



등록특허 10-2367723



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월28일
(11) 등록번호 10-2367723
(24) 등록일자 2022년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7028912(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월15일
심사청구일자 2020년11월05일
- (85) 번역문제출일자 2020년10월08일
- (65) 공개번호 10-2020-0121370
- (43) 공개일자 2020년10월23일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7030406
원출원일자(국제) 2013년03월15일
심사청구일자 2019년11월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/031836
- (87) 국제공개번호 WO 2013/148296
국제공개일자 2013년10월03일
- (30) 우선권주장
61/616,845 2012년03월28일 미국(US)
1350953 2013년02월04일 프랑스(FR)

- (56) 선행기술조사문헌
Biochimia et Biophysica Acta, Vol 842, Pages 90-99(1985)
KR1020090088891 A
KR1020100100857 A
Regulatory Peptide, Vol.33, pp.321-329(1991.)

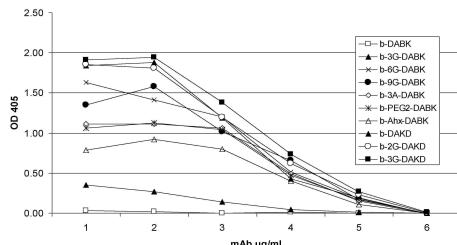
전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 브라디키닌 B1 수용체 리간드에 대한 항체

(57) 요약

본 개시는 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 또한, 본 개시는, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 암호화하는 핵산, 이러한 항체 또는 이의 단편을 제조하기 위한 재조합 밸현 벡터, 및 속주 세포뿐만 아니라 약학적 조성물을 제공한다. 생체 내 또는 시험관 내에서 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘에 대한 항체(여기서 칼리딘은 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘을 포함하는 것으로 간주된다)에 대한 활성화된 항체를 제공하는 것이다.

대 표 도 - 도1

칼리딘 활성을 조절하거나 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘을 검출하기 위해 본 개시의 항체를 사용하는 방법이 또한 본 발명에 의해 제공된다. 또한, 본 개시는 des-Arg₉-브라디키닌 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07H 21/04 (2013.01)

C07K 16/26 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 2299/00 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

장, 지에

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 알렉시스 코트 6

프리츠커, 알라

미국 07751 뉴저지주 모르간빌 브램블 드라이브

142

데이비슨, 매튜

미국 07853 뉴저지주 롱 밸리 글렌 럿지 드라이브

50

보랭, 니콜라

프랑스 애프-91290 아르파종 뤼 두 독투르 루이 바
뱅 22

서브라마니안, 고빈단

미국 08502 뉴저지주 멜레 미드 보이스 레인 28

챈, 신

미국 08820 뉴저지주 에디슨 마르타 스트리트 14

명세서

청구범위

청구항 1

i) 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3) 아미노산 서열, 중쇄 상보성 결정 영역 2 (HCDR2) 아미노산 서열, 및 중쇄 상보성 결정 영역 1 (HCDR1) 아미노산 서열:

a) 각각, 서열번호 32,

서열번호 33, 및

서열번호 34;

b) 각각, 서열번호 40,

서열번호 41, 및

서열번호 42;

c) 각각, 서열번호 47,

서열번호 48, 및

서열번호 49;

d) 각각, 서열번호 55,

서열번호 56, 및

서열번호 57; 및

ii) 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3) 아미노산 서열, 경쇄 상보성 결정 영역 2 (LCDR2) 아미노산 서열, 및 경쇄 상보성 결정 영역 1 (LCDR1) 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역:

e) 각각, 서열번호 35,

서열번호 36, 및

서열번호 37;

f) 각각, 서열번호 43,

서열번호 17, 및

서열번호 44;

g) 각각, 서열번호 50,

서열번호 51, 및

서열번호 52; 및

h) 각각, 서열번호 58,

서열번호 59, 및

서열번호 60;

을 포함하는, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

칼리딘(KD) 또는 desArg₁₀-칼리딘(DAKD)의 4번 프롤린에 2형 타이트 턴(type II tight turn)을 포함하는 Pro4 킹크(kink) 구조를 채택한 KD 또는 DAKD의 구조적 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, KD 또는 DAKD의 Pro4 킹크 구조가 공간적으로 적층된 방식으로 아미노산의 소수성 측쇄를 정렬하는 S자 형상의 아미노산 반복을 더 포함하는 것인 항체 또는 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 진단제 또는 치료제에 접합된 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 6

제5항의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 7

제6항의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 8

칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체가 숙주 세포에 의해 생성되도록 하는 조건 하에 제7항의 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 통증 또는 염증의 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 통증이 만성 통증이고, 염증이 만성 염증인 약학적 조성물.

청구항 11

인간이 아닌 동물을, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열로 구성되고 웨პ티드의 아미노 말단 아르기닌이 링커 모이어티를 통해 담체 모이어티와 간접적으로 연결된 웨პ티드를 포함하는 면역원으로 면역화함으로써 des-Arg₉-브라디키닌, des-Arg₁₀-칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 웨პ티드에 특이적으로 결합하는 항체가 동물의 면역계에 의해 생성되도록 하는 단계를 포함하는, des-Arg₉-브라디키닌 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 웨პ티드에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 인간이 아닌 동물로부터 상기 항체, 상기 항체를 암호화하는 핵산, 또는 상기 항체를 발현하는 면역 세포를 단리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 담체 모이어티가 단백질인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 단백질이 키홀 림펫 혈모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH)인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 링커 모이어티가 [Gly-Gly-Gly]_n을 포함하고, 여기서 n은 1 이상인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

- a) 각각 서열번호 32, 33 및 34에 기재된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- b) 각각 서열번호 35, 36 및 37에 기재된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 17

제1항에 있어서,

- a) 각각 서열번호 40, 41 및 42에 기재된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- b) 각각 서열번호 43, 47 및 44에 기재된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 18

제1항에 있어서,

- a) 각각 서열번호 47, 48 및 49에 기재된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- b) 각각 서열번호 50, 51 및 52에 기재된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 19

제1항에 있어서,

- a) 각각 서열번호 55, 56 및 57에 기재된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- b) 각각 서열번호 58, 59 및 60에 기재된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2012년 3월 28일에 출원된 미국 가출원 제61/616,845호 및 2013년 2월 4일에 출원된 프랑스 특허 출원 제1350953호의 우선권을 주장한다. 이들 출원의 내용은 그 전체가 각각 참조로서 본원에 포함된다.

[0003] 본 발명은 브라디키닌 B1 수용체 리간드에 대한 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 브라디키닌 B1 수용체는 염증성 질환의 발병 및 만성 통증에 연루되어 왔다. 조직 염증 및 신장 섬유증을 조절함으로써, B1 수용체는 또한 말기 신부전의 주요 원인인 만성 신장 질환뿐 아니라 급성 신부전의 발병과 연관되어 왔다.

[0005] 사람에서, 브라디키닌 B1 수용체의 주요 아고니스트는 키닌이다. 키닌은 키니노겐 단백질의 단백질 가수분해로부터 생성된 생리활성 펩티드이다. 브라디키닌 B1 수용체의 주요한 키닌 아고니스트는 데카펩티드 칼리딘 및 노나펩티드 des-Arg₁₀-칼리딘(단백질 가수분해 C-말단 아르기닌 형태 칼리딘에 의해 형성됨)이다. 따라서, 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘의 브라디키닌 B1 수용체에 대한 결합을 저해할 수 있는 제제는 브라디키닌 B1 수용체 매개 병리를 치료하거나 예방할 가능성을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 브라디키닌 B1 수용체 매개 인간 병리의 치료에 사용하기 위해 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘의 브라디키닌 B1 수용체에 대한 결합을 저해하는 신규한 제제에 대한 필요성이 당해 분야에 존재한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하고 브라디키닌 B1 수용체에 대한 결합을 방지하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 이러한 항체는 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애(예컨대, 통증 또는 섬유증)를 치료하는 데 특히 유용하다. 본 발명은, 또한, 항 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 항체를 암호화하는 핵산, 이러한 항체 또는 이의 단편을 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포뿐 아니라 약학적 조성물을 제공한다. 시험관 내 또는 생체 내에서 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘을 검출하거나 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘의 활성을 조절하기 위해 본 발명의 항체, 또는 이의 단편을 사용하는 방법이 또한 본 발명에 포함된다. 또한, 본 발명은 des-Arg₉-브라디키닌 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하기 위한 방법을 제공한다.

[0008] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은:

[0009] a) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않거나;

[0010] b) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 1×10^{-10} M 미만의 KD로 특이적으로 결합하거나;

[0011] c) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만의 K_{off} 로 특이적으로 결합하거나;

[0012] d) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하고 브라디키닌 B1 수용체에 결합하는 것을 저해하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0013] 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘의 N-말단 라이신 잔기에 결합한다.

[0014] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘의 브라디키닌-1 수용체에 대한 결합을 저해한다.

[0015] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 칼리딘 유사 펩티드(KLP)에 특이적으로 결합한다.

[0016] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:

- [0017] a) 서열번호 7 [X₁YX₂X₃D X₄HAM X₅Y],
- [0018] 이 때, X₁은 Y, F 또는 H,
- [0019] X₂는 R, D, A, V, L, I, M, F, Y 또는 W,
- [0020] X₃는 Y, F, W 또는 H,
- [0021] X₄는 D, E 또는 Y이고
- [0022] X₅는 D 또는 E임;
- [0023] b) 서열번호 63 [X₁EYDGX₂YX₃X₄LDX₅],
- [0024] 이 때, X₁은 W 또는 F,
- [0025] X₂는 N 또는 아미노산 없음;
- [0026] X₃는 Y 또는 S,
- [0027] X₄는 D 또는 P이고
- [0028] X₅는 F 또는 Y임;
- [0029] c) 서열번호 13;
- [0030] d) 서열번호 32;
- [0031] e) 서열번호 40;
- [0032] f) 서열번호 47; 및
- [0033] g) 서열번호 55로 이루어진 군으로부터 선택된 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0034] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0035] a) 서열번호 8 [YFX₁PX₂NGNTGYNQKFRG],
- [0036] 이 때, X₁은 D, R, A, V, L, I, M, F, Y 또는 W이고,
- [0037] X₂는 Y, D, E, N, 또는 Q임;
- [0038] b) 서열번호 64 [WX₁DPENGDX₂X₃YAPKFQG],
- [0039] 이 때, X₁는 I, 또는 V,
- [0040] X₂는 T, 또는 S이고,
- [0041] X₃는 G, 또는 D임;
- [0042] c) 서열번호 14
- [0043] d) 서열번호 33;
- [0044] e) 서열번호 41;
- [0045] f) 서열번호 48; 및
- [0046] g) 서열번호 56으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCDR2 아미노산 서열을 포함한다.
- [0047] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0048] a) 서열번호 9 [GYSFTDYX₁IY], 이 때 X₁은 N, W 또는 Y임;

- [0049] b) 서열번호 65 [GFNIKDYYX₁H], Ⓛ 때 X₁은 L, 또는 M임;
- [0050] c) 서열번호 15;
- [0051] d) 서열번호 34;
- [0052] e) 서열번호 42;
- [0053] f) 서열번호 49; 및
- [0054] g) 서열번호 57로 이루어진 군으로부터 선택된 HCDR1 아미노산 서열을 포함한다.
- [0055] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0056] a) 서열번호 10 [QQ X₁ X₂S X₃P X₄T],
- [0057] Ⓛ 때, X₁은 Y, F 또는 H,
- [0058] X₂는 Y, F, H 또는 W,
- [0059] X₃는 Y, F, T 또는 H이고,
- [0060] X₄는 W, Y, F, H 또는 L임;
- [0061] b) 서열번호 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T],
- [0062] Ⓛ 때, X₁은 Q 또는 N,
- [0063] X₂는 Y, F, D 또는 H,
- [0064] X₃는 Y, F, H 또는 W,
- [0065] X₄는 Y, F, T 또는 H이고
- [0066] X₅는 W, Y, F, H 또는 L임;
- [0067] c) 서열번호 69 [X₁QGTHFPYT], Ⓛ 때, X₁은 L 또는 M임;
- [0068] d) 서열번호 16;
- [0069] e) 서열번호 35;
- [0070] f) 서열번호 43;
- [0071] g) 서열번호 50; 및
- [0072] h) 서열번호 58로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0073] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0074] a) 서열번호 11 [WASTRX₁], Ⓛ 때 X₁은 E, D, Q 또는 N임;
- [0075] b) 서열번호 67 [X₂ASTRX₂],
- [0076] Ⓛ 때, X₁은 W 또는 G이고,
- [0077] X₂는 E, D, Q 또는 N임;
- [0078] c) 서열번호 17;
- [0079] d) 서열번호 36;
- [0080] e) 서열번호 51; 및

- [0081] f) 서열번호 59로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR2 아미노산 서열을 포함한다.
- [0082] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0083] a) 서열번호 12 [KSSQSLL X₁SSNQKN X₂LA],
- [0084] i) 때, X₁은 W, H, Y 또는 F이고,
- [0085] X₂는 H 또는 Y임;
- [0086] b) 서열번호 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA],
- [0087] i) 때, X₁은 W, H, Y 또는 F,
- [0088] X₂는 S 또는 G,
- [0089] X₃는 N 또는 D,
- [0090] X₄는 K 또는 R,
- [0091] X₅는 H 또는 Y임.
- [0092] c) 서열번호 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], i) 때, X₁은 K 또는 E임;
- [0093] b) 서열번호 18;
- [0094] c) 서열번호 37;
- [0095] d) 서열번호 44;
- [0096] e) 서열번호 52; 및
- [0097] f) 서열번호 60으로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR1 아미노산 서열을 포함한다.
- [0098] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0099] a) 서열번호 10 [QQ X₁ X₂S X₃P X₄T],
- [0100] i) 때, X₁은 Y, F 또는 H,
- [0101] X₂는 Y, F, H 또는 W,
- [0102] X₃는 Y, F, T 또는 H이고,
- [0103] X₄는 W, Y, F, H 또는 L임:
- [0104] b) 서열번호 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T],
- [0105] i) 때, X₁은 Q 또는 N,
- [0106] X₂는 Y, F, D 또는 H,
- [0107] X₃는 Y, F, H 또는 W,
- [0108] X₄는 Y, F, T 또는 H이고,
- [0109] X₅는 W, Y, F, H 또는 L임;
- [0110] c) 서열번호 69 [X₁QGTHFPYT], i) 때, X₁은 L 또는 M임;
- [0111] d) 서열번호 16;

- [0112] e) 서열번호 35;
- [0113] f) 서열번호 43;
- [0114] g) 서열번호 50; 및
- [0115] h) 서열번호 58로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0116] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0117] a) 서열번호 11 [WASTRX₁], 이 때, X₁은 E, D, Q 또는 N임;
- [0118] b) 서열번호 67 [X₁ASTRX₂],
- [0119] i) 때, X₁은 W 또는 G이고,
- [0120] X₂는 E, D, Q 또는 N임;
- [0121] c) 서열번호 17;
- [0122] d) 서열번호 36;
- [0123] e) 서열번호 51; 및
- [0124] f) 서열번호 59로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR2 아미노산 서열을 포함한다.
- [0125] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0126] a) 서열번호 12 [KSSQSLL X₁SSNQKN X₂LA], 이 때, X₁은 W, H, Y 또는 F이고,
- [0127] X₂는 H 또는 Y임;
- [0128] b) 서열번호 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA],
- [0129] i) 때, X₁은 W, H, Y 또는 F,
- [0130] X₂는 S 또는 G,
- [0131] X₃는 N 또는 D,
- [0132] X₄는 K 또는 R,
- [0133] X₅는 H 또는 Y임.
- [0134] c) 서열번호 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], 이 때, X₁는 K 또는 E임;
- [0135] b) 서열번호 18;
- [0136] c) 서열번호 37;
- [0137] d) 서열번호 44;
- [0138] e) 서열번호 52; 및
- [0139] f) 서열번호 60으로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR1 아미노산 서열을 포함한다.
- [0140] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 13, 14 및 15에 각각 기재된 HCDR3, HCGR2, HCGR1 영역 아미노 서열 및 카바트(kabat)에 따른 H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87, 및 H108로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0141] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 16, 17 및 18에 각각 기재된 LCDR3, LCDR2, LCDR1 영역 아미노 서열 및 카바트에 따른 L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78, L79, L83, L85, L100 및 L104로 이루어진 군으로부터 선택된 위치의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

다.

[0142] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53, 및 61로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 가지는 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0143] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54, 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 가지는 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0144] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54, 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 가지는 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0145] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53, 및 61로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0146] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54, 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다.

[0147] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54, 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0148] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 19 및 26, 서열번호 20 및 27, 서열번호 21 및 28; 서열번호 22 및 28; 서열번호 23 및 29; 서열번호 24 및 30; 서열번호 25 및 31; 서열번호 38 및 39, 서열 번호 45 및 46, 서열번호 53 및 54, 또는 서열번호 61 및 62에 각각 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0149] 다른 양태에서, 본 발명은 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하되, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 결합하기 위해 서열번호 19 및 26, 서열번호 38 및 39, 서열번호 45 및 46, 서열번호 53 및 54, 또는 서열번호 61 및 62에 각각 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체와 경쟁한다.

[0150] 다른 양태에서, 본 발명은 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 결합하기 위해 선행하는 청구항 중 어느 한 항의 항체와 경쟁하고 브라디키닌 또는 desArg₉-브라디키닌에 결합하지 않는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0151] 다른 양태에서, 본 발명은 칼리딘(KD) 또는 desArg10-칼리딘(DAKD)의 4번 프롤린에 2형 타이트 턴(type II tight turn)을 포함하는 Pro4 킹크(kink) 구조를 채택한 KD 또는 DAKD의 구조적 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일 구현예에서, KD 또는 DAKD의 Pro4 킹크 구조는 공간적으로 적충된 방식으로 아미노산의 소수성 측쇄를 정렬하는 S자 형상의 아미노산 반복을 더 포함한다. 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다: (a) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에는 특이적으로 결합하지만 브라디키닌 또는 des-Arg₉-브라디키닌에는 특이적으로 결합하지 않거나; (b) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 1×10^{-10} M 미만의 KD로 특이적으로 결합하거나; (c) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 1×10^{-4} S⁻¹ 미만의 K_{off}로 특이적으로 결합하거나; (d) 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하고 브라디키닌 B1 수용체에 대한 결합을 저해한다.

[0152] 다른 양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 진단제 또는 치료제에 접합된다.

[0153] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 아미노산 서열을 암호화하는 단리된 핵산을 제공한다.

[0154] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0155] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

- [0156] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체가 숙주 세포에 의해 생성되는 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0157] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0158] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다.
- [0159] 일 구현예에서, 질환 또는 장애는 만성 통증이다.
- [0160] 다른 양태에서, 본 발명은 동물을 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열로 구성되고, 웨티드의 아미노 말단 아르기닌이 링커 모이어티를 통해 담체 모이어티와 간접적으로 연결된 웨티드를 포함하는 면역원으로 면역화함으로써 des-Arg₉-브라디키닌, des-Arg₁₀-칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 웨티드에 특이적으로 결합하는 항체가 동물의 면역계에 의해 생성되는 단계를 포함하는 des-Arg₉-브라디키닌 및 des-Arg₁₀-칼리딘 유사 웨티드에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0161] 다른 구현예에서, 방법은 동물로부터 항체, 항체를 암호화하는 핵의 단리체, 또는 항체를 발현하는 면역 세포를 단리하는 단계를 더 포함한다.
- [0162] 일 구현예에서, 담체 모이어티는 단백질이다. 다른 구현예에서, 단백질은 키홀 림펫 해모시아닌(keyhole limpet hemocyanin, KLH)이다. 다른 구현예에서, 링커 모이어티는 [Gly-Gly-Gly]_n(n은 1이상)을 포함한다.
- ### 도면의 간단한 설명
- [0163] 도 1은 키닌 웨티드에 대한 EE1 항체의 결합을 보여주는 ELISA 검정 결과를 도시한 것이다.
- 도 2는 항체 F151의 시차주사열량분석 측정 결과를 도시한 것이다.
- 도 3은 뮤라인 및 인간화 F151 항체의 가변 영역의 아미노산 서열 정렬을 도시한 것이다. 모든 동일한 잔기들이 정렬 내에 나열되며, 상동성 잔기들은 "+" 표시에 의해 식별되고 비 상동성 잔기들은 빈칸으로 남겨진다.
- 도 4는 F151 항체/칼리딘 복합체의 항원 결합 자리의 전자 밀도 지도를 도시한 것이다.
- 도 5는 F151 항체/des-Arg10-칼리딘 복합체의 항원 결합 자리의 전자 밀도 지도를 도시한 것이다.
- 도 6은 칼리딘에 결합한 F151의 Fv 서브유닛의 리본 및 막대도를 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 예시적인 뮤라인 항 칼리딘 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 정렬을 도시한 것이다. 칼리딘과 상호작용하는 아미노산 잔기는 별표로 표시되어 있다.
- 도 8은 본 발명의 예시적인 뮤라인 항 칼리딘 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 정렬을 도시한 것이다. 칼리딘과 상호작용하는 아미노산 잔기는 별표로 표시되어 있다.
- 도 9는 포르말린으로 유도된 급성 염증성 통증에 대한 EE1 항체의 효과를 결정하는 생체 내 실험의 결과를 도시한 것이다.
- 도 10은 CFA로 유도된 기계적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과를 결정하는 생체 내 실험의 결과를 도시한 것이다.
- 도 11은 CFA로 유도된 열적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과를 결정하는 생체 내 실험의 결과를 도시한 것이다.
- 도 12는 CCI로 유도된 기계적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과를 결정하는 생체 내 실험의 결과를 도시한 것이다.
- 도 13은 CCI로 유도된 열적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과를 결정하는 생체 내 실험의 결과를 도시한 것이다.
- 도 14는 굽은 글씨 및 밑줄 친 추정서열로서 나타낸 제한 DNA 엔도뉴클라제 자리를 가지는 인간화 F151 변이체 HC3a/LC3a를 생성하기 위한 VL 및 VH 발현 컨스트럭트의 개략적인 지도를 도시한 것이다. 패널 a는 경쇄를 도시한 것이고, 패널 b는 중쇄를 도시한 것이다.

도 15는 F151 중쇄(a) 및 경쇄(b) 아미노산 서열과 가장 유사한 인간 생식계열 아미노산 서열의 정렬을 도시한 것이다.

도 16은 F151 중쇄(a) 및 경쇄(b)와 VH1 서브 패밀리의 중쇄 유전자위(1 내지 08 및 1 내지 18) 및 경쇄(V IV-B3) 유전자위의 정렬을 도시한 것이다. CDR 영역 및 베르니어(Vernier) 영역은 짙은 활자로 나타나 있으며, 인간화 돌연변이는 밑줄 친 곳이다.

도 17은, F151 항체에 결합된, 프롤린 4번에 2형 타이트 턴(tight turn)을 포함하는 칼리딘(KD)의 주쇄 폴리펩티드 골격 구조(c)의 2차(a) 및 3차(b) 구조를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0164]

본 발명은 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하고 브라디키닌 B1 수용체에 대한 결합을 방지하는 항체를 제공한다. 이러한 항체는 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애(예컨대, 통증)을 치료하는 데 특히 유용하다. 본 발명은, 또한, 항 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 항체를 암호화하는 핵산, 이러한 항체 또는 이의 단편을 제조하기 위한 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포뿐 아니라 약학적 조성물을 제공한다. 시험관 내 또는 생체 내에서 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘을 검출하거나 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘의 활성을 조절하기 위해 본 발명의 항체를 사용하는 방법이 또한 본 발명에 포함된다.

[0165]

I. 정의

[0166]

본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위해서, 일정 용어들이 우선 정의된다.

[0167]

본원에 사용된 "칼라딘(kallidin)"이라는 용어는 아미노산 서열 KRPPGFSPFR(서열번호 1)를 포함하거나 아미노산 서열 KRPPGFSPFR(서열번호 1)로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0168]

본원에 사용된 "des-Arg₁₀-칼리딘"이라는 용어는 아미노산 서열 KRPPGFSPF(서열번호 2)를 포함하거나 아미노산 서열 KRPPGFSPF(서열번호 2)로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0169]

본원에 사용된 "마우스 칼리딘" 또는 "칼리딘 유사 웨프티드"라는 용어는 아미노산 서열 RRPPGFSPFR(서열번호 3)를 포함하거나 아미노산 서열 RRPPGFSPFR(서열번호 3)으로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0170]

본원에 사용된 "마우스 des-Arg₁₀-칼리딘" 또는 "des-Arg₁₀-칼리딘 유사웨프티드"라는 용어는 아미노산 서열 RRPPGFSPF(서열번호 4)를 포함하거나 아미노산 서열 RRPPGFSPF(서열번호 4)로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0171]

본원에 사용된 "브라디키닌(Bradykinin)"이라는 용어는 아미노산 서열 RPPGFSPFR(서열번호 5)를 포함하거나 아미노산 서열 RPPGFSPFR(서열번호 5)로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0172]

본원에 사용된 "des-Arg₉-브라디키닌"이라는 용어는 아미노산 서열 RPPGFSPF(서열번호 6)를 포함하거나 아미노산 서열 RPPGFSPF(서열번호 6)로 구성된 웨프티드를 지칭한다.

[0173]

본원에 사용된 "항체"라는 용어는 4개의 폴리웨프티드 사슬, 이황화 결합에 의해 상호연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)뿐 아니라 이의 멀티머(예컨대, IgM)를 포함하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(V_H 또는 VH로 축약됨) 및 중쇄 불변 영역(C_H 또는 CH)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인인 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(V_L로 축약됨) 및 경쇄 불변 영역(C_L 또는 CL)을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(C_L1)을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은, 구조형성 영역(FR)로 일컬어지는 더 보존된 영역에 산재된 상보성 결정 영역(CDR)으로 일컬어지는 과가변영역으로 더 분류될 수 있다. 각 V_H 및 V_L은 하기의 순서로 아미노 말단에서부터 카르복시 말단으로 배열된 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0174]

본원에 사용된 항체의 "항원 결합 단편"이라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 자연적으로 발생하거나, 효소로 수득 가능하거나, 합성, 또는 유전적으로 조작된 임의의 폴리웨프티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원 결합 단편은, 예컨대, 전체 항체 분자로부터 단백질 가수분해와 같은 임의의 적합한 표준 기술 또는 항체 가변 및 선택적으로 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현과 관련된 재조합 유전 공학 기술을 사용하여 도출될 수 있다. 항원 결합 부위의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii)

$F(ab')_2$ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일 사슬 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 과가변영역과 유사한 아미노산 잔기로 구성된 최소 인식 단위(예컨대, 단리된 상보성 결정 영역(CDR)). 다른 조작된 분자들, 예를 들면, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 미니바디도 또한 "항원 결합 단편"이라는 표현 내에 포함된다.

[0175] 본원에 사용된 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"이라는 용어는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 가변 영역 내에서 발견되는 불연속적인 항원 결합 자리를 의미한다. 이러한 특정 영역은 문헌(Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 및 Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)), 및 문헌(Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 및 MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))에 기술되어 있고 서로에 대해 비교할 때 정의가 아미노산 잔기의 중첩 또는 하위세트를 포함한다. 위에서 인용된 참조 각각에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산 잔기가 비교를 위해 기재된다. 본 발명의 일 구현예에서, "CDR"이라는 용어는 서열 비교에 기반하여 카바트(Kabat)에 의해 정의된 CDR이다.

[0176] 본원에 사용된 "구조형성(FR) 아미노산 잔기"라는 용어는 Ig 사슬의 구조형성 영역 내의 아미노산들을 지칭한다. 본원에 사용된 "구조형성 영역" 또는 "FR 영역"이라는 용어는 가변 영역의 일부이지만 CDR(예컨대, 카바트의 CDR 정의를 사용함)의 일부는 아닌 아미노산 잔기를 포함한다. 따라서, 가변 영역 구조형성부는 길이가 약 100 내지 120개의 아미노산이지만 CDR 외부의 아미노산만을 포함한다.

[0177] 본원에 사용된 "특이적으로 결합한다"라는 용어는 적어도 약 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M 이상의 Kd로 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 지칭한다. 또한, 용어에는 비특이적인 항원에 대한 항체의 친화도보다 적어도 2배 더 큰 친화도로 항원에 결합하는 항체 또는 이의 항원결합 단편의 능력을 지칭하는 것도 포함한다. 그러나, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열이 관련된 2종 이상의 항원(예컨대, 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 및 마우스 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘)에 특이적으로 결합할 수 있다는 것으로 이해해야 한다.

[0178] 본원에서 사용된, "항원"이라는 용어는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의해 인식되는 결합 자리 또는 에피토프를 지칭한다.

[0179] 본원에서 사용된, "벡터"라는 용어는 핵산 분자가 연결되는 다른 핵산을 이동시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 벡터의 한 가지 유형은 뱃"플라스미드"이며, 이것은 추가적인 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 환형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터로, 바이러스 게놈 내에 추가적인 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있다. 일정 벡터(예컨대, 박테리아 복제 원점을 가지는 박테리아 벡터 및 포유동물 에피솜 벡터)는 그들이 도입되는 숙주 세포 내에서 자발적으로 복제할 수 있다. 다른 벡터(예컨대, 포유동물 비에피솜 벡터)들은 숙주 세포로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 삽입될 수 있어서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 일정 벡터들은 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터들은 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단하게, "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 활용되는 발현 벡터들은 대개 플라스미드의 형태이다. "플라스미드" 및 "벡터"라는 용어는 상호호환 가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은, 동등한 기능을 수행하는 바이러스 벡터(예컨대, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터들도 포함하는 것으로 의도된다.

[0180] 본원에서 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 재조합 발현 벡터가 도입되는 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 용어는 특정한 대상 세포뿐 아니라 이러한 세포의 자손세포도 지칭하는 것으로 의도된다는 것을 이해해야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해, 계대에서 일정한 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손세포는, 실제로, 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 "숙주 세포"라는 용어의 범주 내에 여전히 포함된다.

[0181] 본원에서 사용된 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"라는 용어는 본원에 기술된 치료적 또는 예방적 조치를 지칭한다. "치료"의 방법은 질환 또는 장애 또는 재발한 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 개선하거나 중증도를 감소시키거나 지연시키거나, 치료하거나, 예방하거나, 이러한 치료의 부재 시 예상되는 생존률보다 대상체의 생존률을 연장시키기 위해, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 대상체, 예를 들어 칼리딘 및 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애(예컨대, 염증성 질환)을 가지거나 이러한 질환 또는 장애를 가지는 경향을 가지는 대상체에 투여하는 것을 채용한다.

[0182] 본원에 사용된 "칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애"라는 용어는 변형된 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘의 수준 또는 활성이 발견되는 질환 상태 및/또는 질환 상태에 연관된 증상을 포함한다. 예시적인 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애는, 이에 제한되지는 않으나, 통증 및 섬유증을 포함한다.

[0183] 본원에 사용된 "유효량"이라는 용어는, 본원에 기술된 바와 같이, 대상체에 투여될 때, 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 연관 질환 또는 장애의 치료, 예후, 또는 진단을 시행하기에 충분한 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료될 병태 및 대상체, 대상체의 체중 및 연령, 병태의 중증도, 투여의 방식 등에 따라 달라질 것이고, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여량은, 예를 들어, 약 1 ng 내지 약 10,000 mg, 약 1 ug 내지 약 5,000 mg, 약 1 mg 내지 약 1,000 mg, 약 10 mg 내지 약 100 mg의 범위의 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 투여 계획은 최적 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 또한, 유효량은 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 임의의 독성 또는 해로운 효과(즉, 부작용)가 최소화되거나 이로운 효과가 더 큰 양이다.

[0184] 본원에서 사용된 "대상체"라는 용어는 임의의 인간 또는 인간이 아닌 동물을 포함한다.

[0185] 본원에서 사용된 "에피토프"라는 용어는 파라토프(paratope)라고 알려진 항체 분자의 가변 영역 내 특이적인 항원 결합 자리와 상호작용하는 항원성 결정기를 지칭한다. 단일 항원이 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체들은 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고, 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 구조적 또는 선형일 수 있다. 구조적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 상이한 세그먼트로부터 공간적으로 나란히 놓인 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬 내 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성되는 것이다.

[0186] 여기서, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 "하나의(a, an, the)"와 같은 단수 형태는 문맥에서 명확하게 다르게 지시되지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 것을 주지한다.

II. 항 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 항체

[0188] 일 양태에서, 본 발명은 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 발명의 항체의 예시적인 VH, VL 및 CDR 아미노산 서열이 표 1에 기재되어 있다.

표 1

[0189] 예시적인 항 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 항체의 VH, VL 및 CDR 아미노산 서열

항체 클론	서열	서열번호
F151 HCDR3 공통(consensus)	X ₁ YX ₂ X ₃ DX ₄ HAMX ₅ Y 이 때: X ₁ 은 Y, F 또는 H; X ₂ 는 R, D, A, V, L, I, M, F, Y 또는 W; X ₃ 는 Y, F, W 또는 H; X ₄ 는 D, E 또는 Y이고; X ₅ 는 D 또는 E이다.	7
F151 HCDR2 공통	YFX ₁ PX ₂ NGNTGYNQKFRG 이 때: X ₁ 은 D, R, A, V, L, I, M, F, Y 또는 W이고; X ₂ 는 Y, D, E, N, 또는 Q이다.	8
F151 HCDR1 공통	GYSFTDYX ₁ IY 이 때 X ₁ 는 N, W 또는 Y이다.	9

F151 LCDR3 공통	QQX ₁ X ₂ SX ₃ PX ₄ T 이 때: X ₁ 은 Y, F 또는 H; X ₂ 는 Y, F, H 또는 W; X ₃ 는 Y, F, T 또는 H이고; X ₄ 는 W, Y, F, H 또는 L이다.	10
F151 LCDR2 공통	WASTRX ₁ 이 때 X ₁ 은 E, D, Q 또는 N이다.	11
F151 LCDR1 공통	KSSQSLLX ₁ SSNQKNX ₂ LA 이 때: X ₁ 은 W, H, Y 또는 F이고; X ₂ 는 H 또는 Y이다.	12
F151 HCDR3	YYRYDDHAMDY	13
F151 HCDR2	YFDPYNGNTGYNQKFRG	14
F151 HCDR1	GYSFTDNYIY	15
F151 LCDR3	QQYYSYWPWT	16
F151 LCDR2	WASTRES	17
F151 LCDR1	KSSQSLLYSSNQKNYLA	18
F151 VH	EIQLQSGPELVKPGTSVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLLSSLTSDDSAYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSVTVSS	19
F151 인간화 HC1	EIQLVQSGPEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSPGKSLWEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLLSSLTSEDSAVYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSVTVSS	20
F151 인간화 HC2a	QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSPGKSLWEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGKATLTVDKSSSTAJMHLLSSLTSEZSAVYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSVTVSS	21
F151 인간화 HC2b	QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSPGKSLWEWIGYFDPYNGNTGYN EKFRGKATLTVDKSSSTAJMHLLSSLTSEZSAVYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSVTVSS	22
F151 인간화 HC2c	QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSPGKSLWEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGKATLTVDKSSSTAJMHLLSSKTSEZSAVYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSVTVSS	23
F151 인간화 HC3a	QIQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVRQAPGQGLEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGRATLTVDKSTSTAYMELRSLSRSDTAVYCANYYRYDDHAMDYWGQTLTVSS	24
F151 인간화 HC3b	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVRQAPGQGLEWIGYFDPYNGNTGYN QKFRGRVTMTTDSTSTAYMELRSLSRSDTAVYCANYYRYDDHAMDYWGQTLTVSS	25
F151 VL	DIVMSQPSSLAVSGEVTMSCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKPLIYWASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK	26
F151 인간화 LC1	DIVMSQPSSLAAVGDRVTMSCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKPLIYWASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK	27
F151 인간화 LC2a	DIVM7QSPSSLASVGDRVT/ISCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKPLIYWASTRE SGVPDRFSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK	28
F151 인간화 LC2b	DIVM7QSPSSLASVGDRVT/ISCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKPLIYWASTRE SGVPDRFSGSGTDFTLTISSVQAEDKA7YYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK	29
F151 인간화 LC3a	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKPLIYWASTRE SGVPDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCQQYYSYPWTFGGGTKVEIK	30
F151 인간화 LC3b	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRE SGVPDRFSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYCQQYYSYPWTFGGGTKVEIK	31
B21 HCDR3	WEYDGYYLDY	32
B21 HCDR2	WIDPENGDTGYARKFQG	33
B21 HCDR1	GFNIKDYYLH	34
B21 LCDR3	LQGTHFPYT	35
B21 LCDR2	LVSKLDS	36
B21 LCDR1	KSSQSLLYSNGKTYLN	37

B21 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKSCTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTGYA RKFQGKATMTADTSSNTVYLHLSLTSEDTAVYYFNAWEYDGYLDYWGQGTSVTVSS	38
B21 VL	DVVMQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLYSNGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVYCLQGTHFPYTFGGTKLEIK	39
C63 HCDR3	EDYGGDY	40
C63 HCDR2	EIRSKSNNYATHYAESVKG	41
C63 HCDR1	GFTFSNYWMN	42
C63 LCDR3	QQYYSYPT	43
C63 LCDR2	WASTRES	17
C63 LCDR1	KSSQSLYSSDQRNYLA	44
C63 VH	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSKSNNYATH YAESVKGRTIISRDDSCKSSVYLQMNNLRAEDTGIIYCIGEDYGGDYWGQGTSVTVSS	45
C63 VL	DIVMSQSPSSLAVSVEKVTMSCKSSQSLYSSDQRNYLAWYQRSQGQSPKLLIYWASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYSYPTFGGGTKLEIK	46
I22 HCDR3	FEYDGNYSPDF	47
I22 HCDR2	WVDPENGDSDYAPKFQ	48
I22 HCDR1	GFNIKDYMH	49
I22 LCDR3	QNDHSYPLT	50
I22 LCDR2	GASTRES	51
I22 LCDR1	KSSQSLNSGNQKNYLA	52
I22 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPENGDSDYA PKFQGKATMTADTSSNTVYLQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLDFWGQGTSVTVSS	53
I22 VL	DIVMTQSPSSLVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQKPGQPPKLLIYGASTRE SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLEIK	54
I54 HCDR3	FEYDGNYSPDF	55
I54 HCDR2	WVDPENGDSDYAPKFQ	56
I54 HCDR1	GFNIKDYMH	57
I54 LCDR3	MQGTHFPYT	58
I54 LCDR2	LVSKlds	59
I54 LCDR1	KSSQSLYSNGETYLN	60
I54 VH	EVQLQQSGAELVRSGASVKSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPENGDSDYA PKFQGKATMTADTSSNTVYLQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLDFWGQGTSVTVSS	61
I54 VL	DVVMQTPLTLSVPIGQPASISCKSSQSLYSNGETYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYCMQGTHFPYTFGGTKLEIK	62
B21/ I22/ I54 HCDR3 공통	X ₁ EYDGX ₂ YX ₃ X ₄ LDX ₅ 이 때: X ₁ 은 W 또는 F; X ₂ 는 N 또는 아미노산 없음; X ₃ 는 Y 또는 S; X ₄ 는 D 또는 P이고; X ₅ 는 F 또는 Y이다.	63
B21/ I22/ I54 HCDR2 공통	WX ₁ DPENGDX ₂ X ₃ YAPKFQG 이 때: X ₁ 은 I, 또는 V; X ₂ 는 T, 또는 S이고; X ₃ 는 G, 또는 D이다.	64
B21/ I22/ I54 HCDR1 공통	GFNIKDYX ₁ H 이 때 X ₁ 은 L, 또는 M이다.	65

F151/C63/I22 LCDR3 공통	QX ₁ X ₂ X ₃ SX ₄ PX ₅ T 의 때: X ₁ 은 Q 또는 N; X ₂ 는 Y, F, D 또는 H; X ₃ 는 Y, F, H 또는 W; X ₄ 는 Y, F, T 또는 H이고; X ₅ 는 W, Y, F, H 또는 L이다.	66
F151/C63/I22 LCDR2 공통	X ₁ ASTRX ₂ 의 때: X ₁ 은 W 또는 G이고; X ₂ 는 E, D, Q 또는 N이다	67
F151/C63/I22 LCDR1 공통	KSSQSLLX ₁ X ₂ SX ₃ QX ₄ NX ₅ LA 의 때: X ₁ 은 W, H, Y 또는 F; X ₂ 는 S 또는 G; X ₃ 는 N 또는 D; X ₄ 는 K 또는 R; X ₅ 는 H 또는 Y이다.	68
B21/I54 LCDR3 공통	X ₁ QGTHFPYT 의 때: X ₁ 은 L 또는 M이다;	69
B21/I54 LCDR2 둘다 동일	LVSKLDS	36
B21/I54 LCDR1 공통	KSSQSLLYSNGX ₁ TYLN 의 때: X ₁ 은 K 또는 E이다;	70

[0190] 일정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 및 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 영역 아미노산 서열을 포함한다.

[0191] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노산 서열을 각각 포함한다:

[0192] a) 서열번호 7, 8, 및 9;

[0193] b) 서열번호 13, 14, 및 15;

[0194] c) 서열번호 32, 33, 및 34;

[0195] d) 서열번호 40, 41, 및 42;

[0196] e) 서열번호 47, 48, 및 49;

[0197] f) 서열번호 55, 56, 및 57; 및

[0198] g) 서열번호 63, 64, 및 65.

[0199] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노산 서열을 각각 포함한다:

- [0200] a) 서열번호 10, 11, 및 12;
- [0201] b) 서열번호 16, 17, 및 18;
- [0202] c) 서열번호 35, 36, 및 37;
- [0203] d) 서열번호 43, 17, 및 44;
- [0204] e) 서열번호 50, 51, 및 52;
- [0205] f) 서열번호 58, 59, 및 60;
- [0206] g) 서열번호 66, 67, 및 68; 및
- [0207] h) 서열번호 69, 25, 및 70.
- [0208] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCDR3, HCDR2, HCDR1, LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노산 서열을 각각 포함한다
- [0209] a) 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 및 12;
- [0210] b) 서열번호 13, 14, 15, 16, 17, 및 18;
- [0211] c) 서열번호 32, 33, 34, 35, 36 및 37;
- [0212] d) 서열번호 40, 41, 42, 43, 17, 및 44;
- [0213] e) 서열번호 47, 48, 49, 50, 51, 및 52; 및
- [0214] f) 서열번호 55, 56, 57, 58, 59, 및 60.
- [0215] 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 개시된 뮤라인 항체로부터의 하나 이상의 CDR 영역(또는 이의 보존적으로 변형된 변이체)을 포함하는 인간화 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 발명의 인간화 항체를 생성하기 위해 임의의 인간화 방법을 채용할 수 있다. 적합한 방법들이 본원에 개시되고, 실시예 4에 구체적으로 예시된다.
- [0216] 하나의 특정한 구현예에서, 인간화 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0217] 13, 14, 및 15에 각각 기재된 HCDR3, HCDR2 및 HCDR1 영역 아미노 서열 및 H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87, 및 H108로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- [0218] 16, 17, 및 18에 각각 기재된 LCDR3, LCDR2 및 LCDR1 영역 아미노 서열 및 L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78, L79, L83, L85, L100 및 L104(카바트 번호부여 관례에 따름)으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0219] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53, 및/또는 61에 기재된 VH 영역 아미노산 서열을 포함한다.
- [0220] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54 및/또는 62에 기재된 VL 영역 아미노산 서열을 포함한다.
- [0221] 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 각각, 서열번호 19 및 26, 서열번호 20 및 27, 서열번호 21 및 28; 서열번호 22 및 28; 서열번호 23 및 29; 서열번호 24 및 30; 서열번호 25 및 31; 서열번호 38 및 39, 서열번호 45 및 46, 서열번호 53 및 54, 또는 서열번호 61 및 62로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 및 VL 영역 아미노산 서열을 포함한다.
- [0222] 일정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51 52, 55, 56, 57, 58, 59 및 60으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 영역 아미노산 서열을 포함하되, 하나 이상의 CDR 영역 아미노산 서열은 적어도 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함한다.
- [0223] 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 CDR 아미노산 서열(예컨대, 서열번호 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51 52, 55, 56, 57, 58, 59 및 60)에

"보존적 아미노산 치환", 즉, 항체의 항원, 예컨대 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘에 대한 결합을 방해하지 않는 아미노산 서열 변형을 포함한다. 보존적 아미노산 치환은 하나의 클래스의 아미노산의 동일한 클래스의 아미노산에 의한 치환을 포함하되, 클래스는 통상적인 물리화학적 아미노산 측쇄 성질에 의해 정의되고, 예를 들어, 표준 데이호프(Dayhoff) 빈도 교환 매트릭스 또는 BLOSUM 매트릭스에 의해 결정되는 바와 같이, 상동성 단백질에서의 높은 치환 빈도가 자연계에서 관찰된다. 아미노산 측쇄의 6가지 일반적인 클래스가 카테고리화되어있고, 다음을 포함한다: 클래스 I(Cys); 클래스 II(Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); 클래스 III(Asn, Asp, Gln, Glu); 클래스 IV(His, Arg, Lys); 클래스 V(Ile, Leu, Val, Met); 및 클래스 VI(Phe, Tyr, Trp). 예를 들어, 다른 클래스 III 잔기(예를 들면, Asn, Gln, 또는 Glu)에 대한 Asp로의 치환은 보존적 치환이다. 따라서, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체의 예측된 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게 동일한 클래스로부터의 다른 아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 항원 결합을 제거하지 않는 아미노산 보존적 치환을 식별하는 방법들이 당해 분야에 잘 공지되어 있다(예컨대, Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); 및 Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)을 참조한다).

[0224] 다른 구현예에서, 본 발명은, 각각, 서열번호 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53, 또는 61에 기재된 VH 영역 아미노산 서열 또는 서열번호 26, 27, 28, 29, 30, 31, 39, 46, 54, 또는 62에 기재된 VL 영역 아미노산 서열과 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 VH 및 /또는 VL 영역 아미노산 서열을 포함하는 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0225] 다른 구현예에서, 본 발명은, 각각, 서열번호 19 및 25, 서열번호 38 및 39, 서열번호 45 및 46, 서열번호 53 및 54, 또는 서열번호 61 및 62에 기재된 VH 및 VL 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 교차 경쟁하는 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 제공한다. 이러한 항체는 예를 들어, 표면 플라스몬 공명(SPR) 기반 경쟁 검정을 포함하는 일상적인 경쟁 결합 검정을 사용하여 식별할 수 있다.

[0226] 일정 구현예에서, 본 발명의 항체는 "Pro4 킹크(kink)"구조를 채택하는 칼리딘(KD) 또는 desArg10-칼리딘(DAK D)의 구조적 에피토프에 결합한다. 도 17에 도시된 바와 같이, "Pro 4 킹크" 구조의 전형적인 특징은 KD 또는 DAKD의 주체 폴리펩티드 골격 내 4번 프롤린에서 2형 타이트 턴(tight turn)이다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 2형 타이트 턴 구조는 3개의 잔기(X1-X2-X3)를 포함하며 잔기 X1의 카르보닐과 통상적으로 글리신인 잔기 X3의 아미드 N과 수소 결합을 형성한다(본원에 참조로서 포함된 Richardson JS. "The anatomy and taxonomy of protein structure." Adv Protein Chem. 1981;34:167-339을 참조한다). 따라서, 일정 구현예에서, 2형 타이트 턴 구조는 KD 또는 DAKD의 Pro3-Pro4-Gly5 모티프에 의해 형성된다. 더욱 구체적인 구현예에서, "Pro 4 킹크" 구조는 소수성 측쇄를 공간적으로 적층된 방식으로 정렬하는 S자형 형상의 반복을 채택한 KD(1 내지 2 및 6 내지 9) 또는 DAKD의 잔존 아미노산의 전부 또는 실질적으로 전부에 의해 더 정의된다.

III. 변형된 항 칼리딘 또는 des-Arg₁₀-칼리딘 항체

[0227] 일정 구현예에서, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체의 변형된 형태는 당해 분야에 공지된 임의의 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

i) 면역원성 감소

[0228] 일정 구현예에서, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 그들의 면역원성을 낮추기 위해 당해 분야에 알려진 기술을 사용하여 변형된다. 예를 들어, 항체 또는 이의 단편은 키메라화되고/되거나, 인간화되고/되거나, 탈면역화될 수 있다.

[0229] 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 키메라일수 있다. 키메라 항체는 항체의 상이한 부위들이 상이한 동물 종으로부터 유래한 항체, 예를 들면 뮤라인 단일클론 항체로부터 유래한 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 항체이다. 키메라 항체 또는 이의 단편을 제조하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 문헌(Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); 미국 특허 제 5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호를 참조한다. "키메라 항체"의 생성을 위해 개발된 기술(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))이 상기 분자의 합성을 위해 채용될 수 있다. 예를 들어,

마우스 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체 분자의 결합 특이성을 암호화하는 유전 서열이 적절한 생물학적 활성의 인간 항체 분자로부터의 서열과 함께 융합될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 키메라 항체는 상이한 부위들이 상이한 동물종으로부터 유래된 분자, 예를 들면 뮤라인 단일클론 항체로부터 유래된 가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 영역을 가지는 분자, 예컨대, 인간화 항체이다.

[0232] 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다. 인간화 항체는 비인간 항체로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 인간 항체 분자로부터의 구조형성 영역을 포함하는 결합 특이성을 가진다. 종종, 인간 구조형성 영역의 구조형성 잔기는 항원 결합을 변경, 바람직하게는, 개선하기 위해 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이러한 구조형성부 치환은 당해분야에 잘 공지된 방법에 의해, 예컨대 항원 결합에 중요한 구조형성 잔기를 식별하기 위한 CDR과 구조형성 잔기의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 특이한 구조형성 잔기를 식별하기 위한 서열비교에 의해 식별된다(예컨대, 그 전체가 본원에 참조로서 포함된 Queen et al., 미국 특허 제5,585,089호; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)을 참조한다). 항체는, 예를 들어 CDR 이식(EP 239,400; PCT 공개 WO 91/09967; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 표면치환(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)) 및 사슬 셀플링(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 당해 분야에 공지된 다양한 기술들을 사용하여 인간화될 수 있다.

[0233] 특정 구현예에서, 면역 인식 중간 및 면역 인식에서 항체의 문자적 유연성의 영향에 기반한 인간화 방법이 채용된다(그 전체가 본원에 참조로서 포함된 WO2009/032661을 참조한다). 단백질 유연성은 단백질 분자의 분자 운동에 관련된다. 단백질 유연성은 전체 단백질, 단백질의 일부, 또는 단일 아미노산 잔기가 서로 현저하게 다른 구조들의 총체를 채택하는 능력이다. 단백질 유연성에 대한 정보는 단백질 X-선 결정 실험(예를 들어, Kundu et al. 2002, Biophys J 83:723-732을 참조), 핵자기공명 실험(예를 들어, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923 참조)을 수행하거나 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 시행함으로써 수득할 수 있다. 단백질의 MD 시뮬레이션은 컴퓨터에서 수행되고, 원자의 서로 간의 물리적 상호작용을 계산함으로써 임의의 기간 동안 모든 단백질 원자들의 운동을 결정하도록 한다. MD 시뮬레이션의 결과는 연구된 단백질의 시뮬레이션 기간 동안의 궤적이다. 궤적(또한 스냅샷으로도 불림)은 단백질 구조들의 총체이며, 시뮬레이션 기간 동안, 예컨대, 1 피코세컨드(ps)마다 주기적으로 수집된다. 스냅샷의 총체를 분석함으로써, 단백질 아미노산 잔기의 유연성을 정량할 수 있다는 것이다. 따라서, 유연한 잔기는 그 잔기가 존재하는 폴리펩티드의 맥락 내의 상이한 구조의 총체를 채택하는 잔기이다. MD 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예컨대, 문헌(Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988))을 참조한다. Amber(Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688 참조), Charmm(Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; 및 MacKerell et al. (1998) "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons 참조) 또는 Impact(Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900 참조)와 같은 몇몇 소프트웨어들이 MD 시뮬레이션을 가능하게 한다.

[0234] 대부분의 단백질 복합체는 상대적으로 크고 평면인 매복 표면을 공유하고, 결합 파트너의 유연성이 그들을 서로 구조적으로 맞출 수 있게 하는 그들의 가소성의 기원을 제공한다(Structure (2000) 8, R137-R142). 이처럼, "유도 맞춤"의 예가 단백질 단백질 계면에서 지배적인 역할을 수행하는 것으로 나타난다. 또한, 단백질이 실제로 다양한 형태 크기 및 조성의 리간드에 결합하고(Protein Science (2002) 11:184-187) 구조적 다양성이 상이한 파트너를 인식하는 능력의 필수적인 구성요소인 것으로 보인다(Science (2003) 299, 1362-1367)는 것을 나타내는 데이터가 꾸준히 증가하고 있다. 유연한 잔기는 단백질-단백질 파트너의 결합에 관련된다(Structure (2006) 14, 683-693).

[0235] 유연성 잔기들은 상호작용 영역들의 총체를 제공하는 다양한 구조를 채택할 수 있고, 다양한 구조는 기억 B 세포에 의해 인식되고 면역 반응을 유발할 수 있다. 따라서, 항체는 구조형성부로부터의 다수의 잔기들을 변형함으로써 인간화될 수 있어서, 변형된 항체의 의해 제시되는 총체적인 구조 및 인식 영역이 인간 항체에 의해 채택된 총체적인 구조 및 인식 영역과 가능한 한 닮게 된다. 이는 제한된 수의 잔기들을 다음에 의해 변형함으로써 달성할 수 있다: (1) 모 mAb의 상동성 모델 구축 및 MD 시뮬레이션 수행; (2) 유연성 잔기의 분석 및 비인간 항체 분자의 가장 유연한 잔기의 식별 및 이종성 또는 분해 반응의 원천이 될 수 있는 잔기 또는 모티프의 식별; (3) 모항체와 가장 유사한 총체적인 인식 면적을 제시하는 인간 항체의 식별; (4) 돌연변이될 유연성 잔기의 결정, 이종성 및 분해의 원천이 될 수 있는 잔기 또는 모티프도 또한 돌연변이화된다; 및 (5) 공지된 T 세포 또는 B 세포 에피토프의 존재에 대한 검증. 유연성 잔기는, 본원에 교시된 바와 같이, 시뮬레이션 기간 동안

단백질 원자들과 물 용매의 상호작용을 고려한 내재 용매 모델을 사용한 MD 계산을 통해 밝혀질 수 있다.

[0236] 일단 가변 경쇄 및 중쇄 내 유연성 잔기들의 세트가 식별되면, 관심있는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 구조형 성부와 밀접하게 닮은 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 구조형 성부의 세트가 식별된다. 이는, 예를 들어, 항체 인간 생식계열 서열의 데이터베이스에 대한 유연성 잔기들의 세트의 BLAST 검색을 사용하여 수행될 수 있다. 또한, 이는 모 mAb의 역학을 생식계열 표준구조의 라이브러리의 역학과 비교함으로써 수행될 수 있다. 항원에 대한 높은 친화도를 보존하기 위해 CDR 잔기 및 이웃하는 잔기는 검색으로부터 제외된다. 유연성 잔기들은 그런 다음 교체된다.

[0237] 몇몇 인간 잔기들이 유사한 상동성을 나타낼 때, 선택은 또한 인간화 항체의 용액 거동에 영향을 미칠 수 있는 잔기들의 성질에 의해 이루어진다. 예를 들어, 소수성 잔기 위로 노출되는 유연성 루프에는 극성 잔기들이 바람직할 것이다. 불안정성 및 이종성의 잠재적인 원천인 잔기들은 심지어 잔기들이 CDR에서 발견되더라도 또한 돌연변이화된다. 돌연변이는, 산소 라디칼, Asp-Pro 디펩ти드의 산 불안정성 결합과 같은 산 불안정성 결합(Drug Dev Res (2004) 61:137-154)의 가수분해, 작은 아미노산(예를 들면, Gly, Ser, Ala, His, Asn 또는 Cys(J Chromatog (2006) 837:35-43))이 뒤따르는 노출된 아스파라긴 잔기와 함께 발견되는 탈아미드화 자리, 및 N-당화 자리(예를 들면, Asn-X-Ser/Thr 자리)로부터 기인할 수 있는 슬록사이드 형성에 따른 메티오닌의 노출을 포함할 것이다. 통상적으로, 노출된 메티오닌은 Leu에 의해 치환될 것이거나, 노출된 아스파라긴은 글루타민 또는 아스파르坦염에 의해 교체될 것이거나, 후속 잔기가 변할 것이다. 당화 자리(Asn-X-Ser/Thr)에 대해서는, Asn 또는 Ser/Thr 잔기 중 하나가 변할 것이다.

[0238] 얻어진 복합 항체 서열은 공지된 B 세포 또는 선형 T 세포 에피토프의 존재에 대하여 점검된다. 검색은, 예를 들어, 열람 가능한 면역 에피토프 데이터베이스(Immune Epitope Data Base, IEDB)(PLOS Biol (2005) 3(3)e91)를 사용하여 수행할 수 있다. 만약 공지된 에피토프가 복합 서열 내에서 발견된다면, 다른 세트의 인간 서열을 검색하고 치환할 수 있다. 따라서, 미국 특허 제5,639,641호의 표면치환법과는 다르게, B 세포 매개 및 T 세포 매개 면역원성 반응이 모두 본 방법에 의해 다루어질 수 있다. 본 방법은, 또한, CDR 이식에서 때때로 관찰되는 활성의 소실 문제를 회피한다(미국 특허 제5,530,101호). 또한, 안정성 및 용해성 문제들도 조작 및 선택 과정에서 고려되어, 낮은 면역원성, 높은 항원 친화도, 및 개선된 생물물리학적 성질을 위해 최적화된 항체가 얻어진다.

[0239] 일부 구현예에서, 탈면역화가 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 면역원성을 낮추기 위해 사용될 수 있다. 본원에서 사용된, "탈면역화"라는 용어는 T 세포 에피토프를 변형하기 위한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변경을 포함한다(예컨대, WO9852976A1, WO0034317A2를 참조). 예를 들어, 출발 항체로부터의 VH 및 VL 서열이 분석될 수 있고, 상보성 결정 영역(CDR) 및 서열 내 다른 주요 잔기들과 비교하여 에피토프의 위치를 보여주는 인간 T 세포 에피토프 "지도"가 각각의 V 영역으로부터 생성될 수 있다. T 세포 에피토프 지도로부터의 개별적인 T 세포 에피토프들이 최종 항체의 활성을 변경시킬 위험이 낮은 대안적인 아미노산 치환을 식별하기 위해 분석된다. 아미노산 치환의 조합을 포함하는 다양한 대안적인 VH 및 VL 서열들이 설계되고, 이러한 서열들은, 이어서, 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위해 다양한 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 특이적 항체 또는 이의 단편에 삽입된 다음, 기능에 대해 시험된다. 통상적으로, 12 및 24개 사이의 변이 항체들이 생성되고 시험된다. 다음으로, 변형된 V 및 인간 C 영역을 포함하는 완전한 중쇄 및 경쇄 유전자가 발현 벡터 내로 클로닝되고, 이어서 플라스미드가 전항체의 생성을 위해 세포주 내로 도입된다. 그런 다음, 항체들은 적절한 생화학 및 생물학적 검정으로 비교되고, 최적의 변이체가 식별된다.

ii) 효과기 기능 및 Fc 변형

[0240] 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 매개하는 항체 불변 영역(예컨대, IgG 불변 영역, 예컨대, 인간 IgG 불변 영역, 예컨대, 인간 IgG1 또는 IgG4 불변 영역)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 불변 영역과 보체의 C1 구성요소의 결합은 보체 시스템을 활성화시킬 수 있다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 읍소닌화 및 용해에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증성 반응을 자극하고 또한 자가면역 과민증과 관련될 수 있다. 또한, 항체는 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합하는 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 자리를 가지는 Fc 영역을 통하여 다양한 세포 상의 수용체에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)을 포함하는 상이한 클래스의 항체에 특이적인 다수의 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 항체 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체로 코팅된 입자의 포획 및 파괴, 면역 복합체들의 제거, 살상 세포들에 의한 항체로 코팅된 표적 세포들의 용해(항체 의존성 세포 매개 세포독성, 또는 ADCC로 불림), 염증성 매개체들의 방출, 태반 이동 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하는 다수의 중요하고

다양한 생물학적 반응들을 유발한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 Fc 감마 수용체에 결합한다. 대안적인 구현예에서, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 하나 이상의 효과기 기능(예컨대, ADCC 활성)이 없는 불변 영역을 포함할 수 있고/있거나 Fc 수용체에 결합할 수 없다.

[0242] 본 발명의 일정한 구현예는 하나 이상의 불변 영역 도메인의 적어도 하나의 아미노산이 결실되거나 그렇지 않으면 변경되어 원하는 생화학적 특성(예를 들면, 대략 동일한 면역원성의 미변경 전항체와 비교할 때, 감소되거나 향상된 효과기 기능, 비공유적으로 이량체화되는 능력, 종양의 자리로 국소화되는 능력의 증가, 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기)을 제공하는 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 포함한다. 예를 들어, 본 원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 일정 항체 또는 이의 단편은 도메인이 결실된 항체로, 면역글로불린 중쇄와 유사한 폴리펩티드 사슬을 포함하지만, 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 하나의 부위가 결여되어 있다. 예를 들어, 일정 항체에서, 변형된 항체의 불변 영역의 하나의 전체 도메인이 결실될 것이고, 예를 들어, CH2 도메인의 전부 또는 일부가 결실될 것이다.

[0243] 다른 일정 구현예에서, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 상이한 항체 동형으로부터 유래한 불변 영역(예컨대, 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 2종 이상으로부터 유래한 불변 영역)을 포함한다. 다른 구현예에서, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 키메라 힌지(즉, 상이한 항체 동형의 힌지 도메인으로부터 유래한 힌지 부위, 예컨대 IgG4 문자로부터의 상부 힌지 도메인 및 IgG1 중간 힌지 도메인을 포함하는 힌지)를 포함한다. 일 구현예에서, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 인간 IgG4 문자로부터의 Fc 영역 또는 이의 부위 및 문자의 코어 힌지 영역 내 Ser228Pro 돌연변이(EU 번호부여)를 포함한다.

[0244] 일정한 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체에서, Fc 부위는 효과기 기능을 높이거나 낮추기 위해 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 돌연변이화될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 도메인의 (접돌연변이 또는 다른 수단을 통한) 결실 및 불활성화는 변형된 혈중 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 종양 국소화를 증가시킨다. 다른 경우에서, 본 발명과 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 약화시켜서, 접합된 세포독소의 혈청 반감기 및 비특이적 결합을 감소시키는 것일 수 있다. 이황화 결합 또는 올리고당 모이어티를 변형시키기 위해 불변 영역의 여전히 다른 변형이 사용될 수 있고, 증가된 항원 특이성 또는 유연성으로 인해 국소화를 향상시킬 수 있다. 변형의 결과적인 생리학적 프로파일, 생물학적 이용가능성 및 다른 생화학적 효과, 예를 들면, 종양 국소화, 생물학적 분배, 및 혈청 반감기는 불필요한 실험 없이 잘 알려진 면역학적 기술들을 사용하여 쉽게 측정되고 정량될 수 있다.

[0245] 일정 구현예에서, 본 발명의 항체에 채용된 Fc 도메인은 Fc 변이체이다. 본원에서 사용된 “Fc 변이체”라는 용어는 상기 Fc 도메인이 유래된 야생형 Fc 도메인과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 가지는 Fc 도메인을 지칭한다. 예를 들어, Fc 도메인이 인간 IgG1 항체로부터 유래한 경우, 상기 인간 IgG1 Fc 도메인의 Fc 변이체는 상기 Fc 도메인과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0246] Fc 변이체의 아미노산 치환(들)은 Fc 도메인 내 임의의 위치(즉, 임의의 EU 관례 아미노산 위치)에 위치할 수 있다. 일 구현예에서, Fc 변이체는 힌지 도메인 또는 이의 부위에 위치한 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH2 도메인 또는 이의 부위에 위치한 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH3 도메인 또는 이의 부분에 위치한 아미노산 위치에 치환을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc 변이체는 CH4 도메인 또는 이의 부분에 위치한 아미노산 위치에 치환을 포함한다.

[0247] 본 발명의 항체는 효과기 기능 및/또는 FcR 결합을 개선(예컨대, 감소 또는 향상)하는 것으로 알려진 임의의 당해 분야에 알려진 Fc 변이체를 채용할 수 있다. 상기 Fc 변이체는, 예를 들어, 각각 참조로서 본원에 포함된 국제 PCT 공개 WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, 및 WO06/085967A2 또는 미국 특허 제5,648,260호; 제5,739,277호; 제5,834,250호; 제5,869,046호; 제6,096,871호; 제6,121,022호; 제6,194,551호; 제6,242,195호; 제6,277,375호; 제6,528,624호; 제6,538,124호; 제6,737,056호; 제6,821,505호; 제6,998,253호; 및 제7,083,784호에 개시된 아미노산 치환 중 임의의 하나를 포함할 수 있다. 예시적인 일 구현예에서, 본 발명의 항체는 EU 위치 268에 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체(예컨대, H268D 또는 H268E)를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명의 항체는 EU 위치 239번(예컨대, S239D 또는 S239E) 및/또는 EU 위치 332번(예컨대, I332D 또는 I332Q)에 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0248]

일정 구현예에서, 본 발명의 항체는 항체의 항원 비의존성 효과기 기능, 특히 항체의 순환 반감기를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 이러한 치환이 결여된 항체에 비교하여 증가하거나 감소된 FcRn에 대한 결합을 나타내며, 따라서, 혈청 내에서 각각 증가하거나 감소된 반감기를 가진다. FcRn에 대한 개선된 친화도를 가지는 Fc 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 가지는 것으로 예상되며, 이러한 분자들은 투여되는 항체의 반감기가 긴 것이 바람직한 포유동물의 치료, 예컨대, 만성 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에 유용하게 적용된다. 반대로, 감소된 FcRn 결합 친화도를 가지는 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 가지는 것으로 예상되며, 이러한 분자들은 또한, 예를 들어, 단축된 순환 시간이 유리할 수 있는 포유동물에의 투여, 예컨대 생체 내 진단 영상화 또는 출발 항체가 연장된 기간 동안 순환계에 존재하는 경우 독성 부작용을 가지는 상황에 유용하다. 감소된 FcRn 결합 친화도를 가지는 Fc 변이체는 또한 태반을 가로지르는 경향이 낮기 때문에 임신한 여성의 질환 또는 장애의 치료에 또한 유용하다. 추가로, 감소된 FcRn 결합 친화도가 바람직 할 수 있는 다른 적용예는 뇌, 신장 및/또는 간으로의 국소화가 바람직한 적용예를 포함한다. 예시적인 일정 구현예에서, 본 발명의 변경된 항체는 혈관으로부터 신장 사구체의 표피를 가로지르는 이동의 감소를 나타낸다. 다른 구현예에서, 본 발명의 변경된 항체는 뇌로부터 혈관 공간으로 뇌혈관 장벽(BBB)을 가로지르는 이동의 감소를 나타낸다. 일정 구현예에서, 변경된 FcRn 결합을 가지는 항체는 Fc 도메인의 “FcRn 결합 루프” 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 가지는 Fc 도메인을 포함한다. FcRn 결합 루프는 아미노산 잔기 280 내지 299(EU 번호 부여에 따름)로 구성된다. FcRn 결합 활성을 바꾸는 예시적인 아미노산 치환이 본원에 참조로서 포함된 국제 PCT 공개 WO05/047327에 개시되어 있다. 예시적인 일정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 하기 치환 중 하나 이상을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다: V284E, H285E, N286D, K290E 및 S304D(EU 번호부여).

[0249]

다른 구현예에서, 본원에 기술된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 항체는 당화를 감소시키거나 제거하도록 변경된 불변 영역, 예컨대 IgG1 또는 IgG4 중쇄 불변 영역을 가진다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또한 항체의 당화를 변경하는 아미노산 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 Fc 변이체는 감소된 당화(예컨대, N- 또는 O- 결합 당화)를 가질 수 있다. 예시적인 구현예에서, Fc 변이체는 보통 아미노산 위치 297번(EU 번호부여)에서 발견되는 N-결합 글리칸의 당화의 감소를 포함한다. 다른 구현예에서, 항체는 당화 모티브(예를 들어, 아미노산 서열 NXT 또는 NXS를 포함하는 N-결합 당화 모티프)에 가깝게 또는 당화 모티프 내에 아미노산 치환을 가진다. 특정 구현예에서, 항체는 아미노산 위치 228 또는 299번(EU 번호부여)에 아미노산 치환을 가지는 Fc 변이체를 포함한다. 더욱 특정한 구현예에서, 항체는 S228P 및 T299A 돌연변이(EU 번호부여)를 포함하는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함한다.

[0250]

감소되거나 변경된 당화를 부여하는 예시적인 아미노산 치환은 본원에 참조로서 포함된 국제 PCT 공개 WO05/018572에 개시되어 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 당화를 제거하기 위해 변형된다. 이러한 항체 또는 이의 단편은 “어글리(ugly)” 항체 또는 이(예컨대, “어글리 항체”)의 단편으로 지칭될 수 있다. 이론에 얹매이지 않으면서, “어글리” 항체, 또는 이의 단편은 개선된 생체 내 안전성 및 안정성 프로파일을 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 예시적인 어글리 항체 또는 이의 단편은 Fc 효과기 기능이 결여된 IgG4 항체의 무당화 Fc 영역을 포함함으로써 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘을 발현하는 보통의 중요 기관에 대한 Fc 매개 독성의 가능성을 제거한다. 여전히 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 변경된 글리칸을 포함한다. 예를 들어, 항체는 Fc 영역의 Asn297의 N-글리칸 상에 감소된 수의 푸코스 잔기를 가질 수 있다(즉, 무푸코실화된다). 다른 구현예에서, 항체는 Fc 영역의 Asn297의 N-글리칸 상에 변경된 수의 시알산 잔기를 가질 수 있다.

[0251]

iii) 공유 부착

[0252]

본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는, 예컨대 공유 부착이 항체가 그의 동족 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 방지하지 않도록 하는 항체에 대한 분자의 공유 부착에 의해 변형될 수 있다. 제한의 방식이 아니라, 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 당화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질 가수분해, 세포 리간드 또는 다른 단백질 등에 의한 결합에 의해 변형될 수 있다. 특이적 화학적 분해, 아세틸화, 포밀화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 공지된 기술에 의해 다수의 화학적 변형 중 임의의 것이 수행될 수 있다. 추가적으로, 유도체는 하나 이상의 비 고전적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0253]

본 발명의 항체 또는 이의 단편은 또한 N- 또는 C- 말단 이종 폴리펩티드에 재조합적으로 융합되거나 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 접합(공유 및 비공유 접합을 포함함)될 수 있다. 예를 들어, 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체가 검출 검정에서 표지로서 유용한 분자 및 이종 폴리펩티드, 약물, 방사성핵종 또는 독소와 같은 효과기 분자에 재조합적으로 융합되거나 접합될 수 있다. 예컨대, PCT 공개 WO 92/08495; WO

91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 제5,314,995호; 및 EP 396,387을 참조한다.

[0254] 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체가 생체 내 반감기를 증가시키거나 당해 분야에 공지된 방법을 사용하는 면역검정법에 사용하기 위해 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 PEG가 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체에 접합될 수 있다(Leong, S. R., et al., Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); or Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002)).

[0255] 더욱이, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 그들의 정제 또는 검출을 촉진하기 위한 펩티드와 같은 마커 서열에 융합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 마커 아미노산 서열은 상업적으로 입수 가능한 많은 다른 것들 중에서 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)에 제공되는 태그와 같은 헥사 히스티딘 펩티드이다. 문헌(Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989))에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 헥사 히스티딘(서열번호 137)은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그는, 이에 제한되지는 않지만, 인플루엔자 해마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 "HA" 태그(Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) 및

[0256] "플래그"태그를 포함한다.

[0257] 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 비접합 형태로 사용될 수 있거나, 예컨대, 분자의 치료적 성질을 개선하거나, 표적 검출을 용이하게 하거나, 환자의 영상화 또는 치료를 위해 다양한 분자들 중 적어도 하나에 접합될 수 있다. 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는, 정제가 수행될 때, 정제의 이전 또는 이후에 표지되거나 접합될 수 있다. 특히, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 치료제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제, 약학적 제제 또는 PEG에 접합될 수 있다.

[0258] 본 발명은 진단제 또는 치료제에 접합된 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 더 포함한다. 항-칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 진단용으로 사용될 수 있는데, 예컨대, 주어진 치료 및/또는 예방 계획의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 절차의 일부로서, 예를 들어, 면역 세포 장애(예컨대, CLL)의 진행 또는 발달을 감시하기 위해 사용될 수 있다. 검출은 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 검출가능한 물질에 연결시킴으로써 촉진될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결 원자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 단층 촬영을 사용한 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 진단제로서 사용하기 위한 항체에 접합될 수 있는 금속 이온에 대한 미국 특허 제4,741,900호를 참조한다. 적합한 효소의 예는 홀스래디쉬 과산화효소, 알칼라인 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결 원자단 복합체는 스트렙트아비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 웜밸리페논, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐라민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린, 및 에퀴린을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 125I, 131I, 111In 또는 99Tc을 포함한다.

[0259] 본원에 개시된 진단 및 치료방법에 사용하기 위한 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 (방사성동위원소, 세포독성 약물 또는 독소와 같은) 세포독소 치료제, 세포정지제, 생물학적 독소, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 조절제, 약학적 제제, 면역학적으로 활성인 리간드(예컨대, 림포카인 또는 얻어진 분자가 신생 세포 및 T 세포와 같은 효과기 세포 둘 다에 결합하는 다른 항체), 또는 PEG에 접합될 수 있다.

[0260] 다른 구현예에서, 본원에 개시된 진단 및 치료 방법에 사용하기 위한 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체는 종양 세포 생장을 낮추는 분자에 접합될 수 있다. 다른 구현예에서, 개시된 조성물은 약물 또는 전구약물에 연결된 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 본 발명의 여전히 다른 구현예는 리신(ricin), 젤로닌(gelonin), 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소와 같은 특이적인 생물 독소 또는 그들의 세포독성 단편에 접합된 항체 또는 이의 단편의 용도를 포함한다. 접합 또는 미접합 항체 사용의 선택은 암의 유형 및 단계, 부가 치료(예컨대, 화학요법 또는 외부방사선)의 사용 및 환자 병태에 의존할 것이다. 본원의 교시를 고려하여 쉽게 이러한 선택을 내릴 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0261] 이전의 연구에서, 동위원소로 표지된 항 종양 항체가 동일 모델, 및 일부 경우 인간에서 종양 세포를 파괴하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다는 것이 이해될 것이다. 예시적인 방사성동위원소는 90Y, 125I, 131I, 123I,

111In, 105Rh, 153Sm, 67Cu, 67Ga, 166Ho, 177Lu, 186Re 및 188Re를 포함한다. 방사성 핵종은 핵 DNA에서 세포 사멸을 초래하는 다수의 가닥 끊김을 유발하는 전리 방사선을 생성함으로써 작용한다. 치료용 접합체를 생성하기 위해 사용된 동위원소는 경로 길이가 짧은 통상적으로 고에너지 알파 또는 베타 입자를 생성한다. 이러한 방사성 핵종은 그들과 밀접하게 인접한 세포, 예를 들어 접합체가 부착되거나 도입된 신생 세포를 살상한다. 그들은 비 국소화 세포에 거의 영향을 미치지 않거나 전혀 영향을 미치지 않는다. 방사성 핵종은 필수적으로 비면역 원성이다.

[0262] IV. 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현

위에 기재된 바와 같은 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체를 제공하기 위해 단리된 유전 물질의 조작 후, 통상적으로, 원하는 양의 청구되는 항체 또는 이의 단편을 생성하기 위해 사용될 수 있는 숙주 세포에 도입하기 위한 발현 벡터 내에 유전자를 삽입한다.

"벡터" 또는 "발현 벡터"라는 용어는 본원에서, 세포 내 원하는 유전자를 내부로 도입하고 발현시키기 위한 비히클로서 본 발명에 따라 사용되는 벡터를 의미하기 위해, 명세서 및 청구범위를 위하여 사용된다. 당업자에 공지된 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 과지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 군으로부터 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로 본 발명과 맞는 벡터는 선택 마커, 원하는 유전자의 클로닝을 촉진하기 위한 적절한 제한 자리, 및 진핵 또는 원핵 세포에 도입되고/되거나 복제하는 능력을 포함할 것이다.

다수의 발현 벡터 시스템이 본 발명의 목적을 위해 채용될 수 있다. 예를 들어, 벡터의 한 가지 클래스는 동물 바이러스로부터 유래된 DNA 요소, 예를 들면, 소 파필로마 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노 바이러스, 백시니아 바이러스, 배콜로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스를 활용한다. 다른 것들은 내부 리보솜 결합 자리를 가지는 폴리시스트론 시스템을 사용한다. 추가적으로, DNA를 염색체 내에 삽입한 세포들은 형질감염된 숙주 세포를 선택할 수 있게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 독립영양을 제공하거나, 살생물체(예컨대, 항생제) 저항성, 또는 구리와 같은 중금속에 대한 저항성을 제공할 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접적으로 연결되거나 공동형질전환에 의해 동일한 세포 내로 도입될 수 있다. 추가적인 요소가 또한 최적의 mRNA 합성에 필요할 수 있다. 이러한 요소들은 신호 서열, 스플라이싱 서열뿐 아니라 전사 프로모터, 인핸서 및 말단 신호를 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 클로닝된 다양한 영역 유전자는, 위에서 논의한 바와 같이, 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(바람직하게는 인간) 합성체와 함께 발현 벡터 내로 삽입된다.

다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체 또는 이의 단편은 폴리시스트론 구조체를 통해 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 항체의 중쇄 및 경쇄와 같은 관심있는 다수의 유전자 산물은 단일 폴리시스트론 컨스트럭트로부터 생성될 수 있다. 이러한 시스템은 유리하게는 진핵 숙주 세포 내에서 상대적으로 높은 수준의 본 발명의 폴리펩티드를 제공하기 위해 내부 리보솜 유입 자리(internal ribosome entry site, IRES)를 사용한다. 친화성의 IRES 서열이 본원에 참조로서 포함된 미국 특허 제6,193,980호에 개시되어 있다. 당업자는 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 폴리펩티드의 전체 범위를 효과적으로 생성하기 위해 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

더욱 일반적으로, 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되고 있고, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 즉, 숙주 세포는 형질전환될 수 있다. 숙주 세포 내로의 플라스미드의 도입은 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 방법은, 이에 제한되지는 않으나, (전기영동 및 전기천공을 포함하는) 형질감염, 원형질 융합, 인산 칼슘 침전, 외피 DNA로의 세포 융합, 미세주입, 및 온전한 바이러스로의 감염을 포함한다. 문헌(Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988))을 참조한다. 가장 바람직하게, 숙주 내로의 플라스미드 도입은 전기천공을 통한다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생성에 적절한 조건 하에 생장하고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 평가한다. 예시적인 검정 기술은 효소 결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역검정(radioimmunoassay, RIA) 또는 형광 활성화 세포 분류기 분석(fluorescence-activated cell sorter analysis, FACS), 면역조직화학법 등을 포함한다.

본원에서 사용된 "형질전환(transformation)"이라는 용어는 유전형을 바꾸고 결과적으로 수여 세포의 변화를 야기하는 수여 숙주 세포 내로의 DNA의 도입을 지칭하는 넓은 의미로 사용되어야 한다.

동일한 세포주들을 따라 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성되고 적어도 하나의 이종 유전자를 암호화하는 벡터로 형질전환되는 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩티드의 단리를 위한 과정의

기술에서, "세포" 및 "세포 배양물"이라는 용어는 명확하게 다르게 구체화되지 않는 한, 항체의 원천을 보여주기 위해, 상호교환가능하게 사용된다. 다시 말해, "세포"로부터의 폴리펩티드의 회수는 스핀다운된 전세포로부터 또는 배지 및 혼탁된 세포를 모두 함유하는 세포 배양물로부터를 의미할 수 있다.

[0270] 일 구현예에서, 항체 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 포유동물 기원이고; 당업자는 그 안에서 발현될 원하는 유전자 생성물에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포는, 이에 제한되지는 않으나, DG44 및 DUXB11(차이니즈 햄스터 난소주, DHFR 음성), HEA(인간 경부암종), CVI(원숭이 신장주), COS(SV40 T 항원을 가지는 CVI 의 유도체), R1610(차이니즈 햄스터 섬유아세포) BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 신장주), SP2/0(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(인간 림프구), 293(인간 신장)을 포함한다. 일 구현예에서, 세포주는 항체가 발현된 세포주(예컨대, PER.C6.RTM.(Cruce11) 또는 FUT8-녹아웃 CHO 세포주(Potelligent.RTM. 세포)(Biowa, Princeton, N.J.)로부터 변경된 당화, 예컨대, 무푸코실화를 제공한다. 일 구현예에서, NSO 세포가 사용될 수 있다. CHO 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포주는 통상적으로 상업적인 서비스인 미국 세포주 은행(American Tissue Culture Collection) 또는 공개된 문헌으로부터 입수 가능하다.

[0271] 시험관 내 생성은 대량의 원하는 폴리펩티드를 제공하는 스케일 업을 가능하게 한다. 조직 배양 조건 하에 포유동물 세포 배양을 위한 기술들이 당해 분야에 공지되어 있고, 예컨대, 공기양수 반응기 또는 연속 교반 반응기 내에서의 균일 혼탁 배양, 또는, 예컨대, 중공 섬유, 미세 캡슐 내, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서의 고정되거나 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요하고/하거나 원한다면, 폴리펩티드의 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로오스를 사용한 크로마토그래피 및/또는 (면역) 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0272] 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체, 또는 이의 단편을 암호화하는 유전자는 또한 박테리아 또는 효모 또는 식물 세포와 같은 비 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 관점에서, 다양한 단세포 비포유동물 미생물(예를 들면, 박테리아), 즉, 배양물에서 생장할 수 있거나 발효될 수 있는 미생물이 또한 형질전환될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 형질전환이 잘 되는 박테리아는 장내세균과(예를 들면, 에스체리키아 콜라이 또는 살모넬라 균주); 간균과(예를 들면, 바실러스 서브틸리스); 뉴모코커스; 스트렙토코커스, 및 헤모필러스 인플루엔자의 구성원을 포함한다. 또한, 박테리아에서 발현될 때, 폴리펩티드는 봉입소체의 일부가 될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 폴리펩티드는 단리되고, 정제된 다음 기능적 분자 내로 조립되어야 한다.

[0273] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물도 또한 사용될 수 있다. 다수의 다른 균주들도 흔히 사용 가능하지만, 사카로마이세스 세레비지에 또는 통상적인 빵 효모가 진핵 미생물 중에서 가장 흔하게 사용된다. 사카로마이세스 내에서의 발현을 위해, 예를 들어, 플라스미드 YRp7(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))이 흔히 사용된다. 이러한 플라스미드는 이미 트립토판에서 생장하는 능력이 결여된 효모 돌연변이 균주(예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1(Jones, Genetics, 85:12 (1977)))에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 함유하고 있다. 그런 다음, 효모 숙주 세포 계놈의 특성으로서 trp1 손상의 존재는 트립토판의 부재 하에서의 생장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

V. 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체의 투여 방법 및 약학적 제제.

[0275] 다른 양태에서, 본 발명은 항 칼리딘 또는 des-Arg10-항체 또는 이의 단편을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0276] 본 발명의 항체 또는 이의 단편을 제조하고 대상체에 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 본 발명의 항체 또는 이의 단편의 투여 경로는 경구, 흡입 또는 국소에 의한 비경구일 수 있다. 본원에서 사용된 비경구라는 용어는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 비경구 투여의 정맥내, 동맥내, 피하 및 근육내 형태가 일반적으로 바람직하다. 이러한 투여 형태들 모두가 명백하게 본 발명의 범주 내인 것으로 고려되지만, 투여를 위한 형태는 주사용 용액, 특히 정맥 내 또는 동맥 내 주사 또는 점적주입일 수 있다. 보통, 주사에 적합한 약학적 조성물은 완충액(예컨대, 아세테이트, 인산염, 또는 시트르산 완충액), 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예컨대, 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시와 맞는 다른 방법들에서, 폴리펩티드는 유해한 세포 군집의 자리에 직접적으로 전달됨으로써 질환 조직을 치료제에 노출하는 것을 증가시킬 수 있다.

[0277] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수용액 또는 비수용액, 혼탁액 및 에멀젼을 포함한다. 비수용성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일 및 에틸 올레이트와 같은 주사용 유기

에스테르이다. 수용성 담체는, 염분 및 완충 배지를 포함하는, 물, 알코올성/수성 용액, 살린 에멀젼 또는 혼탁액을 포함한다. 대상 발명에서, 약학적으로 허용가능한 담체는, 이에 제한되지는 않지만, 0.01 내지 0.1 M, 그리고 바람직하게는 0.05 M 인산 완충액 또는 0.8% 염수를 포함한다. 다른 흔한 비경구 비히클은 인산 나트륨 용액, 링거 텍스트로스(Ringer's dextrose), 텍스트로스 및 염화 나트륨, 젖산화 링거액(Ringer's), 또는 고정유를 포함한다. 정맥 내 비히클은 링거 텍스트로스에 기반한 것 등과 같은 전해질 보충물, 유체 및 영양 보충물을 포함한다. 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 퀘레이팅제 및 불활성화 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제들이 또한 존재할 수 있다. 더욱 상세하게는, 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성) 또는 분산액 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 조제를 위한 멸균 분말을 포함한다. 이러한 경우에, 조성물은 반드시 멸균되어야 하고, 용이한 주사가능성이 존재하는 정도의 유체여야 한다. 조성물은 제조 및 저장의 조건 하에 안정해야 하고, 바람직하게는 박테리아 및 진균류와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보존될 것이다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우에서 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 및 티메로살 등을 포함하는 다양한 항박테리아 및 항진균제에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우, 등장제, 예를 들어, 자당, 폴리알코올(예를 들면, 만니톨, 소르비톨), 또는 염화 나트륨을 조성물 내에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 흡수 연장은 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물 내에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0278] 임의의 경우, 멸균 주사 용액은 활성 화합물(예컨대, 항체 그 자체 또는 다른 활성제와의 조합)을 요구되는 양으로 요구에 따라 본원에 나열된 성분 중 하나 또는 조합을 가지는 적절한 용매에 포함시키고 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기 분산 매질 및 위에 나열된 성분으로부터 요구되는 기타 성분들을 함유하는 멸균 비히클에 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로 사전 멸균 여과 용액으로부터의 임의의 추가적인 원하는 성분에 더해진 유효 성분의 분말을 산출한다. 당해 분야에 공지된 방법에 따라 주사를 위한 제제가 가공되고, 앰플, 백, 병, 주사기 또는 바이알과 같은 용기에 채워지고, 무균 상태 하에 밀봉된다. 또한, 제제는 각각이 참조로서 본원에 포함된 동시 계류중인 미국 일련번호 제09/259,337호 및 미국 일련번호 제09/259,338호에 기술된 키트와 같은 키트의 형태 내에 포장되고 판매될 수 있다. 이러한 제조 물품은 바람직하게는 연관된 조성물이 자가면역 또는 종양 장애로 고통받는 대상체를 치료하거나 자가면역 또는 종양 장애의 예후의 표지로 유용하다는 것을 나타내는 표지 또는 포장 인서트를 포함할 것이다.

[0279] 전술된 형태를 치료하기 위한 본 발명의 안정화된 항체 또는 이의 단편의 유효 용량은 투여의 수단, 표적 자리, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 또는 동물인지의 여부, 투여되는 다른 약제들, 및 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부를 포함하는 많은 다른 인자들에 따라 달라진다. 대개, 환자는 인간이지만, 유전자이식 포유동물을 포함하는 인간이 아닌 포유동물들도 또한 치료될 수 있다. 안전성 및 효능을 최적화하기 위해, 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 치료 투여량이 적정될 수 있다.

[0280] 본 발명의 항체로의 수동 면역에서, 투여량은, 예컨대, 숙주 체중의 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더욱 흔하게는 0.01 내지 5 mg/kg(예컨대, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg 등)의 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 체중 1 kg 당 1 mg 또는 체중 1 kg 당 10 mg 또는 1 내지 10 mg/kg의 범위, 바람직하게는 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 위의 범위의 중간의 용량들도 또한 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0281] 대상체는 이러한 용량을 매일, 격일, 매주 또는 실험적 분석에 의해 결정된 임의의 다른 일정에 따라 투여받는다. 하나의 예시적인 치료는 연장된 기간, 예를 들어, 적어도 6개월에 걸친 다수의 투여량으로의 투여를 수반한다. 추가적인 예시적인 치료 계획은 2주마다 1회 또는 매월 1회 또는 3 내지 6 개월마다 1회의 투여를 수반한다. 예시적인 투여 일정은 매일 1 내지 10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 격일로 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg를 포함한다. 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 가지는 2종 이상의 단일클론 항체가 동시에 투여되고, 이 경우 투여되는 각 항체의 투여량은 지시된 범위 내이다.

[0282] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 다수 회로 투여될 수 있다. 단일 투여량 사이의 간격은, 예컨대, 매일, 주간, 월간 또는 연간이 될 수 있다. 간격은 또한 환자에서 폴리펩티드 또는 표적 분자의 혈중 수준을 측정함으로써 지시되는 바와 같이 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 일정한 혈장 항체 또는 독소 농도, 예컨대, 1 내지 1000 ug/ml 또는 25 내지 300 ug/ml을 달성하기 위해 조정된다. 대안적으로, 항체 또는 이의 단편은 서방

제제로 투여될 수 있고, 이 경우 더 적은 빈도의 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자 내 항체의 반감기에 따라 달라진다. 일반적으로, 인간화 항체는 더 긴 반감기를 나타내고, 다음으로 키메라 항체 및 비인간 항체가 뒤따른다. 일 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 미접합 형태로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 접합 형태로 다수회 투여될 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 미접합 형태로 투여된 다음, 접합된 형태로 투여되거나 이 반대일 수 있다.

[0283] 투여의 빈도 및 투여량은 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 달라질 수 있다. 예방적인 적용에서, 본 항체 또는 이의 카테일을 함유하는 조성물은 환자의 저항성을 향상시키기 위해 아직 질병상태가 아닌 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효량"으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은, 다시, 환자의 건강 상태 및 일반적인 면역에 의존하지만, 일반적으로 용량 당 0.1 내지 25 mg, 특히 용량 당 0.5 내지 2.5 mg의 범위이다. 긴 기간에 걸쳐서 상대적으로 낮은 투여량이 상대적으로 널 잦은 간격으로 투여될 수 있다. 일부 환자는 그들의 남은 일생 동안 치료를 받는 것을 계속한다.

[0284] 치료적 적용에서, 질환의 진행이 감소되거나 종결되고, 바람직하게는 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 나타낼 때까지 상대적으로 짧은 간격의 상대적으로 높은 투여량(예컨대, 용량 당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체, 보다 일반적으로 5 내지 25 mg의 투여량이 방사면역접합을 위해 사용되고 세포독성-약물 접합 분자용으로는 더 높은 투여량을 가짐)이 때때로 요구된다. 그런 다음, 환자는 예방적 요법을 투여받을 수 있다.

[0285] 일 구현예에서, 대상체는 (예컨대, 벡터 내에) 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자로 치료받을 수 있다. 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 용량은 환자 당 약 10 ng 내지 1 g, 100 ng 내지 100 mg, 1 ug 내지 10 mg, 또는 30-300 ug DNA의 범위이다. 감염성 바이러스 벡터용 용량은 용량 당 10 내지 100 이상의 비리온으로 다양하다.

[0286] 치료제는 예방 및/또는 치료적 처치를 위한 비경구, 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개 내, 복강내, 비강내, 또는 근육내 수단에 의해 투여될 수 있다. 근육 내 주사 또는 정맥 내 주입이 본 발명의 항체의 투여를 위해 바람직하다. 일부 구현예에서, 치료적 항체 또는 이의 단편은 두개골 내로 직접적으로 주사된다. 일부 방법에서, 항체 또는 이의 단편이 서방성 조성물 또는 디바이스, 예를 들면 MedipadTM 디바이스로 투여된다.

[0287] 본 발명의 제제는 선택적으로 (예컨대, 예방적 또는 치료적) 치료를 필요로 하는 장애 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 바람직한 추가적인 제제는 당해 분야에 알려진 제제이고, 특정 장애에 대한 표준으로 투여된다.

[0288] 본 발명의 90Y 표지된 항체의 유효한 단일 치료 투여량(즉, 치료적 유효량)은 약 5 및 약 75 mCi 사이, 더욱 바람직하게는, 약 10 및 약 40 mCi 사이의 범위이다. 131I 표지된 항체의 유효한 단일 치료 비 골수 절제 투여량은 약 5 및 약 70 mCi 사이, 더욱 바람직하게는, 약 5 및 약 40 mCi 사이의 범위이다. 131I 표지된 항체의 유효한 단일 치료 절제 투여량(즉, 자가유래 골수 이식이 요구될 수 있음)은 약 30 및 약 600 mCi 사이, 더욱 바람직하게는, 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 키메라 변형 항체와 함께, 존재하는 뮤라인 항체의 더 긴 순환 반감기로 인해, 요오드 131 표지된 키메라 항체의 유효 단일 치료 비 골수 절제 투여량은 약 5 내지 약 40 mCi, 더욱 바람직하게는 약 30 mCi 미만의 범위이다. 예컨대, 111In 표지에 대한 영상화 범주는 통상적으로 약 5 mCi 미만이다.

[0289] 131I 및 90Y로 상당한 임상적 경험이 얻어졌지만, 다른 방사성표지들도 당해 분야에 알려져 있고, 유사한 목적을 위해 사용될 수 있다. 여전히 다른 방사성동위원소들이 영상화를 위해 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 범주 내에 맞는 추가적인 방사성동위원소는, 이에 제한되지는 않으나, 123I, 125I, 32P, 57Co, 64Cu, 67Cu, 77Br, 81Rb, 81Kr, 87Sr, 113In, 127Cs, 129Cs, 132I, 197Hg, 203Pb, 206Bi, 177Lu, 186Re, 212Pb, 212Bi, 47Sc, 105Rh, 109Pd, 153Sm, 188Re, 199Au, 225Ac, 211A 213Bi를 포함한다. 이를 고려하면, 알파, 감마 및 베타 방출자는 모두 본 발명에 맞는다. 또한, 본 개시의 관점에서, 당업자는 불필요한 실험 없이 어떠한 방사성핵종이 선택된 치료의 과정에 맞는지를 용이하게 결정할 수 있다는 것이 제시된다. 이를 위해, 임상 진단에서 이미 사용되고 있는 추가적인 방사성 핵종은 125I, 123I, 99Tc, 43K, 52Fe, 67Ga, 68Ga뿐만 아니라 111In을 포함한다. 항체는 또한 표적화된 면역요법(Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65: 111-125 (1987))에서의 잠재적인 사용을 위해 다양한 방사성핵종으로 표지된다. 이러한 방사성핵종은 188Re 및 186Re뿐 아니라 더 적은 범위로 199Au 및 67Cu를 포함한다. 미국 특허 제5,460,785호는 이러한 방사성동위원소를 고려한 추가적인 데이터를 제공하고, 참조로서 본원에 포함된다.

[0290] 앞서 논의한 바와 같이, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 포유동물 장애의 생체 내 치료를 위한 약학적 유효량

으로 투여될 수 있다. 이를 고려하면, 개시된 항체 또는 이의 단편이 활성 제제의 안정성을 증진하고 투여를 촉진하도록 제형화될 것이라는 것이 이해될 것이다. 바람직하게, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능하고, 비독성인 멸균 담체(예를 들면, 생리학적 염수, 비독성 완충액, 보존제 등)를 포함한다. 본 출원의 목적에서, 치료제에 접합되거나 접합되지 않은 본 발명의 항체의 약학적 유효량은 표적에 효과적인 결합을 달성하고, 혜택, 예컨대, 질환 또는 장애의 증상을 개선하거나 물질 또는 세포를 검출하는 것을 달성하기에 충분한 양을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 종양 세포의 경우에서, 폴리펩티드는, 바람직하게는, 종양 또는 면역반응성 세포 상의 선택된 면역반응성 항원과 상호작용할 수 있을 것이고, 이러한 세포 사멸의 증가를 제공할 것이다. 물론, 본 발명의 약학적 조성물은 유효량의 약학적 폴리펩티드를 제공하기 위해 단일 또는 다수 용량으로 투여될 수 있다.

[0291] 본 개시의 범주와 일치하여, 본 발명의 항체는 인간 또는 다른 동물에 앞서 언급된 치료방법에 따라 치료 또는 예방 효과를 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 이러한 인간 또는 다른 동물에 본 발명의 항체와 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 공지된 기술에 따라 조합하여 제조된 통상적인 투여 형태로 투여될 수 있다. 당업자는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제의 형태 및 특성이 조합될 유효 성분의 양, 투여의 경로 및 다른 잘 알려진 변수들에 의해 좌우된다는 것을 인식할 것이다. 또한, 당업자는 본 발명에 따른 하나 이상의 종의 폴리펩티드를 포함하는 칵테일이 특히 효과적인 것으로 판명될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

VI. 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 연관 질환 또는 장애의 치료 방법

[0293] 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체, 또는 이의 단편은 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 활성을 상쇄하는 데 유용하다. 따라서, 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 연관 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0294] 치료할 수 있는 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 연관 질환 또는 장애는, 제한 없이, 염증, 상처, 화상, 쇼크, 알레르기, 급성 또는 만성 통증 및 섬유증, 예컨대 신장 섬유증과 같은 병리생리학적 병태를 포함한다. 일정한 예시, 구현예에서, 본 발명의 항체는 신장 섬유증 및 연관된 급성 신장 손상뿐 아니라 말기 신부전의 주요 원인인 만성 신장 질환을 치료하기 위해 생성될 수 있다.

[0295] 당업자는 통상적인 실험에 의해 칼리딘 또는 des-Arg10-칼리딘 연관 질환 또는 장애를 치료하기 위한 목적으로 대해 효과적이고 비독성인 양의 항체(또는 추가적인 치료제)가 어떤 것인지를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 폴리펩티드의 치료적 활성량은 질환 상태(예컨대, 단계 I 대 단계 IV), 대상체의 연령, 성별, 의학적 합병증(예컨대, 면역억제 병태 또는 질환) 및 체중 및 대상체에서 원하는 반응을 유발하는 항체의 능력과 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 투여 계획은 최적 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 몇몇의 나누어진 투여량이 매일 투여될 수 있거나, 치료 상황의 급박함에 의해 지시되는 바에 비례하여 용량이 감소될 수 있다. 그러나, 일반적으로, 유효 투여량은 체중 1 킬로그램 당 하루에 약 0.05 내지 100 밀리그램, 더욱 바람직하게는 체중 1 킬로그램 당 하루에 약 0.5 내지 10 밀리그램의 범위 내일 것으로 예상된다.

VII. 예시화

[0297] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 더 예시되며, 이는 추가의 제한으로 이해되어서는 안 된다. 서열 목록, 도면들 및 모든 참조들의 내용, 본 출원 전체에 걸쳐 인용된 특허들 및 공개된 특히 출원들은 명백하게 참조로서 본원에 포함된다.

[0298] 또한, 본 발명에 따라, 당해 분야의 기술 내에서 채용된 통상적인 문자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술들이 존재할 수 있다. 이러한 기술들은 문헌에서 완전히 설명된다. 예컨대, 문헌(Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein 뒷ambrook et al., 1989")); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994))을 참조한다.

[0299] 실시예 1: 하이브리도마 생성: KLH에 접합된 칼리딘 펩티드로의 마우스의면역화 및 인간 BKR1 리간드에 대한 항

체 생성

[0300] 목적은 이러한 리간드가 인간 BKR1에 결합하는 것을 저해할 수 있는 칼리딘(KD, 서열번호 1) 및 des-arg-칼리딘(DAKD, 서열번호 2)에 대한 교차 반응성 항체를 개발하는 것이었다. 일반적으로 웨티드의 C- 또는 N-말단 중 어느 하나 상의 추가적인 시스테인을 통해 KLH에 접합된 KD로의 마우스의 면역화가 하이브리도마를 생성하기 위한 융합 파트너로서 마우스 골수 세포주와 융합하기 위한 마우스 비장세포를 수득하기 위해 사용되었다.

[0301] 간략하게, 면역화 프로토콜은 다음과 같다: BALB/c 마우스(8 내지 20 주령 미접촉(naive) 암컷)를 인산 완충 염수(PBS) 중의 균일한 양의 KLH-KD 및 KD-KLH 혼합물을 마우스 당 200 μ l의 총 부피로 Sigma 어쥬번트 시스템(Sigma cat #6322)에 1:1로 혼합된 마우스당 총 100 ug의 항원으로서 복강내로 면역화하였다(0일). 21일에 마우스를 PBS 중의 균일한 양의 KLH-KD 및 KD-KLH 혼합물을 마우스 당 200 μ l의 총 부피로 Sigma 어쥬번트 시스템(Sigma cat #6322)에 1:1로 혼합된 마우스당 총 50 ug의 항원으로서 부스팅하였다. 30일에, KD 특이적 항체 역가 평가를 위해 혈액 시료를 수확하였다. 51일에 마우스를 마우스 당 200 μ l의 총 부피로 Sigma 어쥬번트 시스템(Sigma cat #6322)에 1:1로 혼합된 마우스당 총 50 ug의 항원으로서 PBS 중의 균일한 양의 KLH-KD 및 KD-KLH 혼합물을 융합을 위해 부스팅하였다. 55일에, CO₂ 챔버에서 마우스를 희생시켰고, 심장 천자를 통해 혈액을 수집하였고, 하이브리도마 생성을 위해 비장을 수확하였다.

[0302] 아데노신 인산화리보실전이효소(adenosine phosphoribosyltransferase, APRT)가 결핍된 마우스 골수 세포를 특이적 항원으로 면역화된 마우스로부터의 비장 세포와 융합함으로써 하이브리도마를 제조하였다. 하이포잔틴, 아자세린 및 티미딘(HAT) 배지를 사용한 선택 시스템은 APRT+인 융합 세포를 제외한 모두를 제거한다. 성공적인 하이브리도마는 또한 면역글로불린(Igh) 중쇄, 면역글로불린 경쇄 유전좌위 중 하나를 보유하고, 기능적 항체를 분비해야 한다.

[0303] 하이브리도마 생성 배지(IMDM)는 하기를 조합하여 제조하였다: 500 ml 이스코브 변형 둘베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(HyClone SH30259.01), 50 ml 우태아 혈청(HyClone SH30070.03), 5 ml L-글루타민(Gibco Invitrogen cat # 25030), 5 ml 비필수 아미노산(Gibco Invitrogen cat # 11140050), 5 ml 피루브산나트륨(Gibco Invitrogen cat # 11360070), 5 ml 0.1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco Invitrogen cat # 15140148). 사용 전에 배지를 여과하였다. 중식 배지는 하기를 조합하여 제조하였다: 1000 ml 무혈청 배지(Gibco Hybridoma SFM # 12045), 100 ml 10% HyClone SuperLow IgG Defined FBS # SH30898.03 및 10 ml 페니실린/스트렙토마이신. 동결 배지는 여과 멸균된 45 ml 열 불활성화 FBS(HyClone SH30070.03) 및 5 ml DMSO였다. 다른 재료들은 다음을 포함하였다: HAT(50x)는 Sigma-Aldrich(# H0262)로부터 수득하였다; 하이브리도마 융합 및 클로닝 보충제(50X)(Roche Diagnostics 11 363 735 001); 트립토판 블루 염색 0.4%(Invitrogen cat # 15250-061 또는 T10282); 75 mM 헤페스(Hepes) 중 PEG 1500 50% w/v(Roche cat # 783641(10783641001)). HAT 및 하이브리도마 융합 및 클로닝 보충제를 제외한 모든 시약들은 37°C에서 사용되었다.

표 2

면역화 및 선별에 사용된 웨티드 시약

웨티드 번호	서열번호	웨티드 서열	웨티드 이름	대안적인 이름
1	5	RPPGFSPFR	브라디키닌	BK
2	117	비오틴-RPPGFSPFR		b-BK
3	71	RPPGFSPFR- 비오틴		BK-b
4	72	KLH-RPPGFSPFR		KLH-BK
5	73	RPPGFSPFR-KLH		BK-KLH
6	1	KRPPGFSPFR	칼리딘	KD
7	74	비오틴-KRPPGFSPFR		b-KD
8	75	KRPPGFSPFR- 비오틴		KD-b
9	76	KLH-KRPPGFSPFR		KLH-KD
10	77	KRPPGFSPFR-KLH		KD-KLH
11	6	RPPGFSPF	desArg9브라디키닌	DABK
12	78	비오틴-RPPGFSPF		b-DABK
13	79	RPPGFSPF- 비오틴		DABK-b
14	80	KLH-RPPGFSPF		KLHDABK
15	81	RPPGFSPF-KLH		DABK-KLH
16	2	KRPPGFSPF	desArg10칼리딘	DAKD
17	82	비오틴-KRPPGFSPF		b-DAKD

18	83	KRPPGFSPF- 비오틴		DAKD-b
19	84	KLH-KRPPGFSPF		KLH-DAKD
20	85	KRPPGFSPF-KLH		DAKD-KLH
21	3	RRPPGFSPFR	칼리딘 유사 웨티드	KLP
22	86	비오틴-RRPPGFSPFR		b-KLP
23	87	RRPPGFSPFR- 비오틴		KLP-b
24	88	KLH-RRPPGFSPFR		KLH-KLP
25	89	RRPPGFSPFR-KLH		KLP-KLH
26	90	RRPPGFSPF	desArg10칼리딘 유사 웨티드	DAKLP
27	91	비오틴-RRPPGFSPF		b-DAKLP
28	92	RRPPGFSPF-비오틴		DAKLP-b
29	93	KLH-RRPPGFSPF		KLH-DAKLP
30	94	RRPPGFSPF-KLH		DAKLP-b
31	95	RPPGF	브라디키닌1-5	BK15
32	96	비오틴-RPPGF		b-BK15

[0305] 간략하게, 융합 3 또는 4일 전에, 마우스를 관심있는 항원으로 복강내 또는 정맥내로 부스팅하였다. 융합 날, 마우스를 CO₂ 챔버 내에서 희생시키고, 심장 천자에 의해 혈액을 수집하였고, 비장을 취하여 페트리 접시 내 10 ml 무혈청 IMDM 내에 넣었다. 융합 파트너 세포 골수종: F0(ATCC ref CRL-1646)/ X63 Ag8.653(ATCC ref CRL1580)를 긴 기간 생장시키고, 융합 하루 전에 분할하고(1:2 및 1:5), 20 ml 원심분리 튜브 내에 수집하여, 희전시키고, 펠렛을 10 ml IMDM에 재현탁하였다. 펠렛을 무혈청 IMDM 배지로 2회 세척하였다. 모든 원심분리는 1570 rpm으로 5분간 수행되었다. 10 ml 무혈청 IMDM에 최종 재현탁하였다. 비장으로부터 결합 조직을 절개해낸다. 비장에 37°C에서 사전가열된 1 ml의 무혈청 IMDM을 1 ml 주사기 및 25 게이지의 바늘로 주사하였다. 비장세포를 겸자에 의해 섬유성 탄성 조직 외피로부터 짜내고, 10 ml의 무혈청 IMDM에서 2회 세척(초기 희전을 포함함)하고, 10 ml 무혈청 IMDM에 재현탁하였다. 세포를 Countess 자동화 세포 계수기에서 계수하였다.

[0306] 융합 파트너 세포 및 비장 세포를 하나의 50 ml 튜브에 (세포 수에 의해) 1:2 내지 1:10의 비로 조합하고, 970 rpm에서 10분간(느린 희전) 희전시켜서 느슨한 펠렛을 형성하였다. "느린" 희전 후, 펠렛을 흘뜨리지는 않지만, PEG 1500을 희석시키지 않기 위해 세포 위의 액체 양이 최소가 되도록 주의하면서 상층액을 취하였다. 마지막 잔존 배지를 남겨두고, PEG를 첨가한 다음 다시 첨가하였다(하기). 사전가열된 PEG 1500(37°C, 총 1 ml)을 1분의 기간 동안 세포 펠렛에 한 방울씩 떨어뜨려서 첨가하였고, PEG 방울이 모두 첨가된 후 세포를 혼합하였다. 10 중 처음 1 ml이 30초간 첨가되도록 1분 동안 10 ml 무혈청 IMDM 배지를 첨가한 후, 펠렛을 추가 1분간 PEG와 함께 항온배양하였다. 세포를 10분간 970 rpm으로 느리게 희전시키고, 상층액을 따라냈다. 100 ml 흄통(trough)(2)에, 다음을 첨가하였다: 10% FBS를 가지는 70 ml IMDM, 2 ml HAT 및 2 ml 하이브리도마 및 융합 클로닝 보충제. 세포를 10% FBS를 가지는 10 ml IMDM에 재현탁하고, 50 ml 튜브(2) 내에 분할(5 ml 세포/튜브)하여, 10% FBS를 가지는 25 ml IMDM을 첨가하였다. 결과물 30 ml을 70 ml HBSS/HAT/클로닝 보충제를 함유하는 흄통에 옮기고, 웰 당 200 ul 세포를 96-웰 플레이트(10) 내로 파이펫팅하였다. 융합은 약 10 내지 14일 후 또는 웰 내 배지가 황색으로 변할 때에 ELISA(50 ul)에 의한 선별을 위한 준비가 되었다. 1차 선별 후, 양성 클론들을 선택하고, 계수하고, 10% FBShI를 가지는 IMDM이 웰 당 500 ul인 24웰 플레이트로 이동시킨다. 하이브리도마 상층액을 N- 및 C-말단 비오틴화 웨티드로 코팅된 스트렙트아비딘이 평판배양된 ELISA에 의해 선별하였다(하기를 참조한다).

실시예 2: 인간 BKR1 리간드에 대한 항체를 발현하는 하이브리도마의 특성분석 및 선별

[0308] 하이브리도마 상층액을 N- 및 C-말단 비오틴화 웨티드로 코팅된 스트렙트아비딘이 평판배양된 ELISA에서 선별하였고(예컨대, 표 2에 기재된 웨티드를 참조), 그런 다음 확인된 양성 하이브리도마 클론에 대한 항체 결합 동역학을 결정하였다.

[0309] BKR1 리간드 웨티드에 결합하는 하이브리도마 상층액 내 항체의 능력을 ELISA 검정으로 평가하였다. 인산 완충 염수(PBS) 완충액 내 DAKD 비오틴 또는 KD-비오틴 웨티드를 5 ug/ml로 상온에서 한 시간 동안 96웰 SA 플레이트에 코팅하였고, 비특이적 결합 자리를 PBS 완충액 중 1% 소혈청 알부민(BSA)으로 차단하였다. 이러한 플레이트를 미정제 하이브리도마 상층액의 1차 및 2차 선별을 위해 사용하였다. 코팅된 KD 또는 DAKD 웨티드와의 결합을 위해 하이브리도마 상층액을 플레이트에 첨가하였다. 1시간의 항온배양 후, 플레이트를 세척하였고, 결합된 항체를 홀스래디쉬 과산화효소(HRP)가 접합된 2차 항체(HRP-염소 항 마우스 IgG(H+L): Jackson ImmunoResearch

Labs # 115-035-166)를 사용하여 검출하고, 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(ABTS) 기질(Roche diagnostics # 11 204 521 001)을 사용하여 현상하였다. 엑셀을 사용하여 데이터를 분석하였다. (1:10000 혈청 희석 ELISA 신호보다 2배 더 큰) 양성 신호를 나타낸 항체를 선택하였고, 확인을 위해 2반복으로 재선택하였다. 확인된 양성 하이브리도마 클론을 선택하였고, 비아코어에 의한 결합 해리율 순위결정을 수행하였다.

[0310]

항체 결합 동역학에서, 사용된 기기는 실시간 생물분자 상호작용 분석(BIA)을 위해 설계된 BIACORE 2000 또는 BIACORE 3000(GE Healthcare)이었다. 사용된 센서 칩은 카복시메틸화 텍스트란 매트릭스에 공유결합으로 고정된 스트렙트아비딘을 가지는 SA 칩(GE Healthcare)이었다. 각각의 센서 칩은 4개의 별별 세포 유동(Fc)를 가진다. 비오틴화된 BKR1 또는 BKR2 리간드 웨პ티드 모두를 결합 해리율 선별 및 선택적 선별을 위해 SA 칩 내의 유동 세포 2 내지 4(Fc2 내지 Fc4) 중 하나에 고정하였다. 음성 대조군으로서 시험 리간드 웨პ티드와 비교하기 위해 유동 세포 1(Fc1)을 남기고 동일하거나 유사한 웨პ티드 길이를 가지는 (하나의 말단이 비오틴화된) 무작위적 웨პ티드로 고정시켰다. 선별 결정에서, 일시적으로 발현된 인간화 변이체의 1차 선별을 통해 선택된 하이브리도마 클론의 세포 배양 상층액을 고정된 웨პ티드에 주사하였다. 하이브리도마 세포 배양 배지를 또한 베이스라인을 설정하기 위한 블랭크로서 칩 표면에 주사하였다. Fc1 및 블랭크 완충액 시행의 신호를 감한 후, 상층액으로부터의 각각의 웨პ티드에 대한 항체의 해리율을 분석하고 BIAevaluation 소프트웨어를 사용하여 순위결정하였다. 더 나은($kd < 10^{-4} \text{ M}$) 결합 해리율을 나타낸 항체 클론들만 서브클로닝 및 추가적인 특성분석을 위해 선택되었다. 동역학 분석에서, 선별에서 식별된 시험 항체에 대해 상응하는 비오틴-웨პ티드를 Fc2 내지 Fc4에 고정화한 반면 무작위 웨პ티드를 가지는 Fc1는 참조 세포로서 사용되었다. 선별로부터 선택된 각각의 정제된 항체는 0.1 내지 10 nM 사이의 러닝 완충액(1 x HBS-EP 완충액(GE Healthcare)) 내 일련의 두 배 희석액으로 제조하였다. 결합의 결합율, 해리율, 및 전체 친화도를 BIAevaluation에서 계산하였다. 각각의 항체에 대한 항체 결합 동역학은 항상 Biacore를 사용한 3반복 검정으로 확인하였다.

[0311]

총 8마리의 마우스가 혼합된 KLH-KD/KD-KLH 및 KLH-DAKD/DAKD-KLH로 면역화되었고, 위의 프로토콜을 사용하여 비장을 융합하였다. 약 7680개의 하이브리도마 클론의 DAKD-비오틴 및 KD-비오틴을 사용한 ELISA에서의 1차 선별 후, 단지 76개의 클론만이 양성인 것으로 확인되고, 스트렙트아비딘(SA) 칩 상에 고정화된 DAKD-비오틴 및 KD-비오틴을 사용한 Biacore 3000/2000에서의 결합 해리율 순위결정을 위해 선택되었다. 이들 중에서, 10^{-4} 이하의 결합 해리율을 가지는 8개의 하이브리도마 클론이 서브클로닝되고, 서열분석되고, 정제되고, 더 특성분석되었다(표 3 참조).

표 3

KLH-KD/KD-KLH 및 KLH-DAKD 및 DAKD-KLH로의 면역화 결과

리간드	검정에 사용된 웨პ티드	검정	클론 ID								
			B21	C63	F151	F306	I2	I8	I22**	I54**	
DAKD	b-DAKD	ELISA	+	+	-	-	+	+	+	+	
		Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	-	NS	NS	
	DAKD-b	ELISA	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Biacore (KD,M)	4.15 E-11	1.42 E-10	1.60 E-10	1.60 E-10	1.10 E-10	6.25 E-10	NTD	NTD	
DABK	b-DABK	FLIPR (50nM)	22-25, 9	-	6.9	6.9			9.4	8.1	
		ELISA	+/-	+/-	-	-	+	+	+	+	
	DABK-b	Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	-	NS	NS	
		ELISA	+	+/-	-	-	+	+	+	+	
	DABK	Biacore (KD,M)	-*	-	-	-	-	-	NS	NS	
BK	b-BK	FLIPR (nM)									
		ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	

	Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	-	NS	NS
BK-b	ELISA	+	-	-	-	+	+	+	+
	Biacore (KD,M)	8.57 E-09	-	-	-	-	-	NS	NS
	BK	FLIPR (nM)	-	-	-				
KD	b-KD	ELISA	+	-	-	-	-	-	-
		Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	NS	NS
	KD-b	ELISA	+	+	+	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	8.4 E-11	2.21 E-10	2.9 E-11	2.9 E-11	7.8 E-11	7.53 E-10	NTD
	KD (15nM)M	FLIPR (nM)	12	-	3.0	3.0	7.3	8.3	25
									30

NA = 적용 불가능, ELISA에서 음성
 NS = 비특이적 결합
 NTD = 결정되지 않음
 -* = 잔여 결합(Biacore에서 낮은 RU)

[0313] 표 3에 나타낸 결과에 기반하여, 고유의 서열을 가지는 5개의 클론이 동역학 연구를 위해 선택되었다. 이들 항체는 DAKD-비오틴, KD-비오틴, DAKLP-비오틴 및 KLP-비오틴 결합에 대하여 매우 선택적이었다(표 4 참조). 이들은 다른 키닌 웨프티드 또는 N-말단이 비오틴화된 웨프티드에 결합하지 않는다.

표 4

선택된 항 DAKD/KD 항체 후보들의 동역학의 요약

항체	DAKD-b		KD-b	
	koff	KD	koff	KD
C63	9.36E-05	1.42E-10	1.00E-04	2.21E-10
B21	9.89E-05	4.15E-11	2.04E-04	8.40E-11
F151	1.36E-04	1.62E-10	2.00E-05	2.88E-11
I22	3.19E-04	2.17E-10	2.10E-05	4.40E-12
I54	3.06E-05	9.53E-12	3.88E-05	1.12E-11
<hr/>				
	DAKLP-b		KLP-b	
	koff	KD	koff	KD
C63	n/b	n/b	n/b	n/b
B21	2.30E-04	1.34E-10	1.12E-04	1.92E-10
F151	6.58E-05	2.12E-10	≤1.0E-06	=1.66E-11
I22	≤1.0E-06	=1.83E-12	1.03E-05	1.82E-12
I54	5.66E-05	1.17E-11	6.04E-05	9.56E-12

n/b = 결합하지 않음

[0315] 설충류 BKR1 리간드, DABK 및 DAKD를 차단하는 항체뿐 아니라 키닌 패밀리의 웨프티드의 상이한 구성원에 대해 기타 결합 특이성을 가지는 항체를 생성하기 위해 다수의 면역원을 사용한 추가적인 면역화가 수행되었다(표 2의 웨프티드 목록 참조).

[0316] 표 5는 생성된 항체의 중쇄 및 경쇄 서열을 나열한 것이다.

표 5

항체의 중쇄 및 경쇄 서열

항체	동형	서열번호	중쇄 서열
B21	IgG1/k	97	LPEFQVKLEESGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTGYARKFQGKATMTADTSSNTV р LHLSSLTSEDTAVYYFNAWEYDGYYLDWГQGTSTVSSAKTTPPSVYGSS
C63		98	LPEFQVQLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWRQSPKLEWVAEIRSKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSV р QMNNLRAEDTGICYCIGEDYGGDYWGQGTSTVSSAKTTPPSVYGSS
F151		99	LPEFEVQLEESGPЕLVKPGTSVKSCASGYSFTDYNIYWWKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSТАFMHLSSLTSDSAVYYCANYRYDDHAMDYWGQGTSTVSSAKTTPPSVYGSS
I22		100	LPEFEV р LQESGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDSDYAPKFQGKATMTADTSSNTV р LQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLD FWГQGTSTVSSAKTTPPSVYGSS
154		101	LPEFEV р KLEQSGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDSDYAPKFQGKATMTADTSSNTV р LQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLD FWГQGTSTVSSAKTTPPSVYGSS
B21	m IgG1/K	118	EVQLQQSGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTGYARKFQGKATMTADTSNTV р LHLSSLTSEDTAVYYFNAWEYDGYYLDWГQGTSTVSSAKTTPPS
C63		119	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWRQSPKLEWVAEIRSKSNNYATHYAESVKGRFTISRD DSKSSV р QMNNLRAEDTGICYCIGEDYGGDYWGQGTSTVSSAKTTPPS
F151		120	EIQLQQSGPЕLVKPGTSVKSCASGYSFTDYNIYWWKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSСTAFMHLSSLTSDSAVYYCANYRYDDHAMDYWGQGTSTVSSAKTTPPS
I22		121	EVQLQQSGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDSDYAPKFQGKATMTADTSNTV р LQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLD FWГQGTSTVSSAKTTPPS
154		122	EVQLQQSGAELVRSGASV р SСTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDSDYAPKFQGKATMTADTSNTV р LQFSSLTSEDTAVYYCNAFEYDGNYSPLD FWГQGTSTVSSAKTTPPS
항체	동형	서열번호	경쇄 서열
B21	IgG1/k	102	ELDIVMTQTTLTSVTIGQPASIСKSSQSLLYSNGKTYLNWLЛQRPGQSPKRLIYLVSКLDSGVРDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVYCYCQGTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSKLELY
C63		103	ELDIVLTQSPSSLAVSVGЕKVTMSCKSSQSLLYSSDQRNYLAWYQQRSGQSPKLLIYWASTRESGVРDRFTGSGSGTDFTLTISSV р KAEDLAIVYCQOYYSYWPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSKLELY
F151		104	ELDIVMTQTPSSLAVSVGЕKVTMSCKSSQSLLYTSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTRESGVРDRFTGSGSGTDFTLTISSV р KAEDLAIVYCQOYYSYWPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSKLELY
I22		105	ELDIVITQTTLSLSVPIGQPASIСKSRQSLLYSNGETYLNLWLЛQRPGQSPKRLIYLVSКLDSGVРDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYCYCMQGTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSKLELY
154		106	ELDIVITQSTLTLSPVIGQPASIСKSSQSLLYSNGETYLNLWLЛQRPGQSPKRLIYLVSКLDSGVРDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYCYCMQGTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSKLELY
B21	m IgG1/K	123	DVVMQTPLTLSVTIGQPASIСKSSQSLLYSNGKTYLNWLЛQRPGQSPKRLIYLVSКLDSGVРDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVYCYCQGTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT
C63		124	DIVMSQSPSSLAVSVGЕKVTMSCKSSQSLLYSSDQRNYLAWYQQRSGQSPKLLIYWASTRESGVРDRFTGSGSGTDFTLTISSV р KAEDLAIVYCQOYYSYWPWTFGGGTKLEIKRADAAPT
F151		125	DIVMSQSPSSLAVSVGЕKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTRESGVРDRFTGSGSGTDFTLTISSV р KAEDLAIVYCQOYYSYWPWTFGGGTKLEIKRADAAPT
I22		126	DIVMTQSPSSLVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVРDRFTGSGSGTDFTLTISSV р QAEDELAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLEIKRADAAPT
154		131	DVVMQTPLTLSVPIGQPASIСKSSQSLLYSNGETYLNLWLЛQRPGQSPKRLIYLVSКLDSGVРDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYCYCMQGTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT

단일 밑줄 = CDR 영역; 이중 밑줄 = CDR을 식별하기 위한 특징 아미노산

[0318] 실시예 3: 뮤라인 동물 연구를 위한 대리 항체의 생성

뮤라인 동물 연구에 사용될 대리(surrogate) 항체는 설충류 BKR1 리간드, DABK 및 DAKLP(DAKD의 마우스 등가물)에 결합하고 중화할 수 있어야 할 필요가 있다. 요구되는 대리 항체를 생성하기 위해, 마우스는 우선 웨티드의 N-말단에 직접적으로 접합된 KLH를 가지는 DABK 및/또는 DAKD로 면역화된다. ELISA 선별로부터의 비오틴-DABK/비오틴-DAKD(웨티드의 N-말단에 직접적으로 비오틴화) 양성 하이브리도마 클론을 스케일업 및 정제를 위해 선택하였다. 비오틴-DABK, 비오틴-DAKL 및 비오틴-DAKD에 높은 친화도를 나타내는 패밀리 7에 나열된 항체(표 12 참조)를 Biacore 직접 결합 검정에 기반하여 선택하였다(표 10). 그러나, 패밀리 7 항체는 경쟁 ELISA에서 자연적인 비변형 DABK 및 DAKD 웨티드에 결합하지 않았고, 기능성 약물 선별 시스템(FDSS)(Hamamatsu

Photonics K.K., Japan)을 사용한 칼슘 유입 검정에서 중화 기능성이 결여되어 있다. 더욱이, 비오틴-DABK 및 비오틴-DAKD는 FDSS 검정에서 자연적인 비변형 DABK 및 DAKD 펩티드와 비교할 때 생물활성을 완전히 소실하였다(데이터 미도시).

[0320] KLH 및 비오틴의 직접적인 N-말단 접합은 DABK 및 DAKD의 자연적인 구조가 형성되는 것을 방지하는 것으로 가정하였다. KLH 및 비오틴 접합 펩티드에서 자연적인 구조를 회복하려는 목적으로, 펩티드 구조에 대한 KLH/비오틴 접합 효과를 "완화"하려는 의도를 가지고 링커가 설계되었고, DABK 및/또는 DAKD의 N-말단에 첨가되었다. 모델링 결과에 기반한 단순하고, 비극성이며 중성인 성질로 인해, 폴리 글리신 링커를 가장 먼저 시도하고 시험하였다. FDSS 검정 결과는 KLH 및 비오틴 접합 DABK 및 DAKD 펩티드의 생리활성을 회복하는 능력에 따를 때 gly-gly-gly(3G) 링커가 최선이었다는 것을 나타내었다(데이터 미도시). 따라서, KLH-3G-DABK가 마우스를 면역화하기 위해 선택되었다. 그리고, 비오틴-3G-DABK 및 비오틴 3G-KD가 결합 기반 선별 검정(ELISA 및 Biacore)에 사용되었다. 몇몇 DABK/DAKD 특이적 항체(페밀리 3, 표 13 참조)를 이러한 새로운 회차의 대리 항체 하이브리도마 선택에서 선택하였다. EE1이 자연적인 DABK/DAKD에 대한 EE1의 우수한 결합 친화도 및 중화 활성 및 다른 펩티드에 대한 교차 반응성의 결여에 기반하여 선도 대리 항체로서 선택되었다(표 6 내지 12 참조).

[0321] 표 13에 나열된 상이한 면역원을 사용할 때 상이한 특이성을 가지는 항체들이 생성되었다. 패밀리 4 항체들은 BKR2 수용체 리간드인 BK 및 KD에 특이적이었다. 패밀리 5 항체들은 BK 및 DABK의 C 말단에 특이적으로 결합한다. 패밀리 6 항체는 BK, DABK 및 DAKD에는 결합하지만 KD에는 결합하지 않는다.

[0322] 더 긴 폴리-글리신 링커, 폴리-알라닌 링커 및 이미 존재하는 링커(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG2) 링커 및 아미노헥사노익 산(Ahx) 링커(6-탄소 불활성 링커))를 포함하는 추가적인 링커들이 대리 EE1 항체에 대한 결합을 위해 EE1 내 DABK/DAKD 결합 포켓에 들어맞는 그들의 능력에 대하여 평가되었다. 모든 링커 펩티드는 Abgent(Can Diego, CA)에 의해 맞춤 합성되었다. 링커를 가지는 모든 시험된 비오틴화 펩티드(비오틴-링커-DABK/DAKD)는 EE1에 잘 결합되었고, 이는 임의의 불활성 N-말단 링커가 DABK 및 DAKD 펩티드가 비오틴 및 다른 분자들에 접합될 때 그들의 자연적인 생물활성 구조를 유지하는 데에 도움을 준다는 것을 나타낸다. 반대로, 직접적인 N-말단 비오틴 접합을 가지는 펩티드인 비오틴-DABK 및 비오틴-DAKD에서는 EE1에 대한 결합이 관찰되지 않거나 불량한 결합이 관찰되었다(도 1 참조).

[0323] 생성된 항체들의 결합 동역학이 표 5 내지 11에 요약되어 있다. 다음으로, 생성된 모든 항체들을 패밀리에 따라 분류하였고, 그들의 결합 특이성은 하기의 표 12에 요약하였다. 표 13은 그들의 결합 특이성에 기반하여 패밀리 1 및 패밀리 2에 놓여진 항체의 중쇄 및 경쇄 서열을 제공한다(표 12 참조).

표 6

b-3G-DABK 및 b-3G-DAKD 펩티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	b-3G-DABK			b-3G-DAKD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	1.5E+06	2.3E-04	1.6E-10	4.7E+05	4.0E-04	8.8E-10
UR11	2.0E+05	3.0E-04	1.5E-09	3.0E+05	1.6E-03	5.2E-09
DD7	2.3E+05	6.0E-04	2.7E-09	2.1E+05	1.4E-03	6.6E-09
EE1	4.4E+05	1.2E-04	2.8E-10	4.4E+05	2.0E-04	4.5E-10
EE36	4.3E+03	5.3E-04	1.2E-07	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b*	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	3.44E+05	3.91E-05	1.14E-10	3.18E+05	5.07E-05	1.60E-10
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b* = 비특이적 결합, n/b = 결합하지 않음

표 7

b-3G-DAKLP 및 b-3G-BK 펩티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	b-3G-DAKLP			b-3G-BK		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	3.1E+05	6.1E-04	2.0E-09	3.0E+05	7.1E-04	2.3E-09
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	1.7E+05	2.1E-03	1.2E-08	1.3E+05	8.8E-04	6.8E-09
EE1	4.2E+05	2.9E-04	6.8E-10	2.5E+05	2.6E-03	1.1E-08
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	ND	ND	ND	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음

표 8

B-3G-KLP 및 b-3G-KD 펩티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	b-3G-KLP			b-3G-KD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	3.8E+05	5.7E-04	1.5E-09	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	1.2E+05	1.3E-03	1.1E-08
DD7	1.5E+05	2.1E-03	1.5E-08	2.2E+05	1.8E-03	8.4E-09
EE1	4.0E+05	2.1E-03	5.3E-09	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	ND	ND	ND	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음

표 9

DABK-b 및 DAKLP-b 펩티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	DABK-b			DAKLP-b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	1.5E+06	5.8E-05	3.9E-11	3.0E+06	2.1E-03	6.8E-10
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음

표 10

BK-b 및 b-BK 패티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	BK-b			b-BK		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	1.5E+06	1.0E-04	7.2E-11	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	8.69E+04	8.77E-04	1.01E-08
NR15	n/b	n/b	n/b	2.95E+05	1.09E-03	3.68E-09

n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음

표 11

b-DABK 및 b-DAKD 패티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	b-DABK			b-DAKD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	1.48E+05	1.04E-03	7.15E-09	3.27E+05	7.63E-04	2.36E-09
LR16	4.34E+05	4.38E-05	1.01E-10	2.07E+05	3.39E-03	1.65E-08
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	2.91E+05	5.40E-04	3.63E-09	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음

표 12

b-DAKLP 및 b-KD 펩티드에 대한 항체 동역학의 요약

클론	b-DAKLP			b-KD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	1.84E+05	2.58E-04	1.40E-09	n/b	n/b	n/b
LR16	2.34E+05	1.11E-04	4.74E-10	n/b	n/b	n/b
LR6	6.80E+05	4.01E-04	7.45E-10	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	1.66E+05	5.81E-03	3.56E-08
NR15	n/b	n/b	n/b	7.66E+05	5.66E-03	7.41E-09
n/b = 결합하지 않음; ND = 결정되지 않음						

표 13

항 키닌 펩티드 항체 생성의 요약

항체 패밀리	면역원	대표적인 항체	결합 특이성
패밀리 1	KD-KLH + KLH-KD 또는 DAKD-KLH + KLH-DAKD	F151, B21, I22, I54	DAKD(DAKLP) 및 KD(KLP)의 N-말단
패밀리 2	KD-KLH + KLH-KD 또는 DAKD-KLH + KLH-DAKD	C63	DAKD 및 KD의 N-말단
패밀리 3	KLH-3G-DABK	EE1, DD20, JK3	DABK 및 DAKD(DAKLP)의 C-말단
패밀리 4	KLH-BK 및 BSA-BK	NR15, NR1	BK 및 KD의 C-말단
패밀리 5	KLH-BK	UR29	BK 및 DABK의 N-말단
패밀리 6	KLH-BK	UR11	BK, DABK 및 DAKD
패밀리 7	KLH-DABK 또는 KLH-DAKD	LR4, LR6, LR12 and LR16	자연적인 펩티드와 결합하지 않음

[0332] 실시예 4: 칼슘 이동을 사용한 des-arg-키닌 리간드 고갈의 특성분석

[0333] 7개의 패밀리의 생성된 항체들을 추가로 특성분석하기 위해 기능성 검정을 사용하였다. 브라디키닌 B1 수용체 신호전달은 Gq 커플링되며, 따라서, 수용체 활성화는 IP3의 Gq 활성화 및 하류의 칼슘 이동을 이용하여 감시할 수 있다. HEK mBKR1(재조합 마우스 브라디키닌 B1 수용체) 세포 또는 MRC5(브라디키닌 B2 수용체의 내인성 발현)(ATCC CCL-171)을 칼슘 이동을 측정하기 위해 사용하였다.

[0334] 간략하게, 마우스 Bdkrb1 유전자(하기에 제공된 서열)를 마우스 폐 cDNA(Biochain, Cat# C1334152)로부터 PCR 프라이머 804_cGWY_F를 사용하여 증폭하였고:

[0335] 5' - AAAAGCAGGCTTAGGAGCGGCCGCATGGCGTCCCAGGCCTCGCTG-3' 서열번호 107) 및 804_cGWY_R:

[0336] 5' - CAAGAAAGCTGGTCGGATCCTATAAAGTCCCAGAACCTGGTC-3' 서열번호 108) 및 Pfu 중합효소(Agilent Technologies, Cat# 600264), BP 클로네이즈 효소 혼합(Invitrogen, Cat# 11789-020)을 사용하여 pDONR201 내로 클로닝하였다. 동시에, pEAK8 발현 벡터(EDGE Biosystems)를 N-말단 HA 태그(GCATACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT, GenBank 서열번호 109 CY100443)를 EcoRI 및 HindIII로 선형화된 pEAK8(벡

터 pEAK8-nHA) 내로 삽입하고, 이어서 Gateway 카세트 B(Invitrogen, Cat# 11828-029)를 EcoRI 및 NotI로 분해되고 Klenow 중합효소(NEB, cat# M0210S)로 평활말단이 된 pEAK8_nHA내에 삽입하여 백터 pEAK8_nHA_DEST를 얻음으로써 변형시켰다. 다음으로, 마우스 Bdkrb1을 pEAK8_nHA_DEST에 LR 클로네이즈(Invitrogen, Cat# 11791-100)를 사용하여 서브클로닝하였다. 그런 다음, 293-PSC 세포를 pEAK8-Bdkrb1 플라스미드로 Fugene 6 형질감염시약을 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염 24 시간 후, 세포를 항생제(퓨로마이신) 선택 하에 놓고, 안정적인 세포주를 생성하기 위해 선택을 유지하였다. 얻어진 안정적인 세포주 내 Bdkrb1 유전자의 존재는 실시간 RT-PCR을 사용하고, 아가로스 젤 전기영동에 의해 확인되었다. 브라디키닌 B1 수용체의 세포 표면 발현은 FACS 기기에서 브라디키닌 B1R 상의 N-말단 HA 태그에 대한 항체(Covance, Cat # MMS-101P)를 사용하여 수행되었다. 브라디키닌 B1 수용체의 기능적 활성을 선택적인 아고니스트로의 칼슘 이동 검정에서 입증되었다.

[0337]

Bdkrb1 유전자가 세포 내로 서브클로닝되었다:

[0338]

```
ATGGCGTCCCAGGCCCTCGCTGAAGCTACAGCCTCTAACCAAAGCCAGCAGGCCCTCCAAACATCACCTCCTGCGAGGGCGCCCGAAGCCTGGATCTG
CTGTGTCGGGTGCTGCCAGGGTTGTCATCACTGTCGTTCTGCCTCTGGGAACCTTTAGTCCTGTCCTTGCCTTGCGACGATGG
TGGCAGCAGCGGCCAGCGCTAACCATAGCAGAAATCTACCTGGCTAACGGCTCTGATCTGGTGTGCTGGCCTGCCCTCTGGCAGAG
AACGTTGGAACCGTTCAACTGCCCTTGGAAAGTGACCTCTGCCGGTGGTCAGCGGGTCATCAAGGCAACCTGTTCATCAGCATCTCCTGGTGGTG
GCCATCAGTCAGGACCGCTACAGGTTGCTGGTATAACCCATGACCAGCTGGGGAACCGCGCGACGGCAAGGCCAAGTGACCTGCCGCTCATCTGGTA
GCTGGGGCCTCTGAGCACCCCCACGTTCTGCGTCCGTCAAAGTCGTCCTGATCTGAACATCTGCCTGCATCCTGCTTCCCCACGAAGCT
TGGCACTTGTAAAGGATGGTGGAGTTGAACGTTGGGTTCTCCATTGGCTGCCATCCTCTACTTCACATTCACATCCTGGCCTCCCTGAGAGGA
CAGAAGGAGGCCAGCAGAACCCGGTGTGGGGACCCAAGGACAGCAAGACAATGGGCTGATCCTCACACTGGTAGCCTCCTGGTCTGCTGGCCCCCT
TACCACTCTTGCTTGCCTCCTGGATTTCCTGGTCCAGGTGAGAGTGATCCAGGACTGCTCTGGAAGGAGCTCACAGACCTGGCCTGCAGCTGCCAACATTC
TTTGCTTTGTCAACAGCTGCCTGAACCCACTGATTATGCTTGCAGGCCGGCTTTAAGACCAGGGTCTGGAACTTTATAA(GenBank
NM_007539; 서열번호 110)
```

[0339]

HEK mBKR1 또는 MRC5 세포를 384 웰의 투명 바닥 플레이트의 성장 배지 내에 평판배양하였고, 밤새 부착되도록 하였다. 그런 다음, 성장 배지를 제거하고, 검정 완충액(HBSS, 20 mM HEPES, 2.5 mM 프로베네시드) 내에서 세포를 세척한 다음, 37°C에서 1 시간 동안 0.04% 폴루론 산과 함께 세포 투과성 칼슘 감지 염색제인 0.5 μM Fluo-4AM 염색제를 로딩하였다. AM 에스테르는 분해되고, 칼슘 염색제는 세포질 내에 보유된다. 1 시간 후, 과량의 염색제를 제거하기 위해 세포를 세척하였고, 20 uL의 잔류 완충액을 세포 상에 유지시켰다. 치료제를 2X용액으로서 Hamamatsu로부터의 기능성 약물 선별 시스템(Functional Drug Screening System, FDSS)에 첨가하였고, 칼슘 이동을 적어도 4분간 동역학적으로 감시하였다. B1R 또는 B2R 수용체 활성화는 Galpha q 매개 포스포리파제 C 활성화 및 IP3 매개 칼슘 이동을 초래한다. Fluo-4 염색제가 방출된 칼슘을 캘레이팅하고, 형광의 강한 변화가 관찰된다. 결과는 세포 밀도 사이의 차이 또는 플레이트를 가로지르는 염색제 로딩을 정규화하기 위해 최대-최소 상대적 형광 단위로서 이출되었다.

[0340]

리간드 효능은 리간드의 농도 반응 곡선을 시행함으로써 매일 결정되었고, 대략 EC 70 내지 80 농도의 리간드를 항체와의 항온배양을 위해 선택하였다. EC80 농도가 선택되었는데, 이는 EC80 농도가 검출 곡선의 선형 범위에 있고, 길항제 또는 리간드 고갈 항체를 사용한 감소를 보여주는 충분한 차이 있기 때문이었다. 용량 반응 곡선의 항체는 EC80 농도 리간드에 결합할 수 있고, 리간드 고갈의 범위는 형광에서의 변화를 이용하여 감시하였다. 결과들은 완충액 및 EC80 리간드 반응에 대하여 정규화되었고, 리간드 고갈에 대한 EC50을 계산하였다. 그런 다음, 결과를 사용된 리간드 농도에 따라 나눠진 리간드 반응의 50% 고갈(즉, 항체의 EC50)을 낮추는 항체 농도에 상응하는 몰비로 기록하였다. 이론적인 최대치는 0.5이어야 하는데, 이는 하나의 단위의 항체가 2 단위의 리간드를 고갈시킬 수 있기 때문이지만, 우리는 실제로는 더 낮은 수치를 확인하였고, 이는 항체에 대한 화학양론적 제약보다는 낮은 리간드 농도에 대한 검출 방법의 불감을 반영한 것일 것이다. 이러한 실험의 결과들은 표 14 내지 16에 기재된다.

[0341]

모든 패밀리 1 및 패밀리 2 항체(표 13 참조)는 Biacore에 의한 우수한 결합 동역학(표 3) 및 DAKD 및 KD 펩티드에 대한 칼슘 이동에 의해 측정된 바와 같은 중화 활성(표 14 및 15)을 나타내었다. 항체를 열적 안정성 및 인간화에 대한 서열 적합성에 대해 더 분석하였다. F151을 인간화를 위해 더 진전시켰는데, 이는 F151이 열적으로 안정하고, CDR 영역에 문제성 잔기가 없고, 마우스 리간드 KLP 및 DAKLP에 교차 반응성이기 때문이었다.

[0342]

HEK mBKR1 세포 내에서 칼슘 이동을 사용한 des-arg-키닌 리간드 고갈의 특성분석

폐밀리	항체	DABK의 고갈			DAKD의 고갈			DAKLP의 고갈		
		DABK (평균 몰비)	SD 몰비	n	DAKD (평균 몰비)	SD 몰비	n	DAKLP (평 균 몰비)	SD 몰비	n
1	F151	IA100		5	0.08	0.04	7	0.15	0.04	4
1	B21	IA100		1	0.15	0.04	3	0.67		1
1	I22	IA100		1	0.07	0.02	3	0.21		1
1	I54	IA100		1	0.15	0.05	3	0.35		1
2	C63	IA100		1	0.08	0.02	3	5.85		1
3	EE1	1.03	0.52	5	0.86	0.52	3	0.57	0.36	4
3	DD20	3.45	1.34	3	1.82	0.76	3	1.31	0.86	3
	DD7	2.18	0.45	3	4.22	0.95	3	5.34	1.22	2
3	JK3	1.86	0.03	2	ND			1.44	0.03	2
4	MBK3	ND			ND			ND		
4	NR15	ND			ND			ND		
4	NR1	ND			ND			ND		
5	UR29	0.60	0.12	5	IA200		3	IA300		4
6	UR11	6.99	1.61	3	19.65	14.95	3	11.09	3.13	2
7	LR4	IA100		1	IA400		1	IA400		1
7	LR6	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR12	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR16	IA100		1	IA100		1	ND		
브라디키닌 B1 수용체에서 칼슘 이동을 활성화하기 위해 항체를 일련의 농도, 보통 EC 70 내지 80의 리간드와 함께 사전 항온배양하였다. Hamamatsu FDSS6000 기기 상에서 칼슘 감지 염색제(Fluo-4AM 또는 Fluo-8AM)가 사전 로딩된 HEK mBKR1 세포에 항체 리간드 혼합물을 첨가하였고, 칼슘 이동을 감시하였다. 데이터는 생물학적 반응의 최대-최소 상대적 형광으로서 이출되었고, 리간드 고갈에 대한 IC50을 Graph Pad Prism V4.03에서의 S자형 곡선 맞춤을 사용하여 계산하였다. 데이터는 다양한 실험에 사용되었던 상이한 농도의 리간드를 표준화하기 위해 항체에 의한 리간드 고갈에 대한 몰비로 기록하였다.										
리간드 고갈에 대한 몰비 = [항체의 IC50] / [리간드]										
SD = 표준 편차; ND = 결정되지 않음; IA100 = 100 nM에서 불활성; IA200 = 200 nM에서 불활성; IA300 = 300 nM에서 불활성; IA400 = 400 nM에서 불활성										

표 15

[0343]

MRC5 소 폐 섬유아세포 내에서 칼슘 이동을 사용한 키닌 리간드 고갈의 특성분석

폐밀리	항체	BK의 고갈			KD의 고갈			KLP의 고갈		
		BK (평균 몰비)	SD 몰비	n	KD (평균 몰비)	SD 몰비	n	KLP (평균 몰비)	SD 몰비	n
1	F151	IA100		5	0.14	0.05	5	0.15	0.02	3
1	B21	IA100		1	0.33		1	ND		
1	I22	IA100		1	0.22		1	ND		
1	I54	IA100		1	0.30		1	ND		
2	C63	IA100		1	0.23		1	ND		
3	EE1	IA300		4	IA300		4	IA150		1
3	DD20	IA600		4	IA600		5	IA150		1
	DD7	7.11	3.62	3	17.37	12.11	3	4.27		1
3	JK3	IA300		2	IA300		2	ND		
4	MBK3	22.11	14.10	9	3.46	2.64	6	9.45		1
4	NR15	15.26	11.51	5	4.34	2.55	5	11.18		1
4	NR1	39.31		1	42.15		1	32.58		1
5	UR29	1.15	0.86	5	0.30	0.08	2	0.41		1
6	UR11	5.41	0.80	2	25.21	4.54	2	1.53		1
7	LR4	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR6	IA100		1	IA100		1	ND		

7	LR12	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR16	IA100		1	IA100		1	ND		
브라디키닌 B2 수용체에서 칼슘 이동을 활성화하기 위해 항체를 일련의 농도, 보통 EC 70 내지 80의 리간드와 함께 사전 항온배양하였다. Hamamatsu FDSS6000 기기 상에서 칼슘 감지 염색제(Fluo-4AM 또는 Fluo-8AM)가 사전 로딩된 MRC5 소 폐 섬유아세포(ATCC CCL-171)에 항체 리간드 혼합물을 첨가하였고, 칼슘 이동을 감시하였다. 데이터는 생물학적 반응의 최대-최소 상대적 형광으로서 이출되었고, 리간드 고갈에 대한 IC50을 Graph Pad Prism V4.03에서의 S자형 곡선 맞춤을 사용하여 계산하였다. 데이터는 다양한 실험에 사용되었던 상이한 농도의 리간드를 표준화하기 위해 항체에 의한 리간드 고갈에 대한 몰비로 기록하였다.										
리간드 고갈에 대한 몰비= [항체의 IC50]/ [리간드]										
SD = 표준 편차; ND = 결정되지 않음; IA100 = 100 nM에서 불활성; IA150 = 150 nM에서 불활성; IA300 = 300 nM에서 불활성; IA400 = 400 nM에서 불활성, IA600 = 600 nM에서 불활성										

[0344] 실시예 5: F151의 조작: 인간화, 안정화 및 원치않는 서열 모티프의 돌연변이화

1. 인간화

[0345] 사용된 인간화 프로토콜은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된 PCT/US08/74381(US20110027266)에 기술되어 있다. 뮤라인 F151의 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH) 서열이 문자 작동 환경(MOE; v. 2009.10; Chemical Computing Group)내 항 DAKD/KD F151 LC 및 HC의 상동성 모델을 구축하기 위해 사용되었다. 하기의 주형이 사용되었다: 경쇄 구조형성부-1SBS(구조형성 영역에서 93% 동일성), 중쇄 구조형성부-2VXT(구조형성 영역 내 84% 동일성), L1 - 1LVE(93% 동일성), L2 - 1EEU(100% 동일성), L3 - 2R56(93% 동일성), H1 - 1NJ9(95% 동일성), H2 2VXU(76% 동일성) 및 H3 - 1HIL(49% 동일성). Rutgers 및 캘리포니아대학교 샌디에이고 캠퍼스에 의해 운영되는 웹사이트 인 및 월드 와이드 웹 rcsb.org에 밝혀진 RCSB 단백질 데이터뱅크의 주형이 이용가능하였다(Berman, H.M.; Westbrook J.; Feng. Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 235-242.). 이어서 상동성 모델을 MOE에서 구현되는 표준 절차를 사용하여 에너지 최소화하였다. 단백질 골격에 제한을 가지는 뮤라인 F151의 최소화된 3D 상동성 모델의 문자 역학(MD) 시뮬레이션을 이어서 일반화된 보른 내포 용매(Generalized Born implicit solvent)에서 1.1 나노세컨드(ns) 동안 500K 온도로 수행하였다. 제1 MD 시행으로부터 마지막 1 ns 동안 100 피코세컨드(ps)마다 10개의 다양한 구조가 추출되었다. 이러한 다양한 구조들은, 그런 다음, 단백질 골격에 대한 제약 없이 300 K 온도에서 약 2.3 ns 동안 각각 MD 시뮬레이션에 제출되었다. 다음으로 10 MD 시행 각각에서, MD 궤적으로 부터의 마지막 2,000 스텝샷을 매 ps 마다 1회 각 뮤라인 F151 아미노산에 대해 참조 메도이드(medoid) 위치와 비교하여 그의 평균제곱편차(rmsd)를 계산하기 위해 사용하였다. 모든 F151 뮤라인 아미노산의 전체 평균 rmsd 와 주어진 아미노산의 10회의 개별 MD 시행에 대한 평균 rmsd를 비교함으로써, T 세포 수용체와 상호작용할 수 있고, 면역 반응의 활성화를 담당하는 것으로 간주되는 MD 동안에 보여지는 바와 같이 아미노산이 충분히 유연한지를 결정한다. CDR 및 그의 바로5 Å 인접부를 제외한 62개의 아미노산이 뮤라인 F151 항체에서 유연한 것으로 식별되었다.

[0346] 그런 다음, 20 ns(10 x 2 ns) 동안, 28개의 가장 유연한 뮤라인 F151 아미노산의 운동을, 각각이 10 x 2 ns MD 시뮬레이션을 시행한 49개의 인간 생식계열 상동 모델의 상응하는 유연한 아미노산의 운동과 비교하였다. 49개의 인간 생식계열 모델을 7개의 가장 공통적인 인간 생식계열 경쇄(vk1, vk2, vk3, vk4, vlambda1, vlambda2, vlambda3) 및 7개의 가장 공통적인 인간 생식계열 중쇄(vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6)를 조직적으로 조합하여 구축하였다. vk1-vh1b 인간 생식계열 항체는 뮤라인 F151 항체의 유연한 아미노산에 비교하여 그의 유연한 아미노산에 대해 0.80의 4D 유사도를 나타내었다; vk1-vh1b 생식계열 항체를, 따라서, 유연성 아미노산에 초점을 맞추어 F151 항체를 인간화하기 위해 사용하였다. 뮤라인 F151 vk1-vh1b 아미노산 사이의 쌍별 아미노산 연관을 위해, 2개의 상응하는 상동 모델의 알파 탄소의 최적 3D 중첩에 기반하여 2개의 서열을 정렬하였다(각각, F151 및 F151 HC와 vk1 및 vh1b의 정렬에 대하여 도 15를 참조한다).

2. 안정화

[0347] 항체의 안정성을 개선하기 위해 2개의 접근법이 사용되었다.

[0348] a) 지식 기반 접근법

[0349] 낮은 발생 빈도의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 대 CDR을 제외한 그들의 정준 서열이 가장 빈번하게 발견되는 아미노산 내로 돌연변이화되도록 제안되었다($\Delta\Delta G_{th} > 0.5 \text{ kcal/mol}$; E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, p. 580-593). 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)에 대한 컨센서스 돌연변이의 제1 목록은 가장 가까운 인

간 생식계열(vk1-vh1b)에서 발견되는 아미노산으로 제한되었다. CDR의 바로 인접부(5 암스트롱의 "베르니어" 구역, J. Mol. Biol. 224, 1992, p. 487-499)내에 제시된 변화는 고려에서 제외하였다. 이는 LC 내 5개의 안정화 돌연변이(표 19 참조) 및 HC 내 4개의 안정화 돌연변이(표 20 참조)를 초래하였다. 항 DAKD/KD F151 항체를 잠재적으로 안정시키기 위한 이들 돌연변이의 다른 기준도 고려하였다. 이러한 범주는 표면 소수성의 호의적인 변화 또는 돌연변이의 분자 역학 기반 예상 안정화였다. 또한, 문헌(E. Monsellier & H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, p. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol., 1994, 240, 188-192)에서 성공적인 것으로 보고된 추가적인 안정화 돌연변이도 고려하였다(표 16 내지 22 참조). 이러한 변화들 중 하나는 하기 서열 HC2a, HC2b 및 HC2c 내 안정화 돌연변이(D89E)로서 포함되었다. 다른 제시된 변화(Q62E)는 변이체 HC2b에 포함되었다.

[0352] b) 3D 및 MD 기반 접근법

3D 및 MD 기반 접근법이 사전에 보고되어 있다(Seco J, Luque FJ, Barril X., J Med Chem. 2009 Apr 23;52(8):2363-71; Malin Jonsson et al., J. Phys. Chem. B 2003, 107, 5511-5518). 항체의 소수성 영역을 이원 용매내 Fab의 분자 역학 시뮬레이션(수 중 20% 이소프로판을, 20 ns 생성 시뮬레이션)을 분석함으로써 명확하게 식별하였다. 그런 다음, 라이신 돌연변이를 이러한 영역의 인접부에 응집을 방지하기 위한 시도로써 도입하였다. Schrodinger의 maestro 소프트웨어(v. 8.5.207) 내에서 소수성 표면 지도를 사용한 추가적인 분석을 완료하였다. 이러한 2가지 기술의 조합을 사용함으로써, 중쇄 내 하나, 및 경쇄 내 하나의 2개의 Lys 돌연변이가 제시된다.

[0354] 3. 이식에 의한 인간화

이식 기술을 사용한 인간화 기술이 사전에 보고되어 있다(Peter T. Jones, Paul H. Dear, Jefferson Foote, Michael S. Neuberger & Greg Winter, Nature, 1986, 321, 522-525). 사용된 인간화 과정은 항 DAKD/KD 경쇄 및 중쇄에 가장 가까운 인간 생식계열을 식별함으로써 시작되었다. 이것은 조직적으로 나열된 모든 인간 생식계열(카파 및 람파 사슬에 대한 V & J 도메인; 중쇄에 대한 V, D, 및 J 도메인의 모든 가능한 조합)에 대한 BLAST 검색을 수행함으로써 수행된다

다음으로 가장 가까운 인간 생식계열은 항 DAKD/KD F151 경쇄(LC) 및 중쇄(HC)에 각각 83% 및 62% 서열 동일성을 가지는 것으로 식별되었다(도 16 참조). 내부 VBASE 생식계열을 사용하여, 경쇄는 VHIV-B3 유전자위에 가까운 것으로 밝혀지고(약 83% 동일성), 중쇄는 VH1 하위 패밀리의 1 내지 08 & 1 내지 18 유전자위에 가깝다(약 62% 동일성). (MOE에 의해 정의된 바와 같은) CDR 영역 및 (Foote & Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224, 487-499에서 정의된) 베르니어 영역은 진한 글씨로 나타낸다. 밀줄친 부분의 인간화 돌연변이는 위에서 정의된 바와 같은 CDR 및 베르니어 구역 잔기를 제외한 2개의 정렬된 서열의 쌍별 비교를 수행함으로써 수득되었다. 인간화의 다른 변이체에서는, CDR만이 비교에서 제외되었다.

[0357] 4. 원치않는 서열 모티프의 돌연변이

다음의 서열 모티브들이 고려되었다: Asp-Pro(산 불안정 결합), Asn-X-Ser/Thr(당화, X는 Pro이 아닌 임의의 아미노산), Asp-Gly/Ser/Thr(유연성 영역 내 숙신이미드/이소-asp 형성), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys(노출된 탈아미드화 자리), 및 Met(노출된 영역에서 산화). 다른 범주 중에서, 뮤라인 F151의 VL 및 VH 도메인이 다른 뮤라인 항체로부터 선택되었는데, 이는 뮤라인 F151이 원치않는 서열 모티프를 노출하지는 않았지만, 원치않는 서열 모티브들이 일부 인간화 변이체들에 도입되었기 때문이다.

LC3a, LC3b, HC3a 및 HC3b 각각은 잠재적인 문제성 숙신이미드 자리를 가지며, 이 자리들을 식별하였다. 이러한 자리를 제안된 서열에서 변형되지 않았는데, 이는 연관된 잔기들이 잠재적으로 H-결합 네트워크에 연관되기 때문이다(상동 모델의 육안 검사). 이러한 위치들은 또한 다수의 다른 항체 구조에서도 발견된다. 추가적으로, HC3a 및 HC3b에서, 이식에 의한 엄격한 인간화는 Ser115의 Met로의 치환을 포함할 수 있다. 이러한 메티오닌은 노출된다. 이 위치에서의 류신으로의 치환이 인간화 돌연변이로서 제시되는데, 이는 류신이 많은 유사한 인간 생식계열 서열에서 공통적인 잔기이기 때문이다.

서열 중 어떠한 것도 임의의 공지된 인간 B 또는 T 세포 에피토프를 함유하지 않는다는 것을 보증하기 위해, 언어진 인간화 서열을 국제 에피토프 데이터베이스(IEDB) 데이터베이스(immuneepitope.com)의 범세계 웹에 밝혀짐; version June 2009; Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B; The immune epitope database 2.0. Nucleic Acids Res. 2010 Jan;38(Database issue):D854-62. Epub 2009 Nov 11)에 대한 서열 유사성(BLAST 검색에서 수득된 결과에 대한 컷오프로써 70%의 서열동일성이 사

용되고 인간 종으로부터의 결과만 고려하였음)을 블라스트분석하였다.

5. 뮤라인 F151 가변 도메인의 원래 서열

[0362] CDR은 진한글씨로 강조되고, (Foote & Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224, 487-499에서 정의된 바와 같은) 베르니어 영역에는 밑줄을 쳤다.

[0363] 경쇄(서열번호 26)

[0364] DIVMSQSPSS LAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLA

[0365] WYQQKPGQSP KPLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFLT

[0366] ISSVKAEDLA IYYCQQYYSYWPWT~~F~~GGGT~~K~~LEIK

[0367] 생식계열 지수(Germinality index) = Z46615_1_V_X67858_1_J[V IV-B3]과 83% 동일성

[0368] 중쇄(서열번호 19):

[0369] EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCKAS~~GYSFTDYN~~YIWVKQS

[0370] HGKSLE~~WIGY~~ FDPYNGNTGYNQKFRGKATLTV~~D~~KSSSTAF

[0371] MHLSSLTSDDS~~AVYYCAN~~YYRYDDHAMDY~~W~~QQGTSVTVSS

[0372] 생식계열 지수 = Z12316_1_VX97051_4_D_X97051_5_J[VH1 1-18]과 62% 동일성

6. 조작된 서열

[0374] a) 배경

[0375] 경쇄에 대한 5개의 버전(LC1, LC2a, LC2b, LC3a, 및 LC3b) 및 중쇄에 대한 5개의 버전(HC1, HC2a, HC2b, HC3a, 및 HC3b)이 제안되었다.

[0376] LC1은 4D 인간화 프로토콜을 사용하여 식별한 5개의 인간화 돌연변이를 함유한다. LC2a를 추가적인 5개의 안정화 돌연변이로서 도입하였다. LC2b에는 응집 방지를 돋기 위해 하나의 라이신 돌연변이가 추가되었다. LC3a은 가장 가까운 인간 생식계열 서열에 대한 이식으로부터 유래된 15개의 돌연변이를 함유하고, 뮤라인 CDR 및 베르니어 구역 잔기를 보유한다. LC3b는 하나의 추가적인 인간화 돌연변이와 CDR 이식으로부터 유래한 16개의 돌연변이를 함유하였다.

[0377] HC1은 인하우스 프로토콜에 의해 식별된 6개의 인간화 돌연변이를 가진다. HC1과 비교하여, HC2a는 5개의 추가적인 안정화 돌연변이가 도입된 반면, HC2b는 6개의 추가적인 안정화 돌연변이를 함유한다. HC2c는, HC2a의 안정화 돌연변이에 추가하여, 응집 방지를 돋기 위한 1개의 Lys 돌연변이를 함유한다. HC3a은 가장 가까운 인간 생식계열 서열에 대한 이식으로부터 유래된 19개의 돌연변이를 함유하고, 뮤라인 CDR 및 베르니어 구역 잔기를 보유한다. HC3b은 CDR이식으로부터 유래한 25개의 돌연변이를 함유한다.

[0378] 총 6개의 조합이 제안되었다(표 16에 요약되어 있다):

[0379] ●LC1 x HC1(인간화를 다루는 돌연변이만)

[0380] ●LC2a x HC2a(인간화 및 안정화를 다루는 돌연변이)

[0381] ●LC2a x HC2b(인간화 및 안정화를 다루는 돌연변이)

[0382] ●LC2b x HC2c(인간화, 안정화 및 "항응집"을 다루는 돌연변이)

[0383] ●LC3a x HC3a(이식에 의한 인간화를 주로 다루는 돌연변이 + 베르니어)

[0384] ●LC3b x HC3b(이식에 의한 인간화를 다루는 돌연변이)

[0385]

제안된 6 LC x HC 조합의 요약

	(LC1) 인간화	(LC2a) 인간화 + 안정화	(LC2b) 인간화+안정화 + 항응집	(LC3a) 베르니어 영역으로 이식	(LC3b) 이식
(HC1) 인간화	X				
(HC2a) 인간화 + 안정화		X			
(HC2b) 인간화 + 안정화		X			
(HC2c) 인간화 + 안정화 + "항응집"			X		
(HC3a) 이식				X	
(HC3b) 이식					X

표 17

[0386]

항 DAKD/KD F151 항체의 5LC 변이체의 돌연변이

경쇄 순차적 번호부 여	경쇄 카바트 번호부 여	(LC1) 인간화 돌연변이	(LC2a) 인간화 + 안정화 돌연 변이	(LC2b) 인간화 + 안 정화 돌연변이 + 항응집 돌연변이	(LC3a) 이식 CDR + 베르 니어 잔기	(LC3b) CDR만 이식
Ser5	Ser5		Thr	Thr	Thr	Thr
Ser9	Ser9				Asp	Asp
Ala12	Ala12		Ser	Ser		
Val13	Val13	Ala	Ala	Ala		
Val15	Val15				Leu	Leu
Glu17	Glu17	Asp	Asp	Asp		
Lys18	Lys18	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
Val19	Val19				Ala	Ala
Met21	Met21		Ile	Ile	Ile	Ile
Ser22	Ser22				Asn	Asn
Gln48	Gln42	Lys	Lys	Lys		
Ser49	Ser43				Pro	Pro
Pro52	Pro46					Leu
Thr69	Thr63		Ser	Ser	Ser	Ser
Val84	Val78				Leu	Leu
Lys85	Lys79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Leu89	Leu83			Lys	Val	Val
Ile91	Ile85		Thr	Thr	Val	Val
Gly106	Gly100				Gln	Gln
Leu110	Leu104				Val	Val
돌연변이		5	10	11	15	16

표 18

[0387]

항 DAKD/KD F151 항체의 6HC 변이체의 돌연변이

증쇄 순차적 번호부여	증쇄 카바트 번호부 여	(HC1) 인 간화 돌연 변이	(HC2a) 인 간화 +안정 화 돌연변 이	(HC2b) 인간 화 안정화 돌연변이	(HC2c) 인간화 +안정화 돌연변 이 + 항응집 돌연변 이	(HC3a) 이식 CDR + 베르니 어 잔기	(HC3b) CDR만 이식
Glu1	Glu1		Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Ile2	Ile2						Val

Gln5	Gln5	Val	Val	Val	Val	Val	Val
Pro9	Pro9		Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Leu11	Leu11	Val	Val	Val	Val	Val	Val
Val12	Val12	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
Thr16	Thr16	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Lys38	Lys38					Arg	Arg
Ser40	Ser40					Ala	Ala
His41	His41	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Lys43	Lys43					Gln	Gln
Ser44	Ser44		Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
Ile48	Ile48						Met
Gln62	Gln61			Glu			
Lys67	Lys66					Arg	Arg
Ala68	Ala67						Val
Leu70	Leu69						Met
Val72	Val71						Thr
Lys74	Lys73						Thr
Ser76	Ser75					Thr	Thr
Phe80	Phe79		Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
His82	His81					Glu	Glu
Ser84	Ser82A					Arg	Arg
Leu86	Leu82C				Lys		
Thr87	Thr83					Arg	Arg
Asp89	Asp85	Glu	Glu	Glu	Glu		
Asp90	Asp86		Glu	Glu	Glu		
Ser91	Ser87					Thr	Thr
Ser115	Ser108					Leu	Leu
돌연변이:		6	11	12	12	19	25

[0388] a) 조작된 경쇄 서열:

[0389] 잠재적인 문제성으로 공지된 T 세포 또는 B 세포 에피토프는 제안된 모든 변이체에서 발견되지 않았다.

[0390] LC1(서열번호 27), 인간화 돌연변이에는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이다:

[0391] DIVMSQSPSSLAASVGDRVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLA

[0392] WYQQKPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLT ISSVQAEDLAIYCQQQYSYPWTFGGGTKLEIK

[0393] LC2a(서열번호 28), 인간화 돌연변이에는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이고, 안정화 돌연변이는 이탈릭체이다(5번 위치의 T, 12번 위치의 S, 21번 위치의 I, 69번 위치의 S, 91번 위치의 T가 하기에 나타나았다):

[0394] DIVMTQSPSSLSASVGDRVT/SCKSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLT

[0395] ISSVQAEDLA TYYCQQQYSYPWTFGGGTKLEIK

[0396] LC2b(서열번호 29) 인간화 돌연변이에는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이고, 안정화 돌연변이는 이탈릭체이고(5번 위치의 T, 12번 위치의 S, 21번 위치의 I, 69번 위치의 S, 91번 위치의 T가 하기에 나타남) 항응집 돌연변이는 89번 위치의 K이다:

[0397] DIVMTQSPSSLSASVGDRVT/SCKSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLT

[0398] ISSVQAEDKA TYYCQQQYSYPWTFGGGTKLEIK

[0399] LC3a(서열번호 30), 이식된 돌연변이에는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨로 나타내었다:

[0400] DIVMTQSPDSLAVLGERATNCKSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFLT
ISSLQAEDVYYCQQQYSYPWTFGQGTKVEIK

[0401] LC3b(서열번호 31), 이식된 돌연변이는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨로 나타내었다:

- [0402] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLA
ISSLQAEDVAVYYCQQYYSYWPWTFGQGTYEIK
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGPDRFSGS₂SGTDFLT
- [0404] 52번 위치의 L이 인간으로 돌연변이된 베르니어 잔기라는 것을 주지한다.
- [0405] c) 조작된 중쇄 서열
- [0406] HC1(서열번호 20), 인간화 돌연변이는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이다:
- [0407] EIQLYQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKQS
MHLSSLTSEDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTSVTVSS
PGKSLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAF
- [0408] HC2a(서열번호 21), 인간화 돌연변이는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이고, 안정화 돌연변이는 이탈릭체이다(1번 위치의 Q, 9번 위치의 A, 44번 위치의 G, 80번 위치의 Y 및 90번 위치의 E가 하기에 나타나 있다):
- [0409] QIQLYQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKQS
MHLSSLTSEDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTSVTVSS
PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
- [0410] HC2b(서열번호 22), 인간화 돌연변이는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이고, 안정화 돌연변이는 이탈릭체이다(1번 위치의 Q, 9번 위치의 A, 44번 위치의 G, 62번 위치의 E, 80번 위치의 Y 및 90번 위치의 E가 하기에 나타나 있다):
- [0411] QIQLYQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKQS
MHLSSLTSEDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTSVTVSS
PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
- [0412] IEDB 데이터베이스에서 서열 HC2b에 대한 어떠한 인간 애피토프도 식별되지 않았다.
- [0413] HC2c(서열번호 23), 인간화 돌연변이는 밑줄을 쳤고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨이고, 안정화 돌연변이는 이탈릭체이고(1번 위치의 Q, 9번 위치의 A, 44번 위치의 G, 80번 위치의 Y 및 90번 위치의 E가 하기에 나타남) 86번 위치의 항응집 돌연변이 K:
- [0414] QIQLYQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKQS
MHLSSKTSEDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTSVTVSS
PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
- [0415] HC3a(서열번호 24), 이식된 돌연변이는 밑줄로 나타내었고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨로 나타내었다:
- [0416] QIQLYQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKRQA
MELRSLRSDDTAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTLVTVSS
PGQGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGRATLTVDKSTSTAY
- [0417] LC3b(서열번호 25), 이식된 돌연변이는 밑줄로 나타내었고, CDR 및 베르니어 구역은 진한 글씨로 나타내었다:
- [0418] QVQLYQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWKRQA
MELRSLRSDDTAVYYCANYYRYDDHAMDYWWGQGTLVTVSS
PGQGLEWMGYFDPYNGNTGYNQKFRGRVTMTDTSTSTAY
- [0419] 하기 베르니어 잔기는 인간으로 돌연변이화된 것임을 주지한다: 2번 위치의 V, 48번 위치의 M, 68번 위치의 V, 70번 위치의 M 및 74번 위치의 T.
- [0420] IEDB 데이터베이스 내 서열 HC3b에 대한 어떠한 인간 애피토프도 식별되지 않았다.
- [0421] HC3b 생식계열 지수= Z12316_1_V_J00235_1_D_U42590_1_J [1-18/DP-14]와 83%.

표 19

경쇄에 제안된 안정화 돌연변이

잔기	제안된 변화	계산된 Gth	변화 수용
Ser-5	Thr	2.32286	네
Ala-12	Ser	0.75228	네
Met-21	Ile	0.768959	네
Pro-52	Leu	1.70059	아니오 -베르니어 영역
Thr-69	Ser	1.10843	네
Lys-86	Glu	2.00115	아니오 -인간화 동안 Gln으로 변화

Ile-91	Thr	1.27255	네
--------	-----	---------	---

표 20

증쇄에 제안된 안정화 돌연변이

잔기	제안된 변화	계산된 Gth	변화 수용
Glu-1	Gln	0.562423	네
Ile-2	Val	2.15882	아니오 - 베르니어 영역
Pro-9	Ala	0.505324	네
Thr-16	Ala	1.50552	인간화에서 이미 Ala으로 변화
Val-20	Leu	2.21586	아니오 - 생식계열 서열 내에 없음
Ser-40	Arg	1.03643	아니오 - 생식계열 서열 내에 없음
His-41	Pro	1.67738	인간화에서 이미 Pro으로 변화
Ser-44	Gly	1.5068	네
Gln-62	Glu	0.74934	아니오 - 생식계열 서열 내에 없음
Arg-65	Lys	2.32314	아니오 - 생식계열 서열 내에 없음
Phe-80	Tyr	1.30935	네
His-82	Gln	2.24674	아니오 - 생식계열 서열 내에 없음
Asp-89	Glu	1.65409	인간화에서 이미 Glu으로 변화
Asn-98	Arg	3.65643	아니오 - 베르니어 영역

표 21

평가된 안정화 돌연변이의 조합

조합*	제시된 추가적인 변화	변화 수용
L1 (46->P & 48->Q)	K48->Q	아니오 - K48 인간화 돌연변이
L2 (51->K)	없음 - 이미 K51	없음
L3 (80->T)	없음 - 이미 T80	없음
L4 (82->S)	없음 - 이미 S82	없음
L5 (90->A, 91->T)	없음 - 이미 위에서 제시된 A90, T91(표 1)	없음
H1 (15->G)	없음 - 이미 G15	없음
H2 (62->E, 63->K, 64->F)	Q62->E, 이미 K63 및 F64	네 - HC2b에서 고려됨
H3 (87->T, 88->S, 89->D)	D89->E, 이미 T87 및 S88	네 - K63 및 K43로 잠재적인 염다리
S1 (L1 & L5)	K48->Q	아니오 - K48 인간화 돌연변이
S2 (H1 & H3)	D89->E	아니오(H3 참조)

*주의: 잔기를 언급하기 위해 순차적 번호부여가 사용됨

표 22

잠재적인 안정화 돌연변이

경쇄 잔기*	제시된 추가적인 변화	변화 수용
15->L	V15->L	아니오 - V15 생식계열 내 V15
96->Q	없음 - 이미 Q96	없음
38->Y	없음 - 이미 Y38	없음

112->I	없음 - 이미 I112	없음
69->S	G69->S	아니오 - G69는 베르니어 영역 내에 존재한다
21->I	M21->I	이미 변화됨(표 19 참조)
*주의: 잔기를 언급하기 위해 순차적 번호부여가 사용됨		

[0426] 실시예 6: 인간화 변이체의 특성분석

표 16에 제시된 인실리코(*in silico*) 모델링에 기반하여, 인간화 F151의 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) DNA의 가변 영역은 HEK293 발현 및 GeneArt에 의해 합성된 유전자에 대해 최적화된 코돈이었다(Life Technologies의 자회사). 합성된 DNA 단편을 경쇄 불변 영역(CL)을 암호화하는 벡터 pFF0362(A. 인간 카파 LC 벡터)의 ApaLI/BsiWI 자리 및 중쇄의 불변 영역(CH1, CH2, 및 CH3) 암호화 벡터 pFF0363(B. 인간 IgG1 HC 벡터)의 ApaLI/ApaI 자리로, 각각, 클로닝하였다. LC의 전체 서열을 함유하는 플라스미드 pFF0460 및 인간화 F151 변이체의 전장 HC를 함유하는 pFF0466을 FreeStyle™ 293 발현 시스템(Invitrogen/Life Technologies, catalog no. K9000-01) 내에서 공동 형질감염시키고 일시적으로 발현시켰다.

표 16에 나타낸 6개의 인간화 변이체를 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 다양한 파라미터(예를 들면, 결합 동역학(위에서 논의됨) 및 화학적 및 물리적 성질들, 예컨대 열안정성)들에 대하여 특성분석하였다.

특성분석은 이단으로 수행되었다. 1단에는 표 24 및 도 2에 나타낸 시차주사열량법(DSC)이 포함된다. 간략하게, DCS 실험에서, 항체를 인산 염 완충 용액에 투석하였다. 항체 농도를 UV 흡광에 의해 측정하였다. 항체를 PBS를 사용하여 1 mg/mL으로 희석하였다. 참조 구획 내 PBS를 가지는 0.3268 mL 모세관 세포를 사용한 Calorimetry Sciences Corporation N-DSC II 기기를 사용하여 스캔을 수행하였다. 스캔율은 2°C/분이었고, 시료는 20°C 내지 100°C에서 스캐닝되었다.

HC3b/LC3b을 제외한 모든 변이체는 모항체에 비견할 만한 결합 친화도를 나타내었다. SEC 데이터, 안정성 및 응집의 결여와 같은 기타 생리화학적 성질에 기반하여 다른 변이체들 중에서 변이체 HC3a/LC3a을 선택하였다(표 23 내지 25 참조).

표 23

인간화된 F151 변이체의 동역학 비교

	HC1/LC1			HC2a/LC2a		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DAKD-b	4.16E+05	6.00E-06	1.45E-11	6.66E+05	1.22E-05	1.83E-11
KD-b	4.24E+05	1.74E-07	3.94E-13	7.03E+05	6.12E-06	8.71E-12
DAKLP-b	5.00E+05	7.96E-06	1.60E-11	4.10E+05	5.67E-06	1.38E-11
KLP-b	4.81E+05	2.67E-06	5.54E-12	6.15E+05	2.68E-05	4.34E-11
	HC2b/LC2a			HC2c/LC2b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DAKD-b	4.17E+05	1.05E-05	2.57E-11	4.81E+05	4.34E-05	9.01E-11
KD-b	3.75E+05	1.66E-06	4.72E-12	5.64E+05	9.08E-06	1.74E-11
DAKLP-b	4.46E+05	1.30E-05	2.97E-11	9.03E+05	1.10E-05	1.21E-11
KLP-b	4.01E+05	2.20E-06	5.76E-12	5.16E+05	1.02E-05	1.98E-11
	HC3a/LC3a			HC3b/LC3b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DAKD-b	5.06E+05	1.28E-05	2.53E-11	3.85E+05	5.15E-05	1.35E-10
KD-b	4.27E+05	2.95E-06	6.78E-12	2.51E+05	3.02E-06	1.44E-11
DAKLP-b	4.65E+05	1.42E-05	3.05E-11	7.04E+04	2.76E-03	4.05E-08
KLP-b	5.02E+05	5.43E-07	1.06E-12	5.39E+05	2.72E-04	5.26E-10

비교를 위해: mF151의 $K_a(1/Ms)$ 는 DAKD-b에 대해 $7.84E+05$, KD-b에 대해 $8.30E+05$ for, DAKLP-b에 대해 $1.81E+06$ 및 KLP-b에 대해 $1.12E+06$ 이었다.

표 24

인간화 변이체의 1단 비교

변이체	시험	단백질 농도 (mg/ml)	순도		안정성	기능적 효능 검정		리간드 친화도	
			방법	UV 분광법(A28 0)	1D-겔(환원 & 비환원)	SEC	DSC(T_m °C) (모 F151의 $T_m = 73°C$)	FDSS 검정	사전항온 배양 없는 FDSS 검정
HC1/ LC1		1.69	Ag/Deg 없음	—5% Ag	81.6(M) 70.0(m)		DAKD에서 nM 효능, KD에서 서 브 nM 효능, 5개 의 변이체 중에서 비 교가능	DAKD 및 K D에서 활성 5개의 변 이체 중에 서 비교가 능	Kon 10E5, koff 10E-6 이하 5개의 변이체 중에서 비교 가능
HC2a/ LC2a		2.01	Ag/Deg 없음	Ag 없음	75.0(M) 82.5(m)				
HC2b/ LC2a		1.83	Ag/Deg 없음	Ag 없음	74.6(M) 83.0(m)				
HC2c/ LC2b		0.68	Ag/Deg 없음	Ag 없음	71.0(M) 64.0(m) 82.5(m) 불안정				
HC3a/ LC3a		1.71	Ag/Deg 없음	Ag 없음	82.3(M) 71.8(m) 가장 안정				
HC3b/ LC3b		1.47	Ag/Deg 없음	Ag 없음	79.4(M) 71.4(m)		KLP & DAKLP에 대 한 효능 소 실		KLP & DAKLP 에 대한 감소 된 친화도

약어: Ag=온집, Deg=분해

표 25

인간화 변이체의 2단 비교

	열안정성			안정성	무결성 확인(LC, HC)	N-말단 서열 확인
변이체	1D-겔	SEC	Biacore	SEC	LC-MS	N-말단 서열분석
HC1/ LC1	Ag/Deg 없음	Ag/Deg 없음	4C보다 약간 빠른 해리율 45C	Ag/Deg 없음	LC(+1Da off) HC(+1Da off) G0 우세	LC & HC 무결체의 N 말단
HC2a/ LC2a	Ag/Deg 없음	Ag/Deg 없음	4C보다 약간 빠른 해리율 45C	Ag/Deg 없음	LC(스팟 온) HC(스팟 온) G0 우세	LC & HC 무결체의 N 말단
HC2b/ LC2a	Ag/Deg 없음	Ag/Deg 없음	4C보다 약간 빠른 해리율 45C	Ag/Deg 없음	LC(+1Da off) HC(+1Da off) G0 우세	LC & HC 무결체의 N 말단
HC2c/ LC2b	X	X	X	X	X	X
HC3a/ LC3a	Ag/Deg 없음	Ag/Deg 없음	4C보다 약간 빠른 해리율 45C	Ag/Deg 없음	LC(-2Da off) HC(-2Da off) G0 우세	LC & HC 무결체의 N 말단
HC3b/ LC3b	X	X	X	X	X	X

열안정성 = 4°C(대조군) 및 45°C에서 3일간 항온배양; 1D-겔은 비활원 조건이었다; 안정성 = 동결/해동의 사이클; LC-MS = 활원 및 활원/탈당화
약어: Ag=응집, Deg=분해, X = 데이터 존재하지 않음

표 26

모 F151 및 인간화 변이체 F151(HC3a/LC3a)의 비교

모 F151		
	가변 중쇄	가변 경쇄
유전자	GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCA GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTCTGGTTACTCATTCACTACAACATC TACTGGGTGAAACAGAGCCATGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATTT GATCCTTACAATGGTAAATCTGGCTACAACCAGAAGTCAGGGCAAGGCC ACATTGACTGTTGACAAGTCCCTCAGCACAGCCTCATGCATCTCAGCAGC CTGACATCTGATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAACACTATAGGTAT GACGACCAGTGTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC TCA (서열번호 127)	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTC GTTGGAGAGAAGGGTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGC CTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTAC CAGCAGAACCCAGGGCAGTCTCTAAACCGCTGATTACTGG GCATCCACTAGGAAATCTGGGTCCTGATCGCTTCACAGGC AGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCACAGCAGTGTG AAGGCTGAAGACCTGGCAATTATTACTGTGAGCAATATTAT AGCTATCCGTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATC AAA (서열번호 128)
단백질	EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCKASGYSFDTDYNIYWVKQSHGKSLEWIGYF DPYNGNTGYNQKFRGRATLTVDKSSSTAFMHLSSLSDSAVYYCANYRY DDHAMDYWGQGTSTVSS (서열번호 19)	DIVMSQSPSSLAVSVEKVTMSCKSSQSLYSSNQKNYLAWY QQKPGQSPKPLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSV KAEDLAIYYCQQYYSYWPWTFGGGTKLEIK (서열번호 26)
인간화 F151(HC3a/LC3a)		
유전자	CAGATTCACTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAACCTGGGCCAGC GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGCCTACAGCTTACCGACTACAACATC TACTGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATCGCTACTTC GACCCCTACAACGGCAACACCGGCTACAACCGAGAAGTCCGGGAGAGCC ACCCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCTACATGGAACCTCGGGAGC CTGAGAACGAGCACACCGCCGTACTACTGCGCCAACACTACAGATAC GACGACCACGCCATGGACTACTGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCC TCT (서열번호 129)	GACATCGTATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGCT CTGGCGAGCGGGCACCATCACTGCAAGAGCAGCCAGAGC CTGCTGTACTCTAGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTAT CAGCAGAACCCGGCCAGCCCCCAAGCCCCCTGATCTACTGG GCCAGCACCCCGAGAGCGGCGTGGCCGATAGATTTCCGGC AGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTG CAGGCGAGGACGTGGCCGTACTACTGCCAGCAGTACTAC AGCTACCCCTGGACCTTCCGGCCAGGGCACCAAGGTGAAATC AAG (서열번호 130)
단백질	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFDTDYNIYWVRQAPGQGLEWIGYF DPYNGNTGYNQKFRGRATLTVDKSTAYMELRSLRSDDTAVYYCANYRY DDHAMDYWGQGTSTVSS (서열번호 24)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLYSSNQKNYLAWY QQKPGQPPKPLIYWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSV QAEDVAVYYCQQYYSYWPWTFGQQGTKEIK (서열번호 30)
단일 밀줄= CDR 영역; 이중 밀줄= CDR을 식별하기 위한 특징 아미노산		

[0435] 모 F151의 경쇄 및 중쇄의 인간화 F151 변이체(HC3a/LC3a)에 대한 정렬에 대해서는, 도 3을 참조한다.

[0436] 실시예 7: BKR1 리간드 칼리딘 및 des-arg¹⁰-칼리딘에 대한 인간화 항체 F151의 결정 구조

[0437] 칼리딘 또는 des-arg¹⁰-칼리딘에 결합된 인간화 F151(HC3a/LC3a) Fab의 결정 구조를 결정하였고, 문자 상호작용을 분석하였다.

[0438] 칼리딘 분말은 Phoenix Pharmaceuticals(Cat. No. 009-37)로부터 구매하였다. Fab 단백질 생성을 위해, 인간화 F151 HC3a로부터의 중쇄(HC) VH 영역 DNA를 6XHis 태그가 달린 CH1 벡터 pFF0366내로 클로닝하였다. 여기서 사용된 경쇄(LC) 플라스미드는 F151 인간화에서 사용된 원래의 F151 LC3a와 동일하다(실시예 5 참조). 2종의 플라스미드를 Fab 발현을 위해 Free style HEK293 세포에 공동 형질감염시켰다. Fab 단백질을 코발트-수지를 사용하여 정제하였고, 약 9 mg/mL로 농축되기 전에 완충액을 50 mM MES pH6.0, 50 mM NaCl로 교체하였다. 정제된 F151 Fab 단백질을 칼리딘과 1:2의 문자비로 혼합하였고, 결정화 선별을 준비하였다. 결정화 선별은 다양한 조건으로 수행하였다. 가장 우수한 결정은 Hampton Research 선별 키트 PEG/ION HT의 B10, B12 및 G10 조건 하에

관찰되었다. 결정은 웰 완충액 내 20%의 글리세롤로 동결보호되고, 회절 데이터 수집을 위해 동결되었다. 2개의 복합물에 대한 X-선 회절 데이터는 Canadian Light Source의 범라인 CMCF-08ID에서 수집하였다. F151-KD 복합체에 대한 Rmerge는 8.9%이고, I/s(I)는 20.2인 반면 F151-DAKD에 대한 Rmerge 및 I/s(I)는 각각 7.7% 및 18.5이다. F151-KD 구조는 V_L-V_H 및 C_L-C_H1 도메인을 각각 독립적인 단위로서 처리한 PDB 엔트리 3QOS로부터의 Fab 결합률 사용한 Phase 내에서 분자 교체에 의해 해결되었다. 구조는 2.07 Å 해상도로 공간 그룹 P2₁2₁에서 0.205의 R 인자 및 0.228의 Rfree에 대해 AutoBuster에서 정제되었다. F151-DAKD 구조는 F151-KD 결합률을 사용하여 해결하였다. 구조는 공간 그룹 P212121에서 0.232 R인자 및 0.238의 Rfree에 대해 1.86 Å 해상도로 AutoBuster에서 정제되었다.

[0439] 도 4 및 5에 나타낸 전자 밀도 맵은 칼리딘(KD) 및 Des-Arg¹⁰-칼리딘(DAKD)의 F151 Fab에 대한 결합을 도시한 것이며, 각 아미노산의 위치를 명료하게 결정한다. 칼리딘에 대하여, 가장 끝의 C-말단 잔기 Arg¹⁰에 대한 전자 밀도는 존재하지 않는다. 이것은 C-말단 잔기 아르기닌이 없는 DAKD(하기 표 27에 나타냄)가 KD로서 F151에 동일하게 잘 결합한다는 관찰과 일치한다. KD 및 DAKD에 대한 중화 FDSS 세포 검정에서 F151에 대한 IC50 값은, 각각, 0.12 nM 및 0.09 nM이다. 각각의 경우에서, 전자 밀도는 펩티드의 C-말단으로 갈수록 약해진다. KD 내 Phe⁹가 DAKD 내 Phe9보다 약간 더 나은 전자 밀도를 가지기 때문에, KD의 C-말단에 추가적인 아르기닌의 존재는 F151에 결합할 때 비록 아르기닌 자체는 X-선에 의해 관찰될 만큼 안정적이지 않더라도 이러한 펩티드의 C 말단을 안정화시킬 수 있다. 2개의 구조가 본질적으로 동일하기 때문에(KD 및 DAKD 사이의 rms는 C원자에 대하여 0.139이고, 모든 다른 원자들에 대하여는 0.328임)하기의 모든 논의는 F151-KD 구조를 기반으로 한다.

표 27

선택된 키닌 펩티드의 목록

펩티드 이름	서열번호	서열									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KD(칼리딘)	1	Lys	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg
DAKD(des-Arg ¹⁰ -칼리딘)	2	Lys	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	
KLP(설충류 KD 오르소로그)	3	Arg	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg
BK(브라디키닌)	5	Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg	

[0441] 도 6에 나타낸 바와 같이, KD는 경쇄 및 중쇄의 Fv 서브유닛 사이의 계면에 묻힌 KD의 N-말단으로 결합한다. 중쇄 및 경쇄 사이의 계면은 적층 및 소수성 상호작용을 통해 서로 안정화시키는 Tyr-L42, Tyr-L93, Tyr-L100, Trp-L102, Phe-L104 및 Tyr-H35, Trp-H47, Tyr-H50, Tyr-H99, Trp-H110을 포함하는 방향족 아미노산으로 쌓여진다. CDR의 경쇄 및 중쇄 각각으로부터의 잔기가 결합에 기여한다. CDR상에 지도로 만들어진 바와 같이 경쇄 및 중쇄에 따른 KD와의 상호작용에 연관된 잔기들이 표 7 및 8에 나타나있다. 중쇄의 CDR H3은 가장 긴 루프이고, KD와의 상호작용에서 가장 빈번하게 사용되며 KD에 대한 측 덮개를 형성한다. 루프는 대개 중쇄의 다른 2개의 CDR인 중쇄의 H1 및 H2와의 상호작용, 즉, Asp-H101 및 Arg-H52(H1 및 H3 안정화)사이의 염다리, Tyr-H102 및 Tyr-H54 사이의 아렌-H 상호작용(H2 및 H3 안정화), Asp-H108 및 Tyr-H35 사이의 H-결합, 및 His-H105 및 Tyr-L55 사이의 H-결합(H3 및 L2 안정화)를 통하여 안정화되었다.

[0442] 생성된 항체들 사이의 KD 상호작용 잔기를 비교하면, 항체들 사이에 유사성이 있다는 것을 알 수 있고, KD 상호작용에 대한 특정 아미노산의 사용에서의 일부는 다른 것들보다 더욱 관련되어 있다. 예를 들어, 경쇄 F151에서, B21 및 I54가 더욱 유사한 반면, C63 및 I22이 KD에 결합하기 위해 그들의 CDR에서의 더욱 유사한 아미노산을 사용한다. 중쇄에서, F151 및 C63은 서로로부터 및 B21, I22 및 I54로부터 상당히 독특하였다. 뒤의 3 가지는 유사성에서 하나의 군을 형성하는 것으로 나타났다. C63 특히 그의 중쇄가 흥미로운데, H2 및 H3에서의 루프 길이가 기타 모든 것들로부터 더욱 상이하기 때문이다. Fab를 전체로서 고려할 때, B21 및 I54가 가장 밀접하게 관련되어 있다.

[0443] 결정 구조에서, 우리는 KD는 조직적인 수소 결합 및 Fab와의 소수성 상호작용과 연관된다는 것을 밝혔다. KD의 N-말단은 Fab내에 매장되고, 더욱 강한 상호작용을 숨기는 반면, C-말단은 필수적으로 용매에 노출된다. 처음 4 개의 잔기(Lys-Arg-Pro-Pro)를 제외하고, KD의 다른 잔기들은 점증적으로 별크 용매 내로 확장된다. 라이신 1

측쇄의 아미디늄기는 Glu-L61(L: 경쇄)에 의해 염 다리를 통해 고정되는 반면, 아미노 말단 아미노기 Lys 1은 Asp-H108(H: 중쇄)과 염다리를 형성한다. Lys1 측쇄의 아미디늄기는 또한 양이온 상호작용에 관련된 Tyr-L55의 방향족 고리와 어울린다. Lys1과 연관된 이러한 강한 상호작용은 KD의 아미노 말단을 Fab 내에 강하게 고정시킨다. 이는, 또한, F151에 대한 KD의 결합에서 Lys1의 중요성을 설명한다. 이것(즉, 브라디키닌)없이는, hF151 또는 F151에 대한 어떠한 검출 가능한 결합도 측정될 수 없다. Lys1과 유사하게, Arg2도 염다리를 통해 Fab와 상호작용한다. Arg2의 구아니늄기는 Asp-H104의 측쇄와 상호작용한다. Arg2의 측쇄는 또한 Arg-H101의 주쇄 카보닐 산소와 H-결합한다. 또한, Pro8의 주쇄 산소는 Arg-H101의 측쇄와 H-결합한다. Tyr-H102는 KD와의 소수성 상호작용에 관련된 Phe8 및 Pro9 내에 반만 삽입된다. 직접적인 상호작용에 더하여, KD 및 Fab 사이에서 다수의 물 매개 H-결합이 또한 보여진다. 다른 아미노산에 비하여 티로신 잔기가 상호작용에 가장 빈번하게 사용된다는 것을 주지하는 것이 흥미롭다; 도 7 및 8에서 별표로 표시된 16개 잔기 중 9개가 티로신이다. KD를 둘러싸는 F151의 모든 잔기들은 Asn-H33(Phe6 측쇄에 가깝지만 극성이 맞지않고 다른 중요한 상호작용이 결여됨)을 제외하고는 리간드 결합에 임의의 역할을 수행하는 것으로 보인다. Phe8과의 상호작용을 위한 Trp 또는 Tyr과 같은 방향족/소수성 잔기들로의 치환은 친화도 성숙이 고려된다면 빠른 선택이 되는 것으로 보인다. 이러한 2개의 방향족 아미노산은 사실 다른 항체에서도 보여진다(C63 내 Trp, 및 B21, I22, I54 내 Tyr). 하기 표 28은 도 7 및 8에 표시된 16 KD와 상호작용하는 아미노산 잔기의 상세한 분석을 제공하고 CDR 영역내에 만들어질 수 있는 항원 결합을 파괴하지 않는 기능적 치환을 기재하고 있다.

표 28

[0445] KD 결합 포켓 주위에서 발견되는 아미노산 잔기의 목록 및 KD 결합 및 잠재적인 기능적 치환에서 그들의 역할
(회색으로 칠해진 구획은 경쇄 잔기이고 음영 처리되지 않은 구획은 중쇄 잔기)

잔기	KD 결합 또는 CDR 안정화에서의 역할	기능적 치환
Tyr-L31	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro4와 옛지 온 소수성 상호작용 ●Tyr-L38 및 Tyr-L98과 함께 KD의 Pro4에서의 90도 회전을 둘러싸는 3개의 직교 평면을 형성 	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro5의 아미드 N과의 H-결합을 첨가하기 위한 His ●Trp, 및 Phe과 같은 다른 방향족 a.a
Tyr-L38	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro4와의 소수성 적층 ●Tyr-L31 및 Tyr-L98 과 함께 KD의 Pro4에서의 90도 회전을 둘러싸는 3개의 직교 평면을 형성 	<ul style="list-style-type: none"> ●Arg2의 카보닐 O에 -결합을 첨가하기 위한 His
Tyr-L55	<ul style="list-style-type: none"> ●Lys1측쇄의 아미디늄 이온과의 상호작용 양이온 ●His-H105와의 H-결합; L2 및 H3 루프 사이의 Tyr-L55 --His-H105 쌍 첨가 안정화 	<ul style="list-style-type: none"> ●H105의 Gln, Asn, Glu 또는 Asp 돌연변이와 짹을 이루기 위한 Trp(H-결합을 유지); His_H105의 다른 변이체는 Tyr 및 Ser이다. ●Trp, His 및 Phe과 같은 다른 방향족 a.a
Glu-L61	●Lys1 측쇄와 주요 염다리 형성	<ul style="list-style-type: none"> ●Asp, Gln, ASN(Asp B21 및 I54에서 이미 나타나 있다, 도 7)
Tyr-L97	<ul style="list-style-type: none"> ●Trp-L56의 아미드 N과의 H-결합 ●Arg1 연장 측쇄를 위한 포켓 형성 	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe 또는 His와 같은 방향족 a.a(Trp용으로는 공간이 너무 좁음)
Tyr-L98	●Tyr-L31 및 Tyr-L38과 함께 KD의 Pro4에서의 90도 회전을 둘러싸는 3개의 직교 평면을 형성	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe, Trp, 또는 His와 같은 다른 방향족 a.a
Tyr-L100	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro3을 위한 포켓 표면을 형성 ●방향족 a.a의 일부. L/H 사슬 사이의 클러스터 계면, Tyr-L42, Tyr-L93, Trp_L102, Phe-L104 및 Tyr-H35, Trp-H47, Tyr-H50, Tyr-H99, Trp-H110을 더 포함 ●Tyr-H50과 부분적 적층 	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe과 같은 다른 방향족 a.a (Pro3과 더 나은 소수성 상호작용) ●다른 나타난 변이체는 Thr(B21 및 I54) 및 His(I22)이다.
Trp-L102	<ul style="list-style-type: none"> ●방향족 a.a의 일부. L/H 사슬 사이의 클러스터 계면 ●Trp-H47과의 적층 	<ul style="list-style-type: none"> ●Tyr(C63 및 B21), Phe 및 His과 같은 다른 방향족 a.a ●L과 같은 다른 소수성 잔기(I22)
Asn-H33	●Phe6 측쇄에 가깝지만 극성이 맞지않고, 다른 역할도 볼 수 없음; 친화도 돌연변이의 표적이 될 수 있음	<ul style="list-style-type: none"> ●Trp(C63에 나타남) 또는 Tyr (B21, I22, I54에 나타남)과 같은 방향족/소수성 a.a로의 교체
Asp-H52	●Arg-H101와 염다리, H1 및 H3 루프 안정화	<ul style="list-style-type: none"> ●Arg-H101의 쌍으로서 반대로 하전된 a.a로의 돌연변이, 예를 들면 Arg-H52/Asp-H101, 또는 KD의 Phe6과의 클러스터를 형성하기 위한 소수성 a.a의 쌍으로의 돌연변이(Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala)

Tyr-H54	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro8에 가깝지만, 특이적인 상호작용이 없음 ●Arg-H101에 가깝지만, 전하 상호작용이 없음 	<ul style="list-style-type: none"> ●Arg-H101를 안정화하기 위해 음으로 하전된 a.a로의 돌연변이, 예를 들면, D 또는 E(B21, I22 및 I54에 나타남) 또는 Pro8의 카보닐 O와의 H-결합도 제공하는 N 또는 Q(Glu에 대해 전하 역전될 수 있는 C63 Lys)
Tyr-H99	<ul style="list-style-type: none"> ●H 및 L 사슬 사이의 방향족 계면의 일부 ●Asn-H33과의 H-결합 ●단단한 공간 	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe 및 His과 같은, W를 제외한 작은 방향족 a.a로의 돌연변이
Arg-H101	<ul style="list-style-type: none"> ●Pro8의 아미드와의 H-결합 ●Asp-H52(염다리)에 의해 지지됨 	<ul style="list-style-type: none"> ●Asp-H52의 쌍으로서 반대로 하전된 a.a로의 돌연변이, 예를 들면 Arg-H52/Asp-H101, 또는 KD의 Phe6과의 클러스터를 형성하기 위한 소수성 a.a으로의 돌연변이
Tyr-H102	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe9 및 Pro8로의 반 삽입, KD와의 소수성 상호작용 	<ul style="list-style-type: none"> ●Phe 더 나을 수 있지만, Trp 또는 His도, 또한, 괜찮다
Asp-H104	<ul style="list-style-type: none"> ●Arg2와의 염다리에서 주요 잔기 	<ul style="list-style-type: none"> ●Arg2와의 염다리를 유지하기 위한 Glu ●Pro3로부터의 간극을 채우기 위한 더 큰 a.a, 예를 들면, B21, I22 및 I54에서 나타난 Tyr
Asp-H108	<ul style="list-style-type: none"> ●KD의 N-말단 -NH3+에서의 염다리를 위한 주요 잔기 ●Tyr-H33과 H-결합, H3 루프 안정화 ●보존 잔기! CDR이 아님 	<ul style="list-style-type: none"> ●Glu

[0446] 칼리딘(KD) 또는 desArg10-칼리딘(DAKD)의 구조적 에피토프의 분석은 에피토프가 "Pro4 킹크" 구조를 채택하고 있음을 밝혔다. 도 17에 도시된 바와 같이, "Pro 4 킹크" 구조의 전형적인 특징은 KD 또는 DAKD의 주체 폴리펩티드 골격 내 4번 프롤린에서의 2형 타이트 턴(tight turn)이다(본원에 참조로서 포함된 Richardson JS. "The anatomy and taxonomy of protein structure." Adv Protein Chem. 1981;34:167-339을 참조한다). "Pro 4 킹크" 구조는 소수성 측쇄를 공간적으로 적층된 방식으로 정렬하는 S자형 형상의 반복을 채택한 KD(1 내지 2 및 6 내지 9) 또는 DAKD의 잔존 아미노산의 전부 또는 실질적으로 전부에 의해 더 정의된다.

[0447] 실시예 8: 통증 모델에서 항 BKR1 리간드 항체의 생체 내 약리학

[0448] 본 발명의 실시예는 항 BKR1 수용체-리간드 항체의 급성 및 만성 통증의 상이한 전임상 모델((a) Saddi GM and Abbott FV., Pain (2000), 89:53-63; (b) Chen et al., Molecular Pain (2010), 2:6-13 and (c) Bennett GJ and Xie YK., Pain (1988), 33:87-107에 기술된 변형된 절차에 따름)에 대한 생체 내 효능을 예시한다.

[0449] 동물

[0450] 실험은 포르말린 연구를 위한 성인 수컷 OF1 마우스(20 내지 30 gr) 및 CFA 및 CCI 연구 둘 다를 위한 성인 수컷 C57B1/6J 마우스(25 내지 30 gr)를 사용하여 수행되었다. 마우스를 12h 명-암 사이를 하에 온도가 제어되는 방에서 길렸다. 음식 및 물은 무제한으로 공급되었다. 모든 실험에서, 마우스를 적어도 시험 2시간 전부터 실험실 방에 적응시켰다. 연구를 위한 무작위화는 수행하지 않았다. 행동 시험을 수행하는 연구자들은 치료에 대해 알고 있었다; 그러나 그들은 연구 가설을 알지 못했다. 모든 절차는 사노피 아벤티스 연구 및 개발(sanofi-aventis recherche & developpement)의 "실험 동물의 보호를 위한 실험 위원회(Comite d' Experimentation pour la Protection de l' Animal de Laboratoire)"동물 보호 및 사용 위원회의 승인을 받았고, 유럽 지침 86/609/EEC를 구현하는 프랑스 법령(법령 n° 87-848 - 19 October 1987 - 및 판결문-19 April 1988)에 따라 수행하였다.

[0451] A. 포르말린 유도된 급성 염증성 통증

[0452] 포르말린 시험은 침해수용 및 염증성 통증을 측정하기 위해 사용되었다. 즉, 포르말린의 발바닥 내 주사는 초기 급성 침해수용 행동 반응(0 내지 12분)을 유도하고, 척수 흥분성에 기인한 제2 염증성 매개 반응(15 내지 45 분)이 뒤따랐다.

[0453] 포름알데하이드(37%, Sigma)를 염수(v/v)에 희석하여 2.5% 포름알데하이드 농도를 얻었다(즉, ≈ 6.25% 포르말린 농도). 마우스를 부드럽게 구속하고, 20 μL의 이러한 용액을 한 개의 뒷발의 등쪽 부위에 피하로 주사하였다. 포르말린 주사 후 즉시, 그런 다음 45분 간 3분 간격으로 행동 반응을 다음과 같이 점수화하였다: (0): 보통의 체중을 지지하는 주사된 발; (1) 바닥에 가볍게 놓여진 주사된 발; (2) 주사된 발의 들어올림 증가; (3) 주사된

발을 훑거나 물어뜯음. 군의 크기는 11 내지 12마리의 수컷 OF1 마우스였다.

[0454] 점수는 시간에 대해 도표화되었고, 곡선하 면적(AUC)을 초기(0 내지 12분) 및 후기(15 내지 45분) 단계 모두에 대하여 평균 점수(\pm SEM)로부터 계산하였다. 통증 유사 행동의 역전은 AUC의 변화(%)로 표시되었다.

[0455] EE1 항체는 수컷 OF1 마우스의 포르말린 시험의 후기 단계에서 통증 유사 행동을 저해하였다. EE1 항체는, 도 9에 도시된 바와 같이, 포르말린의 발바닥 내 주사 48시간 전에 정맥내로 투여될 때 통증 유사 행동의 용량 의존적 역전을 후기 단계에서만 2.5 mg/kg의 최소 유효량(MED)으로 나타내었다. 즉, 표 29에 나타낸 바와 같이 2.5, 10 및 30 mg/kg으로 투여될 때 EE1은 후기 단계를 각각, 35 \pm 5%, 33 \pm 5% 및 45 \pm 7% 만큼 역전시켰다.

[0456] 반대로, F151은 포르말린의 발바닥 내 주사 48시간 전에 투여될 때, 포르말린 시험의 후기 단계에서의 통증 유사 행동을 약하게 저해하였다. 즉, 표 29에 나타낸 바와 같이 2.5, 및 10 mg/kg으로 투여될 때 F151은 후기 단계를 각각, 15 \pm 7% 및 21 \pm 5% 만큼 역전시켰다.

표 29

[0457]

수컷 OF1 마우스에서 포르말린 유도 통증 유사 행동에 대한 EE1 및 F151 항체의 효과

군	용량 (mg/kg, i.v.)	A.U.C. \pm SEM (15-45 분)	통증 유사 행동의 역전(%) \pm SEM (15-45 분)
동형 대조군 1B7.11 (EE1)	30	63.6 \pm 2.9	0 \pm 5
EE1	2.5	41.6 \pm 3.4 (***)	35 \pm 5
	10	42.9 \pm 2.9 (***)	33 \pm 5
	30	36.5 \pm 4.3 (***)	45 \pm 7
동형 대조군 1B7.11 (F151)	10	57.3 \pm 3	0 \pm 5
F151	2.5	48.9 \pm 3.8 (NS)	15 \pm 7
	10	45.0 \pm 2.8 (*)	21 \pm 5

*, p<0.05; ***, p<0.001: 적절한 대조군에 대한 스튜던트 T 검정이 사용되었다.

NS: 유의하지 않음

B. 완전 프로인드 어쥬번트(Complete Freund[®] adjuvant, CFA) 유도 만성 염증성 통증

[0459] 만성 염증은 미네랄 오일 및 만니드 모노올레이트(Sigma) 중 1 μ g/ μ L의 열사된 마이코박테리움 투버큐로시스를 함유하는 완전 프로인드 어쥬번트(Complete Freund[®] Adjuvant, CFA) 25 μ L의 짙은 마취 하 발바닥 내 투여에 의해 유도되었다. 군의 크기는 8마리의 수컷 C57B1/6 마우스였다.

[0460] EE1 항체는 2.5 및 30 mg/kg의 CFA의 발바닥 내 주사 22 시간 후에 정맥 내로 투여되었고, 기계적 및 열적 과민증을 CFA 발바닥 내 투여 후 1일(D1), 4일(D4) 및 7일(D7)에 산정하였다.

B1. 기계적 과민증

[0462] 기계적 과민증은 주사된 발의 발바닥 표면에 0.6 g Von Frey 필라멘트(Bioseb, France)의 10회 적용 후 회피 반응의 빈도(FR, %)를 측정함으로써 산정하였다.

[0463] 통증 유사 행동에 대한 EE1 항체의 효능을 조사하기 위해, 우리는 기계적 과민증에 대한 역전(%)을 다음과 같이 계산하였다:

[0464] 역전 백분율은 각각의 마우스에 대해 (평균 FR-동형-대조군_{후용량} - FR-Ipsi_{후용량}) / (평균 FR-동형-대조군_{후용량} - 평균 FR- sham_{후용량})로 계산하였다.

[0465] D1, D4 및 D7에서, CFA의 발바닥 내 주사 후, 미접촉(naive)군에 비교하여 Von Frey 필라멘트에 대한 FR의 유의한 증가가 이소형 대조군 1B7.11 치료군에서 관찰되었고, 이는 기계적 과민증의 발달을 나타낸다. 발바닥 내로의 CFA 22시간 후에 정맥 내로 투여되었을 때, EE1 항체는 이러한 FR을 연구된 상이한 시점에서 동형 대조군

1B7.11치료군에서 수득된 FR과 비교하여 유의하게 감소시킬 수 있었다(도 10).

[0466] 기계적 과민증의 역전은 2.5 mg/kg 및 30 mg/kg의 EE1 항체의 정맥 내 투여에 대해, 각각, D1에서는 41±8% 및 22±8%, D4에서는 36±9% 및 32±9%, D7에서는 27±10% 및 50±9%이었다(표 30).

표 30

수컷 C57B1/6 마우스에서 CFA 유도된 기계적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과

군	용량 (mg/kg, i.v.)	CFA 후 1일 FR (%) 효과 %		CFA 후 4일 FR (%) 효과 %		CFA 후 7일 FR (%) 효과 %	
		41.3±4.4	100±11	43.8±2.6	100±8	45±5	100±13
미접촉	n.a.						
동형 대조 군 1B7.11	30	81.3±4.4	0±11	78.8±3	0±8	82.5±2.5	0±7
EE1	2.5 30	65±3.3 (**) 72.5±3.1 (*)	41±8 22±8	66.3±3.2 (*) 67.5±3.1 (*)	36±9 32±9	72.5±3.7 (*) 63.8±3.2 (***)	27±10 50±9

FR: 반응 빈도(%) ± SEM, % 효과 ± SEM, n.a. 적용가능하지 않음

*, p<0.05, **, p<0.01 and ***, p<0.001, 반복된 측정으로서 시간으로의 이원배치 분산분석 후 시간 인자의 각 수준에 대한 인자군에 대한 두네트 시험을 수행

B2. 열적 과민증

[0470] 열적 과민증에 대해, 복사열에 대한 반응을 발바닥 장치(IITC, Woodland Hills, USA)를 사용하여 발 움추림 잠복기(Paw Withdrawal Latencies, PWL, 초)의 측정에 의해 평가하였다.

[0471] 통증 유사 행동에 대한 EE1 항체의 효능을 조사하기 위해, 우리는 열적 과민증에 대한 역전(%)을 다음과 같이 계산하였다:

[0472] 역전 백분율을 각각의 마우스에 대해 $(PWL_{\text{후용량}} - \text{평균 동형 대조군후용량}) / (\text{평균 동형-대조군사전용량} - \text{평균 동형 대조군후용량})$ 로 계산하였다.

[0473] 열적 과민증은 베이스라인에서는 CFA의 발바닥 내 주사 전에는 모든 군 간에서 차이가 없었다(데이터 미도시).

[0474] CFA의 발바닥 내 주사 후 D1, D4 및 D7에서, 동형 대조군 1B7.11-치료군 마우스에서 주사된 발의 발 움추림 잠복기의 유의한 감소가 관찰되었고, 이는 CFA가 열적 과민증을 유도한다는 것을 나타낸다(데이터 미도시).

[0475] EE1 항체는 발바닥 내 CFA 주사 22 시간 후(즉, 발바닥 내 CFA 주사 후 1일)에 정맥 내 투여되었고, 시험된 용량에 상관없이 D1에서는 발 움추림 잠복기를 증가시킬 수 없었다(도 11). 그러나, EE1은 D4에서 발바닥 움추림 잠복기를 유의하게 증가시켰고, 이러한 효과는 D7에서도 또한 존재하였다(도 11).

[0476] 열적 과민증의 역전은 2.5 mg/kg 및 30 mg/kg의 EE1의 정맥 내 투여에 대하여, 각각, D4에서는 41±15% 및 58±21%, D7에서는 46±10% 및 52±17%이었다(표 31).

표 31

수컷 C57B1/6 마우스에서 CFA 유도 열적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과

군	용량 (mg/kg, i.v.)	CFA 후 1일 PWL(초) 효과 %		CFA 후 4일 PWL(초) 효과 %		CFA 후 7일 PWL(초) 효과 %	
		3.3±0.3	n.a.	4.1±0.1	n.a.	3.6±0.3	n.a.
동형 대조 군 1B7.11	30						
EE1	2.5 30	3.1±0.3 2.6±0.2	-7±10 -20±5	5.2±0.4 5.7±0.6 (*)	41±15 58±21	5.0±0.3 (*) 5.2±0.6 (*)	46±10 52±17

PWL: 발 움추림 잠복기 \pm SEM, % 효과 \pm SEM, n.a. 적용가능하지 않음

*, p<0.05, 반복된 측정으로서 시간으로의 이원배치 분산분석 후 시간 인자의 각 수준에 대한 인자군에 대한 두네트 시험을 수행

[0479] C. 만성 협착성 통증(CCI)유도 신경병 유사 통증(베네트 모델)

[0480] CCI 모델은 말초 신경 손상 모델로서 사용되었다. 간략하게, 마우스를 이소플루란(3%)로 마취시키고, 작은 절개를 통해 중간 넓적다리 수준에서 오른쪽 좌골 신경을 노출시켰다. 1 mm 간격으로 6.0 크로믹 거트(chromic gut(Ethicon))의 3개의 결찰을 좌골 신경 주위로 위치시켰다. 이러한 수술적 절차는 근육 및 피부를 덮음으로써 완료하였다. CCI 수술 날은 0일로 간주된다. 군의 크기는 6 내지 10 마리의 수컷 C57B1/6 마우스였다.

[0481] EE1 항체는 수술 후 11일에 2.5 및 30 mg/kg으로 정맥 내 투여되었고, 기계적 및 열적 과민증을 수술 후 12일(D12), 14일(D14) 및 18일(D18)(치료 후 1일(D1), 3일(D3), 및 7일(D7)에 해당)에 산정하였다.

[0482] C1. 기계적 과민증

[0483] 기계적 과민증은 증가하는 압력(g) 자극에 대한 (손상[즉, 동축(Ipsi)]되거나 손상되지 않은[즉, 대조] 뒷발 상에서) 뒷발 움추림 역치를 Dynamic Plantar Aesthesiometer(Ugo-Basile, Italy)를 사용하여 측정함으로써 산정하였다; 마우스의 뒷발에 철골이 (10초에 5 그람씩) 증가하는 힘으로 적용되었다.

[0484] 통증 유사 행동에 대한 EE1 항체의 효능을 조사하기 위해, 우리는 기계적 과민증에 대한 역전을 다음과 같이 계산하였다: 역전 백분율은 각각의 마우스에 대해 $(Ipsi_{후용량} - Ipsi_{사전용량}) / (대조_{사전용량} - Ipsi_{사전용량})$ 로 계산하였다.

[0485] 수술 후, 수술을 받은 마우스는 손상된 발의 기계적 자극에 대한 강력한 감작이 발달된 반면 손상되지 않은 발은 영향을 받지 않았다. 11일에, 손상된 발에 대한 기계적 감작은 정체기에 도달하였다(데이터 미도시).

[0486] 2.5 및 30 mg/kg으로 11일에 정맥 내로 투여된 EE1 항체는 D12, D14 및 D18에서, 각각, D12에서 $15.2 \pm 4.9\%$ 및 $15.2 \pm 5.7\%$, D14에서 $26.8 \pm 5.7\%$ 및 $25.7 \pm 4.5\%$, D18에서 $30.3 \pm 7.1\%$ 및 $20.8 \pm 5.9\%$ 로 CCI 유도 기계적 과민증을 약간 역전시키는 경향을 나타냈다(도 12 및 표 32).

표 32

[0487] 수컷 C57B1/6 마우스에서 CCI 유도 기계적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과

군	용량 (mg/kg, i.v.)	CCI 후 12일 % 효과 \pm SEM	CCI 후 14일 % 효과 \pm SEM	CCI 후 18일 % 효과 \pm SEM
동형 대조군1B7.1 1	30	0.2 \pm 3.0	1.8 \pm 4.3	18.1 \pm 6.6
EE1	2.5	15.2 \pm 4.9	26.8 \pm 5.7 (**)	30.3 \pm 7.1
	30	15.2 \pm 5.7	25.7 \pm 4.5 (*)	20.8 \pm 5.9

*, p<0.05, 및 **, p<0.01 반복된 측정으로서 시간으로의 이원배치 분산분석 후 시간 인자의 각 수준에 대한 인자군에 대한 두네트 시험을 수행(엘타 ipsi 값에 대한 통계를 수행)

[0489] C2. 열적 과민증

[0490] 열적 과민증에 대해, 발 움추림 잠복기(Paw Withdrawal Latencies, PWL)(초)의 측정은 주사된 뒷발에서 복사열에 대한 반응을 발바닥 장치(IITC, Woodland Hills, USA)를 사용하여 산정하였다.

[0491] 통증 유사 행동에 대한 EE1 항체의 효능을 조사하기 위해, 우리는 열적 과민증에 대한 역전(%)을 다음과 같이 계산하였다:

[0492] 역전 백분율은 각각의 마우스에 대해 $(Ipsi_{후용량} - 평균_동형_대조_{후용량}) / (평균_미접촉_{후용량} - 평균_동형_대조_{후용량})$ 로 계산하였다.

[0493] 수술 후, 수술을 받은 마우스는 손상된 발의 열적 자극에 대한 강력한 감작이 발달된 반면 손상되지 않은 발은

영향을 받지 않았다. 11일에, 손상된 발에 대한 열적 감작은 정체기에 도달하였다(데이터 미도시).

[0494] 11일에 정맥 내로 투여된 EE1 항체는, D12에서, 경향은 관찰되었지만, 손상된 발의 발 움추림 잠복기를 유의하게 증가시키지는 않았다. 그러나, D14부터, EE1 항체는 발 움추림을 유의하게 증가시켰다(도 13).

[0495] 열적 과민증의 역전은 2.5 mg/kg 및 30 mg/kg의 EE1 항체의 정맥 내 투여에 대해, 각각, D12에서는 41±16% 및 56±24%, D14에서는 51±16% 및 98±48%, D18에서는 78±19% 및 84±9%이었다(표 33).

표 33

수컷 C57BI/6 마우스에서 CCI-유도 열적 과민증에 대한 EE1 항체의 효과 동역학 평가

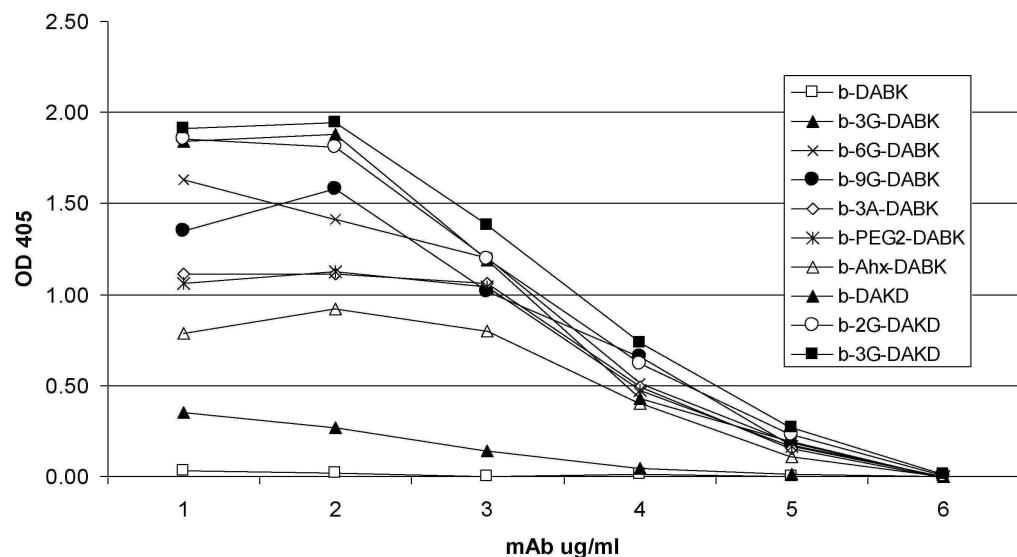
군	용량 (mg/kg, i.v.)	CCI 후 12일 PWL(초)		CCI 후 14일 PWL(초)		CCI 후 18일 PWL(초)	
		% 효과	% 효과	% 효과	% 효과	% 효과	% 효과
미접촉	n.a.	6.3±0.5	100±19	6.2±0.4	100±14	6.1±0.5	100±17
동형 대조 군 1B7.11	30	3.8±0.2	0±7	3.4±0.2	0±5	3.4±0.2	0±7
EE1	2.5	4.8±0.4	41±16	4.8±0.5	51±16	5.5±0.5 (*)	78±19
	30	5.2±0.6	56±24	6.1±1.3(**)	98±48	5.7±0.6 (**)	84±22

PWL: 발 움추림 잠복기±SEM, % 효과 ±SEM, n.a. 적용가능하지 않음

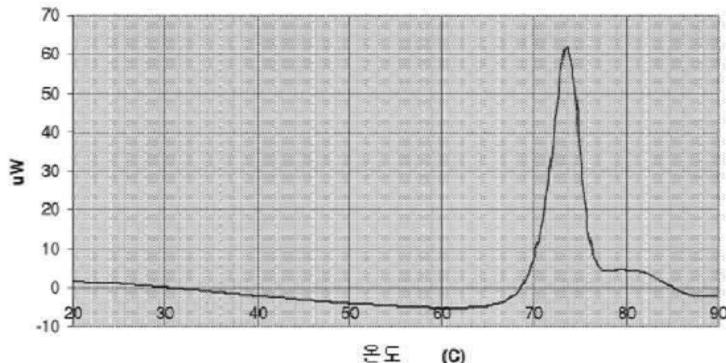
*, p<0.05, and **, p<0.01 반복된 측정으로서 시간으로의 이원배치 분산분석 후 시간 인자의 각 수준에 대한 인자군에 대한 두네트 시험을 수행

도면

도면1



도면2



도면3

중쇄 정렬

모 : EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCKASGYSFTDYNIYWVKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNTGY
+IQL QSG E+ KPG SVKVSCKASGYSFTDYNIYWV+Q+ G+ LEWIGYFDPYNGNTGY

인간화 : QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYWVRQAPGQGLEWIGYFDPYNGNTGY

모 : NOKFRGKATLTVDKSSSTAMHLLSLTSDDSAVYYCANYYRDDHAMDYWGQGTSVTVSS
NOKFRG+ATLTVDKSS+STA+M L SL SDD+AVYYCANYYRDDHAMDYWGQGT VTVSS

인간화 : NOKFRGRATLTVDKSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCANYYRDDHAMDYWGQGTLVTIVSS

경쇄 정렬

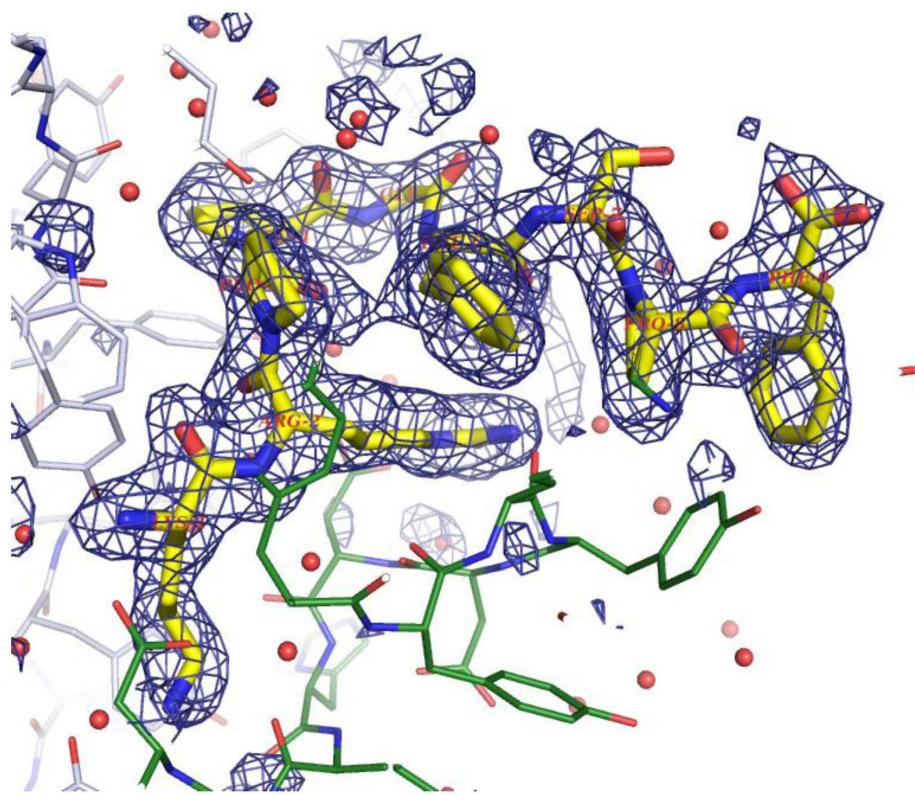
모 : DIVMSQSPSSLAVSVGEKUTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAMYQQXPGQSPKPLIYWASTR
DIVM+QSP SLAVS+GE+ T++CKSSQSLLYSSNQKNYLAMYQQXPGQSPKPLIYWASTR

인간화 : DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPGQPPKPLIYWASTR

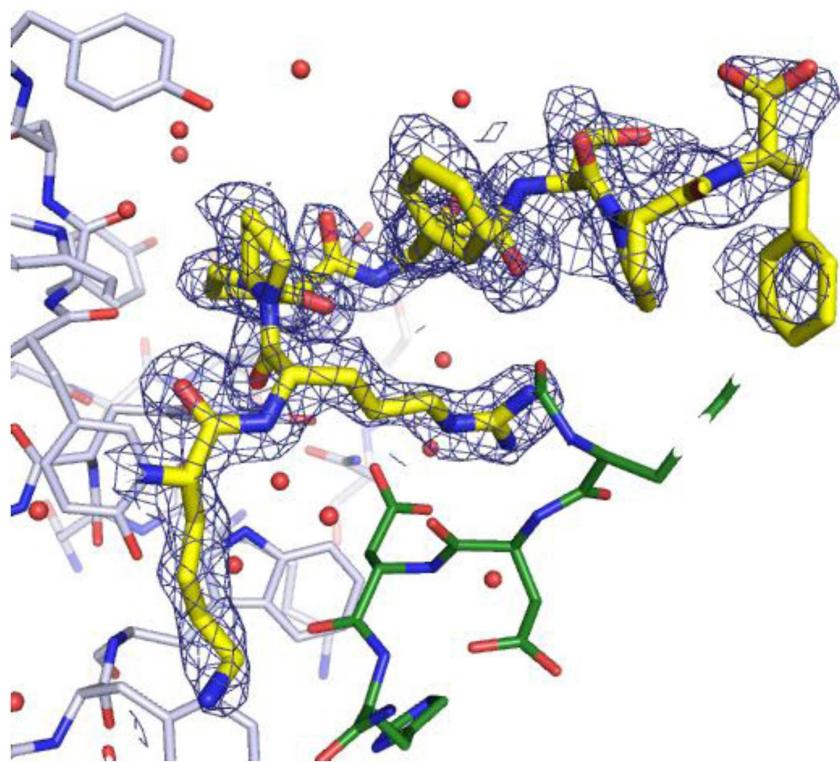
모 : ESGVPDRFTGSGSGTDPTLTISSVQAEDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK
ESGV^PDRF+GSGSGTDFTLTISSS++AED+A+YYCQQYYSYPWTFG GTK+EIK

인간화 : ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPWTFQGTKVEIK

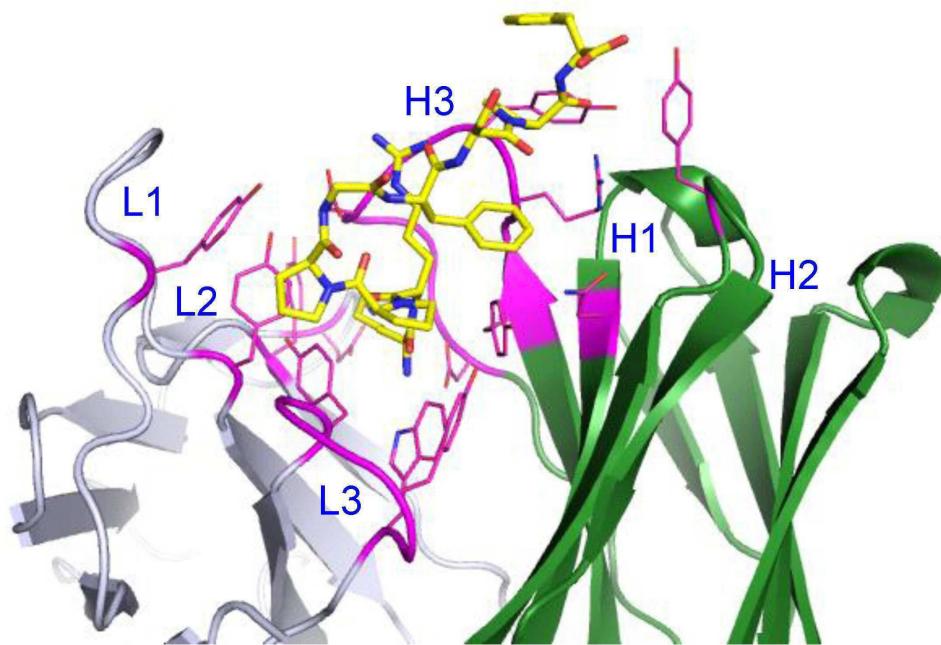
도면4



도면5



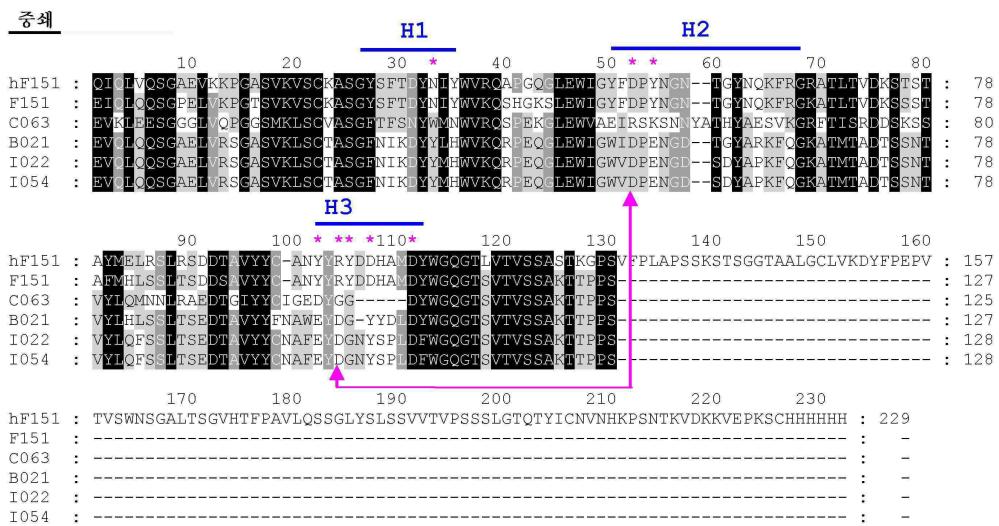
도면6



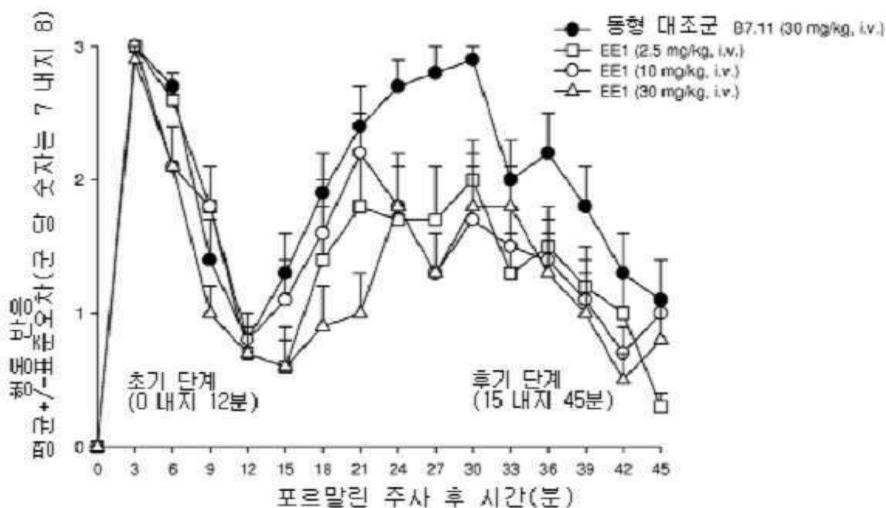
도면7

<u>정체</u>		L1										L2										
		10	20	30*	40	50	*	60*	70	80												
hF151 :	DIVMTQSPSPLAVSLGERATINCKSSQSLLYSENQKNYLAMYQQREGQPKPPLIYWASTRBSGVPDFSGSGSGTDFTLT										: 80											
F151 :	DIVMSQSPSPLAVSVGEGKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAMYQQREGQPKPPLIYWASTRBSGVPDFRTGSGSGTDFTLT										: 80											
C063 :	DIVM30SPSPLAVSVGEGKVTMSCKSSQSLLYSSDQNYLAMYQQRSQGQSPKLLILYWASTRBSGVPDFRTGSGSGTDFTLT										: 80											
B021 :	DVVMQTPTTLSVTLGQFASISCKSSQSLLYSNGTYLNWLLQRPGQSPKRLLIYLVSKLLSGVPDFRTGSGSGTDFTLK										: 79											
I022 :	DIVMTQSPSPLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSCNQKNYLAMYQQREGQPKPLLIYGASTRBSGVPDFRTGSGSGTDFTLT										: 80											
I054 :	DVVMQTPTTLSVTFGQFASISCKSSQSLLYSNGETYLNWLLQRPGQSPKRLLIYLVSKLLSGVPDFRTGSGSGTDFTLK										: 79											
<u>L3</u>																						
		90	100	110	120	130	140	150	160													
hF151 :	ISSLQEDVAVYYCQOYYSMWTFCGGTKVEIKRTVRAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNAL																					
F151 :	ISSVKPEDVAIYYCQOYYSMWTFCGGTKLEIKRADAAPT-----																					
C063 :	ISSVKPEDVAVYYCQOYYSMWTFCGGTKLEIKRADAAPT-----																					
B021 :	ITRVEAEDLGVYYCLGTHFPTFEGGTTKLEIKRADAAPT-----																					
I022 :	ISSVQEDLGVYYCQNDHSMELTFGAGTTKLELKRAADAPT-----																					
I054 :	ISRVESEDLGVYYCMGTHFPTFEGGTTKLEIKRADAAPT-----																					
		100																				
		170	180	190	200	210	220															
hF151 :	QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRREC																					
F151 :	-----																					
C063 :	-----																					
B021 :	-----																					
I022 :	-----																					
I054 :	-----																					

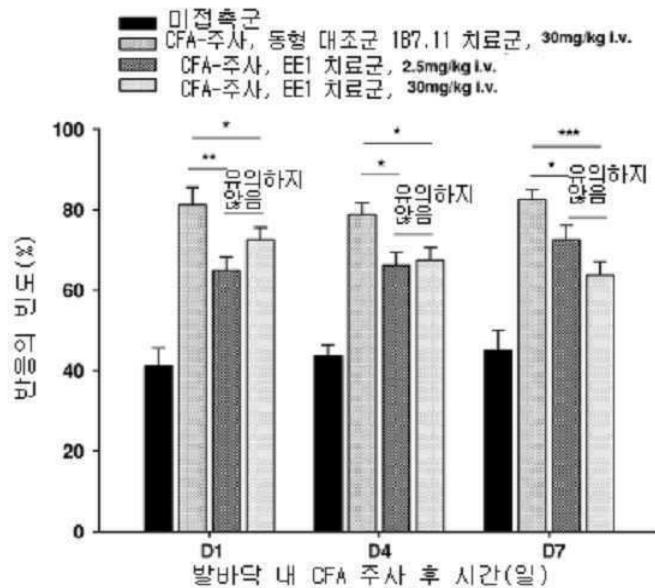
도면8



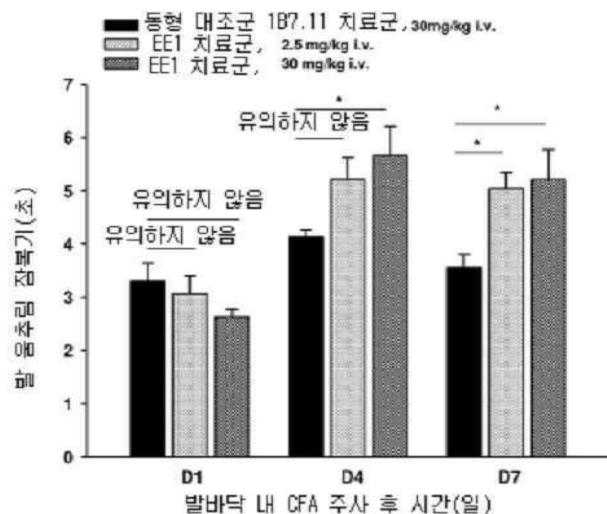
도면9



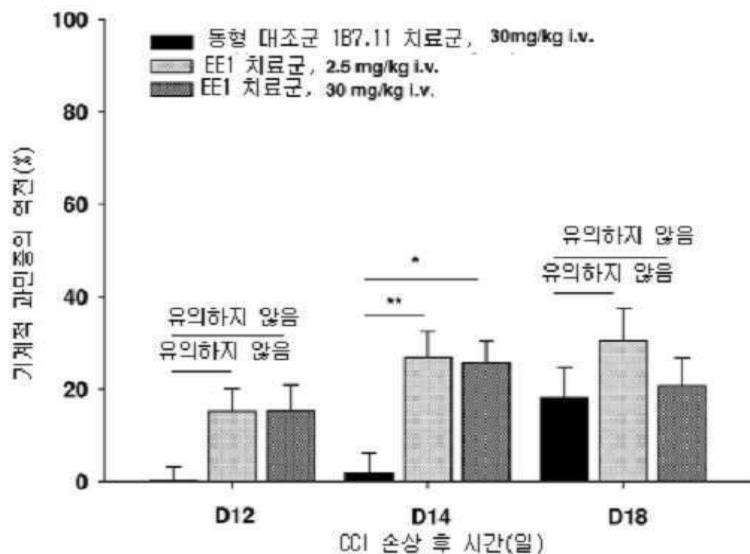
도면10



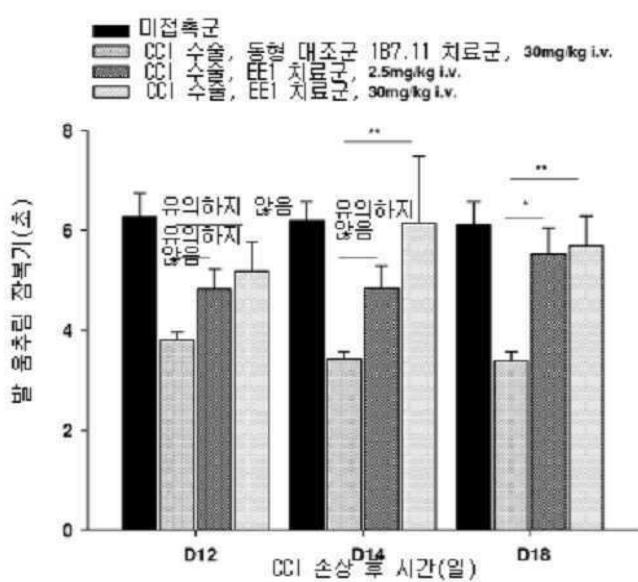
도면11



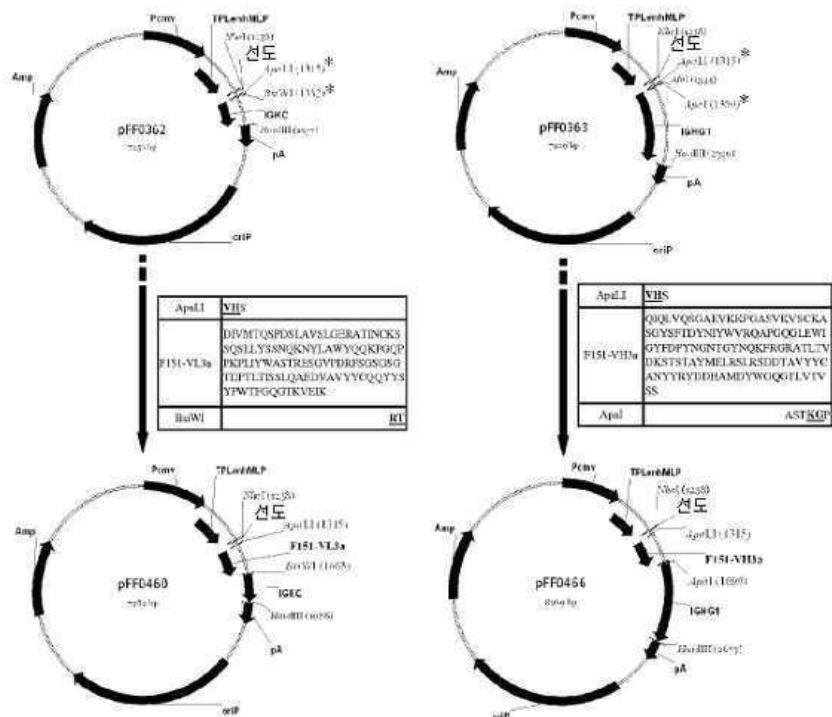
도면12



도면13



도면 14



도면 15

A.

10	20	30	40	50	60
F151LC	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPPLIYWASTR :: ::::::::::::::::::::: ::::: ::::: . ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: VK1 DIQHTQGPSSLSASVGVDRVITCRAQSII-----SSYLNWYQQKPGKAPKLIIYRASSL				
10	20	30	40	50	
70	80	90	100	110	
F151LC	E5GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAITYCQQYYSYFWTFGGGTKE	(시열번호 : 111)			
.....	
VK1	QSCVPSGRFSGCSCGDFTLTISSLQPEDLAITYCQQYSYTFPTFCQGCTKVE	(시열번호 : 112)			
60	70	80	90	100	

B.

10	20	30	40	50	60	
F151HC EIQLQQSGPELVKPGTSVVKVSKASGYSFTIDNYIYWVKQSHGKSLIEWIGYFDOPYINGIYG						
.....:::..:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::						
VH1b QVQLVQSGAEVKKPGASVVKVSKASGYFTSYYMMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSSGGINY						
10	20	30	40	50	60	
70	80	90	100	110	120	
F151HC HQKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLLSLTSDSAAVYTCANY- YRYD--DHAMDYWGQGTSVT						
.....:::..:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::						
VH1b AQKFQGRVIMTRDKSESTAYNELLRSRSEDITAVYYCARQYDYDVFYAMDYWGQGTIVT						
70	80	90	100	110	120	
120						
F151HC VSS (서열번호 : 113)						
:::						
VH1b VSS (서열번호 : 114)						

도면16

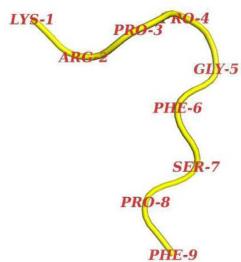
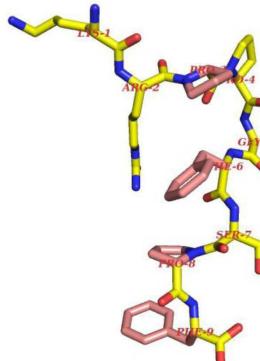
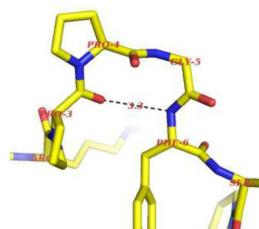
A.

mF151-LC: DIVMSQSPSSLAVSGEKVTHNSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTRES
 ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 Z46615-1-V-X67858-1-J : DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKILLIYWASTRES
 ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 GVPDRFTGSGSGTDFLTISSVKAEDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGTKLEIK (서열번호 : 26)
 ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPTNFGQQGTKVEIK (서열번호 : 115)

B.

mF151-HC: EIQLOQQSGPELVKPGTSVKVSCKASGYSFTDYNIIYWVKQSHGKSLEWIGY
 ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 Z12316-1-VX97051-4-D-X97051-5-J : QYQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTTTSYGISNVRQAPGQGLEMMGW
 ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 FDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLSSLTSDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQQGTSVTVSS (서열번호 : 19)
 ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::
 ISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTAYMELRSLSRSDOTAVYYCAREYSSSSDAFDINGQGTMVTVSS (서열번호 : 116)

도면17

A.**B.****C.**

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI

<120> ANTIBODIES TO BRADYKININ B1 RECEPTOR LIGANDS

<130> 543895 SA9-029PC

<140> New Application

<141> Concurrently Herewith

<150> 61/616,845

<151> 2012-03-28

<150> FR 1350953

<151> 2013-02-04

<160> 137

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

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

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

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

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

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

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: Bradykinin peptide"

<400> 5

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: Des-Arg9-Bradykinin peptide"

<400> 6

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Phe" or "His"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Asp" or "Ala" or "Val" or "Leu" or "Ile" or "Met"
or "Phe" or "Tyr" or "Trp"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Phe" or "Trp" or "His"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Glu" or "Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Glu"

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<400> 7

Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Arg" or "Ala" or "Val" or "Leu" or "Ile" or "Met"
or "Phe" or "Tyr" or "Trp"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Asp" or "Glu" or "Asn" or "Gln"

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to those in the annotations for said position"

<400> 8

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

1

5

10

15

Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Trp" or "Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<400> 9

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr

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

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Phe" or "His"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Phe" or "His" or "Trp"

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(4)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Phe" or "Thr" or "His"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Tyr" or "Phe" or "His" or "Leu"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<400> 10

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1	5
---	---

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Asp" or "Gln" or "Asn"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<400> 11

Trp Ala Ser Thr Arg Glu

1	5
---	---

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222>

(8)..(8)

<223> /replace="His" or "Tyr" or "Phe"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Ser Asn Gln Lys Asn His Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr

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

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1	5
---	---

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1	5
---	---

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 21

Gln Ile 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 Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

Gln Ile 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 Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 23

Gln Ile 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 Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Lys Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24

Gln Ile 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 Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

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

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 25

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

65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400

> 27

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Lys

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 28

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

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

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 30

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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr

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

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Arg Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr			
65	70	75	80
Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Phe			
85	90	95	
Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 39			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Mus musculus			
<400> 39			
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser			
20	25	30	
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly			

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr

1	5	
---	---	--

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Lys Gly

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn

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

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1	5	
---	---	--

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 46

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 54

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys

<210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 55
 Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe

1 5 10
 <210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 56
 Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 57
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 58

Met Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 61

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85	90	95
Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly		
100	105	110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 62

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Pro Ile Gly			
1	5	10	15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser		
20	25	30

Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
35	40	45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro		
50	55	60

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

Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly		
85	90	95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Phe"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace=" "

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Pro"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference
with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<400> 63

Trp Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 64

<211>

> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Val"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Asp"

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<400> 64

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

1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Met"

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<400> 65

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His

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

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Phe" or "Asp" or "His"

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Phe" or "His" or "Trp"

<220><221> misc_feature

<222

> (4)..(4)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Phe" or "Thr" or "His"

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Tyr" or "Phe" or "His" or "Leu"

<220><221> misc_feature

<222

> (8)..(8)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to those in the annotations for said position"

<400> 66

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Gly"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference"

with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /replace="Asp" or "Gln" or "Asn"
<220><221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> /note="Residue given in the sequence has no preference"

with respect to those in the annotations for said position"

<400> 67

Trp Ala Ser Thr Arg Glu

1	5
---	---

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="His" or "Tyr" or "Phe"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Gly"

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> /note="Residues given in the sequence have no preference"

with respect to those in the annotations for said positions"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Asp"

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (13)..(13)

<223> /replace="Arg"

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<220><221> VARIANT

<222> (15)..(15)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference

with respect to that in the annotation for said position"

<400> 68

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Ser Asn Gln Lys Asn His Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Met"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<400> 69

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
consensus peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="Glu"

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> /note="Residue given in the sequence has no preference
with respect to that in the annotation for said position"

<400> 70

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> source
<223> /note="C-term biotin"
<400> 71

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source
<223> /note="N-term KLH"
<400> 72

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source
<223> /note="C-term KLH"
<400> 73

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 74
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 74

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term biotin"

<400> 75

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term KLH"

<400> 76

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term KLH"

<400

> 77

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 78

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term biotin"

<400> 79

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term KLH"

<400> 80

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term KLH"

<400> 81

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 82

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term biotin"

<400> 83

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term KLH"

<400> 84

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term KLH"

<400> 85

Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 86

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term biotin"

<400> 87

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term KLH"

<400> 88

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term KLH"

<400> 89

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5 10

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 91

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term biotin"

<400> 92

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term KLH"

<400> 93

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210

> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="C-term KLH"

<400> 94

Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe

1 5

<210> 95

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: Bradykinin 1-5 peptide"

<400> 95

Arg Pro Pro Gly Phe

1 5

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 96

Arg Pro Pro Gly Phe

1 5

<210> 97

<211> 136

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

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

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

Val Tyr Tyr Phe Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 115 120 125
 Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130 135

<210> 98

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

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

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

His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 65 70 75 80

Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
 85 90 95

Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro
 115 120 125

Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130

<210> 99

<211> 136

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

99

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

Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 20 25 30

Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser
 35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Thr Ala Phe Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 115 120 125

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser

130 135

<210> 100

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly

35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr

50 55 60

Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser

65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala

85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Ser Leu

100 105 110

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr

115 120 125

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser

130 135

<210> 101

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly

35	40	45
----	----	----

Leu Glu Trp Ile Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr

50	55	60
----	----	----

Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala

85	90	95
----	----	----

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr

115	120	125
-----	-----	-----

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser

130	135	
-----	-----	--

<210> 102

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 102

Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Thr Leu Thr Leu Ser Val Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20	25	30
----	----	----

Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly

35	40	45
----	----	----

Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Lys Leu Glu Leu Tyr

130

<210> 103

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

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

1 5 10 15

Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20 25 30

Tyr Ser Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ser Lys Leu Glu Leu Tyr

130

<210> 104

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 104

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

1 5 10 15

Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20 25 30

Tyr Thr Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

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

115 120 125

Ser Lys Leu Glu Leu Tyr

130

<210> 105

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 105

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

1 5 10 15

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Leu Leu

20 25 30

Tyr Ser Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly

35 40 45

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

Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Tyr

130

<210> 106

<211> 133

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

Glu Leu Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Thr Leu Thr Leu Ser Val Pro
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30

Tyr Ser Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly
 35 40 45

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

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

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

Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

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

115	120	125	
Lys Leu Glu Leu Tyr			
130			
<210> 107			
<211> 46			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><			
221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"			
<400> 107			
aaaagcaggc ttaggagcgg ccgcattggc gtcccaaggcc tcgctg 46			
<210> 108			
<211> 46			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"			
<400> 108			
caagaaagct gggtcggatc cttataaagt tcccagaacc ctggtc 46			
<210> 109			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<			
223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"			
<400> 109			
gcatacccat acgacgtccc agactacgtc 30			
<210> 110			
<211> 1005			
<212> DNA			

<213> Mus musculus

<400> 110

atggcgtccc	aggcctcgct	gaagctacag	ccttctaacc	aaagccagca	ggccctccc	60
aacatcacct	ccigcgaggg	cgccccggaa	gcctggatc	tgcgtgtcg	ggtgcigcca	120
gggttgtca	tcactgtctg	ttctttggc	ctcctggga	accttttagt	cctgtccttc	180
ttcctttgc	cttggcgacg	atggtggcag	cagcggcggc	agcgcctaac	catagcagaa	240

atctaacctgg	ctaacttggc	agcttctgat	ctgggtttg	tgctgggcct	gcccttctgg	300
gcagagaacg	ttgggaaccg	tttcaactgg	cccttgaa	gtgacctctg	ccgggtggtc	360
agcgggtca	tcaaggccaa	cctgttcatc	agcatcttcc	tggtggtggc	catcagttag	420
gaccgctaca	ggttgctgtt	atacccatg	accagctggg	ggaaccggcg	gacggcaaa	480
gccccagtga	cctgcctgct	catctggta	gctgggggccc	tcttgagcac	ccccacgttc	540
cttctgcgtt	ccgtcaaagt	cgtccctgat	ctgaacatct	ctgcctgcat	cctgctttc	600
ccccacgaag	cttggactt	tgttaaggatg	gtggagttga	acgtttggg	tttccctcctc	660

ccattggctg	ccatcctcta	cttcaactt	cacatcctgg	cctccctgag	aggacagaag	720
gaggccagca	gaaccgggtg	tgggggaccc	aaggacagca	agacaatggg	gctgatcctc	780
acactggtag	cctccttcct	ggtctgctgg	gccccttacc	acttcttgc	cttcctggat	840
ttcctggtcc	aggtgagagt	gatccaggac	tgcttctgga	aggagctcac	agacactggc	900
ctgcagctgg	ccaaacttctt	tgctttgtc	aacagctgcc	tgaaccact	gatttatgtc	960
tttgcaggcc	ggcttttaa	gaccagggtt	ctggaaacctt	tataa		1005

<210> 111

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 112

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

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

65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu			
100	105		

<210> 113

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

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

1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

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

85 90 95
Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

85	90	95
Ala Arg Trp Gly Tyr Asp Tyr Asp Val Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

<210> 115

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 115

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 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser			
20	25	30	

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
50	55	60	

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	

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

Lys

<210> 116

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<

<400> 116

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> source

<223> /note="N-term biotin"

<400> 117

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg

1 5

<210> 118

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 118

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Phe

85 90 95

Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

115 120 125

<210> 119

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95
 Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125

<210> 120

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 120

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125
<210> 121

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 121

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

115 120 125

<210> 122

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80
 Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly

100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

115 120 125

<210> 123

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 123

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr

115

<210> 124

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr

115 120

<210> 125

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 126

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

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

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

<210> 127

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 127

gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctgggacttc agtgaaggta	60
tcctgcaagg ctctcggtt ctcattcaact gactacaaca tctactgggt gaaacagagc	120
catggaaaga gccttgagtg gattggatat ttgtatcctt acaatggtaa tactggctac	180
aaccagaagt tcaggggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagccttc	240
atgcatctca gcagcctgac atctgatgac tctgcgtct attactgtgc aaactactat	300
aggtatgacg accatgctat ggactattgg ggtcaaggaa ctcagtcac cgttcctca	360

<210> 128

<211> 339

<212> DNA

<213>

> Mus musculus

<400> 128

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact	60
atgagctgca agtccagtca gagccttttata tagtagca atcaaaagaa ctacttggcc	120
tggtaaccagg agaaaccagg gcagtcctt aaaccgctga ttactggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacagggc agtggatctg ggacagattt cacttcacc	240
atcagcagtgtga aggctgca atttattact gtcaagcaata ttatagctat	300
ccgtggacgtcggtggagg caccaagctg gaaaatcaa	339

<210> 129

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 129

cagattcagc tggtgccagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggta	60
tcctgcaagg ccagcggtca cagttcacc gactacaaca tctactgggt ccgacaggct	120
ccagggccagg gactggaatg gatcggtac ttcgaccctt acaacggcaa caccggctac	180
aaccagaagt tccggggcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctac	240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caactactac 300
 agatacgacg accacgccat ggactactgg ggccaggca ccctggcac cgtgtccct 360
 <210> 130
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"
 <400> 130
 gacatgtga tgacccagag ccccgacage ctggccgtgt ctctggcga gccccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gaggctgctg tactctagca accagaagaa ctacctggcc 120
 tggatatcagc agaagccccgg ccagcccccc aagcccccta tctactggc cagcacccgc 180
 gagagcggcg tgcccgatag atttccggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacagctac 300
 ccctggacct tcggccaggg caccaagggtg gaaatcaag 339
 <210> 131
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 131
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Pro Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly

85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr

115
 <210> 132

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 132
 Lys Arg Pro Pro

1
 <210> 133
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 133

Arg Pro Pro Gly Phe Ser
 1 5
 <210> 134
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 134
 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 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 135

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 135

Gln Ile 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 Ser Phe Thr Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

Asn Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Arg Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

His His His His His

225

<210> 136

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 136

Ala Ser Thr Lys Gly Pro

1 5

<210> 137

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 137

His His His His His His

1 5