



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월03일
(11) 등록번호 10-1885388
(24) 등록일자 2018년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/46 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7001244
(22) 출원일자(국제) 2011년06월17일
심사청구일자 2016년05월17일
(85) 번역문제출일자 2013년01월17일
(65) 공개번호 10-2013-0032896
(43) 공개일자 2013년04월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/040825
(87) 국제공개번호 WO 2011/159980
국제공개일자 2011년12월22일
(30) 우선권주장
61/356,508 2010년06월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Oncogene. 2009, 28:3442-3455.*
RecName: Full=Tyrosine-protein kinase
receptor UFO; AltName: Full=AXL oncogene;
Flags: Precursor. UniProtKB/Swiss-Prot:
P30530.3(2013.02.06.).*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
페이, 린
미국 94401 캘리포니아 산마테오 넘버2썸 사우쓰
그랜트 스트리트 318
유, 안
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
예, 시아오옌
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 23 항

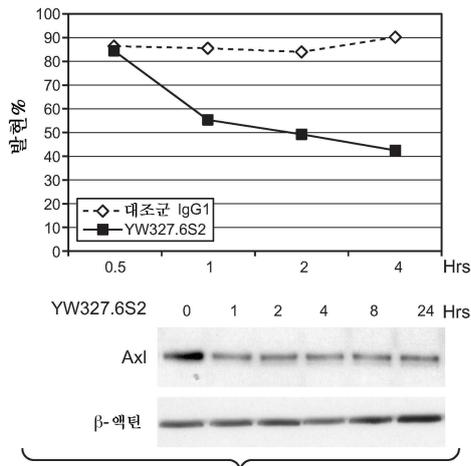
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 항-Ax1 항체 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 항-Ax1 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,
 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,
 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하거나, 또는
 (b) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1,
 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2,
 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3,
 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1,
 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및
 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는,
 인간 Ax1에 결합하는 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 Ax1에는 ≤ 1 nM의 친화도로 결합하고 마우스 Ax1에는 ≤ 600 pM의 친화도로 결합하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, Ax1 수용체 하향조절을 촉진하고/거나 구성적 Ax1 활성화를 억제하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 111의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 서열 111의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 결합하는 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 IgG1 항체인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 Ax1에 결합하는 항체 단편인 항체.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, HVR-H1이 서열 7의 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2이 서열 8의 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열 9의 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L1이 서열 10의 아미노산 서열을

포함하고, HVR-L2가 서열 11의 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 항체.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, HVR-L3이 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함하는 항체.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 서열 103의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 104의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, 서열 103의 VH 서열 및/또는 서열 104의 VL 서열을 포함하는 항체.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 15

제14항의 핵산을 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

항체가 생산되도록 제15항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역집합체.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암의 치료, 전이의 억제 및/또는 혈관신생의 억제를 위한 제약 제제.

청구항 20

제19항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 추가의 치료제가 VEGF 길항제, EGFR 길항제 및 화학요법제로부터 선택되는 것인 제약 제제.

청구항 22

유효량의 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는, 개체에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 추가의 치료제가 VEGF 길항제, EGFR 길항제 및 화학요법제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] <관련 출원>
- [0002] 본원은 35 USC § 119 하에 2010년 6월 18일에 출원된 미국 가출원 번호 61/356,508을 우선권 주장하고, 그의 내용은 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0003] <서열 목록>
- [0004] 본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0005] <본 발명의 분야>
- [0006] 본 발명은 항-Ax1 항체 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] Ax1은 수용체 티로신 키나제의 TAM (Tyro3, Ax1 및 Mer) 패밀리의 구성원이다 (문헌 [O'Bryan et al., 1991; Lai et al., 1991]). 이는 본래 혈액 악성종양에서 형질전환 유전자로 확인되었다 (문헌 [O'Bryan et al., 1991; Janssen et al., 1991]). Ax1 또는 그의 리간드 Gas6의 조절이상은 다양한 인간 암의 발병기전과 관련된다. Ax1 과다발현은 광범위한 인간 암에서 보고되었으며 (문헌 [Berclaz et al., 2001; Craven et al., 1995; Shieh et al., 2005; Sun et al., 2004; Ito et al., 1999]), 폐 (문헌 [Shieh et al., 2005]), 전립선 (문헌 [Sainaghi et al., 2005]), 유방 (문헌 [Meric et al., 2002; Zhang et al., 2008]), 위 (문헌 [Wu et al., 2002]) 및 췌장 (문헌 [Koorstra et al., 2009]) 암, 신세포 암종 (문헌 [Chung et al., 2003]) 뿐만 아니라 교모세포종 (문헌 [Hutterer et al., 2008])에서의 침습 및 전이와 연관된다. 최근에, 포스티로신 신호전달의 프로파일링에 의해, 활성화 Ax1 단백질이 NSCLC의 약 5% 원발성 종양에서 검출되었다 (문헌 [Rikova et al., 2007]). Ax1 발현이 표적화 및 화학요법 약물에 의해 유도되고, 약물-유도된 Ax1 발현은 급성 골수성 백혈병에서 화학요법에 대한 내성 (문헌 [Hong et al., 2008]) 뿐만 아니라 각각 위장 기질 종양 (문헌 [Mehadevan, et al., 2007]) 및 유방암 (문헌 [Liu et al., 2009])에서 이마티닙 및 라파티닙(Lapatinib)/헤르셉틴(Herceptin)에 대한 내성을 부여한다. Ax1 및 항-Ax1 항체와 관련된 다른 공보는 W02004/039955, W02009/063965; 공유 US 출원 번호 61/228,915 (2009년 7월 27일 출원); W02009/062690; W02004/008147; 5,468,634를 포함한다.
- [0008] 치료제로서의 개발에 최적인 임상적 특성을 갖는 작용제가 계속 요구된다는 것이 명백하다. 본원에 기재된 발명은 이러한 요구를 충족시키고, 다른 이점을 제공한다.
- [0009] 특허 출원 및 공보를 포함하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체내용이 참고로 포함된다.

발명의 내용

- [0010] <개요>
- [0011] 본 발명은 항-Ax1 항체 및 그의 사용 방법을 제공한다.
- [0012] 한 측면에서, 본 발명은 인간 Ax1에 결합하는 단리된 항체이며, 인간 Ax1에는 ≤ 1 nM의 친화도로 결합하고, 마우스 Ax1에는 ≤ 600 pM의 친화도로 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 Ax1 수용체 하향조절을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 구성적 Ax1 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다:
MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPNITGARGLTGTLRCQ
LQVQGEPEVHWLRDQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSLQLSDTGQYQC
LVFLGHQTFVSPGYVG (서열 111).
- [0013] 추가 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Ax1에 결합하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다.
- [0014] 한 측면에서, 본 발명은 (a) GFX1X₂X₃X₄X₅X₆X₇H (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 L, F 또는 V이고; X₃은 S, T 또는 R이고; X₄는 G 또는 S이고; X₅는 S, H, T 또는 I이고; X₆은 W 또는 G이고; X₇은 I 또는 L임) (서열 112)를 포함하는 HVR-H1, (b) X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YYADSVKQ (여기서, X₁은 G 또는 A이고; X₂는 W 또는 G이고; X₃은 N, S, A 또는 P이고; X₄는 Y, A 또는 V이고; X₅는 R, G 또는 S이고; X₆은 G, R 또는 S이고; X₇은 Y, S, H 또는 Y이고; X₈은 A, T 또는 P임) (서열 113)를 포함하는 HVR-H2 및/또는 X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YYADSVKQ (여기서, X₁은 G 또는 A이고; X₂는 W 또는 G이고; X₃은 N, S, A 또는 P이고; X₄는 Y, A 또는 V이고; X₅는 R, G 또는 S이고; X₆은 G, R 또는 S이고; X₇은 Y, S, H 또는 Y이고; X₈은 A, T 또는 P이고; X₉는 임의의 아미노산이거나 또는 부재하고; X₁₀은 임의의 아미노산이거나 또는 부재함) (서열 166)를 포함하는 HVR-H2; (c) ARX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃MDY (여기서, X₁은 E 또는 W이고; X₂는 Y 또는 R이고; X₃은 S, N 또는 P이고; X₄는 G, D 또는 L이고; X₅는 W 또는 S이고; X₆은 G, R, A 또는 S이고; X₇은 G 또는 S이고; X₈는 S이거나 또는 부재하고; X₉는 S, Y이거나 또는 부재하고; X₁₀은 V, I이거나 또는 부재하고; X₁₁은 G이거나 또는 부재하고; X₁₂는 Y이거나 또는 부재하고; X₁₃은 A, E이거나 또는 부재함) (서열 114)를 포함하는 HVR-H3; (d) RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A (여기서, X₁은 D, I 또는 S이고; X₂는

V 또는 I이고; X₃은 S, G 또는 R이고; X₄는 T, I, N 또는 R이고; X₅는 A 또는 S이고; X₆은 V 또는 L임) (서열 115)를 포함하는 HVR-L1; (e) X₁ASX₂LX₃S (여기서, X₁은 S, A 또는 V이고; X₂는 F, N 또는 S이고; X₃은 Y 또는 A임) (서열 116)를 포함하는 HVR-L2; 및 (f) QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T (여기서, X₁은 S 또는 A이고; X₂는 Y, K 또는 N이고; X₃은 T, S, Y, M, R 또는 A이고; X₄는 T, N, S 또는 F이고; X₅는 P 또는 R이고; X₆은 P, Y, S 또는 L임) (서열 117)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) GFX₁X₂X₃GX₄WIH (여기서, X₁은 T 또는 S이고, X₂는 F 또는 L이고, X₃은 T 또는 S이고, X₄는 H, S 또는 T임) (서열 118)를 포함하는 HVR-H1; (b) GWIX₁PYX₂X₃X₄YYADSVKG (여기서, X₁은 S, N 또는 A이고; X₂는 G, R 또는 S이고; X₃은 G 또는 R이고; X₄는 S, Y 또는 H이고; X₅는 T, A 또는 P임) (서열 119)를 포함하는 HVR-H2; (c) AREYX₁X₂WX₃X₄SX₅X₆GYX₇MDY (여기서, X₁은 S, N 또는 P이고; X₂는 G 또는 D이고; X₃은 G, R 또는 A이고; X₄는 G 또는 S이고; X₅는 S 또는 Y이고; X₆은 V 또는 I이고; X₇은 A 또는 E임) (서열 120)를 포함하는 HVR-H3; 및 (d) QQSX₁X₂X₃X₄T (여기서, X₁은 T, S 또는 Y이고; X₂는 T, N, S 또는 F이고; X₃은 P 또는 R이고; X₄는 P, Y 또는 S임) (서열 121)를 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3, (b) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3, 및 (c) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2를 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 및 (b) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 및 (b) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 항체는 도 3a-b, 4, 5 또는 6에 제시된 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.

[0021] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 103의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 104의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 103의 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 104의 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 103의 VH 서열 및 서열 104의 VL 서열을 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 항체는 전장 IgG1 항체이다.

[0023] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 항체를 코딩하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 항체가 생산되도록 본 발명의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 추가로 포함한다.

[0026] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 항-Ax1 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 항-Ax1 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 제제는 추가의 치료제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 VEGF 길항제, EGFR 길항제 및 화학요법제로부터 선택된다.

[0028] 본 발명은 또한 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 사용은 암의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 사용은 면역 장애, 심혈관 장애, 혈전증 또는 당뇨병의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 사용은 세포 증식의 억제제를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 사용은 Ax1 하향조절의 촉진을 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 사용은 혈관신생의 억제제를 위한 것이다.

- [0029] 본 발명은 또한 의약의 제조에 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 의약은 암의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 의약은 면역 장애, 심혈관 장애, 혈전증 또는 당뇨병의 치료를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 의약은 세포 증식의 억제, 혈관신생의 억제, Ax1 하향조절의 촉진, 전이의 억제, 혈관신생의 억제를 위한 것이다.
- [0030] 본 발명은 또한 암을 갖는 개체에게 유효량의 본원에 개시된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 추가의 치료제를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 치료제는 VEGF 길항제, EGFR 길항제 및 화학요법제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0031] 본 발명은 또한 면역 장애, 심혈관 장애, 혈전증 또는 당뇨병을 갖는 개체에게 유효량의 본원에 개시된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명은 또한 개체에게 유효량의 본원에 개시된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하여 혈관신생을 억제하거나, 세포 증식을 억제하거나, Ax1 수용체 하향조절을 촉진하거나 또는 전이를 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 혈관신생을 억제하거나, 세포 증식을 억제하거나, Ax1 수용체 하향조절을 촉진하거나 또는 전이를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명은 또한 개체에게 유효량의 본원에 개시된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하여 구성적 Ax1을 억제하는 것을 포함하는, 구성적 Ax1 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0034] 한 측면에서, 본 발명은 EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있으며 EGFR 길항제로의 치료에 대한 내성이 발생한 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는지 여부를 결정하는 것, 및 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는 상기 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0035] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료된 대상체에서 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭이 발생하는지 결정하기 위해 상기 대상체를 모니터링하는 것, 및 (ii) 상기 대상체의 치료 요법을 EGFR 길항제 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하도록 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체에서는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭이 발생한 것인, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0036] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료된 대상체에서 억제제에 대한 내성이 발생하는지 결정하기 위해 상기 대상체를 모니터링하는 것, (ii) 상기 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는지 여부를 결정하기 위해 상기 대상체를 시험하는 것, 및 (iii) 상기 대상체의 치료 요법을 EGFR 길항제 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하도록 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는 것인, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0037] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료된 대상체의 집단을, 요법에 대한 내성이 발생한 대상체를 확인하기 위해 모니터링하는 것, (ii) 상기 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는지 여부를 결정하기 위해 내성 대상체를 시험하는 것, 및 (iii) 상기 대상체의 치료 요법을 EGFR 길항제 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하도록 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 갖는 것인, EGFR 길항제를 평가하는 방법을 제공한다.
- [0038] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포에서 EGFR 인산화를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0039] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포에서 PI3K 매개 신호전달을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0040] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포에서 EGFR-매개 신호전달을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0041] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 것을 포함

하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포의 EGFR 길항제에 대한 감수성을 회복시키는 방법을 제공한다.

- [0042] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포의 성장 또는 증식을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0043] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포의 아포토시스를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0044] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포의 EGFR 길항제에 대한 내성을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0045] 한 측면에서, 본 발명은 암 세포를 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 암 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인, 암 세포에서 획득된 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 암 세포는 임의의 EGFR-유래 암이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 활성화 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 유전자 증폭은 적어도 2배이다. 일부 실시양태에서, Ax1 증폭은 적어도 2배이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대해 증가된 내성과 연관된 EGFR 유전자 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제에 대해 증가된 내성과 연관된 EGFR 유전자 돌연변이는 EGFR의 T790M 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 소분자 치료제, 핵산 치료제 또는 단백질 치료제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 항체, 안티센스 분자 또는 소분자 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 EGFR 키나제 억제제이다: 게피티닙, 에를로티닙, 세특시맵, 판티누무맵. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 항-EGFR 항체이다: 세특시맵, 파니투무맵. 일부 실시양태에서, 핵산 치료제는 siRNA 분자이다.
- [0047] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포에서 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체는 EGFR 길항제로 치료되고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 암을 앓고 있는 것인, EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체로의 치료를 위한 후보로서의 대상체를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0048] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포에서 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭의 존재를 검출하는 것을 포함하며, 여기서 상기 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭의 존재는 상기 내성을 획득할 위험을 나타내는 것인, EGFR 길항제로 치료되고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0049] 한 측면에서, 본 발명은 EGFR 길항제로의 치료에 대한 내성이 있는 암을 앓고 있는 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0050] 한 측면에서, 본 발명은 EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있으며 EGFR 길항제로의 치료에 대한 내성이 발생한 대상체가 Ax1 발현, 예컨대 상승된 Ax1 수준 및/또는 활성을 갖는지 여부를 결정하는 것, 및 Ax1 발현, 예컨대 상승된 Ax1 활성을 갖는 상기 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0051] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료된 대상체에서 Ax1 발현, 예컨대 상승된 수준 및/또는 Ax1 활성이 발생하는지 결정하기 위해 상기 대상체를 모니터링하는 것, 및 (ii) 상기 대상체의 치료 요법을 EGFR 길항제 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하도록 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 대상체에서는 Ax1 발현, 예컨대 상승된 Ax1 수준 및/또는 활성이 발생한 것인, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0052] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료된 대상체에서 억제제에 대한 내성이 발생하는지 결정하기 위해 상기 대상체를 모니터링하는 것, 및 (ii) 상기 대상체가 Ax1 발현, 예컨대 상승된 Ax1 수준 및/또는 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해 상기 대상체를 시험하는 것, 및 (iii) 상기 대상체의 치료 요법을 EGFR 길항제 뿐만

아니라 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하도록 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 대상체는 상승된 Ax1 수준 및/또는 활성을 갖는 것인, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체와 접촉시킴으로써, (i) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 감수성을 회복시키고/거나, (ii) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 내성을 감소시키고/거나 (iii) 암 세포에서 획득된 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, 예를 들어 Ax1 유전자에서의 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭 또는 Gas6 매개 Ax1 활성화와 연관된 Ax1 활성화 및/또는 발현의 상승된 수준을 포함한다. 본원에 개시된 방법은 암 세포의 감수성을 회복시키고/거나 내성을 감소시키고/거나 획득된 내성을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0054] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기재된 임의의 항-Ax1 항체와 접촉시킴으로써, 암 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나 또는 암 세포의 아폽토시스를 증가시키는 방법을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하고, 예를 들어 Ax1 유전자에서의 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭 또는 Gas6 매개 Ax1 활성화와 연관된 상승된 Ax1 활성화 및/또는 발현을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1a-f: 항-FGFR3 항체의 중쇄 및 경쇄 HVR 루프 서열. 도면은 중쇄 HVR 서열, H1, H2 및 H3, 및 경쇄 HVR 서열, L1, L2 및 L3을 보여준다. 아미노산 위치는 본원에 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 2: 항-Ax1 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

도 3a-b 및 4: 하기와 같은 서열 식별자와 본 발명을 수행하는데 사용하기 위한 예시적인 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한다:

가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 (도 3a-b)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (나타나는 순서대로 각각 서열 131-133 및 125)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 초가변 영역 (나타나는 순서대로 각각 서열 134-135, 133, 125, 134-136, 125, 134-135, 137 및 125)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (나타나는 순서대로 각각 서열 138-140 및 125)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 초가변 영역 (나타나는 순서대로 각각 서열 141-142, 140, 125, 141-143, 125, 141-142, 144 및 125)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (나타나는 순서대로 각각 서열 145-147 및 125)

인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 초가변 영역 (나타나는 순서대로 각각 서열 122-123, 147, 125, 122-123, 148, 125 및 122-125)

인간 VH 수용자 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (나타나는 순서대로 각각 서열 149, 146, 150 및 125)

인간 VH 수용자 프레임워크 마이너스 확장된 초가변 영역 (나타나는 순서대로 각각 서열 122-123, 150, 125, 122-123, 151 및 125)

인간 VH 수용자 2 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (나타나는 순서대로 각각 서열 149, 146, 152 및 125)

인간 VH 수용자 2 프레임워크 마이너스 확장된 초가변 영역 (나타나는 순서대로 각각 서열 122-123, 152, 125, 122-123, 153, 125, 122-123, 154 및 125)

가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 (도 4)

인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (나타나는 순서대로 각각 서열 126-129)

인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (나타나는 순서대로 각각 서열 155-157 및 129)

인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (나타나는 순서대로 각각 서열 158-160 및 129)

인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (나타나는 순서대로 각각 서열 161-163 및 129)

도 5: huMAb4D5-8 경쇄 (나타나는 순서대로 각각 서열 126-127, 164 및 129) 및 중쇄 (나타나는 순서대로 각각 서열 122-123, 154 및 125)의 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위치자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 6: huMAb4D5-8 경쇄 (나타나는 순서대로 각각 서열 126-129) 및 중쇄 (나타나는 순서대로 각각 서열 122-125)의 변형/변이체 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위치자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 7a-h: Ax1 mAb YW327.6S2의 특성화. a-b. 비아코어(BIAcore)를 이용하는 YW327.6S2의 친화도 측정. 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 일-대-일 랭뮤어 결합 모델을 이용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{on}/k_{off} 비로 구하였다. c. YW327.6S2의 교차 반응성. YW327.6S2는 뮤린 및 시노물구스 Ax1과 교차 반응하지 만 Tyro3 또는 Mer과 교차 반응하지 않는다. 플레이트를 항-인간 IgG Fc로 코팅한 후에, 인간 Ax1, Mer, Tyro3 Fc, 마우스 또는 시노물구스 Ax1Fc와 인큐베이션하였다. 세척 후에, 이소형 대조군 항체 또는 YW327.6S2를 첨가하고, 이후에 HRP 접합된 항-인간 IgG를 첨가하였다. d-e. YW327.6S2는 Ax1에의 Gas6 결합을 차단한다. 도 7d: ELISA. 플레이트를 항-인간 IgG Fc로 코팅하고, 인간 Ax1-Fc와 인큐베이션하였다. 세척 후에, Gas6를 항체와 함께 또는 항체 없이 첨가하였다. Gas6의 결합을 비오틴닐화 항-Gas6 항체 및 스트렙타비딘-HRP 접합체에 의해 검출하였다. 도 7e: FACS. HUVEC를 수확하고, YW327.6S2 또는 대조군 항체로 처리한 후에 Gas6과 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 세포 표면의 Gas6의 결합을 비오틴닐화 항-Gas6 항체 및 스트렙타비딘-PE 접합체에 의해 검출하였다. f. YW327.6S2는 Ax1 발현을 하향조절한다. A549 세포를 지시된 시간 동안 $1 \mu\text{g/ml}$ YW327.6S2와 인큐베이션하고, 세포 표면 Ax1 발현을 FACS에 의해 결정하고 (상부 패널), 전체 단백질 발현을 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 결정하였다 (하부 패널). g. YW327.6S2는 Gas6-유도된 Ax1 인산화 및 신호전달을 억제한다. H1299 세포를 혈청 무함유 배지에서 밤새 배양하고, YW327.6S2와 4시간 동안 예비-인큐베이션하고, Gas6으로 30분 동안 처리하였다. 인산화 Ax1을 ELISA에 의해 측정하고 (상부 패널), 인산화 Akt를 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 측정하였다 (하부 패널). h. YW327.6S2는 Baf3Ax1 세포 성장을 억제한다. Baf3Ax1 세포를 200 ng/ml Gas6을 함유하는 배지에서 성장시키고, YW327.6S2로 지시된 농도에서 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존율을 셀타이터 글로(CellTiter Glo) 검정에 의해 측정하였다.

도 8a-f: YW327.6S2는 A549 이종이식 종양 성장을 감소시키고, 항-VEGF의 효과를 증진시킨다. a. 종양 성장 곡선. mAb를 평균 종양 크기가 100 mm^3 에 도달하였을 때 (제0일) 시작하여 1주일에 2회 10 mg/kg (YW327.6S2 및 이소형 대조군 항체) 또는 1 mg/kg (항-VEGF)에서 IP 투여하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다 (각 실험에서 각각의 군에 대해 $n=10$). $p=0.0003$ (YW327.6S2 대 대조군), $p=10^{-11}$ (YW327.6S2 대 조합). b. 다양한 처리군의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선. 마우스를 이들의 종양 크기가 800 mm^3 에 도달하였을 때 연구로부터 배제하고, 각각의 군에 잔류하는 동물 (잔류%)을 플롯팅하였다. c. 12A11은 항-VEGF의 효과를 증진시킨다. 12A11 및 항-VEGF를 평균 종양 크기가 100 mm^3 에 도달하였을 때 (제0일) 시작하여 1주일에 2회 각각 30 mg/kg 및 1 mg/kg 에서 IP 투여하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다 (각 실험에서 각각의 군에 대해 $n=10$). $p=0.006$ (12A11 대 대조군); $p=0.0001$ (12A11 대 조합). d. YW327.6S2는 Ax1 발현을 하향조절한다. 마우스를 YW327.6S2로 10 mg/kg 에서 처리하고, 종양을 지시된 시점에 절제하였다. 종양으로부터의 세포 용해물을 Ax1 발현에 대한 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. e. YW327.6S2는 아포토시스를 유도한다. 대조군 또는 YW327.6S2로 2주 동안 처리된 종양을 절제하고, CC3 IHC를 수행하여 아포토시스를 측정하였다. f. YW327.6S2는 종양내 혈관 밀도의 감소에 있어 항-VEGF의 효과를 증진시킨다. d에서 상기와 같이 처리된 마우스로부터의 종양을 투여 0 및 72시간 후에 절제하고, 종양 혈관계를 MECA32 면역조직화학으로 염색함으로써 시각화하고, 영상 분석에 의해 정량화하였다 (제공 마이크로미터로 표현됨). 스튜던트 t 검정을 각각의 쌍에 대해 수행하였다 (대조군 대 조합에 대해 $p<0.05$).

도 9a-b: YW327.6S2는 A549 이종이식 모델에서 예르로티닙 및 화학요법의 항-종양 효과를 증진시킨다. a. YW327.6S2는 예르로티닙의 효과를 증진시킨다. 항체 투여는 도 2에서와 동일하였다. 예르로티닙을 경구 위관 영양에 의해 100 mg/kg/일 에서 투여하였다. 각각의 군에 대해 $n=10$. $p=1.7 \times 10^{-9}$ (YW327.6S2 대 대조군), $p=2.3 \times 10^{-10}$ (YW327.6S2 대 조합). b. YW327.6S2는 화학요법을 증진시킨다. 항체 투여는 도 2에서와 동일하였다. 파클리탁셀 및 카르보플라틴을 각각 $5 \text{ 일 동안 } 6.25 \text{ mg/kg/일}$ 에서, 및 처리 시작시에 (제0일에) 단일 용량

을 위한 100 mg/kg에서 피하 투여하였다. 각각의 군에 대해 n=10. $p=3 \times 10^{-5}$ (YW327.6S2 대 대조군), $p=10^{-9}$ (화학요법 대 대조군), $p=10^{-5}$ (조합 대 화학요법 단독).

도 10a-g: YW327.6S2는 종양 기질 기능을 조절함으로써 MDA-MB-231 이종이식 종양 성장을 감쇄시킨다. a 및 b. YW327.6S2는 MDA-MB-231 종양 성장을 감소시키고, 항-VEGF의 효과를 증진시키지만 12A11은 그렇지 않다. mAb는 평균 종양 크기가 100 mm³에 도달하였을 때 (제0일) 시작하여 20 mg/kg (YW327.6S2 및 이소형 대조군 항체), 30 mg/kg (12A11) 및 2 mg/kg (항-VEGF)에서 1주일에 2회 IP 투여하였다. 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다 (각 실험에서 각각의 군에 대해 n=10). $p=8.5 \times 10^{-6}$ (YW327.6S2 대 대조군), $p=2.8 \times 10^{-8}$ (YW327.6S2 대 조합), $p=0.05$ (12A11 대 대조군), $p=0.145$ (항-VEGF 대 조합). c 및 d. YW327.6S2는 Ax1 발현을 하향조절한다. MDA-MB231 이종이식 종양 (평균 크기 500 mm³)을 보유하는 마우스를 mAb로 20 mg/kg에서 처리하고, 종양을 지시된 시점에 절제하였다. 종양으로부터의 세포 용해물을 Ax1 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석에 사용하였다. e. YW327.6S2는 종양-연관 혈관계의 밀도를 감소시킨다. c에서 상기와 같이 처리된 마우스로부터의 종양을 투여 0시간 및 1주일 후에 절제하고, 종양 혈관계를 MECA32 면역조직화학으로의 염색에 의해 시각화하고, 영상 분석에 의해 정량화하였다 (제곱 마이크로미터로 표현됨). 스튜던트 t 검정을 각각의 쌍에 대해 수행하였다 (YW327.6S2 대 대조군, 항-VEGF 대 대조군, 및 항-VEGF 대 조합의 경우 $p < 0.05$). f. Ax1은 원발성 인간 유방암의 침윤성 대식세포에서 고도로 발현된다. 면역조직화학을 이용하여 79개 원발성 종양을 조사하였다. 이들 종양의 21%는 침윤성 대식세포에서 높은 수준의 Ax1을 발현한다. 대식세포를 항-CD68로의 염색에 의해 확인하고, 대식세포 상에서의 Ax1의 발현은 항-Ax1/CD68 이중 IHC에 의해 결정하였다. 연속 희석액을 사용하였다. g. YW327.6S2는 종양-연관 대식세포로부터의 염증성 시토카인/케모카인 분비를 억제한다. MDA-MB231 이종이식 종양 (평균 크기 500 mm³)을 보유하는 마우스를 대조군 항체, YW327.6S2 또는 12A11로 20 mg/kg에서 처리하고, 종양을 1주 처리 후에 절제하였다. 종양 연관 대식세포를 F4/80 양성 세포에 대해 분류함으로써 단리하고, 밤새 배양하였다. 배지로 분비된 시토카인 및 케모카인은 바이오-플렉스(Bio-Plex) 마우스 시토카인 검정 키트를 이용하여 측정하였다.

도 11a-b: YW327.6S2는 MDA-MB-231 유방암 세포의 골로의 전이를 감소시킨다. a. 종양 세포의 꼬리정맥 주사 4주 후의 생물발광 영상화. 마우스에게 PBS 중 25 mg/ml D-루시페린 (인비트로젠(Invitrogen)) 200 μL를 복강내 (i.p.) 주사하고, 노즈 콘을 통해 이소플루란을 이용하여 영상화 동안 마취시켰다. 생물발광 영상은 강화 전하-커플링 장치 카메라를 갖는 광자 영상화기 (바이오스페이스 랩(Biospace Lab), 프랑스 파리) 상에서 획득하였다. b. 경골 절편의 H & E 염색. 조직을 실험 종료시에 수집하고, 4% 포르말데히드에 고정시키고, 절개하고, H & E로 염색하였다. 상부 패널 내의 원은 골을 침습한 종양 세포를 보여준다. 하부 패널은 골수에서 신생물성 세포를 상세하게 보여준다.

도 12: RefSeq NM_001699의 예시적인 인간 Ax1 서열. (서열 165).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] <본 발명의 실시양태의 상세한 설명>

[0057] I. 정의

[0058] 본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같이 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 프레임워크"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.

[0059] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이 "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 (Kd)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된

방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 예시적 및 대표적 실시양태를 하기 기재한다.

- [0060] "친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는 변경을 갖지 않는 모 항체에 비해 하나 이상의 초가변 영역 (HVR) 내의 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭한다.
- [0061] "혈관신생 장애"는 비-신생물성 및 신생물성 상태 둘 다를 포함하여, 혈관신생의 임의의 조절이상을 지칭한다. 신생물성 상태는 하기 기재된 것들 (예를 들어, "암" 참조)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 비-신생물성 장애는 바람직하지 못하거나 또는 이상 비대증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 판상 건선, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화관, 당뇨병성 및 다른 증식성 망막병증 (미숙아 망막병증 포함), 수정체후 섬유증식증, 신생혈관 녹내장, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관화, 각막 이식 신생혈관화, 각막 이식편 거부, 망막/맥락막 신생혈관화, 각 신생혈관화 (피부홍조), 안구 신생혈관 질환, 혈관 재협착, 동맥벽 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 증식증 (그레이브스병 포함), 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 졸중/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련됨), 활막 염증, RA에서의 판누스 형성, 골화성 근염, 비후성 골 형성, 골관절염 (OA), 불응성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3 공간의 체액 질환 (뇌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 유섬유종, 조속 산통, 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 궤양성 결장염), 신장 동종이식 거부, 염증성 장 질환, 신증후군, 바람직하지 않은 또는 이상 조직 덩어리 성장 (비-암), 혈우병성 관절, 비후성 반흔, 모발 성장의 억제, 오슬러-웨버 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 심낭 삼출 (예컨대, 심막염과 연관된 것) 및 흉막 삼출을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0062] "항혈관신생제"는 혈관 발생을 어느 정도 차단 또는 방해하는 화합물을 지칭한다. 항혈관신생제는 예를 들어 혈관신생 촉진에 관여하는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체에 결합하는 소분자 또는 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항혈관형성제는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 결합하는 항체, 예컨대 베바시주맙 (아바스틴 (AVASTIN)[®])이다.
- [0063] 용어 "항-Ax1 항체" 및 "Ax1에 결합하는 항체"는 항체가 Ax1을 표적화하는데 있어 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 Ax1에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 관련되지 않은 비-Ax1 단백질에의 항-Ax1 항체의 결합의 정도는 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 Ax1에의 상기 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, Ax1에 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-Ax1 항체는 상이한 종류로부터의 Ax1 사이에 보존된 Ax1의 에피토프에 결합한다.
- [0064] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 바람직한 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다.
- [0065] "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 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 참조 항체로서 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 항체, 및 반대로 경쟁 검정에서 항체가 그의 항원에 결합하는 것을 50% 이상 차단하는 참조 항체를 지칭한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.
- [0067] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "Ax1"은 달리 나타내지 않는 한 영장류 (예를 들어, 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 Ax1을 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱된 Ax1 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 형태의 Ax1을 포함한다. 상기 용어는 또한 Ax1의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포함한다. 예시적인 인간 Ax1의 아미노산 서열은 도 12에 제시된다.
- [0068] "Ax1 활성화"는 Ax1 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로, Ax1 활성화는 신호 전달 (예를 들어, Ax1 또는 기질 폴리펩티드에서 티로신 잔기를 인산화하는 Ax1 수용체의 세포내 키나제 도메인에 의해 일어

남)을 일으킨다. Ax1 활성화는 관심 Ax1 수용체에의 Ax1 리간드 (Gas6) 결합에 의해 매개될 수 있다. Ax1에 결합하는 Gas6은 Ax1의 키나제 도메인을 활성화하고, 이에 의해 Ax1에서 티로신 잔기의 인산화 및/또는 추가의 기질 폴리펩티드(들)에서 티로신 잔기의 인산화가 일어날 수 있다.

[0069] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성암, 위장암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프구증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0070] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 이상 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0071] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테라 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)[®]); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)[®]); 베타-라파콘; 라파롤; 콜치신; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)[®]), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)[®]), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스펜지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가1I (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 다이네미신 (다이네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네디인 항생 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®]), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사(독실(DOXIL)[®]), 리포솜 독소루비신 TLC D-99(미오세트(MYOCET)[®]), PEG화 리포솜 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX)[®]) 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토타렉세이트, 잼시타빈 (잼자르(GEMZAR)[®]), 테가푸르(우프트랄(UFTORAL)[®]), 카페시타빈(젤로다(XELODA)[®]), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토타렉세이트, 프테로프테린, 트리메타렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토포린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이신; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미도신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론;

2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; 트리카테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)[®], 필데신(FILDESIN)[®]); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테과; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)[®]); 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)[™]), 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)[®]); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토프린; 메토티렉세이트; 백금 제제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)[®]) 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)[®]), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)[®]), 빈데신 (엘디신[®], 필데신[®]), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)[®])을 포함하여, 튜블린 중합이 미세소관을 형성하는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토코산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산 (백사로텐 (타르그레틴(TARGRETIN)[®]) 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)[®] 또는 오스탁(OSTAC)[®]), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)[®]), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)[®]), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)[®]), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)[®]), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)[®]), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)[®]); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)[®] 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)[®] 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)[®] 백신, 및 백신(VAXID)[®] 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTEKAN)[®]); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)[®]); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트(SUTENT)[®], 화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레코시브 또는 에토리코시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조미 (벨케이드(VELCADE)[®]); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리머센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)[®]); 픽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제(하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮌(RAPAMUNE)[®]); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)[™]); 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴[™])을 이용한 치료 요법에 대한 약어)를 포함한다.

[0072]

본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬 작용제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)[®]), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)[®]), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)[®]), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절자 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 폴베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)[®]) 및 EM800 (이같은 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 저해할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)[®]), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)[®]), 레트로졸 (페마라(FEMARA)[®]) 및 아미노글루테티미드, 및 다른 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)[®]), 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)[®]), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예

를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)[®]) 및 엘리가드(ELIGARD)[®]), 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스틴, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스트론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 및 안드로젠/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산 및 펜레티나이드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로젠, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2 종 이상의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0073] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 다른 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0074] 항체의 "클래스"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5가지 주요 클래스의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 지칭된다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 수용체 키나제 활성화에 적용되는 바와 같은 용어 "구성적"은 리간드 또는 다른 활성화 분자의 존재에 좌우되지 않는 수용체의 지속적인 신호전달 활성을 지칭한다. 수용체의 특성에 따라, 모든 활성이 구성적일 수 있거나 또는 수용체의 활성이 다른 분자 (예를 들어, 리간드)의 결합에 의해 추가로 활성화될 수 있다. 수용체의 활성화로 이어지는 세포 사건이 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 활성화는 더 높은 차수의 수용체 복합체로의 올리고머화, 예를 들어 이량체화, 삼량체화 등을 포함할 수 있다. 복합체는 단일 종의 단백질을 포함할 수 있고, 즉 동종체성 복합체일 수 있다. 대안적으로, 복합체는 적어도 2 종의 상이한 단백질 종을 포함할 수 있고, 즉 이종체성 복합체일 수 있다. 예를 들어, 세포 표면 상에서의 정상 형태 또는 돌연변이체 형태의 수용체의 과다발현에 의해 복합체 형성이 일어날 수 있다. 또한 수용체 내의 특정 돌연변이 또는 돌연변이들에 의해 복합체 형성이 일어날 수 있다.

[0076] 용어 "세포증식억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 성장을 정지시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 세포증식억제제는 S 기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 세포증식억제제의 추가의 예는 G0/G1 정지 또는 M-기 정지를 유도함으로써 세포 주기 진행을 차단하는 작용제를 포함한다. 인간화 항-Her2 항체 트라스투주맵 (헤르셉틴[®])은 G0/G1 정지를 유도하는 세포증식억제제의 예이다. 전통적인 M-기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 특정 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), e.g., p. 13]에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목 나무로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레 (TAXOTERE)[®], 룽-프랑 로리(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)[®], 브리스톨-마이어스 스퀴프 (Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 일으킨다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "세포독성제"는 세포 기능의 억제 또는 저해 및/또는 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, ⁹⁰Y, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함); 및 하기 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0078] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에 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 포함

한다.

- [0079] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 바람직한 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다.
- [0080] 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 카복실-말단으로 신장된다. 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 같이 EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.
- [0081] "프레임워크" 또는 "FR"은 추가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 하기 FR 도메인으로 이루어진다: FR1, FR2, FR3 및 FR4. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.
- [0082] 용어 "전장 항체", "무순상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되며, 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에서 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0083] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 1차 형질전환된 세포 및 계대배양 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으나, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택되는 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.
- [0084] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하거나, 또는 인간 항체 펩티드 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 이용하여 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 배제된다.
- [0085] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 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 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0086] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 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.
- [0087] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "추가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 추가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프 ("추가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 하기 6개의 HVR을 포함한다: VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3). HVR은 일반적으로 추가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 변동성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 추가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). 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 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

- [0088] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 이중 분자(들)에 접합된 항체이다.
- [0089] "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 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0090] "세포 성장 또는 증식을 억제하는"은 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸의 유도를 포함한다.
- [0091] "단리된" 항체는 그의 천연 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 의해 결정된 바와 같이 95% 또는 99% 초과로 순도로 정제한다. 항체 순도의 평가 방법의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.
- [0092] "단리된" 핵산은 그의 천연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유되는 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0093] "항-Ax1 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 별도의 벡터 내의 이러한 분자(들) 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.
- [0094] 본원에 사용된 바와 같이, 예를 들어 수용체 신호전달 활성화에 적용되는 바와 같은 용어 "리간드-비의존성"은 리간드의 존재에 좌우되지 않는 신호전달 활성을 지칭한다. 리간드-비의존성 키나제 활성을 갖는 수용체는 이러한 수용체에 리간드가 결합하여 키나제 활성의 추가의 활성화를 생산하는 것을 반드시 배제하지는 않을 것이다.
- [0095] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하기 위해 사용되고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조할 수 있고, 상기 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다.
- [0096] "네이키드 항체"는 이중 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.
- [0097] "천연 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종사량체 단량단백질이다. N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) (또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) (또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다.
- [0098] 용어 "포장 삽입물"은 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기사항, 및/또는 이러한 치료 제품의 사용에 대한 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭하기 위해

사용된다.

- [0099] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"는 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성 퍼센트 달성을 위해 갭을 도입한 후 임의의 보전적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열 정렬에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네펜테크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네펜테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 시스템에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.
- [0100] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:
- [0101] X/Y 의 분율 x 100
- [0102] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 상기 단락에 기재한 바와 같이 수득한다.
- [0103] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태로 존재하며, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0104] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 다른 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본원에 사용된 바와 같이 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 개입을 지칭하고, 임상적 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 호전, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이의 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다.
- [0106] 용어 "종양"은 악성이든 또는 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0107] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에의 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 초가변 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 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et

al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "백터"는 그 백터가 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라 백터가 그 내부로 도입된 숙주 세포의 계승 내로 통합되는 백터를 포함한다. 특정 백터는 그 백터가 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.

[0109] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열

122)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 123)-H2-

RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 124)-H3-WGQGLTVTVSS (서열

125).

[0110] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 하기 서열 각각의 적어도 일부 또는 모두를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (서열

126)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 127)-L2-

GVPSRFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC (서열 128)-L3-FGQGTKVEIK (서열

129).

[0111] II. 조성물 및 방법

[0112] 한 측면에서, 본 발명은 부분적으로 다양한 Ax1 결합제 (예컨대, 항체 및 그의 단편)의 확인을 기반으로 한다. Ax1은 중요하고 이로운 치료 표적을 제시하고, 본 발명은 Ax1에의 작용제의 결합을 기반으로 하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이 본 발명의 Ax1 결합제는 Ax1 신호전달 경로의 발현 및/또는 활성화와 연관된 병리학적 상태를 표적화하는데 사용하기 위한 중요한 치료제 및 진단제를 제공한다. 특정 실시양태에서, Ax1에 결합하는 항체가 제공된다. 본 발명의 항체는 예를 들어 암의 진단 또는 치료에 유용하다.

[0113] A. 예시적인 항-Ax1 항체

[0114] 한 측면에서, 본 발명은 Ax1에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 인간 Ax1에 ≤ 1 nM의 친화도로 결합하고, 일부 실시양태에서 마우스 Ax1에 ≤ 550 pM의 친화도로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 인간 및 마우스 Ax1에 결합한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 세포 표면 (예를 들어, 종양 세포 표면) 상의 Ax1 수용체 발현의 하향조절을 유도한다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 Ax1 발현은 Ax1 항체 치료의 부재 하의 Ax1 세포 표면 발현의 80% 미만으로 감소한다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 발현은 Ax1 항체 치료의 부재 하의 Ax1 세포 표면 발현의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만 또는 40% 미만으로 감소한다. 일부 실시양태에서, 세포 (예를 들어, 종양 세포)에서의 전체 Ax1 발현은 Ax1 항체 치료의 부재 하의 전체 Ax1 발현의 80% 미만으로 감소한다. 일부 실시양태에서, 전체 Ax1 발현은 Ax1 항체 치료의 부재 하의 전체 Ax1 발현의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만 또는 40% 미만으로 감소한다. 일부 실시양태에서, Ax1 발현의 하향조절은 신속하게 일어나고, 적어도 24시간 동안 지속된다.

[0116] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 구성적 Ax1 활성을 억제한다.

[0117] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Sky 또는 Mer 과 유의하게 교차반응하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Sky 또는 Mer에 유의하게 결합하지 않고, 인간 및 마우스 Ax1에 결합한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Ax1 활성을 억제한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 세포, 예를 들어 종양 세포, 예컨대 A549 종양 세포의 아포토시스를 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Ax1에의 Ax1 리간드 (예를 들어, Gas6) 결합을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Ax1 하류 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Gas-6 의존성 세포 증식을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 종양-연관 대식세포로부터의 염증성 시토카인 발현을 억

제한다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 종양 기질 기능을 조절함으로써 종양 성장 및/또는 전이를 억제한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQ
LQVQGEPPVHWRDLRDLGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQC
LVFLGHQTFVSPGYVG (서열 111).

[0121]

[0122] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다:

ITVLPQQPRNHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEP
DPPEEPLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (서열 130).

[0123]

[0124] 일부 실시양태에서, 항체는 성숙한 인간 Ax1 아미노산 서열의 아미노산 번호 1-122를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다.

[0125] 일부 실시양태에서, 항체는 성숙한 인간 Ax1 아미노산 서열의 아미노산 번호 221-234를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 폴리펩티드에 결합한다.

[0126] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 하기 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열에 결합한다:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQ
LQVQGEPPVHWRDLRDLGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQC
LVFLGHQTFVSPGYVG (서열 111).

[0127]

[0128] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 하기 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 98%의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열에 결합한다:

ITVLPQQPRNHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEE
PLTSQASVPPHQLRGLSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (서열 130).

[0129]

[0130] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0131] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0132] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 14의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0133] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 19의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 20의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 23의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 24의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-Ax1 항체를 제공한다.

[0134] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 25의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 27의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 28의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 30의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로

- [0215] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 74의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 75의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 76의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 78의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0216] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 79의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 80의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0217] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0218] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0219] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0220] 특정 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항-Ax1 항체의 임의의 하나 이상의 아미노산은 하기 HVR 위치에서 치환되거나 또는 부재한다:
- [0221] - HVR-H1 (서열 7)에서: 위치 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10;
- [0222] - HVR-H2 (서열 8)에서: 위치 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 및 10;
- [0223] - HVR-H3 (서열 9)에서: 위치 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15;
- [0224] - HVR-L1 (서열 10)에서: 위치 5, 6, 7, 8, 9 및 10;
- [0225] - HVR-L2 (서열 11)에서: 위치 1, 4 및 6;
- [0226] - HVR-L3 (서열 12)에서: 위치 3, 4, 5, 6, 7 및 8.
- [0227] 특정 실시양태에서, 치환은 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환이다. 특정 실시양태에서, 하기 치환 중 임의의 하나 이상은 임의의 조합으로 이루어질 수 있다:
- [0228] - HVR-H1 (서열 7)에서: S28T; L29F 또는 V; S30T 또는 R; G31S; S32H, T 또는 I; W33G; I34L;
- [0229] - HVR-H2 (서열 8)에서: G49A; W50G; N52S, A, 또는 P; Y53A 또는 V; R54G 또는 S; G55S 또는 R; Y56S 또는 H; A57T 또는 P;
- [0230] - HVR-H3 (서열 9)에서: E95W; Y96R; S97N 또는 P; G98D 또는 L; W99S; G100R, A, 또는 S; G100aS; S100b 부재함; S100cY 또는 부재함; V100dI 또는 부재함; G100e 또는 부재함; Y100f 또는 부재함, A100gE 또는 부재함;
- [0231] - HVR-L1 (서열 10)에서: D28I 또는 S; V29I; S30G 또는 R; T31I, N 또는 R; A32S; V33L;
- [0232] - HVR-L2 (서열 11)에서: S50A 또는 V; F53N 또는 S; Y55A;
- [0233] - HVR-L3 (서열 12)에서: S91A; Y92K 또는 N; T93S, Y, M, R, 또는 A; T94N, F, 또는 S; P95R; P96Y, S, 또는 L.
- [0234] 특정 실시양태에서, 하기 치환 중 임의의 하나 이상은 임의의 조합으로 이루어질 수 있다:
- [0235] - HVR-H1 (서열 7)에서: S28T; L29F 또는 V; S30T; G31S; S32H, T 또는 I;
- [0236] - HVR-H2 (서열 8)에서: N52S, 또는 A; R54G 또는 S; G55R; Y56S, 또는 H; A57T 또는 P;

- [0237] - HVR-H3 (서열 9)에서: S97N 또는 P; G98D; G100S;
- [0238] - HVR-L3 (서열 12)에서: T93S, 또는 Y; T94N, F, 또는 S.
- [0239] 상기 치환의 모든 가능한 조합은 컨센서스 서열에 의해 포함된다:
- [0240] - HVR-H1 (서열 112)에서: GFX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇H (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 L, F 또는 V이고; X₃은 S, T 또는 R이고; X₄는 G 또는 S이고; X₅는 S, H, T 또는 I이고; X₆은 W 또는 G이고; X₇은 I 또는 L임);
- [0241] - HVR-H2 (서열 113)에서: X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈YYADSVKG (여기서, X₁은 G 또는 A이고; X₂는 W 또는 G이고; X₃은 N, S, A 또는 P이고; X₄는 Y, A 또는 V이고; X₅는 R, G 또는 S이고; X₆은 G, R 또는 S이고; X₇은 Y, S, H 또는 Y이고; X₈은 A, T 또는 P임); 및/또는 (서열 166)에서: X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈ X₉X₁₀YYADSVKG (여기서, X₁은 G 또는 A이고; X₂는 W 또는 G이고; X₃은 N, S, A 또는 P이고; X₄는 Y, A 또는 V이고; X₅는 R, G 또는 S이고; X₆은 G, R 또는 S이고; X₇은 Y, S, H 또는 Y이고; X₈은 A, T 또는 P이고; X₉는 임의의 아미노산이거나 또는 부재하고; X₁₀은 임의의 아미노산이거나 또는 부재함);
- [0242] - HVR-H3 (서열 114)에서: ARX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃MDY (여기서, X₁은 E 또는 W이고; X₂는 Y 또는 R이고; X₃은 S, N 또는 P이고; X₄는 G, D 또는 L; X₅는 W 또는 S이고; X₆은 G, R, A 또는 S이고; X₇은 G 또는 S이고; X₈은 S이거나 또는 부재하고; X₉는 S, Y이거나 또는 부재하고; X₁₀은 V, I이거나 또는 부재하고; X₁₁은 G이거나 또는 부재하고; X₁₂는 Y이거나 또는 부재하고, X₁₃은 A, E이거나 또는 부재함);
- [0243] - HVR-L1 (서열 115)에서: RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A (여기서, X₁은 D, I 또는 S이고; X₂는 V 또는 I이고; X₃은 S, G 또는 R이고; X₄는 T, I, N 또는 R이고; X₅는 A 또는 S이고; X₆은 V 또는 L임);
- [0244] - HVR-L2 (서열 116)에서: X₁ASX₂LX₃S (여기서, X₁은 S, A 또는 V이고; X₂는 F, N 또는 S이고; X₃은 Y 또는 A임);
- [0245] - HVR-L3 (서열 117)에서: QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T (여기서, X₁은 S 또는 A이고; X₂는 Y, K 또는 N이고; X₃은 T, S, Y, M, R 또는 A이고; X₄는 T, N, S 또는 F이고; X₅는 P 또는 R이고; X₆은 P, Y, S 또는 L임).
- [0246] 일부 실시양태에서, 하기 컨센서스 서열이 제공된다:
- [0247] - HVR-H1 (서열 118)에서: GFX₁X₂X₃GX₄WIH (여기서, X₁은 T 또는 S이고, X₂는 F 또는 L이고, X₃은 T 또는 S이고, X₄는 H, S 또는 T임);
- [0248] - HVR-H2 (서열 119)에서: GWIX₁PYX₂X₃X₄X₅YYADSVKG (여기서, X₁은 S, N 또는 A이고; X₂는 G, R 또는 S이고; X₃은 G 또는 R이고; X₄는 S, Y 또는 H이고; X₅는 T, A 또는 P임);
- [0249] - HVR-H3 (서열 120)에서: AREYX₁X₂WX₃X₄SX₅X₆GYX₇MDY (여기서, X₁은 S, N 또는 P이고; X₂는 G 또는 D이고; X₃은 G, R 또는 A이고; X₄는 G 또는 S이고; X₅는 S 또는 Y이고; X₆은 V 또는 I이고; X₇은 A 또는 E임);
- [0250] - HVR-L3 (서열 121)에서: QQS₁YX₂X₃X₄T (여기서, X₁은 T, S 또는 Y이고; X₂는 T, N, S 또는 F이고; X₃은 P 또는 R이고; X₄는 P, Y 또는 S임).
- [0251] 또 다른 측면에서, 항-Ax1 항체는 서열 103, 105, 107 또는 109의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-Ax1 항체는 Ax1에 결합하는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 서열 103, 105, 107 또는 109에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-Ax1 항체는 서열 103, 105, 107 또는 109의 VH 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43,

49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91 또는 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92 또는 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93 또는 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0252] 또 다른 측면에서, 서열 104, 106, 108 또는 110의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-Ax1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 이 서열을 포함하는 항-Ax1 항체는 Ax1에 결합하는 능력을 유지한다. 특정 실시양태에서, 서열 104, 106, 108 또는 110에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR의 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-Ax1 항체는 서열 104, 106, 108 또는 110의 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94 또는 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 77, 83, 89, 95 또는 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96 또는 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0253] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH를 포함하는 항-Ax1 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 VL을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 103의 VH 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 105의 VH 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 107의 VH 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 109의 VH 서열을 포함한다.

[0254] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-Ax1 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 VH를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 104의 VL 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 106의 VL 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 108의 VL 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 110의 VL 서열을 포함한다.

[0255] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는 항-Ax1 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 103 및 서열 104의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 105 및 서열 106의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 107 및 서열 108의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함). 한 실시양태에서, 항체는 각각 서열 109 및 서열 110의 VH 및 VL 서열을 포함한다 (이들 서열의 번역후 변형 포함).

[0256] 본 발명의 항체는 Ax1에의 결합 활성이 실질적으로 유지되는 한 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 본 발명의 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나 73은 T이고/거나 78은 A이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (헤르셉틴[®], 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 번호 6,407,213 및 5,821,337, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에 언급됨)의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 특정한 실시양태에서, 이들 항체는 미국 특허 번호 6,407,213 및 5,821,337에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-8의 경쇄 HVR 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (헤르셉틴[®], 제넨테크, 인크., 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코) (또한, 미국 특허 번호 6,407,213 및 5,821,337, 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에 언급됨)의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 임의의 상기 실시양태에서와 같은 HVR을 포함하고, 도 2, 3a-b, 4, 5 또는 6에 제시된 FR1, FR2, FR3 또는 FR4 서열을 포함하는 VH 및/또는 VL을 추가로 포함한다.

- [0257] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 항-Ax1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 서열 103의 VH 서열 및 서열 104의 VL 서열을 포함하는 항-Ax1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 서열 107의 VH 서열 및 서열 108의 VL 서열을 포함하는 항-Ax1 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 아미노산
MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPNITGARGLTGTLRCQ
LQVQGEPEVHWLRDQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQC
LVFLGHQTFVVSQPGYVG (서열 111) 로 이루어진 Ax1의 단편 내의 에피
토프에 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 아미노산
ITVLPQQRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEE
PLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPHYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (서열 130) 로 이루어진 Ax1의 단편 내의 에피
토프에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0258] 추가 측면에서, 본 발명은 서열 103의 VH 서열 및 서열 104의 VL 서열을 포함하는 항-Ax1 항체와 인간 Ax1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 서열 107의 VH 서열 및 서열 108의 VL 서열을 포함하는 항-Ax1 항체와 인간 Ax1에의 결합에 대해 경쟁하는 항체가 제공된다.
- [0259] 본 발명의 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-Ax1 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체를 포함하는 모노클로날 항체이다. 한 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 디아바디 또는 F(ab')₂ 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전장 항체, 예를 들어 무손상 IgG 항체 또는 본원에 정의된 바와 같은 다른 항체 클래스 또는 이소형이다.
- [0260] 추가 측면에서, 임의의 상기 실시양태에 따른 항-Ax1 항체는 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같은 임의의 특징을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다:
- [0261] 1. 항체 친화도
- [0262] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 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.
- [0263] 한 실시양태에서, Kd는 하기 검정에서 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 비표지 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 Fab를 최소 농도의 (¹²⁵I)-표지 항원과 평형화시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-코팅된 플레이트로 포획함으로써 측정된다 (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 $\mu\text{g/ml}$ 의 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 차단하였다. 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 시간 (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(TWEEN-20)[®])으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (마이크로신티-20(MICROSCINT-20)[™]; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)[™] 감마 계수기 (팩커드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다.
- [0264] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 예를 들어 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정화된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어[®]-2000 또는 비아코어[®]-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이

드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 µg/mL (약 0.2 µM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 µl/분의 유량으로 주사한다. 항원 주사 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 µl/분의 유량으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 회합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅시켜 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면-플라즈몬 공명 검정에 의한 온-레이트가 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과하는 경우, 온-레이트는 분광측정계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(SLM-AMINCO)™ 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm, 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 쉐킹 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0265] 2. 항체 단편

[0266] 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 제한되지 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)]; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 샬비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0267] 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.

[0268] 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 월섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0269] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같은 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 재조합 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이 또는 파지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0270] 3. 키메라 및 인간화 항체

[0271] 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 클래스 또는 서브클래스가 모 항체의 것으로부터 변화된 "클래스 스위칭" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0272] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성이 감소하도록 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 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 향상시키기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0273] 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; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (SDR (a-CDR) 그래프팅 기재); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("리서페이싱" 기재); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 서플링" 기재); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 서플링에 대한 "가이드 선택" 접근법 기재)에 추가로 기재되어 있다.

[0274] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 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 제한되지 않는다.

[0275] 4. 인간 항체

[0276] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생성될 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.

[0277] 인간 항체는 항원 접중에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 로커스를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 로커스의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 로커스는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 (제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술 기재); 미국 특허 번호 5,770,429 (HuMab[®] 기술 기재); 미국 특허 번호 7,041,870 (K-M 마우스(K-M MOUSE)[®] 기술 기재), 및 미국 특허 출원 공보 번호 US 2007/0061900 (벨로시마우스(VelociMouse)[®] 기술 기재)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0278] 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.) 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체가 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 항체 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 & Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods & Findings in Exp. & Clin. Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0279] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기 기재된다.

[0280] 5. 라이브러리-유래 항체

[0281] 본 발명의 항체는 바람직한 활성을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 바람직한 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 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)]에서 검토되고, 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.

[0282] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 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 필요 없이 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-자가 및 또한 자가 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 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 공보는 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공보 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0283] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 여겨진다.

[0284] 6. 다중특이적 항체

[0285] 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 Ax1에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Ax1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 Ax1을 발현하는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0286] 다중특이적 항체를 제조하기 위한 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(knob-in-hole)" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이중이량체 분자를 제조하기 위한 정전기 스테어링 효과의 조작 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편의 가교 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위한 유신 지퍼의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 "디아바디" 기술의 사용 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체의 사용 (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 같은 삼중특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다

[0287] "옥토퍼스 항체"를 포함하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0288] 본원의 항체 또는 단편은 또한 Ax1 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAB" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0289] 7. 항체 변이체

[0290] 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 코

당하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 바람직한 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유하도록, 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다.

[0291] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0292] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "보존적 치환"의 표제 하에 표 1에 제시된다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제 하의 표 1에 아미노산 측쇄 클래스에 관하여 하기 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 바람직한 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.

표 1

본래 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

[0293]

[0294] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0295] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0296] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0297] (3) 산성: Asp, Glu;

[0298] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0299] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0300] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0301] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0302] 치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를

치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 상승된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 이용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 하나 이상의 HVR 잔기가 돌연변이화되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0303] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선시키기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008) 참조), 및/또는 SDR (a-CDR) 동안 결합 친화도에 대해 시험된 생성된 변이체 VH 또는 VL로 높은 빈도에서 돌연변이화를 수행하는 코돈에 의해 코딩되는 잔기에서 이루어질 수 있다. 2차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 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 올리고뉴클레오티드-유도된 돌연변이유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 항체를 생성한다. 이어서, 바람직한 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인하게 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 다양성을 도입하는 다른 방법은 HVR-지시된 접근법과 연관되며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합과 연관된 HVR 잔기는 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이유발 또는 모델링을 이용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0304] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 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. 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0305] 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"이라고 지칭된다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하진된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하진된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성을 입증하는 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 바람직한 특성을 함유하는지 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0306] 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 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0307] b) 글리코실화 변이체

[0308] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0309] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 이분지 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 시알산 뿐만 아니라 이분지 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

- [0310] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결핍된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 고만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 나타내지만; Asn297은 또한 항체의 부가적 서열 변이에 의해 위치 297의 약 ±3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫꼬 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 문헌의 예는 하기를 포함한다: 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)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [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 11)), 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.
- [0311] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이분지 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 푸코실화가 감소될 수 있고/거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 하나의 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.
- [0312] c) Fc 영역 변이체
- [0313] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 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.
- [0314] 특정 실시양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하고 있으므로, 생체내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합이 결핍되어 있지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결핍될 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포상에서의 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 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) 및 Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)] 참조); 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토독스(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 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고, 따라서 CDC 활성이 결핍되었는지를 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 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 제거율/반감기 결정은 또한 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0315] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에 치환을 갖는 Fc 돌연변이체 (잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는, 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 포함)를 포함한다 (미국 특허 번호 7,332,581).

[0316] FcR에 대해 개선되거나 또는 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재된다. (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.)

[0317] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0318] 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 나타내는 변경들이 Fc 영역에서 만들어진다.

[0319] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]에의 개선된 결합을 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에의 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 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 하나 이상에서의 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).

[0320] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 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.

[0321] d) 시스테인 조작된 항체 변이체

[0322] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오MAb"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 하나 이상의 하기 잔기가 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.

[0323] e) 항체 유도체

[0324] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되고 쉽게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 잔기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 고려사항을 기반으로

결정될 수 있다.

- [0325] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 집합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 과정을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0326] B. 재조합 방법 및 조성물
- [0327] 항체는 재조합 방법 및 조성물을 이용하여, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Ax1 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 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 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 제 1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제 2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질감염됨). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, YO, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기에 제공된 바와 같은 항-Ax1 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는 항-Ax1 항체를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0328] 항-Ax1 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상적인 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것에 의함).
- [0329] 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 않을 경우, 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. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 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.
- [0330] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 포함하는 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.
- [0331] 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.
- [0332] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 이용할 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.
- [0333] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합한 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 문

헌 [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 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (문헌 [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.

- [0334] C. 검정
- [0335] 본원에 제공된 항-Ax1 항체는 당업계에서 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.
- [0336] 1. 결합 검정 및 다른 검정
- [0337] 한 측면에서, 본 발명의 항체를 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법으로 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다.
- [0338] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정을 이용하여 Ax1에의 결합에 대해 항체 327.6, 327.6.S2, 327.6.S11, 327.6.S50, 327.6.S52, 327.6.S65, 327.42, 327.42.S8, 327.42.S31, 327.42.S13, 327.42.S43, 327.42.S52, 327.42.S63, 327.42.S73, 327.42.H2, 327.42.H4 및/또는 327.42.H20 중 하나 이상과 경쟁하는 항체를 확인할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 327.6, 327.6.S2, 327.6.S11, 327.6.S50, 327.6.S52, 327.6.S65, 327.42, 327.42.S8, 327.42.S31, 327.42.S13, 327.42.S43, 327.42.S52, 327.42.S63, 327.42.S73, 327.42.H2, 327.42.H4 및/또는 327.42.H20에 의해 결합된 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 예시적인 방법의 상세내용은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공된다.
- [0339] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 Ax1을 Ax1에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 327.6, 327.6.S2, 327.6.S11, 327.6.S50, 327.6.S52, 327.6.S65, 327.42, 327.42.S8, 327.42.S31, 327.42.S13, 327.42.S43, 327.42.S52, 327.42.S63, 327.42.S73, 327.42.H2, 327.42.H4 및/또는 327.42.H20) 및 Ax1에의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 Ax1을 제1 표지된 항체를 포함하고 제2 비표지된 항체를 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션한다. Ax1에의 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후, 잉여량의 미결합 항체를 제거하고, 고정화된 Ax1과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정화된 Ax1과 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이것은 제2 항체가 Ax1에의 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.
- [0340] 2. 활성 검정
- [0341] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 그의 항-Ax1 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 Ax1에의 Gas6 결합의 억제, Ax1 활성화의 억제, Ax1 하류 분자 신호전달의 억제, Ax1 발현 (예를 들어, 세포, 예컨대 종양 세포에서의 Ax1 세포 표면 발현 또는 전체 Ax1 발현)의 억제, 염증성 시토카인 분비의 억제, 아폽토시스의 촉진 (예를 들어, 아폽토시스의 Gas6-매개 억제의 억제에 의함), 종양내 혈관계의 억제, 종양 기질 Ax1 활성 및/또는 발현의 억제 및/또는 전이의 억제를 포함할 수 있다. 이러한 생물학적 활성을 생체내 및/또는 시험관내에서 갖는 항체가 또한 제공된다.
- [0342] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 항체는 시험관내에서 아폽토시스 (예를 들어, 종양 세포의 아폽토시스)를 촉진하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 성장 및/또는 증식 및/또는 아폽토시스를 결정하기 위한 예시적인 방법은 예를 들어 BrdU 혼입 검정, MTT, [3H]-티미딘 혼입 (예를 들어, 탐카운트 검정 (퍼킨엘머(PerkinElmer))), 세포 생존율 검정 (예를 들어, 셀타이터-글로 (프로메가)), DNA 단편화 검정, 카스파제 활성화 검정, 트립탄 블루 배제, 염색질 형태학 검정 등을 포함한다.
- [0343] 특정 실시양태에서, 항체는 예를 들어 본원에 기재되고 예시된 방법을 이용하여 Ax1 발현의 억제에 대해 시험된다. 한 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 적합한 시험 세포, 예를 들어 NSCLC 세포 A549와 인큐베이션하고, 적합한 기간 후에, 세포 용해물을 수확하고 전체 Ax1 수준에 대해 조사한다. FACS 분석은 또한 후보 항-Ax1 항체와 인

큐베이션한 후에 표면 Ax1 수용체 수준을 조사하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 종양 샘플은 항-Ax1 항체로의 처리 후에 Ax1 발현에 대해 조사된다.

- [0344] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 본원에 기재되고 예시된 바와 같이 염증성 시토카인 분비를 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다.
- [0345] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 본원에 예시된 바와 같이 종양내 혈관계를 감소시키고/거나 종양 기질 Ax1 활성화 및/또는 발현을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 일부 실시양태에서, 종양 기질 Ax1 활성화는 전이 또는 종양내 혈관계의 발생이다.
- [0346] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 성장 또는 증식의 억제에 대한 검정은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본원에 기재된 "세포 사멸" 검정에 의해 예시되는 세포 증식에 대한 특정 검정은 세포 생존율을 측정한다. 한 이러한 검정은 프로메가 (위스콘신주 매디슨)으로부터 상업적으로 입수가 가능한 셀타이터-글로™ 발광 세포 생존율 검정이다. 이 검정은 대사적으로 활성인 세포의 지표인 존재하는 ATP의 정량화를 기반으로 배양액 중의 생존 세포의 수를 결정한다. 문헌 [Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 번호 6602677을 참조한다. 검정은 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있으며, 이는 자동화 고처리량 스크리닝 (HTS)을 용이하게 한다. 문헌 [Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404]을 참조한다. 검정 절차는 배양된 세포에 단일 시약 (셀타이터-글로® 시약)을 직접 첨가하는 것을 포함한다. 이는 세포를 용해시키고, 루시페라제 반응에 의해 생산된 발광 신호를 생성한다. 발광 신호는 존재하는 ATP의 양에 비례하고, 이는 배양액에 존재하는 생존 세포의 수에 정비례한다. 데이터는 발광측정기 또는 CCD 카메라 영상화 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 결과는 상대적 광 단위 (RLU)로 표현된다.
- [0347] 세포 증식에 대한 또 다른 검정은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 검정인 "MTT" 검정이다. 셀타이터-글로™ 검정과 마찬가지로, 상기 검정은 세포 배양액 내에 존재하는 대사적으로 활성인 세포의 수를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, 및 Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882]을 참조한다.
- [0348] 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 Ax1을 발현하거나 또는 Ax1을 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 이러한 세포는 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 Ax1을 과다발현하는 종양 세포를 포함한다. 이러한 세포는 또한 Ax1을 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함) 및 정상적으로 Ax1을 발현하지 않지만 Ax1을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다. 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위해 본원에 제공된 예시적인 세포주는 NSCLC 세포주 A549, NSCLC 세포주 H1299 및 유방암 세포주 MDA-MB231을 포함한다.
- [0349] 한 측면에서, 그의 항-Ax1 항체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 그의 항-Ax1 항체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예컨대 이종이식 모델은 이러한 시험에 사용될 수 있다. 예시적인 이종이식 시스템에서, 인간 종양 세포는 적합하게는 면역손상된 비-인간 동물, 예를 들어, 무흉선 "누드" 마우스에 도입된다. 본 발명의 항체는 동물에 투여된다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체의 능력이 측정된다. 상기 이종이식 시스템의 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이러한 이종이식 모델은 온코테스트 게엠베하(Oncotest GmbH) (독일 프라이베르그)로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 종양 세포주로부터의 세포, 예컨대 MDA-MB-231 유방암 세포 또는 A549 비소세포 폐암 세포이다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 또는 적절한 부위, 예컨대 유방 지방 패드로의 이식에 의해 적합하게 면역손상된 비-인간 동물에 도입된다.
- [0350] 임의의 상기 검정이 항-Ax1 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0351] 임의의 상기 검정이 항-Ax1 항체 및 추가의 치료제, 예컨대 VEGF 길항제 및/또는 EGFR 길항제 및/또는 화학요법제를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0352] D. 면역접합체
- [0353] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질

독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-Ax1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0354] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588 및 7,498,298 참조); 둘라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579 참조); 메토티렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 약물에 접합된 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0355] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그의 단편 (디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지 않음)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함한다.

[0356] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 다시 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0357] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리 아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. W094/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0358] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 상업적으로 입수가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.; 미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교-링커 시약 (BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나 이에 제한되지 않음)으로 제조된 상기 접합체를 명백하게 고려하나 이에 제한되지 않는다.

[0359] E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0360] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-Ax1 항체는 생물학적 샘플에서 Ax1의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "검출"은 정량적 또는 정성적 검출을 포함한다. 특정 실시양태에서,

생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 유방, 췌장, 식도, 폐 및/또는 뇌를 포함한다.

[0361] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-Ax1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 Ax1의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 Ax1에의 본원에 기재된 바와 같은 항-Ax1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 상기 항-Ax1 항체와 접촉시키는 것, 및 항-Ax1 항체와 Ax1 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 예를 들어 Ax1이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 항-Ax1 항체를 사용하는 요법에 적격인 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0362] 본 발명의 항체를 이용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 암 (예를 들어, 유방암, 폐암, 췌장암, 뇌암, 신장암, 난소암, 위암, 백혈병, 자궁 자궁내막암, 결장암, 전립선암, 갑상선암, 간암, 골육종 및/또는 흑색종)을 포함한다.

[0363] 특정 실시양태에서, 표지된 항-Ax1 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H 및 ¹³¹I, 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단질, 움벨리페론, 또는 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 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 유리 라디칼 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0364] F. 제약 제제

[0365] 본원에 기재된 바와 같은 항-Ax1 항체의 제약 제제는 바람직한 정도의 순도를 갖는 이러한 항체를 하나 이상의 임의의 제약상 허용되는 담체 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 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 10 개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산제, 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. 특정 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법 (rHuPH20 포함)은 미국 특허 공보 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된다.

[0366] 예시적인 동결건조된 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.

[0367] 또한, 본원에서 제제는 치료되는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과와 활성 성분, 바람직하게는 서로 유래한 영향을 주지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, EGFR 길항제 (예컨대, 에를로티닙), 항혈관신생제 (예컨대, VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체) 또는 화학요법제 (예컨대, 탁소이드 또는 백금 작용제)를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되

어 적합하게 존재한다.

- [0368] 활성 성분은 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 매크로에멀전에서 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.
- [0369] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.
- [0370] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성할 수 있다.
- [0371] G. 치료 방법 및 조성물
- [0372] 본원에 제공된 임의의 항-Ax1 항체는 치료 방법에 사용될 수 있다.
- [0373] 한 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한 항-Ax1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 암 (예를 들어, 유방암, 비소세포 폐암, 췌장암, 뇌암, 췌장암, 뇌암, 신장암, 난소암, 위암, 백혈병, 자궁 자궁내막암, 결장암, 전립선암, 갑상선암, 간암, 골육종 및/또는 흑색종)을 치료하는데 사용하기 위한 항-Ax1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 치료 방법에 사용하기 위한 항-Ax1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 암을 갖는 개체에게 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-Ax1 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 면역 장애 (예를 들어, 자가면역 장애), 심혈관 장애 (예를 들어, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환 (예를 들어, 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스) 또는 당뇨병을 갖는 개체에게 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 항-Ax1 항체를 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 혈관신생의 억제, 세포 증식의 억제, 면역 기능의 억제, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)의 억제, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계)의 억제 및/또는 종양 기질 기능의 억제에 사용하기 위한 항-Ax1 항체를 제공한다.
- [0374] 특정 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하여 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계) 발생을 억제하고/거나 종양 기질 기능을 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계)를 억제하고/거나 종양 기질 기능을 억제하는 방법에 사용하기 위한 항-Ax1 항체를 제공한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 바람직하게는 인간이다.
- [0375] 추가 측면에서, 본 발명은 의약의 제작 또는 제조에 있어서 항-Ax1 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 의약은 암 (일부 실시양태에서, 유방암, 비소세포 폐암, 췌장암, 뇌암, 췌장암, 뇌암, 신장암, 난소암, 위암, 백혈병, 자궁 자궁내막암, 결장암, 전립선암, 갑상선암, 간암, 골육종 및/또는 흑색종)의 치료를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 암을 갖는 개체에게 유효량의 의약을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 개체에게 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함하는, 면역 장애 (예를 들어, 자가면역 장애), 심혈관 장애 (예를 들어, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환 (예를 들어, 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스) 또는 당뇨병을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 의약은 혈관신생의 억제, 세포 증식의 억제, 면역 기능의 억제, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)의 억제, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계)의 억제 및/또는 종양 기질 기능의 억제를 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 의약은 개체에게 유효량의 의약을 투여하여 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계) 발생을 억제하고/거나

종양 기질 기능을 억제하는 것을 포함하는, 개체에서 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계)를 억제하고/거나 종양 기질 기능을 억제하는 방법에서 사용하기 위한 것이다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0376] 추가 측면에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 이러한 암을 갖는 개체에 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0377] 추가 측면에서, 본 발명은 면역 장애 (예를 들어, 자가면역 장애), 심혈관 장애 (예를 들어, 아테롬성동맥경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환 (예를 들어, 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스) 또는 당뇨병을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 방법은 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제의 유효량을 개체에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 임의의 상기 실시양태에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0378] 추가 측면에서, 본 발명은 개체에서 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계)를 억제하고/거나 종양 기질 기능을 억제하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 개체에 유효량의 항-Ax1 항체를 투여하여 혈관신생을 억제하고/거나, 세포 증식을 억제하고/거나, 면역 기능을 억제하고/거나, 염증성 시토카인 분비 (예를 들어, 종양-연관 대식세포로부터의 분비)를 억제하고/거나, 종양 혈관계 (예를 들어, 종양내 혈관계 또는 종양-연관 혈관계) 발생을 억제하고/거나 종양 기질 기능을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, "개체"는 인간이다.

[0379] 추가 측면에서, 본 발명은 예를 들어 임의의 상기 치료 방법에 사용하기 위한 본원에 제공된 임의의 항-Ax1 항체를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-Ax1 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 제제는 본원에 제공된 임의의 항-Ax1 항체, 및 예를 들어 하기 기재된 바와 같은 적어도 하나의 추가의 치료제를 포함한다.

[0380] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 추가의 치료제와 공동-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 항혈관신생제이다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 VEGF 길항제 (일부 실시양태에서, 항-VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맵)이다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 EGFR 길항제 (일부 실시양태에서, 에를로티닙)이다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제 및/또는 세포증식억제제이다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 탁소이드 (예를 들어, 파클리탁셀) 및/또는 백금 작용제 (예를 들어, 카르보플라티늄)이다.

[0381] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제가 동일한 또는 별개의 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포함하고, 이 경우에 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 수행될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.

[0382] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비내를 포함하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 바람직한 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 다양한 시점에 걸쳐 단일 또는 다중 투여를 비제한적으로 포함하는 다양한 투여 계획으로는 본원에서 볼루스 투여 및 펄스 주입이 고려된다.

[0383] 본 발명의 항체는 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 요인은 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문의에게 공지된 다른 요인을 포함한다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항체는 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인들에 따라 달라진다. 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.

- [0384] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 때)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의해서든 아니면 연속 주입에 의해서든지 상관없이, 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 40 mg/kg 의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 요인에 따라 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상의 바람직한 저해가 일어날 때까지 지속될 것이다. 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 투여됨). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후에 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.
- [0385] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법은 항-Ax1 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0386] H. 제조품
- [0387] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 조성물 자체를 보유하거나 또는 상기 조성물을 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 조합하여 보유하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥주사액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용되는 것을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (이 조성물은 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서의 제조품은, 조성물이 특정한 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 표시하는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정균 주사용수 (BWFI), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.
- [0388] 임의의 상기 제조품이 항-Ax1 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0389] III. 실시예
- [0390] 물질 및 방법
- [0391] **항체 및 세포주.** 항체는 하기 공급업체로부터 획득하였다: 인간 Ax1에 대한 마우스 모노클로날 항체 (mAb) (아브노바(Abnova), 대만), 포스포-Akt 마우스 mAb 및 Akt 폴리클로날 항체 (셀 시그널링(Cell Signaling)). 마우스 재조합 Gas6 및 포스포-Ax1을 위한 ELISA 키트를 R&D 시스템(R&D System)으로부터 구입하였다. 인간 암종 세포주는 ATCC로부터 획득하였고, 10% FBS가 보충된 PRMI1640 배지에서 배양하였다. 하이브리도마 항-인간 Ax1 모노클로날 항체 12A11 및 3G9는 제넨테크에 의해 제공되었다 (문헌 [Li (2009)] 참조).
- [0392] **파지 항-Ax1 모노클로날 항체의 생성.** 항체 생성을 위해, 인간 IgG 레퍼토리의 천연 다양성을 모방하는, 선택된 상보성 결정 영역 (H1, H2, H3)에서 합성 다양성을 갖는 인간 파지 항체 라이브러리를 패닝에 사용하였다. Fab 단편은 M13 박테리오파지 입자의 표면 상에 2가 디스플레이되었다 (문헌 [Lee et al., 2004]). 파지 항체 라이브러리를 대안적인 라운드에서 인간 및 무린 Ax1 ECD에 대해 패닝하였다. 인간 Ax1 ECD-His 및 무린 Ax1 ECD-Fc 융합 단백질에 결합된 파지 항체를 ELISA 및 DNA 서열분석에 의해 확인하였고, 항체 클론을 재구성하여 전장 IgG를 발현시켰다 (문헌 [Liang et al., 2007]). 개별 클론을 포유동물 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 칼럼으로 정제하였다 (문헌 [Carter et al., 1992]).
- [0393] 파지 클론을 Baf3-Ax1 세포의 Gas6-의존성 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 스크리닝하였다. Baf3Ax1 세포 증식의 억제에서 최고 효능을 나타내는 2개의 클론을 친화도 성숙을 위해 선택하였다.

- [0394] 친화도 성숙을 위해, M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는 과지미드 (문헌 [Liang et al., 2007])를 과지 Ab의 경쇄 (V_L) 및 중쇄 (V_H) 가변 도메인을 이식하기 위한 라이브러리 주형으로 제공하였다. 소프트 랜덤화 전략을 기재된 바와 같이 친화도 성숙을 위해 채택하였고 (문헌 [Liang et al., 2007]), 고처리량 단일-점 경쟁 과지 ELISA를 이용하여 기재된 바와 같이 고친화도 클론에 대해 신속하게 스크리닝하였다 (문헌 [Sidhu et al., 2004]).
- [0395] **항-Ax1 항체의 친화도 측정.** 항-Ax1 항체의 결합 친화도 결정을 위해, 비아코어™-3000 기기로의 표면 플라즈몬 공명 (SRP) 측정을 이용하였다. 항-Ax1 항체 및 인간 Ax1 ECD-His 단백질 사이의 친화도를 측정하기 위해, 항-Ax1 인간 IgG를 마우스 항-인간 IgG로 코팅된 CM5 바이오센서 칩에 의해 포획하여 대략 250 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학적 측정을 위해, 인간 Ax1 ECD-His의 2배 연속 희석액 (440nM - 28nM)을 30 μ l/분의 유량으로 25°C에서 PBT 완충제 (0.05% 트윈 20을 갖는 PBS)에 주사하였다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 간단한 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)를 k_{off}/k_{on} 비로 계산하였다. 항-Ax1 항체의 무린 Ax1 ECD-Fc 융합 단백질에 대한 친화도를 측정하기 위해, 무린 Ax1 ECD 인간 IgG 융합 단백질을 마우스 항-인간 IgG로 코팅된 CM5 바이오센서 칩에 의해 포획하여 대략 150 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학적 측정을 위해, 항-Ax1 Fab 단편의 2배 연속 희석액 (200nM - 12nM)을 30 μ l/분의 유량으로 25°C에서 PBST 완충제 (0.05% 트윈 20을 갖는 PBS)에 주사하였다.
- [0396] **세포 증식 검정.** 세포를 96-웰 플레이트에서 5000개 세포/웰로 시딩하고, 72시간 동안 다양한 농도에서 Ax1 mAb로 처리하였다. 세포 증식을 제조업체의 지침에 따라 셀타이터-글로 발광 세포 생존을 검정 (프로메가)을 이용하여 측정하였다.
- [0397] **ELISA 및 형광-활성화 세포 분류 (FACS).** ELISA 검정을 하기와 같이 수행하였다: 염소 항-인간 IgG Fc 코팅된 플레이트를 0.5% BSA, PBS, 0.05% 트윈 20 (PBST)으로 차단하였다. 교차 반응 검정을 위해, 코팅된 플레이트를 인간 Ax1.Fc, 마우스 Ax1.Fc 또는 인간 Mer.Fc, Tyro-3.Fc와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, PBST에서 4회 세척하고, 항-Ax1 mAb 및 HRP-접합된 항-마우스 Ig와 인큐베이션하였다. 결합 검정을 위해, 코팅된 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인간 Ax1.Fc와 인큐베이션하고, PBST에서 4회 세척하고, 실온에서 1시간 동안 rmGas6 및 항-Ax1 mAb와 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBST에서 4회 세척하고, 비오틴닐화 항-mGas6 및 스트렙타비딘-HRP와 인큐베이션하였다. 분비된 Ang-2 및 DKK3을 제조업체의 지침에 따라 R&D ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. 세포 표면 상의 Ax1 발현을 표준 기술을 이용하여 FACS에 의해 결정하였다. 간략하게, 세포를 수확하고, 얼음 상에서 30분 동안 항-Ax1 mAb (12A11, 10ug/ml)로 염색하고, PBS에서 2회 세척한 후에, PE-접합된 2차 항체로 염색하였다. 세포 표면 상에서 Ax1에의 Gas6 결합을 차단하는 항체를 결정하기 위해, 세포를 수확하고, 30분 동안 항-Ax1 mAb로 염색하고, 얼음 상에서 30분 동안 rmGas6과 인큐베이션하였다. 이들을 PBS에서 2회 세척하고, 비오틴닐화 항-Gas6 및 PE-접합된 스트렙타비딘으로 염색하였다. 샘플을 BD FACScalibur 유동 세포측정기 상에서 분석하였다.
- [0398] **이종이식 실험.** 모든 연구는 "실험 동물의 관리 및 사용을 위한 안내" (NIH)에 따라 수행하였고, 실험 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC)의 승인을 받았다. 총 5×10^6 개 (A549) 또는 매트릭셀 중 10^7 개 (MDA-MB-231)의 세포를 각각 누드 (A549) 또는 SCID 마우스 (MDA-MB-231)의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 평균 종양 크기가 100 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 무작위 추출하여 상이한 처리군 (각각의 군에 대해 n=10)으로 분류하였다. 항-Ax1 또는 대조군 IgG1 항체를 10-30 mg/kg에서, 항-VEGF를 1-2 mg/kg에서 복강내 주사 (IP)를 통해 매주 2회 투여하였다. 예플로티닙을 100 mg/kg/일에서 경구 위관영양에 의해 투여하였다. 파클리탁셀 및 카르보플라틴을 처리 시작시에 각각 6.25 mg/kg/일에서 5일 동안, 및 단일 용량을 위한 100 mg/kg에서 피하 투여하였다. 상이한 처리군에서의 종양 성장의 비교를 위해 2-원 아노바(Anova)를 이용하여 통계 분석을 수행하였다.
- [0399] 약리학 (PD) 연구를 위해, 마우스를 0, 24, 72 및 168시간 동안 항체로 처리하였다. 각각의 시점에서, 종양을 절제하고, 면역조직화학 염색 및 영상 분석을 위해 처리하고, 이를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 위한 세포 용해물을 생성하였다.
- [0400] 전이 연구를 위해, 루시페라제 리porter 유전자로 안정하게 형질감염된 5×10^5 개 MDA-MB-231 세포 (문헌 [Li et al., 2009])를 꼬리 정맥 주사를 통해 SCID 마우스에 이식하였다. 다양한 기관으로의 종양 세포의 전이는 기재된 바와 같이 생물발광 검출에 의해 모니터링하였다 (문헌 [Li et al., 2009]).

[0401] **면역조직화학.** 이중이식 종양 샘플을 10% 중성 완충 포르말린에서 고정시키고, 처리하고, 파라핀에 포매시키고, 4 μm에서 절개하였다. 이어서 얇은 절편을 Ki67에 대한 1차 항체, 절단된 카스파제 3 및 MECA32에 이어 비오틴화 2차 항체 및 DAB 크로마젠으로 처리하였다.

[0402] 도관 및 전이성 선암종 포함하여 원발성 인간 유방암 조직 마이크로어레이를 큐어라인 인크.(Cureline Inc.)로부터 획득하였다. Ax1 IHC를 이전에 기재된 항-Ax1 모노클로날 항체를 이용하여 수행하였고 (문헌 [Li et al., 2009]), 대식세포를 CD68을 이용하여 염색하였다. 이중 Ax1/CD68 IHC를 위해, Ax1 염색을 우선 2 μg/ml에서 벡터 ABC 엘리트 HRP 시약 및 DAB 기질을 이용하여 수행하였다. 이후에 CD68 염색을 0.5 μg/ml에서 또한 ABC 엘리트-HRP 시약을 사용하나 대신 벡터 SG 크로모젠 (블루/그레이)을 이용하여 순차적으로 진행하였다. 2개의 마커의 교차 반응성을 방지하기 위해 2개의 복합체 사이에서 제2 표적 항원 검색 단계를 수행하여 제1 복합체를 용리시켰다.

[0403] **혈관 밀도 측정 및 데이터 분석.** 종양 샘플을 팬 내피 세포 마커인 MECA32로 염색하였다. 영상은 100x 최종 배율에서 아리오울(Ariol) SL-50 자동화 슬라이드 스캐닝 플랫폼 (제네티스 리미티드(Genetix Ltd.); 영국 햄프셔)에 의해 획득하였다. 종양-특이적 구역을 메타모르프(Metamorph) 소프트웨어 패키지 (MDS 어날리티컬 테크놀로지스(MDS Analytical Technologies); 캐나다 온타리오주)에서의 분석을 위해 개별 8-비트 영상으로 송출하였다. 갈색 DAB-특이적 염색을 기재된 바와 같이 청색-정규화 알고리즘을 이용하여 헤마톡실린 대비염색으로부터 단리하였다 (문헌 [Brey et al., 2003]). 세그먼테이션 알고리즘은 용기를 확인하였고, 크기 및 형태를 기반으로 노이즈를 제거했다. 세포를 크기, 형태, 및 헤마톡실린 염색의 밀도를 기반으로 종양 또는 비-종양으로 확인하였다. 비-종양 구역은 비-종양 세포 대 종양 세포의 밀도에 의해 확인하였다. 분석을 완료한 후에, 용기 또는 종양 구역으로 부정확하게 확인된 인공물을 제거하기 위해 영상을 수동으로 검토하였다. 넓이 측정은 각각의 영상에서 개별 용기 뿐만 아니라 종양 및 비-종양 구역에 대해 기록하였다. 영상 분석을 기반으로 하는 본래 값을 JMP 8.0 소프트웨어 (SAS 인스티튜트, 인크.(SAS Institute, Inc.), 미국 노스캐롤라이나주)를 사용하여 분석하였다. 평균의 각각의 쌍을 비교하기 위해 스튜던트 t 검정을 수행하였다 (p < 0.05).

[0404] **종양-연관 대식세포 (TAM)의 단리 및 분비된 시토카인의 검출.** 종양을 해부하고, 작은 조각으로 자르고, 2.5% FBS, 0.2 유닛/ml 리버라제 블렌드자임 II 및 5 유닛/ml DNaseI를 갖는 RPMI1640 배지 (로슈)에서 인큐베이션 하였다. 종양 세포를 MACS 분리 장치 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 이용하여 해리시키고, 실온에서 20분 동안 유지하였다. EDTA (최종 농도 0.002%)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 단세포 현탁액을 제조하고, 적혈구를 RBC 용해 완충제 (이바이오사이언스(eBioscience))를 사용하여 제거하였다. 세포는 1% FBS를 함유하는 PBS 중에 10⁷개 세포/ml에서 재현탁시키고, 20 μg/ml FcRII, III 및 IV와 20분 동안 인큐베이션하였다. 항-F4/80-PE (이바이오사이언스) 및 항-CD11c-APC (BD 파밍겐(BD Pharmingen)) (0.2 μg/10⁶개 세포)를 첨가하고, 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. F4/80 및 CD11c 양성 세포를 FACSAria (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))에 의해 분류하였다. 총 2x10⁵개 F4/80 및 CD11c 양성 세포를 96-웰 플레이트에 시딩하고, 밤새 배양하였다. 배양된 배지를 수집하고, 시토카인 및 케모카인의 수준을 제조업체의 지침에 따라 바이오-플렉스 마우스 시토카인 검정 (바이오-래드(Bio-Rad))을 이용하여 결정하였다.

[0405] **에피토프 맵핑**

[0406] Ax1-2 (PRK HuAx1(1-134Aa)/HuIgG1Fc), Ax1-3 (PRK HuAx1(1-221Aa)/HuIgG1Fc), Ax1-4 (PRK HuAx1(1-324Aa)/HuIgG1Fc) 및 Ax1-5 (PRK HuAx1(1-435Aa)/HuIgG1Fc) 플라스미드 구축물을 표준 분자-생물학 기술에 의해 제조하였다. 모든 플라스미드를 직접 서열분석 및/또는 제한 소화에 의해 확인하였다. Ax1 세포의 도메인의 다양한 부분 (aa1-134, aa1-221, aa1-324, aa1-435)을 코딩하는 플라스미드를 시험관내에서 프로메가 L2080 TNT SP6 퀵(Quick) 전사/번역 시스템 키트를 이용하여 전사 및 번역시키고, 이를 ELISA에서 항원으로 사용하였다. 이들 실험에 사용된 Ax1 부분은 인간 Ax1의 아미노산 1-134 (Ax1의 Ig1 포함):

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPNITGARGLTGTLR
CQLQVQGEPPVHWRDLRGQILELADSTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQY
QCLVFLGHQTFVSPQGYVG (서열 111)

, 및 인간 Ax1의 아미노산 221-324

ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDD

GMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWITHWL (서열

(Ax1 피브로백틴 도메인 포함): 130).

를

포함하였다.

[0407] **항체 경쟁 실험.** 파지 항-Ax1 mab YW327.6 또는 YW327.42가 하이브리도마 항-Ax1 mAb 12A11 및 3G9와 경쟁하는지 여부를 결정하기 위해, A549 세포를 항-Ax1 파지 항체 (각각 50 µg/ml에서) 및 하이브리도마 항-Ax1 항체 (각각 10 µg/ml에서) 30분 동안 공동-염색하였다. 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 항-마우스 Ig-PE로 염색하였다. 샘플을 FACS 분석에 대해 상기 기재된 바와 같이 BD FACScalibur 유동 세포측정기 (BD 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다.

[0408] **결과**

[0409] **Ax1 기능을 차단하는 파지 유래 모노클로날 항체의 생성.** 무린 및 인간 Ax1과 교차반응하는 항체를 확인하기 위해, 본 발명자들은 인간 IgG 항체의 천연 다양성을 모방하는, 선택된 상보성 결정 영역에서 합성 다양성을 갖는 파지-디스플레이 항체 라이브러리를 사용하였다 (문헌 [Lee et al., 2004]). 인간 및 무린 Ax1 ECD 둘 다에 결합된 파지 항체를 ELISA 및 DNA 서열분석에 의해 확인하였고, 항체 클론을 전장 IgG를 발현하도록 재구성하였다 (문헌 [Liang et al., 2007]). 이어서 전장 IgG의 패널을 Baf3Ax1 세포의 Gas6-의존성 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 스크리닝하고 (문헌 [Li et al., 2009]), 클론 YW327.6 중 하나를 친화도 성숙시키고, 정제하였다.

[0410] 친화도 성숙 Ax1 mAb YW327.6S2는 각각 약 1 nM 및 545 pM의 Kd의 고친화도로 인간 및 무린 Ax1 둘 다에 결합한다 (도 7a-b). 구체적으로, Ka는 1.7×10^5 이고, kd는 1.7×10^4 이고, KD는 9.9×10^{-10} 였다. 이 항체는 또한 시노몰구스 Ax1에 결합하지만, 관련 수용체 Tyro3 및 Mer과 교차반응하지 않는다 (도 7c). YW327.6S2는 세포 무함유 ELISA에서 및 FACS에 의해 세포 표면 상에서 둘 다 입증된 바와 같이 Ax1에의 리간드 Gas6의 결합을 용량-의존성 방식으로 차단한다 (도 7d-e).

[0411] 친화도 성숙 Ax1 Mab YW327.6S11, YW327.42S8 및 YW327.42S31을 또한 특성화하였다. YW327.6S11, YW327.42S8 및 YW327.42S31은 인간 및 무린 Ax1 둘 다에 고친화도로 결합한다. 예를 들어, 인간 Ax1에 결합하는 항체의 비아코어 분석은 하기 결과를 나타내었다:

Hu Ax1	Ka	kd	KD
YW327.6S11	1.7×10^5	1.7×10^4	1.3×10^9
YW327.42S8	5.2×10^4	1.3×10^4	2.5×10^9
YW327.42S31	6.3×10^4	1.5×10^4	2.4×10^9

[0412] 이들 항체는 Tyro3 및 Mer과 교차 반응하지 않는다. YW327.6S2 (및 모 항체 YW 327.6)는 Ax1에의 리간드 Gas6의 결합을 차단하는 반면, YW327.42S8 및 YW327.42S31 (및 모 Mab YW327.42)은 Ax1에의 리간드 Gas6의 결합을 차단하지 않는다.

[0414] **Ax1 에피토프 분석.** 인간 Ax1 세포의 도메인의 다양한 부분에 결합하는 Ax1 항체는 ELISA를 이용하여 분석하였다. 하기 결과를 수득하였다.

	YW327.6	YW327.42
Ax12 (aa1-134)	+	-
Ax1-3 (aa1-221)	+	-
Ax1-4 (aa1-324)	+	+

[0416] YW327.6은 인간 Ax1의 아미노산 1-134를 포함하는 Ax1-Fc 융합체에 결합하였다. 대조적으로, YW327.42는 인간 Ax1의 아미노산 1-324를 포함하는 Ax1-Fc 융합체에 결합하였으나, 아미노산 1-134, 및 1-221을 포함하는 Ax1 Fc 융합체에 결합하지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 YW327.6이 인간 Ax1의 아미노산 1-134로 이루어진 폴리펩티드에 결합하고, 인간 Ax1 아미노산 222-234가 YW327.42 결합에 필요하다고 결론내렸다. 아미노산 1-134는 Ax1 IgI 도메인을 함유하고, 아미노산 222-234는 Ax1 피브로넥틴 도메인을 함유한다.

[0417] 항-Ax1 하이브리도마 항체와의 경쟁 실험. 본 발명자들은 항체 YW327.6 및 YW327.42가 인간 Ax1 결합에 대해 항-Ax1 하이브리도마 항체 12A11 및 3G9와 경쟁할 수 있는지 여부를 결정하였다 (문헌 [Li, (2009)], 미국 특허 출원 번호 61/228,915 (2009년 7월 27일 출원)). 인간 Ax1에 대한 항체 경쟁 결합 실험에서, 항체 YW327.6은 인간 Ax1 결합에 대해 하이브리도마 항체 12A11 또는 3G9와 경쟁하지 않았으며, 이는 이들 항체가 동일한 에피토프를 인식하지 않는다는 것을 입증한다. 항체 YW327.42는 인간 Ax1 결합에 대해 하이브리도마 항체 12A11과

경쟁하였으나, 인간 Ax1 결합에 대해 하이브리도마 항체 3G9와 경쟁하지 않았다.

- [0418] **YW327.6S2는 Ax1 발현을 하향 조절하고, 그의 활성화, 신호전달 및 Gas6-의존성 Baf3Ax1 세포 증식을 억제한다.** YW327.6S2가 Ax1 생물학적 기능에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위해, 본 발명자들은 우선 Ax1 발현 및 신호전달에 대한 그의 효과를 평가하였다. NSCLC 세포주 A549의 YW327.6S2로의 처리는 세포 표면 상에서 Ax1 발현의 신속한 하향조절을 일으켰으며 (도 7f, 상부 패널), 이러한 하향 조절은 24시간 동안 지속된다 (도 7f, 하부 패널). H1299 NSCLC 세포의 Gas6 처리는 Ax1 인산화를 유도하고, 이는 세포를 YW327.6S2와 예비-인큐베이션하였을 때 억제되었다 (도 7g, 상부 패널). 결론적으로, YW327.6S2와 H1299 세포의 예비-인큐베이션은 하류 신호전달 분자 Akt의 Gas6-유도된 인산화를 차단한다 (도 7g, 하부 패널). YW327.6S2에 의한 Ax1 발현의 하향조절 및 그의 신호전달의 불활성화는 340 ng/ml의 IC50으로 Baf3Ax1 세포의 Gas6-의존성 성장을 강력하게 억제하였다 (도 7h).
- [0419] **YW327.6S2는 A549 이종이식편 성장을 감소시키고, 항-VEGF의 효과를 증진시킨다.** 이전의 연구에서, 본 발명자들은 RNAi 또는 항-인간 Ax1 하이브리도마 모노클로날 항체로의 처리에 의한 Ax1의 억제가 A549 NSCLC 종양 성장을 유의하게 감소시킨다는 것을 보여주었다 (문헌 [Li et al., 2009]). 따라서, 본 발명자들은 우선 이 모델에서 종양 성장에 대한 YW327.6S2의 효과를 시험하였다. YW327.6S2는 단독으로 10 mg/kg, 1주일에 2회의 투여요법에서 A549 종양 성장을 유의하게 감소시켰으며 (도 8a), 이러한 억제 효과는 항-인간 Ax1 하이브리도마 항체와 대등하다 (도 8c).
- [0420] Ax1은 내피 세포에서 발현되고, VEGF-유도된 내피 세포 형성을 증진시키며 (문헌 [Li et al., 2009; Holland et al., 2005]); 본 발명자들은 항-Ax1 mAb가 항-VEGF의 항-종양 성장 특성을 증진시킬 수 있는지 여부를 시험하였다 (문헌 [Liang et al., 2006]). 항-VEGF 항체 단독 및 YW327.6S2 단독은 A549 종양 성장에 대해 유사한 효과를 가졌다 (도 8a). 두 항체의 조합은 함께 각 항체 단독에 비해 종양 성장 억제를 증진시켰다 (단일 작용제에 의한 30% 억제 대 조합 처리에 의한 60% 억제를 나타냄) (도 8a).
- [0421] 본 연구에서 동물에게 60일 동안 매주 2회 투여한 후에 85일까지 종양 성장의 지연을 조사하였다 (종양 크기가 800 mm³을 초과하는 경우에 동물을 연구로부터 배제하였고, 독성의 결과로 인해 배제된 동물은 없었음). 항-VEGF와 조합된 YW327.6S2는 단일 작용제에 비해 종양 성장을 유의하게 지연시켰다 (도 8a). 마지막 투여로부터 실험 종료시까지 경과된 시간 동안 (85일) 조합 처리군에서 종양의 재성장은 일어나지 않았으며, 이는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯에서 나타난 바와 같이 실험 종료시에 이 군에서의 모든 동물의 생존으로 이어졌다 (도 8b).
- [0422] 무린 Ax1과 교차반응하지 않는 항-인간 Ax1 하이브리도마 모노클로날 항체 12A11은 A549 이종이식 종양 성장을 유의하게 감소시켰으며 (문헌 [Li et al., 2009]), 이는 또한 도 8c에 나타난 바와 같이 항-VEGF의 효과를 증진시킨다. 이는 12A11이 종양 세포 성장을 직접 억제하고 항-VEGF가 종양 혈관계에 영향을 미치기 때문에 예상된다.
- [0423] **YW327.6S2는 수용체 발현을 하향조절하고, A549 종양 세포의 아폽토시스를 유도한다.** 종양 성장 감소에 대한 YW327.6S2 효과를 매개하는 메커니즘의 이해를 시작하기 위해, 본 발명자들은 약력학 연구를 수행하였다. A549 종양 보유 마우스를 YW327.6S2로 처리하고, 종양을 투여 0, 24, 72 및 168시간 후에 절제하였다. 종양 용해물의 웨스턴 블롯팅 분석은 Ax1 발현이 항체 투여 24시간 후에 하향조절되고, 168시간에 걸쳐 지속되었다는 것을 보여주었으며 (도 8d), 이는 YW327.6S2의 항-종양 성장 효과가 Ax1 발현의 하향조절에 의해 부분적으로 매개된다는 것을 시사한다.
- [0424] YW327.6S2가 종양 세포 증식 및 아폽토시스에 대해 직접적인 효과를 갖는지 여부를 결정하기 위해, 대조군 또는 YW327.6S2로 2주 동안 처리된 A549 이종이식 종양을 절제하고, 절단된 카스파제 3 (CC3) 및 Ki67 IHC를 수행하였다. YW327.6S2로 처리된 종양은 대조군에 비해 증가된 CC3을 나타내었으며 (도 8e), 이는 YW327.6S2가 종양 세포의 아폽토시스를 유도한다는 것을 시사한다. 대조군 및 YW327.6S2 처리된 종양 사이에 Ki67 양성 핵의 유의한 차이가 없었으며, 이는 YW327.6S2가 종양 세포 증식에 직접적으로 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다.
- [0425] YW327.6S2가 종양-연관 혈관계에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 A549 종양 보유 마우스를 YW327.6S2 단독으로 또는 항-VEGF와 조합하여 처리하였다. 종양을 절제하고, 팬 내피 마커인 MECA32로 염색하여, 종양내 혈관 밀도를 조사하였다. YW327.6S2 단독은 대조군에 비해 혈관 밀도를 유의하게 감소시키지 않았으나, 항-VEGF와의 조합은 종양 연관 혈관 밀도를 유의하게 감소시켰다 (도 8f). 대조적으로, 12A11은 그 자체로 또는 항-VEGF와 조합하여도 종양내 혈관 밀도에 대해 유의한 효과를 갖지 않는다.

- [0426] **YW327.6S2는 에를로티닙 및 화학요법의 효과를 증진시킨다.** YW327.6S2가 NSCLC에 대한 표준 관리의 치료 지수를 증진시킬 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 본 발명자들은 EGFR 소분자 억제제 (SMI) 에를로티닙 및 화학요법과 YW327.6S2의 조합 처리를 수행하였다.
- [0427] A549는 야생형 EGFR을 함유하고, 오직 에를로티닙에 대해 중간 정도로 감수성이며 (문헌 [Yauch et al., 2005]); 따라서 본 발명자들은 항-Ax1 mAb가 이들 세포를 EGFR SMI에 대해 감작화시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. YW327.6S2 및 에를로티닙은 단일 작용제로 투여된 경우에 종양 성장을 30% 감소시켰으나, 이들의 조합은 종양 성장률을 50% 초과 감소시켰으며 (도 9a), 이는 항-Ax1 mAb가 에를로티닙의 항-종양 성장 효과를 증진시킨다는 것을 시사한다.
- [0428] 이어서, 본 발명자들은 항-Ax1 mAb가 NSCLC에 대한 표준 화학요법의 치료 지수를 증진시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. A549 이종이식편을 보유한 마우스를 처리 시작시에 (0일, 도 9b) 투여되는 파클리탁셀 (6.25 mg/kg/일, 5일) 및 카르보플라틴 (100 mg/kg, 1 용량)으로 이루어진 1 사이클의 화학요법으로 치료하였다. 화학요법 단독은 종양 성장에 대해 단독으로 투여된 YW327.6S2와 유사한 효과를 갖고, 이들 둘의 조합은 종양 성장의 억제를 증진시켰다 (도 9b).
- [0429] **YW327.6S2는 MDA-MB-231 유방암 이종이식 모델에서 혈관 밀도를 감소시키고, 종양-연관 대식세포로부터의 염증성 시토카인 분비를 억제한다.** shRNA에 의한 Ax1 녹다운은 오직 MDA-MB-231 이종이식 종양 성장에 대해 중간 정도의 효과를 가지므로 (문헌 [Li et al., 2009]), 본 발명자들은 YW327.6S2가 이 모델에서 효능이 있는지 여부에 대해 질문을 제기하였다. YW327.6S2 단독은 종양 성장을 감소시킬 수 있었고 (25%), 이 모델에서 단일 작용제로 사용된 항-VEGF와 유사한 효과를 갖는다 (도 10a). 조합 요법은 종양 성장을 50% 감소시켰으며, 이는 YW327.6S2가 항-VEGF의 효과를 강화시킨다는 것을 시사한다 (도 10a). 대조적으로, 무린 Ax1과 교차반응하지 않는 항-Ax1 하이브리도마 항체 12A11 (문헌 [Li et al., 2009])은 이 모델에서 단일 작용제로서 종양 성장에 대해 유의한 효과를 갖지 않으며, 항-VEGF에도 영향을 미치지 않는다 (도 10b). 웨스턴 블롯 분석은 YW327.6S2 및 12A11이 둘 다 종양에서 Ax1 발현을 하향조절한다는 것을 보여주었다 (도 10c 및 d). 이러한 결과는 YW327.6S2의 항-종양 성장 효과가 종양 기질 기능의 조절에 의해 매개될 수 있다는 것을 시사한다.
- [0430] YW327.6S2가 종양 기질 기능을 조절할 수 있는 방법을 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 MDA-MB-231 종양 보유 마우스를 YW327.6S2 단독으로 또는 항-VEGF와 조합하여 처리하였다. 항체의 투여 후에 다양한 시점에, 종양을 절제하고, MECA32로 염색하여 종양내 혈관 밀도를 조사하였다. YW327.6S2 및 항-VEGF는 둘 다 대조군에 비해 혈관 밀도를 유의하게 감소시켰다 (도 10e). 그리고, 이들 두 항체의 조합은 종양 연관 혈관 밀도를 추가로 감소시켰다. 이러한 결과는 YW327.6S2가 부분적으로 혈관 기능을 변경함으로써 MDA-MB-231 종양 성장을 감소시킨다는 것을 시사한다.
- [0431] 원발성 인간 유방암 시편에서, 본 발명자들은 Ax1 단백질이 침윤성 대식세포에서 강하게 발현된다는 것을 발견하였고 (도 10f), 이에 따라 Ax1 mAb YW327.6S2가 종양 연관 대식세포 (TAM) 기능에 영향을 미칠 수 있는지 여부에 대한 질문을 제기하였다. MDA-MB-231 이종이식 종양을 1주 동안 YW327.6S2, 12A11 또는 대조군 항체로 처리하고, TAM을 F4/80 양성 세포에 대한 분류에 의해 분리하였다. 세포를 밤새 혈청 무함유 배지에서 배양하고, 상청액을 수집하고, 다양한 시토카인 및 케모카인의 존재에 대해 검정하였다. YW327.6S2 및 12A11로 처리된 종양으로부터의 TAM은 대조군 항체로 처리된 TAM에 비해 훨씬 낮은 수준의 염증성 시토카인 및 케모카인을 생산하였다 (도 10g). Ax1-mAb로의 처리는 이들 항체에 의한 종양 세포 상에서의 Ax1 발현의 하향조절 (도 10c 및 d)과 대조적으로 TAM 상에서의 Ax1 발현 수준에 영향을 미치지 않는다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 Ax1 mAb가 아마도 종양 및 기질 세포 사이의 교차소통을 차단함으로써 간접적인 방식으로 TAM으로부터의 염증성 시토카인/케모카인 분비를 조절할 가능성이 가장 크다는 것을 시사한다.
- [0432] **YW327.6S2는 MDA-MB-231 유방암 세포의 골로의 전이를 감소시킨다.** 이전의 연구에서 본 발명자들은 shRNA에 의한 Ax1 녹다운이 정위 모델에서 MDA-MB-231 유방암 세포의 골로의 전이를 억제한다는 것을 보여주었으며 (문헌 [Li et al., 2009]), 따라서 본 발명자들은 YW327.6S2가 이들 세포의 전이에 영향을 미치는지 여부를 시험하였다. 루시페라제 리포터 유전자를 안정하게 발현하는 MDA-MB-231 세포 (20)를 꼬리 정맥을 통해 SCID 마우스에 주사하였다. 주사 4주 후에, 대조군 항체 처리군의 모든 5마리 동물의 두개안면부, 경골 및 대퇴골에서 강한 발광 신호가 검출되었다. 대조군에서 생물발광에 의해 검출된 부위는 각각의 동물에서 5, 5, 4, 3 및 1개, 총 18개이다 (도 11a). YW327.6S2로 처리된 마우스에서, 생물발광에 의해 검출된 부위는 각각의 동물에서 0, 1, 2, 3, 및 1개 부위, 전체 군에서 총 7개로 유의하게 감소하였다 (도 11a). 골에서 전이성 지점의 존재는 조직학적 분석에 의해 확인되었다 (도 11b). 이러한 결과는 YW327.6S2가 MDA-MB-231 유방암 세포의 원위 기관으로

의 전이를 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다.

- [0433] **논의**
- [0434] 본 발명자들은 종양형성에서 교차-종 반응성을 나타내고 Ax1의 다양한 기능을 차단하는 인간 항-Ax1 모노클로날 항체 (YW327.6S2)를 개발하고 특성화하였다. Ax1에 대해 처음 보고된 완전 인간화 차단 항체 이외에, YW327.6S2는 암 발생 및 진행의 여러 측면에서 Ax1 활성화/신호전달의 영향을 밝히기 위한 강력한 도구로서의 역할을 할 뿐만 아니라 다양한 암의 치료를 위한 잠재적 요법을 나타낸다.
- [0435] 본 발명자들의 결과는 YW327.6S2가 Ax1 발현의 하향조절 뿐만 아니라 수용체에의 리간드 Gas6 결합의 억제에 의해 Ax1 기능을 차단하여, Ax1 및 그의 하류 신호전달의 불활성화를 일으킨다는 것을 보여준다 (도 7). YW327.6S2가 암 세포에서 Ax1 발현을 하향조절하는 능력은 다수의 암이 구성적으로 활성화된 Ax1을 발현하고 더 이상 외인성 Gas6에 반응하지 않으므로 그의 억제 효과에 대한 중요한 메커니즘을 나타낸다 (문헌 [Li et al., 2009]).
- [0436] A549 NSCLC 모델에서, YW327.6S2는 단일 작용제로 투여된 경우에 종양 성장을 유의하게 감쇄시켰다 (도 8a). 이러한 억제 효과는 이 모델에서 항-Ax1 하이브리도마 항체와 대등하다 (문헌 [Li et al. (2009)]; 도 8c). YW327.6S2는 이종이식편에서 Ax1 발현을 신속하게 하향조절하고 (도 8d), 종양 세포의 아포토시스를 유도하며 (도 8e), 이는 종양 성장에 대한 그의 억제 효과를 매개하는 메커니즘 중 하나일 수 있다. Ax1이 DKK3 및 안지오펜티엔/Tie2 경로의 조절에 의해 내피 세포 기능을 조절한다는 본 발명자들의 이전의 발견 (문헌 [Li et al., 2009])은 항-Ax1 mAb가 종양 성장을 감소시키는데 있어 항-VEGF의 효과를 증진시킬 수 있다는 가능성을 제기하였다. 본 발명자들의 결과 (도 8a 및 f)는 YW327.6S2가 항-VEGF의 효과를 증진시킴으로써 종양 혈관계에 영향을 미쳐 종양내 혈관 밀도를 감소시킨다는 점에서 이 가설과 일치한다. 실제로, A549 모델에서 YW327.6S2 및 항-VEGF의 공동-투여는 치료 중단후 적어도 4주 동안 종양 정체를 유지시켰다 (도 8b). 하이브리도마 항체 12A11은 또한 이 모델에서 항-VEGF의 항-종양 효과를 증진시킨다 (도 8c). 그러나, YW327.6S2와 달리, 12A11은 종양 혈관계에 대해 직접적인 효과를 갖지 않고; 오히려 이는 종양 세포 증식을 직접 억제하고 아포토시스를 유도한다 (문헌 [Li et al. 2009]). 종양 성장에 대한 12A11의 효과 및 종양 혈관계에 대한 항-VEGF의 효과는 두 작용제가 함께 사용된 경우에 효과를 증가시켰다.
- [0437] EGFR 소분자 억제제, 예컨대 에를로티닙은 EGFR 돌연변이 또는 증폭을 보유하는 NSCLC 종양의 치료에 효능이 있다 (문헌 [Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Eberhard et al., 2005; Giaccone et al., 2005; Tsao et al., 2005]). 또한 Her2/EGFR 소분자 억제제 라파티닙 또는 항-Her2 항체 헤르셉틴으로의 유방암 세포의 처리는 Ax1 발현의 유도로 이어지고, 결과적으로 이들 요법에 대한 암 세포의 내성을 초래한다고 알려져 있다 (문헌 [Liu et al., 2009]). 본 발명자들은 최근에 Ax1 발현이 에를로티닙에 대한 내성을 획득한 HCC827 NSCLC (EGFR 돌연변이 및 증폭을 둘 다 보유하는 세포주) 세포에서 유도되고, 내성 세포에서의 Ax1 녹다운이 에를로티닙에 대한 이들의 감수성을 회복시킨다는 것을 발견하였으며, 이는 Ax1이 NSCLC에서의 에를로티닙 내성에서 소정의 역할을 수행할 수 있다는 것을 시사한다. A549 세포가 야생형 EGFR을 함유하고, 시험관내에서 오직 EGFR 억제에 대해 중간 정도의 감수성을 나타내므로 (문헌 [Yauch et al., 2005]), 본 발명자들은 항-Ax1 mAb가 이들 세포를 에를로티닙에 대해 감작화시킬 것인지 여부에 대해 의문을 제기하였다. 본 발명자들의 결과는 YW327.6S2가 종양 성장을 감소시키는데 있어 에를로티닙의 효과를 강화시킨다는 것을 보여주었으며 (도 9a), 이는 항-Ax1 mAb가 아마도 종양 세포에서 Ax1 발현을 직접 감소시킴으로써 EGFR 억제 단독에 대해 불응성인 종양에서 EGFR 억제제의 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 시사한다.
- [0438] 전신 화학요법은 NSCLC에 대한 치료 패러다임에서 가장 큰 부분을 차지한다. 재발성 또는 진단된 질환의 경우, 카르보플라틴/파클리탁셀로 이루어진 화학요법으로 치료한 환자는 15%의 반응률 및 10.3개월의 중앙 생존기간을 갖는다 (문헌 [Sandley et al., 2006]). A549 NSCLC 모델에서 본 발명자들의 결과는 YW327.6S2가 카르보플라틴/파클리탁셀의 항-종양 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 보여주었으며 (도 9b), 이는 Ax1 기능의 차단이 이러한 질환에서 화학요법에 대한 치료 지수를 개선시킬 수 있다는 것을 시사한다. 본 발명자들의 결과는 Ax1 소분자 억제제가 4T1 유방암 정위 모델에서 시스플라틴과 상승작용을 나타내어 간 미세전이를 저해한다는 것을 입증한 최근의 보고와 일치한다 (문헌 [Holland et al., 2010]).
- [0439] MDA-MB-231 유방암 모델에서, YW327.6S2 단독은 종양 성장을 유의하게 감쇄시킬 수 있다 (도 10a). 무린 Ax1과 교차 반응하지 않으며 이에 따라 오직 종양 세포에 영향을 미치는 항-Ax1 하이브리도마 항체는 이 모델에서 종양 성장에 대해 유의한 효과를 나타내지 않는다 (도 10b). 이러한 결과는 YW327.6S2가 종양 기질에 대한 그의 작용을 통해 그의 항종양 효과를 발휘할 가능성이 있다는 것을 시사한다. 본 발명자들의 결과는 YW327.6S2가

종양내 혈관 밀도를 감소시키고 (도 10e), 항-VEGF의 효과를 증진시킨다는 것을 보여준다. YW327.6S2는 종양 혈관계에 대한 그의 효과를 통해 종양 성장에 대해 영향을 미칠 수 있다.

[0440] 암의 발생 및 염증 사이의 연관성은 오래전부터 알려져 있다 (문헌 [Balkwill & Mantovani, 2001; Coussens & Werb, 2002]). 감염 및 자극과 연관된 만성 염증은 게놈 병변 및 종양 개시를 촉진시키는 환경을 만들 수 있다. TAM이 혈관신생의 촉진 및 매트릭스 재형성을 포함하는 종양 진행에서 근원적 역할을 한다는 증거가 증가하고 있다 (문헌 [Balkwill et al., 2005; Pollard, 2004]). 이를 담당하는 신호는 염증성 시토카인, 예를 들어 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터류킨 6 (IL-6) 및 과다한 케모카인일 것으로 생각된다. 이들 시토카인 및 케모카인은 종양 진행을 자극하는 특정 부위에 면역 세포를 동원할 뿐만 아니라, 이들의 수용체는 이들이 종양 성장 및 이동을 증가시킬 수 있는 종양 세포 상에서 발현된다는 것이 밝혀졌다 (문헌 [Haghnegahdar et al., 2000]). 원발성 인간 유방암에서, Ax1 단백질은 종양 연관 대식세포 (TAM) 상에서 높은 수준으로 발현된다 (도 10f). 본 발명자들은 여기서 항-Ax1 mAb가 간접 메커니즘을 통해 이들 세포의 기능을 조절할 수 있다는 증거를 제공한다. 본 발명자들의 데이터는 YW327.6S2 또는 12A11 (유린 Ax1와 교차 반응하지 않으며, 따라서 TAM에 대해 직접적인 효과를 갖지 않아야 함)으로의 MDA-MB-231 이종이식편의 처리가 TAM으로부터의 염증성 시토카인 및 케모카인의 분비를 억제한다는 것을 보여주었다 (도 10g). Ax1-mAb가 TAM 상에서의 Ax1 발현에 대해 유의한 효과를 갖는 것으로 보이지 않으나 종양 세포 상에서의 수용체 발현을 하향조절하므로, 항-Ax1-mAb는 종양 및 기질 세포 사이의 교차소통을 차단함으로써 TAM으로부터의 시토카인/케모카인 분비를 조절할 가능성이 있다. 이러한 결과는 종양 세포가 침윤성 백혈구를 지지함으로써 이들의 성장을 촉진시켜 Gas6의 발현을 유도할 수 있고 (문헌 [Loges et al., 2010]); Ax1의 소분자 억제제가 4T1 유방 종양 세포에서 GM-CSF 발현을 감소시킨다는 (문헌 [Holland et al., 2010]) 최근의 보고와 일치한다.

[0441] 이전의 연구는 종양 세포 이동, 침습 및 전이를 촉진하는데 있어 Ax1의 역할을 확립하였다 (문헌 [Zhang et al., 2008; Li et al., 2009; Tai et al., 2008; Vajkoczy et al., 2006; Gjerdrum et al., 2010]). 여기서 본 발명자들은 YW327.6S2가 MDA-MB-231 유방암 세포의 골로의 전이를 감소시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 유방암 세포에서 RNAi에 의한 Ax1 침묵이 정위 모델에서 이들의 폐로의 전이를 억제한다는 본 발명자들의 이전의 데이터와 일치하며 (문헌 [Li et al., 2009; Gjerdrum et al., 2010]), 이는 이 항-Ax1 항체가 원발성 종양의 치료에서 뿐만 아니라 전이성 질환에서 치료 잠재력을 가질 수 있다는 것을 시사한다.

[0442] 결론적으로, 본 발명자들은 Ax1 기능을 차단하는 인간 모노클로날 항체를 개발하였다. 이 항-Ax1 mAb는 종양 세포 아포토시스의 유도, 혈관신생의 조절 및 종양 연관 면역 세포 기능의 조절을 포함하는 다중 메커니즘을 통해 그의 항종양 효과를 발휘한다. 추가로, 이 항-Ax1 mAb는 항-VEGF, EGFR SMI 뿐만 아니라 화학요법의 항종양 효능을 증진시키고, 따라서 이들 요법이 표준 관리인 임상적 셋팅에서의 신규 치료 접근법을 제시할 수 있다.

[0443]

부분 참고문헌 목록

- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? (2001). *Lancet* 357: 539-45.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7: 211-7.
- Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. (2001). Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol* 12: 819-24.
- Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick Jr CW. (2003). Automated Selection of DAB-labeled Tissue for Immunohistochemical Quantification. *J Histochem & Cytochem* 51: 575-84.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-89.
- Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey TW. (2003). Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol* 22:533-40.
- Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-7.
- Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer* 60:791-7.
- Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23: 5900-9.
- Giaccone G. (2005). Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 3235-42.
- Gjerdum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. (2010). Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1124-29.
- Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. (2000). The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol* 67:53-62.
- Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieri AM, Atchison RE, et al. (2005). Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res* 65: 9294-303.
- Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. (2010). R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 70:1544-54.

[0444]

Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. (2008). Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett* 268: 314-24.

Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, et al. (2008). Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 14:130-8.

Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I. (1999). Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* 9: 563-7.

Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6: 2113-20.

Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ, Alvarez H, Maitra A. (2009). The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8: 618-26.

Lai C, Lemke G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 6: 691-704.

Lee CV, Liang WC, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. (2004). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-93.

Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009). Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* 28: 3442-55.

Lian WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 281: 951-61.

Liang WC, Dennis MS, Stawicki S, Chanthery Y, Pan Q, Chen Y, Eigenbrot C, Yin J, Koch AW, Wu X, et al. (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366: 815-29.

Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. (2009). Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res* 69: 6871-8.

[0445]

- Loges S, Schmidt T, Tjwa M, van Geyte K, Lievens D, Lutgens E, et al. (2010). Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood* 115:2264-73.
- Lynch TJ, Bell TW, Sordella R, et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-39.
- Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. (2007). A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 26: 3909-19.
- Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:361-7.
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al, (1991). Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 11:5016-31.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-500.
- Pollard JW. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-8.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131:1190-203.
- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* 204:36-44.
- Sandley A, Gray R, Perry MC et al. (2006). Palitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for no-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 355: 2542-50.
- Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW. (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia* 7:1058-64.
- Sidhu SS, Li B, Chen Y, Fellouse FA, Eigenbrot C, Fuh G. (2004). Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338:299-310.
- Sun W, Fujimoto J, Tamaya T. (2004). Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology* 66:450-7.
- Tai KY, Shieh YS, Lee CS, Shiah SG, Wu CW. (2008). Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1. *Oncogene* 27: 4044-55.
- Tsao MS, Sakurada A, Lorimer I, et al. (2005). Molecular analysis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and protein expression in patients treated with erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) trial BR.21. *J Clin Oncol* 23: 7007. Meeting Abstracts.
- Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, et al. (2006). Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5799-5804.
- Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC. (2002). Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res* 22:1071-8.
- Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, et al. (2005). Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:8686-98.
- Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, et al. (2008). AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 68:1905-15.

[0446]

[0447]

[0448]

상기 본 발명이 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 설명 및 예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 이러한 설명 및 예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그 전체가 명백하게 참고로 포함된다.

도면

도면1a

클론 #	H1										서열
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
327.6	G	F	T	F	T	G	H	W	I	H	1
327.6.S2	G	F	S	L	S	G	S	W	I	H	7
327.6.S11	G	F	S	F	T	G	T	W	I	H	13
327.6.S50	G	F	T	F	T	G	S	W	I	H	19
327.6.S52	G	F	T	F	T	G	S	W	I	H	25
327.6.S65	G	F	T	F	T	G	S	W	I	H	31
327.42	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	37
327.42.S8	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	43
327.42.S31	G	F	S	F	T	S	I	G	I	H	49
327.42.S13	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	55
327.42.S43	G	F	S	V	R	G	T	G	L	H	61
327.42.S52	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	67
327.42.S63	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	73
327.42.S73	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	79
327.42.H2	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	85
327.42.H4	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	91
327.42.H20	G	F	T	F	T	G	T	G	I	H	97

도면1b

문항 #	H2	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	시열
327.6	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	2
327.6.S2	G	W	I	N	P	Y	R	G	Y	A	Y	Y	A	D	S	V	K	G	8
327.6.S11	G	W	I	A	P	Y	S	R	H	P	Y	Y	A	D	S	V	K	G	14
327.6.S50	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	20
327.6.S52	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	26
327.6.S65	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	32
327.42	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	38
327.42.S8	A	G	I	P	P	V	G	S	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	44
327.42.S31	A	G	I	P	P	V	G	R	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	50
327.42.S13	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	56
327.42.S43	A	G	I	S	P	V	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	62
327.42.S52	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	68
327.42.S63	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	74
327.42.S73	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	80
327.42.H2	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	86
327.42.H4	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	92
327.42.H20	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	98

도면1c

클론 #	H3	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	101	102	서열
327.6	A	R	R	E	Y	S	G	W	G	G	S	S	V	G	Y	A	M	D	Y	3
327.6.S2	A	R	R	E	Y	S	G	W	G	G	S	S	V	G	Y	A	M	D	Y	9
327.6.S11	A	R	R	E	Y	S	G	W	G	G	S	S	V	G	Y	A	M	D	Y	15
327.6.S50	A	R	R	E	Y	N	D	W	R	G	S	S	V	G	Y	A	M	D	Y	21
327.6.S52	A	R	R	E	Y	S	G	W	A	S	S	Y	V	G	Y	A	M	D	Y	27
327.6.S65	A	R	R	E	Y	P	G	W	G	G	S	S	I	G	Y	E	M	D	Y	33
327.42	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	39
327.42.S8	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	45
327.42.S31	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	51
327.42.S13	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	57
327.42.S43	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	63
327.42.S62	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	69
327.42.S63	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	75
327.42.S73	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	81
327.42.H2	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	87
327.42.H4	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	93
327.42.H20	A	R	R	W	R	S	L	S	S	G							M	D	Y	99

* 공란은 존재하지 않는 아미노산 잔기를 나타냄

도면1d

클론 #	L1											서열
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
327.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	4
327.6.S2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	10
327.6.S11	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	16
327.6.S50	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	22
327.6.S52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	28
327.6.S65	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	34
327.42	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	40
327.42.S8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	46
327.42.S31	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	52
327.42.S13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	58
327.42.S43	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	64
327.42.S52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	70
327.42.S63	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	76
327.42.S73	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	82
327.42.H2	R	A	S	Q	I	I	G	I	S	L	A	88
327.42.H4	R	A	S	Q	S	I	R	N	S	L	A	94
327.42.H20	R	A	S	Q	I	I	G	R	S	L	A	100

도면1e

클론 #	L2							서열
	50	51	52	53	54	55	56	
327.6	S	A	S	F	L	Y	S	5
327.6.S2	S	A	S	F	L	Y	S	11
327.6.S11	S	A	S	F	L	Y	S	17
327.6.S50	S	A	S	F	L	Y	S	23
327.6.S52	S	A	S	F	L	Y	S	29
327.6.S65	S	A	S	F	L	Y	S	35
327.42	S	A	S	F	L	Y	S	41
327.42.S8	S	A	S	F	L	Y	S	47
327.42.S31	S	A	S	F	L	Y	S	53
327.42.S13	S	A	S	F	L	Y	S	59
327.42.S43	S	A	S	F	L	Y	S	65
327.42.S52	S	A	S	F	L	Y	S	71
327.42.S63	S	A	S	F	L	Y	S	77
327.42.S73	S	A	S	F	L	Y	S	83
327.42.H2	A	A	S	N	L	A	S	89
327.42.H4	V	A	S	S	L	A	S	95
327.42.H20	V	A	S	N	L	A	S	101

도면1f

클론 #	L3								서열	
	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
327.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	6
327.6.S2	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	12
327.6.S11	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	18
327.6.S50	Q	Q	S	Y	S	N	P	Y	T	24
327.6.S52	Q	Q	S	Y	T	S	P	S	T	30
327.6.S65	Q	Q	S	Y	Y	F	R	S	T	36
327.42	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	42
327.42.S8	Q	Q	S	K	T	T	P	P	T	48
327.42.S31	Q	Q	S	Y	M	S	P	L	T	54
327.42.S13	Q	Q	S	K	R	T	P	P	T	60
327.42.S43	Q	Q	A	K	T	T	P	P	T	66
327.42.S52	Q	Q	A	K	S	T	P	P	T	72
327.42.S63	Q	Q	A	K	R	T	P	P	T	78
327.42.S73	Q	Q	A	K	T	T	P	P	T	84
327.42.H2	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T	90
327.42.H4	Q	Q	S	Y	S	T	P	L	T	96
327.42.H20	Q	Q	S	N	A	T	P	P	T	102

도면2

클론 YW327.6S2

VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GFSLSGSWIH WVRQAPGKGLEWV
 GWINPYRGYAYYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AREYSGWGGSSVGYAMDY WGQGTLV (서열 103)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
 GVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
 (서열 104)

클론 YW327.6S11

VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GFSFTGTWIH WVRQAPGKGLEWV
 GWIAPYSRHPYYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AREYSGWGGSSVGYAMDY WGQGTLV (서열 105)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
 GVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
 (서열 106)

클론 YW327.42.S8

VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GFTFTGTGIH WVRQAPGKGLEWV
 AGIPPVGSYTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWRSLSSGMDY
 WGQGTLV (서열 107)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
 GVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC QQSKTTPPT FGQGTKVEIKR
 (서열 108)

클론 YW327.42.S31

VH
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAAS GFSFTSIGIH WVRQAPGKGLEWV
 AGIPPVGRYTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWRSLSSGMDY
 WGQGTLV (서열 109)

VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
 GVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYMSPLT FGQGTKVEIKR
 (서열 110)



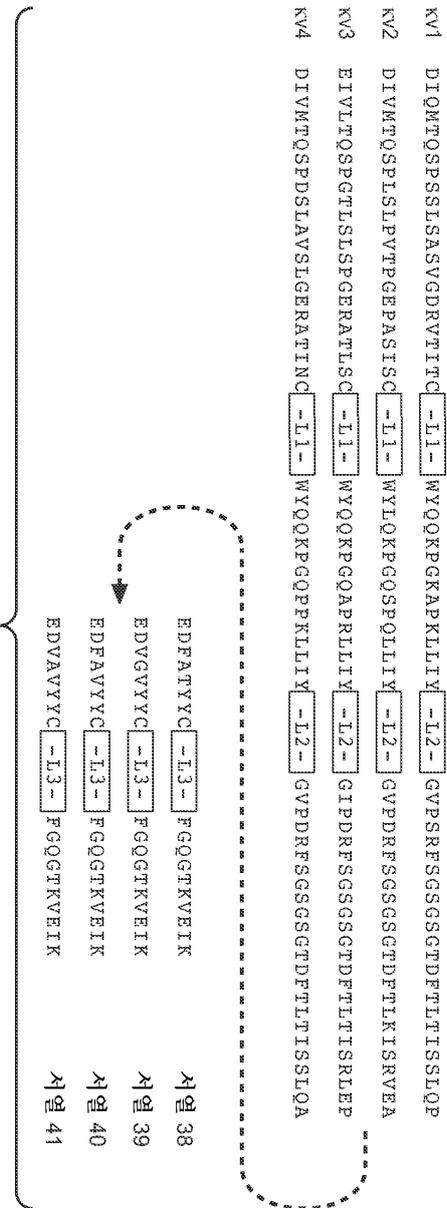
도면3a

I			
A	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKASGCTFTL	-H1-	WVRQAPGGGLEWVG
B	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWMM
C	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEMM
D	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGGGLEWMM
II			
A	QVQLQESGGPGLVKRPSQTLSTLTCTVSSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG
B	QVQLQESGGPGLVKRPSQTLSTLTCTVSS	-H1-	WIRQPPGKGLEWII
C	QVQLQESGGPGLVKRPSQTLSTLTCTVSS	-H1-	WIRQPPGKGLEWII
D	QVQLQESGGPGLVKRPSQTLSTLTCTVSS	-H1-	WIRQPPGKGLEWII
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
수용자			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
계2 수용자			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV

도면3b

I	A	ADTSTSTAYMELSSLSRSEDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 19
	B	ADTSTSTAYMELSSLSRSEDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 20
	C	ADTSTSTAYMELSSLSRSEDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 21
	D	ADTSTSTAYMELSSLSRSEDPTAVYYCC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 22
II	A	VDTSKNQPSIKLSSVTPAADPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 23
	B	VDTSKNQPSIKLSSVTPAADPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 24
	C	VDTSKNQPSIKLSSVTPAADPTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 25
	D	VDTSKNQPSIKLSSVTPAADPTAVYYCC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 26
III	A	RDNSKNTLLYLQMNSTRAREDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 27
	B	RDNSKNTLLYLQMNSTRAREDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 28
	C	RDNSKNTLLYLQMNSTRAREDPTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 29
	D	RDNSKNTLLYLQMNSTRAREDPTAVYYCC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 30
수용자	A	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCSK	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 31
	B	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 32
	C	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 33
계2 수용자	A	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 34
	B	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 35
	C	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 36
	D	ADTISKNTAYLLOMNSTRAEDPTAVYYCC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	시월 37

도면4



도면5

huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 126)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 127)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 164)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 129)

huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 122)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 123)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 154)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 125)

도면6

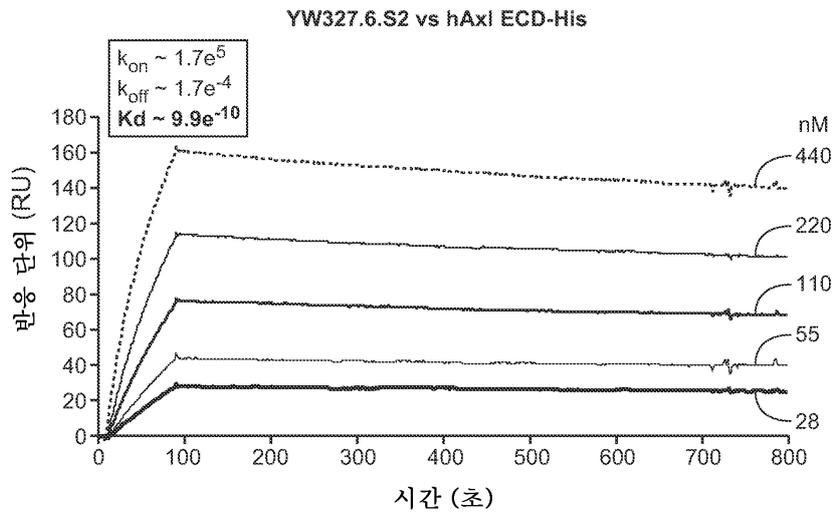
위치 66 (밑줄 표시)에서 변형된 huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 126)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 127)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 128)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 129)

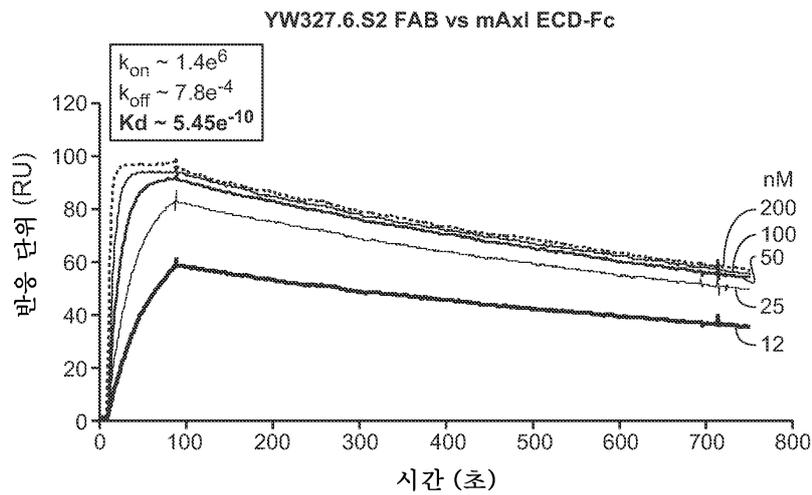
위치 71,73 및 78 (밑줄 표시)에서 변형된 huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 122)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 123)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 124)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 125)

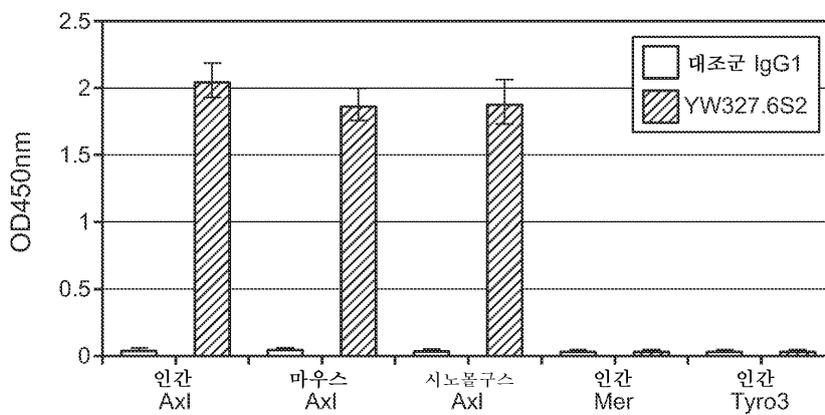
도면7a



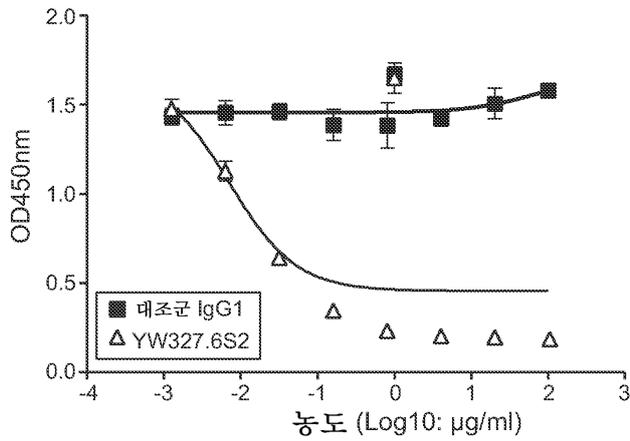
도면7b



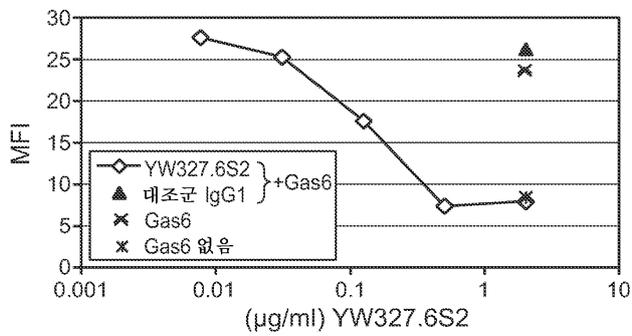
도면7c



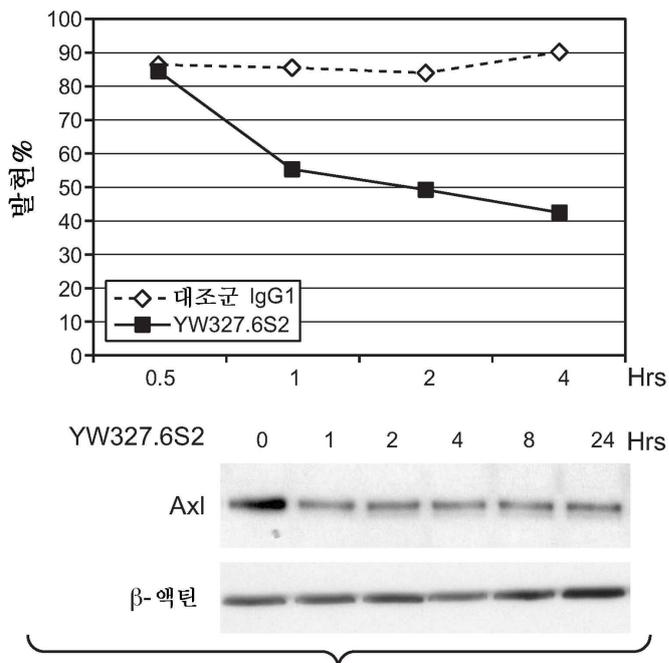
도면7d



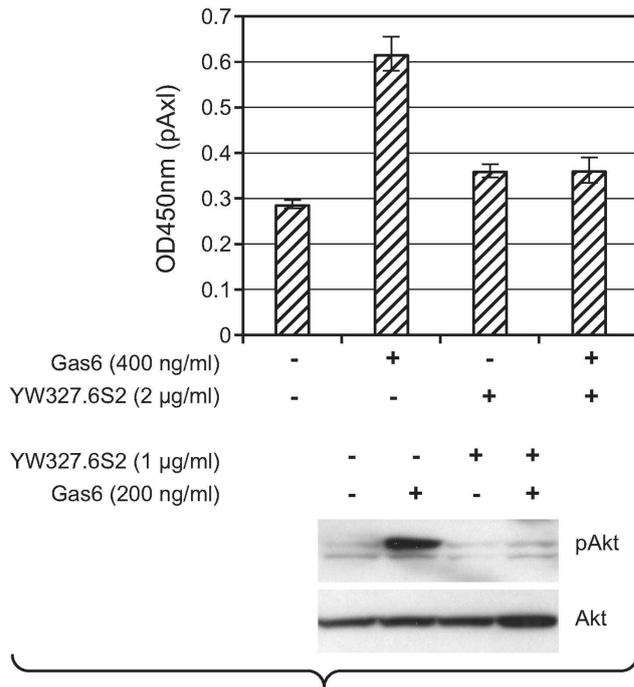
도면7e



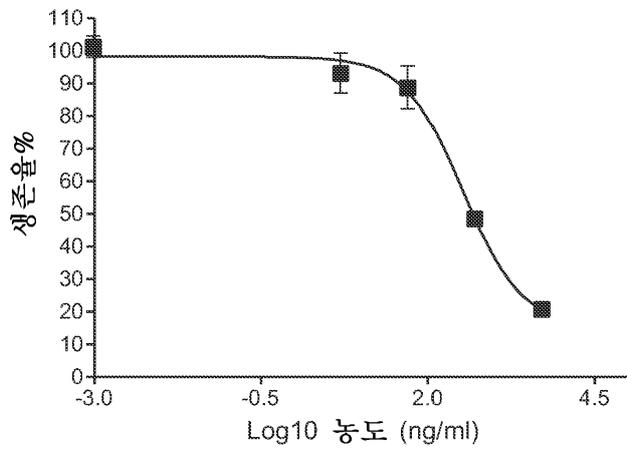
도면7f



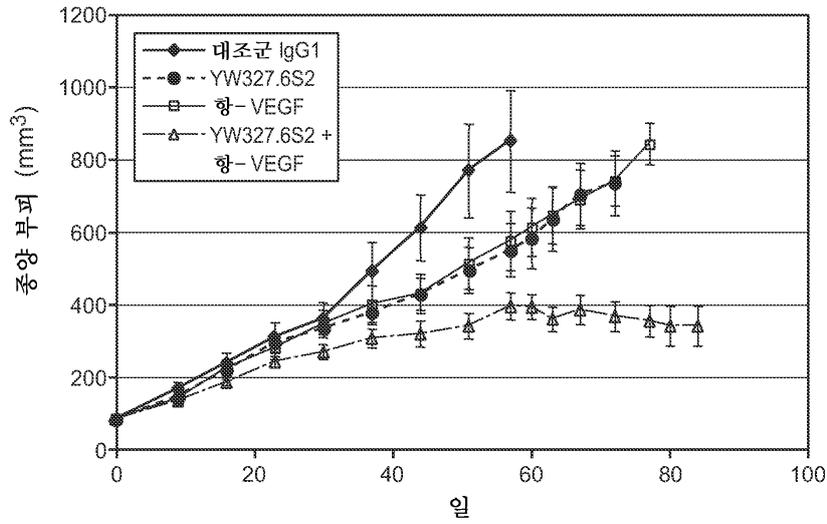
도면7g



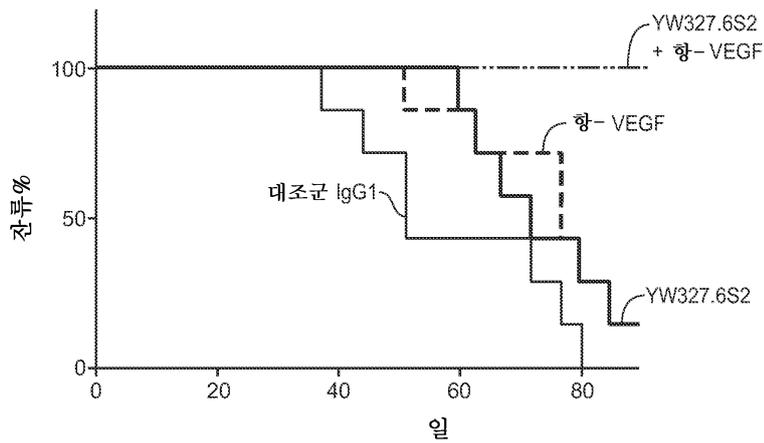
도면7h



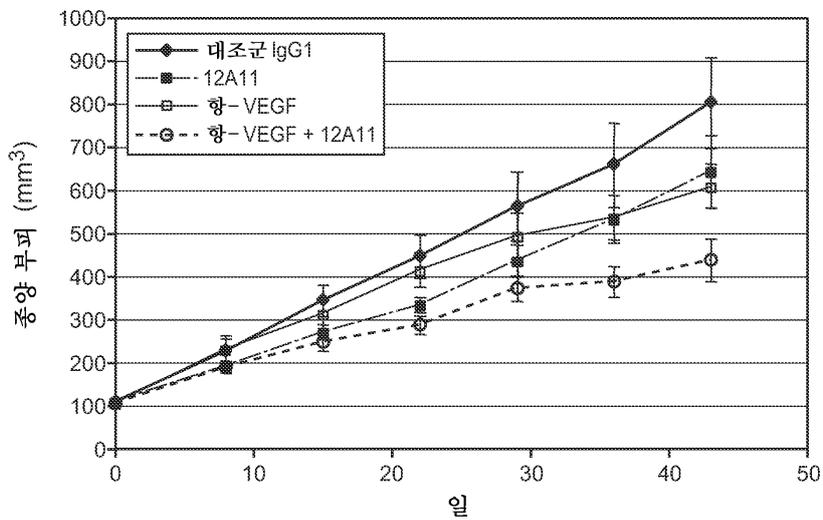
도면8a



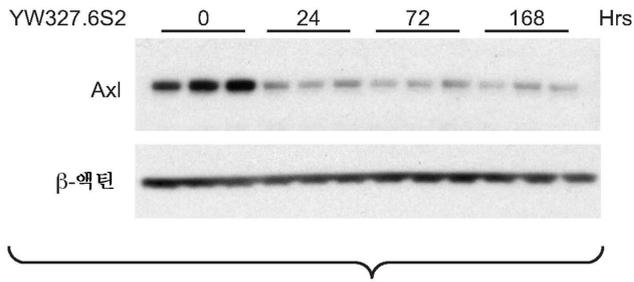
도면8b



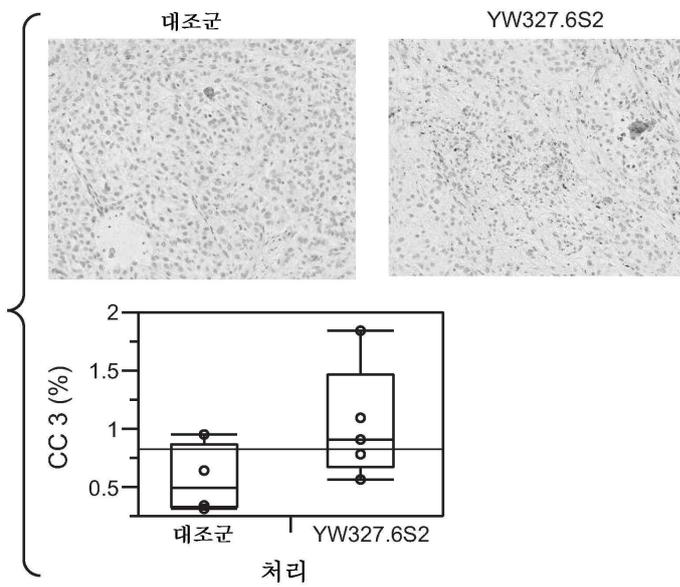
도면8c



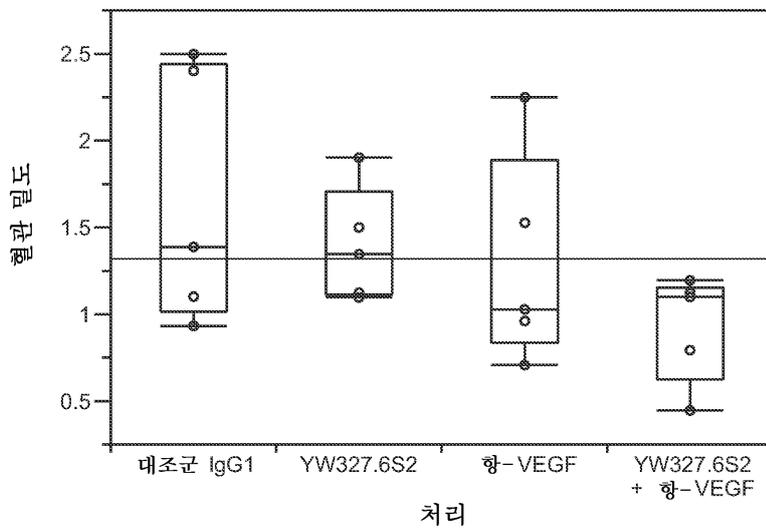
도면8d



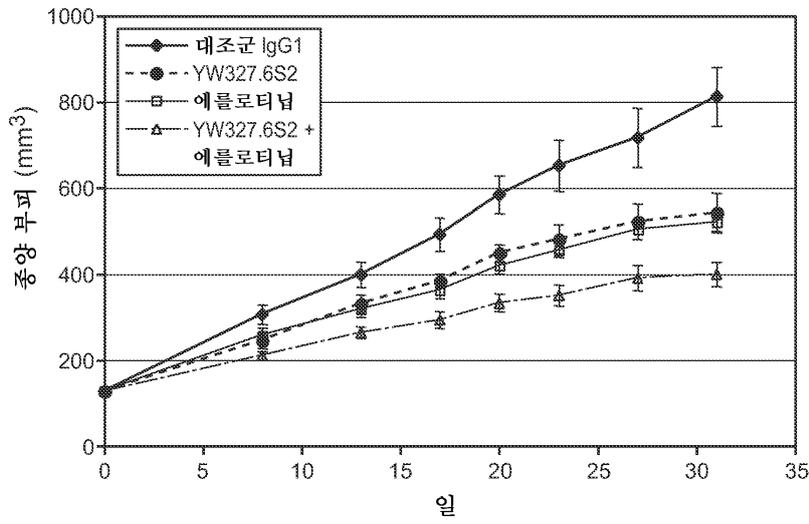
도면8e



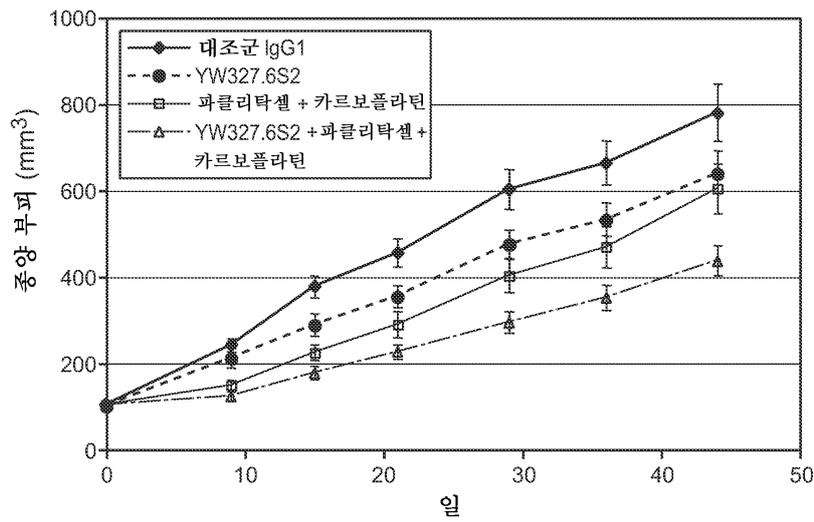
도면8f



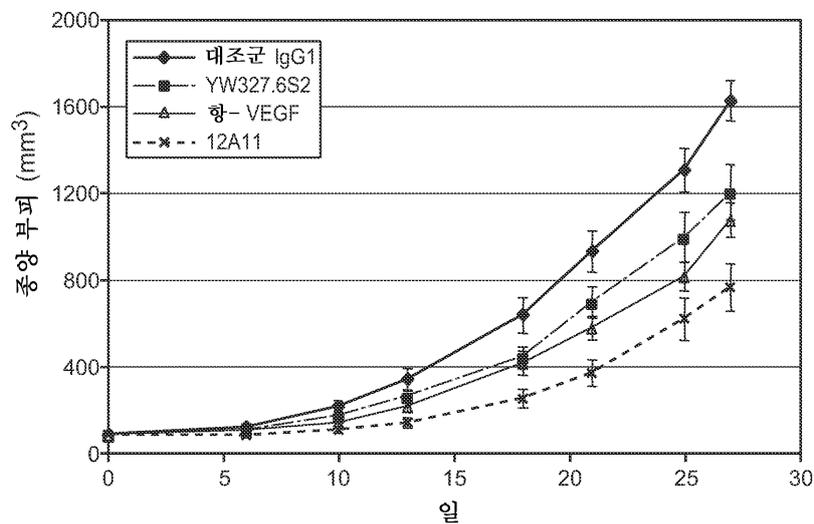
도면9a



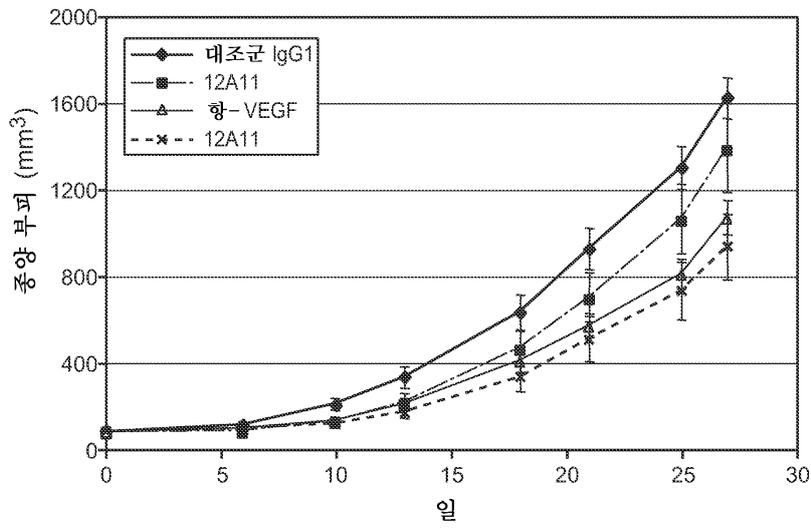
도면9b



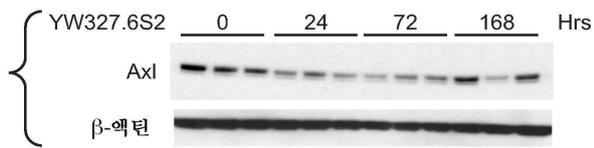
도면10a



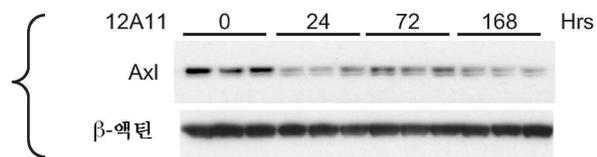
도면10b



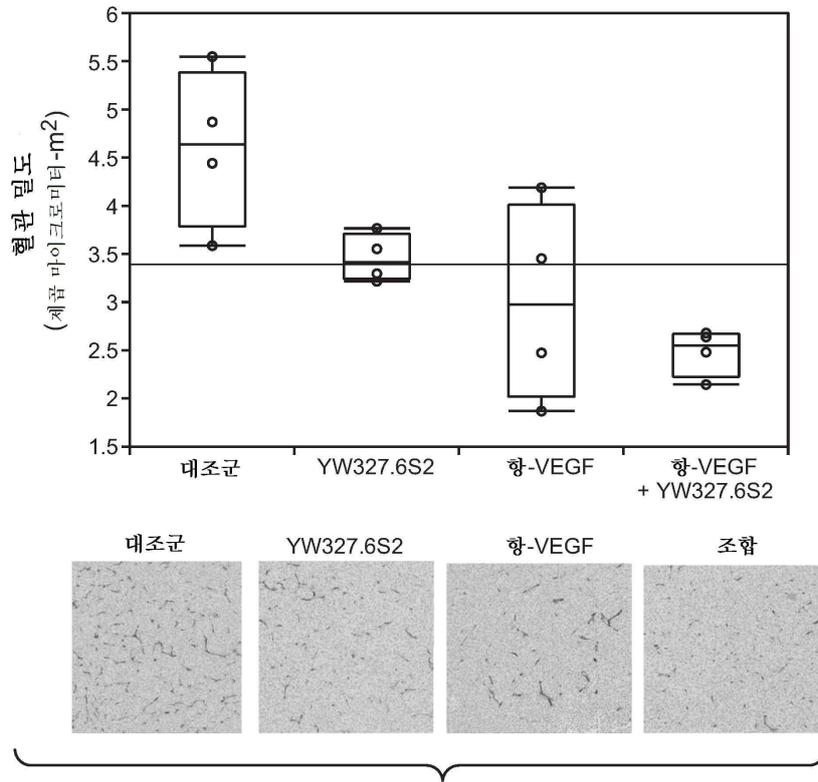
도면10c



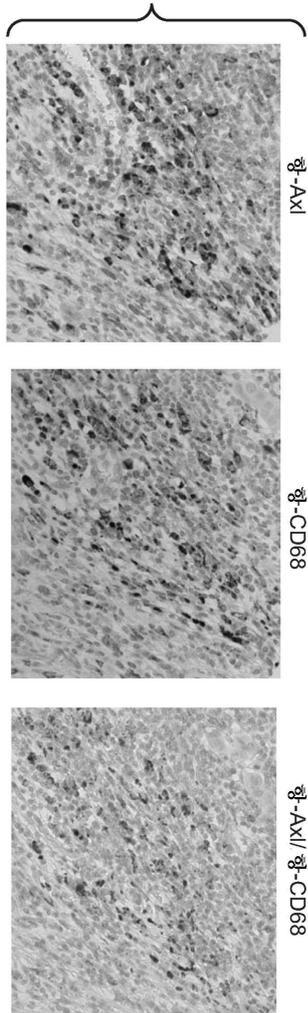
도면10d



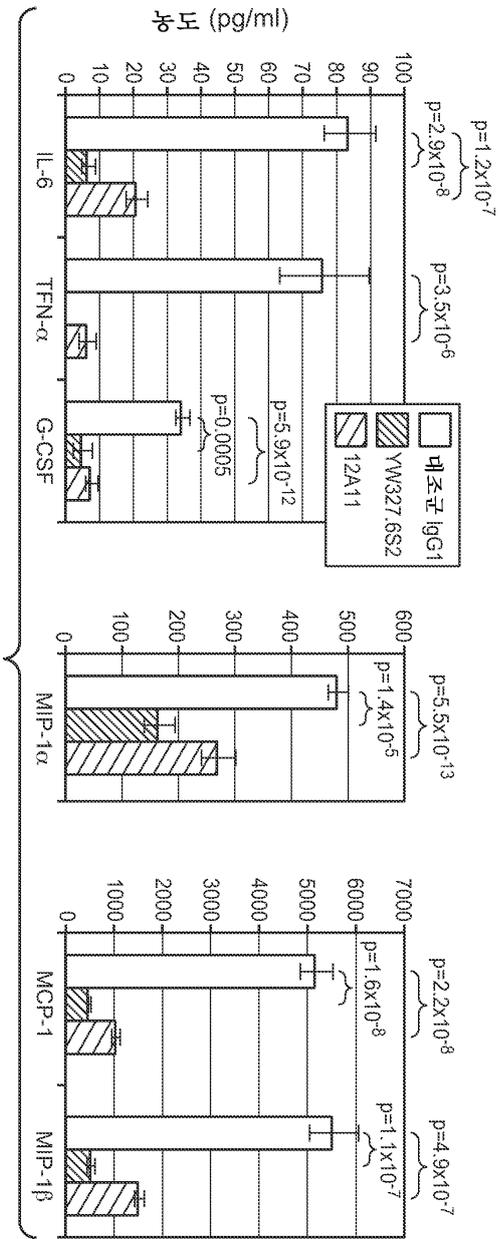
도면10e



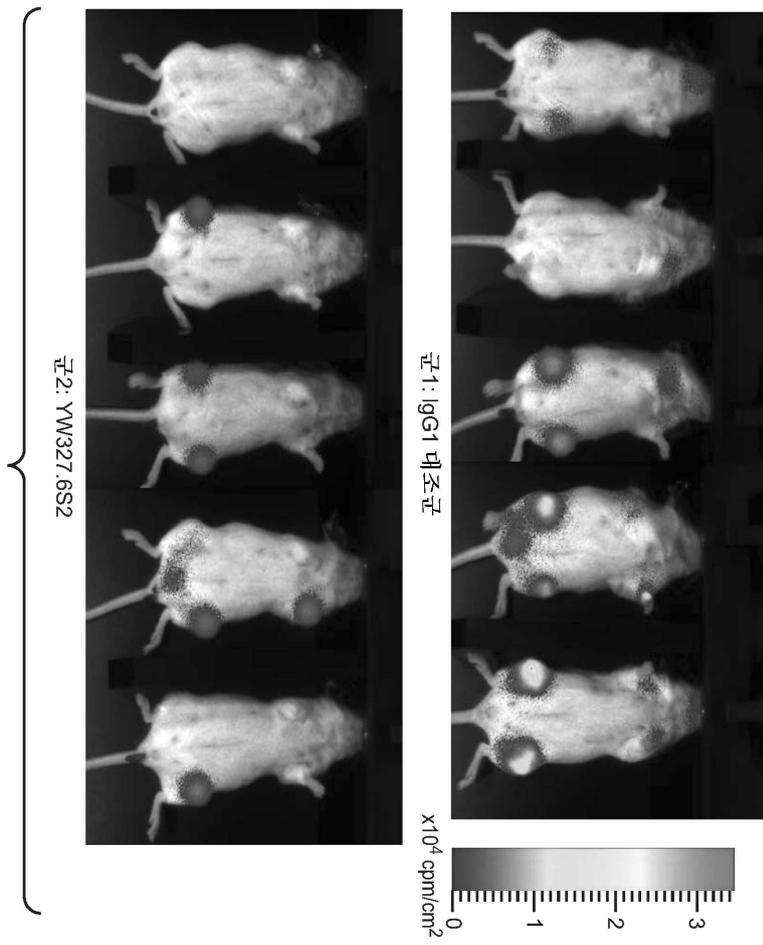
도면10f



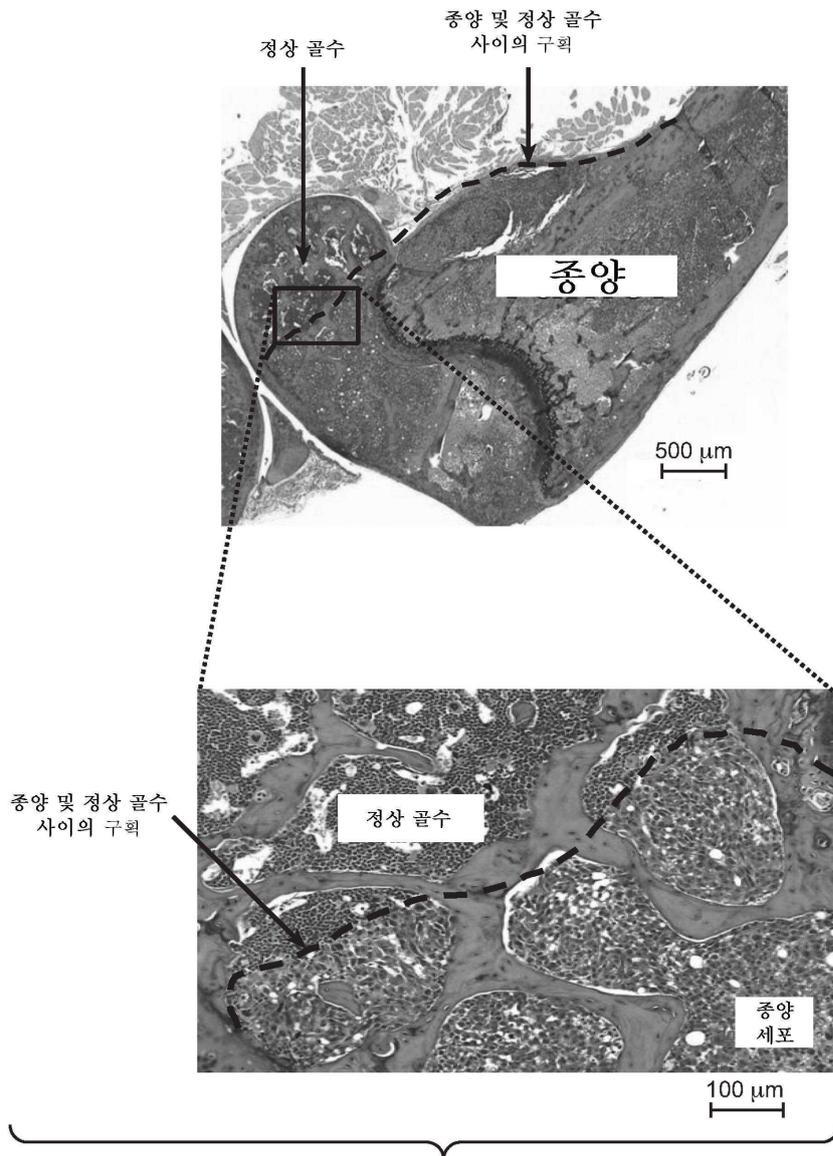
도면10g



도면11a



도면11b



도면12

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNI
 TGARGLTGTLCRLQVQGEPPVHWRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQ
 RITSLQLSDTGGYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSC
 QAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLSLHVPGLNKTSSFSCAEHNAKGVPTSRT
 ATITVLPQQPRNLHLVSRQTELEVAVWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEP
 DPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPL
 GPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTTLE
 LQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVV
 AAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRVYRVRKSYSRRTTEATLNSLG
 ISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSILKVAVKTMKIAICT
 RSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLL
 YSRLGDQPVYLPQMLVKFMADIASGMEYLSKTRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADF
 GLSKKIYNGDYRQCRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEIATRQQT
 YPGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSTFTELREDLNTL
 KALPPAQEPDEIILVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTAAEVHPAGR
 VVLCPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA (서열 165)

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> ANTI-AXL ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> P4436R1-WO

<140><141><150> 61/356,508

<151> 2010-06-18

<160> 166

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Thr Gly His Trp Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

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

<400> 2

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 3

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 7
 Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ser Trp Ile His

1 5 10
 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 8
 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 9
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 9
 Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met

1 5 10 15
 Asp Tyr

<210> 10
 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<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> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr Trp Ile His

1 5 10

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 15

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 17

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 20

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 21

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

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 23

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 24

Gln Gln Ser Tyr Ser Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 27

<

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 27

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Ala Ser Ser Tyr Val Gly Tyr Ala Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 29

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 30

Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Ser Thr

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 31

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 32

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 32

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 33

Ala Arg Glu Tyr Pro Gly Trp Gly Gly Ser Ser Ile Gly Tyr Glu Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

Gln Gln Ser Tyr Tyr Phe Arg Ser Thr

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 38

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 38

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 41

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 44

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 45
 Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 46
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 47
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 48

Gln Gln Ser Lys Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 49

Gly Phe Ser Phe Thr Ser Ile Gly Ile His

1 5 10

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 51

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

1 5 10

<210> 52

<211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 52
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210>
 > 53

<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 53
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 54
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 54
 Gln Gln Ser Tyr Met Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 55
 Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

 peptide

<400> 56

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

 peptide

<400> 57

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

1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

 peptide

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 59

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

Gln Gln Ser Lys Arg Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 61

Gly Phe Ser Val Arg Gly Thr Gly Leu His

1 5 10

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 63
 Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 64
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <400> 65
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 66

Gln Gln Ala Lys Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 67

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 68

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 69

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

1 5 10

<210> 70

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 70
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 71
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 72
 Gln Gln Ala Lys Ser Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 73

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 74

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 74

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

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

1 5 10

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210>

> 77

<211> 7

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 77
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 78
 Gln Gln Ala Lys Arg Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 79
 Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
 1 5 10

<210> 80

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 80
 Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 81

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

1 5 10

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 83

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 84

Gln Gln Ala Lys Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 85

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 86

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 87

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

1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Ile Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 89

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 90

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 91

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 92

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 92

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 93

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

1 5 10

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 94

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 95

Val Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 97

Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His

1 5 10

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 98

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 99

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

1 5 10

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 100

Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Arg Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 101

Val Ala Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 102

Gln Gln Ser Asn Ala Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 103

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 103

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 Ser Leu Ser Gly Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Ala 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 Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met

 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

 115 120

<210> 104

<211> 108

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<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 Tyr Thr Thr Pro Pro

 85 90 95

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

 100 105

<210> 105

<

211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<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 Ser Phe Thr Gly Thr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Trp Ile Ala Pro Tyr Ser Arg His Pro 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 Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<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 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 107

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

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

 35 40 45
Ala Gly Ile Pro Pro Val Gly Ser 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 Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110
Thr Leu Val
 115

<210> 108

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<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

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg

35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser

115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly

130

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Leu, Phe or Val

<220

><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser, Thr or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Gly or Ser

<220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser, His, Thr or Ile
 <220><221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Trp or Gly
 <220><221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ile or Leu
 <400> 112
 Gly Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10
 <210> 113
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Gly or Ala
 <220><221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Trp or Gly
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Asn, Ser, Ala or Pro
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Tyr, Ala or Val
 <220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Arg, Gly or Ser
 <220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Tyr, Ser or His

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Ala, Thr or Pro

<400> 113

Xaa Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 114

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Glu or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Tyr or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser, Asn or Pro

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Gly, Asp or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223>

Trp or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Gly, Arg, Ala or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Gly or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Ser or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Ser, Tyr or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Val, Ile or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Gly or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> Tyr or absent

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Ala, Glu or absent

<400> 114

Ala Arg Xaa Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
 <223> Asp, Ile or Ser
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val or Ile
 <220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser, Gly or Arg
 <220><221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)

 <223> Thr, Ile, Asn or Arg
 <220><221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala or Ser
 <220><221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Val or Leu
 <400> 115
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 1 5 10
 <210> 116
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ser, Ala or Val
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Phe, Asn or Ser
 <220>
 ><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)
 <223> Tyr or Ala
 <400> 116
 Xaa Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1 5
 <210> 117
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide
 <220><221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Ser or Ala
 <220><221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr, Lys or Asn
 <220><221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr, Ser, Tyr, Met, Arg or Ala
 <220><221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Thr, Asn, Ser or Phe

 <220><221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Pro or Arg
 <220><221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Pro, Tyr, Ser or Leu
 <400> 117
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5
 <210> 118
 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Thr or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Phe or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Thr or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> His, Ser or Thr

<400> 118

Gly Phe Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Trp Ile His

1 5 10

<210> 119

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Ser, Asn or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Gly, Arg or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Gly or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Ser, Tyr or His

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Thr, Ala or Pro

<400> 119

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 120

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ser, Asn or Pro

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Gly or Asp

<220>

><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Gly, Arg or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Gly or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Ser or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Val or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Ala or Glu

<400> 120

Ala Arg Glu Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Thr, Ser or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Thr, Asn, Ser or Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Pro or Arg

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro, Tyr or Ser

<400> 121

Gln Gln Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr

1 5

<210> 122

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 122

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

 20 25

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 123

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

1 5 10

<210> 124

<211>

> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 124

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 126

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 126

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

20

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 127

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

1 5 10 15

<210> 128

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 128

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 129

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 130

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His

65 70 75 80

Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly

85 90 95

Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu

100

<210> 131

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 131

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 132

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 132

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

1 5 10

<210> 133

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 133

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 134

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 134

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

 20 25

<210> 135

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 135

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

1 5 10

<210> 136

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 136

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 137

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 137

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

<210> 138

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 138

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30

<210> 139

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 139

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 140

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 140

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

1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 141

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 141

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 142

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 142

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

1 5 10

<210> 143

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 143

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

20 25 30

<210> 144

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 144

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 145

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 145

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
 20 25 30

<210> 146

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 146

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 147

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 147

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 148

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 148

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 149

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 149

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 Asn Ile Lys

 20 25 30

<210> 150

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 150

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 151

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 151

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 152

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 152

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 153

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 153

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 154

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 154

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 155

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 155

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys

 20

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 156

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

1 5 10 15

<210> 157

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 157

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 158

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 158

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 159

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 159

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

1 5 10 15

<210> 160

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 160

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 161

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 161

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

 20

<210> 162

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 162

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

1 5 10 15

<210> 163

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 163

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 164

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 164

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 165

<211> 885

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

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

1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala

 20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg

 35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro

 50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp

 85 90 95

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

 100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser

 115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp

 165 170 175

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

 180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His

195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu

210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu

225 230 235 240

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

Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu
 500 505 510
 Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala
 515 520 525
 Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly
 530 535 540
 Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met
 545 550 555 560
 Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu
 565 570 575
 Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile
 580 585 590
 Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val
 595 600 605
 Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu
 610 615 620
 Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu
 625 630 635 640
 Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr
 645 650 655
 Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn
 660 665 670
 Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile
 675 680 685
 Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val
 690 695 700
 Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys
 705 710 715 720
 Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg
 725 730 735
 Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr

