



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0068855
(43) 공개일자 2016년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/24 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7011945
(22) 출원일자(국제) 2014년10월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년05월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/060182
(87) 국제공개번호 WO 2015/054670
국제공개일자 2015년04월16일
(30) 우선권주장
61/890,147 2013년10월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
린, 쉼-옌, 잭
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
키르호퍼, 다니엘, 케이.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
반 로케렌 캄파뉴, 멘노
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 이귀동

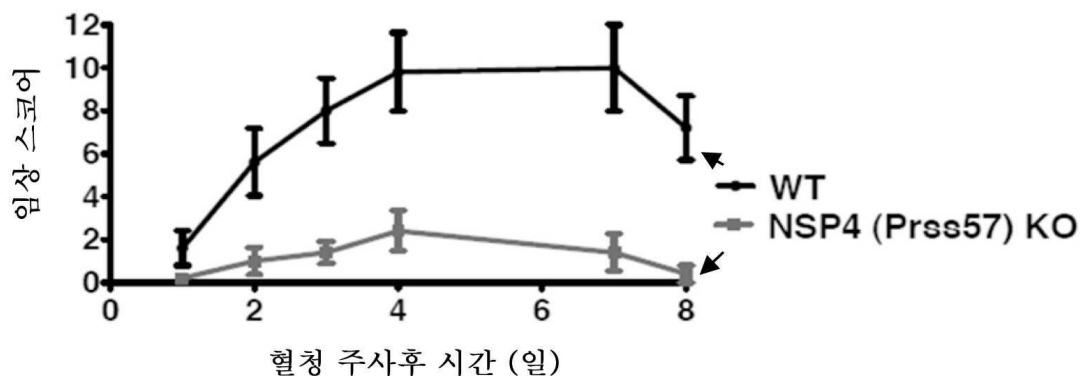
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 NSP4 억제제 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 NSP4 억제제 (예컨대 항-NSP4 항체) 및 그의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도11a



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/893,059 2013년10월18일 미국(US)

62/053,052 2014년09월19일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서

(a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나;

(b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95)의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L인 HVR-L3을 포함하는 것인

항-NSP4 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, HVR-L3이 서열 12 및 92-94로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 102의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 103의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 104의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 7

(a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95)의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L인 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체.

청구항 8

중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서

(a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KRHLHNVAFDY (서열 87)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나;

(b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQAYSAPPT (서열 96)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 것인

항-NSP4 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 106의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 10

(a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KRHLHNVAFDY (서열 87)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQAYSAPPT (서열 96)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체.

청구항 11

중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서

(a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 는 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F인 HVR-H3을 포함하고/거나;

(b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 $QQX_1X_2X_3X_4$ PPT (서열 101)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 는 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 는 T, A, 또는 S인 HVR-L3을 포함하는 것인

항-NSP4 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, HVR-H3이 서열 67, 89 및 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, HVR-L3이 서열 12 및 97-100으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 14

제11항에 있어서,

(a) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 67의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 12의 서열을 포함하는 HVR-L3;

(b) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 88의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 67의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 97의 서열을 포함하는 HVR-L3;

(c) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 67의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 98의 서열을 포함하는 HVR-L3;

(d) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 89의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 97의 서열을 포함하는 HVR-L3;

(e) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 90의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 99의 서열을 포함하는 HVR-L3;

(f) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 67의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 97의 서열을 포함하는

HVR-L3; 또는

(g) 서열 65의 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 66의 서열을 포함하는 HVR-H2, 서열 89의 서열을 포함하는 HVR-H3, 서열 19의 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 11의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 100의 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 항체.

청구항 15

제11항에 있어서, 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 16

제11항에 있어서, 서열 107의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 17

제11항에 있어서, 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 109의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 18

제11항에 있어서, 서열 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 19

제11항에 있어서, 서열 111의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 112의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 20

제11항에 있어서, 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 21

제11항에 있어서, 서열 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 113의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 22

(a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 는 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F인 HVR-H3; 및 (c) QQX₁X₂X₃X₄PPT (서열 101)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 는 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 는 T, A, 또는 S인 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체.

청구항 23

NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항-NSP4 항체.

청구항 24

NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 항-NSP4 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 항체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역을 포함하는 항체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4의 성숙 형태에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 29

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4의 성숙 형태에는 특이적으로 결합하지만 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않는 항체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 NSP4에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 NSP4에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 32

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 NSP4 및 마우스 NSP4 둘 다에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 34

제33항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 35

제33항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 36

제35항의 숙주 세포를 항체의 생산에 적합한 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 숙주 세포에 의해 생산된 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항의 방법에 의해 생산된 항-NSP4 항체.

청구항 39

제1항 내지 제32항 및 제38항 중 어느 한 항의 항-NSP4 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제32항 및 제38항 중 어느 한 항의 항체의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 과

립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 항체가 NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 항체가 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 것인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항체 및 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 항체의 유효량을 개체에게 투여하는 방법.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 호중구-매개, 호산구-매개, 또는 호염기구-매개 질환 또는 장애인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 호중구-매개 질환 또는 장애가 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 혈관 질환이 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 염증성 질환이 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 및 패혈성 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 48

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 특발성 폐 섬유증, 천식, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 수포성 피부 질환, 수포성 유천포창, 염증성 피부 질환, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염, 암, 폐암, 신장 질환, 사구체신염, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환, 궤양성 결장염, 및 크론병으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 49

제40항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 50

제40항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로, 또는 비강내로 투여하는 방법.

청구항 51

제40항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체가 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로 제제화된 것인 방법.

청구항 52

NSP4 억제제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 질환 또는 장애가 호중구-매개, 호산구-매개, 또는 호염기구-매개 질환 또는 장애인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 호중구-매개 질환 또는 장애가 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 혈관 질환이 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 염증성 질환이 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 및 패혈성 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 57

제52항에 있어서, 질환 또는 장애가 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 특발성 폐 섬유증, 천식, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 수포성 피부 질환, 수포성 유천포창, 염증성 피부 질환, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염, 암, 폐암, 신장 질환, 사구체신염, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환, 궤양성 결장염, 및 크론병으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 58

제52항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 인간인 방법.

청구항 59

제52항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 항체, 안티센스 분자, siRNA, 소분자 억제제, 프로테아제 억제제, 및 펩티드 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 프로테아제 억제제가 세린 프로테아제 억제제인 방법.

청구항 61

제59항에 있어서, 프로테아제 억제제가 $\alpha 1$ -항트립신, 헤파린-활성화 항트롬빈, C1 억제제, 또는 $\alpha 2$ -항플라스민인 방법.

청구항 62

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 63

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 NSP4의 성숙 형태에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 64

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 NSP4의 성숙 형태에는 특이적으로 결합하지만 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 65

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 인간 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 66

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 마우스 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 67

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, NSP4 억제제가 인간 NSP4 및 마우스 NSP4 둘 다에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체인 방법.

청구항 68

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 69

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체가 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편인 방법.

청구항 70

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체가 인간화 항체 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 71

제62항에 있어서, 항-NSP4 항체가 (i) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; (iii) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; (iv) 서열 1, 4, 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (v) 서열 2, 5, 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (vi) 서열 3, 6, 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 항-NSP4 항체가 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 13, 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 73

제52항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체 또는 NSP4 억제제를 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로, 또는 비강내로 투여하는 방법.

청구항 74

제52항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 항-NSP4 항체 또는 NSP4 억제제가 (a) 항-NSP4 항체 또는 NSP4 억제제 및 (b) 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로 제제화된 것인 방법.

청구항 75

제1항 내지 제32항 및 제38항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 제조 물품.

청구항 76

제75항에 있어서, 개체에서 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 항체를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함하는 물품.

청구항 77

제76항에 있어서, 질환 또는 장애가 호산구-매개, 호염기구-매개, 또는 호중구-매개 질환 또는 장애인 물품.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2013년 10월 11일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/890,147; 2013년 10월 18일에 출원된 61/893,059; 및 2014년 9월 19일에 출원된 62/053,052의 우선권 이익을 주장하고; 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출
- [0004] ASCII 텍스트 파일의 하기 제출 내용: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 146392022740SEQLIST.txt, 기록 일자: 2014년 10월 8일, 크기: 63 KB)는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 NSP4 억제제 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 호중구 세린 프로테아제는 침입 병원체에 대해 보호하는데 중요한 선천성 면역계의 이펙터 분자 패밀리아다. 이러한 트립신-폴드 프로테아제 패밀리의 구성원, 호중구 엘라스타제 (NE), 카텝신 G (CG), 및 프로테이나제 3 (PR3)은 침입 미생물 (Reeves et al., Nature, 2002, 416:291-297; Weinrauch et al., Nature, 2002, 417:91-94; Belaaouaj et al., Nat Med, 1998, 4:615-618) 및 염증 (Pham et al., Nat Rev Immunol, 2006, 6:541-550)의 호중구-매개 클리어런스에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 다양한 질환의 발병기전에 참여할 수 있다 (Magrone et al., Curr Pharm Des., 2012, 18(12):1609-19 및 Pham et al., Int J Biochem Cell Biol., 2008, 40(6-7):1317-1333). 최근에, 인간 cDNA 라이브러리의 효모 신호 포획 스크리닝 및 컴퓨터 마이닝에 의해 최초로 발견된 세린 프로테아제 PRSS57 (Clark et al., Genome Res., 2003, 13:2265-2270)이 제4 NSP 구성원으로서 확인되었고, 이어서 호중구 세린 프로테아제 4 (NSP4)로 지칭되었다 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234; Perera et al., J Immunol., 2013). 놀랍게도, NSP4는 경골 어류에서 인간에 이르기까지 고도로 보존되어 있고, 다른 NSP의 출현에 선행하며, 이는 NSP4가 호중구 생물학에서 근본적인 역할을 할 가능성이 있음을 나타낸다 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234; Perera et al., Expert Rev Clin Immunol, 2012, 8:501-503).
- [0008] NE, CG, 및 PR3의 상대적으로 넓은 기질 특이성은 그의 활성 부위 구조에 대한 세부 지식에 기초하여 널리 이해되어 있다 (Navia et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:7-11; Hof et al., EMBO J, 1996, 15:5481-5491; Fujinaga et al., J Mol Biol, 1996, 261:267-278.). 그러나, NSP4는 트립신과 마찬가지로 아르기닌 잔기 다음에서 기질을 절단하지만 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234; Perera et al., J Immunol., 2013), 모순적으로 소형 지방족 아미노산을 선호하는 매우 상이한 엘라스타제-유사 활성 부위를 예측하게 하는 1차 서열을 갖고, 긴 P1-아르기닌 측쇄와 상용불가능한 것으로 보인다는 점에서 난제를 제기한다. NSP4의 긴 진화 계열 및 그의 특유의 활성 부위로 인해, NSP4가 호중구 기능을 위한 중요한 프로테아제이고 호중구-매개 질환 또는 장애의 원인이 될 수 있을 가능성이 있다. 그러나, 호중구 세린 프로테아제 패밀리의 다른 구성원에 비해, 호중구-매개 질환, 예컨대 관절염에서의 NSP4의 역할은 공지되어 있지 않다. 예를 들어, NE 및 CG의 복합 결핍은 마우스 콜라겐 항체-유발 관절염 모델에서 완전한 보호를 부여하기 위해 요구된다 (Adkison et al., J Clin Invest, 2002, 109:363-371). NE 및 CG는 또한 염증성 관절염을 촉진하는 염증유발 시토카인인 (Xu et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105:10913-10918) IL-33을 각각 프로세싱 및 활성화시킬 수 있다 (Lefrancais et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:1673-1678). 유사하게, NE 및 PR3의

복합 제거는 염증성 관절염을 완화시키는 항염증 시토키인인 (Tang et al., Science, 2011, 332:478-484) 프로 그래놀린의 불활성화를 방지하기 위해 요구된다 (Kessenbrock et al., J Clin Invest, 2008, 118:2438-2447).

[0009] NSP4에 의해 나타내어진 예측되는 엘라스타제-유사 활성 부위와 실제 트립신-유사 활성 부위 사이의 모순을 해결하는 것은 특이적 NSP4 억제제의 개발을 용이하게 할 수 있는 효소 활성 부위의 구조적 특색을 제공할 잠재력을 갖는다. 이들 NSP4 억제제는 기저 병리상태가 전적으로 또는 부분적으로 NSP4의 활성으로 인한 호중구-매개 질환 또는 장애의 치료를 위한 필요를 충족시킬 수 있다.

[0010] 특허 출원, 특허 공개, 과학 문헌, 및 국립 생물 정보 센터 (NCBI) 수탁 번호를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은, 각각의 개별 참고문헌이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 나타내어지는 것과 같이, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 호중구 세린 프로테아제 4 (NSP4) 억제제 및 그의 사용 방법을 광범위하게 제공한다.

[0012] 한 측면에서, 본원은 NSP4 억제제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 호산구-매개, 호염기구-매개, 또는 호중구-매개 질환 또는 장애이다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, NSP4 억제제에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 장애는 혈관 질환, 염증성 질환 또는 자가면역 질환이다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 천식 (예를 들어, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환 (예를 들어, 수포성 유천포창), 염증성 피부 질환 (예를 들어, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염), 암 (예를 들어, 폐암), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 폐혈성 쇼크, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염, 크론병)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애를 갖거나, 질환 또는 장애로 진단되었다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0013] 한 측면에서, 본원은 NSP4 억제제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 호중구-매개 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, 혈관 질환은 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 실시양태에서, 염증성 질환은 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 및 폐혈성 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 임의의 실시양태에서, 개체는 인간일 수 있다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용될 수 있는 NSP4 억제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 항체, 안티센스 분자, siRNA, 소분자 억제제, 프로테아제 억제제, 및 펩티드 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, 프로테아제 억제제는 세린 프로테아제 억제제이다. 또 다른 추가 실시양태에서, 프로테아제 억제제는 α 1-항트립신, 헤파린-활성화 항트롬빈, C1 억제제, 또는 α 2-항플라스민이다.

[0015] 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4의 성숙 형태에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4의 성숙 형태에는 특이적으로 결합하지만 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 인간 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 마우스 NSP4에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 인간 NSP4 및 마우스 NSP4 둘 다에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 모노클로날 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (i) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하

는 HVR-L1; (ii) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; (iii) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; (iv) 서열 1, 4, 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (v) 서열 2, 5, 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (vi) 서열 3, 6, 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 HVR을 포함할 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 및 서열 13, 14 또는 15의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0016] 본원의 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로, 또는 비강내로 투여될 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4 억제제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로 제제화될 수 있다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 억제제, 및 개체에서 파립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 NSP4 억제제를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 제조 물품을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 호산구-매개, 호염기구-매개, 또는 호중구-매개 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 장애는 혈관 질환, 염증성 질환, 또는 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 천식 (예를 들어, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환 (예를 들어, 수포성 유천포창), 염증성 피부 질환 (예를 들어, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염), 암 (예를 들어, 폐암), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염, 크론병)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애를 갖거나, 질환 또는 장애로 진단되었다. 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 억제제, 및 개체에서 호중구-매개 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 NSP4 억제제를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 포함하는 제조 물품을 제공한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시양태에서, 혈관 질환은 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 추가 실시양태에서, 염증성 질환은 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 및 패혈성 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 임의의 실시양태에서, 개체는 인간일 수 있다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95)의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L인 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95)의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L인 HVR-L3을 포함하는 것인 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, HVR-L3은 서열 12 및 92-94로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0020] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b)

경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.WT의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.WT의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0021] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYGFPLT (서열 92)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYGFPLT (서열 92)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 102의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.14의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.14의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0022] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYDFPLT (서열 93)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYDFPLT (서열 93)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 103의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.50의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.50의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0023] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSAGFPLT (서열 94)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSAGFPLT (서열 94)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 104의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.62의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.62의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0024] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95)의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L인 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b)

RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYGFPLT (서열 92)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYDFPLT (서열 93)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSAGFPLT (서열 94)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KRHLHNVAFDY (서열 87)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQAYSAPPT (서열 96)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KRHLHNVAFDY (서열 87)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQAYSAPPT (서열 96)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 105의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 106의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.77의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 35.77의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0026] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KRHLHNVAFDY (서열 87)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQAYSAPPT (서열 96)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 는 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F인 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) $QQX_1X_2X_3X_4$ PPT (서열 101)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 는 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 는 T, A, 또는 S인 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 는 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F인 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 $QQX_1X_2X_3X_4$ PPT (서열 101)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 는 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 는 T, A, 또는 S인 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, HVR-H3은 서열 67, 89, 및 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HVR-L3은 서열 12 및 97-100으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HVR-H3은 서열 67, 89, 및 90으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, HVR-L3은 서열 12 및 97-100으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0028] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하

는 HVR-H2, 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.WT의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.WT의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0029]

특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 107의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.30의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.30의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0030]

특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQANSTPPT (서열 98)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQANSTPPT (서열 98)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 109의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.50의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.50의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0031]

특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.51의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.51의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0032]

특정 실시양태에서, NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RVFFHNVAFDY (서열 90)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

(f) QQNFSSPPT (서열 99)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RVFFHNVAFDY (서열 90)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQNFSSPPT (서열 99)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 111의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 112의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.59의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.59의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0033] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.72의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.72의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0034] 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQTYNAPPT (서열 100)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQTYNAPPT (서열 100)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 113의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.82의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 5-7에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 51.82의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 7에 제시된 바와 같음).

[0035] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 은 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F인 HVR-H3; 및 (c) $QQX_1X_2X_3X_4$ PPT (서열 101)의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 은 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 은 T, A, 또는 S인 HVR-L3을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQANSTPPT (서열 98)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는

HVR-H2; (b) RVFFHNVAFDY (서열 90)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQNFSSPPT (서열 99)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTAPPT (서열 97)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RGLFHNVAFDY (서열 89)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQTYNAPPT (서열 100)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0036]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGSWIS (서열 20)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GTISPYNGSTYYADSVKG (서열 21)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RVLRPKVYASVMDY (서열 22)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GTISPYNGSTYYADSVKG (서열 21)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RVLRPKVYASVMDY (서열 22)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSWIS (서열 20)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GTISPYNGSTYYADSVKG (서열 21)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RVLRPKVYASVMDY (서열 22)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 68의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-1의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-1의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0037]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGYSIH (서열 23)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AGISPTNGYTDYADSVKG (서열 24)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RLVFYRGVMDY (서열 25)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AGISPTNGYTDYADSVKG (서열 24)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RLVFYRGVMDY (서열 25)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGYSIH (서열 23)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AGISPTNGYTDYADSVKG (서열 24)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RLVFYRGVMDY (서열 25)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 69의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-2의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-2의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0038]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSDNWIS (서열 26)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GYIYPASGYTDYADSVKG (서열 27)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) SDSPHAYWYAMDY (서열 28)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GYIYPASGYTDYADSVKG (서열 27)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) SDSPHAYWYAMDY (서열 28)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNWIS (서열 26)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GYIYPASGYTDYADSVKG (서열 27)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 SDSPHAYWYAMDY (서열 28)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 70의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변

영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0039]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTNNSIS (서열 29)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GAISPNNGSTYYADSVKG (서열 30)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RNAWHYSWVGMDY (서열 31)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GAISPNNGSTYYADSVKG (서열 30)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RNAWHYSWVGMDY (서열 31)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTNNSIS (서열 29)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GAISPNNGSTYYADSVKG (서열 30)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RNAWHYSWVGMDY (서열 31)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 71의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 1-5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0040]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTDYSIH (서열 32)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AEIYPYSGDTYYADSVKG (서열 33)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDGDGWFDWAMDY (서열 34)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AEIYPYSGDTYYADSVKG (서열 33)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDGDGWFDWAMDY (서열 34)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTDYSIH (서열 32)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AEIYPYSGDTYYADSVKG (서열 33)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDGDGWFDWAMDY (서열 34)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 72의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-1의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-1의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0041]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSSTAIS (서열 35)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GEIYPSDGYTDYADSVKG (서열 36)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RVKWAVSSLGVMDY (서열 37)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GEIYPSDGYTDYADSVKG (서열 36)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RVKWAVSSLGVMDY (서열 37)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSSTAIS (서열 35)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GEIYPSDGYTDYADSVKG (서열 36)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RVKWAVSSLGVMDY (서열 37)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 73의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-2의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-2의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0042]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTDSDIS (서열 38)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPSDGYTDYADSVKG (서열 39)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) HEASDDDYAIDY (서열 40)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열

12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPSDGDYADSVKG (서열 39)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) HEASDDDYAIDY (서열 40)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTSDIS (서열 38)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPSDGDYADSVKG (서열 39)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 HEASDDDYAIDY (서열 40)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 74의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0043]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSDYWIS (서열 41)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AGISPNNGDTYYADSVKG (서열 42)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) REDDDERDYAMDY (서열 43)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AGISPNNGDTYYADSVKG (서열 42)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) REDDDERDYAMDY (서열 43)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDYWIS (서열 41)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AGISPNNGDTYYADSVKG (서열 42)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 REDDDERDYAMDY (서열 43)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 75의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-4의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-4의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0044]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTGYGIS (서열 44)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GWIYPASGATYYADSVKG (서열 45)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RHRAFDWYPYIGSSVMYD (서열 46)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GWIYPASGATYYADSVKG (서열 45)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RHRAFDWYPYIGSSVMYD (서열 46)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTGYGIS (서열 44)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GWIYPASGATYYADSVKG (서열 45)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RHRAFDWYPYIGSSVMYD (서열 46)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 76의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 2-5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0045]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSDYSIS (서열 47)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GEINPAGGATYYADSVKG (서열 48)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RGDFFPWSDAYVMDY (서열 49)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GEINPAGGATYYADSVKG (서열 48)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RGDFFPWSDAYVMDY (서열 49)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함

하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDYSIS (서열 47)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GEINPAGGATYYADSVKG (서열 48)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RGDFPFWSDAYVMDY (서열 49)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 77의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 3-2의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 3-2의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0046]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSDNDIS (서열 50)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 3-5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 3-5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0047]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGSDIS (서열 53)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GEIYPSNGDTYYADSVKG (서열 54)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RSVRPSWWAMDY (서열 55)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GEIYPSNGDTYYADSVKG (서열 54)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RSVRPSWWAMDY (서열 55)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSDIS (서열 53)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GEIYPSNGDTYYADSVKG (서열 54)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RSVRPSWWAMDY (서열 55)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 79의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-2의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-2의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0048]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSSYDIS (서열 56)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GTISPYDGYTDYADSVKG (서열 57)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RYIRRYSVHYGMDY (서열 58)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GTISPYDGYTDYADSVKG (서열 57)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RYIRRYSVHYGMDY (서열 58)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSSYDIS (서열 56)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GTISPYDGYTDYADSVKG (서열 57)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RYIRRYSVHYGMDY (서열 58)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 80의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-3의 적

어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0049]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTSTSIH (서열 59)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AEITPHGGYTNVADSVKG (서열 60)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RGRTKWGWLYGMDY (서열 61)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AEITPHGGYTNVADSVKG (서열 60)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RGRTKWGWLYGMDY (서열 61)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTSTSIH (서열 59)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AEITPHGGYTNVADSVKG (서열 60)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RGRTKWGWLYGMDY (서열 61)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 81의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-4의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-4의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0050]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTNNSIH (서열 62)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AEIAPDDGYTYADSVKG (서열 63)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RGVIRYAYLYAMDY (서열 64)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AEIAPDDGYTYADSVKG (서열 63)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RGVIRYAYLYAMDY (서열 64)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTNNSIH (서열 62)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AEIAPDDGYTYADSVKG (서열 63)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RGVIRYAYLYAMDY (서열 64)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 82의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-5의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 4-5의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0051]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGSGIH (서열 65)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 83의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-1의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-1의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0052]

또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSNTYIS (서열 1)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) GFIYPANGATYYADSVKG (서열

2)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RRYRLSFDY (서열 3)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) GFIYPANGATYYADSVKG (서열 2)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RRYRLSFDY (서열 3)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSNTYIS (서열 1)의 서열을 포함하는 HVR-H1, GFIYPANGATYYADSVKG (서열 2)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RRYRLSFDY (서열 3)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 84의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-2의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-2의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0053] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFSGNDIS (서열 4)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFSGNDIS (서열 4)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 85의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-3의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-3의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0054] 또 다른 측면에서, 본원은 (a) GFTFTSYAIS (서열 7)의 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) RAGRWITHSDIDY (서열 9)의 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 (a) AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8)의 서열을 포함하는 HVR-H2; (b) RAGRWITHSDIDY (서열 9)의 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (c) QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서 (a) 중쇄는 GFTFTSYAIS (서열 7)의 서열을 포함하는 HVR-H1, AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8)의 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 RAGRWITHSDIDY (서열 9)의 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/거나; (b) 경쇄는 RASQDVS (서열 19)의 서열을 포함하는 HVR-L1, SASFLYS (서열 11)의 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 QQSYTTPPT (서열 12)의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 서열 86의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-4의 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 3 및 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음). 특정 실시양태에서, 항체는 항체 5-4의 중쇄 가변 영역 서열 및/또는 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다 (예를 들어, 표 4 및 서열 19, 11, 및 12에 제시된 바와 같음).

[0055] 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 서열 114의 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함한다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 서열 115의 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다.

[0056] 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 환

성 부위에 특이적으로 결합하고 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0058] 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 및 (Fab')₂ 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 단편이다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역을 포함한다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4의 성숙 형태에 특이적으로 결합한다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4의 성숙 형태에는 특이적으로 결합하지만 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않는다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 인간 NSP4에 특이적으로 결합한다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 마우스 NSP4에 특이적으로 결합한다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 인간 NSP4 및 마우스 NSP4 둘 다에 특이적으로 결합한다.

[0059] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 숙주 세포를 항체의 생산에 적합한 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항체를 생산하는 방법은 본원에 기재된 숙주 세포에 의해 생산된 본원에 기재된 항체를 회수하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 항체를 생산하는 방법에 의해 생산된 항체를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0060] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁한다. 특정 실시양태에서, NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항체 및 NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁하는 항체의 유효량이 개체에 투여된다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 호중구-매개, 호산구-매개, 또는 호염기구-매개 질환 또는 장애이다. 특정 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 혈관 질환은 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 염증성 질환은 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 및 패혈성 쇼크로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 특발성 폐 섬유증, 천식, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 수포성 피부 질환, 수포성 유천포창, 염증성 피부 질환, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염, 암, 폐암, 신장 질환, 사구체신염, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환, 궤양성 결장염, 및 크론병으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 개체는 인간이다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항체는 정맥내로, 근육내로, 피하로, 국소로, 경구로, 경피로, 복강내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 뇌실내로, 또는 비강내로 투여된다. 임의의 상기 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물로 제제화된다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 기재된 임의의 항체를 포함하는 제조 물품을 제공한다. 특정 실시양태에서, 제조 물품은 개체에서 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 항체를 사용하는 것에 대한 지침을 포함하는 패키지 삽입물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 호산구-매개, 호염기구-매개, 또는 호중구-매개 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체에 의해 치

료될 수 있는 질환 또는 장애는 혈관 질환, 염증성 질환, 또는 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 졸증, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 천식 (예를 들어, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환 (예를 들어, 수포성 유천포창), 염증성 피부 질환 (예를 들어, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염), 암 (예를 들어, 폐암), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염, 크론병)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애를 갖거나, 질환 또는 장애로 진단되었다. 일부 실시양태에서, 개체는 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 개체는 인간이다.

[0062] 본원에 기재된 다양한 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 전부가 조합되어 본 발명의 다른 실시양태를 형성할 수 있는 것으로 이해된다. 본 발명의 이들 및 다른 측면은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하게 될 것이다. 본 발명의 이들 및 다른 실시양태는 하기 상세한 설명에 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 NSP4 오르토로그의 활성 영역의 서열 정렬이다. 잔기는 상단에서 키모트립시노젠 넘버링 시스템에 의해 넘버링된다. 디술피드 결합은 하단에서 선으로 표시된다. 보존된 잔기는 클러스탈엑스(ClustalX) 스킴에 의해 색으로 표시된다. 190, 192, 및 216 위치의 NSP4 1차 기질 특이성 결정기를 표시하고 약술한다. P1-아르기닌 측쇄를 조정하는 180-루프 (¹⁹⁰FCS¹⁹²) 및 220-루프 (²¹⁴SFGxxC²²⁰) 절편의 길이가 또한 NSP4 오르토로그에 보존되어 있고, 상단에서 흑색 바로 표시된다. 2개 이상의 NSP4 파라로그가 태즈메이니아 데빌, 개구리 (엑스. 라에비스(X. laevis) 및 엑스. 트로피칼리스(X. tropicalis)), 및 실러캔스에서 발견되고; 일부 파라로그는 192 위치에서 치환을 갖지만, 모든 종은 모든 필수적인 H-결합 수용자를 갖는 적어도 1개의 파라로그를 갖는다. 파충류 및 조류 종은 진실한 호중구 대신 이중친화백혈구를 갖고, 그의 NSP4 오르토로그는 F190V 치환을 갖는다. 조류 NSP4 오르토로그는 S192A 치환으로 인해 감소된 활성을 가질 것으로 예측되고, C201F 치환으로 인해 고립된 쌍형성되지 않은 C136을 갖는다. NSP4 오르토로그 서열은 국립 생물 정보 센터 (NCBI) 및 ENSEMBL 데이터베이스로부터 컴파일링되고, 클러스탈더블유(ClustalW)에 의해 정렬된다 (Larkin et al., Bioinformatics, 2007, 23:2947-2948). 이어서 예비 정렬이 수동으로 관찰되고, SeaView (Gouy et al., Mol Biol Evol, 2010, 27:221-224) 및 Unipro UGENE (Okonechnikov et al., Bioinformatics, 2012, 28:1166-1167)에 의해 분석된다.

도 2a-2d는 NSP4가 트립신-유사 아르기닌 특이성과 함께 엘라스타제-유사 활성 부위를 가짐을 보여준다. a) NSP4 S1 포켓의 개략도. b) 트립신, 키모트립신, 및 호중구 엘라스타제 S1 포켓 및 바람직한 P1 잔기와 그의 상호작용의 개략도. 트립신-유사 프로테아제는 깊은 S1 포켓을 갖고, 기질 P1-아르기닌과 S1 포켓 기저의 보존된 D189 사이에 염 가교 상호작용을 형성한다 (파선). 키모트립신-유사 프로테아제는 벌키 P1 잔기를 수용하기 위한 큰 소수성 포켓을 갖는다. 엘라스타제-유사 프로테아제는 작은 지방족 P1 잔기를 수용하기 위한, 216 및 190 위치의 잔기에 의해 형성된 얇은 S1 포켓을 갖는다. c) 곤충 (바쿨로바이러스(Baculovirus) 발현 벡터 시스템; BEVS) 또는 포유동물 세포 (차이니스 햄스터 난소; CHO)로부터 생산된 재조합 야생형 (WT) 또는 불활성 (S195A) NSP4로 처리된, 상이한 P1 잔기를 갖는 형광원성 펩티드 기질 패널의 사용에 의한 NSP4 P1 기질 특이성의 프로파일링. P1-Arg 펩티드: WT (BEVS) $k_{cat}/K_M = 1.1 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 및 WT (CHO) $k_{cat}/K_M = 7.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. d) NSP4 S1 포켓 돌연변이체에 의한 형광원성 펩티드의 절단. 활성은 초당 형성된 나노몰 생성물 (nM/s)로 측정된다. 결과는 적어도 3회의 독립적 실험으로부터의 평균 $\pm$ 표준 편차이다.

도 3a-3b는 NSP4가 폐색된 S1 포켓 및 P1-아르기닌과의 비-정규 상호작용을 특색으로 함을 보여준다. a) NSP4 결정 구조의 중첩: NSP4-apo 형태 1, NSP4-apo 형태 2, NSP4:FFR-cmk, 및 NSP4:VLK-cmk. 별표는 촉매 트리아드 잔기를 나타낸다. b) 상단 좌측, 정규 트립신-유사 프로테아제, 인자 VIIa, PDB 1DAN에 결합된 FFR-cmk (스틱). 상단 우측, NSP4에 결합된 FFR-cmk (스틱). 하단 좌측, 트립신-유사 프로테아제 (리본)에 결합된 10종의 상이한 P1-아르기닌 리간드 (스틱)와 중첩된 정규 S1 포켓의 측면도. 제시된 구조는 1DAN, 1SHH, 1ORF, 1AUT, 1PFx, 2FIR, 1LMW, 1BUI, 2B80, 1BDA이다. 하단 우측, NSP4에 결합된 FFR-cmk (스틱)의 측면도.

도 4a-4b는 NSP4가 이온 상호작용을 통해 헤파린에 결합하는 염기성 패치를 보유함을 보여준다. a) -5에서 5 kT/e까지 윤곽표시되는 포아송-볼츠만 정전기 계산에 의해 음영표시된 바와 같은 NSP4의 표면 표현. S1은 폐색된 S1 포켓을 나타낸다. b) 상이한 이온 조건에서의 형광 편광에 의해 (좌측) 및 0.15M NaCl 조건에서의 천연

폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 (우측) 결정된 플루오레세인-접합된 헤파린에 대한 NSP4 결합.

도 5는 NSP4 활성 부위에서의 대표적인 전자 밀도를 보여준다. NSP4 활성 부위의 1.5σ 에서 윤곽표시된 σA -가중 2mFo-DFc 전자 밀도 지도. 220-루프 잔기 ²¹⁴SFSGLCW²²⁰, 180-루프 잔기 ¹⁹⁰FCS¹⁹², 촉매 잔기 H57 및 S195가 표시된다. S1 포켓을 폐색시키는 S216 및 F190 잔기는 스틱으로 표시된다. 결합된 FFR-cmk 및 VLK-cmk는 스틱으로 표시된다.

도 6a-6d는 P1-아르기닌이 "업" 입체형태에서 H-결합 네트워크에 의해 안정화됨을 보여준다. a) NSP4 및 인자 VIIa (PDB 1DAN) 내에서의 P1-아르기닌의 구조적 중첩. b) NSP4 내에서의 P1-아르기닌 잔기 (P1-Arg) 주위의 H-결합 네트워크. c) NSP4 수소 결합 돌연변이체에 의한 형광원성 펩티드의 절단. d) NSP4 또는 인자 Xa (FXa)에 의한 P1-아르기닌 및 P1-메틸아르기닌을 갖는 형광원성 펩티드의 절단.

도 7은 P1-리신보다 P1-아르기닌에 대한 NSP4 선호도의 구조적 근거를 보여준다. NSP4:FFR-cmk 구조 내의 P1-아르기닌은 H-결합 수용자 S216 및 S192 측쇄 및 G217 백본 카르보닐 산소에 의해 조정되는 H-결합의 네트워크에 의해 안정화된다. 대조적으로, NSP4:VLK-cmk 구조 내의 P1-리신은 NSP4 상의 H-결합 수용자의 전체 정원과 맞물리지 못한다.

도 8은 액체 크로마토그래피-질량 분광측정법 (LC-MS)에 의한 변형된 P1-아르기닌 형광원성 펩티드 기질의 NSP4 또는 FXa 절단의 확인을 보여준다. NSP4 (50nM)에 의한 또는 인자 Xa (FXa, 200nM)에 의한 P1-아르기닌 (P1-Arg, 좌측 패널) 또는 P1-메틸아르기닌 (P1-Arg(Me), 우측 패널) 형광원성 펩티드 기질의 절단을 LC-MS의 사용에 의해 확인하였다. 전체 이온 전류에서 측정된 피크는 역상 HPLC 상에서 분리된 전장 또는 가수분해된 펩티드 단편을 나타낸다. 펩티드 단편의 아이덴티티 및 그의 추론되는 질량을 나타낸다. P1-Arg(Me)는 FXa 절단에 불응성이고; FXa의 경우에 P1-Arg(Me) 펩티드에서 관찰되는 피크는, NSP4의 경우에 관찰되는 ¹IR{Arg(Me)}³↓⁴SSYSFKK¹⁰ 대신 ¹IR²↓³{Arg(Me)}SSYSFKK¹⁰에서 일어난, 이동된 P1 절단 이벤트를 나타낸다.

도 9a-9c는 NSP4^{-/-} 마우스의 특징화를 보여준다. a) 이전에 기재된 바와 같은 (Tang et al., Nat Biotechnol, 2010, 28:749-755), 상동 재조합에 의해 NSP4^{-/-} 마우스를 생성하기 위한 표적화 전략. b) NSP4^{-/-} 마우스에서의 NSP4 제거는 전체 골수 세포로부터, 3개의 별개의 NSP4 프라이머 (PRSS57_1, PRSS57_2, PRSS57_3)를 사용하는 RT-qPCR에 의해 확인되었다. 이웃 프로테아제 유전자, 호중구 엘라스타제 (Elane), 그랜자임 M (Gzmm), 프로테이나제 3 (Prtn3), 및 보체 인자 D (Cfd)의 발현이 또한 분석되었다. 모든 유전자 발현 수준은 포유동물 18S rRNA (dCt)에 대한 그의 상대적 존재비에 의해 정량화된다. c) 생존 전체 골수 세포 및 분류된 B 세포 (B220⁺), 골수 세포 (B220⁻/CD11b⁺), 단핵구 (B220⁻/CD11b⁺/Ly6C^{hi}) 및 호중구 (B220⁻/CD11b⁺/Ly6G^{hi}) 세포의 카운팅.

도 10a-10b는 NSP4가 K/BxN 혈청-유발 혈관 누출에 필요하다는 것을 보여준다. 형광 프로브 안지오센스 (AngioSense) 680을 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사하여 (-5분에), 5분 동안 평형화되게 한 다음, K/BxN 관절염 성 혈청을 정맥내 주사하였다 (0분에). a) 야생형 및 NSP4^{-/-} 마우스로부터의 앞발의 대표적인 근적외선 형광 영상화. 혈관 누출은 야생형 마우스 앞발에서 5분부터 관찰할 수 있었다 (화살표). b) 군당 표지된 n = 5 마우스로서, 야생형 마우스 또는 NSP4^{-/-} 마우스의 평균 형광 강도에서의 배수 변화의 개별 정량화.

도 11a-11c는 NSP4가 K/BxN 혈청-유발 관절염에 필요함을 보여준다. a) 야생형 (원형) 및 NSP4^{-/-} (사각형) 마우스에서 전신 K/BxN 혈청 주사 후 마우스 발의 임상 스코어. 데이터는 군당 n = 4 마우스의 평균 ± SEM으로서 나타내어진다. b) 실험 종점에서의 마우스 발의 조직학적 병변 스코어. 군당 n = 4 마우스의 각각의 마우스의 모든 4개의 발을 반절편으로 검사하고, 염증, 섬유증식증, 연골 손상 및 골 재형성에 대해 0 (병변 없음)에서 5 (중증 병변)의 규모로 스코어링하였다. 야생형 마우스는 경도 내지 중등도 병변 (평균 조직학적 병변 스코어, 3.4, 3.0, 2.1, 2.2)을 가진 반면에, NSP4^{-/-} 마우스는 본질적으로 보호되었다 (평균 조직학적 병변 스코어, 0.70, 0.80, 0.00, 0.78). 모든 4종의 조직학적 병변 스코어 카테고리에 대한 군별 비교는 p < 0.0001로 통계적 유의성에 도달하였다. c) 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 야생형 (좌측) 및 NSP4^{-/-} (우측) 마우스 앞발의 대표적인 조직학적 절편. 상단: 야생형 마우스는 광범위한 관절주위 염증 세포 침윤 (화살표) 및 섬유증식증과 함께 상당한 연부 조직 종창을 가졌다. 중간: 야생형 발 병변은 관절내 삼출물 (별표), 골막 골용해 (화살촉), 및 염증 세포 침윤 (이중 화살표)을 포함하였다. 하단: 야생형 마우스는 밀집된 관절주위 염증 세포

침윤을 가졌다. NSP4^{-/-} 마우스는 어떠한 조직 종창도 나타내지 않았고 (상단), 정상 관절 아키텍처를 유지하였고 (중간), 최소 세포 침윤물을 가졌다 (하단).

도 12는 파지 디스플레이에 의한 입체형태-특이적 NSP4 항체의 생성에 사용된 NSP4의 전구체 형태 (지모겐) 및 NSP4의 성숙 형태 (활성)의 다이어그램이다. hZ는 인간 NSP4의 전구체 형태를 나타내고; mZ는 마우스 NSP4의 전구체 형태를 나타내고; hA는 인간 NSP4의 성숙 형태를 나타내고; mA는 마우스 NSP4의 성숙 형태를 나타낸다.

도 13은 항체 5-2, 5-3, 및 5-4의 중쇄 가변 영역의 CDR 서열의 다이어그램이다. 도면에 도시된 서열은 서열 목록에서 하기와 같이 확인된다: 파지 클론 5-2에 대한 CDRH1, 서열 1; 파지 클론 5-2에 대한 CDRH2, 서열 2; 파지 클론 5-2에 대한 CDRH3, 서열 3; 파지 클론 5-3에 대한 CDRH1, 서열 4; 파지 클론 5-3에 대한 CDRH2, 서열 5; 파지 클론 5-3에 대한 CDRH3, 서열 6; 파지 클론 5-4에 대한 CDRH1, 서열 7; 파지 클론 5-4에 대한 CDRH2, 서열 8; 및 파지 클론 5-4에 대한 CDRH3, 서열 9.

도 14a-14c는 생물층 간섭측정법 실험에서 마우스 NSP4의 성숙 형태에 대한 항체 a) 5-2, b) 5-3, 및 c) 5-4의 특이적 결합을 보여주는 일련의 그래프를 보여준다. hZ는 인간 NSP4의 전구체 형태를 나타내고; mZ는 마우스 NSP4의 전구체 형태를 나타내고; hA는 인간 NSP4의 성숙 형태를 나타내고; mA는 마우스 NSP4의 성숙 형태를 나타낸다.

도 15는 항체 5-2, 5-3, 및 5-4가 형광원성 기질 검정에서 마우스 NSP4의 프로테아제 활성을 특이적으로 차단한다는 것을 보여주는 그래프이다. hNSP는 성숙 인간 NSP4를 나타낸다. mNSP는 성숙 마우스 NSP4를 나타낸다.

도 16a-16c는 4마리의 야생형 (WT) 및 4마리의 NSP4-결핍 마우스 (NSP4 PRSS57 KO)로부터 분리된 4개의 별개의 분류된 골수 세포 분획의 mRNA 측정치를 보여주는 일련의 그래프를 보여준다. 야생형 마우스에서의 전사체 수준은 원형으로 나타내고, NSP4-결핍 마우스에서의 전사체 수준은 사각형으로 나타낸다. 3개의 상이한 엑손 접합부에 걸쳐 있는 3개의 상이한 NSP4/Prss57 프라이머/프로브 세트를 사용하였다: a) 엑손 1-2에 걸쳐 있음, b) 엑손 2-3에 걸쳐 있음, c) 엑손 3-4에 걸쳐 있음.

도 17은 4종의 상이한 마우스 골수계 세포 유형 (호중구, 호산구, 비만 세포, 및 대식세포)에서 NSP4 단백질의 존재를 검출하기 위해 수행된 일련의 웨스턴 블롯이다. 단백질 용해물의 동등량 (10 ug/레인)을 로딩하고, 토끼 항-마우스 NSP4 폴리클로날 항체를 사용하여 NSP4를 검출하였다. 마우스 골수-유래 호중구, 호산구, 비만 세포, 및 대식세포는 3마리의 야생형 (WT) 및 3마리의 NSP4 (Prss57)-결핍 (KO) 마우스 골수로부터 분리하였다.

도 18a-18c는 NSP4가 호중구 동원에 필요하다는 것을 보여준다. a) 표시된 시점에서의 전신 K/BxN 혈청 주사 후의 마우스 발의 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 활성의 루미놀-기반 생물발광 영상화. 야생형 (WT) 또는 NSP4-결핍 (KO) 마우스를 표시한 바와 같이 시험하고, cm²당 분당 광자 카운트 (cpm)로 정량화하였다. b) 야생형 (WT) 및 NSP4-결핍 (KO) 마우스로부터 분리된 전체 마우스 골수-유래 호중구 용해물을 사용한 MPO 및 대조 단백질 베타 액틴의 웨스턴 블롯. 각각의 레인은 유전자형당 3마리의 마우스로부터의 풀링된 용해물을 나타낸다. c) 야생형 (WT) 또는 NSP4-결핍 (NSP4KO) 마우스 (n=3)에서 K/BxN 혈청 주사 후의 마우스 발의 루미놀-기반 생물발광의 대표적인 그래프.

도 19는 파지 IC50 검정에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 추정치를 보여준다. 2ug/ml의 NSP4로 코팅된 웰에 농기 전 가용성 NSP4 단백질과 사전인큐베이션된 파지 클론의 검출에 이어서, 0.02% 트윈(Tween)-20으로 보충된 포스페이트 완충 염수를 사용한 웰의 세척. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4. 보다 높은 친화도 클론이 보다 낮은 가용성 NSP4 농도에서 가용성 NSP4에 결합하고, 따라서 좌측으로 이동된 곡선을 갖는다.

도 20a-20b는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 1-1 (a) 및 1-2 (b) (둘 다 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표시된 바와 같음.

도 21a-21b는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 1-3 (a) 및 1-5 (b) (둘 다 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표시된 바와 같음.

도 22a-22d는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 2-1 (a), 2-2 (b), 2-3 (c), 및 2-4 (d) (모두 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표지된 바와 같음.

도 23은 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 2-5 (인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표지된 바와 같음.

도 24a-24b는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 3-2 (a) 및 3-5 (b) (둘 다 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표지된 바와 같음.

도 25a-25c는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 4-2 (a), 4-3 (b), 및 4-4 (c) (모두 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표지된 바와 같음.

도 26a-26d는 생물층 간섭측정법에 의한 NSP4 항체 클론 친화도의 결정을 보여준다. 정제된 NSP4 단백질의 상이한 변이체에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 5-1 (a), 5-2 (b), 5-3 (c), 및 5-4 (d) (모두 인간 IgG1 포맷) 결합의 생물층 간섭측정법 측정치. hZ, 인간 지모겐 NSP4; mZ, 마우스 지모겐 NSP4; hA, 인간 활성 NSP4; mA, 마우스 활성 NSP4; 모두 표지된 바와 같음.

도 27은 활성 NSP4를 사용한 형광원성 활성 검정에 의한 지모겐 NSP4에 대해 패닝된 항체의 스크리닝을 보여준다. 완충제 단독 ("Ab 부재") 또는 상이한 정제된 항-NSP4 항체와 사전인큐베이션된 정제된 인간 활성 NSP4 (회색 바), 마우스 활성 NSP4 (백색 바), 또는 완충제 단독 (효소 부재; 흑색 바)의 형광원성 펩티드 절단 검정.

도 28은 활성 NSP4를 사용한 형광원성 활성 검정에 의한 NSP4 차단 항체에 대한 스크리닝을 보여준다. 완충제 단독 ("Ab 부재") 또는 상이한 정제된 NSP4-특이적 항체와 사전인큐베이션된 정제된 인간 활성 NSP4 (회색 바), 마우스 활성 NSP4 (백색 바), 또는 완충제 단독 (효소 부재; 흑색 바)의 형광원성 펩티드 절단 검정. 별표는 NSP4 효소 활성을 억제하는 항체를 나타낸다.

도 29는 NSP4 항체 특징화의 요약이다. (좌측에서 우측으로): 생물층 간섭측정법에 의한 정제된 NSP4 변이체에 대한 친화도, 생물층 간섭측정법에 의해 결정된 바와 같은 특이성 분류, 및 형광원성 효소 활성 검정에 의한 차단 항체 스크린에 의해 결정된 바와 같은, 정제된 NSP4-특이적 항체의 시험관내 특징화의 요약을 제공한다.

도 30은 Fab 5-1을 사용한 NSP4 항체의 에피토프 맵핑을 보여준다. Fab 5-1의 존재 하에 정제된 마우스 NSP4에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 결합의 생물층 간섭측정법 측정에 의한 마우스-특이적 NSP4 항체의 에피토프 맵핑.

도 31은 헤파린을 사용한 NSP4 항체의 에피토프 맵핑을 보여준다. 헤파린 술페이트의 존재 하에 정제된 마우스 NSP4에 대한 정제된 NSP4-특이적 항체 결합의 생물층 간섭측정법 측정에 의한 마우스-특이적 NSP4 항체의 에피토프 맵핑.

도 32는 범 NSP4 Ab35 항체 클론의 친화도 성숙을 보여준다. 가용성 mNSP4 (상단) 또는 가용성 hNSP4 (하단) 경쟁자를 사용한 파지 IC50 검정에 의해 결정된 바와 같은 Ab 3-5 ("35.WT")를 기반으로 하는 항체의 친화도 개선.

도 33은 입체형태-특이적 NSP4 Ab51 항체 클론의 친화도 성숙을 보여준다. 가용성 mNSP4 경쟁자를 사용한 파지 IC50 검정에 의해 결정된 바와 같은 Ab 5-1 ("51.WT")을 기반으로 하는 항체의 친화도 개선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

본원에 사용된 용어 "호중구 세린 프로테아제 4" 또는 "NSP4"는, 달리 나타내지 않는 한, 임의의 포유동물, 예

컨대 영장류 (예를 들어, 인간, 레서스, 침팬지 NSP4) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)로부터의 임의의 천연 NSP4를 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 NSP4, 예컨대 NSP4의 전구체 또는 지모겐 형태 뿐만 아니라 단백질분해적 절단으로부터 생성된 임의의 형태의 NSP4, 예컨대 NSP4의 성숙 또는 활성 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 NSP4의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 예시적인 인간 NSP4의 아미노산 서열이 서열 17에 제시된다. 또 다른 예시적인 인간 NSP4의 아미노산 서열이 서열 18에 제시된다.

인간 NSP4 서열

MGLGLRGWGRPLLTVALMLPVKPPAGSWGAIIGGHEVTPHSRPYMASVRFGG
QHHC GGFLLRARWVVSAAHCFSHRDLRTGLVVLGAHVLSTAEPTQQVFGIDALTTH
PDYHPMTHANDICLLRLNGSAVLGPAVGLLRPPGRRARPPTAGTRCRVAGWGFVSD
FEELPPGLMEAKVRVLDPDVCNSSWKGHLLTLMCTRSGDSHRRGFCSADSGGPLV
CRNRAHGLVSFSGLWCGDPKTPDVYTQVSAFVAWIWDVVRSSSPQGPLPGTTRPP
GEAA (서열 17)

인간 NSP4 서열

MGLGLRGWGRPLLTVALMLPVKPPAGSWGAIIGGHEVTPHSRPYMASVRFGG
QHHC GGFLLRARWVVSAAHCFSHRDLRTGLVVLGAHVLSTAEPTQQVFGIDALTTH
PDYHPMTHANDICLLRLNGSAVLGPAVGLLRPPGRRARPPTAGTRCRVAGWGFVSD
FEELPPGLMEAKVRVLDPDVCNSSWKGHLLTLMCTRSGDSHRRGFCSADSGGPLV
CRNRAHGLVSFSGLWCGDPKTPDVYTQVSAFVAWIWDVVRSSSPQGPLPGTTRPP
GEAA (서열 18)

[0066]

[0067]

본원에 사용된 용어 "호중구 세린 프로테아제 4 억제제" 또는 "NSP4 억제제"는 시험관내, 계내 및/또는 생체내에서 NSP4 (포유동물, 예컨대 인간 NSP4) 생물학적 활성을 차단, 억제, 감소 (유의하게 감소 포함), 또는 방해하는 분자를 지칭한다. 용어 "억제제"는 어떠한 생물학적 작용의 특정 메커니즘을 의미하지 않고, 직접적이든 간접적이든 관계없이 그리고 NSP4, 그의 기질과 상호작용하는지 또는 또 다른 메커니즘을 통하는지 관계없이, NSP4와의 모든 가능한 약리학적, 생리학적, 및 생화학적 상호작용, 및 다양한 상이하고 화학적으로 다른 조성에 의해 달성될 수 있는 결과를 명백하게 포함하고 포괄한다. 예시적인 NSP4 억제제는 NSP4 또는 NSP4의 전구체 형태 및 성숙 형태 중 어느 하나 또는 둘 다에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체, NSP4를 코딩하는 핵산에 대해 지시되는 안티-센스 분자, NSP4를 코딩하는 핵산에 대해 지시되는 짧은 간섭 RNA ("siRNA") 분자, NSP4 억제 화합물, NSP4 또는 NSP4의 전구체 형태 및 성숙 형태 중 어느 하나 또는 둘 다에 결합하는 RNA 또는 DNA 압타머, 및 NSP4 구조 유사체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제 (예를 들어, 항체)는 NSP4와 결합 (그와 물리적으로 상호작용)하고/거나, NSP4 기질에 결합하고/거나, NSP4 합성, 생산 또는 방출을 억제 (감소)한다. 다른 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4와 결합하고, 그의 기질에 대한 그의 결합을 방지한다. 다른 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4의 발현 (즉, 전사 또는 번역) 또는 단백질분해적 프로세싱을 감소 또는 제거한다. NSP4 억제제의 유형의 예가 본원에 제공된다.

[0068]

본원에 사용된 용어 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 일반적으로 이중-가닥 RNA 분자 또는 짧은 헤어핀 RNA 분자가 이중-가닥 또는 짧은 헤어핀 RNA 분자와 실질적인 또는 전체 상동성을 공유하는 핵산 서열의 발현을 감소 또는 억제하는 과정을 지칭한다. 용어 "짧은 간섭 RNA" 또는 "siRNA" 또는 "RNAi 작용제"는 RNA 간섭을 도출하는 RNA 서열을 지칭한다. WO 00/44895 (Kreutzer et al.); WO 01/36646 (Zernicka-Goetz et al.); WO 99/32619 (Fire); WO 01/29058 (Mello and Fire)을 참조한다. 본원에 사용된 siRNA 분자는 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드 및 비-뉴클레오타이드를 포괄하는 RNA 분자를 포함한다. 용어 "ddRNAi 작용제"는 외인성 벡터로부터 전사된 DNA-지시된 RNAi 작용제를 지칭한다. 용어 "짧은 헤어핀 RNA" 또는 "shRNA"는 듀플렉스 영역 및 루프 영역을 갖는 RNA 구조를 지칭한다. 특정 실시양태에서, ddRNAi 작용제는 처음에 shRNA로 발현된다.

[0069]

본원에 사용된 용어 "압타머"는 목적하는 분자 표적, 예컨대 예를 들어 통상의 대사 보조인자 (예를 들어, 조효소 A, S-아데노실 메티오닌 등), 단백질 (예를 들어, 보체 단백질 C5, 항체 등), 또는 핵산 분자 내의 보존된

구조적 요소 (예를 들어, 전사 인자의 결합에 중요한 구조 등)에 치밀하고 특이적으로 결합할 수 있는 이중 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 압타머는 전형적으로 약 10 내지 약 100개 뉴클레오타이드 길이, 약 10 내지 약 75개 뉴클레오타이드 길이, 약 10 내지 약 50개 뉴클레오타이드 길이, 약 10 내지 약 35개 뉴클레오타이드 길이, 및 약 10 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이 범위의 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 합성 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드는 표준 고체 상 포스포라미다이트 방법 및 장비를 사용하여, 예컨대 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) (캘리포니아주 포스터 시티)로부터 입수가 가능한 3900 고처리량 DNA 합성기™를 사용하는 것에 의해 제조될 수 있다. 압타머는 빈번하게는, 뉴클레아제에 대한 저항성, 결합력을 증가시키거나 또는 달리 그의 약동학적 특성을 변경시키기 위해, 백본 또는 연결 변형 (예를 들어, 펩티드 핵산 (PNA) 또는 포스포티오에이트 연결)을 비롯하여 DNA 및 RNA에서 발견되는 통상적으로 발생하는 뉴클레오타이드의 유도체 또는 유사체 (예를 들어, A, G, C, 및 T/U)를 포함한다. 예시적인 변형이 미국 특허 번호 6,455,308; 4,469,863; 5,536,821; 5,541,306; 5,637,683; 5,637,684; 5,700,922; 5,717,083; 5,719,262; 5,739,308; 5,773,601; 5,886,165; 5,929,226; 5,977,296; 6,140,482; 및 WIPO 공개 WO 00/56746 및 WO 01/14398에 제시되어 있다. 이러한 유사체 또는 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은, 예를 들어 상기 인용된 특허 공개 및 미국 특허 번호 6,455,308; 5,614,622; 5,739,314; 5,955,599; 5,962,674; 6,117,992; 및 WO 00/75372 에 개시되어 있다.

[0070] "차단" 항체는 그것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 감소시키는 것이다. 일부 실시양태에서, 차단 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 일부 실시양태에서, 항원은 NSP4이다.

[0071] 용어 "항-NSP4 항체" 및 "NSP4에 결합하는 항체"는 NSP4를 표적화하는데 있어서 항체가 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 NSP4에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 비관련, 비-NSP4 단백질에 대한 항-NSP4 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 방사선면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의한 측정 시 NSP4에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, NSP4에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 상이한 종으로부터의 NSP4 사이에 보존된 NSP4의 에피토프에 결합한다.

[0072] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0073] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 일부를 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하고, 반대로 참조 항체는 경쟁 검정에서 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.

[0075] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면에, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0076] 항체의 "부류"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5종의 주요 부류의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가로 나뉘어질 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다.

[0077] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0078] 본원의 목적상 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같은, 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임

워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

[0079] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 나타내어질 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 비롯하여, 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위한 구체적인 설명적 및 예시적 실시양태가 하기 기재된다.

[0080] "친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도에서의 개선을 생성하는 변형을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 1개 이상의 초가변 영역 (HVR)에서 1개 이상의 변형을 갖는 항체를 지칭한다.

[0081] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은, EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0082] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0083] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0084] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 1차 형질전환된 세포 및 계대 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.

[0085] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 사용하는 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 구체적으로 제외된다.

[0086] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택 시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 III이다.

[0087] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 그것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 그것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변적이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변

루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 추가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식에 관여한다. 본원에 사용된 바와 같은 HVR 영역은 위치 24-36 (L1의 경우), 46-56 (L2의 경우), 89-97 (L3의 경우), 26-35B (H1의 경우), 47-65 (H2의 경우) 및 93-102 (H3의 경우) 내에 위치한 임의의 번호의 잔기를 포함한다. 따라서, HVR은 이전에 기재된 위치의 잔기를 포함한다:

- [0089] A) 24-34 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));
- [0090] B) 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35B (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- [0091] C) 30-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35 (H1), 47-58 (H2), 93-100a-j (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)).
- [0092] VH 내의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 추가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR, 또는 a-CDR로 불리는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조.) 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인 내의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 상기 문헌 [Kabat et al.]에 따라 본원에서 넘버링된다.
- [0093] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원에 대한 항체의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 추가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.
- [0094] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼, 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0095] "단리된" 항체는 그의 자연 환경의 성분에서 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어, 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의한 결정 시 95% 또는 99% 초과로 순도로 정제된다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.
- [0096] "단리된" 핵산은 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0097] "항-NSP4 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 1개 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 개별 벡터 내의 이러한 핵산 분자(들) 및 숙주 세포 내 1개 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.
- [0098] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 상기 집단을 구성하는 개별 항체는, 일반적으로 소량으로 존재하는 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고, 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 나타

내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하는 다른 예시적인 방법이 본원에 기재되어 있다.

- [0099] "네이키드 항체"는 이중 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.
- [0100] "천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VH)에 이어서 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VL)에 이어서 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2가지 유형 중 1가지로 할당될 수 있다.
- [0101] 용어 "패키지 삽입물"은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보가 담긴, 이러한 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 지침을 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0102] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우에 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환은 서열 동일성 부분으로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 관련 기술분야 기술 내의 다양한 방식으로, 예를 들어 공개적으로 입수가 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 통상의 기술자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가 가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 비롯한 UNIX 운영 시스템에서의 사용을 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.
- [0103] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우에, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B 대비 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B 대비 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)은 하기: X/Y 분율 $\times 100$ 과 같이 계산되며, 여기서 X는 A 및 B의 프로그램 정렬 시 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않을 것임을 인식할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 직전 단락에 기재된 바와 같이 수득한다.
- [0104] 용어 "제약 제제"는 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적하도록 하는 형태로 존재하며, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0105] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "치료"는 임상 병리상태의 과정 동안 치료될 개체 또는 세포의 자연 과정을 변경시키도록 설계된 임상 개입을 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화,

및 경감 또는 개선된 예후를 포함한다. 예를 들어, 장애와 연관된 1종 이상의 증상이 완화 또는 제거된 경우에, 개체는 성공적으로 "치료된" 것이다. 예를 들어, 질환으로부터 발생하는 증상의 감소, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질의 증가, 질환을 치료하는데 필요한 다른 의학의 용량의 감소, 질환 진행의 지연 및/또는 개체의 생존 연장을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 염증성 질환과 연관된 1종 이상의 증상이 완화 또는 제거된 경우에, 개체는 성공적으로 "치료된" 것이다.

[0107] 본원에 사용된 "와 함께"는 한 치료 양식에 더하여 또 다른 치료 양식의 투여를 지칭한다. 이에 따라, "와 함께"는 한 치료 양식을, 개체에게 다른 치료 양식을 투여하기 전에, 그 동안 또는 그 후에 투여하는 것을 지칭한다.

[0108] 본원에 사용된 용어 "방지"는 개체에서 장애의 발생 또는 재발과 관련하여 예방을 제공하는 것을 포함한다. 개체는 장애에 대한 소인이 있거나, 장애에 감수성이거나, 또는 장애가 발생할 위험이 있을 수 있지만, 아직 장애를 진단받지는 않았다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 NSP4 억제제는 장애의 발생을 지연시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 NSP4 억제제는 염증 및/또는 혈관 누출을 방지한다.

[0109] 본원에 사용된 장애가 발생할 "위험이 있는" 개체는 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 갖거나 갖지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법 전에 검출가능한 질환 또는 질환의 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다. "위험이 있는"은 개체가 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 장애의 발생과 상관관계가 있는 측정가능한 파라미터인 1개 이상의 위험 인자를 갖는다는 것을 나타낸다. 이들 위험 인자 중 1개 이상을 갖는 개체는 이들 위험 인자 중 1개 이상을 갖지 않는 개체보다 더 높은 장애 발생 확률을 갖는다.

[0110] "유효량"은 치료 또는 예방 결과를 비롯한 목적 효과 또는 지시된 효과를 달성하기 위한, 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안의, 적어도 유효한 양을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다.

[0111] "치료 유효량"은 특정한 장애의 측정가능한 개선에 요구되는 적어도 최소 농도이다. 본원에서 치료 유효량은 환자의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 도출하는 항체의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 항체의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료상 유의한 효과가 더 큰 것이다. "예방 유효량"은 목적하는 예방 결과를 달성하기 위한, 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안의, 유효한 양을 지칭한다. 반드시서는 아니지만 전형적으로, 예방 용량은 질환의 보다 초기 단계 전에 또는 보다 초기 단계에서 대상체에 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량 미만일 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 용어 "백터"는, 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라, 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 혼입된 백터를 포함한다. 특정 백터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.

[0113] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 할 수 있는, 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "아암"시키고, 이는 상기 메카니즘으로 표적 세포를 사멸시키는데 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 Fc 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있는 것을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.

[0114] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)의, 그의 동족 항원에 결합된 (적절한 하위부류의) 항체와의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 용어 "약"은 이러한 기술 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 값 또는 파라미터 그 자체에 대한 실시양태를 포함 (및 기재)한다.

[0116] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 지시대상을 포함

한다. 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 1 내지 다수의 항체, 예컨대 몰 양에 대한 언급이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 그의 등가물 등을 포함한다.

[0117] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태를 "포함하는", 이들로 "이루어진" 및 이들로 "본질적으로 이루어진" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

[0118] II. 조성물 및 방법

[0119] A. NSP4 억제제

[0120] 본원은 시험관내, 계내 및/또는 생체내에서 NSP4의 효소적 활성을 차단, 억제, 감소 또는 방해하는 NSP4 억제제를 제공한다. NSP4 억제제는 하기 특징: (1) NSP4 효소적 활성을 억제 또는 감소시킴; (2) NSP4의 그의 기질(들)에 대한 결합을 억제 또는 감소시킬 수 있음; (3) NSP4의 클리어언스를 증가시킬 수 있음 (예를 들어, 방출된 NSP4의 세포외 수준을 감소시킴); (4) 호중구, 호염기구 및/또는 호산구로부터의 NSP4 방출을 억제 또는 감소시킬 수 있음; (5) 호중구, 호염기구 및/또는 호산구에서의 NSP4 발현을 (예컨대 mRNA 수준에서 및/또는 단백질 수준에서) 감소시킬 수 있음; (6) NSP4의 전구체 및/또는 성숙 형태와 상호작용하거나, 그에 결합하거나, 또는 그를 인식할 수 있음; (7) 프로테아제 억제제 (예를 들어, $\alpha 1$ -항트립신)에 의한 NSP4의 불활성화를 증진시킬 수 있음; (8) 호중구 엘라스타제 (NE), 카텝신 G (CG), 또는 프로테이나제 3 (PR3) 활성과 특이적으로 상호작용하지 않고, NSP4와 특이적으로 상호작용하거나 그에 결합할 수 있음; (9) 본원에서 기재되거나 고려되는 임의의 측면의 호중구-매개 질환 또는 장애를 치료, 개선 또는 방지할 수 있음; 및 (10) 본원에서 기재되거나 고려되는 임의의 측면의 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료, 개선 또는 방지할 수 있음; 중 1개 이상을 갖는 분자이다.

[0121] NSP4의 생산을 억제하는 예시적인 NSP4 억제제는 비제한적으로, NSP4 합성 및/또는 방출을 특이적으로 억제하는 화합물, NSP4에 대해 지시되는 안티센스 분자, 또는 NSP4를 코딩하는 핵산에 대해 지시되는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 분자와 같은 작용제를 포함한다. NSP4 프로테아제 활성을 억제하는 추가의 예시적인 NSP4 억제제는 비제한적으로, NSP4 (예를 들어, 전구체 NSP4 및/또는 성숙 NSP4)에 특이적으로 결합하는 항-NSP4 항체, 프로테아제 억제제 (예를 들어, 세린 프로테아제 억제제), NSP4 촉매 활성을 특이적으로 억제하는 화합물, 예컨대 소분자 억제제 및/또는 펩티드 억제제, NSP4의 그의 기질(들)에 대한 결합을 특이적으로 억제하는 화합물, NSP4 구조 유사체, 또는 NSP4에 결합하는 RNA 또는 DNA 압타머와 같은 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 알로스테릭 억제제이다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 오르토스테릭 억제제이다.

[0122] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4의 촉매 활성을 감소시키는 프로테아제 억제제이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 프로테아제 억제제는 활성 NSP4 단백질 농도를 감소시킴으로써 NSP4 프로테아제 활성의 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 프로테아제 활성을 억제시킬 수 있는 일군의 단백질로서 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는, 세르핀으로 지칭되는 세린 프로테아제 억제제이다. 예를 들어, 세르핀 단백질은 $\alpha 1$ -항트립신, C1 억제제, 헤파린-활성화 항트롬빈, 및 $\alpha 2$ -항플라스민을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 세르핀 억제제를 제조 또는 정제하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 제조한 단백질 발현 또는 면역침화 정제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0123] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 소형 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 가용성 펩티드, 및 합성 비-펩티딜 유기 또는 무기 화합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 소분자 억제제 (예를 들어, 펩티드 억제제)이다. 소분자 억제제는 임의의 약 100 내지 약 20,000 달톤 (Da), 약 500 내지 약 15,000 Da, 약 1000 내지 약 10,000 Da의 분자량을 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에서 고려되는 소분자 억제제는 아마스타틴 히드로클로라이드 수화물, 안티페인 디히드로클로라이드, 아프로티닌, 엘라스타티날, 에피아마스타틴 히드로클로라이드, 히스타틴 5, 류펩틴 헤미수페이트, 류펩틴 트리플루오로아세테이트, 류펩틴 히드로클로라이드, 캅스타틴 또는 페닐메탄술폰닐플루오라이드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 소분자 억제제는 마크로시클릭 억제제, 예컨대 비제한적으로 마크로시클릭 아실술폰아미드, 또는 HCV NS3/4A 프로테아제를 억제하는 것으로 공지된 소분자 억제제이다. 촉매 활성에 대해 억제 효과를 갖는 소분자를 제조하고 이를 시험하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이러한 방법은 NSP4 활성에 대한 소분자 억제제의 효과를 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각의 NSP4 억제제 후보를 완충제 중 형광원성 펩티드 기질의 존재 하에 활성 NSP4와 인큐베이션시킴으로써, 억제제 후보의 라이브러리를 NSP4 프로테아제 활성을 감소시키는 것에 대해 스크리닝할 수 있다. NSP4가 절단되면, 상기 형광원성 펩티드 기질은 형광을 낼 것이고, 각각의 억제제 후보의 존재 하의 NSP4 활성은 관련 기술분야에 널리 공지된 기술에 의해 측정될 수 있다. 본원에 기재된 검정에 사용될 수 있는 예시적인 형광원성 펩티드 기질은 아미노산 서열 $^1\text{IR}\{\text{Arg}(\text{Me})\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 또는 $^1\text{IR}\{\text{Arg}\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 을 갖는 형광원성

펩티드 기질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0124] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4에 결합하거나 그와 물리적으로 상호작용하는 항-NSP4 항체이다. 항체는 표적 항원 (예를 들어, NSP4)에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 Kd는 약 0.05 내지 약 100 nM이다. 예를 들어, 항체의 Kd는 약 100 nM, 약 50 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 500 pM, 약 100 pM, 또는 약 50 pM 중 임의의 것 내지 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 또는 약 40 pM 중 임의의 것이다. NSP4와 특이성을 가지고 상호작용하고/거나 그에 결합하는 항체의 제조 및 선택 방법이 본원에 기재된다.
- [0125] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4를 코딩하는 핵산을 표적화함으로써 기능적 NSP4의 발현을 차단 또는 감소시킬 수 있는 적어도 1개의 안티센스 분자를 포함한다. NSP4의 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 NSP4는 NCBI 수탁 번호 NM_214710에 제시된 바와 같은 핵산 서열을 가질 수 있고, 마우스 NSP4는 NCBI 수탁 번호 NM_001042710에 제시된 바와 같은 핵산 서열을 가질 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자의 제조 방법은 공지되어 있고, 이러한 방법은 다른 폴리뉴클레오타이드와 교차-반응하지 않으면서 1개 이상의 NSP4 mRNA에 특이적으로 결합할 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하는데 사용될 수 있다. 예시적인 표적화 부위는 개시 코돈, 5' 조절 영역, 임의의 보존된 컨센서스 영역을 비롯한 코딩 서열, 및 3' 비번역 영역을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 약 10 내지 약 100개 뉴클레오타이드 길이, 약 15 내지 약 50개 뉴클레오타이드 길이, 약 18 내지 약 25개 뉴클레오타이드 길이 또는 그 초과이다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레아제 저항성 등을 증가시키기 위한 화학적 변형, 예컨대 예를 들어 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 포스포로티오에이트 연결 및 2'-O-당 변형을 추가로 포함한다.
- [0126] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4를 코딩하는 핵산을 표적화함으로써 기능적 NSP4의 발현을 차단 또는 감소시킬 수 있는 적어도 1개의 siRNA 분자를 포함한다. siRNA 분자를 제조하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이러한 방법은 다른 폴리뉴클레오타이드와 교차-반응하지 않으면서 NSP4 mRNA를 특이적으로 표적화할 siRNA 분자를 제조하는데 사용될 수 있다. siRNA 분자는 전형적인 고체 상 올리고뉴클레오타이드 합성과 같은 방법에 의해 생성될 수 있고, 종종 siRNA 작용제의 반감기 및/또는 효능을 증가시키고/거나 보다 강건한 전달 체제를 가능하게 하기 위해 화학적 변형을 포함할 것이다. 대안적으로, siRNA 분자는 siRNA의 세포내 전사를 위한 발현 카세트를 코딩하는 벡터를 사용하여 전달된다.
- [0127] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4에 결합하거나 물리적으로 상호작용하고, NSP4와 그의 기질(들) 사이의 상호작용을 차단하는 RNA 또는 DNA 압타머이다. 특정 실시양태에서, 압타머는 NSP4의 성숙 형태에 결합하는 적어도 1개의 RNA 또는 DNA 압타머를 포함한다. 특정 실시양태에서, 압타머는 NSP4의 전구체 형태에 결합하는 적어도 1개의 RNA 또는 DNA 압타머를 포함한다.
- [0128] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 적어도 1개의 NSP4 구조 유사체를 포함한다. 용어 NSP4 구조 유사체는 NSP4 (예를 들어, NSP4의 전구체 및/또는 성숙 형태)의 3차원 구조의 일부와 유사한 3차원 구조를 갖고, 시험관내 또는 생체내 생리학적 조건 하에 NSP4 기질에 결합하며, 이러한 결합은 NSP4 생물학적 활성을 적어도 부분적으로 억제하는 것인 화합물을 지칭한다. 적합한 NSP4 구조 유사체는 NSP4의 그의 기질에 대한 결합의 분자 모델링을 통해 설계 및 합성될 수 있다. NSP4 구조 유사체는 단량체, 이량체, 또는 개선된 친화도 및 생물학적 효과를 수득하기 위한 동일하거나 상이한 구조의 임의의 목적하는 조합으로의 보다 높은 차수의 다량체일 수 있다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 도 1에 제시된 바와 같은 NSP4의 아미노산 서열에 결합하거나 그와 상호작용한다.
- [0129] 검정
- [0130] NSP4 억제제는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예컨대 예를 들어 방사성표지된 억제제 검정, 광학 검정, 단백질 결합 검정, 생화학적 스크리닝 검정, 면역검정, 질량 이동 측정 검정, 형광 검정, 및/또는 형광원성 펩티드 절단 검정을 사용하여 확인 및/또는 특징화될 수 있다.
- [0131] 결합 검정 및 다른 검정
- [0132] 특정 실시양태에서, NSP4 억제제는 NSP4 억제제 후보의 NSP4와의 상호작용 및/또는 NSP4에 대한 결합 친화도의 존재를 검출하는 것에 대한 관련 기술분야에 널리 공지된 기술에 의해 확인될 수 있다.
- [0133] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제는 방사성표지된 억제제 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 공지된 양의 방사성표지된 억제제 후보를 공지된 양의 고정된 NSP4 및 완충제와 인큐베이션시킬 수

있다. 이어서, 고정된 NSP4를 완충제로 세척할 수 있고, 관련 기술분야에 공지된 기술, 예컨대 예를 들어 감마 카운터를 사용하여 고정된 NSP4에 대해 남아있는 방사성표지된 NSP4 억제제 후보의 존재를 측정할 수 있다. 방사성표지된 물질의 존재를 나타내는 측정은 방사성표지된 억제제 후보가 NSP4와 상호작용 및/또는 그에 결합할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0134] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제는 광학 기술을 사용하여 확인될 수 있다. NSP4의 억제제를 검출하기 위한 예시적인 광학 기술은, 예를 들어 NSP4를 비색 공명 그래프팅 표면에 부착시키고, 그에 의해 광이 받아들여야 하는 광학 경로에서의 변화로 인해 반사광의 파장이 이동하고, 이어서 억제제 후보를 NSP4와 상호작용하게 했을 때 반사광의 파장에서의 추가의 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 억제제를 NSP4와 인큐베이션시킨 경우에 반사광의 측정된 파장에서 변화가 없는 것은 억제제 후보가 NSP4와 상호작용하지 못한다는 것을 나타낼 수 있다. 억제제 후보를 NSP4와 인큐베이션시킨 경우에 반사광의 측정된 파장에서의 변화는 억제제 후보가 NSP4에 결합 및/또는 그와 상호작용할 수 있다는 것을 나타낼 수 있다.

[0135] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제는 단백질 결합 검정을 사용하여 확인될 수 있다. NSP4 억제제를 검출하기 위한 예시적인 단백질 결합 검정은, 예를 들어 억제제 후보의 존재 하에서의 NSP4의 공동-면역침전을 포함할 수 있다. 예를 들어, NSP4를 완충제 중에서 억제제 후보와 인큐베이션시킬 수 있고, 이어서 NSP4를 포획하기 위한 특이적인 고정된 분자, 예컨대 예를 들어 항-NSP4 항체를 사용하여 억제제 후보의 존재 하에 NSP4를 포획하고, 관련 기술분야에 공지된 세척 절차 동안 억제제 후보와 잠재적으로 상호작용하고 있는 NSP4에 결합하도록 할 수 있다. 이어서, 억제제 후보와 잠재적으로 상호작용하고 있는 NSP4를 방출시킬 수 있고, 억제제 후보의 존재는 예를 들어 질량 분광측정법 및/또는 웨스턴 블롯과 같은 기술에 의해, 억제제 후보 특징에 기초하여 검출할 수 있다.

[0136] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제는 관련 기술분야에 널리 공지된 생화학적 및/또는 면역검정 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예시적인 기술은 예를 들어, 예를 들어 웨스턴 블롯과 같은 기술을 사용하여 NSP4 농도 및/또는 단백질 반감기에서의 변화를 정량적으로 측정하기 위한 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 억제제 후보를 NSP4를 함유하는 샘플과 인큐베이션시킬 수 있고, 이어서 시간 경과 연구 동안의 시점에서 NSP4 단백질 양을 측정할 수 있다. 대조 처리와 비교하여 단백질 양 및/또는 단백질 반감기에서의 변화는 NSP4 억제제 후보가 NSP4 반감기 및/또는 활성을 변경시킬 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0137] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제를 확인하기 위해 질량 이동 측정 검정이 사용될 수 있다. 예시적인 질량 이동 측정 검정은, 예를 들어 비제한적으로 질량 분광계와 같은 기기를 사용하여, 억제제 후보가 NSP4와 상호작용할 때 NSP4 질량에서의 변화를 측정함으로써 강력하게 및/또는 공유적으로 결합된 NSP4 억제제의 존재를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 질량 이동 검정은 억제제 후보 상호작용의 속성에 따라 전체 단백질 및/또는 펩티드-기반 분석으로 수행될 수 있다. NSP4에 대한 상기 억제제 후보의 부가와 관련된 질량 이동의 검출은 억제제 후보가 NSP4를 억제할 수 있음을 나타낼 수 있다. 추가로, 예시적인 질량 이동 측정 검정은 예를 들어, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명과 같은 기술을 사용하여, 억제제 후보가 NSP4와 상호작용할 때 각각의 억제제 후보 질량과 관련하여 NSP4에 대한 질량의 부가를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 광의 굴절률에서의 변화를 측정하고, 센서 표면에 부착된 NSP4의 질량에서의 변화와 관련시킬 수 있다.

[0138] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제를 확인하기 위해 화학적 가교 검정이 사용될 수 있다. 예를 들어, 억제제 후보를 NSP4와, 생체내 또는 시험관내에서, NSP4와 상호작용하는 억제제 후보를 상기 NSP4 분자에 공유 연결시킬 수 있는 분자 가교제의 존재 하에 인큐베이션시킬 수 있다. 이어서, 비제한적으로 질량 분광측정법 및/또는 웨스턴 블롯과 같은 기술을 사용하여 NSP4를 억제할 수 있는 억제제 후보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 억제제 후보와 공유 가교된 NSP4의 검출은 억제제 후보가 NSP4를 억제할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0139] 특정 실시양태에서, NSP4와 상호작용하는 NSP4 억제제는 형광 억제제 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 공지된 양의 형광 억제제 후보를 공지된 양의 고정된 NSP4 및 완충제와 인큐베이션시킬 수 있다. 이어서, 고정된 NSP4를 완충제로 세척할 수 있고, 관련 기술분야에 공지된 기술, 예컨대 비제한적으로 형광 검출을 사용하여 고정된 NSP4에 대해 남아있는 형광 NSP4 억제제 후보의 존재를 측정할 수 있다. 형광 물질의 존재를 나타내는 측정은 형광 억제제 후보가 NSP4와 상호작용 및/또는 그에 결합할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0140] 활성 검정

[0141] 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원 (예를 들어, 실시예 3)에 기재된 검정은 NSP4 억제제의 생물학적 활성을

확인하고 시험하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, NSP4 활성을 차단하는 NSP4 억제제 능력을 시험하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성에 대한 예시적인 시험은, 예를 들어 NSP4 (예를 들어, 인간 NSP4)를 NSP4 억제제와의 혼합물로 제공하는 것 및 상기 혼합물을 1종 이상의 내부-켄칭된 형광원성 펩티드 기질과 함께 인큐베이션시키는 것 및 예를 들어 분광광도계와 같은 기기로 형광 강도를 측정하는 것을 포함할 수 있다. NSP4 억제제의 존재 하에서의 형광의 증가는 NSP4 억제제가 NSP4 활성을 차단하지 못한다는 것을 나타낼 것이고, 반면에 NSP4 억제제의 존재 하에서의 형광의 증가의 결여는 NSP4 억제제가 NSP4 활성을 차단한다는 것을 나타낼 것이다. 본원에 기재된 검정에 사용될 수 있는 예시적인 형광원성 펩티드 기질은 아미노산 서열 $^1\text{IR}\{\text{Arg}(\text{Me})\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 또는 $^1\text{IR}\{\text{Arg}\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 을 갖는 형광원성 펩티드 기질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0142] 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 임의의 이들 검정에서 NSP4 활성을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100% 중 임의의 것으로 차단할 수 있다.

[0143] 항-NSP4 항체

[0144] 한 측면에서, 본 발명은 NSP4에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 하기 특징: (1) NSP4 (예를 들어, 인간 NSP4)에 결합하고 NSP4 프로테아제 활성을 억제 또는 감소시킴; (2) NSP4의 그의 펩티드 기질(들)에 대한 결합을 차단함; (3) 마우스 및/또는 인간의 NSP4에 결합함; (4) NSP4의 불활성 및/또는 성숙 형태에 결합함; (5) NSP4와 프로테아제 억제제 (예를 들어, $\alpha 1$ -항트립신) 사이에 형성된 복합체에 결합함; (6) 프로테아제 억제제 (예를 들어, $\alpha 1$ -항트립신)에 의한 NSP4의 불활성화를 증진시킴; 및 (7) NSP4와 특이적으로 반응하지만 호중구 엘라스타제 (NE), 카텝신 G (CG), 또는 프로테이나제 3 (PR3)과는 그렇지 않음; 중 1개 이상을 갖는다.

[0145] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 하위부류: 1) 마우스 NSP4의 성숙 및 전구체 형태에는 결합하지만 인간 NSP4의 성숙 및 전구체 형태에는 결합하지 않음; 2) 인간 NSP4의 성숙 및 전구체 형태에는 결합하지만 마우스 NSP4의 성숙 및 전구체 형태에는 결합하지 않음; 3) 마우스 NSP4의 성숙 형태에는 결합하지만 마우스 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않음; 4) 인간 NSP4의 성숙 형태에는 결합하지만 인간 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않음; 5) 마우스 NSP4 및 인간 NSP4의 성숙 형태에는 결합하지만 마우스 NSP4 및 인간 NSP4의 전구체 형태에는 결합하지 않음; 및 6) 마우스 NSP4 및 인간 NSP4의 성숙 및 전구체 형태에 결합함; 중 1개로 분류될 수 있는 단리된 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0146] 본원은 NSP4가 활성 부위 및 헤파린 결합 부위를 포함한다는 발견을 기재한다 (예를 들어, 도 4a 참조). 추가로 본원은 이들 부위 중 하나에 특이적으로 결합하는 항체를 기재한다 (예를 들어, 도 30-31 참조). 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 하위부류: (1) NSP4 활성 부위 또는 NSP4 활성 부위 근처에 특이적으로 결합함; (2) NSP4의 촉매 활성을 억제함; (3) NSP4 활성 부위 또는 NSP4 활성 부위 근처에 특이적으로 결합하고 NSP4의 촉매 활성을 억제함; (4) NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합함; (5) NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁함; 및 (6) NSP4 헤파린 결합 부위에 특이적으로 결합하고 NSP4에의 결합에 대해 헤파린과 경쟁함; 중 1개로 분류될 수 있는 단리된 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0147] 한 측면에서, 본 발명은 (i) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (ii) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; (iii) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; (iv) 서열 1, 4, 또는 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (v) 서열 2, 5, 또는 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; 및 (vi) 서열 3, 6, 또는 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 HVR을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체를 제공한다.

[0148] 한 실시양태에서, 단리된 항-NSP4 항체는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

[0149] (a) HVR-H1 서열은 GFTFSNTYIS (서열 1)이고;

[0150] (b) HVR-H2 서열은 GFIYPANGATYYADSVKG (서열 2)이고;

[0151] (c) HVR-H3 서열은 RRYRLSFDY (서열 3)이다.

[0152] 한 실시양태에서, 단리된 항-NSP4 항체는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

- [0153] (a) HVR-H1 서열은 GFTFSGNDIS (서열 4)이고;
- [0154] (b) HVR-H2 서열은 AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)이고;
- [0155] (c) HVR-H3 서열은 RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)이다.
- [0156] 한 실시양태에서, 단리된 항-NSP4 항체는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서
- [0157] (a) HVR-H1 서열은 GFTFTSYAIS (서열 7)이고;
- [0158] (b) HVR-H2 서열은 AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8)이고;
- [0159] (c) HVR-H3 서열은 RAGRWITHSDIDY (서열 9)이다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 중쇄 폴리펩티드는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하는 가변 영역 경쇄와 추가로 조합되며, 여기서
- [0161] (a) HVR-L1 서열은 RASQDVSTAVA (서열 10)이고;
- [0162] (b) HVR-L2 서열은 SASFLYS (서열 11)이고;
- [0163] (c) HVR-L3 서열은 QQSYTTPPT (서열 12)이다.
- [0164] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0165] (a) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 여기서
- [0166] (i) HVR-H1 서열은 GFTFSNTYIS (서열 1)이고;
- [0167] (ii) HVR-H2 서열은 GFIIYPANGATYYADSVKG (서열 2)이고;
- [0168] (iii) HVR-H3 서열은 RRYRLSFDY (서열 3)이고/거나;
- [0169] (b) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서
- [0170] (i) HVR-L1 서열은 RASQDVSTAVA (서열 10)이고;
- [0171] (ii) HVR-L2 서열은 SASFLYS (서열 11)이고;
- [0172] (iii) HVR-L3 서열은 QQSYTTPPT (서열 12)이다.
- [0173] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0174] (c) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 여기서
- [0175] (i) HVR-H1 서열은 GFTFSGNDIS (서열 4)이고;
- [0176] (ii) HVR-H2 서열은 AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)이고;
- [0177] (iii) HVR-H3 서열은 RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)이고/거나;
- [0178] (d) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서
- [0179] (i) HVR-L1 서열은 RASQDVSTAVA (서열 10)이고;
- [0180] (ii) HVR-L2 서열은 SASFLYS (서열 11)이고;
- [0181] (iii) HVR-L3 서열은 QQSYTTPPT (서열 12)이다.
- [0182] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0183] (e) 중쇄는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 여기서
- [0184] (i) HVR-H1 서열은 GFTFTSYAIS (서열 7)이고;

- [0185] (ii) HVR-H2 서열은 AGISPSNGYTNVADSVKG (서열 8)이고;
- [0186] (iii) HVR-H3 서열은 RAGRWTHSDIDY (서열 9)이고/거나;
- [0187] (f) 경쇄는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3을 포함하고, 여기서
- [0188] (i) HVR-L1 서열은 RASQDVSTAVA (서열 10)이고;
- [0189] (ii) HVR-L2 서열은 SASFLYS (서열 11)이고;
- [0190] (iii) HVR-L3 서열은 QQSYTTPPT (서열 12)이다.
- [0191] 추가의 구체적 측면에서, 항체는 인간 또는 무린 불변 영역을 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 구체적 측면에서, 인간 불변 영역은 IgG1이다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG1, IgG2A, IgG2B, 및 IgG3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 측면에서, 무린 불변 영역은 IgG2A이다. 추가의 구체적 측면에서, 항체는 감소된 또는 최소 이펙터 기능을 갖는다.
- [0192] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0193] (a) 중쇄는 각각 GFTFSNTYIS (서열 1), GFIYPANGATYYADSVKG (서열 2), 및 RRYRLSFDY (서열 3)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고/거나
- [0194] (b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (서열 10), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.
- [0195] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0196] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGNDIS (서열 4), AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5), 및 RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고/거나
- [0197] (b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (서열 10), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.
- [0198] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0199] (a) 중쇄는 각각 GFTFTSYAIS (서열 7), AGISPSNGYTNVADSVKG (서열 8), 및 RAGRWTHSDIDY (서열 9)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 추가로 포함하고/거나
- [0200] (b) 경쇄는 각각 RASQDVSTAVA (서열 10), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 추가로 포함한다.
- [0201] 추가 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0202] (a) 중쇄 서열은 중쇄 서열:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNTYISWVRQAPGKGLEWVGFIYPANGA
 TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRRLSFDYWGQGLTV
 TVSS (서열 13)
- [0203]
- [0204] 와 적어도 85% 서열 동일성을 갖고/거나,
- [0205] (b) 경쇄 서열은 경쇄 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
 GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (서열 16)
- [0206]
- [0207] 과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다.

- [0208] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0209] (a) 중쇄 서열은 중쇄 서열:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGNDISWVRQAPGKGLEWVAGISPYGGS
 TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRRVSFYSRHAGMDYW
 GGGLTVTVSS (서열 14)
- [0210]
- [0211] 와 적어도 85% 서열 동일성을 갖고/거나,
- [0212] (b) 경쇄 서열은 경쇄 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (서열 16)
- [0213]
- [0214] 과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다.
- [0215] 또 다른 실시양태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 단리된 항-NSP4 항체 또는 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서
- [0216] (a) 중쇄 서열은 중쇄 서열:
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAISWVRQAPGKGLEWVAGISPSNGY
 TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRAGRWITHSDIDYWGQ
 GTLVTVSS (서열 15)
- [0217]
- [0218] 와 적어도 85% 서열 동일성을 갖고/거나,
- [0219] (b) 경쇄 서열은 경쇄 서열:
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (서열 16)
- [0220]
- [0221] 과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는다.
- [0222] 임의의 상기 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 단리된 항체이다. 임의의 상기 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR 및 도 13에 제시된 HVR (카바트(Kabat) CDR, 코티아(Chothia) CDR, 또는 접촉 CDR 서열을 포함하는 HVR 포함)을 포함하고, 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센스 프레임워크를 추가로 포함한다.
- [0223] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 카바트에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 카바트에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 코티아에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 코티아에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 접촉 CDR 서열에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 접촉 CDR 서열에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다.
- [0224] 또 다른 측면에서, 서열 16의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-NSP4 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-NSP4 항체는 NSP4에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 서열 16에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉,

FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NSP4 항체는 서열 16의 VL 서열 (그러한 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다.

- [0225] 또 다른 측면에서, 항-NSP4 항체는 서열 13-15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-NSP4 항체는 NSP4에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 임의의 서열 13-15에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NSP4 항체는 임의의 서열 13-15의 VH 서열 (그러한 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다.
- [0226] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0227] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0228] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95) (여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L임)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0229] 일부 실시양태에서, 상기 단락의 항-NSP4 항체는 서열 12 및 92-94로부터 선택된 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0230] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0231] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0232] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0233] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 78과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0234] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0235] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0236] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYGFPLT (서열 92)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0237] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 78과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 102와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0238] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0239] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0240] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYDFPLT (서열 93)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0241] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 78과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 103과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0242] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0243] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0244] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSAGFPLT (서열 94)와 적어도 85% 서열 동일성을

갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

- [0245] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 78의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 104의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0246] 일부 실시양태에서, 본원은 각각 GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), RDDVPAVFTSAMDY (서열 52), 및 QQSX₁X₂X₃PX₄T (서열 95) (여기서 X₁은 Y 또는 A이고; X₂는 T, G, 또는 D이고; X₃은 T 또는 F이고; X₄는 P 또는 L임)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다.
- [0247] 일부 실시양태에서, 항체는 각각 GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), RDDVPAVFTSAMDY (서열 52), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), RDDVPAVFTSAMDY (서열 52), 및 QQSYGFPLT (서열 92)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), RDDVPAVFTSAMDY (서열 52), 및 QQSYDFPLT (서열 93)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), RDDVPAVFTSAMDY (서열 52), 및 QQSAGFPLT (서열 94)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0248] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0249] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 KRHLHNVAFDY (서열 87)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0250] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQAYSAPPT (서열 96)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0251] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 105와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 106과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0252] 일부 실시양태에서, 본원은 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), KRHLHNVAFDY (서열 87), 및 QQAYSAPPT (서열 96)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다.
- [0253] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0254] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66) 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88), 및 X₁X₂X₃FHNVAFDY (서열 91) (여기서 X₁은 K 또는 R이고; X₂는 S, G, 또는 V이고; X₃은 L 또는 F임)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0255] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQX₁X₂X₃X₄PPT (서열 101) (여기서 X₁은 S, A, N, 또는 T이고; X₂는 Y, N, 또는 F이고; X₃은 T, S, 또는 N이고; X₄는 T, A, 또는 S임)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0256] 일부 실시양태에서, 상기 단락의 항-NSP4 항체는 서열 67, 89, 및 90으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 단락의 항-NSP4 항체는 서열 12 및 97-100으로부터 선택된 서열과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L3 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0257] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0258] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), KSLFHNVAFDY (서열 67)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0259] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 83과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서

- [0262] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88), 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0263] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0264] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 107과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0265] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0266] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0267] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQANSTPPT (서열 98)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0268] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 83과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 109와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0269] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0270] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 RGLFHNVAFDY (서열 89)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0271] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0272] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 110과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0273] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0274] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 RVFFHNVAFDY (서열 90)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0275] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQNFSSPPT (서열 99)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0276] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 111과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 112와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0277] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0278] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0279] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0280] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 83과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 108과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0281] 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기서
- [0282] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), RGLFHNVAFDY (서열 89)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0283] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQTYNAPPT (서열 100)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0284] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 110과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 113과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0285] 일부 실시양태에서, 본원은 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66) 또는 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88), $X_1X_2X_3$ FHNVAFDY (서열 91) (여기서 X_1 은 K 또는 R이고; X_2 는 S, G, 또는 V이고; X_3 은 L 또는 F임); 및 $QQX_1X_2X_3X_4$ PPT (서열 101) (여기서 X_1 은 S, A, N, 또는 T이고; X_2 는 Y, N, 또는 F이고; X_3 은 T, S, 또는 N이고; X_4 는 T, A, 또는 S임)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함하는 항-NSP4 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), KSLFHNVAFDY (서열 67), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWIPTAGGNTYYADSVKG (서열 88), KSLFHNVAFDY (서열 67), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), KSLFHNVAFDY (서열 67), 및 QQANSTPPT (서열 98)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), RGLFHNVAFDY (서열 89), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), RVFFHNVAFDY (서열 90), 및 QQNFSSPPT (서열 99)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), KSLFHNVAFDY (서열 67), 및 QQSYTAPPT (서열 97)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 각각 AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), RGLFHNVAFDY (서열 89), 및 QQTYNAPPT (서열 100)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H2, HVR-H3, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0286] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0287] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSWIS (서열 20), GTISPYNGSTYYADSVKG (서열 21), 및 RVLRPKVYASVMDY (서열 22)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0288] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 68과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0290] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0291] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGYSIH (서열 23), AGISPTNGYTDYADSVKG (서열 24), 및 RLVFYRGVMDY (서열 25)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0292] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 69와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0294] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0295] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNWIS (서열 26), GYIYPASGYTDYADSVKG (서열 27), 및 SDSPHAYWYAMDY (서열 28)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0296] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0297] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 70과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0298] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0299] (a) 중쇄는 각각 GFTFTNNSIS (서열 29), GAISPNGSTYYADSVKG (서열 30), 및 RNAWHYSWVGVMY (서열 31)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0300] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

- [0301] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 71과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0302] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0303] (a) 중쇄는 각각 GFTFTDYSIH (서열 32), AEIYPYSGDTYYADSVKG (서열 33), 및 RDGDGWFWDAMDY (서열 34)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0304] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0305] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 72와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0306] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0307] (a) 중쇄는 각각 GFTFSSTAIS (서열 35), GEIYPYSGDTYYADSVKG (서열 36), 및 RVKWAVSSLGVMDY (서열 37)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0308] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0309] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 73과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0311] (a) 중쇄는 각각 GFTFTDSDIS (서열 38), AWISPSDYGATDYADSVKG (서열 39), 및 HEASDDDYAIDY (서열 40)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0312] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0313] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 74와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0315] (a) 중쇄는 각각 GFTFSYDWIS (서열 41), AGISPNNGDTYYADSVKG (서열 42), 및 REDDDERDYAMDY (서열 43)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0316] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0317] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 75와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0318] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0319] (a) 중쇄는 각각 GFTFTGYGIS (서열 44), GWIYPASGATYYADSVKG (서열 45), 및 RHRAFDWYPYIGSSVMDY (서열 46)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0320] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0321] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 76과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0322] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0323] (a) 중쇄는 각각 GFTFSYDYSIS (서열 47), GEINPAGGATYYADSVKG (서열 48), 및 RGDFPFWSDAYYVMDY (서열 49)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0324] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을

갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.

- [0325] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 77과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0326] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0327] (a) 중쇄는 각각 GFTFSDNDIS (서열 50), GSISPDNGDTNYADSVKG (서열 51), 및 RDDVPAVFTSAMDY (서열 52)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0328] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0329] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 78과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0331] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSDIS (서열 53), GEIYPSNGDTYYADSVKG (서열 54), 및 RSVRPSWWAMDY (서열 55)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0332] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 79와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0335] (a) 중쇄는 각각 GFTFSSYDIS (서열 56), GTISPYDGYTDYADSVKG (서열 57), 및 RYIRRYSVHYGMDY (서열 58)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0336] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0337] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 80과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0338] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0339] (a) 중쇄는 각각 GFTFTSTSIH (서열 59), AEITPHGGYTYADSVKG (서열 60), 및 RGRTKWGWLYGMDY (서열 61)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0340] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 81과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0343] (a) 중쇄는 각각 GFTFTNNSIH (서열 62), AEIAPDDGYTYADSVKG (서열 63), 및 RGVIRYAYLYAMDY (서열 64)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0344] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0345] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 82와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0346] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0347] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGSGIH (서열 65), AWISPTGGNTYYADSVKG (서열 66), 및 KSLFHNVAFDY (서열 67)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;

- [0348] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0349] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 83과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0350] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0351] (a) 중쇄는 각각 GFTFSNTYIS (서열 1), GFIIYPANGATYYADSVKG (서열 2), 및 RRYRLSFDY (서열 3)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0352] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0353] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 84와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0354] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0355] (a) 중쇄는 각각 GFTFSGNDIS (서열 4), AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5), 및 RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0356] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0357] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 85와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0358] 일부 실시양태에서, 본원은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항-NSP4 항체를 제공하며, 여기서
- [0359] (a) 중쇄는 각각 GFTFTSYAIS (서열 7), AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8), 및 RAGRWTSHDIDY (서열 9)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3 서열을 포함하고/거나;
- [0360] (b) 경쇄는 각각 RASQDVS (서열 19), SASFLYS (서열 11), 및 QQSYTTPPT (서열 12)와 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함한다.
- [0361] 일부 실시양태에서, 항체는 서열 86과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열 16과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0362] 상기 기재된 임의의 실시양태와 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 서열 동일성은 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성일 수 있다.
- [0363] 일부 상기 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 단리된 항체이다. 일부 상기 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR 및 본원에 기재된 항체의 HVR (카바트 CDR, 코티아 CDR, 또는 접촉 CDR 서열을 포함하는 HVR 포함)을 포함한다.
- [0364] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 카바트에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 카바트에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 코티아에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 코티아에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체는 접촉 CDR 서열에 의해 정의된 바와 같은 HVR을 포함하고, 예를 들어 항-NSP4 항체는 각각의 CDR이 본원에 추가로 기재된 바와 같이 접촉 CDR 서열에 의해 정의된 것인 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다.
- [0365] 또 다른 측면에서, 서열 16, 102, 103, 104, 106, 108, 109, 112, 또는 113으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-NSP4 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-NSP4 항체는 NSP4에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에

서, 총 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 임의의 서열 16, 102, 103, 104, 106, 108, 109, 112, 또는 113에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NSP4 항체는 임의의 서열 16, 102, 103, 104, 106, 108, 109, 112, 또는 113의 VL 서열 (그러한 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 임의로, 경쇄는 서열 115의 서열을 갖는 불변 영역을 함유한다.

[0366] 또 다른 측면에서, 항-NSP4 항체는 서열 13-15, 68-86, 105, 107, 110, 및 111로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 비해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-NSP4 항체는 NSP4에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 임의의 서열 13-15, 68-86, 105, 107, 110, 및 111에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입, 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-NSP4 항체는 임의의 서열 13-15, 68-86, 105, 107, 110, 및 111의 VH 서열 (그러한 서열의 번역후 변형 포함)을 포함한다. 임의로, 중쇄는 서열 114의 서열을 갖는 불변 영역을 함유한다.

[0367] 본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-NSP4 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 비롯한 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디, 또는 F(ab')₂ 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어 무손상 IgG1 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 부류 또는 이소형 (예를 들어, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)이다.

[0368] NSP4의 아미노산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 NSP4는 NCBI 수탁 번호 NP_999875.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가질 수 있고, 비-인간 영장류 NSP4는 NCBI 수탁 번호 XP_001146596.1 (침팬지 NSP4), XP_002828403.1 (오랑우탄 NSP4), EHH29398.1 (레서스 원숭이 NSP4), XP_003914595.1 (개코원숭이 NSP4), XP_002761565.1 (마모셋 NSP4), 또는 XP_003788878.1 (갈라고 NSP4)에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가질 수 있고, 비-영장류 포유동물은 NCBI 수탁 번호 NP_001036175.1 (마우스 NSP4), Q6IE59.2 (랫트 NSP4), XP_004717061.1 (고슴도치 NSP4), XP_001375784.7 (주머니쥐 NSP4), XP_542217.3 (개 NSP4), XP_593377.3 (소 NSP4) 또는 XP_004009516.1 (양 NSP4)에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 인간 NSP4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 마우스 NSP4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 인간 NSP4 및 마우스 NSP4 둘 다에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 도 1에 제시된 바와 같은 NSP4의 아미노산 서열에 결합한다.

[0369] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-NSP4 항체는 하기 섹션에 기재된 바와 같은 임의의 특색을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:

[0370] 항체 친화도

[0371] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어, 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다.

[0372] 한 실시양태에서, Kd는 하기 검정에 의해 기재된 바와 같이 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (¹²⁵I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g/ml}$ 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단한다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 기간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를

PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈-20®)으로 8회 세척한다. 플레이트가 건조된 경우에, 150 μ l/웰의 섬광제 (마이크로신티(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0373] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 ~10 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어 (BIACORE)®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용하여 5 μ g/ml (~0.2 μ M)로 희석한 후에 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μ l/분의 유량으로 주입한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2-배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유량으로 25℃에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주입한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센소그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지-유동 설비 분광광도계 (아비브 인스트루먼트) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코™ 분광광도계 (써모스펙트로닉)에서 측정되는 바와 같은, 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS, pH 7.2 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하는 것에 의해 결정될 수 있다.

[0374] 항체 단편

[0375] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해서는, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0376] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0377] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 윌섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0378] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이, 무손상 항체의 단백질을 분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0379] 키메라 및 인간화 항체

[0380] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 교체된" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

- [0381] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 내의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 개선시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0382] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되었고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; 문헌 [Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 그래프팅 기재); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) ("재표면화" 기재); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) ("FR 셔플링" 기재); 및 Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FR 셔플링에 대한 "유도 선택" 접근법 기재)]에 추가로 기재되어 있다.
- [0383] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은, "최적-피트" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 성숙) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0384] 인간 항체
- [0385] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.
- [0386] 인간 항체는 항원 펩티드에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하는 것에 의해 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술을 기재하는 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; 휴맵(HuMab)[®] 기술을 기재하는 미국 특허 번호 5,770,429; K-M 마우스(K-M MOUSE)[®] 기술을 기재하는 미국 특허 번호 7,041,870, 및 벨로시마우스(VelociMouse)[®] 기술을 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시키는 것에 의해 추가로 변형될 수 있다.
- [0387] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)] 참조.) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 생산 기재) 및 문헌 [Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

- [0388] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하는 것에 의해 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하는 기술은 하기 기재된다.
- [0389] 라이브러리-유래 항체
- [0390] 본 발명의 항체는 목적 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해 단리될 수 있다. 예를 들어, 실시예 3에 기재된 방법과 같은, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 목적하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 추가의 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.
- [0391] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 비재배열 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도의 가변 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공개는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360을 포함한다.
- [0392] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.
- [0393] 다중특이적 항체
- [0394] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 NSP4에 대한 것이고, 다른 것은 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 NSP4의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.
- [0395] 다중특이적 항체를 제조하는 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공-발현 (문헌 [Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다중-특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기적 스테어링 효과를 조작하는 것 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교하는 것 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위해 류신 지퍼를 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "디아바디" 기술을 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조하는 것에 의해 제조될 수 있다.
- [0396] "옥토퍼스 항체"를 비롯하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다

(예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0397] 본원의 항체 또는 단편은 또한 NSP4 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 Fab" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0398] 항체 변이체

[0399] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입하는 것에 의해 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있고, 단 최종 구축물은 목적하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유한다.

[0400] 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0401] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 1에서 "보존적 치환"의 표제 하에 제시된다. 보다 실질적인 변화는 표 1에서 "예시적인 치환"의 표제 하에 제공되고, 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기에 추가로 기재된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입될 수 있고, 산물은 목적 달성, 예를 들어 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0402] <표 1> 예시적인 치환

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0403]

[0404] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다:

[0405]

a. 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0406]

b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0407]

c. 산성: Asp, Glu;

[0408]

d. 염기성: His, Lys, Arg;

[0409]

e. 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0410]

f. 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0411]

비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0412]

치환 변이체의 한 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)에서 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활

성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

- [0413] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선시키기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 SDR (a-CDR)에서 이루어질 수 있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL는 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터 구축 및 재선택하는 것에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 섀 셔플링, 또는 올리고뉴클레오타이드-지시된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 라이브러리를 스크리닝하여 목적 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 수반하며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.
- [0414] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항체가 항원에 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 1개 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟" 또는 SDR의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0415] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체되어 항체와 항원의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성이 입증된 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조가 사용된다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 목적하는 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.
- [0416] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노 - 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드의 융합을 포함한다.
- [0417] 글리코실화 변이체
- [0418] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 1개 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.
- [0419] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형, 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어 문헌 [Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.
- [0420] 한 실시양태에서, Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에서 푸코스가 감소되거나 푸코스가 결여되어 있는 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체가 제공되며, 이는 ADCC 기능을 개선시킬 수 있다. 구체적으로, 야생형 CHO 세포에서 생산된 동일한 항체 상의 푸코스의 양에 비해 푸코스가 감소된 항체가 본원에서 고려된다. 즉, 이들은 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 글리코실화 패턴을 생산하는 CHO 세포, 예컨대 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포)에 의해 생산된 경우에 이들이 달리 갖게 될 것보다 더 적은 양의 푸코스를 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실

시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 5% 미만이 푸코스를 포함하는 것이다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 그 상의 N-연결 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는 항체이며, 즉 항체는 푸코스가 완전히 없거나, 또는 푸코스를 전혀 갖지 않거나, 또는 비-푸코실화된다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의한 측정 시, Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조물)의 합계에 관하여 Asn297에서 당쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산하는 것에 의해 결정된다. Asn297은 Fc 영역 내의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체에서의 부차적 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 및 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체와 관련된 공개 문헌의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams et al., 특히 실시예 11에서), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0421] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되며, 예를 들어 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); US 2005/0123546 (Umana et al.) 및 문헌 [Ferrara et al., Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006)]에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.

[0422] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 Fc γ RIII에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 Fc 영역을 포함하는 항체 변이체는 인간 이펙터 세포의 존재 하에 ADCC 활성을 갖거나, 또는 인간 야생형 IgG1Fc 영역을 포함하는 달리 동일한 항체와 비교하여 인간 이펙터 세포의 존재 하에 증가된 ADCC 활성을 갖는다.

[0423] Fc 영역 변이체

[0424] 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어, 그에 의해 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 1개 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0425] 특정 실시양태에서, 본 발명은 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 해로운 적용에 대해 바람직한 후보가 되게 하는, 모든 이펙터 기능은 아니지만 일부 이펙터 기능을 보유하는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합이 결여되어 있지만 (따라서 ADCC 활성이 결여될 수 있음), FcRn 결합 능력은 보유함을 확실하게 하기 위해 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌 [Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)]; 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 사용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티

(ACT1)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토크스(CytoTox) 96® 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같이 동물 모델에서 평가될 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결여되어 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 클리어런스/반감기 결정은 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

- [0426] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 1개 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는, 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 비롯하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).
- [0427] FcR에 대해 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)
- [0428] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 그의 Fc 영역에 하기 아미노산 치환: S298A, E333A, 및 K334A를 포함한다.
- [0429] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 생성하는 변경이 Fc 영역에서 이루어진다.
- [0430] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 1개 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 1개 이상에서 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).
- [0431] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.
- [0432] 시스테인 조작된 항체 변이체
- [0433] 특정 실시양태에서, 항체의 1개 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAB"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 생성된다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 그에 의해 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 위치하게 되고, 이것을 사용하여 항체를 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역결합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하기 잔기 중 어느 1개 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.
- [0434] 항체 유도체
- [0435] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 관련 기술분야에 공지되고 용이하게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을

포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 달라질 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착되는 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선시킬 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 요법에서 규정된 조건 하에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0436] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). 방사선은 임의의 파장의 것일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0437] 재조합 방법 및 조성물

[0438] 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-NSP4 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 1개 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 하나의 이러한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질감염된다). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 항-NSP4 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것 및 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 임의로 회수하는 것을 포함하는, 상기에 제공된 바와 같은 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 추가로, 이러한 방법에 의해 생산된 항-NSP4 항체가 본원에 제공된다.

[0439] 항-NSP4 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 1개 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상의 절차를 사용하여 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것에 의해).

[0440] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우에, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (또한, 이. 콜라이에서 항체 단편의 발현을 기재하는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조.) 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.

[0441] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체가 생산되게 하는 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 숙주 발현에 적합하다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.

[0442] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바칼로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되어 있다.

[0443] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.

[0444] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합화된 포유동물

세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)])에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포; 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)])에 기재된 바와 같은 TM4 세포; 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포를 비롯한 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

- [0445] 검정
- [0446] 본원에 제공된 항-NSP4 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 스크리닝되거나 특징화될 수 있다.
- [0447] 결합 검정 및 다른 검정
- [0448] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다.
- [0449] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정을 사용하여 NSP4에의 결합에 대해 1-1, 1-2, 1-3, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 3-2, 3-5, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 35.WT, 35.14, 35.50, 35.62, 35.77, 51.WT, 51.30, 51.50, 51.51, 51.59, 51.72, 및 51.82로부터 선택된 1개 이상의 항체와 경쟁하는 항체를 확인할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 1-1, 1-2, 1-3, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 3-2, 3-5, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 5-1, 5-2, 5-3, 5-4, 35.WT, 35.14, 35.50, 35.62, 35.77, 51.WT, 51.30, 51.50, 51.51, 51.59, 51.72, 및 51.82로부터 선택된 1개 이상의 항체가 결합하는 것과 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체 형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 상세한 예시적인 방법이 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공되어 있다.
- [0450] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정된 NSP4는 NSP4 (예를 들어, 인간 NSP4 또는 마우스 NSP4)에 결합하는 제1 표지된 항체 및 NSP4에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험될 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션된다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액 중에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 NSP4는 제1 표지된 항체를 포함하나 제2 비표지된 항체는 포함하지 않는 용액 중에서 인큐베이션된다. NSP4에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 잉여량의 미결합 항체를 제거하고, 고정된 NSP4와 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 NSP4와 회합된 표지의 양이 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이는 제2 항체가 NSP4에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.
- [0451] 또 다른 측면에서, 생물층 간섭측정법을 사용하여 NSP4에 대한 항-NSP4 항체의 친화도를 결정할 수 있다. 예시적인 검정에서, 항-NSP4 항체를 항-인간 Fc 센서 상에 고정시키고, 증가하는 농도의 NSP4와 인큐베이션시켜, 예를 들어 옥테트 시스템(Octet System) (포르테바이오(ForteBio))와 같은 기기를 사용하여 친화도 측정치를 수득한다.
- [0452] 또 다른 측면에서, ELISA를 사용하여 NSP4 및 프로테아제 억제제 (예를 들어, α 1-항트립신)의 복합체에 결합하는 항체를 확인할 수 있다. 예시적인 검정에서, 재조합 NSP4를 프로테아제 억제제, 예컨대 세틴 프로테아제 억제제와 혼합하여 복합체가 형성되게 한다. NSP4 복합체를 재조합 NSP4 상에 존재하는 His-태그를 통해 니켈 (Ni) 플레이트 내에 코팅하고, 항-NSP4 항체를 사용하여 포획 ELISA를 이전에 기재된 바와 같이 수행한다 (문헌 [Kuhl et al., 2010, J. Immunol., 185, 387-399] 참조). 이소형 항체 대조군과 비교하여 NSP4 복합체에 대한 항-NSP4 항체의 결합은 상기 항체가 NSP4 및 프로테아제 억제제의 복합체에 결합하는 것임을 확인시켜준다. 예를 들어, 문헌 [Hinkofer et al., J. Biol. Chem., 2013, 288:26635-26648]을 참조한다.

- [0453] 본원의 임의의 실시양태에서, 검정에 사용되는 NSP4는 NSP4의 성숙 형태 또는 전구체 형태일 수 있다.
- [0454] 활성 검정
- [0455] 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원 (예를 들어, 실시예 3)에 기재된 검정은 항-NSP4 항체의 생물학적 활성을 확인하고 시험하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, NSP4 활성을 차단하는 것에 대해 항-NSP4 항체를 시험하는 검정이 제공된다. 생물학적 활성에 대한 예시적인 시험은, 예를 들어 NSP4 (예를 들어, 인간 NSP4)를 항-NSP4 항체와의 혼합물로 제공하는 것 및 상기 혼합물을 1종 이상의 내부-퀀팅된 형광원성 펩티드 기질과 함께 인큐베이션시키는 것 및 예를 들어 분광광도계와 같은 기기로 형광 강도를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 항-NSP4 항체의 존재 하에서의 형광의 증가는 항-NSP4 항체가 NSP4 활성을 차단하지 못한다는 것을 나타낼 것이고, 반면에 항-NSP4 항체의 존재 하에서의 형광의 증가의 결여는 항-NSP4 항체가 NSP4 활성을 차단한다는 것을 나타낼 것이다. 본원에 기재된 검정에 사용될 수 있는 예시적인 형광원성 펩티드 기질은 아미노산 서열 ${}^1\text{IR}\{\text{Arg}(\text{Me})\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 또는 ${}^1\text{IR}\{\text{Arg}\}\text{SSYSFKK}^{10}$ 을 갖는 형광원성 펩티드 기질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0456] 일부 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 임의의 이들 검정에서 NSP4 활성을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100% 중 임의의 것으로 차단할 수 있다.
- [0457] NSP4 활성을 차단하는 것에 대해 항-NSP4 항체를 시험하는 검정이 또한 제공된다. NSP4 활성을 평가하는 예시적인 방법은 기질 상에 과립구를 제공하는 것, 과립구를 NSP4 억제제, 예컨대 항-NSP4 항체와 인큐베이션시킨 다음 화학주성 인자 (예컨대 보체 C5a 또는 인터류킨-8)로 자극하는 것, 및 이소형 대조군과 비교하여 항-NSP4 항체의 존재 하에서의 과립구의 화학주성 또는 운동성에서의 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 화학주성 또는 이동성에서의 감소는 항-NSP4 항체가 NSP4 활성을 차단한다는 것을 나타낸다.
- [0458] 또 다른 예시적인 검정에서, 호중구-매개 질환에 대한 생체내 동물 모델이 사용될 수 있다. 예를 들어, 호중구-의존성 K/BxN 혈청 전달 관절염 모델은 정맥내 K/BxN 혈청의 투여 전, 그와 병용하여, 또는 그 후에 항-NSP4 항체를 투여함으로써 사용될 수 있다. 처리된 마우스의 발에서의 혈관 누출, 홍반, 및 부종은 실시예 2에 기재된 바와 같은 생체내 근적외선 형광 영상화를 사용하여 모니터링될 수 있고, 여기서 혈관 누출, 홍반, 또는 부종 중 어느 하나의 감소는 항-NSP4 항체가 NSP4 활성을 차단한다는 것을 나타낸다.
- [0459] 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물
- [0460] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-NSP4 항체는 생물학적 샘플에서 NSP4 단백질의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 호중구를 포함한다.
- [0461] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-NSP4 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 NSP4의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 NSP4에 대한 항-NSP4 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항-NSP4 항체와 접촉시키는 것, 및 항-NSP4 항체와 NSP4 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-NSP4 항체는 예를 들어 NSP4가 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 항-NSP4 항체를 사용한 요법에 적절한 대상체를 선택하는데 사용된다.
- [0462] 본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 줄증, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염 (예를 들어, 소아 류마티스 관절염), 폐혈성 쇼크, 만성 기관지염, 폐기종, α -1 항트립신 결핍, 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환, 암 (예를 들어, 폐암), 천연 프로테아제 억제제 (예를 들어, 세린 프로테아제 억제제)의 결핍에 의해 유발되는 질환, 및 본원에서 기재되고 고려되는 임의의 다른 과립구-매개 질환 또는 장애 (예를 들어, 호중구-매개 질환 또는 장애)를 포함한다.
- [0463] 특정 실시양태에서, 표지된 항-NSP4 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ${}^{32}\text{P}$, ${}^{14}\text{C}$, ${}^{125}\text{I}$, ${}^3\text{H}$, 및 ${}^{131}\text{I}$, 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단질, 움벨리페론, 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박

테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0464] B. 제약 조성물 및 제제

[0465] 또한, 본원은 본원에 기재된 NSP4 억제제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물 및 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, NSP4 억제제는 본원에 기재된 항체일 수 있다.

[0466] 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물 및 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 NSP4 억제제 (예컨대 항체 또는 폴리펩티드)를 1종 이상의 임의적인 제약상 허용되는 담체와 동결건조 제제, 또는 수용액의 형태로 혼합하는 것에 의해 제조될 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 비롯한, 특정의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 1개 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0467] 예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0468] 본원의 조성물 및 제제는 또한 치료되는 특정한 적응증에의 필요에 따라 1종 초과와 활성 성분, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0469] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0470] 지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0471] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균성이다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0472] C. 치료 방법

[0473] 본원에 제공된 임의의 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)는 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0474] 한 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 제공된다. 추가 측면에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어,

항-NSP4 항체)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 NSP4 억제제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 상기 개체를 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)를 제공한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다. 본원의 임의의 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0475] 특정 실시양태에서, 본 발명은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 항-NSP4 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 상기 개체를 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 항-NSP4 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4의 촉매 활성을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고 NSP4의 촉매 활성을 억제한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 효소 결합 부위에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4에의 결합에 대해 효소 결합과 경쟁한다. 특정 실시양태에서, 항체는 NSP4 효소 결합 부위에 특이적으로 결합하고, NSP4에의 결합에 대해 효소 결합과 경쟁한다. 특정 실시양태에서, NSP4 활성 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 항체 및 NSP4 효소 결합 부위에 특이적으로 결합하고/거나 NSP4에의 결합에 대해 효소 결합과 경쟁하는 항체의 유효량이 개체에게 투여된다.

[0476] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제작 또는 제조에서의 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 상기 의약의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 상기 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0477] 추가 측면에서, 본 발명은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 이러한 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0478] 한 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 제공된다. 추가 측면에서, 호중구-매개 질환 또는 장애를 치료하는데 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 호중구-매개 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 NSP4 억제제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 상기 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)를 제공한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다. 본원의 임의의 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0479] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제작 또는 제조에서의 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 호중구-매개 질환 또는 장애의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 호중구-매개 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 의약의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 상기 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0480] 추가 측면에서, 본 발명은 호중구-매개 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기

방법은 이러한 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 개체에게 적어도 1종의 추가의 치료제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 혈관 질환 및 염증성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다. 본원의 임의의 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 본원에 기재된 질환일 수 있다.

[0481] 다형핵 백혈구 (PMN)로도 공지되어 있는 호중구는 급성 염증 및 침입 병원체 (예를 들어, 박테리아)의 식세포작용에 관여하는 선천성 면역계 세포이다. 호중구의 항-미생물 활성은 부분적으로는 호중구 세린 프로테아제, 예컨대 호중구 엘라스타제, 카텝신 G, 및 프로테이나제 3에 의해 매개되며, 이는 식세포작용을 받은 미생물을 파괴하기 위해 세포내에서 작용하거나, 또는 감염 부위에서의 병원체 증식을 함유하고 감소시키는 세포의 작용을 하도록 호중구에 의해 방출될 수 있다. 호중구에 의해 방출된 호중구 세린 프로테아제는 선천성 면역계에서 유익한 역할을 제공할 수 있지만, 이들 프로테아제는 또한 예를 들어 이상 조직 손상 및 염증을 유발함으로써 호중구-매개 질환 또는 장애의 형성의 원인이 될 수 있다. 연구는 호중구를 여러 질환, 예컨대 비제한적으로 패혈성 쇼크, 급성 호흡 곤란 증후군, 허혈후 재관류, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 류마티스 관절염 및 암의 병리상태에서 원인 역할을 하는 것으로서 연결시켰다. 예를 들어, 문헌 [Adams et al., J Trauma-Injury Infect Crit Care., 2001, 51:452-456; Lindsey et al., Circulation, 2001, 103:2181-2187; Wright et al., Rheumatology, 2010, 49(9):1618-1631; Magrone et al., Pharm Des., 2012, 18(12):1609-19; 및 Vaguliene et al., BMC Immunology., 2013, 6:14-36]을 참조한다.

[0482] 호중구-매개 질환 또는 장애는 염증 (예를 들어, 급성 염증 및/또는 만성 염증), 증가된 혈관 투과성, 조직 손상 및/또는 호중구가 역할을 하는 것으로 공지되어 있는 다른 염증 과정을 특징으로 하는 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 및 뇌 허혈로 이루어진 군으로부터 선택된 혈관 질환이다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염 (예를 들어, 소아 류마티스 관절염) 및 패혈성 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택된 염증성 질환이다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 COPD, 만성 기관지염, 폐기종, α -1 항트립신 결핍, 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 및 ARDS로 이루어진 군으로부터 선택된 폐 질환이다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 자가면역 질환, 예컨대 비제한적으로 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염 및 수포성 피부 질환이다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 암, 예컨대 비제한적으로 폐암, 유방암, 결장암, 림프종, 췌장암, 및 뇌암이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 암이다. 일부 실시양태에서, 호중구-매개 질환 또는 장애는 천연 (즉, 숙주) 프로테아제 억제제 (예를 들어, 세린 프로테아제 억제제), 예컨대 비제한적으로 α -1 항트립신, 항트롬빈, C1 억제제, 분비 백혈구 프로테아제 억제제, 단핵구-호중구 엘라스타제 억제제, 및 α 1-항키모트립신의 결핍에 의해 유발되는 질환이다.

[0483] 과립구는 호중구, 호산구, 및 호염기구를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 또는 의약은 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 유용하다. 예를 들어, 치료 또는 예방될 수 있는 질환 또는 장애는 혈관 질환, 염증성 질환, 및 자가면역 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 졸중, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 천식 (예를 들어, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환 (예를 들어, 수포성 유천포창), 염증성 피부 질환 (예를 들어, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염), 암 (예를 들어, 폐암), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염, 크론병)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0484] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 임의의 NSP4 억제제를 포함하는 제약 조성물 또는 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 조성물 또는 제제는 본원에 제공된 임의의 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체) 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물 또는 제제는 본원에 제공된 임의의 NSP4 억제제, 및 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 1종의 추가의 치료제를 포함한다.

[0485] 본원에 기재된 NSP4 억제제는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 NSP4 억제제는 적어도 1종의 추가의 치료제와 공-투여될 수 있다. 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제는 동일한 또는 개별 제제에 포함됨) 및 개별 투여를 포괄하고, 이 경우에 본 발명의

항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 일어날 수 있다.

[0486] 본원에 기재된 NSP4 억제제 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 비롯하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투약은 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 부분적으로 투여가 단기적 또는 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 투약 스케줄이 본원에서 고려된다.

[0487] 본원에 기재된 NSP4 억제제 (예를 들어, 항체)는 우수한 의료 행위에 부합하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. NSP4 억제제는, 그러할 필요는 없지만, 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 1종 이상의 작용제와 함께 임의로 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 NSP4 억제제의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0488] 질환의 예방 또는 치료를 위해, NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 적절한 투여량 (단독으로, 또는 1종 이상의 다른 추가의 치료제와 조합되어 사용되는 경우)는 치료할 질환의 유형, NSP4 억제제의 유형, 질환의 중증도 및 경과, NSP4 억제제가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 치료에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 다를 것이다. NSP4 억제제는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다.

[0489] 예를 들어 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의한 것이든 또는 연속 주입에 의한 것이든 관계없이, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg -10 mg/kg)의 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)가 환자에서의 투여를 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 상태에 따라 치료는 일반적으로 질환 증상의 목적하는 억제 발생할 때까지 지속될 것이다. NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체)의 하나의 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 의 범위 내일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg , 2.0 mg/kg , 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 그의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록). 초기의 보다 높은 부하 용량에 이어서, 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0490] III. 제조 물품 및 키트

[0491] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 NSP4 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체) 중 1종 이상을 포함하는 제조 물품 또는 키트가 제공된다. 제조 물품 또는 키트는 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 회합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 조성물을 그 자체로 수용하거나 또는 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 조합하여 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중 적어도 1종의 활성제는 본원에 기재된 NSP4 억제제이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 선택된 상태는 과립구에 의해 매개되는 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 치료될 질환 또는 장애는 졸증, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 아나필락시스, 전신 아나필락시스, 알레르기성 폐 염증, 천식 (예를 들어, 알레르기성 천식, 바이러스-유발 천식), 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환 (예를 들어, 수포성 유천포창), 염증성 피부 질환 (예를 들어, 아토피성 피부염, 두드러기, 호산구성 연조직염), 암 (예를 들어, 폐암), 신장 질환 (예를 들어, 사구체신염), 골관절염, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 건선, 패혈성 쇼크, 염증성 장 질환 (예를 들어, 궤양성 결장염, 크론병)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 선택된 상태는 호중구-

매개 질환 또는 장애, 예컨대 비제한적으로 졸증, 당뇨병성 망막병증, 부종, 당뇨병성 황반 부종, 유전성 혈관 부종, 특발성 혈관부종, 혈관계 누출, 뇌 허혈, 급성 폐 손상, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 골관절염, 류마티스 관절염 (예를 들어, 소아 류마티스 관절염), 패혈성 쇼크, 만성 기관지염, 폐기종, α -1 항트립신 결핍, 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 혈관염, 수포성 피부 질환, 암 (예를 들어, 폐암), 천연 프로테아제 억제제 (예를 들어, 세린 프로테아제 억제제)의 결핍에 의해 유발되는 질환, 또는 본원에서 기재되고 고려되는 임의의 다른 호중구-매개 질환 또는 장애이다. 또한, 제조 물품 또는 키트는 (a) 내부에 본원에 기재된 NSP4 억제제를 포함하는 조성물이 수용된 제1 용기; 및 (b) 내부에 제2 치료제를 포함하는 조성물이 수용된 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서 제조 물품 또는 키트는 조성물이 특정한 상태를 치료하는데 사용될 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조 물품 또는 키트는 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정박 테리아 주사용수 (BWF), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 비롯하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0492] 상기 본 발명은 이해의 명확성의 목적을 위해 예시 및 예의 방식으로 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0493] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제공된 일반적 설명을 고려하여 다양한 다른 실시양태가 실시될 수 있음이 이해된다.

[0494] 실시예

[0495] 실시예 1: 호중구 세린 프로테아제 4 (NSP4)에 의한 기질 인식의 특징화.

[0496] 트립신-폴드 프로테아제로서 특징화된 호중구 세린 프로테아제 패밀리의 구성원인 NSP4는 호중구 호아주르성 과립 내에 저장되어 있지만 (Perera et al., J Immunol., 2013), 모든 NSP 중에서 가장 덜 풍부하고 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234) 그의 기능은 공지되지 않은 채로 남아있다. NSP4는 경골 어류에서 인간에 이르기까지 고도로 보존되어 있고 (도 1), 다른 NSP의 진화상 출현에 선행한다 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234; Perera et al., Expert Rev Clin Immunol, 2012, 8:501-503). 따라서, NSP4는 호중구 생물학에서 근본적인 역할을 할 가능성이 있다. 호중구 엘라스타제 (NE), 카텝신 G (CG), 및 프로테이나제 3 (PR3)의 상대적으로 넓은 기질 특이성은 그의 활성 부위 구조의 지식에 기초하여 널리 이해되어 있고 (Navia et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:7-11; Hof et al., EMBO J, 1996, 15:5481-5491; Fujinaga et al., J Mol Biol, 1996, 261:267-278), NSP4는 그것이 아르기닌 잔기 다음에서 기질을 절단하지만 (Perera et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109:6229-6234; Perera et al., J Immunol., 2013), 그의 1차 서열은 상이한 엘라스타제-유사 활성 부위를 예측하게 한다는 점에서 (도 2a) 도전 과제를 제기한다. 트립신-폴드 프로테아제 중에서, 트립신, 키모트립신, 및 엘라스타제의 활성 부위는 P1 위치에서의 기질 특이성의 3가지 주요 부류를 규정하는데 도움이 된다 (Hedstrom et al., Chem Rev, 2002, 102:4501-4524) (도 2b). 트립신-유사 프로테아제, 예컨대 응고 및 보체 인자는 고도로 보존된 D189 (키모트립시노겐 넘버링)와의 염 가교 상호작용에 의해 안정화되는 긴 아르기닌 측쇄를 수용하기 위한 깊은 S1 포켓을 갖는다. 대조적으로, 엘라스타제-유사 프로테아제는 그의 얇은 S1 포켓으로 인해 큰 아르기닌 측쇄를 수용할 수 없다.

[0497] NSP4가 명백한 엘라스타제-유사 S1 포켓으로 그의 아르기닌-특이성을 어떻게 달성할 수 있는지 조사하기 위해 (도 2a 및 b), 비정형 S1 포켓을 특징화하였다.

[0498] 방법

[0499] 재조합 단백질 발현 및 정제

[0500] 구조적 특징화를 위해 인간 야생형 NSP4를 생성하기 위해, Ile34 (키모트립시노겐 넘버링에서 Ile16)에서 Ala283까지의 인간 NSP4를 코딩하는 DNA를 N-말단 His₆-태그 및 엔테로펩티다제 절단 부위와 융합시키고, pAcGP67 벡터 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 내로 클로닝하였다. 생성된 바콜로바이러스 전달 벡터를 DNA 서열분석에 의해 확인하고, 바콜로골드(BaculoGold) 선형화 DNA (BD 바이오사이언시스)와 함께 Sf9 곤충 세포 내로 공동-형질감염시키고, 3회 증폭시켜 높은 역가의 바이러스 스톱을 생성하였다. 단백질 생산을 위해, 세포를 진탕 플라스크 내에서 또는 웨이브 벡 (지이 헬스케어(GE Healthcare)) 내에서 27°C에서 ESF921 배지 (발현 시스템)를 사용하여 감염후 72시간 동안 배양하고, 원심분리에 의해 제거하였다. 생성된 상청액을 50 mM

트리스-HCl, pH 7.5 중 1 mM NiCl₂, 5 mM CaCl₂로 보충하였다. 상청액 내의 단백질을 중력 유동에 의해 Ni-NTA 칼럼 (퀴아젠(Qiagen)) 상에 포획시키고, 200 ml 세척 완충제 (50 mM 트리스 pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸)로 세척하고, 용리 완충제 (50 mM 트리스 pH 7.5, 300 mM NaCl, 300 mM 이미다졸)로 용리시켰다. 단백질을 농축시키고, 20 mM 트리스 pH 7.5, 150mM NaCl로 평형화된 크기 배제 칼럼 (슈퍼덱스(Superdex) 200 하이로드(HiLoad) 16/60, 지이 바이오사이언시스(GE Biosciences)) 상에서 추가로 정제하였다.

[0501] 생화학적 특징화를 위해 NSP4 돌연변이체를 생산하기 위해, Ile34에서 Ala283까지의 인간 NSP4 단편을 코딩하는 DNA를 포유동물 세포 발현에 적합한 변형된 pRK5 벡터 내에 N-말단 FLAG 태그 및 C-말단 His₆ 태그와 함께 클로닝하였다. 퀵체인지(QuickChange) 돌연변이유발 키트 (애질런트(Agilent))를 사용하여 목적하는 단일 및 이중 점 돌연변이체 (키모트립신 넘버링에서): F190A, S192A, S195A, S216G, F190A:S216G, 및 S192A:S216G를 혼입시킨 유도체 발현 구축물을 생성하였다. 구축물을 일시적 발현에 의해 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 발현시키고, 인큐베이션 후에 상청액을 원심분리에 의해 수거하였다. 상청액 내의 단백질을 중력 유동에 의해 항-FLAG 친화도 수지 상에 포획시키고, 200 ml 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 세척하고, 용리 완충제 (50 mM 시트르산나트륨 pH 3.0, 150 mM NaCl)로 용리시키고, 1M 트리스 pH 8을 사용하여 pH 7로 즉시 중화시켰다.

[0502] 생화학적 검증

[0503] 곤충 세포-유래 및 CHO 세포-유래 NSP4 둘 다를 15 EU/ml의 단백질에서 엔테로펩티다제 (인비트로젠(Invitrogen))를 사용하여 활성화시키고, 밤새 20℃에서 인큐베이션하였다. 절단 반응의 완료를 SDS-PAGE 및 액체 크로마토그래피-질량 분광측정법 (LC-MS)에 의해 모니터링하였다. 이온 교환에 의한 2차 정제를 수행하여 엔테로펩티다제를 제거하고, MonoS 칼럼 (지이 헬스케어)으로 20 mM 트리스 pH 7.5에 의한 0.05 M에서 1.0 M NaCl로의 구배 용리를 사용하여 NSP4를 동결한 정도까지 정제하였다.

[0504] 결정화 및 구조 결정

[0505] apo-NSP4 및 FFR:NSP4 결정을 위해, Endo F3을 100 mM 시트르산나트륨 pH 5.5, 300mM NaCl 중 1:100 Endo F3:NSP4 질량 비로 사용하여, 곤충 세포-유래 NSP4를 37℃에서 3시간 동안, 이어서 4℃에서 밤새 부분적으로 탈글리코실화시켰다. 탈글리코실화 반응은 SDS-PAGE 및 LC-MS를 사용하여 확인하였다. VLK:NSP4 결정을 위해, 곤충 세포-유래 NSP4를 완전 글리코실화시켰다. FFR:NSP4 및 VLK:NSP4 복합체를 제조하기 위해, NSP4를 각각 20-배 몰 과량의 D-Phe-L-Phe-L-Arg-cmk (바켄(Bachem)) 또는 D-Val-L-Leu-L-Lys-cmk (바켄)와 20℃에서 밤새 혼합하였다. 생성된 FFR:NSP4 및 VLK:NSP4 공유 복합체를 LC-MS를 사용하여 확인하였다. Apo-NSP4, FFR:NSP4, 및 VLK:NSP4를 모두, 20 mM 트리스 pH 7.5, 150 mM NaCl을 사용하여 평형화시킨 슈퍼덱스 S200 하이로드 16/60 크기 배제 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 탈염시켰다. 단백질을 대략 10 mg/ml로 농축시키고, 결정화 시행을 위해 침전제/완충제 용액 (모액)과 1:1로 혼합하였다.

[0506] 모든 결정은 19℃에서의 시딩 드롭 증기 확산 방법에 의해 수득되었고, 결정은 2 내지 7일 사이에 나타났다. FFR:NSP4는 20% PEG MME 2000, 0.1M 트리스 pH 8.5, 0.2M 트리메틸아민 N-옥시드 중에서 결정화되었다. Apo-NSP4 (형태 1)는 15-17% PEG-10,000, 0.1 M 아세트산나트륨 pH 4.4, 0.1 M 아세트산암모늄 중에서 결정화되었다. Apo-NSP4 (형태 2)는 22-25% PEG-3350, 0.1 M 비스-트리스 pH 5.5, 0.2 M NaCl 중에서 결정화되었다. VLK:NSP4는 임의의 추가의 완충제의 부재 하에 20% PEG-3350 0.2 M 아세트산칼륨 중에서 결정화되었다. 결정을 20% 글리세롤로 보충된 모액 중에서 동결보호하고, 액체 질소 중에서 급속 동결시켰다.

[0507] 데이터 수집 실험은 싱크로트론 광원을 사용하여 수행하였다. 구체적으로, Apo (형태 1 및 2) 및 VLK-cmk 데이터세트를 ALS 빔라인 5.0.1에서 파장 0.9774 Å 및 온도 95 K (어드밴스드 라이트 소스(Advanced Light Source))에서 수집하였다. FFR-cmk 데이터세트는 SSRL 빔라인 7-1에서 파장 1.1271 Å 및 온도 100 K (스탠포드 싱크로트론 라디에이션 라이트 소스(Stanford Synchrotron Radiation Light Source))에서 수집하였다. 데이터를 인덱싱하고, HKL2000 (Otwinowski et al., Methods in Enzymology, 1997, 276:307-326)을 사용하여 통합하였다. NSP4의 초기 구조를 MrBUMP (Keegan et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007, 63:447-457)를 사용하여 해석하여 초기 상을 획득하고, PHENIX 패키지 (Adams et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010, 66:213-221)를 사용하여 모의 어닐링에 의해 생성된 맵을 재구축하였다. PHENIX를 사용하여 구조를 정밀화하였고, 잔기 중 97.0% (apo 형태 1), 95.4% (apo 형태 2), 96.5% (FFR-cmk), 및 95.4% (VLK-cmk)는 라마찬드란 플롯의 바람직한 영역 내에, 나머지는 허용되는 영역 내에 존재하였다. 데이터 수집 및 정밀화 통계를 표 2에 요약한다. 모든 구조도는 PyMol (슈뢰딩거, 엘엘씨(Schroedinger, LLC))을 사용하여 생성하였다.

- [0508] 형광원성 펩티드 절단 검정
- [0509] N-말단에서 7-메톡시쿠마린-4-아세테이트 (Mca) 및 미니-PEG1 (8-아미노-3,6-디옥사옥탄산), 및 C-말단 근처의 끝에서 두 번째 리신 측쇄에 부착된 디니트로페놀 (Dnp)을 갖는 내부-퀀칭된 형광원성 펩티드를 Fmoc 고체-상 펩티드 합성 (젠스크립트(GenScript))을 사용하여 합성하였다. 펩티드를 50 mM 트리스 pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ 중 50 nM NSP4 또는 100 nM 인자 Xa (엔자임 리서치 래보러토리즈(Enzyme Research Laboratories))에 37°C에서 첨가하였다. 스펙트라맥스(SpectraMax) M5 (몰레큘라디바이시스(MolecularDevices))를 여기 328 nm 및 방출 393 nm로 사용하여 효소 동역학 측정을 수행하였다. 동역학 데이터를 표준 미카엘리스-멘텐 동역학 모델을 사용하여 프리즘5(Prism5) (그래프패드(GraphPad) 소프트웨어)에 의해 피팅시키고, 표준 곡선을 생성하여 촉매작용의 속도를 형광 측정치 (RFU/s)에서 초당 형성된 나노몰 생성물 (nM/s)로 전환시켰다. LC-MS에 의해, 50 mM 트리스 pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM CaCl₂ 중 50nM NSP4 또는 200 nM 인자 Xa와 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 형광원성 펩티드를 사용하여 펩티드 절단 부위를 확인하였다. 펩티드 단편을 5-60% 아세토니트릴:물 역상 구배로 분리시킨 후, 비행 시간 질량 분광계 (애질런트) 상에서 분석하였다.
- [0510] 헤파린 결합 검정
- [0511] 헤파린 결합은 형광-접합된 헤파린 (인비트로젠)을 정제된 재조합 NSP4와 혼합시켜 형광 편광을 사용하여 평가하였다. 형광 편광 검정을 3회 독립적 측정으로 수행하고, 485 ± 30 nm 여기 및 535 ± 40 nm 방출 필터가 구비된 빅터(Victor) 3 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer)) 상에서 판독하였다. 전기영동 이동성 이동 검정을 통해 반응을 평가하기 위해, 동등 부피의 50% 글리세롤을 NSP4:헤파린 혼합물에 첨가한 다음, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 분리하고, 타이폰(Typhoon) 이미저 (지이 헬스케어)를 사용하여 청색 (488 nm) 레이저 및 526 ± 20 nm 방출 필터로 형광 신호를 검출하였다.
- [0512] NSP4^{-/-} 마우스의 특징화
- [0513] NSP4^{-/-} 마우스를 이전에 기재된 바와 같이 생성하고 (Tang et al., Nat Biotechnol, 2010, 28:749-755), 10 세대를 초과하여 C57/BL6과 역교배시켰다. NSP4^{-/-} 마우스에서 NSP4 제거의 확인 및 이웃 프로테아제 유전자 발현의 결정은 RT-PCR을 사용하여 수행하였다. NSP4^{-/-} 마우스 또는 야생형 한배새끼의 전체 골수 세포로부터의 RNA를 RNeasy 미니 키트 (키아젠)를 사용하여 단리하고, iScript 역전사효소 (바이오-라드(Bio-Rad))를 사용하여 상응하는 cDNA를 합성하였다 (모두 제조업체의 지침에 따라 수행함). cDNA 샘플로부터, 어플라이드 바이오시스템즈로부터 수득한 하기 택맨(TaqMan) 프라이머/프로브 세트 (괄호 안은 카탈로그 번호임): Prss57_1 (ABI Mm01144794_m1, 엑손 1-2에 걸쳐있음), Prss57_2 (ABI Mm01144795_m1, 엑손 2-3에 걸쳐있음), Prss57_3 (ABI Mm01144796_m1, 엑손 3-4에 걸쳐있음), Cfd (ABI Mm01143935_g1, 엑손 4-5에 걸쳐있음), Elane (ABI Mm01168928_g1, 엑손 1-2에 걸쳐있음), Gzmm (ABI Mm00493150_m1, 엑손 2-3에 걸쳐있음), Prtn3 (ABI Mm00478323_m1, 엑손 1-2에 걸쳐있음), 18s rRNA (ABI 4333760F)를 사용하는 택맨 2X PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 qPCR을 수행하였다.
- [0514] 면역 세포 집단을 정량화하기 위해, 표준 유동 세포측정법 프로토콜 및 하기 항체 클론: 항-CD11b (M1/70); 항-CD11c (N418); 항-B220 (RA3-6B2); 항-Ly6C (HK1.4), 항-Ly6G (1A8)를 사용하여 NSP4^{-/-} 마우스 또는 야생형 한배새끼의 대퇴 골수로부터의 세포를 확인하였다. 모든 항체는 이바이오사이언스(eBioscience)로부터 수득하였다. 시토크 블루(Sytox Blue) (인비트로젠)를 사용하여 생존율을 평가하였다. 염색된 세포를 FACS아리아 세포 분류기 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 분류하였다. 하기 집단이 분류되었고, 카운팅하였다: B 세포, B220⁺; 전체 골수 세포, B220⁻/CD11b⁺; 단핵구, B220⁻/CD11b⁺/Ly6C^{hi}, 및 호중구, B220⁻/CD11b⁺/Ly6G^{hi}.
- [0515] K/BxN 혈청-전달 마우스 모델
- [0516] K/BxN 혈청-유발 혈관 투과성을 마우스 전체-발의 비-침습적 근적외선 형광 영상화 (NIRF)에 의해 생체내 모니터링하였다. 마우스를 2% 이소플루란 (버틀러 웨인(Butler Schein), 1 L/min 유동)으로 마취시키고, 꼬리 정맥 카테터를 이식하고, 외과용 테이프에 의해 고정된 발을 코닥(Kodak) 생체내 FX Pro 400 전체-동물 NIRF 영상화 시스템 (케어스트림 헬스(Carestream Health))의 영상화 표면 유리 상에 고정시켰다. 마우스에게 꼬리 정맥 카테터를 통해 100 μl의 혈액 풀 프로브 안지오센스 680 (퍼킨엘머)을 주사하고, 5분 동안 1분 간격 (650nm 여기 / 700nm 방출, 21.4mm FOV, 10초 노출, 2x 비닝)으로 영상화하여 기준선 형광을 확립한 후, 75ul K/BxN 혈청을 꼬리 정맥 카테터 주사하고, 다시 25분 동안 추가로 영상화하였다. 이 모델에 사용된 K/BxN 혈청은 중증 관절

염을 나타낸 KRNxNOD F1 마우스로부터 공급된 것이다. 발 내에서의 초기 영상화 시점으로부터의 평균 형광 강도 및 형광 강도에서의 배수 변화를 MatLab (매스웍스(MathWorks))에서 맞춤 과정을 사용하여 정량화하였다.

[0517] 관절염을 혈관 투과성 분석 후 8일 동안 매일 평가하였다. 0 (정상 관절 외관)에서 4 (최대 홍반 및 부종)의 개별 발 스코어를 합하여 할당 시, 임상 스코어는 동물당 0에서 16의 범위였다. 하기 관절에 대해 홍반 및 부종을 분석하였다: 족근 또는 수근 관절, 중족골 또는 중수골 관절, 중족지절 또는 중수지절 관절, 또는 지골.

[0518] 마우스 관절염 발의 조직학적 검사

[0519] 발을 중성 완충 포르말린 중에 고정시키고, 탈석회화하고, 상용적으로 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 시상면 반절편으로 가공하였다. 동물당 모든 4개의 발을 검사하였다. 조직학적 병변을 하기 특색에 대해 0 (정상)에서 5 (중증)의 임의 척도로 스코어링하였다: 염증 세포에 의한 침윤, 판누스 형성을 비롯한 섬유증식증, 연골 손상, 및 골 재형성.

[0520] 결과

[0521] NSP4 S1 결합 포켓의 동역학적 특징화

[0522] NSP4가 P1-아르기닌 잔기를 인식하는 능력을, 특히 아르기닌 결합을 가로막을 것으로 보이는 NSP4 S1 결합 포켓 내의 F190 및 S216 잔기를 고려하여 조사하였다 (도 2a). S1 포켓 개구부의 대향측에 위치한 NSP4 잔기 F190 및 S216은 S1 포켓에의 접근을 허용하는 이동가능한 게이트로서 작용할 수 있다. 그렇다면, P1-아르기닌 측쇄는 D189 (NSP4에서는 G189)에 대한 대용물로서 D226에 의해 안정화될 수 있다 (도 2a) (13, 14). 이러한 가설을 시험하기 위해, 부분적으로 개방되거나 (F190A 또는 S216G) 또는 완전히 개방된 (F190A:S216G) "게이트"를 갖는 NSP4 변이체로 조작하였고, 이는 모두, 가설이 맞다면, 효소 활성을 증가시킬 것이다. NSP4 활성에 대한 효과를 측정하기 위해, 아르기닌 다음에서 NSP4에 의해 특이적으로 절단되는 형광원성 펩티드를 P1 잔기 $^1\text{IRR}^3\downarrow^4\text{SSYSFKK}^{10}$ 으로서 합성하였다 (도 2c). 결과는 단일 돌연변이체 (F190A 또는 S216G) 및 이중 돌연변이체 F190A:S216G가 야생형과 비교하여 대략 10-배 및 4-배 감소된 활성 (k_{cat}/K_M)을 가짐을 보여주었다 (도 2d). 이들 결과는 이동가능한 게이트 가설을 지지하지 않았지만, 오히려 F190 및 S216 둘 다가 촉매작용을 가능하게 하기 위해 기질을 위치시키는데 결정적으로 중요하다는 것을 시사하였다.

[0523] NSP4의 결정 구조

[0524] P1-아르기닌 인식 메커니즘의 구조적 근거를 규명하기 위해, 공유 결합된 기질 모방체 D-Phe-L-Phe-L-Arg 클로로메틸 케톤 (FFR-cmk)을 사용하여 1.40 Å 해상도에서 NSP4의 X선 결정 구조를 결정하였다. 또한, apo-형태인 NSP4의 2개의 비-동형 구조를 2.55 Å 및 2.70 Å 해상도에서 (표 2) 결정하였다. 모든 구조는 트립신-폴드 세린 프로테아제의 이중 β-배럴 및 촉매 트리아드 배열 특징을 나타내었다 (도 3a). NSP4는 또한 NSP4를 프로테오글리칸으로 국제화시키는 기능을 할 수 있는 연장된 염기성 표면 패치를 가졌다 (도 4a). 이러한 관찰과 일관되게, NSP4는 형광 편광 및 전기영동 이동성 이동 검정에서 강력한 헤파린 결합을 나타내었다 (도 4b). NSP4 구조의 중첩은 또한 S2/S4 기질 상호작용 부위를 형성하는 99-루프 (도 3a)가 불안정하고, 다른 세린 프로테아제에 대해 입증된 바와 같이 (Ganesan et al., Structure, 2009, 17:1614-1624; Debela et al., J Mol Biol, 2007, 373:1017-1031) NSP4 알로스테릭 조절에 연루될 수 있음을 보여주었다.

[0525] <표 2> 데이터 및 정밀화 특징.

데이터 수집	Apo (형태 1)	Apo (형태 2)	FFR-CMK	VLK-cmk
공간군	P4 ₁	P6 ₃	P2 ₁ 2 ₁	P6 ₅
셀 치수 a, b, c (Å) α, β, γ (°)	70.4, 70.4, 150.0 90, 90, 90	86.6, 86.6, 69.4 90, 90, 120	55.0, 64.5, 68.4 90, 90, 90	89.7, 89.7, 108.6 90, 90, 120
해상도 (Å)	50-2.55 (2.64-2.55)	50-2.70 (2.80-2.70)	35.69-1.40 (1.45-1.40)	50.0-3.08 (3.19-3.08)
R_{sym}	0.082 (0.494)	0.149 (0.683)	0.048 (0.765)	0.154 (0.810)
$\langle I/\sigma I \rangle$	14.1 (2.0)	12.8 (2.7)	34.3 (2.8)	12.5 (2.4)
완전성 (%)	99.3 (100)	99.8 (100)	93.8 (98.2)	99.2 (99.8)
중복성	3.8 (3.8)	6.2 (6.3)	7.0 (7.1)	6.6 (6.6)
측정된 반사	89593	50790	319648	60991
고유 반사	23577	8192	45664	9241
월슨 B (Å ²)	62	52	18	81
X선 공급원	ALS 5.0.1	ALS 5.0.1	SSRL 7-1	ALS 5.0.1
데이터 환원	HKL2000	HKL2000	HKL2000	HKL2000
정밀화	Apo (형태 1)	Apo (형태 2)	FFR-CMK	VLK-cmk
해상도 (Å)	50-2.55	50-2.70	50-1.40	50-3.08
반사 (전체)	23565	8192	45530	9240
R_{Free} 에서의 반사	1203	802	2276	423
비대칭 단위당 분자	2	1	1	2
R_{work} R_{free}	0.197 0.231	0.187 0.248	0.192 0.215	0.185 0.240
평균 B-인자	54	33	20	62
TLS 기 개수	8	4	4	8
원자 개수 단백질 탄수화물 리간드 용매	3775 3572 76 0 127	1850 1795 38 0 17	2136 1811 38 34 253	3710 3562 98 50 0
R.m.s. 편차 결합 길이 (Å) 결합 각 (°)	0.009 1.05	0.008 1.05	0.008 1.30	0.009 1.23
라마찬드란 (%) 바람직한 영역	97.0	95.4	96.5	95.4

* 괄호 안의 값은 최고-해상도 셀에 대한 것임.

[0526]

[0527]

NSP4 아르기닌 특이성의 구조적 근거

[0528]

활성 부위의 구조적 세부사항은 기질 P1-아르기닌을 인식하는 전례없는 메카니즘을 밝혀내었고, 동시에 NSP4 난제를 해명하였다. 구조는 정규 S1 포켓이 F190 및 S216에 의해 완전히 폐색됨에 따라 그것이 비-존재함을 나타낸다 (도 3b 및 도 5). F190 및 S216 측쇄는 '게이트' 메카니즘의 부재와 일관되게 고도로 정렬되고; 대신, 잔기 F190 및 S216은 폐색된 S1 포켓 위에 얇은 흙의 바닥을 형성하여 재지시된 아르기닌 측쇄를 수용한다 (도 3b). NSP4에서 정규 "다운" 위치로부터 새로운 "업" 위치로의 아르기닌 측쇄 이동은 C β -C γ 결합 (Chi2 각)의 160° 회전에 의해 달성된다 (도 6a). 이와 달리, 프로테아제 214-216 잔기와 기질 P1-P3 잔기 사이의 역평행 주쇄 상호작용을 비롯하여, 측쇄 트리아드, 옥시음이온 홀, 및 FFR 펩티드의 전형적 C α 트레이스는 모두 보존되었다. P1-아르기닌의 "업" 입체형태는 바람직하게는 P1-아르기닌 측쇄의 지방족 부분과 상호작용하는 소수성 플랫폼을 제공하는 F190에 의해 지지된다. 또한, P1-아르기닌에 대한 특이성은 3개의 H-결합 수용자 - S216 및 S192 측쇄 및 G217 백본 카르보닐 산소에 의해 조정되는, 구아니디늄 기를 수반하는 H-결합 네트워크에 의해 부여된다 (도 6b). 따라서, NSP4는 전형적인 트립신-유사 S1 포켓 내에서의 우세한 P1-아르기닌-안정화 정전기적 상호작용을 폐색된 S1 포켓 상부에 위치하는 새로운 H-결합 네트워크로 대체하였다. 측쇄작용을 위한 이러한 H-결합 네트워크의 중요성을 2개의 H-결합 수용자 S192 및 S216을 돌연변이시켜 검사하였다. 단일 H-결합 수용자 돌연변이체는 10-배 감소된 활성을 나타낸 반면에, 둘 다의 H-결합 수용자 (S192A:S216G)의 제거는 20-배 감소를 야기하였다 (도 6c).

[0529]

P1-리신 (P1-Lys) 기질에 대한 NSP4의 불량한 활성에도 불구하고, NSP4와 공유 결합된 리신 기질 모방체 D-Val-L-Leu-L-Lys (VLK)-cmk의 복합체를 제조하고, 3.08Å 해상도에서 결정 구조를 획득하는 것이 가능하였다. P1-

리신 측쇄는 P1-아르기닌의 입체형태와 유사한 입체형태를 채택하는 것으로 나타났다 (도 7). 그러나, 보다 긴 P1-아르기닌 측쇄와 달리, 보다 짧은 P1-리신 측쇄는 P1-아르기닌과 같이 H-결합의 전체 정원과 맞물리지 못했고, 그에 의해 P1-리신 잔기 다음에서의 극도로 불량한 절단이 해명된다 (도 2c).

[0530] NSP4는 변형된 아르기닌을 갖는 기질을 프로세싱한다

[0531] 고유한 NSP4 활성 부위를 검증하기 위한 직교 접근법에서, 변형된 P1 아르기닌을 갖는 펩티드 기질에 대한 NSP4의 활성을 검사하였다. 자연 발생 아르기닌-유도체 메틸아르기닌은 메틸아르기닌 측쇄가 좁은 S1 포켓 내에 공간적으로 수용될 수 없기 때문에 트립신-유사 프로테아제에 의한 절단에 대해 저항성이다 (Baldwin et al., Science, 1971, 171:579-581; Asami et al., Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22:6328-6332). 이러한 구조적 한계가 NSP4에 대해서는 적용되지 않았다. P1-아르기닌 구아니디늄 기는 NSP4에 대해 용매-노출되기 때문에, NSP4는 아르기닌 구아니디늄 기에 대한 변형, 예컨대 여분의 메틸 기를 수용할 수 있는 것으로 판단된다. 펩티드 기질을 사용한 효소적 검정은 NSP4가 실제로 메틸아르기닌 다음을 절단할 수 있는 반면에, 정규 S1 포켓을 갖는 트립신-유사 프로테아제, 인자 Xa는 단지 비변형된 P1-Arg 기질만을 절단할 수 있음을 입증하였다 (도 6d 및 도 8).

[0532] 실시예 2: NSP4-결핍 마우스를 사용한 NSP4의 생물학적 역할의 결정

[0533] NSP4의 생체내 기능을 연구하는 것에 대한 제1 단계로서, 호중구-의존성 K/BxN 혈청 전달 관절염 모델을 사용하여 염증에서의 NSP4의 가능한 역할을 조사하였다 (Monach et al., Curr Protoc Immunol, 2008, Chapter 15:Unit 15.22). NSP4는 이전에 염증성 관절염과 연관되었지만, 실험적 관절염 모델에서 완전 보호를 달성하기 위해서는 NE 및 CG 둘 다의 복합 결핍이 필요하였고, 이는 NSP 사이의 기능상 중복을 시사한다. 그러나, NSP4의 고유한 아르기닌 특이성 및 그의 진화 상태를 고려하면, NSP4는 호중구-매개 염증 과정에서 본질적인 기능을 가질 수 있는 것으로 추측된다. 염증에서의 NSP4의 역할을 조사하기 위해, NSP4-결핍 마우스를 이전에 기재된 바와 같이 생성하고 (Tang et al., Nat Biotechnol, 2010, 28:749-755) (도 9a) 이를 C57BL/6 계통과 역교배시켰다. NSP4^{-/-} 마우스에서 NSP4의 성공적인 제거를 3개의 상이한 NSP4 엑손 경계에 걸쳐있는 상이한 PCR 프라이머/프로브 세트를 사용하는 RT-qPCR에 의해 확인하였다 (도 9b). 유사한 방식으로, NSP4^{-/-} 마우스에 대해 또한 이러한 프로테아제-풍부 유전자좌에서 NSP4에 플랭킹된 프로테아제 유전자의 발현을 분석하였다. NSP 구성원 NE 및 PR3을 비롯하여 이웃 프로테아제 유전자 중 어떠한 것도 영향을 받지 않았다 (도 9b). NSP4-결핍 마우스는 생존하였고, 생식력이 있었고, 포괄적인 표현형 스크린에서 어떠한 두드러진 이상도 나타내지 않았고 (Henrich et al., Nat Struct Biol, 2003, 10:520-526), 정상 골수 세포, B 세포, 단핵구 골수 세포, 및 호중구 카운트를 가졌다 (도 9c).

[0534] K/BxN 모델의 하나의 주요 특징은 정맥내 K/BxN 혈청 투여 후 마우스 발에서의 국제화된 혈관 부종의 신속한 발병이다 (Binstadt et al., Nat Immunol, 2006, 7:284-292). 혈관 누출을 모니터링하기 위해, 근적외선 형광 혈관 프로브를 K/BxN 혈청 주사 5분 전에 NSP4-결핍 및 야생형 마우스 둘 다에 투여한 다음, 생체내 근적외선 형광 영상화에 의해 후속 혈관 투과성 변화를 가시화 및 정량화하였다 (도 10a 및 b). K/BxN 혈청의 정맥내 투여 후에, 야생형 마우스는 예상된 바와 같이 재현가능한 중증도 및 동역학으로 발에서 혈관 프로브의 신속한 혈관외유출을 나타내었다. 놀랄만하게 대조적으로, NSP4^{-/-} 마우스의 형광 수준은 연구 내내 기준선으로 남아있었고 (도 10a 및 b), 이는 NSP4가 이러한 면역 복합체-촉발 혈관투과성 반응을 매개하는데 있어서 필수적인 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0535] 야생형 마우스에서 K/BxN 혈청 전달 후 혈관 누출의 초기 유도에 이어서 홍반 및 부종이 발생한 반면에, NSP4^{-/-} 마우스는 유도후 8-일의 기간 동안 유의하게 보호된 상태로 남아있었다 (도 11a). 실험 종점에서의 발의 조직학적 검사는 야생형 대조군에서 경도 내지 중증도의 다발관절염을 밝혀낸 반면에, NSP4^{-/-} 마우스는 본질적으로 병변이 존재하지 않았다 (도 11b 및 11c). 야생형 마우스에서, 관찰된 다발관절염은 K/BxN 모델과 일치하였고, 이는 경도의 섬유증식증을 동반한 염증 세포, 우세하게는 호중구에 의한 침윤, 연골 손상 및 골 재형성을 특징으로 하였다 (도 11c). 대조적으로, NSP4^{-/-} 마우스는 최소 병리학적 병변 (도 11c, 중간 우측), 및 실질적으로 전무한 염증 세포 침윤 (도 11c, 하단 우측)을 가졌다. 종합하면, 이들 결과는 NSP4가 이러한 호중구-매개 질환 모델에서 필수적인 염증유발 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0536] 실시예 3: 입체형태-특이적 및 종-특이적 NSP4 항체의 생성

- [0537] 한 패널의 항체를 생성하고, NSP4에 대한 특이성에 대해 특징화하였다. 잔기는 카바트 시스템 (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))을 사용하여 넘버링하였다.
- [0538] 방법
- [0539] 재조합 인간 및 마우스 NSP4의 생성
- [0540] 재조합 인간 NSP4 및 마우스 NSP4를 라이브러리 분류를 위한 항원으로서 생성하였다. NSP4는, 조기 활성화를 방지하여 세포 독성을 감소시키고 이중 발현 시스템 내의 단백질 발현을 증가시키기 위해, 단백질 N-말단에서 절단가능한 에피토프 태그를 조합함으로써 불활성 지모겐으로서 생산하였다. 총 4종의 NSP4 항원을 생성하였다: 인간 지모겐 (hZ), 인간 활성 (hA), 마우스 지모겐 (mZ), 및 마우스 활성 (mA). hZ NSP4를 곤충 세포에서 발현시키고, 고정된 금속 친화성 크로마토그래피를 사용하여 N-말단 6His-태그에 의해 정제하였다. mZ NSP4는 CHO 세포에서 발현시키고, 항-FLAG 친화성 크로마토그래피를 사용하여 N-말단 FLAG 태그에 의해 정제하였다. hZ 및 mZ NSP4 둘 다는 슈퍼텍스 200 크기 배제 크로마토그래피 (지이 헬스케어) 및 MonoS 양이온 교환 크로마토그래피 (지이 헬스케어)를 사용하여 추가로 정제하였다. 이들 NSP4의 촉매 활성 형태 (hA 및 mA)는 정제된 지모겐 형태 (hZ 및 mZ)를 EKmax 엔테로펩티다제 (인비트로젠)로 처리하여 N-말단 에피토프 태그를 제거함으로써 생성하였고, 이어서 또 다른 MonoS 양이온 교환 크로마토그래피 (지이 헬스케어) 상에서 동일한 정도까지 정제하였다. 절단은 아미노산 서열 Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 다음의 리신의 C-말단 측에서 일어났다. 이들 4종의 NSP4 항원 (hZ, hA, mZ, 및 mA)을 파지 라이브러리 분류 및 입체형태-특이적 및 중-특이적 항-NSP4 항체를 스크리닝하는데 병용하였다 (도 12).
- [0541] 라이브러리 구축을 위한 파지미드 벡터
- [0542] 주형으로서, Lib-3으로 기재된 (문헌 [Lee et al., 2004. J Mol Biol 340:1073-1093] 참조), 변형된 h4D5-코딩 파지미드, pV0350-4 상의 3개의 중쇄 상보성-결정 영역 (CDR)에서 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이유발을 사용하여 파지-디스플레이된 합성 항체 라이브러리를 생성하였다. 나이트 라이브러리를 사용한 초기 선택을 위해, hZ-, hA-, mZ, 및 mA-NSP4를 각각 맥시소르프(Maxisorp) 이뮤노플레이트 (넉(Nunc)) 상에 개별적으로 고정시키고, 파지 라이브러리를 1% BSA 또는 카세인 (1 및 3 라운드에 BSA, 2 및 4 라운드에 카세인), 0.1% 트윈-20, 및 추가의 0.5 M NaCl로 보충된 포스페이트 완충 염수 중 높은 염 조건 하에 4회 라운드의 결합 선택 (문헌 [Lee et al., J Mol Biol, 2004, 340:1073-1093] 참조)을 통해 사이클링시켜, 양으로 하전된 NSP4 단백질 및 음으로 하전된 파지 입자 사이의 비-특이적 상호작용을 감소시켰다. 3 및 4 라운드로부터 선택된 무작위 클론을 골라내고 검정하여, 파지 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 특이적 결합체를 확인하였다. NSP4에 결합하는 선택된 클론의 VH 영역을 서열분석을 위해 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭시켰다.
- [0543] 경쟁 파지 ELISA
- [0544] 카르베니실린 및 KO7 헬퍼 파지로 보충된 30 ml 2YT 배지 중에서 30°C에서 밤새 성장시켜 단일 콜로니로부터 파지 클론을 번식시키고, 정제하고, 기재된 바와 같이 검정하였다 (문헌 [Lee et al., J Mol Biol, 2004, 340:1073-1093] 참조). 포화-미만 농도의 파지를 먼저 증가하는 농도의 표적 NSP4 항원 (hZ, hA, mZ, 또는 mA)과 1 내지 2 시간(들) 동안 인큐베이션시킨 다음, 동일한 NSP4 항원으로 코팅된 웰로 옮겨 미결합 파지가 포획되게 하였다. 결합된 파지의 양을 항-M13 항체-양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 접합체 (지이 헬스케어)로 측정하고, 기질 테트라메틸벤지딘 (TMB) (키르케가드 앤드 페리 래보러토리즈(Kirkegaard and Perry Laboratories))을 사용하여 대략 5분 동안 발색시키고, 1.0 M H3PO4로 켄칭하고, 이전에 기재된 바와 같이 (문헌 [Lee et al., J Mol Biol, 2004, 340:1073-1093] 참조) 450 nm 파장에서 분광광도계를 사용하여 판독하였다. 억제 농도 (IC50) 값을 고정된 항원에 대한 파지 결합의 50%를 억제하는 가용성 항원의 농도로서 계산하였다.
- [0545] 항-NSP4 항체 생산 및 친화도 측정
- [0546] 특징화를 위해 IgG 단백질을 생성하기 위해, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서의 일시적 IgG 발현을 위해 선택된 파지 클론의 가변 도메인을 인간 경쇄 또는 중쇄 (인간 IgG1) 불변 도메인을 갖는 pRK5-기반 플라스미드 내로 클로닝하고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.
- [0547] 생물층 간섭측정법 측정 (포르테바이오)을 사용하여 모든 4종의 NSP4 항원 (hZ-, hA-, mZ-, 및 mA-NSP4)에 대한 항-NSP4 항체의 친화도를 결정하였다. 각각의 항-NSP4 후보 5 µg/ml를 항-인간 Fc 센서 상에 고정시키고, 중

가하는 농도의 각각의 NSP4 항원과 인큐베이션시켜 친화도 측정을 수득하였다. 이어서 이들 항체 후보를 하기 카테고리 중 하나로 비닝하였다: 1) 입체형태 및 종-특이적: hZ, hA, 또는 mA에 결합함 (mZ-특이적 결합체는 전혀 확인되지 않음); 2) 입체형태-특이적: NSP4의 활성 (hA/mA) 또는 지모겐 (hZ/mZ) 형태에 결합함; 3) 종-특이적: NSP4의 인간 (hZ/hA) 또는 마우스 (mZ/mA) 형태에 결합함; 및 4) 범-NSP4: NSP4의 모든 4가지 형태 (hZ/hA/mZ/mA)에 결합함.

[0548] NSP4 차단 항체에 대한 스크리닝

[0549] NSP4를 사용하여 한 패널의 내부 켄칭된 형광원성 펩티드 기질을 스크리닝하는 것에 의한 (문헌 [Eigenbrot et al., Structure, 2012, 20:1040-1050] 참조) NSP4 형광원성 활성 검정을 고안하였다. 50 nM의 NSP4를 50 mM 트리스 pH 8.0, 200 mM NaCl, 및 0.25% w/w CHAPS 중에서 각각의 형광-켄칭된 펩티드 기질 2.5 μ M과 인큐베이션시키고, 스펙트라맥스 M5 분광광도계 (몰레큘라다이바이시스)를 여기 328 nm 및 방출 393 nm로 사용하여 형광 강도를 결정하였다. NSP4에 의해 가장 효율적으로 절단된 펩티드 기질은 Mca-Ile-Arg-Arg-Ser-Tyr-Ser-Phe-Lys[Dnp]-Lys였고, 여기서 Mca는 7-메톡시쿠마린-4-아세테이트이고 Dnp는 디니트로페놀이다. NSP4와의 인큐베이션은 특이적 절단을 발생시켜 2개의 별개의 단편: Mca-Ile-Arg-Arg 및 Ser-Tyr-Ser-Phe-Lys[Dnp]-Lys를 생성하였다.

[0550] 차단 항-NSP4 항체 후보를 확인하기 위해, 10 nM의 제조함 인간 또는 마우스 NSP4를 각각의 항체 후보 500 nM과 37°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 이러한 NSP4:항체 혼합물을 6.7 μ M의 형광원성 펩티드 기질과 혼합하고, 37°C에서 5분 동안 인큐베이션시킨 다음, 상기 기재된 파라미터를 사용하여 스펙트라맥스 M5 분광광도계 상에서 판독하였다.

[0551] 결과

[0552] 중쇄 가변 도메인 (VH) 라이브러리 패닝 동안 NSP4에 강력하게 결합하는 3개의 항체 후보를 단리하고, 추가의 특징화를 위한 IgG1 항체를 생성하는데 사용하였다 (도 13). 항체 후보 5-2, 5-3, 및 5-4는 활성 마우스 (mA) NSP4 항원에 대해 높은 정도의 결합 특이성을 나타내었다 (각각 도 14a, 14b, 및 14c). 항체 후보 5-2, 5-3, 및 5-4의 평가는 마우스 NSP4의 펩티드 절단 활성을 차단하는 그의 능력을 나타내었다 (도 15). 또한, 이들 항체는 인간 NSP4의 펩티드 절단 활성은 차단하지 못했고, 이는 5-2, 5-3, 및 5-4가 마우스 NSP4에 대해 종 특이적임을 나타낸다 (도 15).

[0553] 인간 NSP4에 대한 항체는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0554] 항체 서열

항체 5-2'에 대한 중쇄 CDR1

GFTFSNTYIS (서열 1)

항체 5-2'에 대한 중쇄 CDR2

GFIYPANGATYYADSVKG (서열 2)

항체 5-2'에 대한 중쇄 CDR3

RRYRLSFDY (서열 3)

항체 5-3'에 대한 중쇄 CDR1

GFTFSGNDIS (서열 4)

항체 5-3'에 대한 중쇄 CDR2

AGISPYGGSTYYADSVKG (서열 5)

항체 5-3'에 대한 중쇄 CDR3

RRVSFYSRHAGMDY (서열 6)

항체 5-4'에 대한 중쇄 CDR1

GFTFTSYAIS (서열 7)

[0555]

항체 5-4'에 대한 중쇄 CDR2

AGISPSNGYTNADSVKG (서열 8)

항체 5-4'에 대한 중쇄 CDR3

RAGRWTHSDIDY (서열 9)

항체 5-2', 5-3', 및 5-4'에 대한 경쇄 CDR1

RASQDVSTAVA (서열 10)

항체 5-2', 5-3', 및 5-4'에 대한 경쇄 CDR2

SASFLYS (서열 11)

항체 5-2', 5-3', 및 5-4'에 대한 경쇄 CDR3

QSYTTPPT (서열 12)

항체 5-2'에 대한 중쇄 가변 영역

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNTYISWVRQAPGKGLEWVGFIYPANGA
TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRRLSFDYWGQGLV
TVSS (서열 13)

항체 5-3'에 대한 중쇄 가변 영역

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGNDISWVRQAPGKGLEWVAGISPYGGS
TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRVSFYSRHAGMDYW
GQGLVTVSS (서열 14)

항체 5-4'에 대한 중쇄 가변 영역

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAISWVRQAPGKGLEWVAGISPSNGY
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRAGRWTHSDIDYWGQ
GTLVTVSS (서열 15)

항체 5-2', 5-3', 및 5-4'에 대한 경쇄 가변 영역

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (서열 16)

실시예 4: NSP4 mRNA 및 단백질 발현 수준의 특징화

NSP4에 대한 mRNA 및 단백질 발현 수준 둘 다를 다양한 마우스 세포 유형에서 측정하여 세포 유형을 NSP4의 존재에 대해 프로파일링하였다.

방법

NSP4 mRNA 수준의 RT-qPCR 측정. 마우스 대퇴 골수로부터의 면역 세포 집단에서 NSP4의 mRNA 발현 수준을 정량화하기 위해, RT-qPCR 분석을 수행하였다. 마우스 대퇴 골수로부터의 면역 세포 집단을 표준 유동 세포측정법 프로토콜 및 하기 항체 클론: 항-CD11b (M1/70); 항-CD11c (N418); 항-B220 (RA3-6B2); (BM8); 항-Ly6C (HK1.4); 항-Ly6G (1A8); 항-Siglec F (E50-2440)를 사용하여 확인하였다. 모든 항체는 이바이오사이언스로부터 획득하였다. 생존율은 사이토스 블루 (인비트로젠)를 사용하여 평가하였다. 염색된 세포를 BD 바이오사이언시스 FACSria 세포 분류기를 사용하여 분류하였다. 하기 집단을 하류 분석을 위해 분류하였다: B 세포, B220+CD11b-; 단핵구, Ly6C+CD11b+; 호중구, Ly6G+CD11b+; 호산구, Siglec F+CD11b+. RNeasy 미니 키트 (쿼아

젠)를 사용하여 각각의 세포 유형으로부터 전체 RNA 함량을 단리하고, iScript 역전사효소 (바이오-라드)를 사용하여 상응하는 cDNA를 합성하였다 (모두 제조업체의 지침에 따라 수행함). cDNA 샘플로부터, 하기 3개의 NSP4/Prss57 프라이머/프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템즈): Prss57_1 (ABI Mm01144794_m1), Prss57_2 (ABI Mm01144795_m1), 및 Prss57_3 (ABI Mm01144796_m1)을 사용하는 택맨 2X PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 qPCR 측정을 수행하였다. 유전자 발현 수준을 마우스 18S rRNA 대조군 대비 $2^{(-dCt)}$ 로 표현하였다.

[0562] NSP4 단백질의 웨스턴 블롯 검출. 마우스 대퇴 골수로부터의 면역 세포 집단에서 NSP4 단백질의 존재를 측정하기 위해, 토끼 항-마우스 NSP4 폴리클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 마우스 호중구 음성 선택 키트 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 수행함으로써 전체 골수 세포로부터 골수 유래 호중구를 단리하였다. 골수 유래 호산구는 문헌 [Dyer et al., 2008. J Immunol 181(6):4004-4009]에 기재된 바와 같이 골수 세포로부터 단리하고 배양하였다. 골수 유래 비만 세포는 문헌 [Lukacs et al., 1996, Blood 87(6):2262-2268]에 기재된 바와 같이 골수 세포로부터 단리하고 배양하였다. 골수 유래 대식세포는 문헌 [Zhang et al., 2008. Curr Protoc Immunol, Unit 14.1]에 기재된 바와 같이 골수 세포로부터 단리하였다. SDS-램리(Laemmli) 샘플 완충제 (바이오-라드)를 사용하여 세포 용해물을 생성하고, BCA 단백질 검정 (피어스(Pierce))을 사용하여 농도를 결정하였다.

[0563] 결과

[0564] NSP4 mRNA 수준의 RT-qPCR 측정. RT-qPCR 분석을 수행하여 마우스 대퇴 골수로부터 단리된 면역 세포 집단에서 NSP4의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. 3개의 상이한 엑손 접합부에 걸쳐 있는 3개의 상이한 NSP4/Prss57 프라이머/프로브 세트를 사용한 RT-qPCR 측정은 B 세포, 호중구, 호산구, 및 단핵구에서의 NSP4 mRNA 발현 수준을 확증하였다 (도 16). 도 16a-c에 의해 제시된 바와 같이, NSP4 mRNA는 호산구에서 매우 고도로 발현되었고, 측정은 단핵구에서의 NSP4 mRNA 발현의 존재를 나타내었다. NSP 유전자의 전사가 주로 전골수구 단계 동안 일어나고 완전히 분화된 호중구에서는 중지되기 때문에, NSP4 전사체는 완전히 분화된 호중구에서 매우 낮았다. 문헌 [Theilgaard-Monch et al., Blood 105:1785-1796, 2005]을 참조한다.

[0565] NSP4 단백질의 웨스턴 블롯 검출. 토끼 항-마우스 NSP4 폴리클로날 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 마우스 대퇴 골수로부터 단리되고 배양된 호중구, 호산구, 비만 세포 및 대식세포에서의 NSP4의 단백질 발현 수준을 측정하였다 (도 17). 제시된 바와 같이, NSP4 단백질 (약 30 kD)은 야생형 마우스로부터 단리된 호중구 및 호산구에서 검출되었지만, NSP4는 야생형 마우스로부터의 비만 세포 또는 대식세포에서는 검출되지 않았다. NSP4는 NSP4-결핍 마우스로부터의 세포에서 검출되지 않았다.

[0566] 실시예 5: 호중구 동원은 NSP4를 필요로 한다

[0567] NSP4^{-/-} 마우스에서 호중구 관절 침윤의 결여를 확인하기 위해, 야생형 및 NSP4^{-/-} 마우스에서 루미놀-기반 생물 발광 영상화에 의해 호중구 동원을 모니터링하였다.

[0568] 방법

[0569] 마우스 발에서의 호중구 미엘로퍼옥시다제 활성의 루미놀-생물발광 영상화. 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 활성을 마우스 발의 비-침습적 생물발광 영상화 (BLI)를 통해 생체내 모니터링하였다. 마우스를 2% 이소플루란 (버틀러 셰인, 1 L/min 유동)으로 마취시키고, 꼬리 정맥 카테터를 이식하고, 포톤 이미저(Photon Imager) (바이오스페이스 랩(Biospace Lab), 프랑스 파리) 내부의 가열된 스테이지 상에 위치시켰다. 마우스에게 꼬리 정맥 카테터를 통해 75 μ l K/BxN 혈청 및 150 μ l MPO-감수성 루미놀 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)) 칵테일을 주사하였다. 각각의 마우스에 대해 5분, 6시간, 및 24시간 간격으로 칵테일 주사후 8분에 걸쳐 발광을 기록하였다. 생물발광 슈도-컬러 영상을 마우스의 회색조 명시야 영상에 중첩시켜 제시하였고, 가장 강렬한 신호는 적색이고 가장 약한 신호는 청색이다. 루미놀 신호의 정량 분석을 위해, 모든 4개의 발에 대한 생물발광 영상에 관심 타원 영역 (ROI)을 도식하였다. ROI 면적은 일정하게 유지되었고, 결과는 M3 비전 소프트웨어 (바이오스페이스 랩)를 사용하여 cm^2 당 분당 광자 카운트로서 표현하였다.

[0570] NSP4-결핍 마우스에서의 미엘로퍼옥시다제의 발현을 확인하기 위해, 마우스 호중구 단리 키트 (밀테니 바이오텍)를 사용하여 대퇴 골수로부터 호중구를 단리하고, 2X 램리 완충제 (바이오-라드)를 사용하여 전체 세포 용해물을 제조하였다. 미엘로퍼옥시다제 및 액틴을 각각 항-미엘로퍼옥시다제 마우스 모노클로날 항체 (클론 392105; 알앤디 바이오시스템즈(R&D Biosystems)) 및 항-베타-액틴 마우스 모노클로날 항체 (클론 8H10D10;

셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology))를 사용하여 검출하였다.

[0571] 결과

[0572] 호중구 미엘로퍼옥시다제 (MPO) 활성의 루미놀-기반 생물발광 영상화를 수행하여 마우스 발 내의 호중구를 영상화하였다 (도 18a). NSP4-결핍 호중구는 정상 수준의 MPO를 발현하였고 (도 18b), 따라서 루미놀-생물발광 수준은 호중구 동원을 모니터링하기 위한 대용물 마커로서 사용될 수 있다. 문헌 [Gross et al., 2009, Nat. Med. 15::455-461]을 참조한다. NSP4^{-/-} 마우스는 K/BxN 혈청 전달 24 h 후에 유의하게 감소된 호중구 미엘로퍼옥시다제 활성을 나타내었고 (도 18c), 이는 생체내 호중구 이행 및 관절 침윤을 매개하는데 있어서 NSP4의 중요한 역할을 시사한다. 이들 광학 영상화 결과는 상기 기재된 조직학적 검사에서 관찰된 호중구 침윤의 결여와 일치하며, 따라서 이는 NSP4^{-/-} 마우스에서의 호중구 관절 침윤의 결여를 확인시켜준다.

[0573] 실시예 6: 항체 3-5 및 5-1의 친화도 개선

[0574] 항체 클론 3-5 및 5-1의 항체 경쇄 서열을 NSP4에 대해 보다 높은 친화도로 결합하도록 최적화함으로써 항체 클론 3-5 및 5-1을 친화도 성숙시켰다.

[0575] 방법

[0576] VH 라이브러리로부터 유래된 클론 3-5 및 5-1의 친화도 개선을 위한 라이브러리 구축. 항체 클론 Ab 3-5 (Ab35로 약기함) 및 Ab 5-1 (Ab51로 약기함)을 추가의 친화도 개선을 위해 선택하였다. 모든 CDR-L3 위치에서 정지 코돈 (TAA)을 함유하고 M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는 파지미드 pW0703 (파지미드 pV0350-2b로부터 유래됨 (Lee et al., J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004)))은 친화도 성숙을 위한 중쇄 가변 도메인 (VH) 라이브러리로부터의 관심 클론의 VH를 그래프팅하기 위한 라이브러리 주형으로서의 역할을 하였다. 친화도 성숙을 위해 하드 및 소프트 무작위화 전략 둘 다를 사용하였다. 하드 무작위화의 경우에, 3개의 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 1개의 경쇄 라이브러리를 천연 인간 항체를 모방하도록 설계한 아미노산을 사용하여 무작위화하고, 설계된 DNA 축증성은 문헌 [Lee et al. (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004))]에 기재된 바와 같았다. 소프트 무작위화의 경우에, CDR-L3의 위치 91-96, CDR-H1의 위치 30-33, 35, CDR-H2의 위치 50, 52, 53-54, 56, 및 58, CDR-H3의 위치 95-100, 100A, 및 100C에서의 잔기를 표적화하고; CDR 루프의 3가지 상이한 조합, H1/L3, H2/L3, 및 H3/L3을 무작위화를 위해 선택하였다. 선택된 위치에서 대략 50%의 돌연변이율을 도입하는 소프트 무작위화 조건을 달성하기 위해, 돌연변이유발 DNA를 야생형 뉴클레오티드를 선호하는 염기의 70-10-10-10 혼합물을 사용하여 합성하였다 (Gallop et al., Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251 (1994)).

[0577] 친화도 개선을 생성하기 위한 파지 분류 전략. 친화도 개선 선택을 위해, 파지 라이브러리를 1 라운드의 플레이트 분류에 이어 3개의 추가의 라운드의 증가하는 엄격도에 의한 용액 분류에 적용시켰다. 1 라운드의 경우에 플레이트 분류 전략을 사용하여, 파지 투입량 1% BSA 및 0.05% 트윈 20 중 3 OD/ml를 마우스 NSP4 5 ug/ml와 1% BSA 및 0.05% 트윈-20을 함유하는 완충제 웰당 100ul로 실온에서 1.5 h 동안 완전한 진탕 하에 인큐베이션시켰다. 웰을 PBS-0.05% 트윈-20으로 10회 세척하였다. 결합된 파지를 150 µl/웰 50mM HCl, 500mM KCl로 30분 동안 용리시키고, 이어서 50 µl/웰의 1M 트리스 pH 8로 중화시키고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 증폭시켰다. 2 내지 4 라운드의 경우에, 용액 분류 전략을 증가하는 선택 엄격도로 사용하였다. 구체적으로, 비오틴화 마우스 NSP4를 20 nM (2 라운드), 5 nM (3 라운드), 및 500 nM 비표지 mNSP4 경쟁자의 존재하에 0.5 nM (4 라운드)로 사용하여 개선된 온-레이트 및 오프-레이트 결합체를 선택하였다. 배경 결합을 결정하기 위해, 파지를 함유하는 대조 웰을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트 상에 포획시켰다. 뉴트라비딘-코팅된 웰 상에 포획된 결합된 파지를 150 µl/웰 50mM HCl, 500mM KCl로 30분 동안 용리시키고, 이어서 50 µl/웰의 1M 트리스 pH8로 중화시키고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 증폭시켰다.

[0578] 에피토프 맵핑. 재조합 마우스 NSP4를 완충제 단독, NSP4 항체 5-1 (Fab 포맷), 또는 10 ug/ml 헤파린 술페이트 (시그마 알드리치)와 함께 포스페이트 완충 염수 중에서 실온에서 15분 동안 사전인큐베이션시켰다. 이어서 이러한 마우스 NSP4 혼합물의 50 nM을 1X 동역학적 완충제 (폴 코포레이션(PaII Corporation)) 중 40 ug/ml로 고정된 NSP4 항체로 코팅된 광학 센서와 함께 인큐베이션시켰다. 결합을 옥테트 생물층 간섭측정법 (폴 코포레이션)을 사용하여 측정하였다.

[0579] 결과

[0580] 다중 항체 클론을 파지 IC50 실험에서 시험하여 NSP4에 대한 그의 결합 친화도를 추정하였다. 간략하게, 2

ug/ml의 NSP4 (hZ, hA, mZ, 또는 mA 변이체)를 0.5% BSA로 보충된 PBS 중에서 웰에 4℃에서 밤새 코팅하였다. 각각의 개별 파지 클론 (0.01 OD/ml)을 정제하고, 증가하는 농도의 가용성 NSP4 단백질과 실온에서 2 h 동안 인큐베이션시킨 후, 고정된 NSP4 단백질로 코팅된 웰에 실온에서 15 min 동안 놓아두었다. 이어서 웰을 0.05% 트윈-20으로 보충된 PBS로 10회 세척하고, HRP와 접합된 항-M13 파지 항체 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 사용하여 발색시켰다. 도 19에 제시된 바와 같이, 보다 높은 친화도의 파지 클론이 보다 낮은 친화도의 파지 클론보다 보다 낮은 항원 농도에서 가용성 항원과 회합된 상태로 남아있을 가능성이 더 크며, 15 min 인큐베이션 기간 동안 웰에 코팅된 고정된 항원에 대한 더 적은 결합을 생성할 것이다. 높은-친화도 파지 클론일 가능성이 더 높은 가용성 파지:항원 복합체는 따라서 연속 세척 단계를 통해 제거되어, 임의의 주어진 가용성 항원 농도에서 보다 낮은 A450 신호를 생성할 것이다. 따라서, 보다 높은 친화도의 파지 클론은 보다 낮은 친화도의 파지 클론과 비교하여 결합 곡선에서의 좌측-이동을 동반하며 보다 낮은 파지 IC50 값을 가질 것이다. 이들 클론에 대한 HVR 서열을 하기 표 3 및 4에 제공한다. 표 3 및 4의 각각의 항체는 서열 16에 상응하는 경쇄 가변 영역 및 각각 서열 19, 11, 및 12에 상응하는 HVR-L1, HVR-L2, 및 HVR-L3 서열을 포함하는 동일한 경쇄를 사용하였다.

[0581]

<표 3> 항-NSP4 항체에 대한 HC HVR 서열.

클론	HVR-H1	서열 번호	HVR-H2	서열 번호	HVR-H3	서열 번호
1-1	GFTFSGSWIS	20	GTISPYNGSTYYADSVKG	21	RVLRPKVYASVMDY	22
1-2	GFTFSGYSIH	23	AGISPTNGYTDYADSVKG	24	RLVFYRGVMDY	25
1-3	GFTFSDNWIS	26	GYIYPASGYTDYADSVKG	27	SDSPHAYWYAMDY	28
1-5	GFTFTNNSIS	29	GAISPNNGSTYYADSVKG	30	RNAWHYSWVGVM DY	31
2-1	GFTFTDYSIH	32	AEIYPYSGDTYYADSVKG	33	RDGDGWFDWAMDY	34
2-2	GFTFSSTAIS	35	GEIYPSDGYTDYADSVKG	36	RVKWAVSSLGVMDY	37
2-3	GFTFTDSDIS	38	AWISPSDGATDYADSVKG	39	HEASDDDYAIDY	40
2-4	GFTFSDYWIS	41	AGISPNNGDTYYADSVKG	42	REDDDERDYAMDY	43
2-5	GFTFTGYGIS	44	GWIYPASGATYYADSVKG	45	RHRAFDWYPYYIGSSVMDY	46
3-2	GFTFSDYSIS	47	GEINPAGGATYYADSVKG	48	RGDFPFWSDAYYVMDY	49
3-5	GFTFSDNDIS	50	GSISPDNGDTNYADSVKG	51	RDDVPAVFTSAMDY	52
4-2	GFTFSGSDIS	53	GEIYPSNGDTYYADSVKG	54	RSVRPSWWAMDY	55
4-3	GFTFSSYDIS	56	GTISPYDGYTDYADSVKG	57	RYIRRYSVHYGMDY	58
4-4	GFTFTSTSIH	59	AEITPHGGYTNYADSVKG	60	RGRTKWGWLYGMDY	61
4-5	GFTFTNNSIH	62	AEIAPDDGYTYYADSVKG	63	RGVIRYAYLYAMDY	64
5-1	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	KSLFHNVAFDY	67
5-2	GFTFSNTYIS	1	GFIYPANGATYYADSVKG	2	RRYRLSFDY	3
5-3	GFTFSGNDIS	4	AGISPYGGSTYYADSVKG	5	RRVSFYSRHAGMDY	6
5-4	GFTFTSYAIS	7	AGISPSNGYTNYADSVKG	8	RAGRWTHSDIDY	9

[0582]

[0583] <표 4> 항-NSP4 항체에 대한 중쇄 가변 영역 서열. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.

클론	HC 가변 영역 서열	서열 번호
1-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSWISWVRQAPGKG LEWVGTISPYNSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR EDTAVYYCARVLRPKVYASVMDYWGQGLTVTVSS	68
1-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYSIHVVRQAPGKG LEWVAGISPTNGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARLVFYRGVMDYWGQGLTVTVSS	69
1-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNWISWVRQAPGK GLEWVGYYIPASGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCASDSPHAYWYAMDYWGQGLTVTVSS	70
1-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNNSISWVRQAPGKG LEWVGAI SPNNGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR EDTAVYYCARNAWHYSWVGVM DYWGQGLTVTVSS	71
2-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYSIHVVRQAPGKG LEWVAEIYPYSGDTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARDGDGWF DWAMDYWGQGLTVTVSS	72
2-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSTAISWVRQAPGKG LEWVG EIPSDGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARVKWAVSSSLGVMDYWGQGLTVTVSS	73
2-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSDISWVRQAPGKG LEWVAWISPSDGATDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAHEASDDDYAIDYWGQGLTVTVSS	74
2-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESDYWISWVRQAPGK GLEWVAGISPNNGDTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCAREDDDERDYAMDYWGQGLTVTVSS	75
2-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTGYGISWVRQAPGKG LEWVGWIYPASGATYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARHRAFDWYPYIGSSVMDYWGQGLTVTVSS	76
3-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESDYSISWVRQAPGKG LEWVG EIPNAGGATYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDFEFWSDA Y YVMDYWGQGLTVTVSS	77
3-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESDNDISWVRQAPGKG LEWVGISPDNGDTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR EDTAVYYCARDDVPAVFTSAMDYWGQGLTVTVSS	78
4-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESGDSISWVRQAPGKG LEWVG EIPSNNGDTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARSVRPSWWAMDYWGQGLTVTVSS	79
4-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYDISWVRQAPGKG LEWVGITISP YDGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARYIRRYSVHYGMDYWGQGLTVTVSS	80
4-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTSIH VVRQAPGKG LEWVAEITPHGGYTN YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGRTKWGWLYGMDYWGQGLTVTVSS	81
4-5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNNSIH VVRQAPGKG LEWVAEIA PDDGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGVIRYAYLYAMDYWGQGLTVTVSS	82
5-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSGIH VVRQAPGKG LEWVAWISPTGGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSLHNVAFDYWGQGLTVTVSS	83
5-2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESNTYISWVRQAPGKG LEWVG EIPNAGATYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRYRLSFDYWGQGLTVTVSS	84
5-3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESGNDISWVRQAPGKG LEWVAGISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR EDTAVYYCARRVSFYSRHAGMDYWGQGLTVTVSS	85
5-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAISWVRQAPGKG LEWVAGISPSNGYTN YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR EDTAVYYCARAGRWT HSDIDYWGQGLTVTVSS	86

[0584]

[0585] 도 19는 경쟁자로서 가용성 hZ-, hA-, mZ-, 또는 mA-NSP4를 사용한 (표지된 바와 같음) 파지 IC50 실험의 결과를 보여준다. 이들 실험에서, 보다 높은 친화도의 클론은 보다 낮은 가용성 NSP4 농도에서 가용성 NSP4에 결합하였고, 이에 따라 곡선은 좌측으로 이동하였다. 이들 결과에 기초하여, 개별 항체를 정제하고, 추가의 특징화를 위해 발현시켰다. 이들 결과를 하기 표에 요약한다.

[0586] <표 8> NSP4-특이적 항체 파지 클론의 파지 IC50 값의 요약.

Ab 클론	IC50에 사용된 가용성 경쟁자 (nM)			
	hZ (NSP4)	hA (NSP4)	mZ (NSP4)	mA (NSP4)
1-시리즈 (hZ-NSP4 에 대해 패닝됨)				
1-1	154.70	--	--	--
1-2	22.08	--	--	--
1-3	52.05	--	--	--
1-5	114.50	--	--	--
2-시리즈 (hZ-NSP4 에 대해 패닝됨)				
2-1	7.62	3.81	--	--
2-2	10.42	10.11	--	--
2-3	3.07	4.96	--	--
2-4	2.30	1.63	--	--
2-5	21.98	5130.00	--	--
3-시리즈 (mZ-NSP4 에 대해 패닝됨)				
3-2	--	--	0.15	--
3-5	--	--	0.18	--
4-시리즈 (hA-NSP4 에 대해 패닝됨)				
4-2	--	84.76	--	--
4-3	--	1.58	--	--
4-4	--	1.48	--	--
5-시리즈 (mA-NSP4 에 대해 패닝됨)				
5-1	--	--	--	9.93
5-2	--	--	--	25.01
5-3	--	--	--	319.00
5-4	--	--	--	60.48

[0587]

[0588] 이들 항체를 생물층 간섭측정법 측정을 사용하여 추가로 특징화하여 상이한 NSP4 단백질 (즉, hZ, hA, mZ, 및 mA, 표지된 바와 같음)에 대한 친화도 (kD)를 추정하였다. 도 20a 및 b는 각각 항체 1-1 및 1-2에 대한 결과를 보여준다. 도 21a 및 b는 각각 항체 1-3 및 1-5에 대한 결과를 보여준다. 도 22a-d는 각각 항체 2-1, 2-2, 2-3 및 2-4에 대한 결과를 보여준다. 도 23은 항체 2-5에 대한 결과를 보여준다. 도 24a 및 b는 각각 항체 3-2 및 3-5에 대한 결과를 보여준다. 도 25a-c는 각각 항체 4-2, 4-3 및 4-4에 대한 결과를 보여준다. 도 26a-d는 각각 항체 5-1, 5-2, 5-3 및 5-4에 대한 결과를 보여준다. 이들 결합 데이터는 고도로 입체형태-특이적 및 중-특이적인 항체 (예를 들어, hZ-NSP4, hA-NSP4, 또는 mA-NSP4 중 1개에 대해 특이적, 예컨대 항체 1-2, 4-3, 및 5-3)로부터, 입체형태-특이적이지만 중-특이적이지 않은 항체 (예를 들어, 지모겐-NSP4 또는 활성-NSP4에 대해 특이적, 예컨대 항체 2-2, 2-5, 및 5-1), 중-특이적이지만 입체형태-특이적이지 않은 항체 (예를 들어, 인간-NSP4 또는 마우스-NSP4에 대해 특이적, 예컨대 항체 3-2, 4-2, 및 4-4), 및 마지막으로 범-NSP4 결합체인 항체 (예를 들어, 인간 및 마우스 NSP4의 그의 지모겐 및 활성 입체형태 상태에 결합함, 예컨대 항체 2-1, 2-3, 2-4, 및 3-5)까지의 범위의 별개의 NSP4-결합 특성을 갖는 항체 패널을 시사한다.

[0589] 항체에 대해 추가로 NSP4 효소적 활성을 차단하는 능력을 시험하였다. 인간 및 마우스 NSP4를 차단하는 능력을 시험하였다. 도 27은 지모겐 NSP4에 대한 항체의 효과를 보여준다. 도 28은 활성 NSP4에 대한 항체의 효과를 보여준다. 도 28에 제시된 바와 같이, 항체 4-3 및 4-4는 인간 NSP4 활성을 차단하는 반면에, 각각의 5-시리즈의 항체는 마우스 NSP4 활성을 차단하였다. 항체의 시험관내 특성을 도 29에 요약한다.

[0590] 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 5-시리즈 항체는 그의 NSP4 효소 활성 차단 능력 및 NSP4의 지모겐 형태가 아닌 활성 형태에의 우선적인 결합으로 인해, 프로테아제 활성화 과정 동안 유의한 입체형태적 변화를 겪는 영역인 효소 활성 부위 근위의 NSP4에 결합할 것으로 가설이 세워졌다. 대조적으로, 3-시리즈 항체는 그의 NSP4 효소 활성 차단 불능 및 그의 입체형태-비감수성으로 인해, 효소 활성 부위 원위의 NSP4에 결합할 것으로 가설이 세워졌다. 항체 에피토프에 대한 이러한 가설은 도 30 및 31에 도시된 일련의 실험에서 확인하였다.

[0591] 도 30에 제시된 바와 같이, Fab 5-1은 마우스 NSP4에 대한 Ab5-1, 5-2, 및 5-4 결합을 방해하였지만, Ab 3-2 또는 3-5 결합은 방해하지 않았다. 유사하게, 도 31에 제시된 바와 같이, 헤파린은 NSP4에 대한 Ab 5-1, 5-2, 및 5-4 결합에 대해서는 거의 영향을 미치지 않았지만, Ab 3-2 및 3-5의 결합은 유의하게 감소시킬 수 있었다. 이들 결과는 Ab 5-1, 5-2, 5-4가 효소 활성 부위 근처에서 결합하고; 대조적으로 Ab 3-2 및 3-5는 효소 활성 부위와 떨어진 헤파린 결합 부위 근처에서 결합한다는 것을 시사한다.

[0592] 항체 클론 3-5 (이하 Ab35로 지칭됨) 및 5-1 (이하 Ab51로 지칭됨)을 추가의 친화도 개선 (상기 기재된 바와 같이 수행됨)을 위해 선택하였다. Ab35는 인간 및 마우스 NSP4 둘 다 및 지모겐 및 활성 입체형태 둘 다에 결합하는 그의 능력으로 인해 선택되었다. Ab51은 5-시리즈 항체 중에서 가장 높은 효력으로 마우스 NSP4 촉매 활성을 억제하는 그의 능력으로 인해 선택되었다.

[0593] 표 5 및 6은 항체 3-5 (하기 표에서 35.WT로 불림)의 35.XX로 표지된 친화도 성숙 변이체, 및 항체 5-1 (하기 표에서 51.WT로 불림)의 51.XX로 표지된 친화도 성숙 변이체를 열거한다. 중쇄 HVR 서열은 표 5에 열거되고; 경쇄 HVR 서열은 표 6에 열거된다.

[0594] <표 5> 친화도 성숙 항-NSP4 항체에 대한 HC HVR 서열.

클론	HVR-H1	서열 번호	HVR-H2	서열 번호	HVR-H3	서열 번호
35.WT	GFTFSDNDIS	50	GSISPDNGDTNYADSVKG	51	RDDVPAVFTSAMDY	52
35.14	GFTFSDNDIS	50	GSISPDNGDTNYADSVKG	51	RDDVPAVFTSAMDY	52
35.50	GFTFSDNDIS	50	GSISPDNGDTNYADSVKG	51	RDDVPAVFTSAMDY	52
35.62	GFTFSDNDIS	50	GSISPDNGDTNYADSVKG	51	RDDVPAVFTSAMDY	52
35.77	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	KRHLHNVAFDY	87
51.WT	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	KSLFHNVAFDY	67
51.30	GFTFSGSGIH	65	AWIPTAGGNTYYADSVKG	88	KSLFHNVAFDY	67
51.50	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	KSLFHNVAFDY	67
51.51	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	RGLFHNVAFDY	89
51.59	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	RVFFHNVAFDY	90
51.72	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	KSLFHNVAFDY	67
51.82	GFTFSGSGIH	65	AWISPTGGNTYYADSVKG	66	RGLFHNVAFDY	89
컨센서스					X ₁ X ₂ X ₃ FHNVAFDY	91

[0595]

[0596] <표 6> 친화도 성숙 항-NSP4 항체에 대한 LC HVR 서열.

클론	HVR-L1	서열 번호	HVR-L2	서열 번호	HVR-L3	서열 번호
35.WT	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYTTPPT	12
35.14	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYGFPLT	92
35.50	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYDFPLT	93
35.62	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSAGFPLT	94
컨센서스					QSX ₁ X ₂ X ₃ PX ₄ T	95
35.77	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QAYSAPPT	96
51.WT	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYTTPPT	12
51.30	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYTAPPT	97
51.50	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QANSTPPT	98
51.51	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYTAPPT	97
51.59	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QNFSSPPT	99
51.72	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QSYTAPPT	97
51.82	RASQDVS	19	SASFLYS	11	QTYNAPPT	100
컨센서스					QX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ PPT	101

[0597]

[0598] 표 7은 항체 3-5 (하기 표에서 35.WT로 불림)의 35.XX로 표지된 친화도 성숙 변이체, 및 항체 5-1 (하기 표에서 51.WT로 불림)의 51.XX로 표지된 친화도 성숙 변이체에 대한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 열거한다. 불변 영역 서열이 하기 표에 제공된다.

[0599] <표 7> 친화도 성숙 항-NSP4 항체에 대한 HC 및 LC 가변 영역 서열. CDR 서열은 밑줄로 표시된다.

클론	HC 가변 영역 서열	서열 번호	LC 가변 영역 서열	서열 번호
35.WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDNDISWVRQAPGKGLEWVG SISPDNGDTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DDVPAVFTSAM DYWGQ GLVTVSS	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR	16
35.14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDNDISWVRQAPGKGLEWVG SISPDNGDTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DDVPAVFTSAM DYWGQ GLVTVSS	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYGFPLTFGQGTKVEIKR	102
35.50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDNDISWVRQAPGKGLEWVG SISPDNGDTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DDVPAVFTSAM DYWGQ GLVTVSS	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYDFPLTFGQGTKVEIKR	103
35.62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSDNDISWVRQAPGKGLEWVG SISPDNGDTNYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DDVPAVFTSAM DYWGQ GLVTVSS	78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSAGFPLTFGQGTKVEIKR	104
35.77	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA KRHLHNVAFDYWGQGLVTVSS	105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQAYSAPPTFGQGTKVEIKR	106
51.WT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA KSLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR	16
51.30	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WIPTAGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA KSLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	107	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTAPPTFGQGTKVEIKR	108
51.50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA KSLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQANSTPPTFGQGTKVEIKR	109
51.51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	110	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTAPPTFGQGTKVEIKR	108
51.59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VFFHNVAFDYWGQGLVTVSS	111	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQNFSSPPTFGQGTKVEIKR	112

[0600]

51.72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA KSLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYTAPPTFGQGTKVEIKR	108
51.82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSGSGIHWVRQAPGKGLEWVA WISPTGGNTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GLFHNVAFDYWGQGLVTVSS	110	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTT CRASQDVSTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQOTYNAPPTFGQGTKVEIKR	113

[0601]

HC 불변 영역 서열(서열 114)

ASTKGPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVL
QSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN
LLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVAVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQT
HREDYASTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVRAPQV
YVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSY
FMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

LC 불변 영역 서열(서열 115)

ADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTD
QDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

[0602]

[0603]

친화도-성숙 항체 클론의 개선을 일련의 파지 IC50 실험에서 추정하였다. 도 32는 인간 및 마우스 NSP4에 대한 Ab35로부터의 친화도-성숙 항체 클론의 친화도를 보여준다. 도 33은 인간 NSP4에 대한 Ab51로부터의 친화도-성숙 항체 클론의 친화도를 보여준다. 제시된 바와 같이, Ab35 클론의 친화도는 Ab51 클론만큼 크게 개선되지 않았다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 이는 Ab35가 보다 높은 친화도를 가지고 시작한다는 사실로 인한 것일 수 있다. 대조적으로, Ab51의 친화도는 유의하게 개선되었다 (500x 초과).

[0604]

표 9는 파지 경쟁 결합 검정에서 그의 IC50 값에 의해 결정된 바와 같은, 친화도-성숙 항체 클론의 개선을 요약한 것이다.

[0605]

<표 9> 친화도-성숙 항체.

Ab 클론	mNSP4 IC50 (nM)	hNSP4 IC50 (nM)	mNSP4에 대한 친화도 개선
35.WT	0.131	32.79	--
35.14	0.048	23.41	2.7
35.50	0.075	22.75	1.7
35.62	0.206	25.69	0.6
35.77	0.064	--	2.0
51.WT	18.670	--	--
51.30	0.116	--	160.9
51.50	0.105	--	178.0
51.51	0.296	--	63.0
51.59	0.095	--	196.0
51.72	0.375	--	49.8
51.82	0.037	--	504.6

[0606]

[0607]

Ab35 및 Ab51는 NSP4에의 결합을 위해 항체 경쟁 상의 CDR 서열을 연구하고 최적화하는 것에 의해, 그의 모 클론에 비해 각각 최대 2.7배 및 504.6배 친화도 개선되었다. 친화도 개선된 Ab35 및 Ab51 클론 둘 다는 NSP4에 대해 표적화된 피코몰-친화도에 도달하였고, 별개의 에피토프를 갖는 NSP4에 결합하였다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, Ab35-유래 클론은 NSP4에 헤파린-결합 부위에서 결합하고, Ab51-유래 클론은 NSP4에 그의 효소 활성 부위 근위에서 결합하는 것으로 생각된다.

[0608]

실시예 7: 생체내 NSP4 촉매 활성

[0609]

NSP4의 효소적 활성이 K/BxN 혈청-전달 마우스 모델에서 관찰되는 질환 표현형과 연관되는지 확인하기 위해, K/BxN 모델을 야생형 NSP4를 갖는 마우스, NSP4 녹아웃을 갖는 마우스 및 촉매 기능상실 NSP4 녹인을 갖는 마우스 (예를 들어, 그의 NSP4 단백질 서열에서 S224A 돌연변이를 갖는 마우스)에서 비교하였다. 각각의 이들 3종의 마우스 계통에서, NIRF, 루미놀-생물발광 영상화 및 조직학적 검사를 사용하여 혈청-유발 혈관 투과성을 생체내 모니터링하였다. 촉매 기능상실 NSP4 단백질을 발현하는 마우스가 K/BxN 모델에서 NSP4 녹아웃 마우스와 유사한 보호를 나타내는 경우에, 이러한 결과는 NSP4의 촉매 활성이 질환 표현형과 연관되고, NSP4 촉매 활성 억제제 (예를 들어, 항-NSP4 항체, 예컨대 항체 51.WT, 51.30, 51.50, 51.51, 51.59, 51.72, 51.82)가 NSP4 활성과 연관된 다양한 혈관 및 염증성 장애에 대한 치료제로서 유용할 것임을 나타낼 수 있다.

[0610]

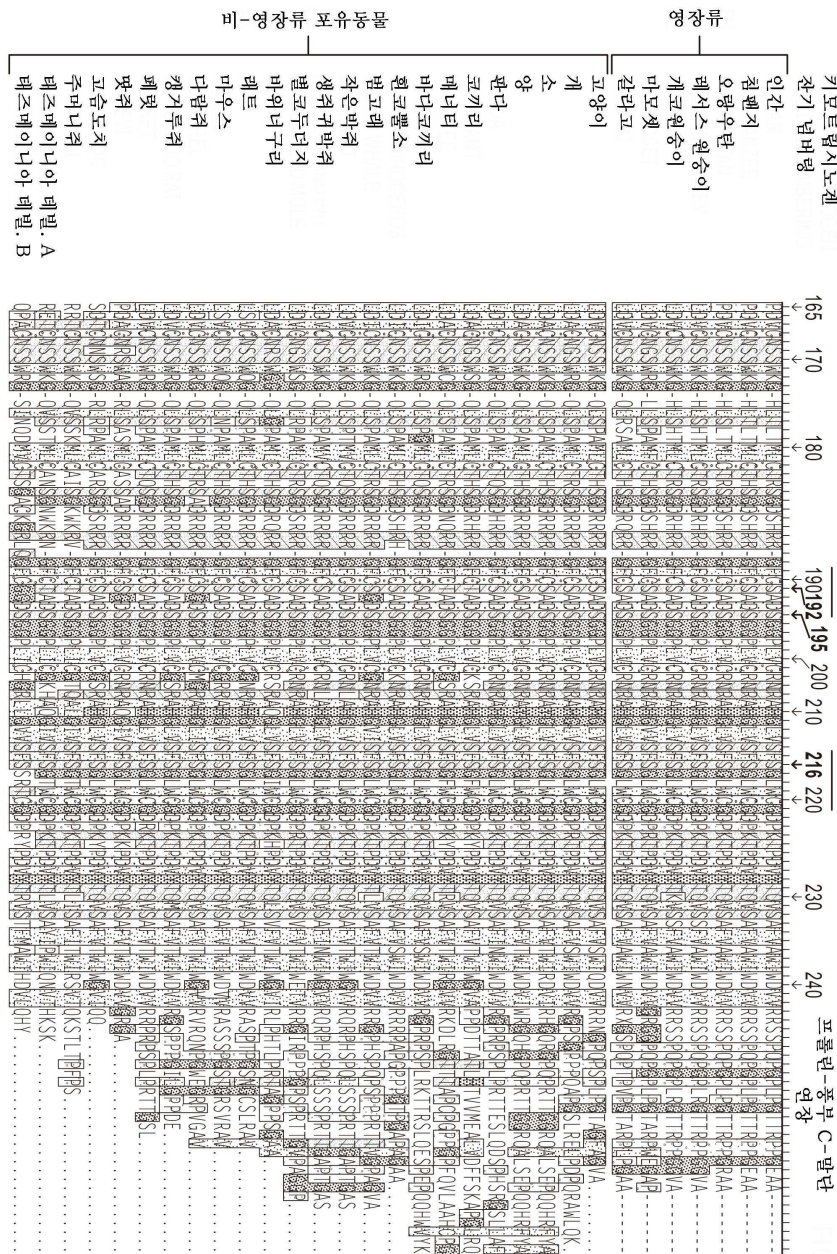
실시예 8: 마우스 모델에서 NSP4 활성 NSP4의 억제

[0611] NSP4 활성의 항체 억제에 야생형 NSP4 K/BxN 모델에서 관찰되는 질환 표현형을 보호하는지 확인하기 위해 항-NSP4 항체를 마우스 K/BxN 모델에서 시험하였다. K/BxN 마우스를 항-NSP4 항체의 존재 또는 부재 하에 상기 기재된 바와 같이 찢어지하였다. hepatin 결합 부위에 결합하거나 (예를 들어, 35 시리즈 항체 35.WT, 35.14, 35.50, 35.62 및/또는 35.77) 또는 NSP4의 촉매 활성을 억제하는 (51 시리즈 항체 51.WT, 51.30, 51.50, 51.51, 51.59, 51.72, 및/또는 51.82) NSP4 항체를 K/BxN 모델에서 시험하였다. 결과를 대조 항체 (예를 들어, NSP4에 결합하지 않는 항체)와 비교하였다. 항-NSP4 항체로 처리된 마우스가 K/BxN 모델에서 NSP4 녹아웃 마우스와 유사한 보호를 나타내는 경우에, 이러한 결과는 항-NSP4 항체를 사용한 NSP4의 억제가 NSP4 활성화와 연관된 다양한 혈관 및 염증성 장애에 대한 치료제로서 유용할 것임을 나타낼 수 있다.

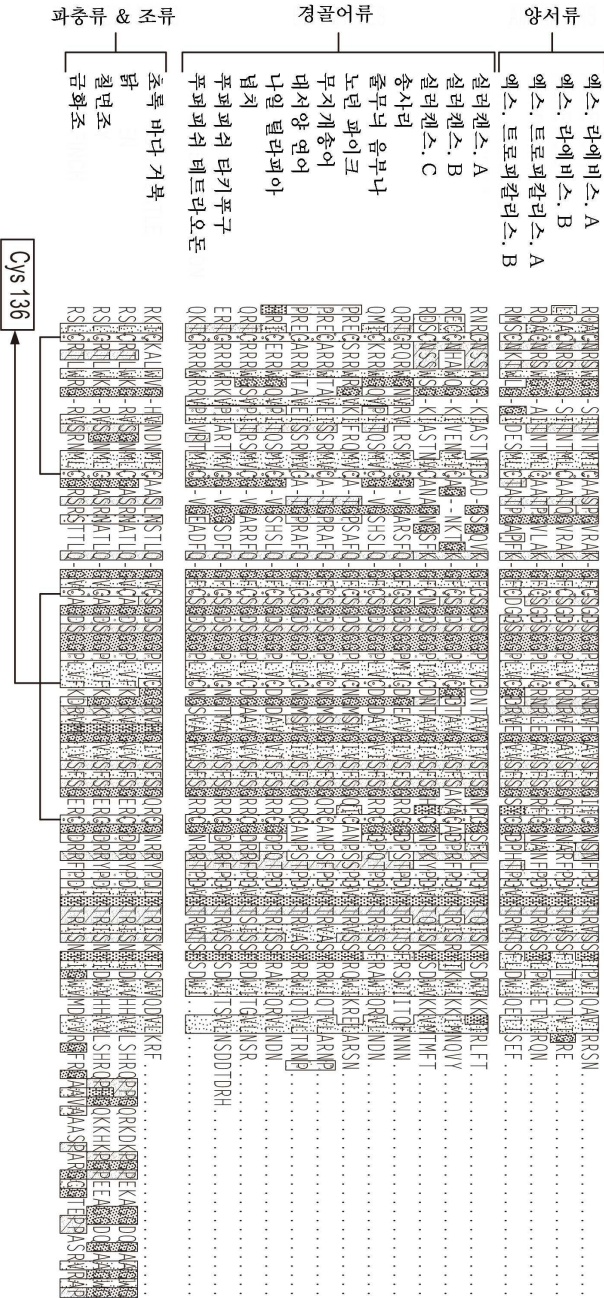
[0612] 상기 본 발명은 이해의 명확성의 목적을 위해 예시 및 예의 방식으로 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그 전문이 명백하게 참조로 포함된다.

도면

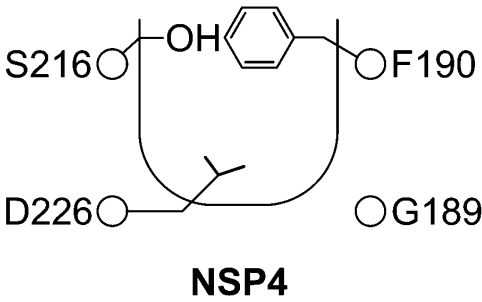
도면1a



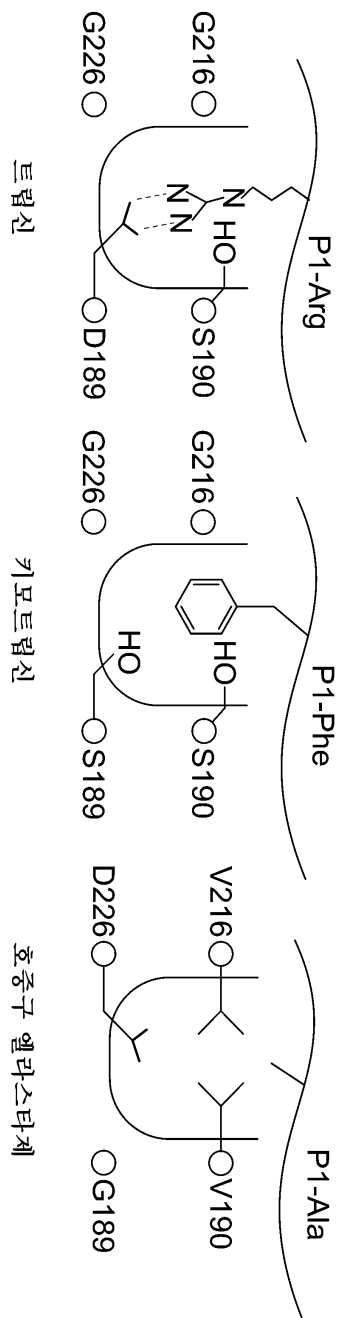
도면1b



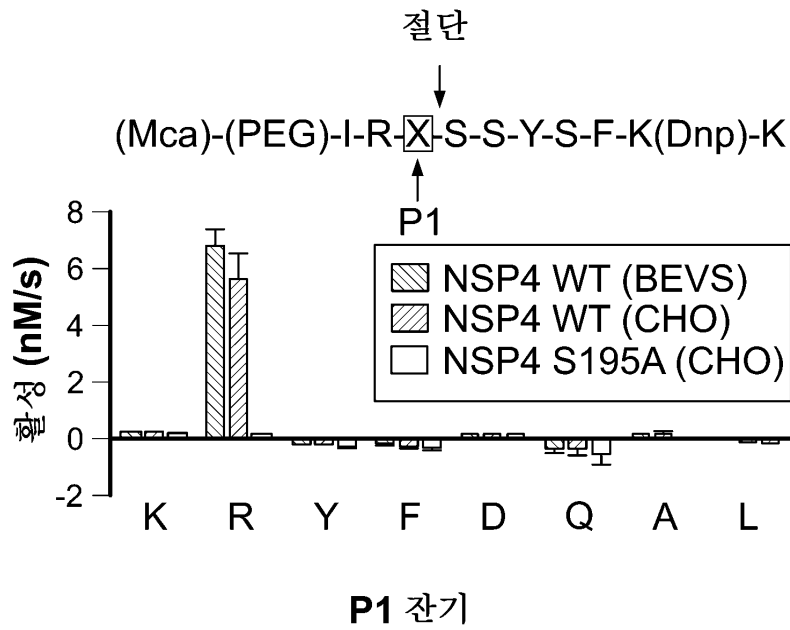
도면2a



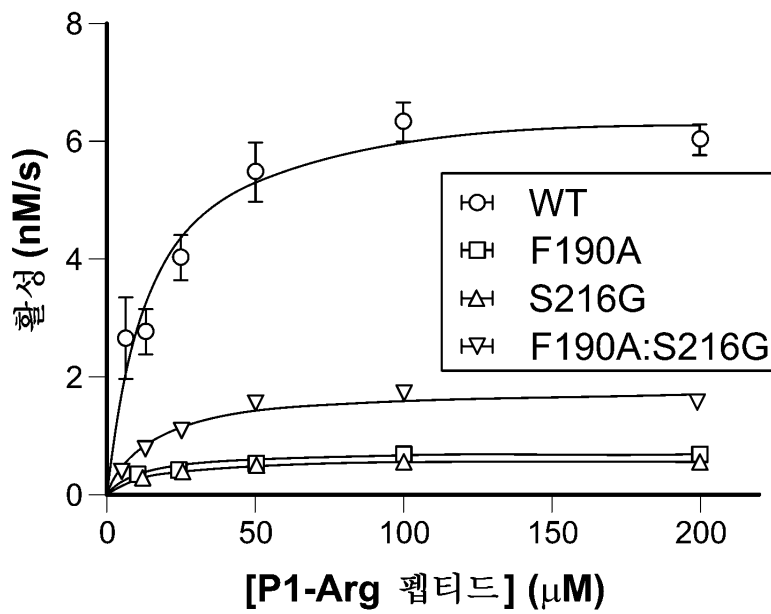
도면2b



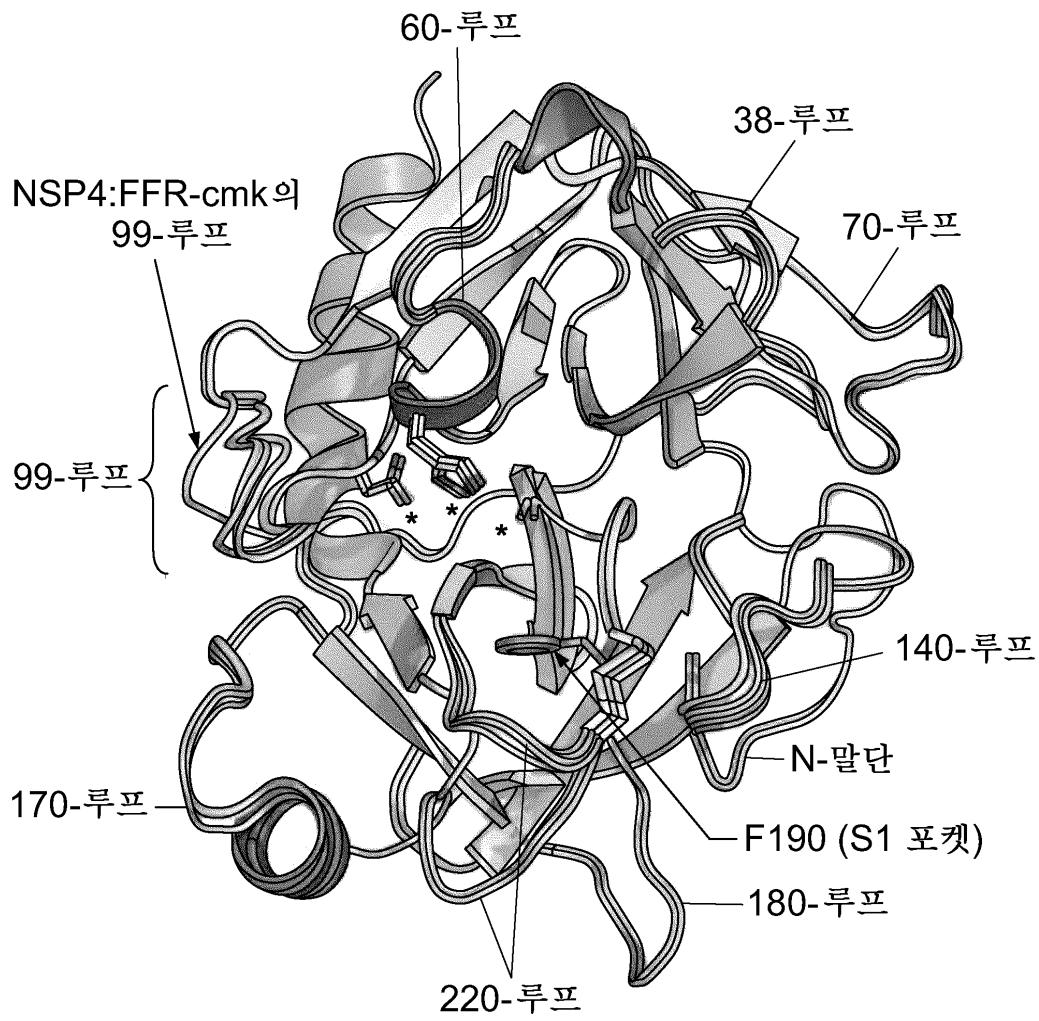
도면2c



도면2d

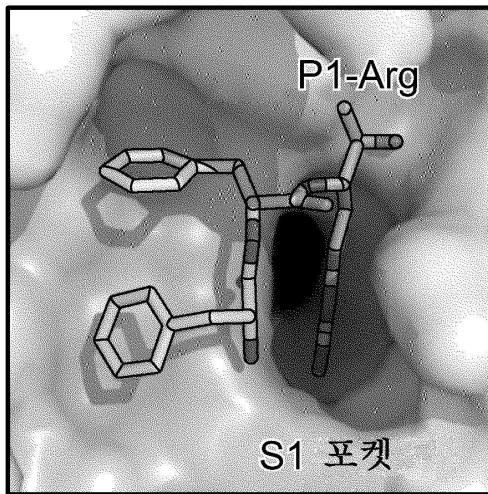


도면3a

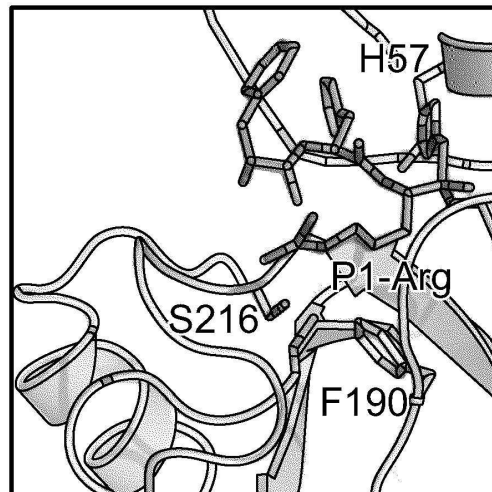
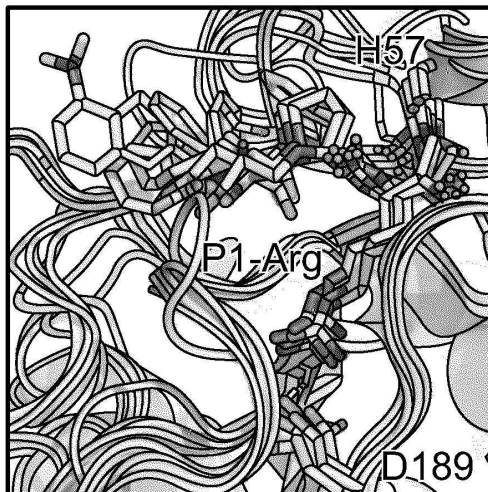
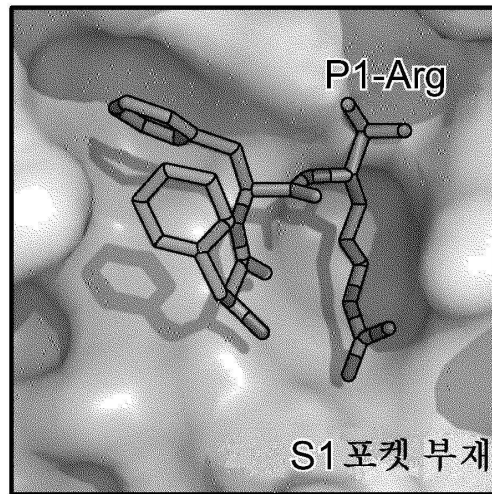


도면3b

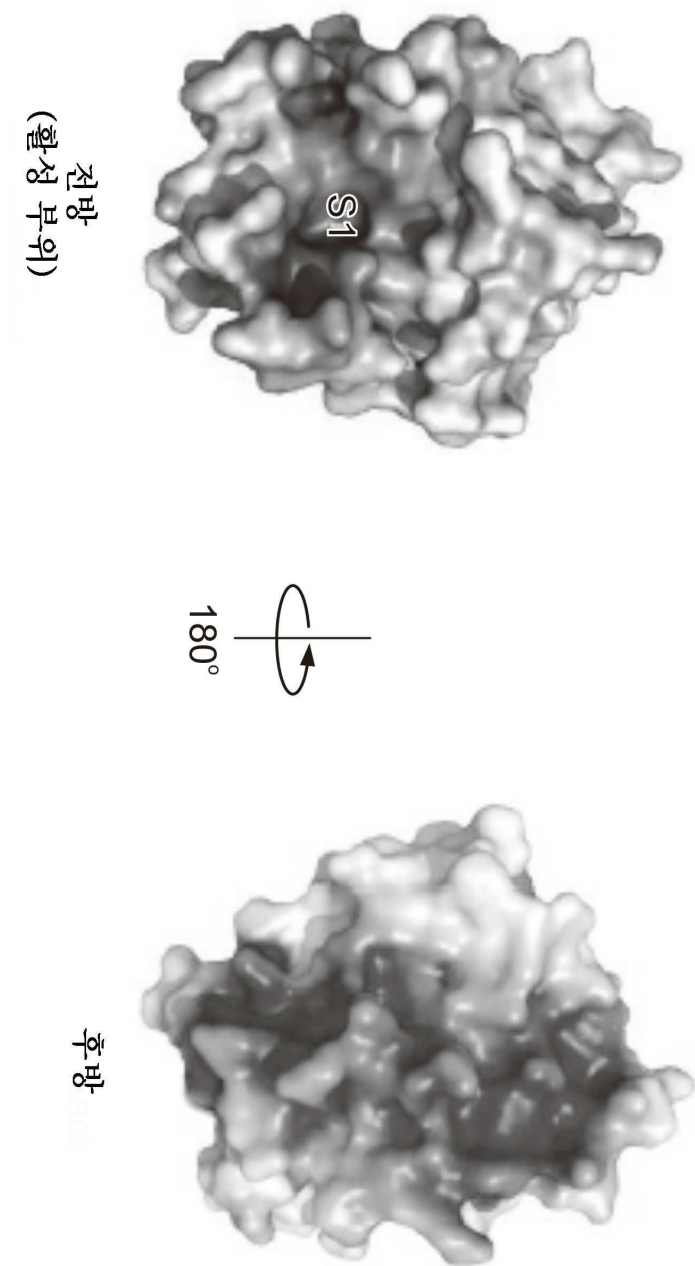
정규
트립신-유사 프로테아제



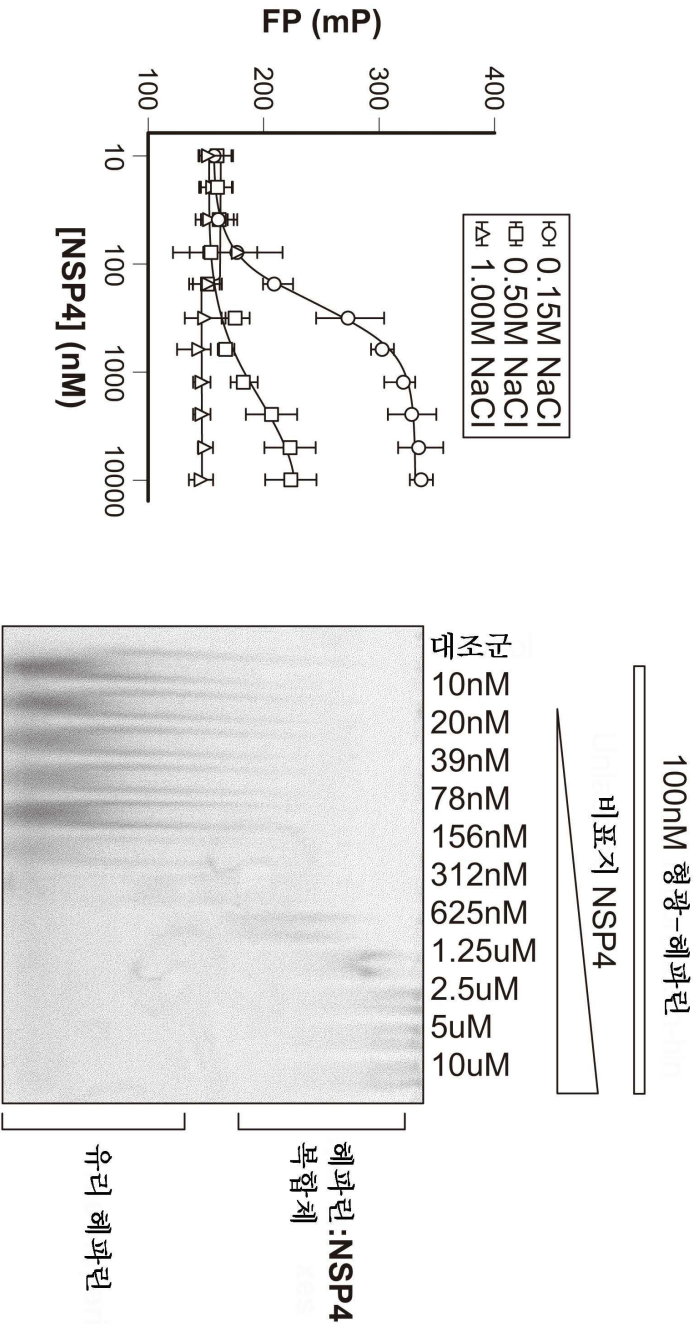
NSP4



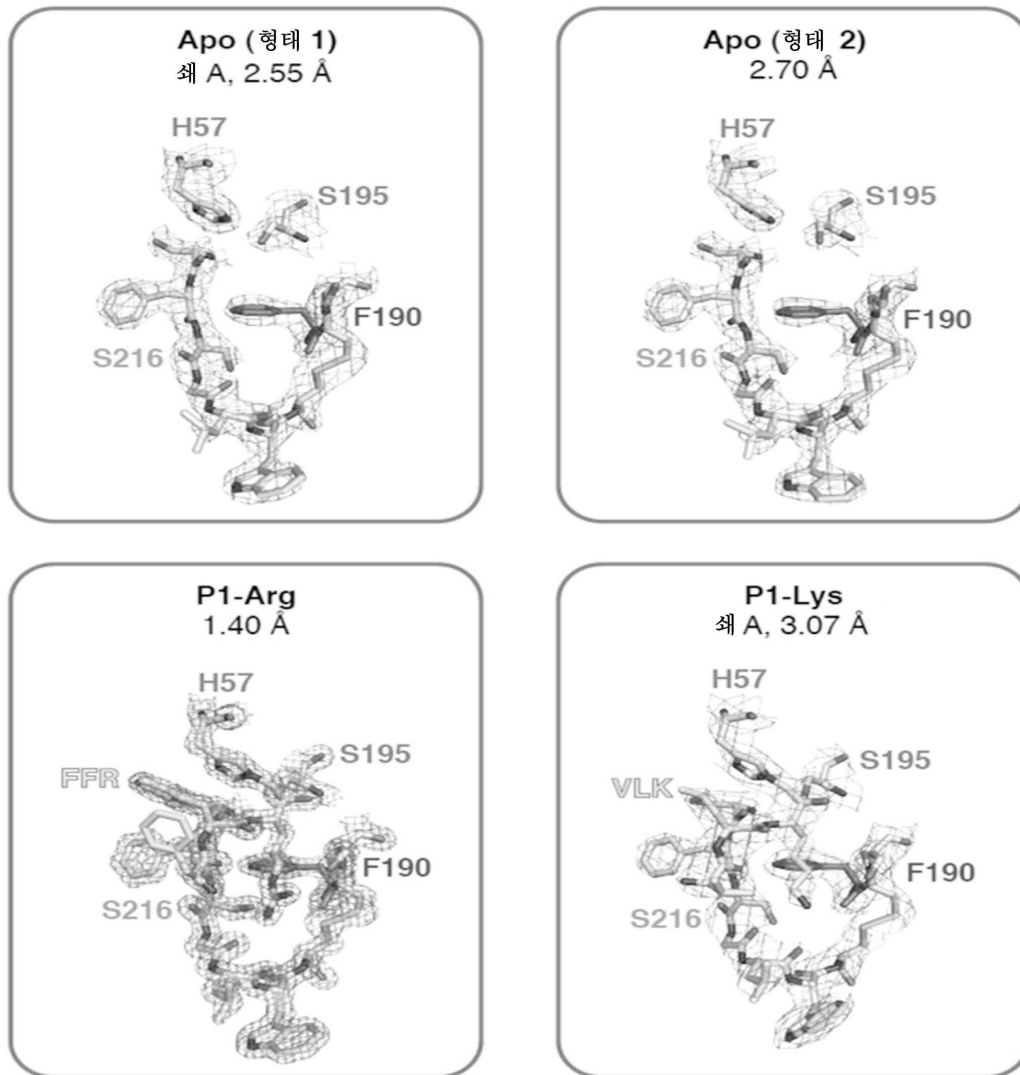
도면4a



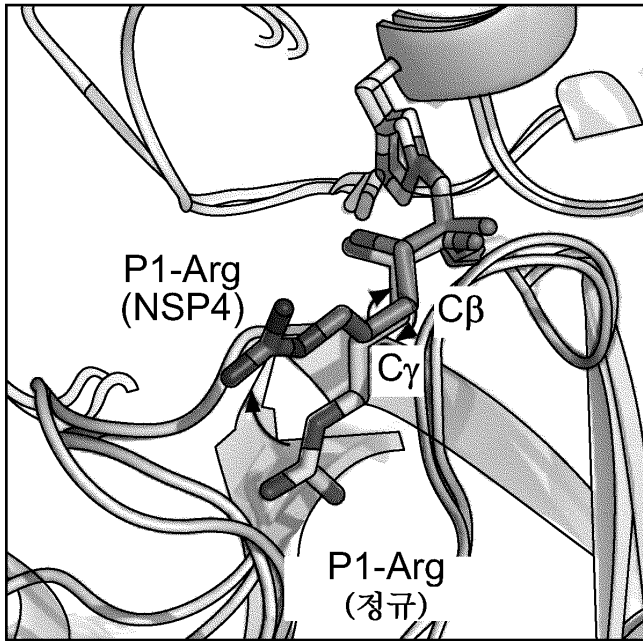
도면4b



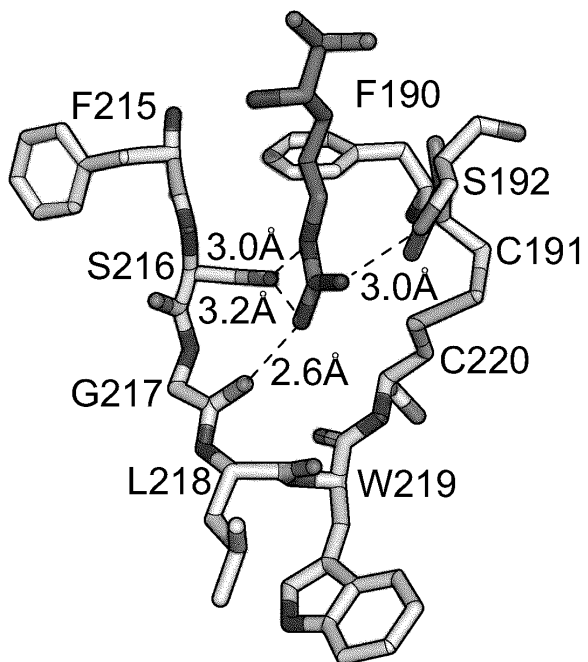
도면5



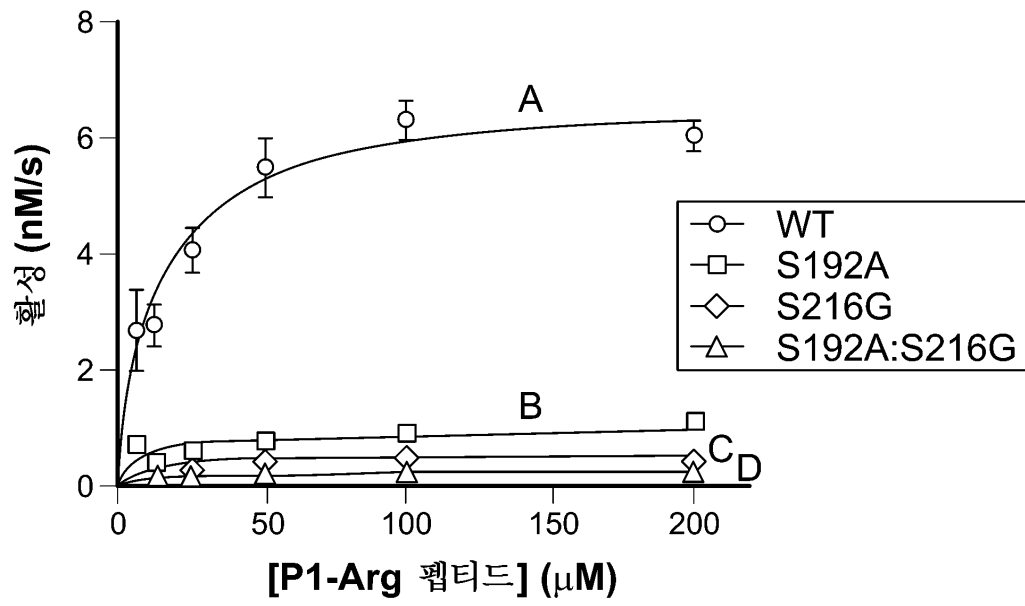
도면6a



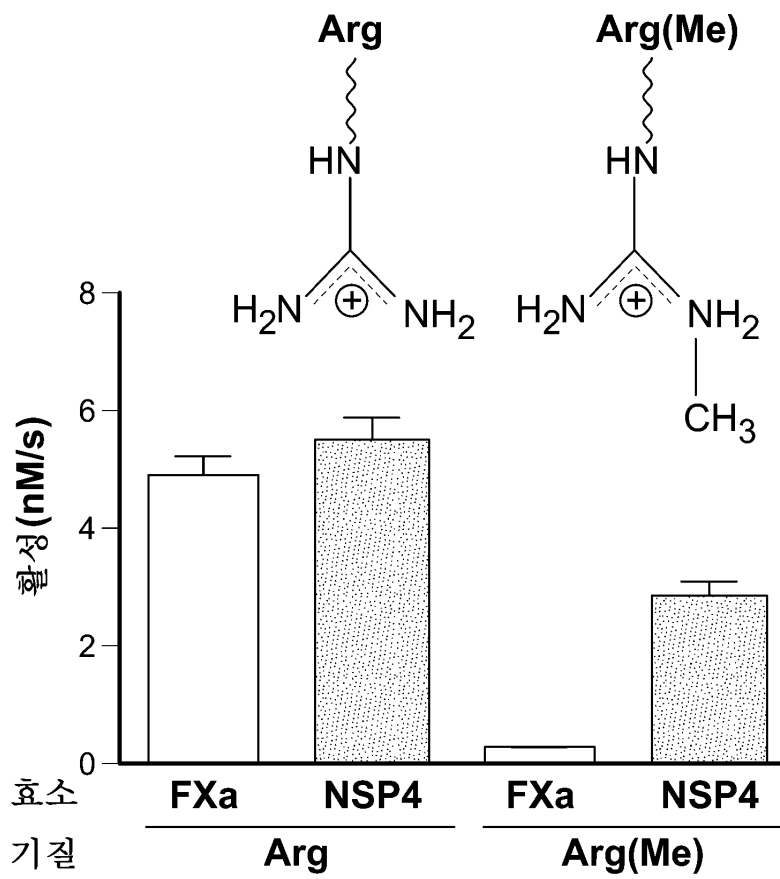
도면6b



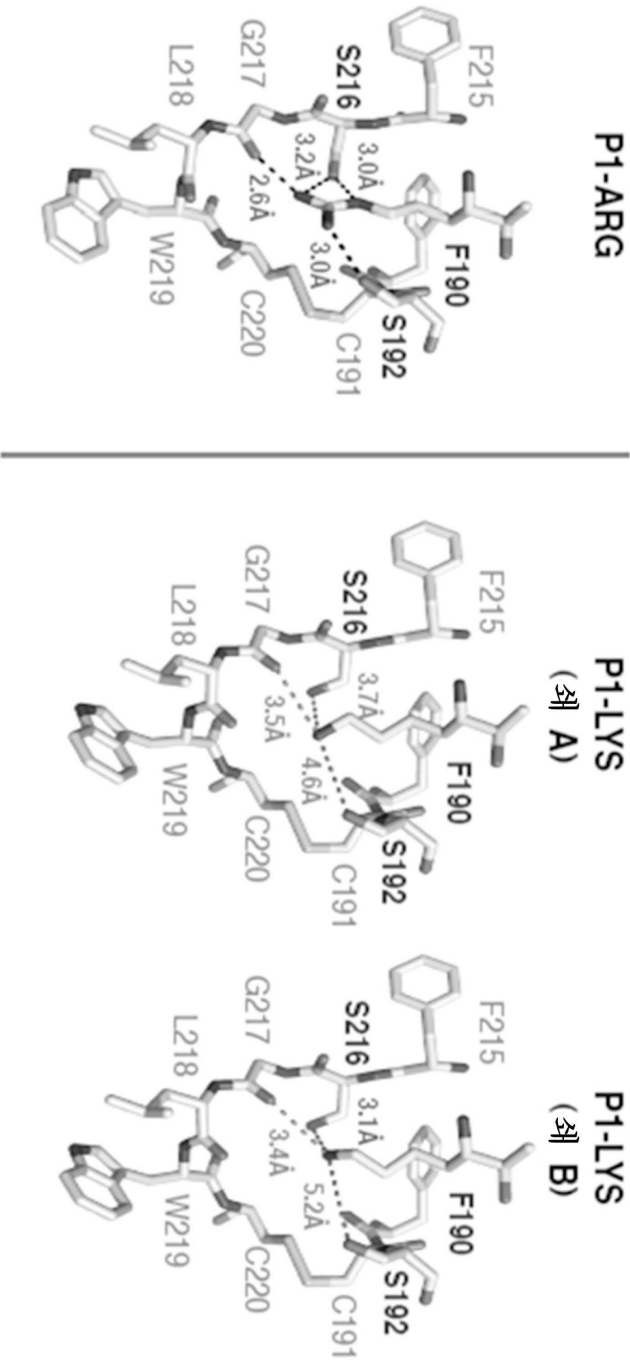
도면6c



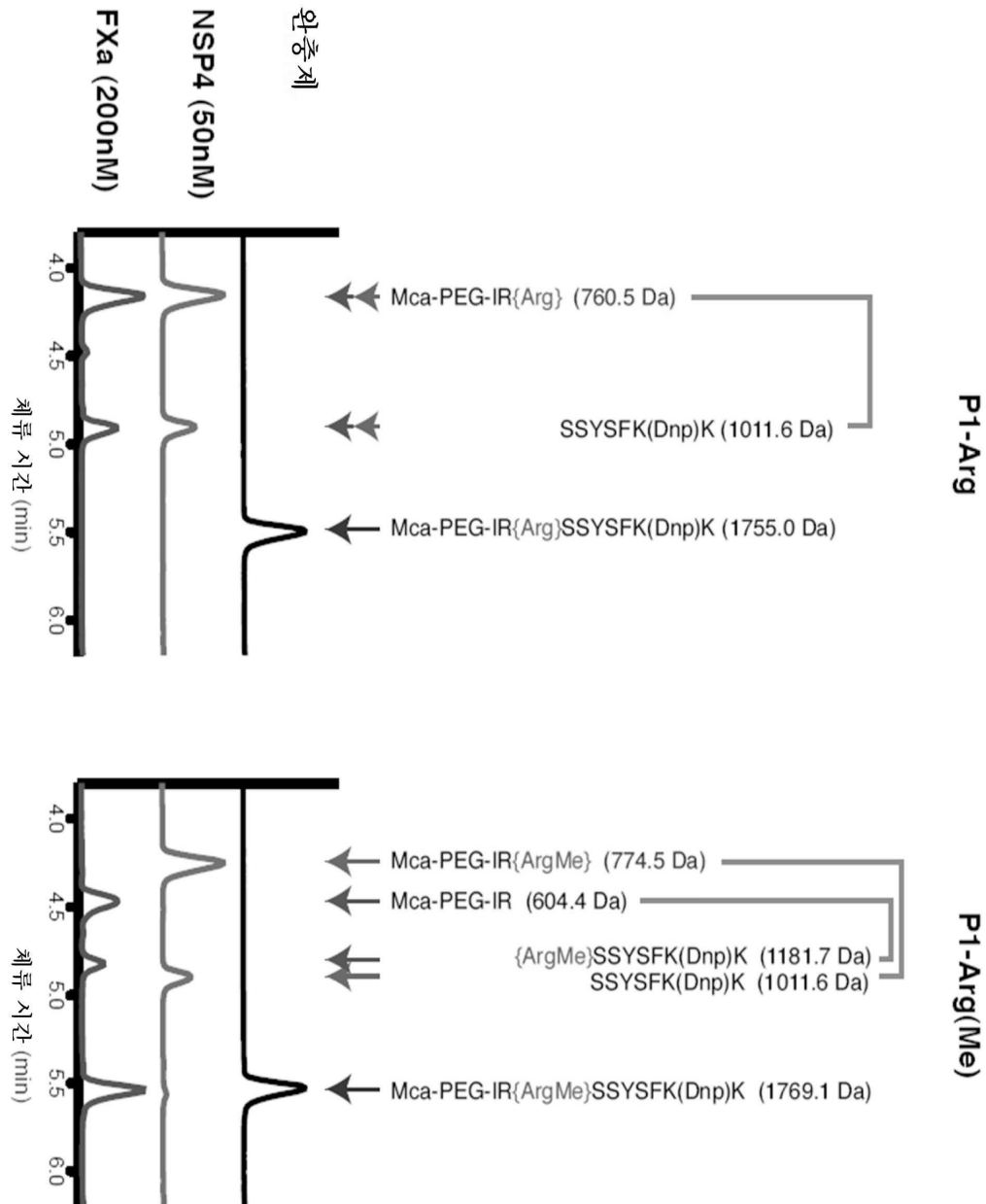
도면6d



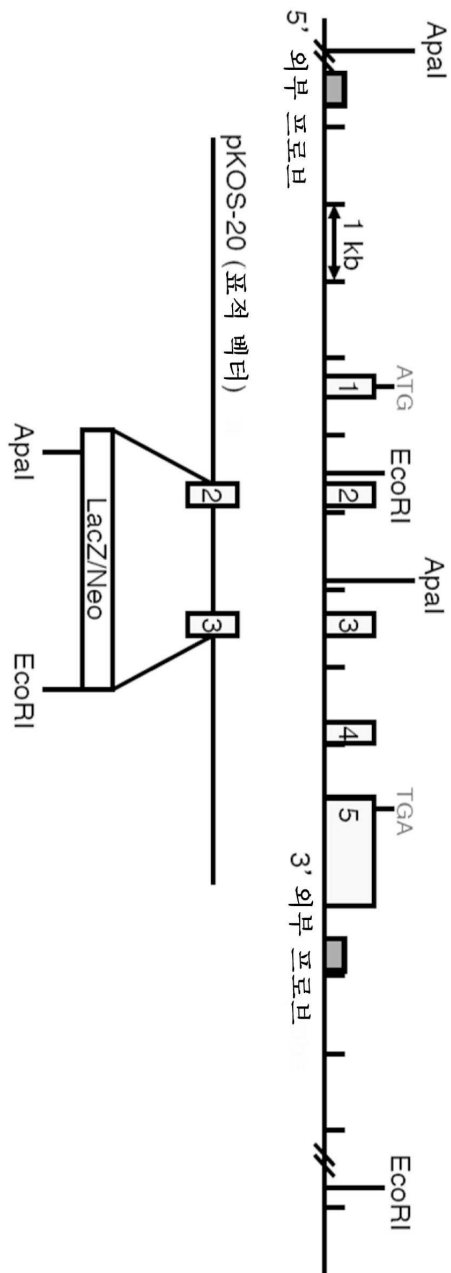
도면7



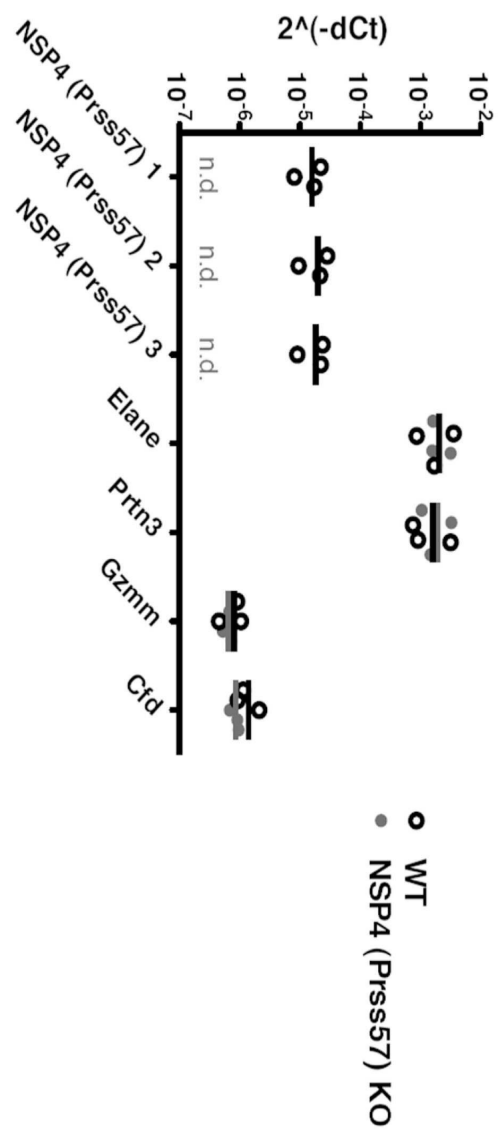
도면8



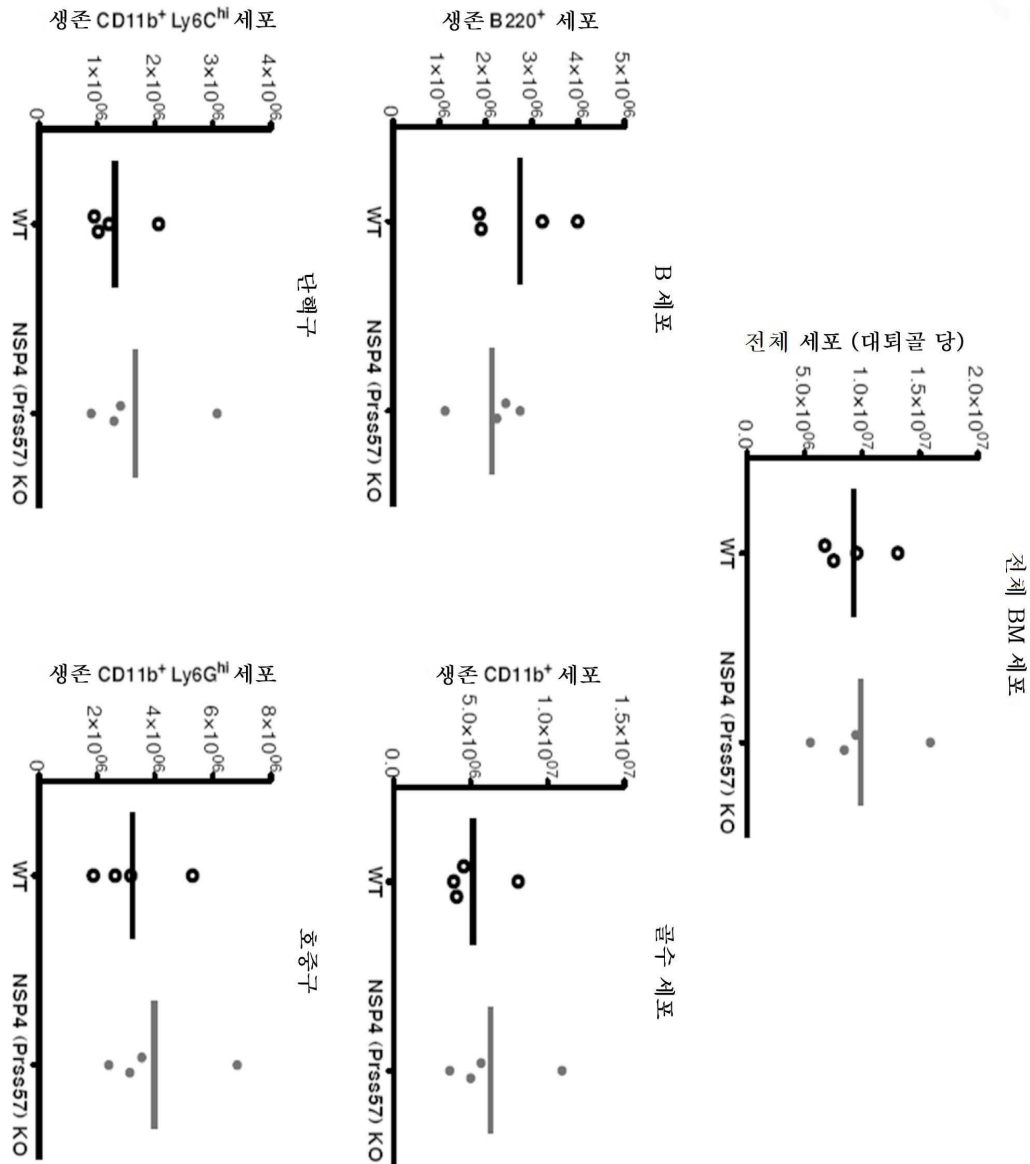
도면9a



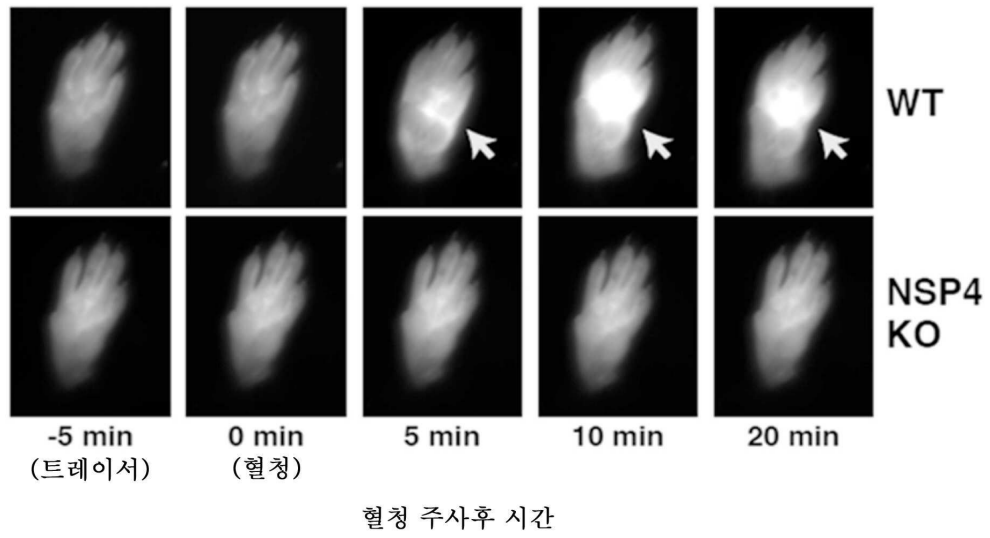
도면9b



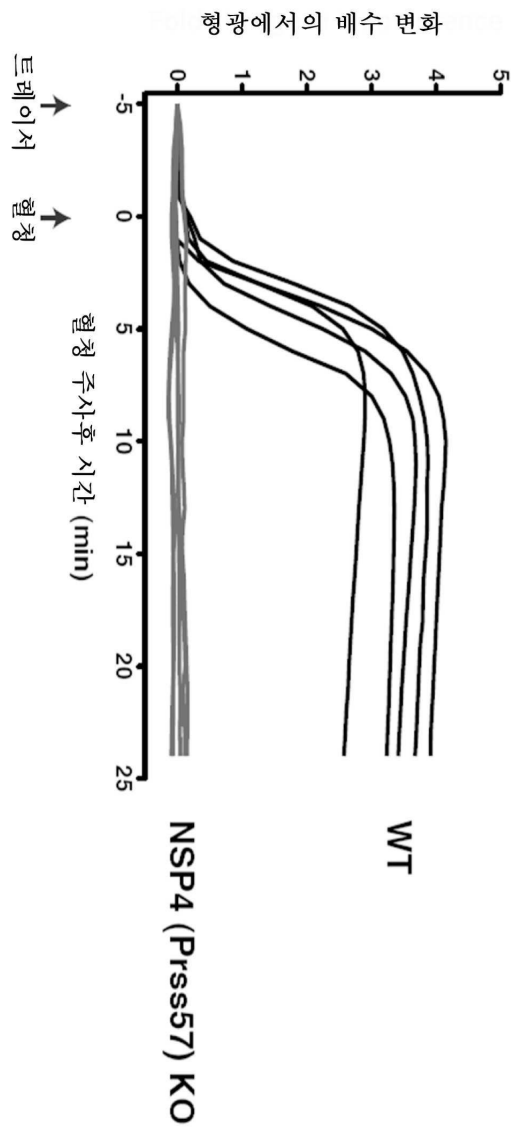
도면9c



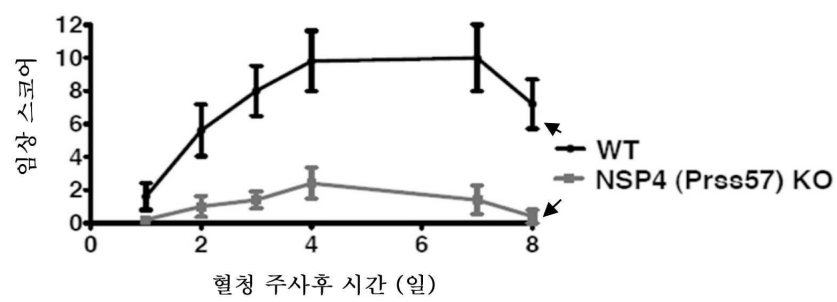
도면10a



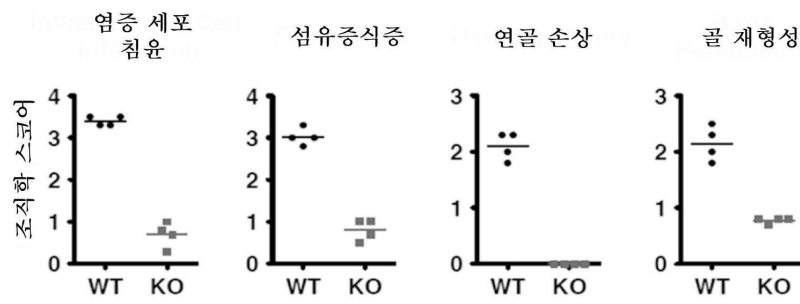
도면10b



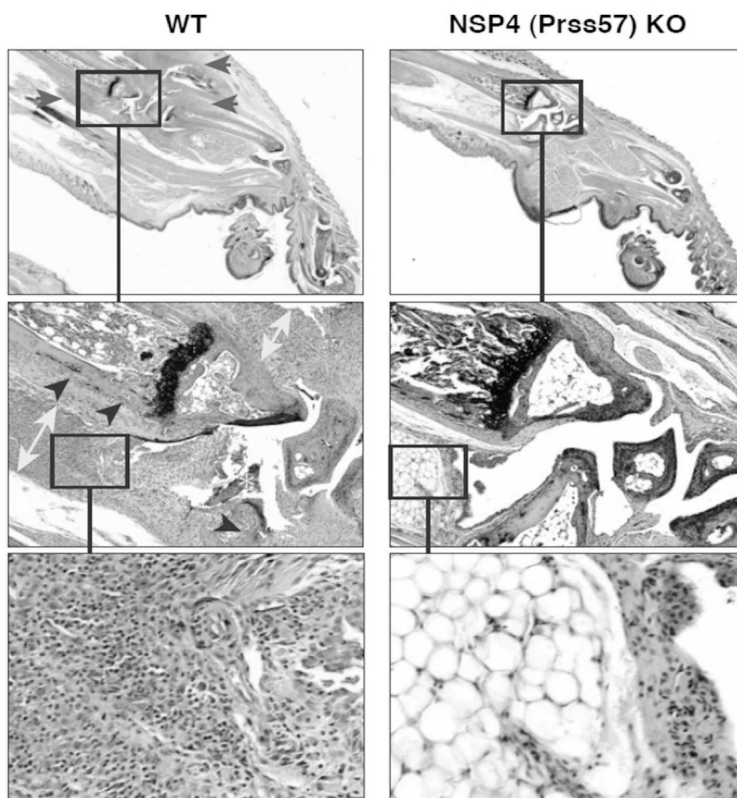
도면11a



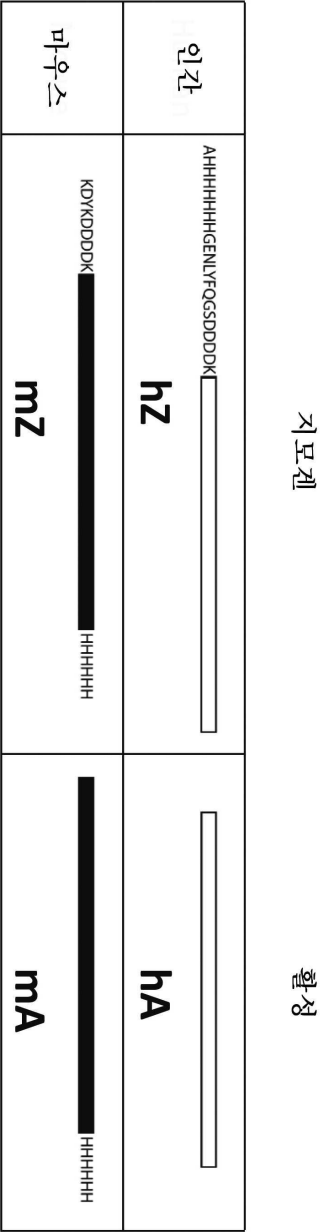
도면11b



도면11c



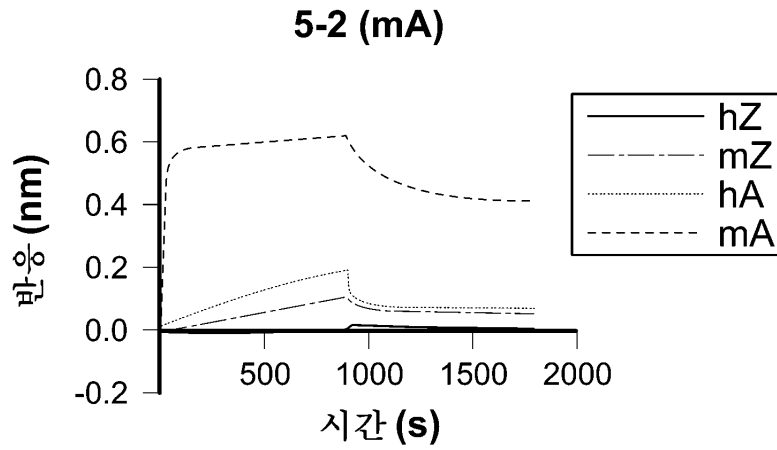
도면12



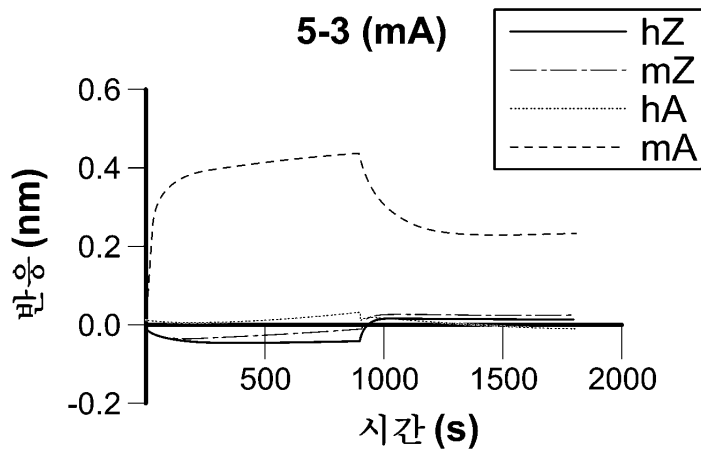
도면13

과제 클론	클론의 #	CDRH1										CDRH2										CDRH3										Sol, Ag																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	94	95		96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5-2	1	G	F	T	F	S	N	T		I	S	G	F	I		P	A	N	G	A	T		Y	A	D	S	V	K	G	P	R		P	R		R	L	S	.	.	.	.	.	.	.	.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																

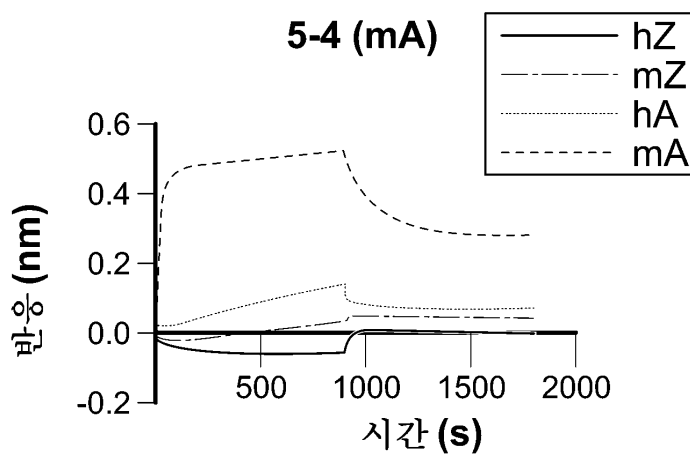
도면14a



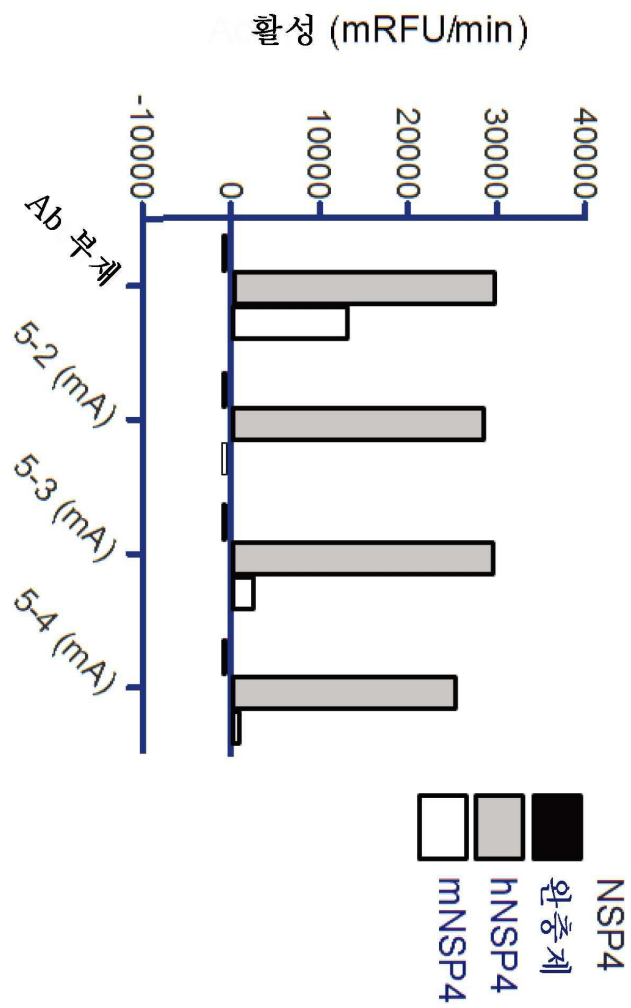
도면14b



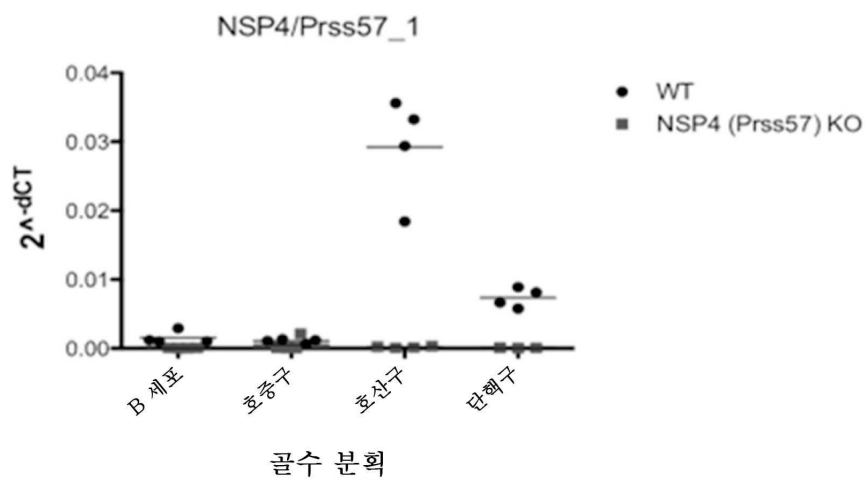
도면14c



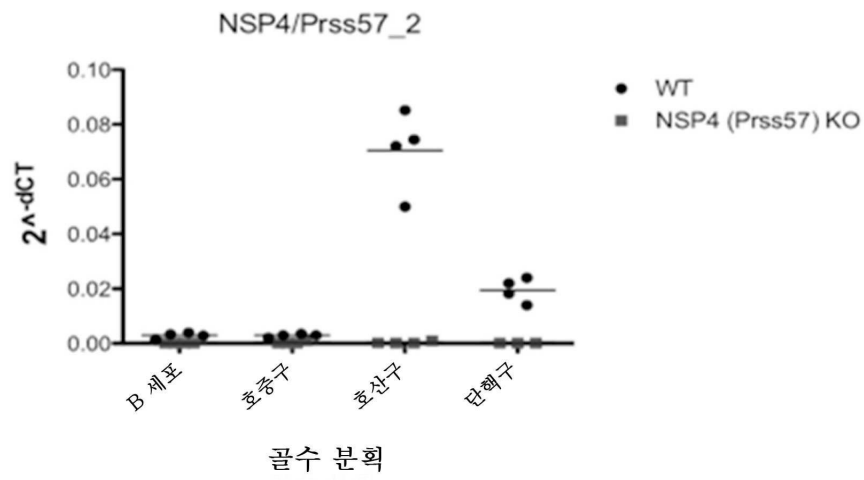
도면15



도면16a



도면16b



도면16c

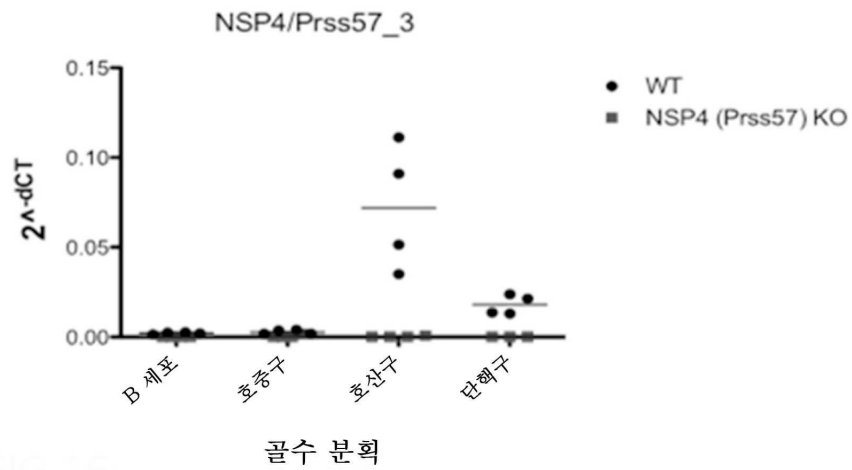
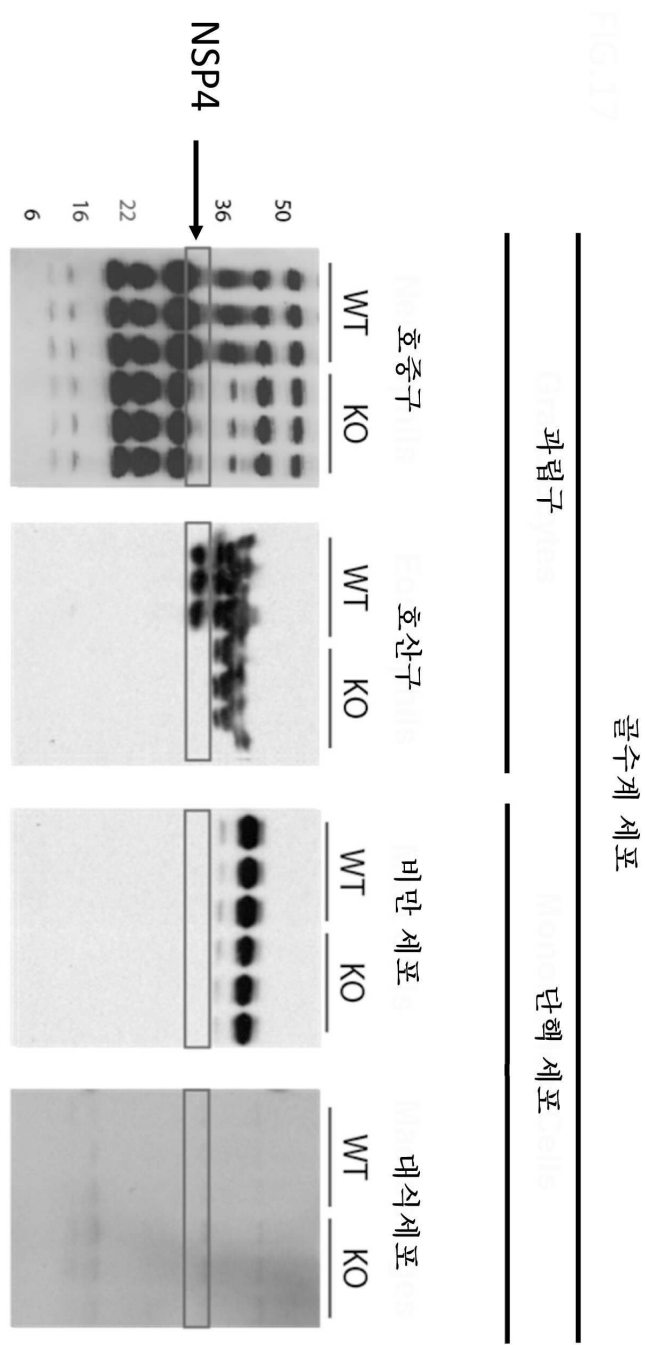
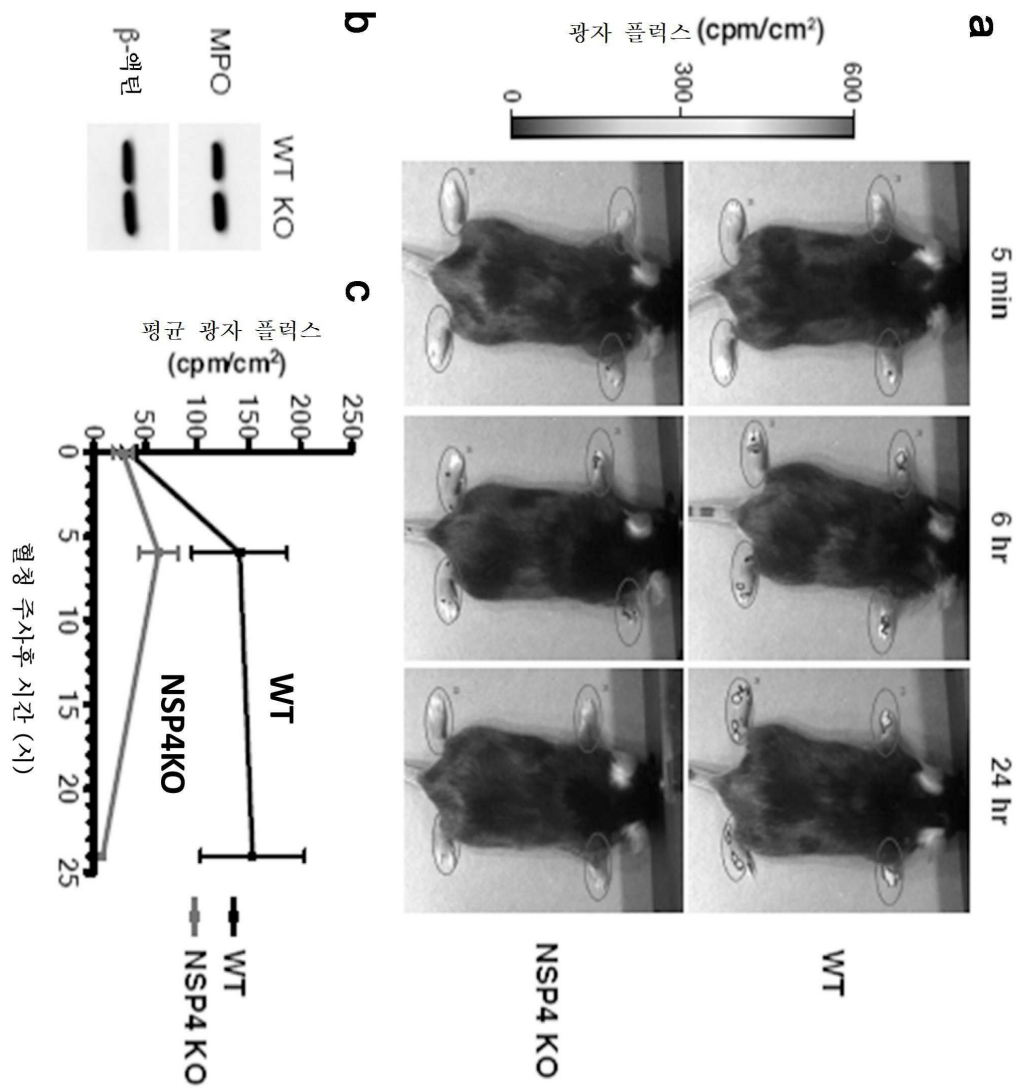


Figure 16b

도면17

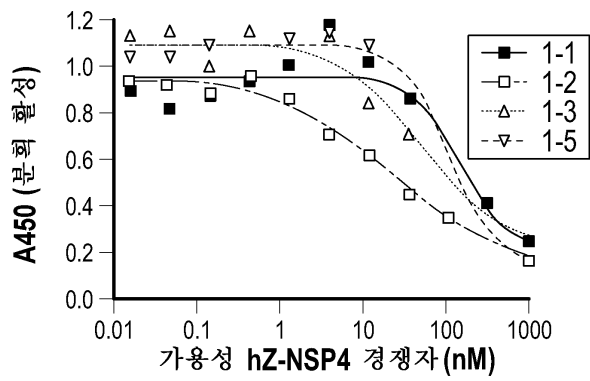


도면18

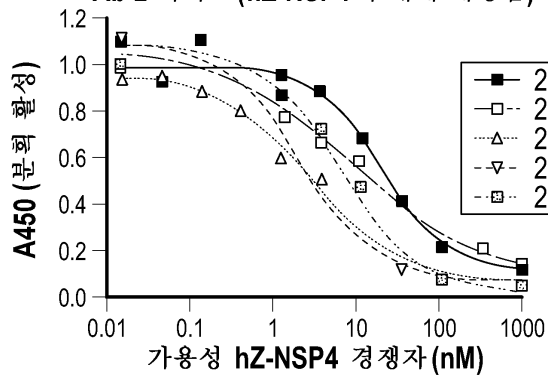


도면19a

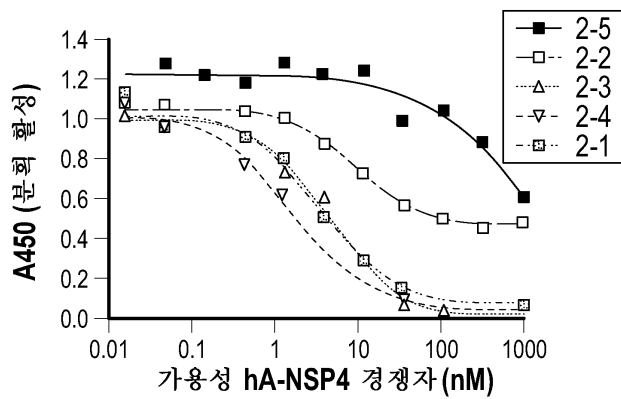
Ab 1-시리즈(hZ-NSP4에 대해 패닝됨)



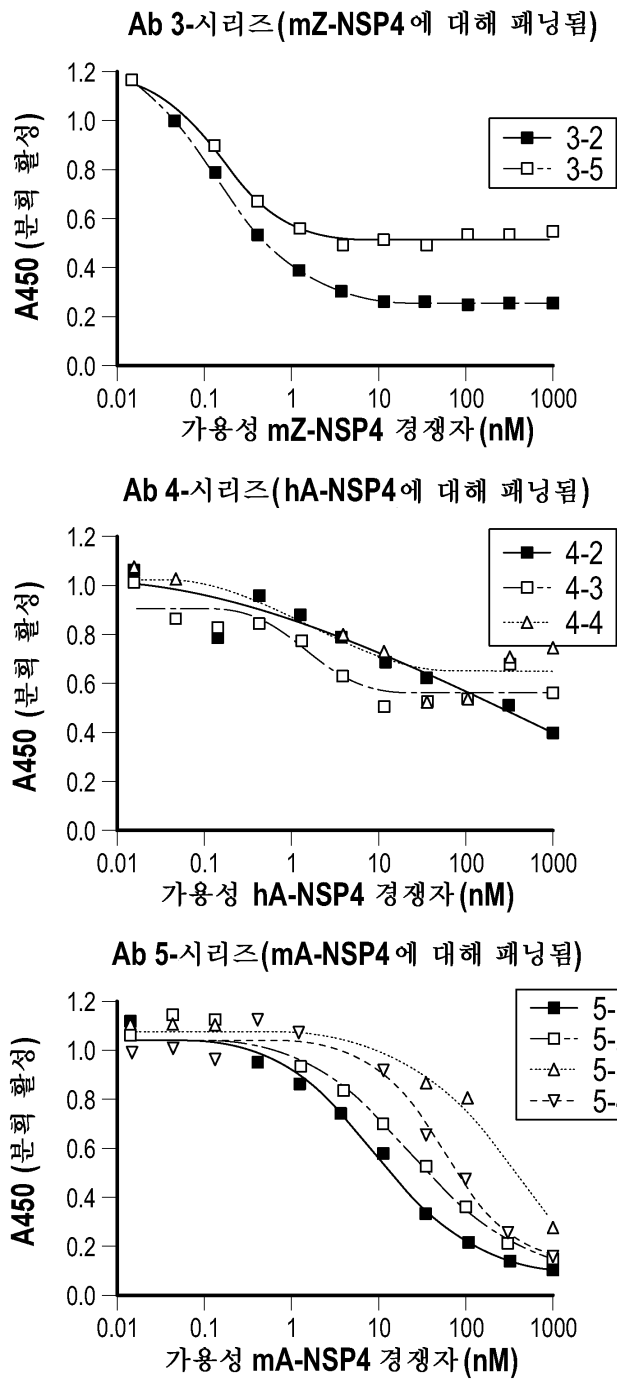
Ab 2-시리즈(hZ-NSP4에 대해 패닝됨)



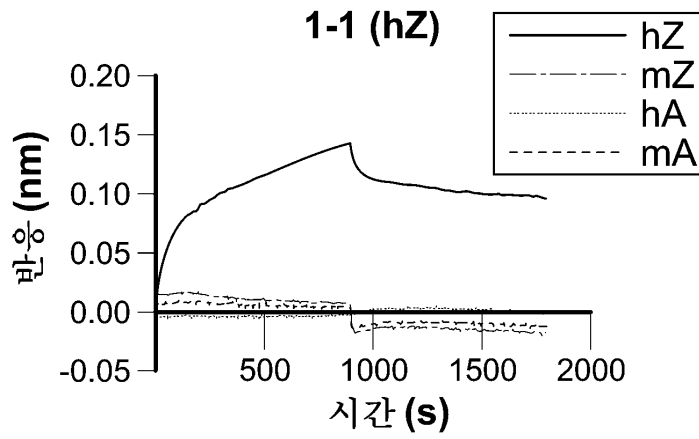
Ab 2-시리즈(hA-NSP4에 대해 패닝됨)



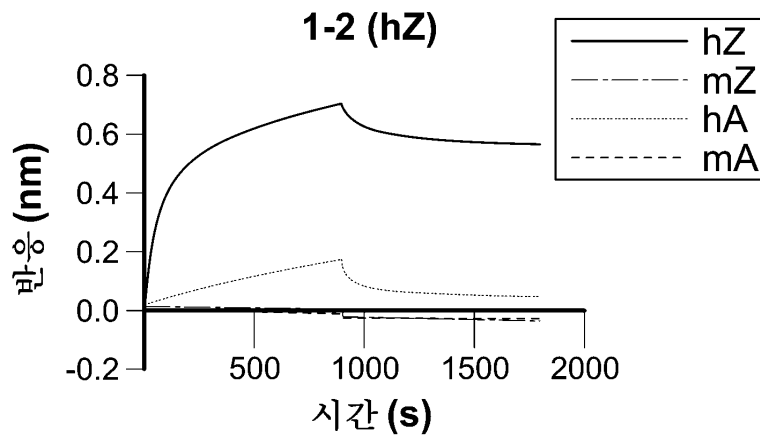
도면19b



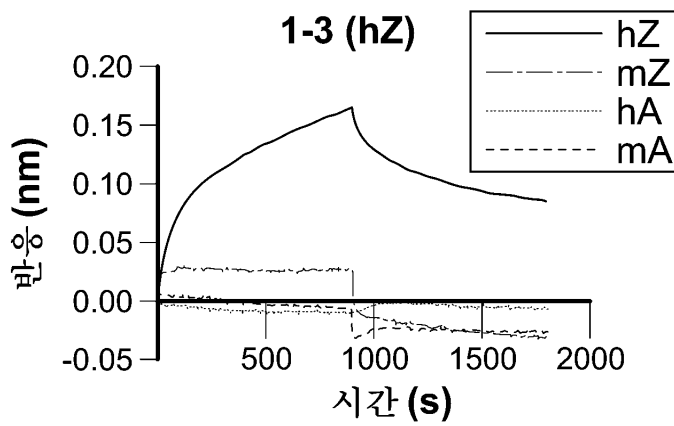
도면20a



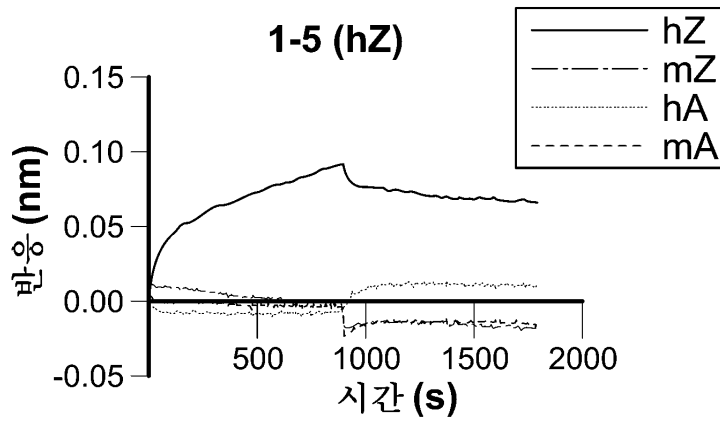
도면20b



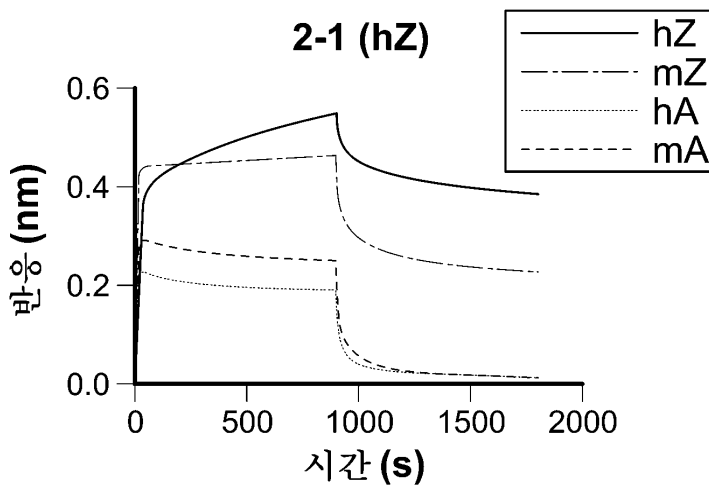
도면21a



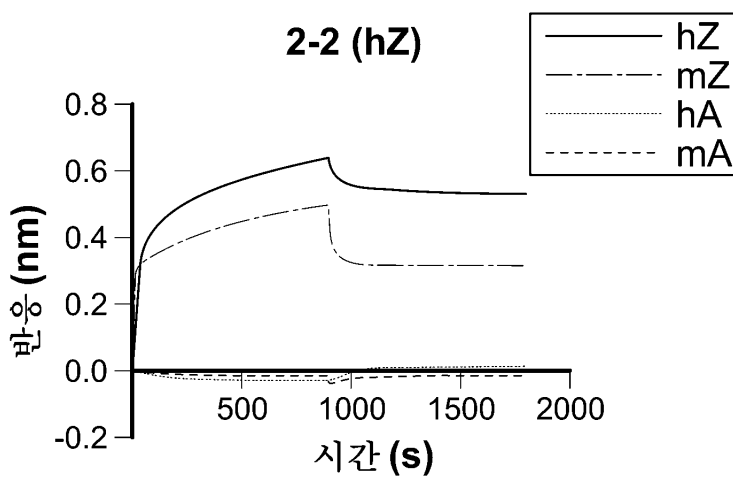
도면21b



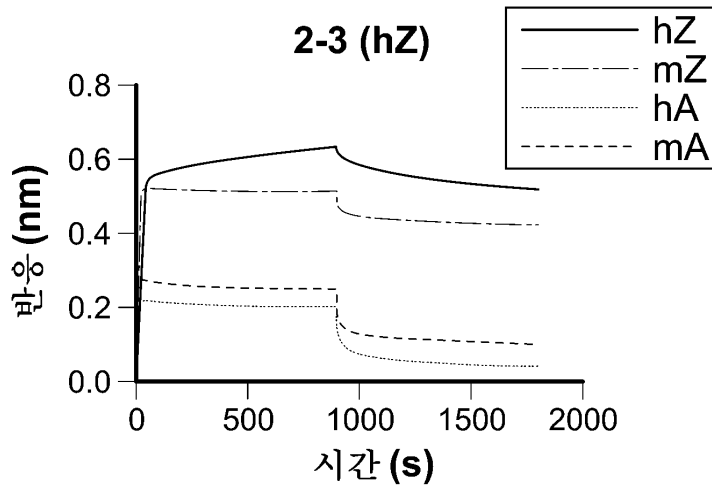
도면22a



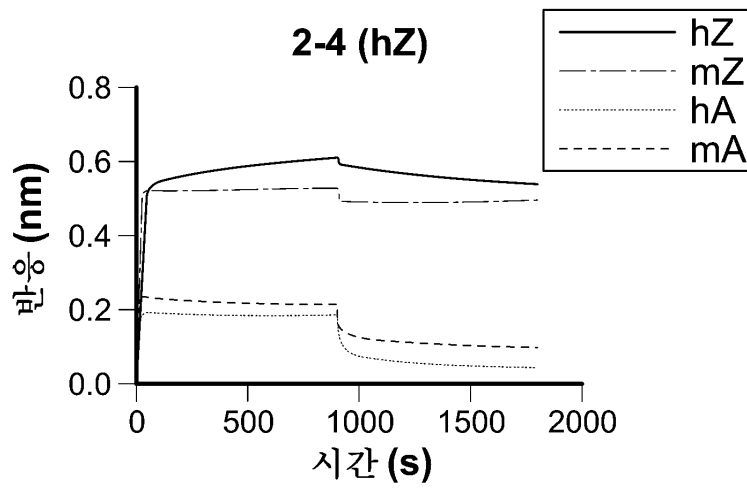
도면22b



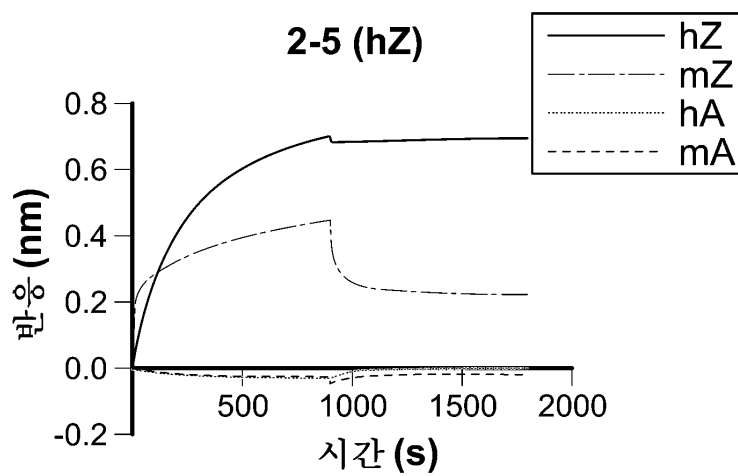
도면22c



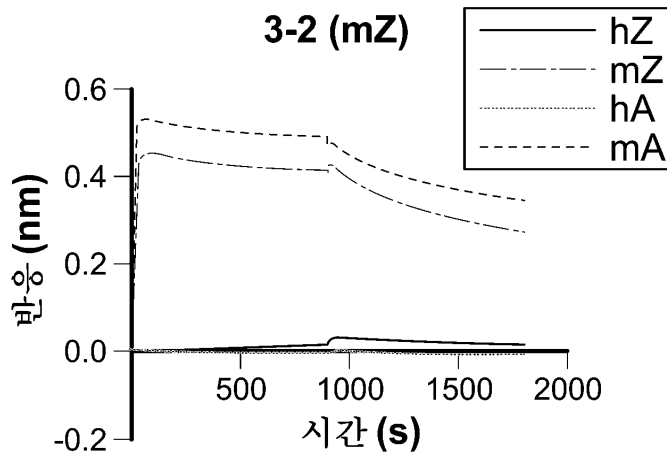
도면22d



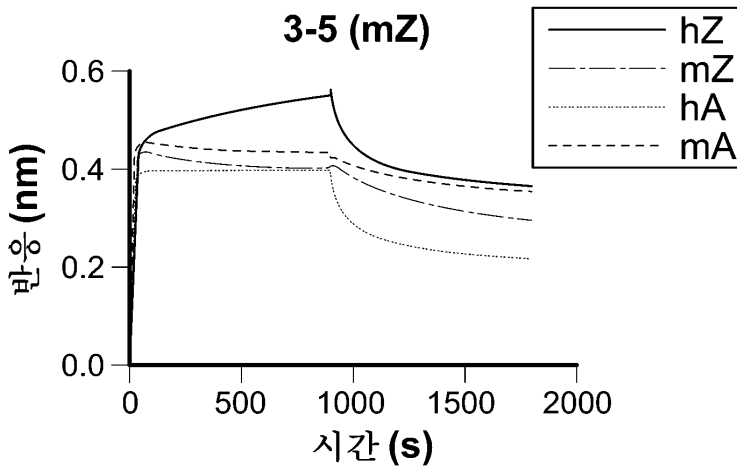
도면23



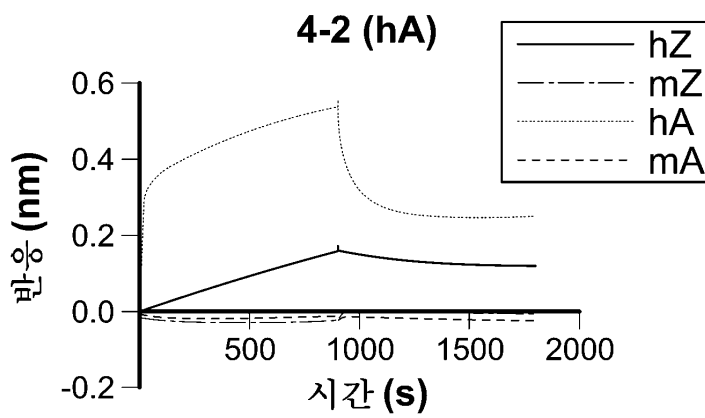
도면24a



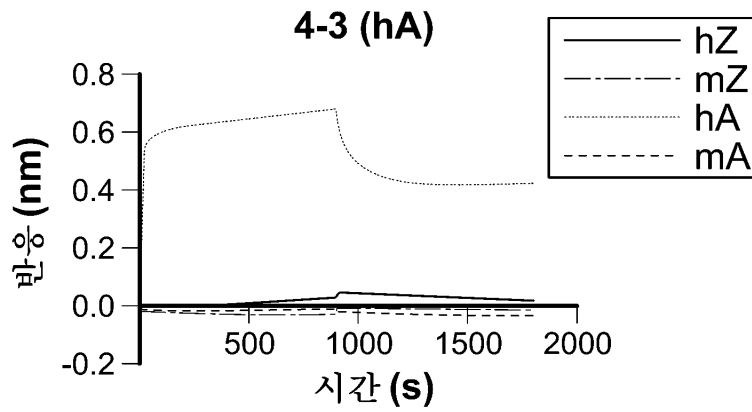
도면24b



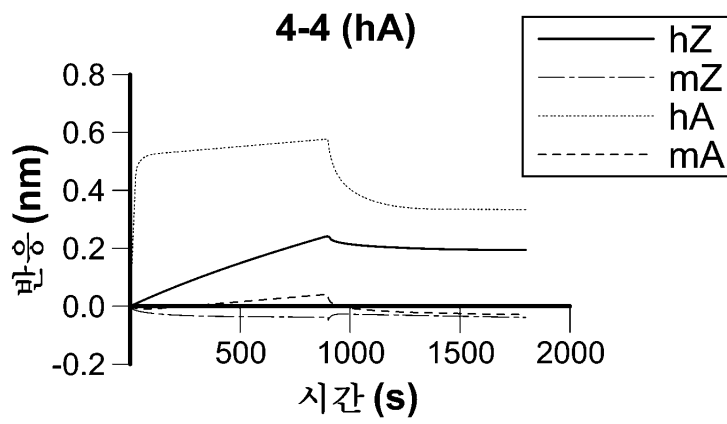
도면25a



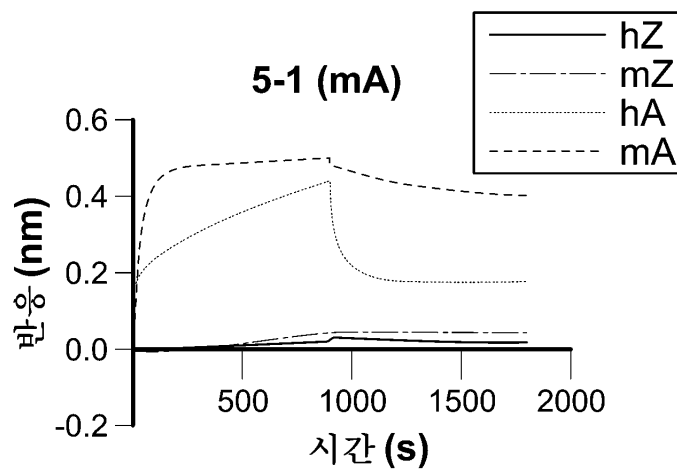
도면25b



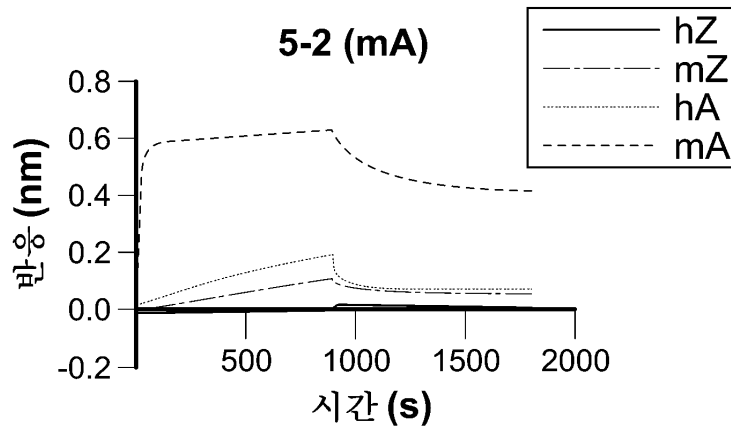
도면25c



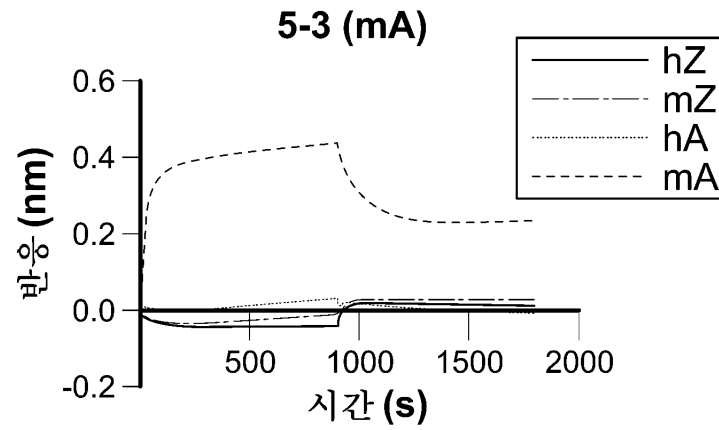
도면26a



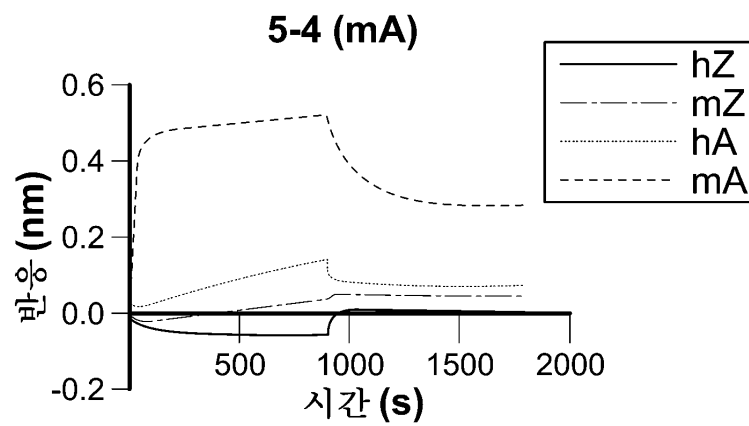
도면26b



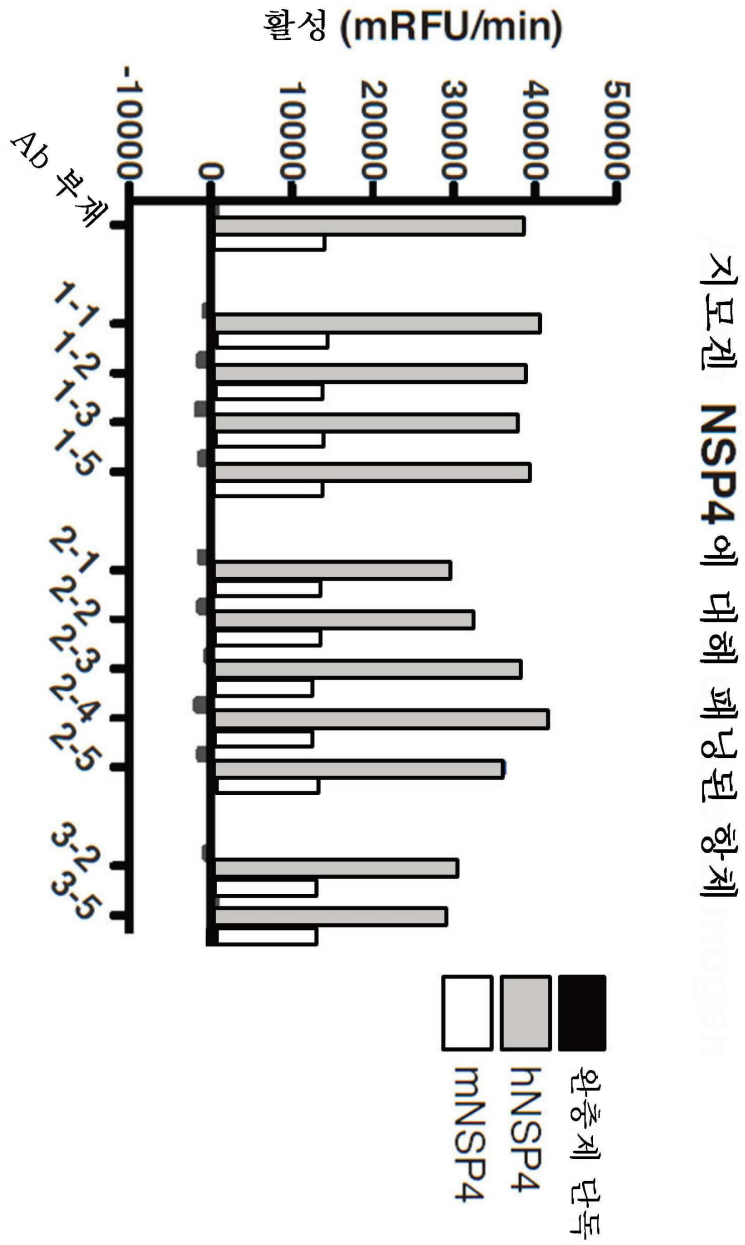
도면26c



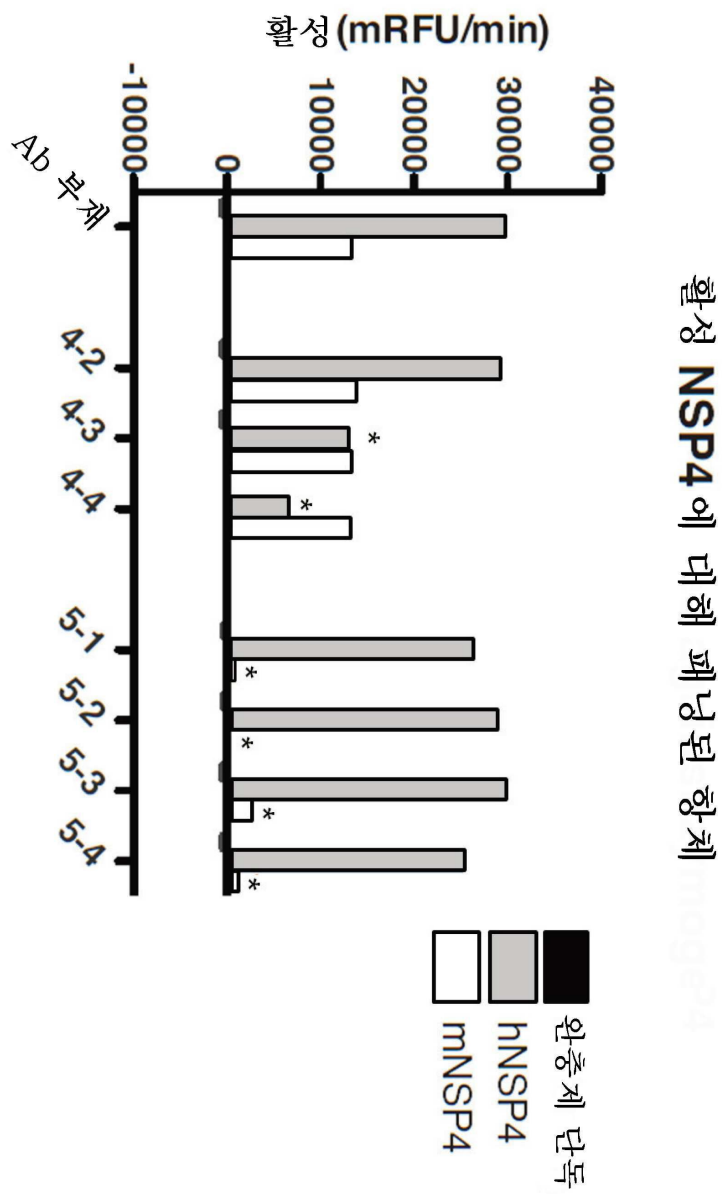
도면26d



도면27



도면28



상이한 NSP4 변이체에 대한 항체 특이성

hZ hA mZ mA

1-시리즈 (hZ-NSP4에 대해 패닝됨)

1-1	+			
1-2	++			
1-3	+			
1-5	+			

2-시리즈 (hZ-NSP4에 대해 패닝됨)

2-1	++	++	++	++
2-2	++		++	
2-3	++	++	++	++
2-4	++	++	++	++
2-5	++		++	

3-시리즈 (mZ-NSP4에 대해 패닝됨)

3-2			++	++
3-5	++	++	++	++

4-시리즈 (hA-NSP4에 대해 패닝됨)

4-2	+	++		
4-3		++		
4-4	+	++		

5-시리즈 (mA-NSP4에 대해 패닝됨)

5-1		+		++
5-2		+	+	++
5-3				++
5-4		+		++

++ 높은 결합, kD < 50 nM

+

낮은 친화도, kD 50 - 1000 nM

친화도 없음, kD > 1 μM

특이성

특이성 분류

차단 Ab

hZ-NSP4 중 + 입체 형태-특이적

	아니오
	아니오
	아니오
	아니오

지모겐 NSP4 입체 형태-특이적

	아니오
	아니오
	아니오
지모겐 NSP4 입체 형태-특이적	아니오

마우스 NSP4 중-특이적

범-NSP4 보편적	아니오
	아니오

인간 NSP4 중-특이적

hA-NSP4 중 + 입체 형태-특이적	아니오
인간 NSP4 중-특이적	예

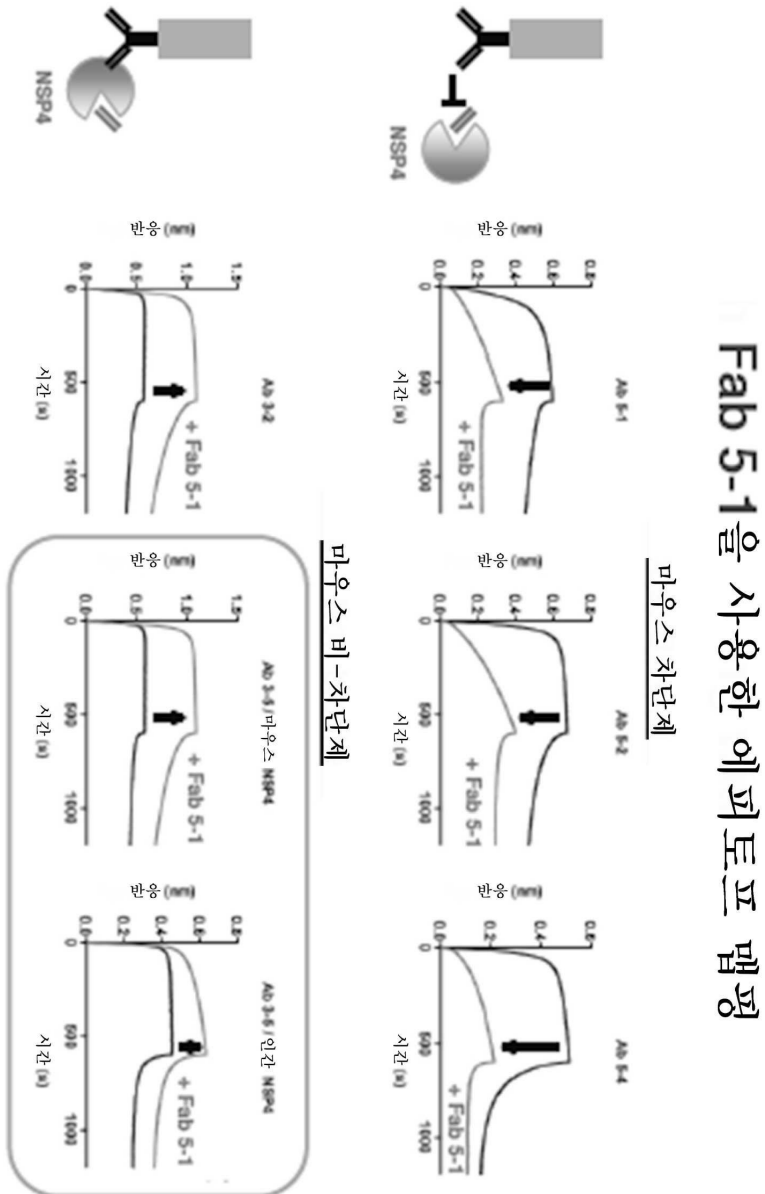
활성 NSP4 입체 형태-특이적

혼합 mA-NSP4 억제	예
--------------------	---

mA-NSP4 중 + 입체 형태-특이적

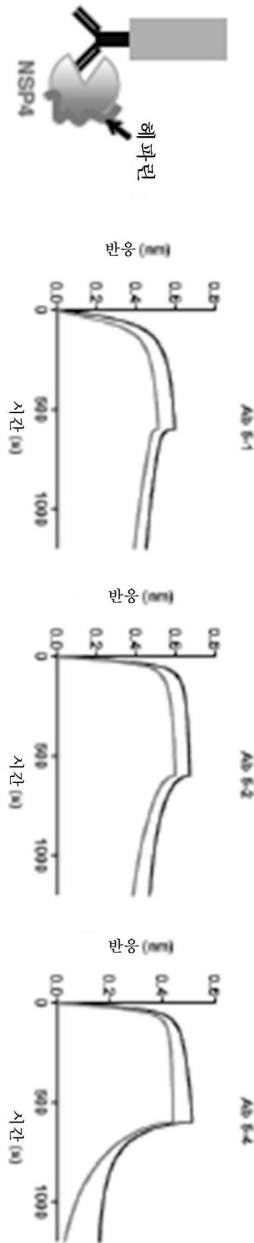
혼합 mA-NSP4 억제	예
--------------------	---

도면30

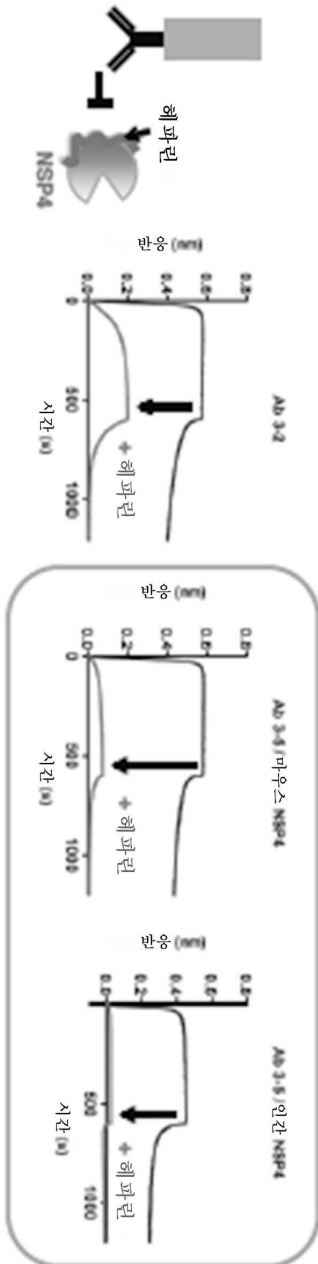


헤파린을 이용한 에피토프 맵핑

마우스 차단제

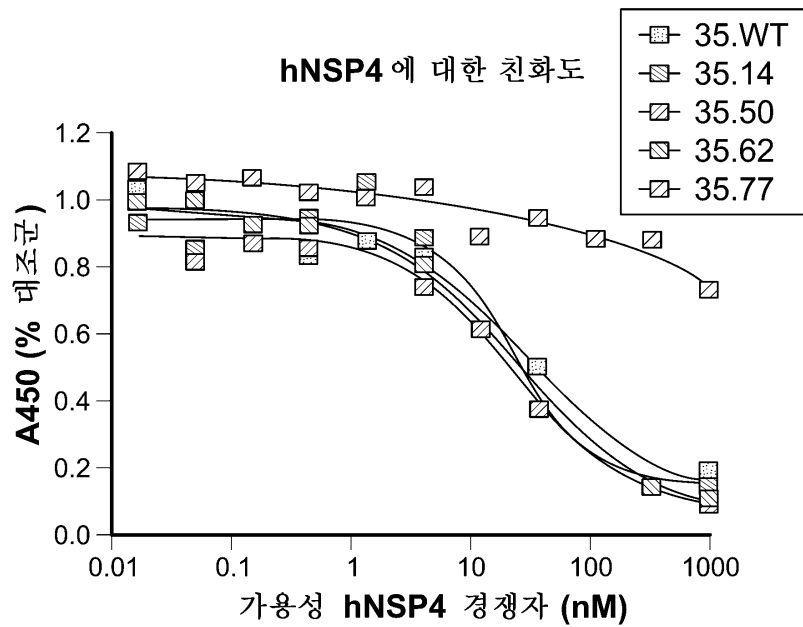
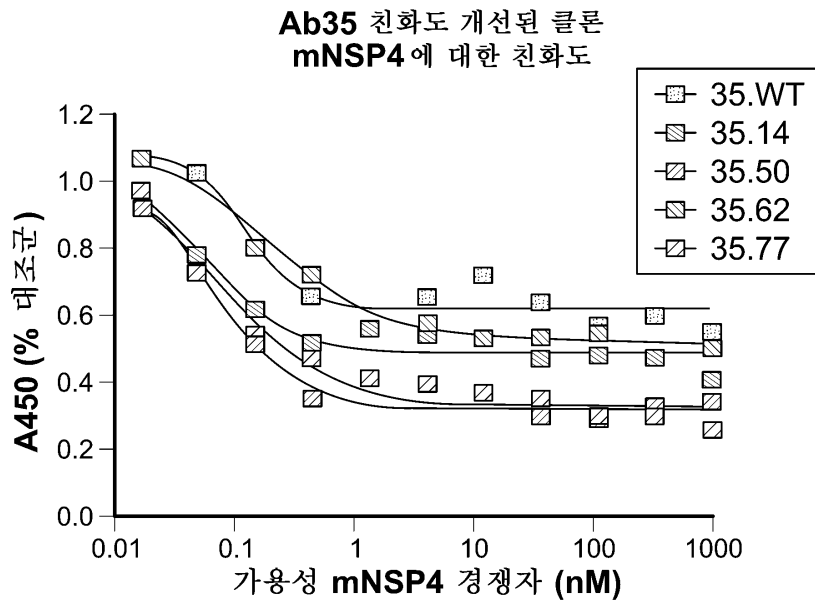


마우스 비-차단제

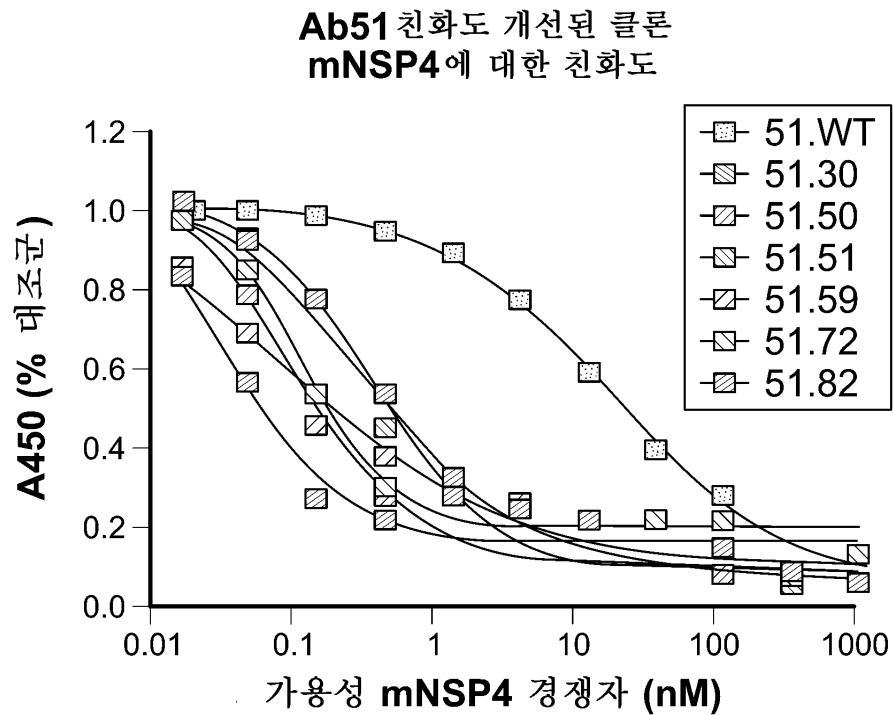


도면31

도면32



도면33



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc.

F. Hoffmann-La Roche AG

<120> NSP4 INHIBITORS AND METHODS OF USE

<130> 146392022740

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/890,147

<151> 2013-10-11

<150> US 61/893,059

<151> 2013-10-18

<150> US 62/053,052

<151> 2014-09-19

<160> 115

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Thr Tyr Ile Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg Arg Tyr Arg Leu Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

Arg Arg Val Ser Phe Tyr Ser Arg His Ala Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

1	5	10	15
Lys Gly			

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

Arg Ala Gly Arg Trp Thr His Ser Asp Ile Asp Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 11

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 13

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 Asn Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

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 Gly Asn

20 25 30

Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Arg Val Ser Phe Tyr Ser Arg His Ala Gly Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

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 Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Pro Ser Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

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

 85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

 100 105

<210> 17

<211> 283

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gly Leu Gly Leu Arg Gly Trp Gly Arg Pro Leu Leu Thr Val Ala

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

65	70					75					80				
Leu	Arg	Thr	Gly	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Ala	His	Val	Leu	Ser	Thr	Ala
85					90					95					
Glu	Pro	Thr	Gln	Gln	Val	Phe	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Thr	Thr	His	Pro
100					105					110					
Asp	Tyr	His	Pro	Met	Thr	His	Ala	Asn	Asp	Ile	Cys	Leu	Leu	Arg	Leu
115					120					125					
Asn	Gly	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Pro	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro

130						135						140					
Gly	Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Pro	Thr	Ala	Gly	Thr	Arg	Cys	Arg	Val	Ala		
145						150						155					
Gly	Trp	Gly	Phe	Val	Ser	Asp	Phe	Glu	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Leu	Met		
					165						170						
															175		

Glu Ala Lys Val Arg Val Leu Asp Pro Asp Val Cys Asn Ser Ser Trp
180 185 190
Lys Gly His Leu Thr Leu Thr Met Leu Cys Thr Arg Ser Gly Asp Ser
195 200 205
His Arg Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
210 215 220
Arg Asn Arg Ala His Gly Leu Val Ser Phe Ser Gly Leu Trp Cys Gly
225 230 235 240
Asp Pro Lys Thr Pro Asp Val Tyr Thr Gln Val Ser Ala Phe Val Ala
245 250 255
Trp Ile Trp Asp Val Val Arg Arg Ser Ser Pro Gln Pro Gly Pro Leu
260 265 270
Pro Gly Thr Thr Arg Pro Pro Gly Glu Ala Ala
275 280
<210> 18
<211> 283
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Met Gly Leu Gly Leu Arg Gly Trp Gly Arg Pro Leu Leu Thr Val Ala
1 5 10 15
Thr Ala Leu Met Leu Pro Val Lys Pro Pro Ala Gly Ser Trp Gly Ala
20 25 30
Gln Ile Ile Gly Gly His Glu Val Thr Pro His Ser Arg Pro Tyr Met
35 40 45
Ala Ser Val Arg Phe Gly Gly Gln His His Cys Gly Gly Phe Leu Leu
50 55 60
Arg Ala Arg Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ser His Arg Asp
65 70 75 80
Leu Arg Thr Gly Leu Val Val Leu Gly Ala His Val Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Glu Pro Thr Gln Gln Val Phe Gly Ile Asp Ala Leu Thr Thr His Pro

100 105 110

Asp Tyr His Pro Met Thr His Ala Asn Asp Ile Cys Leu Leu Arg Leu

115 120 125

Asn Gly Ser Ala Val Leu Gly Pro Ala Val Gly Leu Leu Arg Pro Pro

130 135 140

Gly Arg Arg Ala Arg Pro Pro Thr Ala Gly Thr Arg Cys Arg Val Ala

145 150 155 160

Gly Trp Gly Phe Val Ser Asp Phe Glu Glu Leu Pro Pro Gly Leu Met

165 170 175

Glu Ala Lys Val Arg Val Leu Asp Pro Asp Val Cys Asn Ser Ser Trp

180 185 190

Lys Gly His Leu Thr Leu Thr Met Leu Cys Thr Arg Ser Gly Asp Ser

195 200 205

His Arg Arg Gly Phe Cys Ser Ala Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys

210 215 220

Arg Asn Arg Ala His Gly Leu Val Ser Phe Ser Gly Leu Trp Cys Gly

225 230 235 240

Asp Pro Lys Thr Pro Asp Val Tyr Thr Gln Val Ser Ala Phe Val Ala

245 250 255

Trp Ile Trp Asp Val Val Arg Arg Ser Ser Pro Gln Pro Gly Pro Leu

260 265 270

Pro Gly Thr Thr Arg Pro Pro Gly Glu Ala Ala

275 280

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Trp Ile Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 21

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 22

Arg Val Leu Arg Pro Lys Val Tyr Ala Ser Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ser Ile His

1 5 10

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 25

Arg Leu Val Phe Tyr Arg Gly Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Trp Ile Ser

1 5 10

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 27

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 28

Ser Asp Ser Pro His Ala Tyr Trp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Asn Ser Ile Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 30

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 31

Arg Asn Ala Trp His Tyr Ser Trp Val Gly Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile His

1 5 10

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 33

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 35

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr Ala Ile Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 37

Arg Val Lys Trp Ala Val Ser Ser Leu Gly Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Ser Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 39

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 40

His Glu Ala Ser Asp Asp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 41

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Ile Ser

1 5 10

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 43

Arg Glu Asp Asp Asp Glu Arg Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Tyr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 45

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 46

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

1 5 10 15

Met Asp Tyr

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

Synthetic Construct

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ser Ile Ser

1 5 10

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 48

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 49

Arg Gly Asp Phe Pro Phe Trp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 51

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 52

Arg Asp Asp Val Pro Ala Val Phe Thr Ser Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 54

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 55

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 55

Arg Ser Val Arg Pro Ser Trp Trp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 56

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Ile Ser

1 5 10

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 57

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 58

Arg Tyr Ile Arg Arg Tyr Ser Val His Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Ser Ile His

1 5 10

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 60

Ala Glu Ile Thr Pro His Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 61

Arg Gly Arg Thr Lys Trp Gly Trp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Asn Ser Ile His

1 5 10

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 63

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 64

Arg Gly Val Ile Arg Tyr Ala Tyr Leu Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Gly Ile His

1 5 10

<210>

> 66

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 66

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 67

Lys Ser Leu Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 68

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 Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 69

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 Gly Tyr

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Leu Val Phe Tyr Arg Gly Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 70

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 70

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

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Ser Asp Ser Pro His Ala Tyr Trp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 71

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 Thr Asn Asn
 20 25 30

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

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Ala Trp His Tyr Ser Trp Val Gly Val Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 72

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 72

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 Thr Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 73

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 73

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 Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Val Lys Trp Ala Val Ser Ser Leu Gly Val Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 74

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 74

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 His Glu Ala Ser Asp Asp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 75

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 75

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 Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 76

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 76

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 Thr Gly Tyr

20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Ala Ser Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 His Arg Ala Phe Asp Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ile Gly Ser Ser
 100 105 110
 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 77

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 77

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

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

Ala Arg Gly Asp Phe Pro Phe Trp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 78

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 78

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 Asp Asn
 20 25 30
 Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

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

<210> 79

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 79

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 Gly Ser

20 25 30

Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 80

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 80

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

Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Tyr Ile Arg Arg Tyr Ser Val His Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 81

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 Thr Ser Thr

20 25 30
 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Thr Lys Trp Gly Trp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 82

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 82

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 Thr Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Val Ile Arg Tyr Ala Tyr Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 83

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 Gly Ser
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Trp Ile Ser Pro Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Leu Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 84

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 Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Asn Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Arg Leu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 85

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 Gly Asn

20 25 30
Asp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Gly Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Val Ser Phe Tyr Ser Arg His Ala Gly Met Asp Tyr Trp

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

115

120

<210> 86

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 86

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 Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ser Pro Ser Asn Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Ala Gly Arg Trp Thr His Ser Asp Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 87

Lys Arg His Leu His Asn Val Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 88

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 89

Arg Gly Leu Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 90

Arg Val Phe Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = K or R

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = S, G, or V

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = L or F

<400> 91

Xaa Xaa Xaa Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 92

Gln Gln Ser Tyr Gly Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 93

Gln Gln Ser Tyr Asp Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 94

Gln Gln Ser Ala Gly Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Y or A

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = T, G, or D

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = T or F

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = P or L

<400> 95

Gln Gln Ser Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 96

Gln Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Pro Thr

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 97

Gln Gln Ser Tyr Thr Ala Pro Pro Thr

1 5

<210> 98

<211> 9

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 98

Gln Gln Ala Asn Ser Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 99

Gln Gln Asn Phe Ser Ser Pro Pro Thr

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 100

Gln Gln Thr Tyr Asn Ala Pro Pro Thr

1

5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = S, A, N, or T

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Y, N, or F

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = T, S, or N

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = T, A, or S

<400> 101

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Pro Thr

1

5

<210> 102

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 102

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 Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Tyr Gly Phe Pro Leu

85 90 95

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

100 105

<210> 103

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 103

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 Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Tyr Asp Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 104

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 Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Ala Gly Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 105

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 105

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 Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Arg His Leu His Asn Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 106

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 Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ala Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 107

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 107

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 Gly Ser

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

85 90 95
Ala Lys Ser Leu Phe His Asn Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 108

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 Val Ser Thr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Ser Tyr Thr Ala Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 109

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 109

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 Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Asn Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 110

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 110

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 Gly Ser
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 111

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 Gly Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 112

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 112

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 Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Asn Phe Ser Ser Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 113

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 113

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 Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Tyr Asn Ala Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 114

<

211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 114

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Asp Tyr Ala Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln

180 185 190
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met

245 250 255
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr

305 310 315 320
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 115

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 115

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

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
35 40 45

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