

(43) 공개일자 2020년07월21일

- (71) 출원인
바이오아트라, 엘엘씨
미국, 캘리포니아 92121, 샌디에이고, 스위트
100, 토레야나 로드 11085
- (72) 발명자
쇼트 제이 엠
미합중국 92014 캘리포니아 텔 마르 비아 에스페
리아 12985
창 화이 웬
미합중국 92069 캘리포니아 산 마르코스 새도우
힐스 드라이브 1318
프레이 게르하르트
미합중국 92129 캘리포니아 샌디에고 비아 시마
벨라 13768
- (74) 대리인
이준성

(54) 발명의 명칭 항 Ax1항체 및 이의 면역접합체와 이것들의 용도

Ax1 단백질에 결합하는 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 제공된다. 이러한 항체를 포함하는 면역 접합체, 약학 조성물과 키트도 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/51 (2013.01)

C07K 2317/515 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/70 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는 항 Ax1 항체로서, 상기 항체는 서열 번호 11 내지 서열 번호 13의 서열들로부터 선택되는 DNA 서열에 의해 암호화되는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 7 내지 서열 번호 10의 서열들로부터 선택되는 DNA 서열에 의해 암호화되는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 항체는 종양 미세환경에 조성되는 어느 조건하 어느 변인 값에서의 Ax1 단백질에 대한 결합 친화성이, 비 종양 미세환경에 조성되는 동일 조건하 상이한 변인 값에서의 Ax1 단백질에 대한 결합 친화성에 비하여 더 큰, 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조건은 pH인 항체.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 종양 미세환경 pH는 5.8 내지 7.0의 범위이고, 비 종양 미세환경 pH는 7.2 내지 7.8의 범위인 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 의해 암호화되고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 9에 의해 암호화되는 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 의해 암호화되는 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 의해 암호화되는 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8에 의해 암호화되는 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 의해 암호화되는 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8에 의해 암호화되는 항체.

청구항 10

제 1 항에 따른 항체를 포함하는 면역 접합체.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 면역접합체는 화학요법제, 방사성 원자, 세포증식억제성 제제 및 세포독성 제제로부터 선택되는 제제 적어도 하나를 포함하는 면역접합체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 제제 적어도 2개를 포함하는 면역접합체.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 항체 및 적어도 하나의 제제가 링커 분자에 공유 결합되어 있는 면역접합체.

청구항 14

제 10 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 제제는 메이탄시노이드, 오리스타틴, 돌라스타틴, 칼리키아미신, 피롤로벤조디아제핀 및 안트라사이클린으로부터 선택되는 면역접합체.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 의한 항체 또는 제 10 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 의한 면역접합체; 그리고 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 항체 또는 면역접합체는 암 치료용인 약학 조성물.

청구항 17

진단 또는 치료를 위한 키트로서, 상기 키트는 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 의한 항체, 제 10 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 의한 면역접합체와, 항체 또는 항체 단편, 면역접합체 및/또는 약학 조성물을 진단 또는 치료를 위해 사용하는 것에 관한 지시사항을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항 Ax1 항체 그리고 이러한 항체의 면역접합체와, 진단 방법 및 치료 방법에 있어서 항체 및 면역접합체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Ax1 단백질(Ark, UFO, Tyro-7로서도 공지됨)은 키나아제의 Tyro-3 과의 수용체 티로신 키나아제이다. Tyro-3 수용체 키나아제는 면역글로불린 유사 도메인 2개와, 세포 외 영역 중 III형 피브로넥틴 이중 반복부, 그리고 세포질 키나아제 도메인의 조합임을 특징으로 한다. Tyro-3 수용체 키나아제에 대한 리간드는 Gas6(성장 정지 특이적 6)와 단백질 S, 즉 43%의 아미노산 서열 동일성을 보이고 유사한 도메인 구조를 공유하는 비타민 K 의존적 단백질 2종이다. 각 단백질은, N-말단 GIa 도메인 함유 11g 카복시글루탐산 잔기 → 4개의 상피 성장 인자(EGF) 유사 모듈 → 텐덤 라미닌 G 도메인 2개로 이루어져 있는 C-말단 성 호르몬 결합 글로블린(SHBG) 유사 구조를 이 순서대로 가진다. SHBG 도메인은 Tyro-3 수용체 키나아제 결합 및 활성화에 필요 충분한 것인 반면에, GIa 도메인은 음으로 하전된 막 인지질과 결합하여 세포자멸성 세포의 Tyro-3 키나아제 매개 식세포작용에 있어서 중요한 역할을 담당한다.

[0003] Ax1 활성화는, PI-3 키나아제/Akt(Franke et al., *Oncogene*, vol. 22, pp. 8983-8998, 2003) 및 Ras/Erk 및 β -카테닌/TCF와 같은 기타 주요 경로(Goruppi et al., *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, pp. 902-915, 2001)를 통한 신호전달을 유도한다. Ax1은 뇌, 심장, 골격근, 장기 캡슐(organ capsule) 및 몇몇 기타 장기의 결합 조직과 같은 다수의 정상 조직, 그리고 단핵구에서는 약하게 발현되지만, 림프구에서는 그렇지 않다. 섬유아세포(Goruppi et al., *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, pp. 4442-4453 1997), 내피 세포(Hasanbasic et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 287, H1207-H1213, 2004), 혈관의 평활근 세포(Melaragno et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 37, pp. 881-887, 2004) 및 뉴런(Allen et al., *Mol. Endocrinol.*, vol. 13, pp.191-201, 1999)의 생존에 Ax1에 의해 유도된 Akt 인산화가 관여함이 상기와 같은 문헌에 기재된 바 있다. 뿐만 아니라 Ax1 녹아웃(knockout)된 동물들은 혈소판 인테그린 IIb3의 감소한 활성화로 말미암아 손상된 혈소판 응집 안정

화 및 혈전 생성을 보이는 것으로 보아, Ax1은 세포 부착과 주화성에 있어서 어떤 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

[0004] Ax1 또는 이의 리간드 Gas6의 조절장애는, 다수의 인간 암 발병에 관여한다. 다양한 유형의 암, 예컨대 유방암 (Meric et al., *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, pp. 361-367, 2002; Berclaz et al., *Ann. Oncol.*, vol. 12, pp. 819-824, 2001), 결장암(Chen et al., *Int. J. Cancer*, vol. 83, pp. 579-584, 1999; Craven et al., *Int. J. Cancer*, vol. 60, pp. 791-797, 1995), 전립선암(Jacob et al., *Cancer Detect. Prev.*, vol. 23, pp. 325-332, 1999), 폐암(Wimmel et al., *Eur J Cancer*, vol. 37, pp. 2264-2274, 2001), 위암(Wu et al., *Anticancer Res.*, vol. 22, pp. 1071-1078, 2002), 난소암(Sun et al., *Oncology*, vol. 66, pp. 450-457, 2004), 자궁내막암(Sun et al., *Ann. Oncol.*, vol. 14, pp. 898-906, 2003), 신장암(Chung et al., *DNA Cell Biol.*, vol. 22, pp. 533-540, 2003), 간세포암(Tsou et al., *Genomics*, vol. 50, pp. 331-340, 1998), 갑상샘암(Ito et al., *Thyroid*, vol. 12, pp. 971-975, 2002; Ito et al., *Thyroid*, vol. 9, pp. 563-567, 1999), 그리고 이외에도 만성 골수성 백혈병(Janssen et al., *Oncogene*, vol. 6, pp. 2113-2120, 1991; Braunger et al., *Oncogene*, vol. 14, pp. 2619-2631 1997; O'Bryan et al., *Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, pp. 5016-5031, 1991), 급성 골수성 백혈병(Rochlitz et al., *Leukemia*, vol. 13, pp. 1352-1358, 1999), 골육종(Nakano et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 270, pp. 5702-5705, 2003), 흑색종(van Ginkel et al., *Cancer Res.*, vol. 64, pp. 128-134, 2004), 및 두경부 편평세포 암종(Green et al., *Br J. Cancer.*, vol. 94, pp. 1446-5, 2006)에서 Ax1가 과발현되는 것이 입증되었다

[0005] 최근들어, 포스포티로신 신호전달 프로파일링을 통하여 NSCLC의 원발성 종양 중 약 5%에서 활성화된 Ax1이 확인되었다(Rikova et al., *Cell*, vol. 131, pp. 1190-1203, 2007). Ax1 발현은 표적 화학요법 약물에 의해 유도되는데, 약물 유도된 Ax1 발현은 급성 골수성 백혈병에서 화학요법에 대한 내성을 부여할뿐만 아니라(Hong et al., *Cancer Letters*, vol. 268, pp. 314-324, 2008), 위장관 기저 종양(Mehadevan, et al., *Oncogene*, vol. 26, pp.3909-3919, 2007) 및 유방암(Liu et al., *Cancer Research*, vol. 281, pp. 6871-6878, 2009)에서 각각 이마티닙과 라파티닙/허셉틴에 대한 내성을 부여한다.

[0006] 더욱이 Ax1은 비침습성 세포에서와 비교되었을 때 공격적 유방암 세포주에서 상향조절되는 것으로 보아, 이 Ax1은 종양의 전이와 관련되어 있는 것으로 확인되었다. 시험관 내에서, Ax1 활성화는 이동과 침습에 필요한 것으로 확인되었으며, 이러한 활성화는 항체 치료에 의해 억제될 수 있었다(WO 04/008147). 이와 유사하게, Ax1 활성화는 Ax1의 지배적 음성 형태의 발현을 통하거나(Vajkoczy, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A.*, vol. 103, pp. 5799-5804, 2005) 아니면 Ax1의 siRNA 매개 하향조절에 의해 생체 내에서 발휘되지 않으면, 쥐 이종 이식 실험에 있어서 피하 및 정위 세포 성장이 억제되었다.

[0007] 그러므로 항 Ax1 모노클로날 항체가 암 치료에 사용되는 것으로 기술되었다. 예를 들어 항 Ax1 항체에 관한 공보들로서는 WO 2009/063965, WO 2009/062690, WO 2011/014457, US 2014/0227283 및 미국 특허 제8,853,369호를 포함한다. US 2014/0227283은, 모노클로날 항-Ax1 항체와, 진단 방법과 치료 방법에 있어서 이 항체의 용도를 개시하고 있다. WO 2009/062690은, Ax1 단백질의 세포 외 도메인에 결합하여, Ax1 활성을 적어도 부분적으로나마 억제할 수 있는 항체를 개시하고 있다.

[0008] 이러한 모노클로날 항 Ax1 항체는 환자의 신체 중 임의의 위치, 예컨대 항체가 치료하고자 하는 위치로서 종양이 존재하는 위치에서 유사한 친화성으로 Ax1과 결합할 것이다. 비 종양 환경에서의 이러한 항체와 Ax1의 결합은, 이와 같은 환경에 있어 Ax1의 정상 기능 발현에 부정적인 영향을 미칠 것으로 예상되므로, 유의미한 부작용을 일으킬 수 있다. 본 발명은 종양 미세환경에서의 Ax1과의 결합 친화성이 비 종양 환경에서의 Ax1과의 결합 친화성에 비하여 더 큰, 조건부 활성화 항 Ax1 항체와 항체 단편을 제공한다. 본 발명의 항 Ax1 항체와 항체 단편은 당 분야에 공지된 모노클로날 항 Ax1 항체에 비하여 항암 효능이 거의 동일하거나 더 크면서 부작용은 감소하였을 것으로 예상된다. 이는 또한 항 Ax1 항체 및 항체 단편의 더 많은 투여량의 투여와 더욱 빈번한 횟수의 치료를 허용하여, 더욱 효과적인 치료 선택권을 제공할 수 있게 해준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0009] 하나의 양태에서, 본 발명은 Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는 항 Ax1 항체로서, 상기 항체는 서열 번호 11 내지 서열 번호 13의 서열들로부터 선택되는 DNA 서열에 의해 암호화되는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 7 내지 서열 번호 10의 서열들로부터 선택되는 DNA 서열에 의해 암호화되는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 항체는 종양 미세환경에 조성되는 어느 조건하 어느 변인 값에서의 Ax1 단백질에 대한 결합 친화성이, 비 종양 미세환경에 조성되는 동일 조건하 상이한 변인 값에서의 Ax1 단백질에 대한 결합 친화성에 비하여 더 큰, 항체를 제공한다.
- [0010] 상기 조건은 pH인 항체일 수 있다.
- [0011] 상기 종양 미세환경 pH는 5.8 내지 7.0의 범위이고, 비 종양 미세환경 pH는 7.2 내지 7.8의 범위인 항체일 수 있다.
- [0012] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 의해 암호화되고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 9에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0013] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 10에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0014] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0015] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0016] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 13에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 7에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0017] 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호 12에 의해 암호화되고, 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 8에 의해 암호화되는 항체일 수 있다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 상기 항체를 포함하는 면역 접합체를 제공한다.
- [0019] 상기 면역접합체는 화학요법제, 방사성 원자, 세포증식억제제 제제 및 세포독성 제제로부터 선택되는 제제 적어도 하나를 포함하는 면역접합체일 수 있다.
- [0020] 상기 제제 적어도 2개를 포함하는 면역접합체일 수 있다.
- [0021] 상기 항체 및 적어도 하나의 제제가 링커 분자에 공유 결합되어 있는 면역접합체일 수 있다.
- [0022] 상기 적어도 하나의 제제는 메이탄시노이드, 오리스타틴, 둘라스타틴, 칼리키아미신, 피롤로벤조디아제핀 및 안트라사이클린으로부터 선택되는 면역접합체일 수 있다.
- [0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 항체 또는 상기 면역접합체; 그리고
- [0024] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 항체 또는 면역접합체는 암 치료용인 약학 조성물일 수 있다.
- [0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 진단 또는 치료를 위한 키트로서, 상기 키트는 항체, 면역접합체와, 항체 또는 항체 단편, 면역접합체 및/또는 약학 조성물을 진단 또는 치료를 위해 사용하는 것에 관한 지시사항을 포함하는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1a 및 도 1b는, 본 발명의 항 Ax1 항체의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 각각의 서열 정렬을 보여주는 것이다.
- 도 2는 Ax1의 세포 외 도메인에 대한 본 발명의 다양한 조건부 활성 항체의, pH 6.0 및 pH 7.4에서의 결합능 (OD450)을 보여주는 것이다. 이 조건부 활성 항체는 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 활성이 더욱 크다.
- 도 3은 Ax1의 세포 외 도메인에 대한 본 발명의 다양한 조건부 활성 항체의 선택성을 보여주는 것이다. 선택성은 pH 6.0에서 결합 파트너와의 결합 친화성 대 pH 7.4에서 동일한 결합 파트너와의 결합 친화성의 비율로서 측

정되었다.

도 4는 실시예 1에 기술된 바와 같이, 본 발명의 조건부 활성 항체가 응집하지 않음을 나타내는 크기별 배제 크로마토그래프를 보여주는 것이다.

도 5는 실시예 1에 기술된 바와 같이, ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같은 열 충격 이전과 이후의 본 발명의 조건부 활성 항체의 열안정성을 보여주는 것이다.

도 6a 및 도 6b는, 실시예 1의 SPR 검정에 의해 측정된 바와 같은, 본 발명의 조건부 활성 항체의 선택성을 보여주는 것이다.

도 7은 KREBS 완충제 내에서의, Ax1과 본 발명의 항 Ax1 항체의 결합에 관한 pH 의존적 결합 프로필을 보여주는 것이다.

도 8a 내지 도 8e는, A549 세포를 이용한 또 다른 세포 사멸 연구의 결과를 보여주는 것인데, 여기서 본 발명의 항 Ax1 항체는 pH 6.0 및 pH 7.4에서, 상이한 항체 농도로 세포 사멸에 사용되었다.

도 9a 내지 도 9d는, 상이한 완충제 및 상이한 pH 수준에서 본 발명의 항 Ax1 항체에 대한 인간 Ax1 및 사이노몰거스 Ax1의 결합 친화성을 보여주는 것이다.

도 10a 내지 도 10h는, 듀오마이신에 접합되었던 본 발명의 항 Ax1 항체에 의한, 상이한 pH 수준에서의 상이한 세포주의 세포 사멸을 보여주는 것이다.

도 11은, 겐시타빈에 접합되었던 본 발명의 항 Ax1 항체에 의한, 상이한 pH 수준에서의 A549 세포의 세포 사멸을 보여주는 것이다.

도 12는, 이중 이식된 마우스를 듀오마이신이 접합된 본 발명의 항 Ax1 항체로 처리하였을 때 이 처리가 종양 부피에 미치는 효과를 보여주는 것이다.

도 13a 및 도 13b는, 접합체 주사 후 시간이 경과함에 따라 사이노몰거스 원숭이 혈액 중 본 발명의 듀오마이신 접합 항 Ax1 항체가 존재하는 것이 확인되었음을 보여주는 것이다.

도 14a는, 접합체 주사 직전 3일(주사 전 D-3)로부터 시작하여 주사 후 3일(주사 후 D3)에 이르기까지 시간이 경과함에 따라 사이노몰거스 원숭이 혈액 중 아스파르테이트 트랜스아미나아제(AST)가 존재하는 것이 확인되었음을 보여주는 것이다.

도 14b는, 접합체 주사 직전 3일(주사 전 D-3)로부터 시작하여 주사 후 3일(주사 후 D3)에 이르기까지 시간이 경과함에 따라 사이노몰거스 원숭이 혈액 중 알라닌 아스파르테이트 트랜스아미나아제(ALT)가 존재하는 것이 확인되었음을 보여주는 것이다.

도 15는, 접합체 주사 후 시간이 경과함에 따라 사이노몰거스 원숭이 혈액 중 림프구 수를 보여주는 것이다.

도 16a 및 도 16b는, LCLC103H와 DU145를 각각 투여받은 마우스의 생체 내 치료 결과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본원에 제공된 실시예들의 이해를 돕기 위하여 종종 보이는 임의의 용어들을 본원에 정의하여 두었다.

측정된 양과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 "약"이란 용어는, 측정을 실시하고 측정의 목적과 이때 사용된 측정 장비의 정밀도에 부합하는 수준의 주의가 가하여질 때 당 업자에 의해 예상될 양의 측정치에서의 정상 변차를 지칭하는 것이다. 달리 명시되지 않는 한, "약"은 제공된 값의 +/- 10%만큼의 변차를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 "친화성"이란 용어는, 어떤 분자(예컨대 항체)의 단일 결합 부위와 이 분자의 결합 파트너(예컨대 항원) 사이의 비공유성 상호작용 총 합을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화성"은, 결합쌍의 일원들(예컨대 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내재성 결합 친화성을 지칭한다. 분자 X의, 이 자체의 파트너 Y에 대한 친화성은, 일반적으로 해리 상수(Kd)에 의해 표현될 수 있다. 친화성은 당 분야에 공지된 통상적인 방법, 예컨대 본원에 기술된 방법들에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화성을 측정하기 위한 특정의 예시적이고 전형적인 구현에는 이하에 기술되어 있다.

"성숙한 친화성"이란 용어가 항체와 관련하여 사용될 때, 이 용어는 항체 또는 항체 단편이, 하나 이상의 변경,

즉 항체 또는 항체 단편의 항원에 대한 친화성의 개선을 초래하는 변경을 보유하지 않는 모 항체 또는 항체 단편의 경우에 비하여, 이와 같은 변경을 하나 이상의 초가변 영역(HVR)에 보유하는 경우를 지칭한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은 "아미노산"이란 용어는, 아미노기($-\text{NH}_2$) 및 카복실기($-\text{COOH}$)를, 바람직하게 유리기로서, 또는 대안적으로 축합 후 펩티드 결합의 일부로서 함유하는 임의의 유기 화합물을 지칭한다. "20개의 자연 암호화 폴리펩티드 생성 알파 아미노산"이란, 알라닌(ala 또는 A), 아르기닌(arg 또는 R), 아스파라긴(asn 또는 N), 아스파르트산(asp 또는 D), 시스테인(cys 또는 C), 글루탐산(glu 또는 E), 글루타민(gln 또는 Q), 글리신(gly 또는 G), 히스티딘(his 또는 H), 이소류신(ile 또는 I), 류신(leu 또는 L), 리신(lys 또는 K), 메티오닌(met 또는 M), 페닐알라닌(phe 또는 F), 프롤린(pro 또는 P), 세린(ser 또는 S), 트레오닌(thr 또는 T), 트립토판(trp 또는 W), 티로신(tyr 또는 Y) 및 발린(val 또는 V)을 지칭하는 것으로 당 분야에서 이해되고 있다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은 "혈관신생억제제"란 용어는, 혈관의 발달을 어느 정도 차단하거나 방해하는 화합물을 지칭한다. 혈관신생억제제는, 예컨대 혈관신생 촉진에 관여하는 성장 인자 또는 성장 인자 수용체와 결합하는 소형 분자 또는 항체일 수 있다. 일 구현예에서, 혈관신생억제제는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)와 결합하는 항체 또는 항체 단편, 예컨대 베바시주맵(AVASTIN®)이다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같은 "항체 단편"이란 용어는, 비변형(intact) 항체와 결합하는 항원과 결합하는, 비변형 항체의 일부를 포함하는 비변형 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예들로서는 Fv, Fab, Fab', Fab''-SH, F(ab')₂; 다이아바디; 선형 항체; 단쇄 항체 분자(예컨대 scFv)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 항체의 원인이 된 항원(예컨대 폴리펩티드 항원)과 선택적으로 결합하는 능력을 어느 정도 보유하는 이러한 항체 단편은 당 분야에 널리 공지된 방법을 사용함으로써 제조될 수 있다(예컨대 문헌(Harlow and Lane, 상동) 참조).

[0036] 본원에 사용된 바와 같은 "항체"란 용어는, 비변형 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체 또는 항체 단편은 면역 친화성 크로마토그래피에 의하여 예비 양만큼의 항원을 분리하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체 또는 항체 단편의 기타 다양한 용도로서는 질환(예컨대 신생물형성)을 진단하고/진단하거나 병기를 확인하는 것, 그리고 질환, 예컨대 신생물형성, 자가면역성 질환, AIDS, 심혈관질환 및 감염 등을 치료하기 위한 치료적 응용이 있다. 키메라, 인간 유사, 인간화 또는 완전 인간 항체 또는 항체 단편이 인간 환자에의 투여에 특히 유용하다.

[0037] Fab 단편은 항체 분자의 1가 항원 결합 단편으로 이루어져 있으며, 비변형 경쇄와 중쇄 일부로 이루어진 단편이 획득되도록 파쇄된 효소로 전 항체 분자를 분해하여 제조될 수 있다.

[0038] 항체 분자의 Fab' 단편은 비변형 경쇄와 중쇄 일부로 이루어진 분자가 획득되도록 펩신으로 전 항체 분자를 처리한 다음 환원시켜 제조될 수 있다. 이러한 방식으로 처리된 항체 분자당 Fab' 단편 2개가 획득된다.

[0039] 항체의 (Fab')₂ 단편은 펩신 효소로 전 항체 분자를 처리하되, 이후 환원 과정 없이 제조될 수 있다. (Fab')₂ 단편은 2개의 이황화 결합에 의해 Fab' 단편 2개가 서로 연결된 이량체이다.

[0040] Fv 단편은, 2개의 사슬로 발현되는 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역을 함유하는, 유전자 조작된 단편으로서 정의된다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 "항 Ax1 항체", "항 Ax1 항체 단편" 및 "Ax1에 결합하는 항체 또는 항체 단편"이란 용어는, Ax1을 표적화함에 있어서 항체 또는 항체 단편이 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화성으로 Ax1과 결합할 수 있는 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 일 구현예에서, 예컨대 방사성면역검정법(RIA)에 의해 측정되는 바에 의하면, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 비관련 비 Ax1 단백질과 결합하는 정도는, 항체 또는 항체 단편이 Ax1과 결합하는 정도의 약 10% 미만이다. 임의의 구현예들에서, Ax1과 결합하는 항체 또는 항체 단편의 해리 상수(Kd)는 1 μM , $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ 이다(예컨대 10^{-8} M 이하, 또는 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 또는 10^{-9} M 내지 10^{-13} M 이다). 임의의 구현예들에서, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 상이한 종들로부터 유래하는 Ax1들 사이에 보존되는 Ax1 에피토프와 결합한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "혈관신생질환"이란 용어는 비 신생물형성 및 신생물형성 병태를 포함하여 혈관신생의 임의의 조절장애를 지칭한다. 신생물형성 병태는 이하에 기술된 병태들(예컨대 "암" 참조)을 포함하나, 그에 한정되는 것은 아니다. 비 신생물형성 장애는 원치않거나 비정상적인 비대증, 관절염, 류머티즘성 관절염(RA), 건선, 건선 플라크(psoriatic plaque), 유육종증, 족상경화증, 족상경화증 플라크, 당뇨병 및 기타 증식성 망막병증, 예컨대 미숙아 망막병증, 후 수정체 섬유증식증, 혈관신생성 녹내장, 노인성 황반변성증, 당뇨병성 황반부

중, 각막혈관신생, 각막이식혈관신생, 각막이식거부, 망막/맥락막 혈관신생, 우각 혈관신생(홍조), 안 혈관신생 질환, 혈관계협착, 동정맥기형(AVM), 뇌수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상샘 이상증식증(그레이브스병 포함), 각막 및 기타 조직의 이식, 만성 염증, 폐렴, 급성 폐손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐삼출, (예컨대 급성 졸중/폐쇄성 두부 손상/외상과 연관된) 뇌부종, 활액막 염증, RA에 있어서 판누스 생성, 골화성근염, 비대성 골 형성증, 골관절염(OA), 난치성 복수, 다낭성난소 질환, 자궁내막증, 제3의 공간성 유체 질환(3rd spacing of fluid disease)(체장염, 구획증후군, 화상, 장 질환), 자궁근섬유종, 조산, 만성 염증, 예컨대 IBD(크론병 및 궤양성 대장염), 신장의 동종이식거부반응, 염증성 장 질환, 신증후군, 원치않거나 비정상적인 조직 군성장(tissue mass growth)(비압성), 혈우병성 관절, 비대성 흉터, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버 증후군, 화농성육아종미숙아망막병증, 피부경화증, 트라코마, 혈관유착(vascular adhesion), 활액막염, 피부염, 전자간 증, 복수, 심막삼출(예컨대 심막염과 연관된 심막삼출) 그리고 흉막삼출을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같은 "혈관신생"이란 용어는, 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관, 구체적으로 신생 종양 지원 혈관(이에 한정되는 것은 아님)이 성장하는데 기여하는, Ax1이 수반되는 모든 과정을 지칭한다. 이러한 과정 으로서는, 다수의 세포 내 현상들, 예컨대 혈관 내피 세포의 증식, 생존, 이동 및 발아(sprouting), 혈관주위세포의 유인 및 이동뿐만 아니라, 혈관 안정화를 위한 기저막 형성, 혈관 관류, 또는 기질세포 또는 신생물 세포에 의한 혈관신생인자의 분비를 포함하고, 이러한 과정은 바람직하게 Ax1 인산화 및/또는 Ax1 매개 신호 전달을 비롯하여 Ax1의 비 촉매 활성화 또는 촉매 활성화에 의해 자극 또는 매개될 것이다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같은 "Ax1"이란 용어는, 달리 명시되지 않는 한, 포유동물, 예컨대 영장류(예컨대 인간) 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 기원의 임의의 원산 Ax1을 지칭한다. 이 용어는 "전장" 미가공 Ax1뿐만 아니라, 세포 내 가공으로부터 유래하는 Ax1의 임의의 형태를 포함한다. 이 용어는, 또한 Ax1의 자연 발생 변이체, 예컨대 스플라이싱(splicing)된 변이체 또는 대립형질 변이체를 포함한다. 인간 Ax1의 아미노산 서열은 당 분야에 널리 공지되어 있으며, GenBank와 같은 공공의 데이터베이스로부터 입수 가능하다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같은 "Ax1 활성화"란 용어는, Ax1 수용체의 활성화 또는 인산화를 지칭한다. 일반적으로 Ax1 활성화는 (예컨대 Ax1 또는 기질 폴리펩티드 내 티로신 잔기들을 인산화하는, Ax1 수용체 중 세포 내 키나아제 도메인에 의해 유발되는) 신호 전달을 초래한다. Ax1 활성화는 관심 Ax1 수용체와 Ax1 리간드(Gas6)의 결합에 의해 매개될 수 있다. Ax1과 Gas6의 결합은, Ax1의 키나아제 도메인을 활성화할 수 있고, 이로써 Ax1 내 티로신 잔기들의 인산화 및/또는 추가 기질 폴리펩티드(들) 내 티로신 잔기들의 인산화가 초래된다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같은 "Ax1 매개 항 세포자멸"이란 용어는, 인간 세포, 바람직하게 인간 암세포(이에 한정되는 것은 아님)가, 프로그래밍된 세포 사멸(세포자멸)되지 않도록 막아주는, Ax1이 수반되는 모든 과정들을 지칭한다. 구체적으로 이는 인간 세포, 바람직하게 인간 암세포(이에 한정되는 것은 아님)에서, 성장 인자 회수, 저 산소, 화학요법제 또는 방사선에의 노출을 통한 세포자멸 유도나, Fas/Apo-1 수용체 매개 신호전달의 개시가 일어나는 것을 막아주고, Ax1의 비촉매 활성화 또는 촉매 활성화, 바람직하게, 예를 들어 Ax1 인산화 및/또는 Ax1 매개성 신호 전달에 의해 자극 또는 매개되는 과정을 지칭한다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같은 "결합"이란 용어는, 항체의 가변 영역 또는 Fv와 항원의 상호작용으로서, 특정 구조 (예컨대 항원 결정기 또는 에피토프)의 항원상 존재에 의존적인 상호작용을 지칭한다. 예를 들어 항체 가변 영역 또는 Fv는 보통의 단백질이 아닌, 특이적인 단백질 구조를 인지하여 이에 결합한다. 본원에 사용된 바와 같은 "특이적으로 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이란 용어는, 항체 가변 영역 또는 Fv가 다른 단백질 보다 특 정의 항원과 더 큰 친화성으로 그리고/또는 더 오랜 지속기간 동안 더욱 빈번하게, 그리고 더욱 신속하게 결합 또는 회합함을 의미한다. 예를 들어 항체 가변 영역 또는 Fv는 다른 항원과의 경우보다 더 큰 친화성, 더욱 큰 결합활성으로, 더욱 용이하게 그리고/또는 다른 항원과 결합하는 지속기간보다 더 오랜 지속기간 동안 자체의 항원과 특이적으로 결합한다. 또 다른 예를 들면, 항체 가변 영역 또는 Fv는, 이것이 관련 단백질 또는 기타 세포 표면 단백질이나, 다반응성 자연 항체(즉 인간에서 자연상 발견되는 다양한 항원과 결합하는 것으로 공지된 자연 발생 항체)에 의해 통상 인지되는 항원과 결합할 때보다 실질적으로 더 큰 친화성으로 세포 표면 단백질 (항원)과 결합한다. 그러나 "특이적으로 결합"은, "선택적 결합"이라는 용어가 의미하는 다른 항원과의 배타적 결합 또는 검출 불가능한 결합을 반드시 필요로 하는 것은 아니다. 일례에서, 항체 가변 영역 또는 Fv(또는 기타 결합 영역)의 "특이적 결합"은 항원과의 결합으로서, 항체 가변 영역 또는 Fv가 항원과 평형 상수(KD) 100 nM 이하, 예컨대 50 nM 이하, 예컨대 20 nM 이하, 예컨대 15 nM 이하, 또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하로 결합함을 의미한다.

- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 "암" 및 "암성"이란 용어는, 통상 조절되지 않는 세포 성장/증식에 의해 특징지어지는, 포유동물의 생리적 병태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예로서는 암종, 림프종(예컨대 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 아세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 암에 관한 더욱 구체적인 예로서는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 신경교종, 자궁암, 난소암, 간의 암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 암종 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 콩팥암, 간의 암, 전립선암, 외음부암, 갑상샘암, 간 암종, 백혈병 및 기타 림프구증식성 장애, 그리고 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같은 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"란 용어는, 비정상 세포 증식과 어느 정도 연관된 장애를 지칭한다. 일 구현예에서, 세포 증식성 장애는 암이다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같은 "화학요법제"란 용어는, 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예들로서는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN®); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸로멜라민; 아세트게닌(구체적으로 볼라타신 및 볼라타시논); 델타-9-테트라하이드로칸나비놀(드로나비놀, MARINOL®); 베타-라파론; 라파롤; 콜히친; 베톨린산; 캄프토테신(합성 유사체인 토포페칸(HYCAMTIN®), CPT-11(이리노테칸, CAMPTOSAR®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신(구체적으로 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코이딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라머스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 염화수소산염, 멜파란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니머스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카머스틴, 클로로조토신, 포테머스틴, 로머스틴, 니머스틴 및 라님너스틴; 항생제, 예컨대 에네다인 항생제(예컨대 칼리키아미신, 특히 칼리키아미신 감마II 및 칼리키아미신 오메가II(예컨대 문헌(Nicolaou et al., Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)) 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 다이네미신, 예컨대 다이네미신 A; 에스페라미신; 그리고 네오키르지노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네다인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캇티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 도노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루신, 독소루비신(예컨대 ADRIAMYCIN®, 모폴리노-독소루비신, 시아노모폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포좀 주사제(DOXIL®), 리포좀 독소루비신 TLC D-99(MYOCET®), 페그화 리포좀 독소루비신(CAELYX®) 및 데옥시독소루비신), 그리고 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질, 예컨대 메토트렉세이트, 겐시타빈(GEMZAR®), 테가파(UFTORAL®), 카페시타빈(XELODA®), 에포틸론, 그리고 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모피, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산(frolic acid); 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비잔트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘로르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토잔트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로소잔트론; 2-에틸히드라지드; 프로카바진; PSK® 다당 복합체(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아조산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신(ELDISINE®, FILDESIN®); 다카르바진; 만노머스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예컨대 파클리탁셀(TAXOL®), 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제(ABRAXANE™) 및 도세탁셀(TAXOTERE®); 클로람부실; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 제제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴(예컨대 ELOXATIN®) 및 카르보플라틴; 튜블린 중합으로 인해 미세소관이 형성되는 것을 막아주는 반가, 예컨대 빈블라스틴(VELBAN®), 빈크리스틴(ONCOVIN®), 빈데신(ELDISINE®,

FILDESIN®), 그리고 비노렐빈(NAVELBINE®); 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토잔트론; 루코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 도노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라아제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMF®); 레티노이드, 예컨대 레티노산, 예컨대 백사로텐(TARGRETIN®); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트(예컨대 BONEFOS® 또는 OSTAC®), 에티드로네이트(DIDROCAL®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트(ZOMETA®), 알렌드로네이트(FOSAMAX®), 파미드로네이트(AREDIA®), 킬루드로네이트(SKELID®) 또는 리세드로네이트(ACTONEL®); 트록사시타빈(1,3-디록솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 구체적으로 비정상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로에서 유전자 발현을 억제하는 것, 예컨대 PKC-알파, Raf, H-Ras, 그리고 상피 성장 인자 수용체(EGF-R); 백신, 예컨대 THERATOPE® 백신 및 유전자 치료용 백신, 예컨대 ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신 및 VAXID® 백신; 토포이소머라아제 1 억제제(예컨대 LURTOTECAN®); rmrh(예컨대 ABARELIX®); BAY439006(소라페닙; Bayer); SU-11248(수니티닙, SUTENT®, Pfizer); 페리포신, COX-2 억제제(예컨대 셀레코시브 또는 에토리코시브), 프로테오솜 억제제(예컨대 PS341); 보르테오미드(VELCADE®); CCI-779; 티피파르닙(R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 나트륨(GENASSENSE®); 픽산트론; EGFR 억제제(이하 정의 참조); 티로신 키나아제 억제제(이하 정의 참조); 세린-트레오닌 키나아제 억제제, 예컨대 라파마이신(시롤리무스, RAPAMUNE®); 파르네실트랜스퍼라아제 억제제, 예컨대 로나파르닙(SCH 6636, SARASAR™); 그리고 상기 것들 중 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체; 그리고 상기 것들 중 2개 이상의 조합, 예컨대 CHOP(사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론 병용 요법의 약자); 그리고 FOLFOX(5-FU 및 루코보린과 함께 옥살리플라틴(ELOXATIN™)이 사용되는 치료 계획의 약자)를 포함한다.

[0051] 본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는, 암 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 영향을 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 역할을 하는 "항호르몬제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이 화학요법제는 다음과 같은 호르몬 자체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다: 효현제/길항제 프로필을 조합하여 보이는 항에스트로겐제, 예컨대 타목시펜(NOLVADEX®), 4-하이드록시타목시펜, 토레미펜(FARESTON®), 이독시펜, 드롤록시펜, 칼록시펜(EVISTA®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 그리고 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM), 예컨대 SERM3; 효현제 특성을 보이지 않는 순수한 항에스트로겐제, 예컨대 풀베스트란트(FASLODEX®) 및 EM800(이러한 제제는 에스트로겐 수용체(ER) 이량체화를 차단할 수 있고, DNA 결합을 억제할 수 있으며, ER 전환율(turnover)을 증가시킬 수 있고/있으며 ER 수준을 저하시킬 수 있음); 아로마타아제 억제제, 예컨대 스테로이드성 아로마타아제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄(AROMASIN®), 그리고 비스테로이드성 아로마타아제 억제제, 예컨대 아나스트라졸(ARIMIDEX®), 레트로졸(FEMARA®) 및 아미노글루테티미드, 그리고 기타 아로마타아제 억제제. 또한 기타 아로마타아제 억제제는 보로졸(RIVISOR®), 메게스트롤 아세테이트(MEGASE®), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체형성호르몬 방출 호르몬 효현제, 예컨대 루프롤리드(LUPRON® 및 ELIGARD®), 고세렐린, 부세렐린 및 트리프테렐린; 성 스테로이드, 예컨대 프로게스테론, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 그리고 안드로젠/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스테티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론제; 에스트로겐 수용체 하향 조절제(ERD); 항안드로겐제, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 그리고 상기 것들 중 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체; 그리고 상기 것들 중 2종 이상의 조합을 포함한다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라" 항체라는 용어는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정의 공급원 또는 종으로부터 유래하는 한편, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래하는 항체를 지칭한다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 항체의 "군(class)"이란 용어는, 항체 중쇄가 가지고 있는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 항체에는 5개의 주요 군, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이것들 중 몇몇은 하위 군(이소타입), 예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 세분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 군들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라 칭하여진다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같은 "조건부 활성 항체" 및 "조건부 활성 항체 단편"이란 용어는, 비 종양 미세환경의 어느 조건에서의 어느 변인 값에 비하여 종양 미세환경의 동일한 조건에서의 상이한 변인 값에서 더욱 활성인 항체 또는 항체 단편을 지칭한다. 종양 미세환경 조건은, 비 종양 미세환경 조건에 비하여 더 낮은 pH, 더 높은 락테이트 및/또는 피루베이트 농도, 저산소, 더 낮은 글루코스 농도, 그리고 약간 높은 온도를 포함할 수 있다. 예를 들어 일 구현예에서, 조건부 활성 항체 또는 항체 단편은, 정상 체온에서는 실질적으로 비활성일 수 있지만, 종양 미세환경에서 마주할 수 있는 더 높은 체온에서는 활성일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 조건부 활성 항체 또는 항체 단편은 종양 미세환경에 조성될 수 있는, 산소공급이 덜 이루어지는 환경에서보다 산소공급이 정상적으로 이루어지는 혈액 중에서 활성이 더 작을 수 있다. 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 어떤 조건의 상이

한 변인 값에서 상이한 활성을 가지도록 촉발시킬 수 있는 조건으로서, 본 발명의 조건으로 이용되도록 선택될 수 있는 또 다른 조건이 당 업자에게 공지된 종양 미세환경에 조성된다.

[0055]

본원에 사용된 바와 같은 "구성적"이란 용어는, 예를 들어 Ax1 활성에 적용될 때 리간드나 기타 활성화 분자의 존재와는 독립적인 수용체 키나아제의 연속적 신호전달 활성을 지칭한다. 수용체 키나아제의 성질에 따라서, 모든 활성은 구성적일 수 있거나, 또는 수용체 활성은 다른 분자(예컨대 리간드)의 결합에 의해 추가로 활성화될 수 있다. 수용체 키나아제의 활성화를 유도하는 세포내 현상들은 당 업자들에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어 활성화는 고차원 수용체 복합체로의 올리고머화, 예컨대 이량체화, 삼량체화 등을 포함할 수 있다. 복합체는 단 백질 단일 종을 포함하는, 소위 호모머 복합체(homomeric complex)일 수 있다. 대안적으로 복합체는 상이한 단 백질 중 적어도 2개를 포함하는, 소위 헤테로머 복합체(heteromeric complex)일 수 있다. 복합체 형성은, 예를 들어 세포 표면상 수용체의 정상 형태 또는 돌연변이 형태의 과발현에 의해 유발될 수 있다. 복합체 형성은 또한 수용체 내 특정 돌연변이 또는 돌연변이들에 의해 유발될 수도 있다.

[0056]

본원에 사용된 바와 같은 "세포증식억제성 제제"란 용어는, 시험관 내 또는 생체 내에서 세포 성장을 정지시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 그러므로 세포증식억제성 제제는 S기 세포의 백분율을 유의미하게 줄이는 것일 수 있다. 세포증식억제성 제제의 추가 예들로서는, G0/G1 정지 또는 M기 정지를 유도함으로써 세포 주기의 진행을 차단하는 제제를 포함한다. 인간화 항Her2 항체인 트라스투주맙(HERCEPTIN®)은 G0/G1 정지를 유도하는 세포증식억제성 제제의 일례이다. 고전적인 M기 차단제로서는 빈카(빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산 및 토포이소머라아제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 도노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 임의의 제제, 예컨대 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토틱세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 또한 S기 정지까지 유도할 수 있다. 추가의 정보는 문헌(Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), e.g., p. 13)에서 살펴볼 수 있다. 타산(파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목(yew tree)으로부터 유래하는 항암 약물이다. 서양 주목 유래 도세탁셀(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세소관 조립을 촉진하고, 세포 내 유사분열 억제제를 초래하는 탈중합을 억제함으로써 미세소관을 안정화한다.

[0057]

본원에 사용된 바와 같은 "세포독성 제제"란 용어는, 세포 기능을 억제하거나 막고/막거나 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 세포독성 제제는 방사성 동위원소(예컨대 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학요법제 또는 약물(예컨대 메토틱세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜파란, 미토마이신 C, 클로람부실, 도노루비신 또는 기타 끼어들기 약물); 성장 억제제; 효소 및 이의 단편, 예컨대 핵산분해효소; 항생제; 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 효소활성 독소(이것들의 단편 및/또는 변이체 포함); 그리고 이하 개시된 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058]

본원에 사용된 바와 같은 "다이하바디"란 용어는, 항원 결합 부위를 2개 가지는 것으로서, 중쇄 가변 도메인(V_H)이 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결되어 동일 폴리펩티드 사슬(V_H - V_L)로서 포함되어 있는 소형 항체 단편을 지칭한다. 동일 사슬 상 2개의 도메인 사이에 짝형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커가 사용됨에 따라 도메인들은 다른 사슬의 상보성 도메인들과 강제로 짝을 형성하게 되고, 그 결과 항원 결합 부위 2개가 형성된다.

[0059]

본원에 사용된 바와 같은 "검출 가능 표지"란 용어는, 물리적 수단이나 화학적 수단에 의한 직접적이거나 간접적인 검출 또는 측정이 시료 중 CTC 존재에 대한 지표인 임의의 물질을 지칭한다. 유용한 검출 가능 표지의 대표적인 예들로서는 흡광, 형광, 반사, 광 산란, 인광 또는 발광 특성을 기반으로 직접적으로나 간접적으로 검출 가능한 분자 또는 이온; 자체의 방사성 특성에 의해 검출 가능한 분자 또는 이온; 자체의 핵자기공명 특성 또는 상자 특성에 의해 검출 가능한 분자 또는 이온을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적당한 기질을, 예컨대 비흡광성 분자에서 흡광성 분자로, 또는 비형광성 분자에서 형광성 분자로 전환시키는 다양한 효소가 흡광성 또는 형광성을 기반으로 간접적 검출이 가능한 분자 군들에 포함된다.

[0060]

본원에 사용된 바와 같은 "진단"이라는 용어는, 대상체의 어떤 질환이나 장애에 대한 감수성을 측정하는 것, 대상체가 현재 어떤 질환이나 장애를 앓고 있는지 여부를 측정하는 것, 어떤 질환이나 장애를 앓고 있는 어떤 대상체를 예측하는 것(예컨대 전이 전(pre-metastatic)이거나 전이된 암 상태, 암의 병기 또는 치료법에 대한 암의 반응성을 확인하는 것), 그리고 테라메트릭(therametric)(예컨대 치료법의 효능 또는 효과에 관한 정보를 제

공하기 위해 대상체의 병태를 모니터링하는 것)을 지칭한다. 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 진단 방법은 초기 암 검출에 특히 유용하다.

- [0061] 본원에 사용된 바와 같은 "진단제"란 용어는, 직접적으로나 간접적으로 검출될 수 있으며, 진단용으로 사용되는 분자를 지칭한다. 진단제는 대상체나 시료에 투여될 수 있다. 진단제는 그 자체로서 제공될 수 있거나, 조건부 활성 항체와 같은 비이클에 접합될 수 있다.
- [0062] 본원에 사용된 바와 같은 "효과기 기능"이란 용어는, 항체의 Fc 영역에 귀속할 수 있으며, 항체의 이소타입에 따라 가변적인 생물 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예들로서는 C1q 결합 및 보체 의존적 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예컨대 B 세포 수용체)의 하향 조절; 그리고 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같은 어떤 제제, 예컨대 약학 제제의 "유효량"이란 용어는, 원하는 치료 결과 또는 예방 결과를 달성하는데 필요한 기간 동안 그러한 양으로 이와 같은 결과를 달성하는데 유효한 양을 지칭한다.
- [0064] 본원에 사용된 바와 같은 "Fc 영역"이란 용어는, 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. 이 용어는, 원산 서열 Fc 영역과 변이체 Fc 영역을 포함한다. 일 구현예에서, 인간의 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄 카복실 말단까지 확장되어 있다. 그러나 Fc 영역의 C-말단 리신(Lys447)은 존재할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 본원에 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역의 아미노산 잔기 번호매김은, 문헌(Kabat et al., sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)에 기술된 바와 같이 EU 번호매김 체계(EU 인텍스라고도 칭하여짐)에 따른다.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같은 "프레임워크" 또는 "FR"이란 용어는, 초가변 영역(중쇄의 HVR 또는 H1 ~ H3과 경쇄의 L1 ~ L3) 잔기를 제외한 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은, 일반적으로 4개의 FR 도메인, 즉 FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어져 있다. 그러므로 HVR 및 FR 서열은, 일반적으로 FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4와 같은 V_H (또는 V_L) 내 서열에 보인다.
- [0066] "전장 항체", "비변형 항체" 또는 "전 항체"란 용어는, 항원 결합 가변 영역(V_H 또는 V_L)뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 포함하는 항체를 지칭한다. 불변 도메인은 원산 서열 불변 도메인(예컨대 인간 원산 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 전장 항체는 상이한 "군"으로 분류될 수 있다. 전장 항체의 주요 군에는 5 가지가 있는데(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM), 이것들 중 몇몇은 "하위군"(이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 세분될 수 있다. 항체의 상이한 군에 상응하는 중쇄 불변 도메인들은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 칭하여진다. 면역글로불린의 상이한 군의 서브유닛 구조와 3차원 입체배열은 널리 공지되어 있다.
- [0067] 본원에 사용된 바와 같은 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양액"이란 용어는 호환되어 사용되는 것으로서, 외부 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손도 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는, 1차 형질전환된 세포와 계대배양의 회차수와는 관계없이 이로부터 기원하는 자손을 포함하는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함한다. 자손은 핵산 함량에 있어 모 세포와 완전히 동일할 수 없고, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원칙적으로 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택된 바와 동일한 기능 또는 생물 활성을 가지는 돌연변이 자손은 본원에 포함된다.
- [0068] 본원에 사용된 바와 같은 "인간 항체"란 용어는, 인간이나 인간 세포에 의해 생산되거나, 인간 항체 레파토리 또는 기타 인간 항체 암호화 서열을 이용하는 비 인간 공급원으로부터 유래하는 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 가지는 항체이다. 이와 같은 인간 항체에 관한 정의는, 특히 비 인간 항원 결합 잔기들을 포함하는 인간화 항체를 배제한다.
- [0069] 본원에 사용된 바와 같은 "인간 공통 프레임워크"란 용어는, 인간 면역글로불린 V_L 또는 V_H 프레임워크 서열 선택군에 있어 가장 일반적으로 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로 인간 면역글로불린 V_L 또는 V_H 서열의 선택군은 가변 도메인 서열들의 하위군으로부터 유래한다. 일반적으로 서열들의 하위군은 문헌(Kabat et al., sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3)에서와 같은 하위군이다. 일 구현예에서, V_L 의 경우 하위군은 문헌(Kabat et al., 상동)에서와 같이 하위군 카파 I이다. 일 구현예에서, V_H 의 경우 하위군은 문헌(Kabat et al.,

상동)에서와 같이 하위군 III이다.

- [0070] 본원에 사용된 바와 같은 "인간화" 항체란 용어는, 비 인간 HVR로부터 유래하는 아미노산 잔기들과, 인간 FR로부터 유래하는 아미노산 잔기들을 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 임의의 구현예들에서, 인간화 항체는 적어도 하나, 통상적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인데, 다만 여기서 HVR(예컨대 CDR) 모두 또는 실질적으로 모두는 비 인간 항체의 HVR에 상응하고, FR 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 항체의 FR에 상응한다. 인간화 항체는, 선택적으로 인간 항체로부터 유래하는 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 예컨대 비 인간 항체와 같은 항체의 "인간화된 형태"란, 인간화가 수행된 항체를 지칭한다.
- [0071] 본원에 사용된 바와 같은 "초가변 영역" 또는 "HVR"이란 용어는, 서열 내 초가변성이고/초가변성이거나 구조적으로 한정된 루프("초가변 루프")를 형성하는, 항체 가변 도메인의 영역들 각각을 지칭한다. 일반적으로 원산 4-사슬 항체는 HVR을 6개 포함하는데; 이 중 3개는 V_H 내에 있고(H1, H2, H3), 나머지 3개는 V_L 내에 있다(L1, L2, L3). HVR은, 일반적으로 초가변 루프 및/또는 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터 유래하는 아미노산 잔기들을 포함하는데, 이 중 "상보성 결정 영역"(CDR)으로부터 유래하는 아미노산 잔기는 가장 큰 서열 가변성을 보이고/보이거나 항원 인지에 관여한다. 예시적 초가변 루프는 26 ~ 32번(L1), 50 ~ 52번(L2), 91 ~ 96번(L3), 26 ~ 32번(H1), 53 ~ 55번(H2) 및 96 ~ 101(H3) 아미노산 잔기에서 발생한다(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, vol. 196, pp. 901-917 1987). 예시적 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은, L1의 24 ~ 34번, L2의 50 ~ 56번, L3의 89 ~ 97번, H1의 31 ~ 35번, H2의 50 ~ 65번, 그리고 H3의 95 ~ 102번 아미노산 잔기들에서 발생한다(Kabat et al., *sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991). V_H 의 CDR1을 제외하고, CDR은, 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기들을 포함한다. CDR은 또한 항원과 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR 또는 a-CDR이라고 칭하여지는 CDR의 영역 내에 함유되어 있다. 예시적 a-CDR(a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 31 ~ 34번, L2의 50 ~ 55번, L3의 89 ~ 96번, H1의 31 ~ 35번, H2의 50 ~ 58번, 그리고 H3의 95 ~ 102번 아미노산 잔기에서 발생한다(문헌(Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp.1619-1633, 2008)을 참조하시오). 달리 명시되지 않는 한, 가변 도메인 내 HVR 잔기와 기타 잔기(예컨대 FR 잔기)는 본원에서 문헌(Kabat et al., 상동)에 따라 번호가 매겨진다.
- [0072] 본원에 사용된 바와 같은 "면역접합체"란 용어는, 하나 이상의 이종 분자(들), 예컨대 세포독성 제제(이에 한정되는 것은 아님)에 접합된 항체이다.
- [0073] 본원에 사용된 바와 같은 "개체" 또는 "대상체"란 용어는, 포유동물을 지칭한다. 포유동물로서는 집에서 기르는 동물(예컨대 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예컨대 인간 및 인간 이외의 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류(예컨대 마우스 및 래트)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 임의의 구현예들에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같은 "세포 성장 또는 증식을 억제하는 것"이란 용어는, 세포 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100%까지 감소시키는 것을 의미하며, 이에 세포 사멸을 유도하는 것을 포함한다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같은 "분리된" 항체란 용어는, 그것이 속한 자연 환경의 한 성분으로부터 분리된 항체를 의미한다. 몇몇 구현예들에서, 항체는, 예를 들어 전기영동(예컨대 SDS-PAGE, 등전점 맞춤(isoelectric focusing; IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예컨대 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 측정되는 바에 따르면 95% 또는 99% 보다 높은 순도로 정제된다. 항체 순도 평가를 위한 방법을 참고하고자 한다면, 예컨대 문헌(Flatman et al., *J. Chromatogr. B*, vol. 848, pp. 79-87, 2007)을 참조한다.
- [0076] 본원에 사용된 바와 같은 "분리된" 핵산이란 용어는, 그것이 속한 자연 환경의 한 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 분리된 핵산은, 통상적으로 그 핵산 분자를 함유하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 해당 핵산 분자는 염색체 외부에 존재하거나, 그것의 자연 염색체상 자리와 상이한 염색체상 자리에 존재한다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같은 "항 Ax1 항체를 암호화하는, 분리된 핵산"이란 용어는, 항체의 중쇄 및 경쇄(또는 이것들의 단편)를 암호화하는 핵산 분자 하나 이상, 예컨대 단일 벡터 또는 별도 벡터들 내에 함유된 이러한 핵산 분자(들), 그리고 숙주 세포 내 하나 이상의 자리에 존재하는 이러한 핵산 분자(들)를 지칭한다.

- [0078] 본원에 사용된 바와 같은 "리간드 독립적"이란 용어는, 예를 들어 수용체 신호전달 활성화에 적용될 때, 그 신호 전달 활성이 리간드 존재에 의존적이지 않은 경우를 지칭한다. 리간드 독립적 키나아제 활성을 가지는 수용체는 반드시 키나아제 활성의 추가 활성화를 달성하기 위하여 이 수용체와 리간드의 결합을 불가능하게 만들어야 하는 것은 아닐 것이다.
- [0079] 본원에 사용된 바와 같은 "전이"란 용어는, 암세포가, 원발 종양으로부터 분산되어 림프관 및/또는 혈관으로 들어가서 혈류를 타고 순환하다가 체내 임의의 곳에 있는 정상 조직의 멀리 떨어진 지점에서 성장하는 것(전이)을 지원하는 모든 Ax1 수반 과정을 지칭한다. 구체적으로 전이란, 전이의 바탕을 이루고 Ax1의 비 촉매 활성 또는 촉매 활성, 바람직하게, 예컨대 Ax1 인산화 및/또는 Ax1 매개 신호 전달에 의해 자극 또는 매개되는, 종양 세포의 세포 내 현상, 예컨대 증식, 이동, 부착 비의존성(anchorage independence), 세포자멸의 회피 또는 혈관신생 인자의 분비를 지칭한다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같은 "미세환경"이란 용어는, 체내 어떤 영역들 또는 조직의 다른 영역들과의 차이, 즉 항상적이거나 일시적인 물리적 또는 화학적 차이를 보이는, 조직 또는 체내 임의의 부분 또는 영역을 의미한다. 종양에 대하여, 본원에 사용된 바와 같은 "종양 미세환경"이란 용어는, 종양이 존재하고, 종양내 비 세포성 구역이자 종양성 조직으로부터 바로 뻗어나온 구역이되, 암 세포 자체의 세포 내 구획에는 속하지 않는 환경을 지칭한다. 종양 및 종양 미세환경은 밀접하게 관련되어 있으며, 끊임없이 상호작용한다. 종양은 자체의 미세환경을 바꿀 수 있으며, 미세환경은 종양이 어떻게 성장하고 퍼져 나가는지에 영향을 미칠 수 있다. 통상적으로 종양 미세환경은 5.8 내지 7.0의 범위, 더욱 통상적으로 6.2 내지 6.8의 범위, 가장 통상적으로 6.4 내지 6.8의 범위로 낮은 pH를 보인다. 다른 한편, 정상적인 생리적 pH는 통상 7.2 내지 7.8의 범위이다. 종양 미세환경은 또한 혈장과는 비교되게, 글루코스 및 기타 영양분의 농도가 낮고, 젖산의 농도는 높은 것으로 공지되어 있다. 게다가 종양 미세환경은 정상 생리적 온도보다 0.3℃ 내지 1℃ 더 높은 온도를 보일 수 있다. 종양 미세환경은 문헌(Gillies et al., "MRI of the Tumor Microenvironment," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 16, pp.430-450, 2002)에 기술되어 있다. "비 종양 미세환경"이란 용어는, 종양 이외의 부위의 미세환경을 지칭한다.
- [0081] 본원에 사용된 바와 같은 "모노클로날 항체"란 용어는, 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하는데, 다시 말해서 이 집단에 포함되는 개별 항체는 동일하고/동일하거나, 동일한 에피토프와 결합하지만, 이때 생성 가능한 변이 항체, 예컨대 자연 발생 돌연변이를 함유하거나, 또는 모노클로날 항체 제조 중에 발생하는 항체(이러한 변이체는 일반적으로 소량 존재함)는 그러하지 않다. 통상적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대해 생성된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원상 단일 결정기에 대해 생성된다. 그러므로 수식어 "모노클로날"은, 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득되는 항체의 특성을 나타내는 것이지, 임의의 특정 방법으로 항체를 생산하는 것을 필요로 하는 것이라 해석되어서는 안된다. 예를 들어 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예컨대 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파아지 전사 방법, 그리고 인간 면역글로불린 자리 전부 또는 일부를 함유하는 유전자식 동물을 사용하는 방법(이에 한정되는 것은 아님)에 의해 제조될 수 있는데, 이 경우 이처럼 모노클로날 항체를 제조하기 위한 방법들과 기타 예시적 방법은 본원에 기술되어 있다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은 "나출 항체(naked antibody)"란 용어는, 이중 기(예컨대 세포독성 기) 또는 방사성 표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 나출 항체는 약학 제제 중에 존재할 수 있다.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같은 "원산 항체(native antibody)"란 용어는, 가변적 구조를 가지는 자연 발생 면역글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어 원산 IgG 항체는, 이항화 결합된 2개의 동일한 경쇄와 2개의 동일한 중쇄로 이루어진, 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. 각각의 중쇄는 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 가변 영역(V_H)(가변 중 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 칭하여짐) → 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 가진다. 이와 유사하게, 각각의 경쇄는 N-말단으로부터 C-말단 방향으로 가변 영역(V_L)(가변 경 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 칭하여짐) → 불변 경 도메인(C_L)을 가진다. 항체의 경쇄는 자체의 불변 도메인 아미노산 서열을 기반으로 하였을 때, 카파(κ) 및 람다(λ)라고 칭하여지는 2개의 유형 중 하나에 해당할 수 있다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같은 "팩키지 삽입물"이란 용어는, 치료제 제품의 사용에 관한 적응증, 용도, 투여량, 투여 방법, 병행요법, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는, 치료제 제품의 상업적 패키지에 관례상 포함되어 있는 지시사항을 지칭하도록 사용되고 있다.
- [0085] 기준 폴리펩티드 서열에 대하여 본원에 사용된 바와 같은 "아미노산 서열 동일성 퍼센트(%)"라는 용어는, 필요

하다면 최대 서열 동일성 %를 달성하기 위하여, 서열 동일성의 일부로서 그 어떠한 보존적 치환도 고려하지 않고 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 기준 폴리펩티드 서열 내 아미노산 잔기와 동일한, 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성%를 측정하기 위한 목적의 정렬은, 당 분야의 기술에 속하는 다양한 방법, 예를 들어 공중이 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하는 방법에 의해 달성될 수 있다. 당 업자는, 비교중인 서열들의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 서열들을 정렬하는데 적당한 매개변수를 결정할 수 있다. 그러나 본원의 목적들을 위하여 아미노산 서열 동일성% 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용함으로써 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 제작된 것으로서, 소스 코드는 사용자 문서와 함께 워싱턴 D.C. 20559에 소재하는 미국 저작권청에 출원되어 미국 저작권 등록 번호 TXU510087 하에 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 샌프란시스코 소재 Genentech, Inc.로부터 공중이 입수 가능하거나, 아니면 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하는 UNIX 운영 시스템 상에서 사용되도록 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 매개변수는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며, 가변적이지 않다.

[0086] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이것과의, 또는 이것에 대비되는 주어진 아미노산 서열 A(대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이것과의, 또는 이것에 대비되어 임의의 아미노산 서열 동일성%를 보이거나 포함하는, 주어진 아미노산 서열 A로도 표현될 수 있는 서열)의 아미노산 서열 동일성%는 하기와 같이 산정된다:

[0087] $100 * (X/Y)$

[0088] [식 중, X는 A와 B의 프로그램에 의한 정렬시 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의하여 동일한 매칭부인 것으로 스코어가 매겨진 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B 중 아미노산 잔기의 총수임]

[0089] 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A 대 B의 아미노산 서열 동일성 %는 B 대 A의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것이다. 구체적으로 달리 진술되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성% 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 바로 위 문단에 기술된 바와 같이 구하여진다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 "약학 제제"란 용어는, 안에 함유된 활성 성분의 생물 활성이 효과적일 수 있는 형태를 가지고, 해당 제제가 투여될 대상체에 허용 불가능할 정도로 독성인 추가 성분들은 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 용어는, 활성 성분을 제외한 약학 제제 중 어떤 성분으로서, 대상체에 무독성인 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체로서는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같은 "정제된" 및 "분리된"이란 용어는, 본 발명에 따른 항체 또는 뉴클레오타이드 서열이 피수식 분자가 동일한 유형의 다른 생물 거대분자의 실질적 부재 하에 존재하는 경우를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 "정제된"이란 용어는, 동일한 유형의 생물 거대분자가 바람직하게 적어도 75 중량%, 더욱 바람직하게 적어도 85 중량%, 더욱더 바람직하게 적어도 95 중량%, 그리고 가장 바람직하게 적어도 98 중량%만큼 존재하는 상태를 의미한다. 특정의 폴리펩티드를 암호화하는 "분리된" 핵산 분자란, 해당 폴리펩티드를 암호화하지 않는 또 다른 핵산 분자가 실질적으로 존재하지 않는 핵산 분자를 지칭하지만; 이 경우, 상기 분자는 조성물의 기본 특성에 유해한 영향을 미치지 않는 몇몇 추가의 염기 또는 기를 포함할 수 있다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같은 "제조항 항체"란 용어는, 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 제조항 숙주 세포에 의해 발현되는 항체(예컨대 키메라, 인간화 또는 인간 항체, 또는 이것들의 항원 결합 단편)를 지칭한다. 제조항 항체를 제조하기 위한 "숙주 세포"의 예들로서는 (1) 포유동물 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO), COS, 골수종 세포(YO 및 NSO 세포 포함), 새끼 햄스터 콩팥(BHK), Hela 및 Vero 세포; (2) 곤충 세포, 예컨대 sf9, sf21 및 Tn5; (3) 식물 세포, 예컨대 니코티아나(*Nicotiana*) 속에 속하는 식물(예컨대 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)); (4) 효모 세포, 예컨대 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속에 속하는 세포(예컨대 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)) 또는 아스페질러스(*Aspergillus*) 속에 속하는 세포(예컨대 아스페질러스 나이지(*Aspergillus niger*)); (5) 세균 세포, 예컨대 에스케리치아 콜라이(*Escherichia. coli*) 세포 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 세포 등을 포함한다.

[0094] 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 "치료적 유효량"이란 용어는, 임의의 의료적 처치에 적용될 수 있는 합리적인

이익/위험 비율로 어떤 질환 또는 병증을 치료하는데 충분한, 항체 또는 항체 단편의 양을 의미한다. 그러나, 본 발명의 항체 또는 항체 단편 및 조성물의 1일 총 사용량은 타당한 의료적 판단 범위 내에서 참여 전문의에 의해 결정될 것이다. 어떤 특정 환자에 특이적인 치료적 유효량 수준은, 치료중인 장애 및 해당 장애의 중증도; 사용된 특이 항체 또는 항체 단편의 활성; 사용된 특정 조성물, 환자의 나이, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별 및 식습관; 투여 시간, 투여 경로, 그리고 사용된 특이 항체 또는 항체 단편의 배출 속도; 처치 지속기간; 사용된 특이 항체와 병용되거나 우연히 함께 사용되는 약물; 그리고 의료분야에 널리 공지된 유사 요인들을 비롯한 다양한 요인들에 따라 달라질 것이다. 예를 들어 원하는 치료 효과를 달성하고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증량하는데 필요한 용량보다 더 낮은 수준인, 화합물의 출발 용량은 당 분야의 기술에 널리 공지되어 있다.

[0095] 본원에 사용된 바와 같은 "단일 사슬 Fv"("scFv")란 용어는, 보통 펩티드 암호화 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 암호화 유전자들을 포함하는 유전자 융합을 통해 발현되어 공유적으로 연결된 $V_H::V_L$ 이중이량체이다. "dsFv"는 이황화 결합에 의해 안정화된 $V_H::V_L$ 이중이량체이다. 2가 및 다가 항체 단편은 1가 scFv들의 결합에 의해 자발적으로 생성될 수 있거나, 아니면 펩티드 링커에 의한 1가 scFv들의 커플링에 의해 생성될 수 있다(예컨대 2가 sc(Fv)₂).

[0096] 본원에 사용된 바와 같은 "치료", "치료하다" 또는 "치료하는 것"이란 용어는, 치료중인 개체의 자연 경과의 변경을 도모하고자 하는 임상학적 개입을 지칭하는데, 이는 예방차원에서 수행될 수 있거나, 또는 임상학적 병적 측면의 경과 중에 수행될 수 있다. 원하는 치료 효과로서는 질환의 발생 또는 재발을 막는 것, 증상을 완화하는 것, 질환의 그 어떠한 직접적 또는 간접적 병리 결과를 경감시키는 것, 전이를 예방하는 것, 질환의 진행 속도를 늦추는 것, 병상을 경감 또는 약화시키는 것, 그리고 관해 또는 예후의 개선을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 어떤 질환의 발달을 지연시키거나 어떤 질환의 진행을 늦추는데 사용된다.

[0097] 본원에 사용된 바와 같은 "종양"이라는 용어는, 그것이 악성이건 양성이건 간에, 그리고 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직이건 간에, 모든 신생 세포의 성장 및 증식을 지칭한다. "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"이라는 용어는, 본원에 언급되어 있는 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"이란 용어는, 항체와 항원의 결합에 수반되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 원산 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L)의 가변 도메인은, 일반적으로 각각의 도메인이 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR)과 3개의 초가변 영역(HVR)을 포함하는 유사 구조를 가진다. (예를 들어 문헌(Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007))을 참조한다.) 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하는데 충분할 수 있다. 게다가 특정의 항원과 결합하는 항체 또는 항체 단편은, 상보성 V_L 또는 V_H 도메인 각각의 라이브러리를 스크리닝함에 있어서 항원과 결합하는 항체로부터 V_H 또는 V_L 도메인을 사용함으로써 분리될 수 있다. 예를 들어 문헌(Portolano et al., *J. Immunol.*, vol. 150, pp. 880-887, 1993; Clarkson et al., *Nature*, vol. 352, pp. 624-628, 1991)을 참조한다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"란 용어는, 또 다른 핵산과 연결되어 이를 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는, 자가복제성 핵산 구조로서의 벡터뿐만 아니라, 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포의 계놈에 통합되는 벡터도 포함한다. 임의의 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산들의 발현을 지휘할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"라 지칭된다.

[0100] 상세한 설명

[0101] 예시의 목적으로서, 본 발명의 원리들은 다양한 예시적 구현예들을 참조하여 기술된다. 비록 본 발명의 임의의 구현예들이 본원에 구체적으로 기술되어 있긴 하지만, 당 업자는, 동일한 원리가 다른 시스템 및 방법에 동일하게 적용될 수 있고, 여기에 사용될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 본 발명의 개시된 구현예들을 자세히 설명하기 위해, 본 발명은 기술된 임의의 특정 구현예에 관한 상세한 기술에 적용 가능하다는 것에 제한되지 않음이 이해되어야 할 것이다. 부가적으로, 본원에 사용된 용어는 본 발명을 기술하기 위한 것이지 제한하기 위한 것은 아니다. 게다가 임의의 방법들이 본원에 임의의 순서로 제시된 단계들을 참조하여 기술되어 있다고 할지라도, 다수의 경우 이 단계들은, 당 업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이 임의의 순서로 수행될 수 있으므로; 신규 방법은 본원에 개시된 단계들의 특정 배열에 제한되지 않는다.

- [0102] 본원 및 본원에 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태를 나타내는 "하나의", "한" 및 "본"과 같은 용어는, 내용 중 명확히 달리 명시되어 있지 않는 한, 복수의 피수식 대상도 포함한다는 것이 주목되어야 한다. 게다가 "하나의"(또는 "한"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"라는 용어는 본원에서 호환되어 사용될 수 있다. "~를 포함하는", "~를 포함하여", "~를 가지는" 그리고 "~로부터 구성된"이란 용어도 또한 호환되어 사용될 수 있다.
- [0103] 달리 명시되어 있지 않는 한, 본 명세서와 특허청구범위에 사용된 성분의 양, 특성, 예컨대 분자량, %, 비율, 반응 조건 등을 나타내는 모든 수치는, "약"이라는 용어가 존재하건 존재하지 않건, 모든 경우에 용어 "약"에 의해 수식되는 것으로서 이해되어야 할 것이다. 그러므로 반대로 명시되어 있지 않는 한, 명세서와 특허청구범위에 제시된 수치 매개변수는, 본 발명에 의해 얻어지도록 추구되는 원하는 특성들에 따라서 달라질 수 있는 근사치이다. 최소한의, 그리고 특허청구범위에 균등론 적용을 제한하고자 하는 시도가 아닌, 각각의 수치 매개변수는, 최소한은 보고된 유의미 숫자의 수치에 비추어, 그리고 통상의 반올림 기법을 적용하여 해석되어야 할 것이다. 본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위와 매개변수는 근사치임에도 불구하고, 특정 실시예에 제시된 수치 값은 가능한 한 정확하게 보고되어 있다. 그러나 임의의 수치 값은 본질적으로, 각 실험에 의한 측정치에서 발견되는, 상기 수치 값의 표준 편차로부터 필연적으로 기인하는 임의의 오차들을 포함하고 있다.
- [0104] 본원에 개시된 각각의 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수는 단독으로 사용되거나, 본원에 개시된 다른 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수 각각 및 전부 중 하나 이상과 함께 사용되기 위한 것으로 개시된 바와 같이 해석되어야 함이 이해될 할 것이다.
- [0105] 본원에 개시된 각각의 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수에 대한 각각의 양/값 또는 양/값의 범위는 또한 본원에 개시된 또 다른 임의의 성분(들), 화합물(들), 치환기(들) 또는 매개변수(들)에 관한 각각의 양/값 또는 양/값의 범위와 함께 개시되어 있는 것으로 해석될 것임과, 또한 2개 이상의 성분(들), 화합물(들), 치환기(들) 또는 매개변수(들)에 관한 양/값 또는 양/값의 범위의 임의의 조합은 본 발명을 설명하고자 하는 목적으로 서로 간에 조합되어 개시되기도 함도 또한 이해될 것이다.
- [0106] 본원에 개시된 각각의 범위의 각각의 하한치는, 동일한 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수에 관하여 본원에 개시된 각각의 범위의 각각의 상한치와 함께 개시된 바와 같이 해석될 것임도 또한 이해된다. 그러므로 2개의 범위의 개시내용은 각각의 범위의 각각의 상한치와 함께 각각의 범위의 각각의 하한치를 함함으로써 유추되는 4개의 범위에 관한 개시인 것으로 해석될 것이다. 3개의 범위에 관한 개시내용은 각각의 범위의 각각의 상한치와 함께 각각의 범위의 각각의 하한치를 함함으로써 유추되는 9개의 범위에 관한 개시인 것과 같은 식으로 해석될 것이다. 뿐만 아니라, 발명의 설명 또는 실시예에 개시된 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수의 구체적인 양/값은, 어떤 범위의 상한치 또는 하한치 중 어느 하나에 관한 개시인 것으로서 해석될 것이므로, 본 출원의 다른 부분에 개시되어 있는 동일한 성분, 화합물, 치환기 또는 매개변수에 관한 어떤 범위 또는 특정의 양/값의 또 다른 임의의 하한치 또는 상한치와 합하여질 수 있다.
- [0107] **A. 항 Ax1 항체 또는 항체 단편의 영역들**
- [0108] 하나의 양태에서, 본 발명은 인간 Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는 분리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다. 본 중쇄 가변 영역 폴리펩티드는 3개의 상보성 결정 영역 H1, H2 및 H3를 포함하는데, 여기서
- [0109] H1 서열은 $X_1GX_2X_3MX_4$ (서열 번호 1)이고;
- [0110] H2 서열은 $LIKX_5SNGGT_X6YNQKFKG$ (서열 번호 2)이며;
- [0111] H3 서열은 $GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}DYX_{15}X_{16}$ (서열 번호 3)이되,
- [0112] 다만
- [0113] X_1 은 T 또는 A 또는 W이고,
- [0114] X_2 는 H 또는 A이며,
- [0115] X_3 은 T 또는 I이고,
- [0116] X_4 는 N 또는 I이며,

- [0117] X_5 는 P 또는 N이고,
- [0118] X_6 은 S 또는 I 또는 T이며,
- [0119] X_7 은 H 또는 D 또는 E 또는 P 또는 R 또는 W이고,
- [0120] X_8 은 Y 또는 N이며,
- [0121] X_9 는 E 또는 A 또는 D 또는 F 또는 G 또는 H 또는 I 또는 L 또는 M 또는 N 또는 R 또는 V 또는 Y이고,
- [0122] X_{10} 은 S 또는 D 또는 M 또는 N 또는 Q이며,
- [0123] X_{11} 은 Y 또는 C 또는 E 또는 P이고,
- [0124] X_{12} 는 F 또는 E 또는 N 또는 S 또는 T 또는 V이며,
- [0125] X_{13} 은 A 또는 D 또는 G 또는 L 또는 Y이고,
- [0126] X_{14} 는 M 또는 E 또는 F이며,
- [0127] X_{15} 는 W 또는 A 또는 D 또는 H 또는 L 또는 N 또는 P 또는 R 또는 T이고,
- [0128] X_{16} 은 G 또는 H이다.
- [0129] 중쇄 가변 영역의 정렬은 도 1a에 제시되어 있는데, 여기서 상보성 결정 영역 H1, H2 및 H3는 박스(box) 안에 표시되어 있다.
- [0130] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는, 분리된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 제공한다. 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 3개의 상보성 결정 영역 L1, L2 및 L3 서열을 포함하는데, 여기서
- [0131] L1 서열은 KASQDX₁₇X₁₈SX₁₉VX₂₀ (서열 번호 4)이고;
- [0132] L2 서열은 X₂₁X₂₂X₂₃TRX₂₄T (서열 번호 5)이며;
- [0133] L3 서열은 QEX₂₅X₂₆SX₂₇X₂₈X₂₉X₃₀ (서열 번호 6)이되,
- [0134] 다만
- [0135] X_{17} 은 V 또는 D 또는 G 또는 N 또는 W이고,
- [0136] X_{18} 은 S 또는 V이며,
- [0137] X_{19} 는 A 또는 L 또는 M이고,
- [0138] X_{20} 은 A 또는 D 또는 N 또는 Q이며,
- [0139] X_{21} 은 W 또는 F이고,
- [0140] X_{22} 는 A 또는 I 또는 N 또는 P 또는 Q이며,
- [0141] X_{23} 은 S 또는 D이고,
- [0142] X_{24} 는 H 또는 D이며,
- [0143] X_{25} 는 H 또는 C 또는 F 또는 I 또는 L 또는 Q 또는 S 또는 T 또는 V 또는 Y이고,
- [0144] X_{26} 은 F 또는 C 또는 D 또는 E 또는 G 또는 N 또는 S이며,
- [0145] X_{27} 은 T 또는 C 또는 P이고,

[0146] X_{28} 은 P 또는 A 또는 C 또는 D 또는 E 또는 H 또는 K 또는 S 또는 T 또는 V 또는 W이며,

[0147] X_{29} 은 L 또는 G 또는 R이고,

[0148] X_{30} 은 T 또는 I 또는 R이다.

[0149] 경쇄 가변 영역의 정렬은 도 1b에 제시되어 있는데, 여기서 상보성 결정 영역 L1, L2 및 L3는 박스 안에 표시되어 있다.

[0150] 본 발명은 이처럼 모 항체로부터 분리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드와 모 항체로부터 분리된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 미국 특허 제8,709,755호에 개시된 방법을 사용하여 동정하였다. 모 항체(063-hum10F10)의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 또한 분리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드와 분리된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드 내 돌연변이를 보여주는, 도 1a 및 도 1b에서와 같이 정렬된다.

[0151] 야생형 항체를 암호화하는 DNA는, 주형인 항체 내 각각의 위치가 한 번에 하나씩 랜덤화되는 포괄적 위치 진화(Comprehensive Positional Evolution; CPE)를 이용하여 돌연변이 항체 라이브러리를 생성하도록 진화되었다. 라이브러리 내 각각의 돌연변이 항체는 오로지 하나의 단일 점 돌연변이만을 가진다. 라이브러리 내 돌연변이 항체는, pH 7.4에서의 Ax1에 대한 선택적 결합 친화성에 비해, pH 6.0에서의 Ax1에 대한 선택적 결합 친화성을 ELISA에 의해 동시 스크리닝함으로써 생성되었다. 2가지의 돌연변이 항체 희석(즉 1:3 희석 및 1:9 희석)이 적용되었다. 1:3 또는 1:9 희석이 이루어졌을 때, pH 6.0에서의 결합 친화성 대 pH 7.4에서의 결합 친화성의 비가 적어도 1.5인 돌연변이 항체가, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 각각에 단일 점 돌연변이를 가지는 조건부 활성 항체로서 선택된다(표 1 및 표 2).

표 1

조건부 활성 항Ax1 항체 중쇄 가변 영역

돌연변이체	친화성 ELISA CPE 돌연변이체		돌연변이체	친화성 ELISA CPE 돌연변이체	
	비율 (1:3, pH 6.0/7.4)	비율 (1:9, pH 6.0/7.4)		비율 (1:3, pH 6.0/7.4)	비율 (1:9, pH 6.0/7.4)
HC-T030A	1.292	1.762	HC-E102L	3.266	2.698
HC-T033I	1.594	1.905	HC-E102M	2.979	2.363
HC-W025I	3.814	1.121	HC-E102N	1.520	1.567
HC-P053N	1.493	1.839	HC-E102R	3.701	3.416
HC-S059I	30.452	2.955	HC-E102V	1.931	2.507
HC-S059T	1.021	1.926	HC-E102Y	2.610	1.990
HC-H100R	1.877	2.507	HC-S103D	4.237	2.230
HC-H100D	2.416	3.094	HC-S103M	1.784	1.806
HC-H100E	2.775	3.623	HC-S103N	1.075	3.179
HC-H100W	4.937	5.908	HC-S103Q	0.912	2.256
HC-H100P	2.575	1.179	HC-Y104C	1.845	1.741
HC-Y101N	2.174	2.907	HC-Y104E	1.321	1.796
HC-E102E	1.879	1.363	HC-Y104P	2.535	2.416
HC-E102I	2.616	1.696	HC-F105N	2.364	2.642
HC-E102A	1.538	1.687	HC-F105S	3.898	4.545
HC-E102D	2.674	2.853	HC-F105T	3.463	4.021
HC-E102G	1.798	2.677	HC-F105V	2.429	2.801
HC-E102H	2.076	2.315	HC-A106D	3.389	2.506
HC-W107	7.469	1.372	HC-A106G	1.519	2.196
HC-W10N	4.304	0.600	HC-A106L	21.538	1.613
HC-W10L	8.223	0.924	HC-A106Y	3.293	3.060
HC-W10R	5.991	1.062	HC-M107E	2.164	1.357
HC-W10D	3.716	1.112	HC-M107F	26.579	1.090
HC-W10A	7.909	1.198	HC-W109	6.490	2.148
HC-G111H	1.058	1.786	HC-W110H	7.993	0.932

[0152]

표 2

조건부 활성 항Ax1 항체 경쇄 가변 영역

돌연변이체	친화성 ELISA CPE 돌연변이체		돌연변이체	친화성 ELISA CPE 돌연변이체	
	비율 (1:3, pH 6.0/7.4)	비율 (1:3, pH 6.0/7.4)		비율 (1:3, pH 6.0/7.4)	비율 (1:3, pH 6.0/7.4)
LC-V029D	2.892	2.679	LC-H091S	1.759	1.336
LC-V029G	1.939	1.893	LC-H091T	3.779	3.791
LC-V029N	2.595	2.652	LC-H091V	4.133	1.171
LC-V029W	2.310	2.353	LC-H091Y	3.931	5.126
LC-A032L	1.982	2.272	LC-F092C	3.862	4.576
LC-A032M	4.757	2.920	LC-F092D	2.969	2.940
LC-A034D	3.005	2.599	LC-F092E	1.759	1.999
LC-A034N	2.626	2.403	LC-F092G	3.692	4.758
LC-A034Q	1.999	1.409	LC-F092N	1.933	2.004
LC-W050F	2.245	3.504	LC-F092S	3.179	2.937
LC-A051I	2.241	2.139	LC-T094C	1.423	1.768
LC-A051N	1.412	2.200	LC-P095A	2.523	2.987
LC-A051P	1.920	1.569	LC-F095C	2.350	2.630
LC-H091C	4.003	3.625	LC-P095D	2.949	2.889
LC-H091F	1.603	2.116	LC-F095E	7.121	7.511
LC-H091I	1.550	2.154	LC-P095H	2.504	2.754
LC-H091L	2.798	2.681	LC-F095K	3.840	3.468
LC-H091Q	1.770	2.010	LC-F095S	2.841	3.512
LC-L096G	2.165	2.436	LC-P095T	2.497	2.086
LC-L096R	2.876	2.176	LC-F095V	1.871	2.132
LC-F097I	3.686	4.649	LC-P095W	2.148	2.263

[0153]

[0154]

다른 양태에서, 본 발명은 도 1a에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역과, 도 1b에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 동정하였다. 몇몇 중쇄 가변 영역은 서열 번호 11 내지 서열 번호 13의 DNA 서열에 의해 암호화된다. 도 1a의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 14 내지 서열 번호 67의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 경쇄 가변 영역은 서열 번호 7 내지 서열 번호 10의 DNA 서열에 의해 암호화된다. 도 1b의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 68 내지 서열 번호 116의 아미노산 서열을 포함한다. 이와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 Ax1에 특이적으로 결합할 수 있다. 이와 같은 중쇄 및 경쇄 가변 영역들 중 하나를 포함하는 항체는, 비 중양 미세환경 pH에서보다 중양 미세환경 pH에서 Ax1에 대해 더 큰 결합 친화성을 보이는 것으로 확인되었다.

[0155]

본 발명은 또한 도 1a 및 도 1b에 제시되어 있고, 서열 번호 9 내지 서열 번호 13의 DNA 서열에 의해 암호화되며, Ax1에 특이적으로 결합할 수 있는 중쇄 및 경쇄 가변 영역들의 변이체를 포함한다. 이러한 변이체를 유도하기 위하여, 중쇄 가변 영역(H1 ~ H3)의 상보성 결정 영역(CDR)들과 경쇄 가변 영역(L1 ~ L3)의 CDR들은 비변형인 상태로 남아 있어야 한다는 것이 확인되었다.

[0156]

이와 같은 변이체를 유도함에 있어서, 해당 절차는 본원에 기술된 바와 같은 방법에 의해 안내된다. 이러한 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 변이체들은, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 적당한 변형들을 도입함에 의하거나, 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 변형으로서는, 예를 들어 항체 또는 항체 단편의 아미노산 서열 내 잔기들의 결실 및/또는 이러한 잔기들로의 삽입 및/또는 이러한 잔기들의 치환을 포함한다. 최종 구조체를 제조하기 위해 결실(들), 삽입(들) 및 치환(들)의 임의의 조합이 이루어질 수 있는데, 다만 최종 구조체는 원하는 특성들 중 적어도 하나, 예컨대 항원 결합 특성을 보유한다.

[0157]

치환, 삽입 및 결실 변이체

[0158]

임의의 구현예들에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 가지는 항체 또는 항체 단편 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위들은 CDR들 및 프레임워크 영역(FR)들을 포함한다. 보존적 치환은 표 3에 "보존적 치환"이라는 표제하에 제시되어 있다. 더 많은 실질적 변화들이 표 3에 "예시적 치환"이라는 표제 하에, 그리고 아미노산 사슬 군에 관하여 이하에 추가로 기술되어 있는 바와 같이 제공되어 있다. 아미노산 치환은 원하는 활성, 예컨대 보유하고 있는/개선된 항원 결합 활성, 또는 감소한 면역원성에 대해 스크리닝된 생성물, 관심 항체 또는 항체 단편에 도입될 수 있다.

표 3

아미노산 치환

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

- [0159]
- [0160] 아미노산은 통상의 측쇄 특성에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다:
- [0161] (1) 소수성: 노르루신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0162] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0163] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0164] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0165] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기들: Gly, Pro;
- [0166] (6) 방향성: Trp, Tyr, Phe.
- [0167] 비보존적 치환은 이러한 군들 중 어느 하나의 일원의 다른 군의 일원으로서의 교환을 수반할 것이다.

[0168] 치환 변이체의 한 유형은, 모 항체(예컨대 인간화 항체 또는 인간 항체) 중 초가변 영역 잔기들 하나 이상의 치환을 수반한다. 일반적으로 추가의 연구를 위해 선택된 생성 변이체(들)는 모 항체에 비하여 임의의 생물 특성에 있어 개질(예컨대 개선)(예컨대 증가한 친화성, 감소한 면역원성)을 보일 것이고/것이거나, 모 항체의 임의의 생물 특성을 실질적으로 보유하게될 것이다. 예시적 치환 변이체로서는, 예컨대 파아지 전시 기반 친화성 성숙 기술, 예컨대 본원에 기술된 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화성 성숙 항체(affinity matured antibody)가 있다. 간단히 말해서, 하나 이상의 CDR 잔기들이 돌연변이된 변이체 항체는 파아지 상에 전시되었다가 특정 생물 활성(예컨대 결합 친화성)에 대해 스크리닝된다.

- [0169] 변경(예컨대 치환)은, 예를 들어 항체 친화성을 개선하기 위해 CDR에서 일어날 수 있다. 이와 같은 변경은 CDR "핫스팟(hotspot)", 즉 체 성숙 과정 중 매우 빈번하게 돌연변이를 수행하는 코돈에 의해 암호화되는 잔기(예를 들어 문헌(Chowdhury, *Methods Mol. Biol.*, vol. 207, pp. 179-196, 2008) 참조) 및/또는 SDR(a-CDR)에서 일어날 수 있는데, 이 경우 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화성에 대해 시험된다. 2차 라이브러리를 구성하고 이를 재선택함으로써 이루어지는 친화성 성숙은, 예컨대 문헌(Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology*, vol. 178, pp. 1-37, 2001)에 기술되어 있다. 친화성 성숙에 관한 몇몇 구현예들에서, 성숙을 위해 선택된 가변 유전자에는 다양한 방법들 중 임의의 방법(예컨대 오류 유발 PCR, 사슬 셔플링(chain shuffling) 또는 올리고뉴클레오타이드 유도성 돌연변이유발법)을 통해 다양성이 도입된다. 이후 2차 라이브러리가 생성된다. 그 다음 이 라이브러리는 원하는 친화성을 가지는 임의의 항체 변이체를 동정하기 위해 스크리닝된다. 다양성을 도입하기 위한 또 다른 방법은, CDR 유도성 접근법, 즉 몇 개의 CDR 잔기(예컨대 한 번에 4 ~ 6개의 잔기)가 무작위화되는 접근법을 수반한다. 항원 결합에 수반되는 CDR 잔기들은, 예컨대 알라닌 스캔 돌연변이유발법 또는 모델링을 사용함으로써 특이적으로 동정될 수 있다. 구체적으로 CDR-H3 및 CDR-L3은 종종 표적화된다.
- [0170] 임의의 구현예들에서, 치환, 삽입 또는 결실은, 이러한 변경이 항체 또는 항체 단편이 항원과 결합하는 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어 결합 친화성을 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경(예컨대 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 CDR 내에 일어날 수 있다. 이러한 변경은 CDR "핫스팟" 또는 SDR의 외부에 있을 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열들에 관한 임의의 구현예들에서, 각각의 CDR은 변경되지 않거나, 또는 1개, 2개 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0171] 돌연변이유발법의 표적이 될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 동정하기 위한 유용한 방법은 문헌(Cunningham and Wells, *Science*, vol. 244, pp. 1081-1085, 1989)에 기술된 바와 같이 "알라닌 스캔 돌연변이유발법(alanine scanning mutagenesis)"이라 지칭된다. 이 방법에서, 하나의 잔기 또는 표적 잔기들(예컨대 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu)의 군이 동정되어, 중성 또는 음 하전 아미노산(예컨대 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 치환되며, 그 결과 항체 또는 항체 단편과 항원의 상호작용이 영향을 받았는지 여부가 확인된다. 초기 치환에 대해 기능상 감수성을 보이는 아미노산 자리에 추가의 치환이 도입될 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 항체 또는 항체 단편과 항원 간의 접촉점을 동정하기 위하여 항원-항체 복합체의 결정 구조가 분석될 수 있다. 이러한 접촉 잔기와 이에 이웃하는 잔기들은 치환에 대한 후보 잔기로서 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는, 그것이 원하는 특성을 포함하는지 여부에 대해 확인하기 위하여 스크리닝될 수 있다.
- [0172] 아미노산 서열 삽입은, 그 길이가 잔기 1개에서부터, 잔기 100개 이상을 포함하는 폴리펩티드에 이르기까지의 범위인 아미노- 및/또는 카복시-말단 융합뿐만 아니라, 단일 아미노산 잔기 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예들로서는 N-말단 메티오닐 잔기를 가지는 항체를 포함한다. 항체의 또 다른 삽입 변이체로서는 항체 N-말단 또는 C-말단의, 혈청중 항체 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 효소(예컨대 ADEPT 용)에의 융합을 포함한다.
- [0173] 본원에 기술된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물 특성을 개선하는 것이 요망될 수 있다. 인간화 항체가, 인간 이외의 동물로부터 유래한 항체의 VH 및 VL 내 CDR만을 인간 항체의 VH 및 VL FR에 단순히 이식함으로써 제조될 때, 이 항체의 항원 결합 활성은 인간 이외의 동물로부터 유래한 원래 항체의 항원 결합 활성에 비하여 감소한다. 비 인간 항체의 VH 및 VL 아미노산 잔기(CDR에 있는 잔기뿐만 아니라 FR에 있는 잔기 포함) 몇 개는 항원 결합 활성과 직접적으로나 간접적으로 연관되어 있는 것으로 생각된다. 그러므로 이러한 아미노산 잔기들의, 인간 항체의 VH 및 VL FR로부터 유래하는 상이한 아미노산 잔기로의 치환은, 결합 활성을 감소시킬 것이다. 이 문제를 해결하기 위해, 인간 항체의 VH 및 VL FR, 항체와의 결합에 직접적으로 연관된 아미노산 잔기, 또는 CDR 아미노산 잔기와 상호작용하는 아미노산 잔기, 또는 항체의 3차원 구조를 유지시키고 항원과의 결합에 직접적으로 연관된 아미노산 잔기의 아미노산 서열들을 동정하고자 하는 시도가 인간 CDR이 이식된 항체를 대상으로 행하여져야 한다. 감소한 항원 결합 활성은, 동정된 아미노산이, 인간 이외의 동물로부터 유래하는 원래 항체의 아미노산 잔기로 치환되면 증가할 수 있었다.
- [0174] 본 발명의 항체 구조와, 이러한 항체를 암호화하는 DNA 서열에 변형 및 변화가 일어날 수 있으며, 이러한 변형 및 변화는 원하는 특성들을 가지는 항체를 암호화하는 작용성 분자를 여전히 생성해 낸다.
- [0175] 아미노산서열에 변화를 유발함에 있어서, 아미노산의 소수친수 지수(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 상호작용성 생물 기능을 부여함에 있어서 소수친수 아미노산 지수의 중요성은, 일반적으로 당 분야에서 이해되고 있다. 아미노산의 상대적 소수친수 특성은, 결국 단백질과 다른 분자(예컨대 효소, 기질, 수용체, DNA,

항체 및 항원 등)의 상호작용을 한정하는, 수득된 단백질의 2차 구조에 기여한다. 각각의 아미노산은 자체의 소수성과 하전 특성들을 기반으로 소수친수 지수가 하기와 같이 할당된다: 이소루신(+4.5); 발린(+4.2); 루신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0176] 본 발명의 추가의 목적은 또한 본 발명의 항체의 기능 보존적 변이체를 포함한다.

[0177] "기능 보존적 변이체"란, 단백질 또는 효소 내 주어진 아미노산 잔기가 바뀌었되, 폴리펩티드의 전체 형태 및 기능은 변경되지 않은 변이체, 예를 들어 어떤 아미노산의, 유사한 특성(예컨대 극성, 수소 결합 잠재성, 산성, 염기성, 소수성 및 방향성 등)을 가지는 다른 아미노산으로의 치환(이에 한정되는 것은 아님)이 일어난 변이체이다. 보존된 것으로 명시된 아미노산 이외의 아미노산은 단백질에 차이를 보일 수 있는데, 유사한 기능을 가지는 임의의 단백질 2개 간 단백질 또는 아미노산 서열 유사성%는 다양할 수 있으며, 예를 들어 Cluster 방법에 의한 정렬 계획(이 경우, 유사성은 MEGALIGN 알고리즘을 기반으로 함)에 따라 측정된 바에 의하면, 예를 들어 70% 내지 99%일 수 있다. "기능 보존적 변이체"는 또한, BLAST 또는 FASTA 알고리즘에 의해 측정된 바와 같은 아미노산 동일성이 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더욱더 바람직하게는 적어도 90%, 더욱더 바람직하게는 적어도 95%이고, 비교 대상인 원산 또는 모 단백질의 특성 또는 기능과 동일하거나 실질적으로 유사한 특성 또는 기능을 가지는 폴리펩티드를 포함한다.

[0178] 2개의 아미노산 서열은, 둘 중 더 짧은 서열의 전체 길이에 걸쳐 80%보다 많거나, 바람직하게 85%보다 많거나, 바람직하게 90%보다 많은 아미노산이 동일할 때, 또는 약 90%보다 많거나, 바람직하게는 95%보다 많은 아미노산이 유사할 때(기능상 동일할 때) "실질적으로 상동성"이거나 "실질적으로 유사"한 것이다. 바람직하게, 유사하거나 상동성인 서열들은, 예를 들어 GCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wis.) 파일업 프로그램, 또는 서열 비교 알고리즘 중 임의의 것, 예컨대 BLAST, FASTA 등을 이용한 정렬을 통하여 동정된다.

[0179] 예를 들어 임의의 아미노산은, 감지할 수 있는 정도의 활성 손실을 초래하지 않은 채 단백질 구조 내 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 단백질의 상호작용 능력과 그 성질은 단백질의 생물 기능 활성을 한정하므로, 임의의 아미노산 치환이 단백질 서열뿐만 아니라, 이 단백질 서열을 암호화하는 DNA에서 이루어질 수 있으며, 이와 같은 치환에도 불구하고 유사한 특성을 가지는 단백질이 수득된다. 그러므로 본 발명의 항체 또는 항체 단편의 서열, 또는 이러한 항체나 항체 단편을 암호화하는 상응 DNA 서열에서는, 이 항체 또는 항체 단편의 생물 활성에 감지할 수 있는 정도의 손실이 초래되지 않은 채 다양한 변화가 일어날 수 있음이 고려된다.

[0180] 임의의 아미노산은, 유사한 소수친수 지수 또는 스코어를 가지는 다른 아미노산으로 치환될 수 있으며, 이와 같은 경우에도 여전히 유사한 생물 활성을 가지는 단백질이 수득됨, 즉 여전히 생물 기능이 균등한 단백질이 수득됨이 당 분야에 공지되어 있다.

[0181] 그러므로 상기에 개략적으로 기술된 바와 같이, 아미노산 치환은, 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예컨대 이것의 소수성, 친수성, 전하 및 크기 등을 기반으로 이루어진다. 전술된 다양한 특성들을 고려 대상으로 한 예시적 치환은 당 업자에게 널리 공지되어 있는데, 다음과 같은 것들을 포함한다: 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 그리고 발린, 루신 및 이소루신.

[0182] **당화 변이체**

[0183] 임의의 구현예들에서, 본원에 제공된 항체는, 항체의 당화 정도가 증가 또는 감소하도록 변경된다. 항체에 대한 당화 부위의 부가 또는 결실은, 하나 이상의 당화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0184] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 원산 항체는, 일반적으로 Fc 영역의 CH2 도메인 Asn297에 N-결합을 통하여 부착된, 분지형의 2분쇄(biantennary) 올리고당체를 통상 포함한다. 예를 들어 문헌(Wright et al. *TIBTECH*, vol. 15, pp. 26-32, 1997)을 참조한다. 올리고당체는 다양한 탄수화물, 예컨대 2분쇄 올리고당체 구조의 "줄기"내 GlcNAc에 부착된 푸코스뿐만 아니라, 시알산, 갈락토스, N-아세틸 글루코사민(GlcNAc) 및 만노스를 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 항체 중 올리고당체의 변형은, 임의의 개선했던 특성들을 가지는 항체 변이체를 생성하기 위해 이루어질 수 있다.

- [0185] 일 구현예에서, Fc 영역에 푸코스가 (직접적으로든 간접적으로든) 부착되어 있지 않은 탄수화물 구조를 가지는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어 이러한 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은, 예를 들어 WO 2008/077546에 기술된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광법에 의해 측정된 바에 따르면, Asn 297에 부착된 모든 글리코구조(glycostructure)(예컨대 복합체, 하이브리드 및 고급 만노스 구조) 양의 총 합에 대한, 당 사슬 내 Asn297에 있는 푸코스의 평균 양을 산정함으로써 결정된다. Asn297은 Fc 영역 내 약 297번 위치(Fc 영역 잔기의 Eu식 번호매김)에 존재하는 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체 내 소규모 서열 변이로 인하여 297번 위치의 약 ± 3 개 아미노산 상류 또는 하류(즉, 294번 위와 300번 위치 사이)에 위치하게 될 수도 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 예를 들어 미국 특허출원공보 US 2003/0157108(Presta, L.); US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)를 참조한다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스 결핍된" 항체 변이체와 관련된 공보의 예들로서는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌(Okazaki et al. *J. Mol. Biol.*, vol. 336, pp. 1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.*, vol. 87, pp. 614-622, 2004)을 포함한다. 탈푸코실화된 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예들로서는 단백질 푸코실화가 일어나지 않은 Lec13 CHO 세포(Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 249, pp. 533-545, 1986; 미국 특허출원 US 2003/0157108 A; 및 WO 2004/056312 A1, 구체적으로 실시예 11)와, 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라아제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포를 포함한다(예를 들어 문헌(Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.*, vol. 87, pp. 614-622, 2004; Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 94, pp. 680-688, 2006; 및 WO2003/085107) 참조).
- [0186] 이분된 올리고당체를 가지는 항체 변이체, 즉 항체 Fc 영역에 부착된 2분쇄 올리고당체가 GlcNAc에 의해 이분되어 있는 항체 변이체가 추가로 제공된다. 이러한 항체 변이체는 감소한 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 보일 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예들은, 예를 들어 WO 2003/011878; 미국 특허 제6,602,684호; 및 US 2005/0123546에 기술되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당체 내에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 가지는 항체 변이체도 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 보일 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예컨대 WO 1997/30087; WO 1998/58964; 및 WO 1999/22764에 기술되어 있다.
- [0187] **Fc 영역 변이체**
- [0188] 임의의 구현예들에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입될 수 있으며, 이로써 Fc 영역 변이체가 생성된다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형(예컨대 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역(예컨대 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역) 서열을 포함할 수 있다.
- [0189] 임의의 구현예들에서, 본 발명은 항체 변이체를, 항체의 생체 내 반감기가 중요한 응용예에 요망되는 후보로 만 들어주는, 효과기 기능을 (전부는 아니고 약간만) 보유하는 항체 변이체를 고려하지만, 어떤 효과기 기능(예컨대 ADCC)은 불필요하거나 유해하다. 시험관 내 및/또는 생체 내 세포독성 검정법은 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어 Fc 수용체(FcR) 결합 검정법은, 항체가 Fc γ R 결합능은 상실하되(그리고 이로 인하여 ADCC 활성도 보이지 않을 수 있게 되지만), FcRn 결합능은 보유하는 것을 보장하기 위해 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 오로지 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포상 FcR 발현은 문헌(Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 9, pp. 457-492, 1991)의 484페이지 표 5에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관 내 검정법의 비제한적 예들은 미국 특허 제5,500,362호(예를 들어 문헌(Hellstrom et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 83, pp. 7059-7063, 1986) 및 문헌(Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 82, pp. 1499-1502, 1985)도 참조); 미국 특허 제5,821,337호(문헌(Bruggemann et al., *J. Exp. Med.*, vol. 166, pp. 1351-1361, 1987)도 참조)에 기술되어 있다. 대안적으로, 비방사성 검정 방법이 사용될 수 있다(예를 들어 유세포분석을 위한 ACT1™ 비방사성 세포독성 검정(CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.); 및 CytoTox 96® 비방사성 세포독성 검정(Promega, Madison, Wis.) 참조). 이러한 검정에 유용한 효과기 세포로서는 말초혈액단핵세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내, 예컨대 동물 모델, 예컨대 문헌(Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 652-656, 1998)에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 검정은 또한, 항체가 C1q와 결합할 수 없는 관계로 CDC 활성을 보이지 않음을 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 예를 들어 WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA 를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, CDC

검정법이 수행될 수 있다(예를 들어 문헌(Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, vol. 202, pp.163-171, 1996; Cragg, M. S. et al., *Blood*, vol. 101, pp. 1045-1052, 2003; and Cragg, M. S, and M. J. Glennie, *Blood*, vol. 103, pp. 2738-2743, 2004) 참조). FcRn 결합 및 생체 내 청소율/반감기 측정 또한 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어 문헌(Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.*, vol. 18, pp. 1759-1769, 2006) 참조).

[0190] 효과기 기능이 감소한 항체는, 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329번 Fc 영역 잔기들 중 하나 이상의 치환을 가지는 항체를 포함한다(미국 특허 제6,737,056호). 이러한 Fc 돌연변이체는 265, 269, 270, 297 및 327번 아미노산 위치들 중 2개 이상에서 치환이 일어난 Fc 돌연변이체, 예를 들어 265번 및 297번 잔기의 알라닌으로의 치환이 일어난 소위 "DANA" Fc 돌연변이체를 포함한다(미국 특허 제7,332,581호).

[0191] FcR과의 결합이 개선되었거나 감소한 임의의 항체 변이체가 기술되어 있다(예를 들어 문헌(미국 특허 제 6,737,056호; WO 2004/056312, 및 Shields et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 9, pp. 6591-6604, 2001) 참조).

[0192] 임의의 구현예들에서, 항체 변이체는 ACDD를 개선하는 아미노산 치환, 예컨대 Fc 영역의 298, 333, 및/또는 334번 위치(잔기의 EU식 번호매김)에서의 치환 하나 이상이 일어난 Fc 영역을 포함한다.

[0193] 몇몇 구현예들에서, Fc 영역에 변경이 일어나고, 이로 인하여, 예를 들어 문헌(미국 특허 제6,194,551호, WO 99/51642, 및 Idusogie et al. *J. Immunol.*, vol. 164, pp. 4178-4184, 2000)에 기술된 바와 같이, 변경된(즉 개선 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC)이 초래된다.

[0194] 반감기가 증가하였고, 모체 IgG를 태반으로 운반하는 데에 관여하는 신생아 Fc 수용체(FcRn)(Guyer et al., *J. Immunol.*, vol. 117, pp. 587-593, 1976 and Kim et al., *J. Immunol.*, vol. 24, p. 249, 1994)와의 결합 능력이 개선된 항체는 US2005/0014934에 기술되어 있다. 이 항체는, 그 내부에 Fc 영역과 FcRn의 결합을 개선하는 치환이 하나 이상 일어난 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434번 Fc 영역 잔기 하나 이상에 치환이 일어난 것, 예를 들어 434번 Fc 영역 잔기에 치환이 일어난 것을 포함한다(미국 특허 제7,371,826호). Fc 영역 변이체의 또 다른 예에 관한 문헌(Duncan & Winter, *Nature*, vol. 322, pp. 738-740, 1988; 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 그리고 WO 94/29351)도 또한 참조한다.

[0195] 시스테인 조작 항체 변이체

[0196] 임의의 구현예들에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스테인 잔기로 치환된 시스테인 조작 항체, 예컨대 "thioMAb"을 제조하는 것이 요망될 수 있다. 특정 구현예들에서, 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 일어난다. 이러한 잔기들을 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기는 항체의 접근 가능한 부위들에 위치하게 되고, 이 반응성 티올기는 다른 기, 예컨대 약물기 또는 링커-약물기와 항체의 접합에 사용될 수 있고, 그 결과 본원에 추가로 기술된 바와 같은 면역접합체가 생성될 수 있다. 임의의 구현예들에서, 하기 잔기들 중 임의의 것, 즉 경쇄의 V205(Kabat 번호매김방식); 중쇄의 A118(EU 번호매김방식); 그리고 중쇄 Fc 영역의 5400번 잔기(EU 번호매김방식) 하나 이상이 시스테인으로 치환될 수 있다. 시스테인 조작 항체는, 예컨대 미국 특허 제 7,521,541호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0197] 항체 유도체

[0198] 임의의 구현예들에서, 본원에 제공된 항체 또는 항체 단편은, 당 분야에 공지되어 있으며, 용이하게 입수 가능한 추가의 비단백질성 기를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체 또는 항체 단편의 유도체화에 적합한 기로서는 수용성 중합체들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 수용성 중합체의 비제한적 예들로서는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 공중합체, 폴리아미노산(동중중합체 또는 랜덤 공중합체), 그리고 텍스트란 또는 폴리(n-비틸 피롤리돈)폴리페틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 동중중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예컨대 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이것들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 자체의 수중 안정성으로 말미암아 제조시 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있으며, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체 또는 항체 단편에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있는데, 만일 하나를 초과하는 중합체가 부착되면, 이 중합체는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로 유도체화에 사용된 중합체의 수 및/또는 유형은, 개선된 항체 또는 항체 단편의 구체적인 특성들 또는 기능들, 또는 해당 유도체가 한정된 조건 하에서 치료법에 사용될지 여부 등을 포함하되, 이에 한정되지는 않는 고려사항들을

기반으로 결정될 수 있다.

- [0199] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항체 단편과 비단백질성 기의 접합체로서 복사선에의 노출을 통해 선택적으로 가열될 수 있는 접합체가 제공된다. 일 구현예에서, 비단백질성 기는 탄소 나노튜브이다(Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 11600-11605, 2005). 복사선은 임의의 파장의 것일 수 있으며, 보통의 세포에는 해를 미치지 않지만, 비 단백질성 기를, 항체-비단백질성 기와 인접하는 세포가 사멸되는 온도까지 가열시키는 파장의 복사선들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0200] 또 다른 양태에서, 본 발명은 분리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드 또는 분리된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함하는 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 분리된 중쇄 가변 영역 폴리펩티드는 각각 서열 번호 1 내지 서열 번호 3을 가지는 H1, H2 및 H3 영역을 포함한다. 분리된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 각각 서열 번호 4 내지 서열 번호 6을 가지는 L1, L2 및 L3 영역을 포함한다.
- [0201] 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 종양 미세환경 조건에서 Ax1에 대한 결합 친화성이, 비 종양 미세환경 조건에서의 Ax1에 대한 결합 친화성보다 더 크다. 일 구현예에서, 종양 미세환경 조건 및 비 종양 미세환경 조건 둘 다는 pH이다. 그러므로 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 pH 약 5 ~ 약 6.8에서는 Ax1에 선택적으로 결합할 수 있지만, 정상 생리적 환경에서 마주하게 되는 pH 7.2 ~ 약 7.8에서는 Ax1에의 결합 친화성이 더 작을 것이다. 실시예 3 ~ 4에 보인 바와 같이, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 결합 친화성이 더 크다.
- [0202] 임의의 구현예들에서, 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은, 종양 미세환경 조건 하에서 Ax1과의 해리 상수 (Kd)가 약 1 μ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 0.01 nM, 또는 ≤ 0.001 nM(예컨대, 10^{-8} M 이하, 또는 10^{-8} M 내지 10^{-13} M, 또는 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)이다. 일 구현예에서, 종양 미세환경 조건 하 항체 또는 항체 단편의 Ax1과의 Kd 값 대 비 종양 미세환경의 동일 조건 하 항체 또는 항체 단편의 Ax1과의 상이한 Kd값의 비율은, 적어도 약 1.5:1, 적어도 약 2:1, 적어도 약 3:1, 적어도 약 4:1, 적어도 약 5:1, 적어도 약 6:1, 적어도 약 7:1, 적어도 약 8:1, 적어도 약 9:1, 적어도 약 10:1, 적어도 약 20:1, 적어도 약 30:1, 적어도 약 50:1, 적어도 약 70:1 또는 적어도 약 100:1이다.
- [0203] 일 구현예에서, Kd는, 하기 검정을 이용하여 관심 항체의 Fab 형태 및 이의 항원으로 수행되는 방사성 표지 항원 결합 검정(RIA)에 의해 측정된다. 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화성은, 미표지화 항원의 연속 적정이 이루어질 때 최소 농도만큼의 (^{125} I)-표지화 항원으로 Fab를 평형화한 다음, 결합한 항원을 항 Fab 항체 코팅 평판에 포착시킴으로써 측정된다(예컨대 문헌(Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)) 참조). 검정에 대한 조건을 확립하기 위해, MICROTITER® 다중 웰 평판(Thermo Scientific)은 밤새도록 50 mM 탄산나트륨(pH 9.6) 중 포착 항 Fab 항체(Cappel Labs) 5 μ g/ml으로 코팅되고, 이후 2 시간 내지 5 시간 동안 실온(대략 23 °C)에서 PBS 중 소 혈청 알부민 2%(w/v)로 차단된다. 비 흡착성 평판(Nunc #269620)에서 [^{125} I]-항원 100 pM 또는 26 pM은(예컨대 문헌(Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997))의 항 VEGF 항체, Fab-12의 평가 방법과 동일하게), 관심 Fab의 일련의 희석액과 혼합된다. 그 다음, 관심 Fab는 밤새도록 항온처리되지만; 항온 처리는 평형상태에 도달하는 것을 보장하도록 이보다 더 오랫동안(예컨대 약 65 시간) 계속될 수 있다. 그 다음, 혼합물은 실온에서의 항온처리(예컨대 1 시간 동안의 항온처리)를 위해 포착 평판에 옮겨진다. 이후 용액이 제거되고, 평판은 PBS 중 0.1% 폴리솔베이트 20(TWEEN-20®)로 8회 세척된다. 평판이 건조되면, 웰당 신틸런트(scintillant)(MICROSCINT-20™; Packard) 150 μ l가 첨가되며, 평판을 대상으로 TOPCOUNT™ 감마 카운터(Packard) 상에서 10분 동안 카운팅(counting)이 이루어진다. 경쟁적 결합 검정에 사용하기 위해 최대 결합능의 20% 이하의 결합능을 보이는, 각 Fab의 농도를 선택한다.
- [0204] 또 다른 구현예에 따라, Kd는 BIACORE®-2000 또는 BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 이용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 통해 25°C에서 약 10 반응 단위(RU)로 측정된다(이때, 부동화 항원 CM5 칩 사용). 간단히 말해서, 카복시메틸화된 텍스트란 바이오센서 칩(CM5, BIAcore, Inc.)은, 제조자의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 염화수소산염(EDC)과 N-하이드록시수축신이미드(NHS)로 활성화된다. 항원은 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.8)로 5 μ g/ml(약 0.2 μ M)로 희석된 후, 5 μ l/분의 유속으로 주사되고, 그 결과 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위(RU)가 달성된다. 항원이 주사된 후 1M 에탄올아민이 주사되면 미반응기는 차단된다. 속도 측정을 위해 Fab의 2배 연속 희석액(0.78 nM $\rightarrow$ 500 nM)이 PBS 중에 용해되어 25°C에서 0.05% 폴리솔베이트 20(TWEEN-20™) 계면활성제(PBST)와 함께 유속 대략 25 μ l/분으로 주사된다. 결합 속도(k_{on}) 및 해리 속도(k_{off})는 간단한 1 대 1 랭뮤어 결합 모델(BIACORE® Evaluation Software version

3.2)을 이용하여 결합 센서그램과 해리 센서그램을 동시에 피팅(fitting)함으로써 산정된다. 평형 해리 상수 (K_d)는 비율 k_{off}/k_{on} 로서 산정된다. 예를 들어 문헌(Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999))을 참조한다. 만일 결합 속도(on-rate)가 상기 플라스몬 공명 검정에 따라 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 를 초과하면, 이 결합 속도는, 분광계, 예컨대 중단-흐름 장치(stop-flow)가 장착된 분광분석계(Aviv Instruments) 또는 8000 시리즈 SLM-AMINCO™ 분광분석계(ThermoSpectronic)(교반 큐벳 포함)에서 측정되는 바와 같이 항원의 농도가 증가하는 가운데, 25℃에서 PBS(pH 7.2) 중 20 nM 항 항원-항체(Fab 형태)의 형광 발광 세기의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 소광 기술(fluorescent quenching technique)(여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 대역 통과)을 사용하여 측정될 수 있다.

[0205] 본 발명의 항 Ax1 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체일 수 있다. 일 구현예에서, 항 Ax1 항체 단편, 예컨대 Fv, Fab, Fab', Fab'', -SH, scFv, 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 $F(ab')_2$ 단편, 및 항체 단편들로부터 생성된 다중 특이적 항체가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 항체는 본원에 정의된 바와 같은 전장 항체, 예컨대 비변형 IgG 항체, 또는 기타 항체 군 또는 이소타입이다. 임의의 항체 단편에 관한 검토를 위해서는, 문헌(Hudson et al. *Nat. Med.*, vol. 9, pp. 129-134, 2003)을 참조한다. scFv 단편에 관한 검토를 위해서는, 예컨대 문헌(Pluckthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); 및 WO 93/16185; 및 미국 특허 제5,571,894호 및 동 제5,587,458호)을 참조한다. 구원 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고, 생체 내 반감기가 증가한 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편에 관한 검토를 위해서는, 미국 특허 제5,869,046호를 참조한다.

[0206] 본 발명의 다이아바디는 2가 또는 이중 특이적일 수 있다. 예를 들어 다이아바디에 관한 문헌들(EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 6444-6448, 1993)을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디에 관한 예들은 또한 문헌(Hudson et al., *Nat. Med.*, vol. 9, pp. 129-134, 2003)에 기술되어 있다.

[0207] 몇몇 구현예들에서, 본 발명은 항체의 중쇄 가변 영역 전부 또는 일부나, 항체의 경쇄 가변 영역 전부 또는 일부를 포함하는 단일 도메인 항체 단편을 포함한다. 임의의 구현예들에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 예를 들어 미국 특허 제6,248,516 B1호 참조).

[0208] 항체 단편은 본원에 기술된 바와 같은 다양한 기술, 예를 들어 비변형 항체의 단백질분해성 분해뿐만 아니라, 재조합 숙주 세포에 의한 생산(이에 한정되는 것은 아님)에 의해 제조될 수 있다.

[0209] 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 항 Ax1 항체는 키메라 항체일 수 있다. 임의의 키메라 항체는, 예컨대 문헌(미국 특허 제4,816,567호; 및 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 81, pp. 6851-6855, 1984)에 기술되어 있다. 일 예에서, 키메라 항체는 비 인간 가변 영역(예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 인간 이외의 영장류, 예컨대 원숭이)과, 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 모 항체의 군 또는 하위군을 기준으로 하였을 때 항체의 군 또는 하위군이 바뀐 "군 변동(class switched)" 항체이다. 키메라 항체는 자체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0210] 임의의 구현예들에서, 본 발명의 키메라 항체는 인간화 항체이다. 통상적으로 이러한 비 인간 항체는 인간에 대한 면역원성이 감소하는 한편, 비 인간 모 항체의 특이성과 친화성은 보유하도록 인간화된다. 일반적으로 인간화 항체는, CDR(또는 이의 일부)이 비 인간 항체로부터 유래하고, FR(또는 이의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래한 가변 도메인을 하나 이상 포함한다. 인간화 항체는 또한, 선택적으로 인간 불변 영역의 최소한의 일부를 포함할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 인간화 항체 내 몇몇 FR 잔기는, 예를 들어 항체의 특이성이나 친화성을 회복 또는 개선하기 위하여, 비 인간 항체(예컨대 CDR 잔기의 기원이 된 항체)로부터 유래하는 상응 잔기들로 치환된다.

[0211] 인간화 항체 및 이를 제조하는 방법은, 예컨대 문헌(Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 1619-1633, 2008)에 검토되어 있으며, 또한, 예컨대 문헌(Riechmann et al., *Nature*, vol. 332, pp. 323-329, 1988; Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, vol. 86, pp. 10029-10033, 1989; 미국 특허 제 5,821,337호, 동 제7,527,791호, 동 제6,982,321호 및 동 제7,087,409호; Kashmiri et al., *Methods*, vol. 36, pp. 25-34, 2005 (SDR (a-CDR) 이식에 관하여 기술); Padlan, *Mol. Immunol.*, vol. 28, pp. 489-498, 1991 ("표면재포장(resurfacing)"에 관하여 기술); Dall'Acqua et al., *Methods*, vol. 36, pp. 43-60, 2005 ("FR 서플링"에 관하여 기술); 및 Osbourn et al., *Methods*, vol. 36, pp. 61-68, 2005 및 Klimka et al., *Br. J. Cancer*, vol. 83, pp. 252-260, 2000 ("FR 서플링에 대한"안내 선택"접근법에 관하여 기술)에 추가로 기술되

어 있다.

[0212] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역으로서는, "베스트-핏(best-fit)" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예컨대 Sims et al. *J. Immunol.*, vol. 151, p. 2296, 1993 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정 하위군에 속하는 인간 항체의 공통 서열로부터 유래하는 프레임워크 영역(예컨대 Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, p. 4285, 1992; 및 Presta et al. *J. Immunol.*, vol. 151, p. 2623, 1993 참조); 인간 성숙(체 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역(예컨대 Almagro and Fransson, *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 1619-1633, 2008 참조); 그리고 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래한 프레임워크 영역(예컨대 Baca et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 272, pp. 10678-10684, 1997 및 Rosok et al., *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 22611-22618, 1996 참조)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0213] 몇몇 구현예들에서, 본 발명의 항 Ax1 항체는 다중 특이적, 예컨대 이중 특이적 항체이다. 다중 특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대하여 결합 특이성을 가지는 모노클로날 항체이다. 임의의 구현예들에서, 결합 특이성들 중 하나는 Ax1에 대한 것이고, 다른 하나는 또 다른 항원에 대한 것이다. 임의의 구현예들에서, 이중 특이적 항체는 Ax1의 상이한 에피토프 2개에 결합할 수 있다. 이중 특이적 항체는 또한 세포독성 체제를, Ax1을 발현하는 세포에 국소화하는데 사용될 수도 있다. 이중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0214] 다중 특이적 항체를 제조하기 위한 기술로서는, 상이한 특이성을 가지는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 재조합 공동발현법(문헌(Milstein and Cuello, *Nature*, vol. 305, pp. 537-540, 1983), WO 93/08829, 및 Traunecker et al., *EMBO J.* vol. 10, pp. 3655-3659, 1991) 참조), 그리고 "납-인-홀(knob-in-hole)" 조작용법(예컨대 미국 특허 제5,731,168호)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다중 특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위한 정전기적 조종 효과(electrostatic steering effect) 조작용(WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 항체 단편의 가교(예를 들어 미국 특허 제4,676,980호 및 Brennan et al., *Science*, vol. 229, pp. 81-83, 1985 참조); 이중 특이적 항체를 제조하기 위한 루신 지퍼의 사용(예를 들어 Kostelny et al., *J. Immunol.*, vol. 148, pp. 1547-1553, 1992 참조); 이중 특이적 항체 단편을 제조하기 위한 "다이아바디" 기술의 사용(예를 들어 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 90, pp. 6444-6448, 1993 참조); 단일 사슬 Fv(scFv) 이량체 사용(예컨대 Gruber et al., *J. Immunol.*, vol. 152, pp. 5368-5374, 1994 참조); 그리고, 예컨대 문헌(Tutt et al. *J. Immunol.*, vol. 147, pp. 60-69, 1991)에 기술된 바와 같은 3중 특이적 항체의 제조에 의해 제조될 수 있다.

[0215] "옥토퍼스 항체(Octopus antibody)"를 비롯하여, 3개 이상의 작용성 항원 결합 부위를 가지는 조작용 항체도 또한 본원에 포함된다(예컨대 US 2006/0025576A1 참조).

[0216] 항체 또는 항체 단편도 또한 Ax1뿐만 아니라, 또 다른 상이한 항원과도 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는"이중 작용성 Fab" 또는 "DAF"를 포함할 수 있다(예를 들어 US 2008/0069820 참조).

[0217] 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은, US 2016/0017040에 상세히 기술되어 있는 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 제조될 수 있다.

[0218] 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물 활성은 당 분야에 공지된 다양한 검정법에 의해 시험 및 측정될 수 있다. 이러한 검정법들 중 일부는 미국 특허 제8,853,369호에 기술되어 있다.

[0219] B. 면역접합체

[0220] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성 제제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예컨대 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 단백질 독소, 효소 활성 독소, 또는 이것들의 단편) 또는 방사성 동위원소와 접합된 본원의 항 Ax1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0221] 일 구현예에서, 면역접합체는, 항체가 하나 이상의 약물, 예를 들어 메이탄시노이드(미국 특허 제5,208,020호, 동 제5,416,064호 및 유럽특허 제EP 0 425 235 B1호 참조); 오리스타틴, 예컨대 모노메틸오리스타틴 약물기 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)(미국 특허 제5,635,483호 및 동 제5,780,588호 및 동 제7,498,298호); 돌라스타틴; 칼리키아미신 또는 이의 유도체(미국 특허 제5,712,374호, 동 제5,714,586호, 동 제5,739,116호, 동 제5,767,285호, 동 제5,770,701호, 동 제5,770,710호, 동 제5,773,001호 및 동 제5,877,296호; Hinman et al., *Cancer Res.*, vol. 53, pp. 3336-3342, 1993; 및 Lode et al., *Cancer Res.*, vol. 58, pp. 2925-2928, 1998 참조); 안트라사이클린, 예컨대 도노마이신 또는 독소루비신(Kratz et al., *Current Med. Chem.*, vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, vol. 16, pp. 358-362, 2006;

Torgov et al., *Bioconj. Chem.*, vol. 16, pp. 717-721, 2005; Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pp. 829-834, 2000; Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, vol. 12, pp. 1529-1532, 2002; King et al., *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 4336-4343, 2002; 및 미국 특허 제6,630,579호 참조); 메토트렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065(이에 한정되는 것은 아님)와 접합된 항체-약물 접합체(ADC)이다.

[0222] 또 다른 구현예에서, 면역접합체는 효소 활성인 독소 또는 이의 단편, 예컨대 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우라이테스 포르다이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 리스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센(이에 한정되는 것은 아님)에 접합된, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다.

[0223] 또 다른 구현예에서, 면역접합체는 방사성 원자에 접합되어 방사성접합체를 형성하는, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체 제조에 사용될 수 있다. 그 예들로서는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체가 검출을 위해 사용되면, 이 접합체는 신티그래프 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 또는 ^{112}In , 또는 핵 자기공명(NMR) 영상화(자기공명영상화, MRI라고도 공지됨)를 위한 스핀 표지, 예컨대 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오르-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 등을 포함할 수 있다.

[0224] 항체 및 세포독성 제제의 접합체는, 다양한 2 작용성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리디닐티오)프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 2 작용성 유도체(예컨대 디메틸 아디피미테이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대 비스(p-아지도벤조일)헥사디아민, 비스-디아조늄 유도체(예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 이중활성(bis-active) 플루오르 화합물(예컨대 1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어 리신 면역독소는 문헌(Vitetta et al., *Science*, vol. 238, pp. 1098-, 1987)에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14 표지화된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 항체에 방사성핵종을 접합하기 위한 예시적 킬레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포독성 약물의 세포로의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어 산 불안정성 링커, 펩티다아제 감수성 링커, 광불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커(Chari et al., *Cancer Res.*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; 미국 특허 제5,208,020호)가 사용될 수 있다.

[0225] 본원의 면역접합체는 명백하게 고려되지만, 가교 링커 시약, 예컨대 (예컨대 Pierce Biotechnology, Inc.(Rockford, Ill., U.S.A)로부터) 시판되고 있는 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SLAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC 및 설폰-SMPB, 그리고 SVSB(숙신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)(이에 한정되는 것은 아님)로 제조된 접합체에 한정되는 것은 아니다.

[0226] ADC의 예시적 구현예는 종양 세포를 표적화하는 항체(Ab), 약물기(D), 그리고 Ab를 D에 부착시키는 링커기(L)를 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 항체는 하나 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 리신 및/또는 시스테인을 통해 링커기(L)에 부착된다.

[0227] 예시적 ADC는 화학식 I, 즉 $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ [식 중, p는 1 내지 약 20임]을 가진다. 몇몇 구현예들에서, 항체에 접합될 수 있는 약물기의 수는 유리 시스테인 잔기의 수에 의해 한정된다. 몇몇 구현예들에서, 유리 시스테인 잔기는 본원에 기술된 방법에 의해 항체 아미노산 서열에 도입된다. 화학식 I의 예시적 ADC는 1, 2, 3 또는 4 개의 조작된 시스테인 아미노산을 가지는 항체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다(Lyon et al., *Methods in Enzym.*, vol. 502, pp. 123-138, 2012). 몇몇 구현예들에서, 하나 이상의 유리 시스테인 잔기는 조작이 수행되지 않은 항체 내에 이미 존재하는데, 이 경우 기존의 유리 시스테인 잔기는 항체를 약물에 접합하는데 사용될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 하나 이상의 유리 시스테인 잔기를 생성시키기 위하여 항체는 환원 조건에 노출된 후, 접합이 이루어진다.

[0228] a) 예시적 링커

[0229] "링커(L)"는 하나 이상의 기, 예컨대 약물기(D)를 항체(Ab)와 연결시켜 화학식 I의 ADC와 같은 면역접합체를 형성하는데 사용될 수 있는 2 작용성 또는 다작용성 기이다. 몇몇 구현예들에서, ADC는, 약물 및 항체에의 공유 부착에 대해 반응성인 작용기를 가지는 링커를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 구현예들에서, 항체(Ab)의 시스테인 티올은, 링커 또는 약물-링커 중간체의 반응성 작용기와 결합을 형성하여, ADC를 이룰 수 있다.

[0230] 하나의 양태에서, 링커는 항체에 존재하는 유리 시스테인과 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 작용기를 가진다. 이러한 반응성 작용기의 비제한적 예들로서는 말레이미드, 할로아세트아미드, α -할로아세틸, 활성화된 에스테르, 예컨대 숙신이미드 에스테르, 4-니트로페닐 에스테르, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 무수물, 산 염화물, 설폰 염화물, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함한다. 예를 들어 문헌(Klussman, et al, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 15, pp. 765-773, 2004) 766 페이지의 접합 방법을 참조한다.

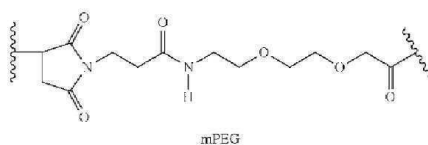
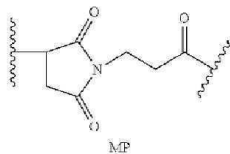
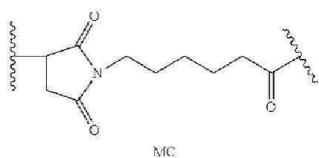
[0231] 몇몇 구현예들에서, 링커는, 항체에 존재하는 친전자성기와 반응할 수 있는 작용기를 가진다. 이러한 친전자성기의 예로서는 알데히드 및 케톤 카보닐 기를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 링커의 반응성 작용기 중 이중 원자는 항체 상의 친전자성기와 반응할 수 있으며, 이로써 항체 단위에 대한 공유 결합이 형성될 수 있다. 이러한 반응성 작용기의 비제한적 예로서는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트 및 아릴히드라지드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0232] 링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시적 링커 성분으로서는 6-말레이미도카프로일("MC"), 말레이미도프로파노일("MP"), 발린-시트룰린("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카보닐("PAB"), N-숙신이미드 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트("SPP"), 그리고 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1 카복실레이트("MCC")를 포함한다. 다양한 링커 성분이 당 분야에 공지되어 있으며, 이것들 중 일부는 이하에 기술되어 있다.

[0233] 링커는 약물의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 절단 가능한 링커의 비제한적 예로서는, 산 불안정성 링커(예컨대 히드라존 포함 링커), 프로테아제 감수성(예컨대 펩티다아제 감수성) 링커, 광불안정성 링커 또는 이황화물 함유 링커를 포함한다(Chari et al., *Cancer Research*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; 미국특허 제5,208,020호).

[0234] 임의의 구현예들에서, 링커는 하기 화학식 II, 즉 $-A_a-W_w-Y_y-$ 를 가지는데, 식 중 A는 "확장자 단위(stretcher unit)"이고, a는 1 내지 1의 정수이며; W는 "아미노산 단위"이고, w는 0 내지 12의 정수이며; Y는 "스페이서 단위"이고, y는 0, 1 또는 2이다. 화학식 II의 링커를 포함하는 ADC는 화학식 I(A), 즉 $Ab-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$ 를 가지는데, 식 중 Ab, D 및 p는 상기 화학식 I에 대해 정의된 바와 같이 정의된다. 이러한 링커의 예시적 구현예들은 미국 특허 제7,498,298호에 기술되어 있다.

[0235] 몇몇 구현예들에서, 링커 성분은 항체를 또 다른 링커 성분이나 약물기에 연결시키는 "확장자 단위"(A)를 포함한다. 비제한 예시적 확장자 단위는 이하에 제시되어 있다(다만 물결선은 항체, 약물 또는 추가 링커 성분에 대한 공유 부착 부위를 나타냄):



[0236]

[0237]

몇몇 구현예들에서, 링커 성분은 "아미노산 단위(W)"를 포함한다. 이러한 몇몇 구현예들에서, 아미노산 단위는 프로테아제에 의한 링커의 절단을 허용하여, 세포 내 프로테아제, 예컨대 리소솜 효소에 노출될 때 면역접합체로부터 약물이 방출되는 것을 촉진한다(Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 778-784, 2003). 예시적 아미노산 단위는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 및 펜타펩티드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적 디펩티드로서는 발린-시트룰린(vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌(af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-리신(fk 또는 phe-lys); 페닐알라닌-호모리신(phe-homolys); 그리고 N-메틸-발린-시트룰린(Me-val-cit)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적 트리펩티드로서는 글리신-발린-시트룰린(gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신(gly-gly-gly)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아미노산 단위는 자연 발생하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있고/포함할 수 있거나 작은(minor) 아미노산 및/또는 비 자연 발생 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린 아미노산 단위는 특정의 효소, 예컨대 종양 연관 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소 절단을 위해 디자인 및 최적화될 수 있다.

[0238]

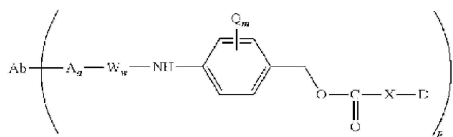
통상적으로 펩티드 유형의 링커는, 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이에 펩티드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 액상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다(예컨대 문헌(E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press)).

[0239]

몇몇 구현예들에서, 링커 성분은 항체를 약물기에 직접적으로 또는 확장자 단위 및/또는 아미노산 단위를 통해 연결시키는, "스페이서 단위(Y)"를 포함한다. 스페이서 단위는 "자기 희생성(self-immolative)" 또는 "비 자기 희생성"일 수 있다. "비 자기 희생성" 스페이서 단위는 스페이서 단위 일부 또는 전부가 ADC 절단시 약물기에 결합된 채 유지되는 것이다. 비 자기 희생성 스페이서 단위의 예들로서는 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 ADC의 종양-세포 연관 프로테아제에 의한 효소 절단은, ADC의 나머지 부분으로부터의 글리신-글리신-약물기 방출을 초래한다. 이러한 몇몇 구현예들에서, 글리신-글리신-약물기는 종양 세포 내 가수분해 단계의 대상이 되고, 이를 통하여 약물기로부터 글리신-글리신 스페이서 단위가 절단되는 것이다.

[0240]

"자기 희생성" 스페이서 단위는 약물기의 방출을 허용한다. 임의의 구현예들에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 이와 같은 몇몇 구현예들에서, p-아미노벤질 알코올이 아마이드 결합을 통해 아미노산 단위에 부착되며, 카바메이트, 메틸카바메이트 또는 카보네이트가 벤질 알코올과 약물 사이에 생성된다(Hamann et al. *Expert Opin. Ther. Patents*, vol. 15, pp. 1087-1103, 2005). 몇몇 구현예들에서, 스페이서 단위는 p-아미노벤질옥시카보닐(PAB)을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 자기 희생성 링커를 포함하는 ADC는 하기 구조, 즉



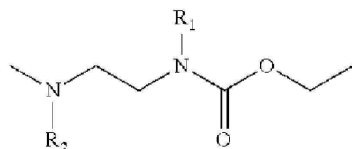
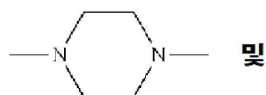
[0241]

[0242]

를 가지는데, 상기 식 중

[0243]

Q는 $-C_1-C_8$ 알킬, $-O-(C_1-C_8)$ 알킬, -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이며; X는 추가의 스페이서 단위 하나 이상일 수 있거나 존재하지 않을 수 있고; p는 1 내지 약 20의 범위이다. 몇몇 구현예들에서, p는 1 내지 10의 범위, 1 내지 7의 범위, 1 내지 5의 범위, 또는 1 내지 4의 범위이다. 비제한 예시적 X 스페이서 단위는



[0244]

[0245]

을 포함하는데, 식 중 R_1 및 R_2 는 독립적으로 H 및 C_1-C_6 알킬로부터 선택된다. 몇몇 구현예들에서, R_1 및 R_2 는 각각 $-CH_3$ 이다.

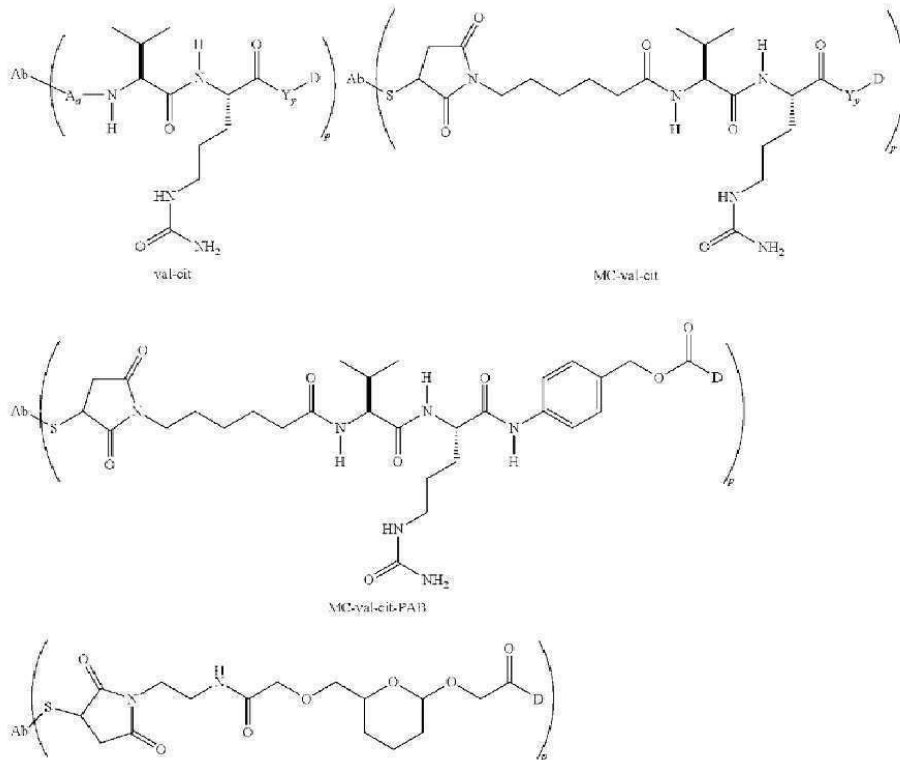
[0246]

자기 희생성 스페이서의 또 다른 예들로서는, PAB기와 전자 성질이 유사한 방향족 화합물, 예컨대 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체(미국 특허 제7,375,078호; Hay et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 9, p. 2237-, 1999)와, 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세트알을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 아마이드 결합 가수분해시 고리화를 수행하는 스페이서, 예컨대 치환 및 비치환 4-아미노부티르산 아마이드(Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, vol. 2, pp. 223-, 1995), 적당히 치환된 비시클로[2.2.1] 및 비시클로[2.2.2] 고리계(Storm et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 94, p. 5815-, 1972) 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드(Amsberry et al., *J. Org. Chem.*, vol. 55, p. 5867, 1990)가 사용될 수 있다. 약물과, 글리신 잔기의 α -탄소의 연결은, ADC에 유용할 수 있는 자기 희생성 스페이서의 또 다른 예이다(Kingsbury et al., *J. Med. Chem.*, vol. 27, p.1447, 1984).

[0247]

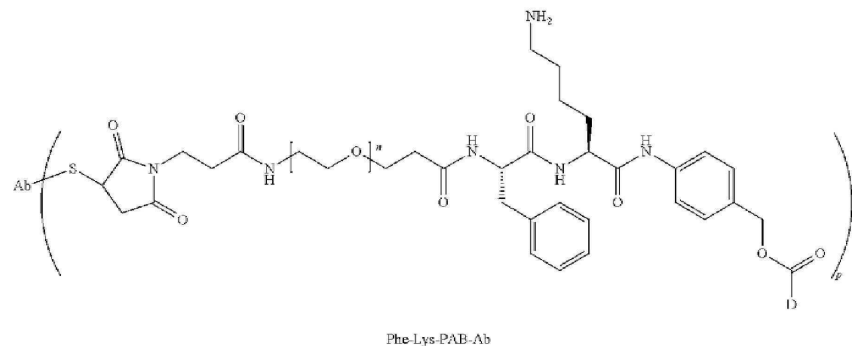
몇몇 구현예들에서, 링커 L은, 분지화 다작용성 링커기를 통해 하나를 초과하는 약물기와 항체를 공유 부착시키기 위한 수지형 링커일 수 있다(Sun et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 12, pp. 2213-2215, 2002; Sun et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol.11, pp. 1761-1768, 2003). 수지상 링커는 약물 대 항체의 몰비(즉 ADC의 효능과 관련된 담지율(loading))를 증가시킬 수 있다. 그러므로 항체가 오로지 하나의 반응성 시스테인 티올기만을 보유하는 경우, 약물기 다수는 수지상 링커를 통하여 부착될 수 있다.

[0248] 화학식 I의 ADC 중 비제한 예시적 링커는 이하에 제시되어 있는데,



[0249]

[0250] 상기 식 중, R₁ 및 R₂는 독립적으로 H 및 C₁-C₆ 알킬로부터 선택된다. 몇몇 구현예들에서, R₁ 및 R₂는 각각 -CH₃이다.



[0251]

[0252] 상기 식 중, n은 0 내지 12이다. 몇몇 구현예들에서, n은 2 내지 10이다. 몇몇 구현예들에서, n은 4 내지 8이다.

닐)부티레이트(SMPB), 숙신이미딜 6-[(베타-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트](SMPH), 이미노티올란(IT), 설포-EMCS, 설포-GMBS, 설포-KMUS, 설포-MBS, 설포-SIAB, 설포-SMCC 및 설포-SMPB, 그리고 숙신이미딜-(4-비닐 설포)벤조에이트(SVSB), 그리고 예를 들어 비스-말레이미드 시약; 디티오비스말레이미도에탄(DTME), 1,4-비스말레이미도부탄(BMB), 1,4비스말레이미드-2,3-디하이드록시부탄(BMDB), 비스말레이미도헥산(BMH), 비스말레이미도 에탄(BMOE), BM(PEG)₂ (이하에 보임), 및 BM(PEG)₃ (이하에 보임); 이미도에스테르의 2 작용성 유도체(예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르(예컨대 디숙신이미딜 수버레이트), 알데히드(예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 그리고 이중 활성 플루오르 화합물(예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)으로 제조된 ADC들을 명백히 고려하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 비스 말레이미드 시약은 항체 중 시스템인 티올기의, 티올 함유 약물기, 링커 또는 링커-약물 중간체와의 부착을 허용한다. 티올기와 반응성인 기타 작용기로서는 요오도아세트아미드, 브로모아세트아미드, 비닐 피리딘, 이황화물, 피리딘 이황화물, 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0258] 임의의 유용한 링커 시약이 다수의 상업적 공급처, 예컨대 Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Ill.), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, Colo.)로부터 취득될 수 있거나, 또는 당 분야에 기술된 방법들, 예컨대 문헌(Toki et al., *J. Org. Chem.*, vol. 67, pp. 1866-1872, 2002; Dubowchik, et al., *Tetrahedron Letters*, vol. 38, pp. 5257-60, 1997; Walker, *J. Org. Chem.*, vol. 60, pp. 5352-5355, 1995; Frisch et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 7, pp. 180-186, 1995; 미국 특허 제6,214,345호; WO 02/088172; US2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 및 WO 04/032828)에 기술된 방법들에 따라 합성될 수 있다.

[0259] 탄소-14 표지화된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은, 항체와 방사성 핵종의 접합을 위한 예시적 킬레이트화제이다. 예컨대 WO 94/11026를 참조한다.

[0260] b) 예시적 약물기

[0261] 1) 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0262] 몇몇 구현예들에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 항체를 포함한다. 메이탄시노이드는 메이탄신의 유도체로서, 튜블린 중합을 억제하는 역할을 하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동 아프리카 관목인 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다(미국 특허 제3,896,111호). 이후 어떤 미생물도 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것이 발견되었다(미국 특허 제4,151,042호). 합성 메이탄시노이드는, 예컨대 미국 특허 제4,137,230호; 동 제4,248,870호; 동 제4,256,746호; 동 제4,260,608호; 동 제4,265,814호; 동 제4,294,757호; 동 제4,307,016호; 동 제4,308,268호; 동 제4,308,269호; 동 제4,309,428호; 동 제4,313,946호; 동 제4,315,929호; 동 제4,317,821호; 동 제4,322,348호; 동 제4,331,598호; 동 제4,361,650호; 동 제4,364,866호; 동 제4,424,219호; 동 제4,450,254호; 동 제4,362,663; 및 동 제4,371,533호에 개시되어 있다.

[0263] 메이탄시노이드 약물기는 항체-약물 접합체에서 매력적인 약물기인데, 그 이유는 이 약물기가 (i) 발효, 또는 발효 생성물의 화학 변형 또는 유도체화에 의해 제조되기가 비교적 용이하고, (ii) 비 이황화물 링커를 통한 항체와의 접합에 적합한 작용기로 유도체화되기 쉬우며, (iii) 혈장 중에서 안정하고, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 유효하기 때문이다.

[0264] 메이탄시노이드 약물기로서 사용하기 적합한 임의의 메이탄시노이드는 당 분야에 공지되어 있으며, 공지된 방법들에 따라 자연 공급원으로부터 분리될 수 있거나, 또는 유전자 조작 기술을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어 문헌(Yu et al., *PNAS*, vol. 99, pp. 7968-7973, 2002) 참조). 메이탄시노이드는 또한 공지된 방법에 따라 합성을 통해 제조될 수도 있다.

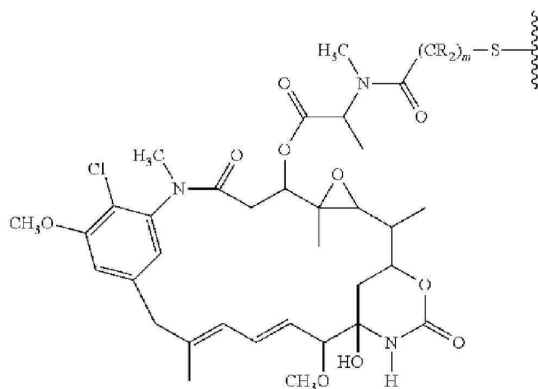
[0265] 예시적 메이탄시노이드 약물기로서는 변형된 방향족 고리를 가지는 것들, 예컨대 C-19-테클로로(미국 특허 제4,256,746호)(예를 들어 안사미토신 P2의 리튬 알루미늄 수화물 환원에 의해 생성됨); C-20-하이드록시(또는 C-20-테메틸) +/- C-19-테클로로(미국 특허 제4,361,650호 및 동 제4,307,016호)(예를 들어 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 또는 악티노마이세스(*Actinomyces*)를 사용하는 탈메틸화, 또는 LAH를 사용하는 탈염소화에 의해 생성됨); 및 C-20-테메톡시, C-20-아실옥시(OCOR), +/- 테클로로(미국 특허 제4,294,757호)(예를 들어 아실 염화물을 사용하는 아실화에 의해 생성됨), 그리고 방향족 고리의 다른 위치에 변형을 가지는 것들을 포함하나,

이에 한정되는 것은 아니다.

[0266] 예시적 메이탄시노이드 약물기는 또한 변형을 가지는 것들, 예컨대 C-9-SH(미국 특허 제4,424,219호)(예를 들어 메이탄시놀과 H_2S 또는 P_2S_5 의 반응에 의해 생성됨); C-14-알콕시메틸(테메톡시/ CH_2OR)(미국 특허 제4,331,598호); C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸(CH_2OH 또는 CH_2OAc)(미국 특허 제4,450,254호)(예를 들어 노카르디아(*Nocardia*)로부터 생성됨); C-15-하이드록시/아실옥시(미국 특허 제4,364,866호)(예를 들어 스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 전환에 의해 생성됨); C-15-메톡시(미국 특허 제4,313,946호 및 동 제 4,315,929호)(예를 들어 트레위아 누들플로라(*Trewia nudiflora*)로부터 분리됨); C-18-N-테메틸(미국 특허 제 4,362,663호 및 동 제4,322,348호)(예를 들어 스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화에 의해 생성됨); 그리고 4,5-테옥시(미국 특허 제4,371,533호)(예를 들어 메이탄시놀의 티타늄 삼염화물/LAH 환원에 의해 생성됨)을 포함한다.

[0267] 메이탄시노이드 화합물 상 다수의 위치들은 연결 위치로서 유용하다. 예를 들어 에스테르 연결은, 종래의 커플 링 기술을 이용하여 하이드록실기와 반응에 의해 형성될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 반응은 하이드록실기를 가지는 C-3 위치, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 하이드록실기로 변형된 C-15 위치, 그리고 하이드록실기를 가지는 C-20 위치에서 발생할 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에 형성된다.

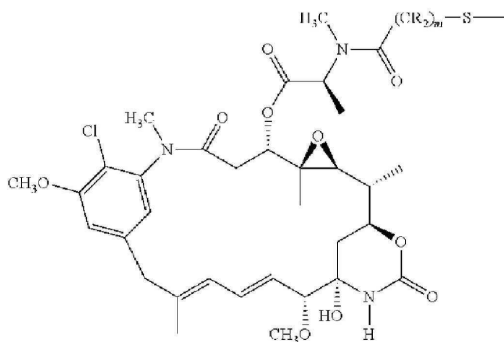
[0268] 메이탄시노이드 약물기는 하기 구조, 즉



[0269]

[0270] 를 가지는 것들을 포함하는데, 여기서 물결선은 메이탄시노이드 약물기 중 황 원자가 ADC의 링커에 공유 부착된 것을 나타낸다. 각각의 R은 독립적으로 H 또는 C_1-C_6 알킬일 수 있다. 아미드기를 황 원자에 부착하는 알킬렌 사슬은 메탄일, 에탄일 또는 프로필일 수 있는데, 즉 m은 1, 2 또는 3이다(미국 특허 제633,410호; 미국 특허 제 5,208,020호; Chari et al., *Cancer Res.*, vol. 52, pp. 127-131, 1992; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996).

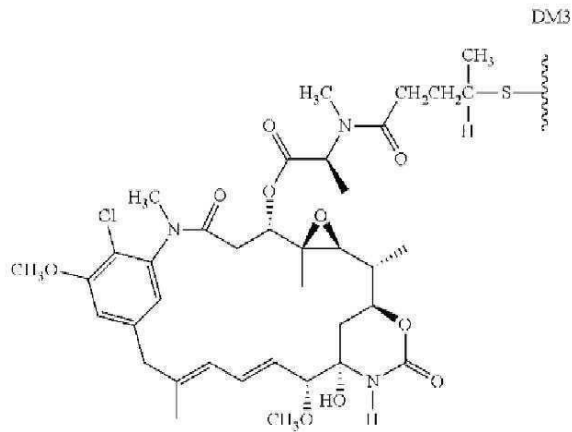
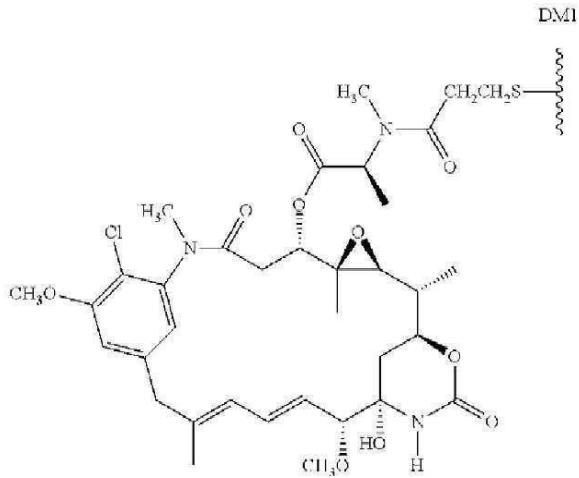
[0271] 메이탄시노이드 약물기의 모든 입체이성체, 즉 키랄 탄소에서의 R 입체배열과 S 입체배열의 입의의 조합이 본 발명의 ADC에 고려된다(미국 특허 제7,276,497호; 미국 특허 제6,913,748호; 미국 특허 제6,441,163호; 미국 특허 제633,410호(RE39151); 미국 특허 제5,208,020호; Widdison et al (2006) *J. Med. Chem.* 49:4392-4408). 몇몇 구현예들에서, 메이탄시노이드 약물기는 하기 입체화학구조, 즉



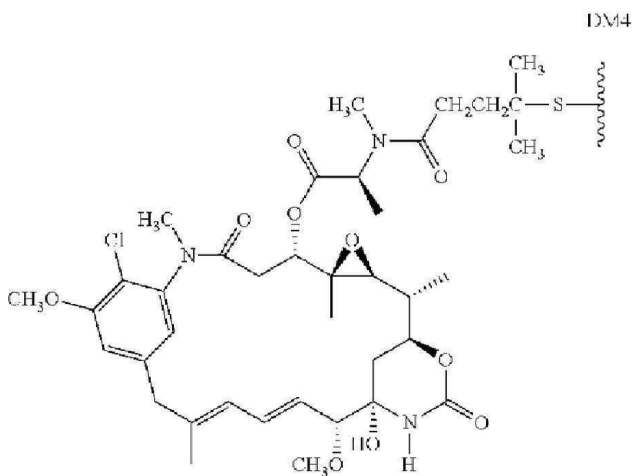
[0272]

[0273] 를 가진다.

[0274] 메이탄시노이드 약물기의 예시적 구현예들은 하기 구조들, 즉



[0275]

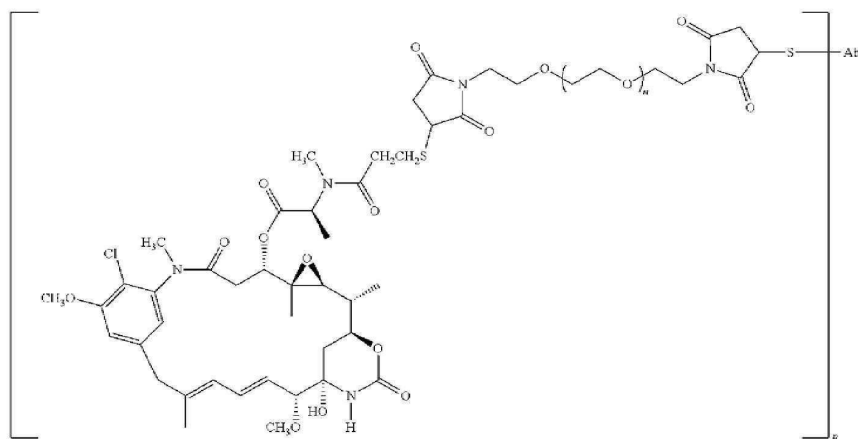


[0276]

[0277] 를 가지는 DM1; DM3; 및 DM4를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아닌데,

[0278] 다만 식중 물결선은 항체-약물 접합체의 링커(L)에 약물의 황 원자가 공유 부착한 것을 나타낸다.

[0279] DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티올기에 연결된, 예시적 항체-약물 접합체는 하기의 구조와 축약어로 표시된다:



[0280]

[0281] [식 중, Ab는 항체이고; n은 0, 1 또는 2이며; p는 1 내지 약 20임]

[0282] 몇몇 구현예들에서, p는 1 내지 10이거나, p는 1 내지 7이거나, p는 1 내지 5이거나, p는 1 내지 4이다.

[0283] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 이를 제조하는 방법, 그리고 이의 치료적 용도가, 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 및 동 제5,416,064호; US 2005/0276812 A1; 및 유럽특허 제EP 0 425 235 B1호에 개시되어 있다. 또한 문헌(Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 8618-8623, 1996; 및 Chari et al., *Cancer Research*, vol. 52, pp. 127-131, 1992)도 참조한다.

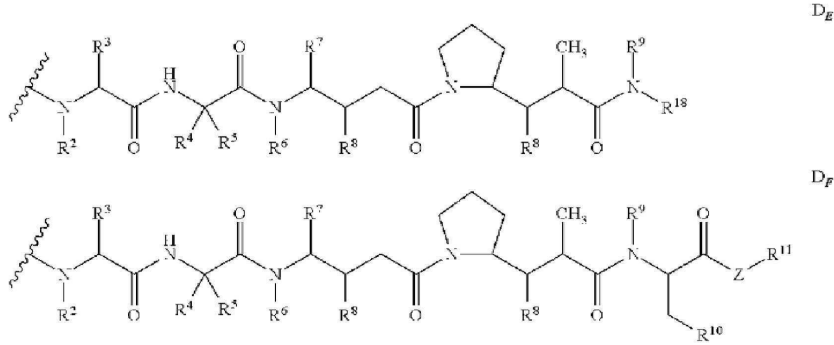
[0284] 몇몇 구현예들에서, 항체-메이탄시노이드 접합체는, 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물 활성을 유의미하게 감소시키지 않은 채 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호를 참조한다. 몇몇 구현예들에서, 항체 분자당 메이탄시노이드 분자가 평균 3 ~ 4개 접합된 ADC는, 항체의 기능 또는 가용성에 부정적인 영향이 초래되지 않은 채 표적 세포의 세포독성을 증강시키는데 효능을 보였다. 몇몇 경우들에서, 심지어 독소/항체 분자 하나는 나출된 항체가 사용되는 경우보다 세포독성을 증강시킬 것으로 예상된다.

[0285] 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하기 위한 예시적 연결기로서는, 예를 들어 본원에 기술된 것들과, 미국 특허 제5,208,020호; 유럽특허 EP 0 425 235 B1; 문헌(Chari et al., *Cancer Research*, vol. 52, pp. 127-131, 1992); US 2005/0276812 A1; 및 US 2005/016993 A1에 개시된 것들을 포함한다.

[0286] (2) 오리스타틴 및 돌라스타틴

[0287] 약물기로서는 돌라스타틴, 오리스타틴 및 이것들의 유사체와 유도체를 포함한다(미국 특허 제5,635,483호; 미국 특허 제5,780,588호; 미국 특허 제5,767,237호; 미국 특허 제6,124,431호). 오리스타틴은 연체 해양동물 화합물인 돌라스타틴-10의 유도체이다. 어떠한 특정 이론에도 국한되고자 하지 않을 때, 돌라스타틴 및 오리스타틴은 미세소관의 동력학, GTP 가수분해, 그리고 핵분열 및 세포분열을 방해하는 것으로 보였고(Woyke et al., *Antimicrob. Agents and Chemother.*, vol. 45, pp. 3580-3584, 2001), 항암 활성(미국 특허 제5,663,149호) 및 항진균 활성(Pettit et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pp. 2961-2965, 1998)을 가지는 것으로 보였다. 돌라스타틴/오리스타틴 약물기는 펩티드성 약물기의 N(아미노) 말단 또는 C(카복실) 말단을 통하여 항체에 부착될 수 있다(WO 02/088172; Doronina et al., *Nature Biotechnology*, vol. 21, pp. 778-784, 2003; Francisco et al., *Blood*, vol. 102, pp. 1458-1465, 2003).

[0288] 예시적 오리스타틴 구현예들로서는 미국 특허 제7,498,298호 및 미국 특허 제7,659,241호에 개시된, N-말단 연결 모노메틸오리스타틴 약물기 D_E 및 D_F, 즉



[0289]

[0290]

[0291]

[0292]

[0293]

[0294]

[0295]

[0296]

[0297]

[0298]

[0299]

[0300]

[0301]

[0302]

[0303]

[0304]

[0305]

[0306]

를 포함하는데,

식 중, D_E 및 D_F 의 물결선은, 독립적으로 각각의 자리에 있는 항체 또는 항체-링커 성분예의 공유 부착 부위를 나타내고,

R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되며;

R^3 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;

R^4 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되며;

R^5 는 H 및 메틸로부터 선택되거나; 또는

R^4 및 R^5 는 함께 카보사이클 고리를 형성하여, 화학식 $-(CR^aR^b)_n-$ [식 중 R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카보사이클로부터 선택되고, n 는 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택됨]를 가지게 되고;

R^6 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되며;

R^7 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 카보사이클), C_3-C_8 헤테로사이클 및 C_1-C_8 알킬-(C_3-C_8 헤테로사이클)로부터 선택되고;

각각의 R^8 은 독립적으로 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클 및 $O-(C_1-C_8$ 알킬)로부터 독립적으로 선택되며;

R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬로부터 선택되고;

R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤테로사이클로부터 선택되며;

Z 는 O, S, NH 또는 NR^{12} 이되, R^{12} 는 C_1-C_8 알킬이고;

R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 로부터 선택되며;

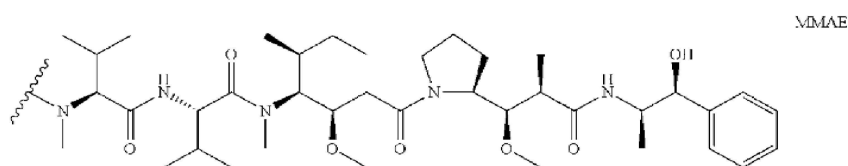
m 은 1 내지 1000 범위의 정수이고;

R^{13} 은 C_2-C_8 알킬이며;

R^{14} 는 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;

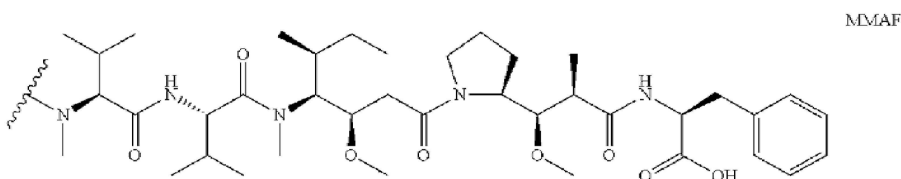
- [0307] e는 각각 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$ 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 알킬이며;
- [0308] e는 각각 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이고;
- [0309] R^{18} 은 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -아릴, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 헤테로사이클) 및 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 카보사이클)로부터 선택되며;
- [0310] n은 0 내지 6의 범위의 정수이다.
- [0311] 일 구현예에서, R^3 , R^4 및 R^7 은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고, R^5 는 -H 또는 메틸이다. 하나의 예시적 구현예에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^5 는 -H이며, R^7 은 sec-부틸이다.
- [0312] 또 다른 구현예에서, R^2 및 R^6 는 각각 메틸이고, R^9 는 -H이다.
- [0313] 또 다른 구현예에서, R^8 은 각각 $-OCH_3$ 이다.
- [0314] 하나의 예시적 구현예에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^2 및 R^6 는 각각 메틸이며, R^5 는 -H이고, R^7 은 sec-부틸이며, R^8 은 각각 $-OCH_3$ 이고, R^9 는 -H이다.
- [0315] 일 구현예에서, Z는 $-O-$ 또는 $-NH-$ 이다.
- [0316] 일 구현예에서, R^{10} 은 아릴이다.
- [0317] 하나의 예시적 구현예에서, R^{10} 은 -페닐이다.
- [0318] 하나의 예시적 구현예에서, Z가 $-O-$ 일 때, R^{11} 은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.
- [0319] 일 구현예에서, Z가 $-NH$ 일 때, R^{11} 은 $-CH(R^{15})_2$ 이되, 다만 R^{15} 는 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 이고, R^{16} 은 C_1-C_8 알킬 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이다.
- [0320] 또 다른 구현예에서, Z가 $-NH$ 일 때, R^{11} 은 $-CH(R^{15})_2$ 이되, 다만 R^{15} 는 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 이다.

[0321] 화학식 D_E의 예시적 오리스타틴 구현예는 MMAE, 즉



[0322] 이되, 다만 물결선은 항체-약물 접합체에 링커(L)가 공유 부착된 것을 나타낸다.

[0324] 화학식 D_E의 예시적 오리스타틴 구현예는 MMAF, 즉



[0325] 이되, 다만 물결선은 항체-약물 접합체에 링커(L)가 공유 부착된 것을 나타낸다.

[0327] 또 다른 예시적 구현예들로서는 펜타펩티드 오리스타틴 약물기의 C-말단에 페닐알라닌 카복시 변형을 가지는 모

노메틸발린 화합물(WO 2007/008848)과, 펜타펩티드 오리스타틴 약물기의 C-말단에 페닐알라닌 측쇄 변형을 가지는 모노메틸발린 화합물(WO 2007/008603)을 포함한다.

[0328] 화학식 I의 ADC에 관한 비제한 예시적 구현예들로서, MMAF와 다양한 링커 성분을 포함하는 것으로서는 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF를 더 포함한다. 단백질분해에 의해 절단될 수 없는 링커에 의해 MMAF가 항체에 부착되어 포함되어 있는 면역접합체는, 단백질분해에 의해 절단될 수 있는 링커에 의해 MMAF가 항체에 부착되어 포함되어 있는 면역접합체 활성화와 거의 동일한 활성을 보유하는 것으로 보인다(Doronina et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 17, pp. 114-124, 2006). 이와 같은 몇몇 구현예들에서, 약물 방출은 세포 내 항체 분해에 의해 이루어지는 것으로 생각된다.

[0329] 통상적으로 펩티드 기반 약물기는, 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 간에 펩티드 결합을 형성시킴으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 액상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다(예컨대 문헌(E. Schröder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) 참조). 몇몇 구현예들에서, 오리스타틴/돌라스타틴 약물기는 문헌(미국 특허 제7,498,298호; 미국 특허 제5,635,483호; 미국 특허 제5,780,588호; Pettit et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, pp. 5463-5465, 1998; Pettit et al., *Anti-Cancer Drug Design*, vol. 13, pp. 243-277, 1998; Pettit et al., *Synthesis*, vol. 6, pp. 719-725, 1996; Pettit et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* vol. 15, pp. 859-863, 1996; and Doronina, *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 778-784, 2003)의 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0330] 몇몇 구현예들에서, MMAE와 같은 화학식 D₆의 오리스타틴/돌라스타틴 약물기, 그리고 MMAF와 같은 화학식 D₆의 오리스타틴/돌라스타틴 약물기와, 이의 약물-링커 중간체 및 유도체, 예컨대 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF 및 MC-vc-PAB-MMAE는, 문헌(미국 특허 제7,498,298호; Doronina et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 17, pp. 114-124, 2006; 및 Doronina et al., *Nat. Biotech.*, vol. 21, pp. 778-784, 2003)에 기술된 방법을 사용하여 제조된 다음, 관심 항체와 접합될 수 있다.

[0331] (3) 칼리키아미신

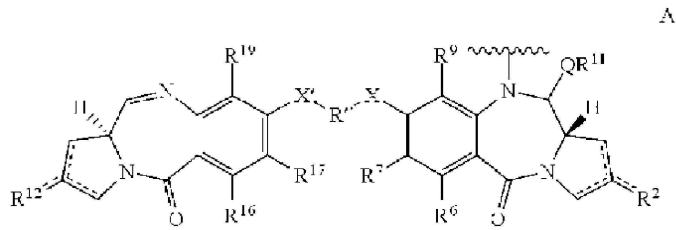
[0332] 몇몇 구현예들에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리키아미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 항생제의 칼리키아미신 과와 이의 유사체들은, 피코몰 이하의 농도로도 이중 가닥 DNA 파괴 부를 만들 수 있다(Hinman et al., *Cancer Research*, vol. 53, pp. 3336-3342, 1993; Lode et al., *Cancer Research*, vol. 58, pp. 2925-2928, 1998). 칼리키아미신은 세포내 작용 부위를 가지지만, 임의의 경우에는 원형질막을 용이하게 건너지 못한다. 그러므로 이러한 제제의 항체 매개 내재화를 통한 세포내 흡수는, 몇몇 구현예들에서 이 제제의 세포독성 효과를 상당히 증가시킬 수 있다. 칼리키아미신 약물을 사용하여 항체-약물 접합체를 제조하는 비제한 예시적 방법들은, 예를 들어 미국 특허 제5,712,374호; 미국 특허 제5,714,586호; 미국 특허 제5,739,116호; 및 미국 특허 제5,767,285호에 기술되어 있다.

[0333] (4) 피롤로벤조디아제핀

[0334] 몇몇 구현예들에서, ADC는 피롤로벤조디아제핀(PBD)을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, PBD 이량체는 특이 DNA 서열을 인지하여 결합한다. 자연 발생 생성물인 안트라마이신, 즉 PBD는 1965년 처음 보고되었다 Leimgruber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 87, pp. 5793-5795, 1965; Leimgruber et al., *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 87, pp. 5791-5793, 1965). 그 후로 트리사이클릭 PBD 스캐폴드 이량체(미국 특허 제6,884,799호; 미국 특허 제7,049,311호; 미국 특허 제7,067,511호; 미국 특허 제7,265,105호; 미국 특허 제7,511,032호; 미국 특허 제7,528,126호; 미국 특허 제7,557,099호)를 비롯하여 다수의 PBD(자연 발생의 것과 유사체 둘 다)가 보고된 바 있다(Thurston et al., *Chem. Rev.* vol. 1994, pp. 433-465 1994). 어떠한 특정 이론에 국한되고자 하지 않을 때, 이량체 구조는 B-형 DNA의 부 홈과의 등나선성(isohelicity)에 적당한 3차원 형상을 부여하고, 이로써 결합 부위에서의 정교함(snug fit)이 초래된다(Kohn, In *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, vol. 19, pp. 230-237, 1986). C2 아릴 치환기를 보유하는 이량체 PBD 화합물은 세포독성 제제로서 유용한 것으로 보였다(Hartley et al *Cancer Res.*, vol. 70, pp. 6849-6858, 2010; Antonow, *J. Med. Chem.* vol. 53, pp. 2927-2941, 2010; Howard et al., *Bioorganic and Med. Chem. Letters*, vol. 19, pp. 6463-6466, 2009).

[0335] PBD 이량체는 항체에 접합되었고, 이로부터 생성된 ADC는 항암 특성을 가지는 것으로 보였다. PBD 이량체상 비제한 예시적 연결 부위로서는 5원 피롤로 고리, PBD 단위들 간 묶음(tether), 그리고 N10-C11 이민기를 포함한다(WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598).

[0336] ADC의 비제한 예시적 PBD 이량체 성분은 하기 화학식 A, 즉



[0337]

[0338] 의 것, 이의 염 및 용매화물인데, 다만

[0339] 식 중, 물결선은 링커에의 공유 부착 부위를 나타내고;

[0340] 점선은 C1과 C2, 또는 C2와 C3 간의 이중 결합의 선택적 존재를 나타내며;

[0341] R^2 는 독립적으로 H, OH, =O, =CH₂, CN, R, OR, =CH-R^D, =C(R^D)₂, O-SO₂-R, CO₂R 및 COR로부터 선택되고, 선택적으로는 할로 또는 디할로로부터 추가로 선택되고, R^D는 독립적으로 R, CO₂R, COR, CHO, CO₂H 및 할로로부터 선택되며;

[0342] R⁶ 및 R⁹는 독립적으로 H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn 및 할로로부터 선택되고;

[0343] R⁷은 독립적으로 H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', NO₂, Me₃Sn 및 할로로부터 선택되며;

[0344] Q는 독립적으로 O, S 및 NH로부터 선택되고;

[0345] R¹¹은 H 또는 R이거나, Q는 O, SO₃M이되, 다만 M은 금속 양이온이며;

[0346] R 및 R'는 각각 독립적으로 선택 치환 C₁₋₈ 알킬, C₁₋₁₂ 알킬, C₃₋₈ 헤테로사이클릴, C₃₋₂₀ 헤테로사이클, 및 C₅₋₂₀ 아릴 기로부터 선택되되, 선택적으로 NRR'기와 관련하여, R 및 R'는 이것들과 부착되어 있는 질소 원자와 함께 선택 치환 4원, 5원, 6원 또는 7원 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

[0347] R¹², R¹⁶, R¹⁹ 및 R¹⁷은 R², R⁶, R⁹ 및 R⁷에 대하여 각각 정의되며;

[0348] R''는 C₃₋₁₂ 알킬렌기로서, 이의 사슬은 하나 이상의 이중 원자, 예컨대 O, S, N(H), NMe 및/또는 방향족 고리, 예컨대 벤젠 또는 피리딘에 의해 중단될 수 있되, 다만 고리는 선택적으로 치환되고;

[0349] X 및 X'는 독립적으로 O, S 및 N(H)로부터 선택된다.

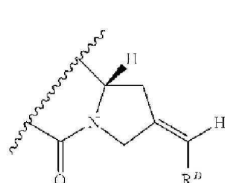
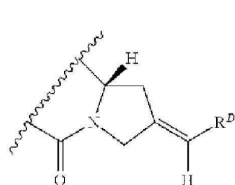
[0350] 몇몇 구현예들에서, R 및 R'는 각각 독립적으로 선택 치환 C₁₋₁₂ 알킬, C₃₋₂₀ 헤테로사이클 및 C₅₋₂₀ 아릴 기로부터 선택되되, 선택적으로 NRR'기와 관련하여, R 및 R'는 이것들과 부착되어 있는 질소 원자와 함께 선택 치환 4원, 5원, 6원 또는 7원 헤테로사이클릭 고리를 형성한다. 몇몇 구현예들에서, R⁹ 및 R¹⁹는 H이다. 몇몇 구현예들에서, R⁶ 및 R¹⁶은 H이다.

[0351] 몇몇 구현예들에서, R⁷ 및 R¹⁷은 둘 다 OR^{7A}이되, 다만 R^{7A}는 선택적으로 치환된 C₁₋₄ 알킬이다. 몇몇 구현예들에서, R^{7A}는 Me이다. 몇몇 구현예들에서, R^{7A}는 CH₂Ph이되, 다만 Ph는 페닐기이다. 몇몇 구현예들에서, X는 O이다. 몇몇 구현예들에서, R¹¹은 H이다. 몇몇 구현예들에서, 각각의 단량체 단위 중 C2와 C3 사이에는 이중 결합이 존재한다.

[0352] 몇몇 구현예들에서, R² 및 R¹²는 독립적으로 H 및 R로부터 선택된다. 몇몇 구현예들에서, R² 및 R¹²는 독립적으로 R이다. 몇몇 구현예들에서, R² 및 R¹²는 독립적으로 선택 치환 C₅₋₂₀ 아릴 또는 C₅₋₇ 아릴 또는 C₈₋₁₀ 아릴이다. 몇몇 구현예들에서, R² 및 R¹²는 독립적으로 선택 치환 페닐, 티에닐, 나프틸, 피리딜, 퀴놀리닐 또는 이소

퀴놀리닐이다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및 R^{12} 는 독립적으로 $=O$, $=CH_2$, $=CH-R^D$ 및 $=C(R^D)_2$ 로부터 선택된다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및 R^{12} 는 $=CH_2$ 이다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및 R^{12} 는 각각 H이다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및 R^{12} 는 각각 $=O$ 이다. 몇몇 구현예들에서 R^2 및 R^{12} 는 각각 $=CF_2$ 이다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및/또는 R^{12} 는 독립적으로 $=C(R^D)_2$ 이다. 몇몇 구현예들에서, R^2 및/또는 R^{12} 는 독립적으로 $=CH-R^D$ 이다.

[0353] 몇몇 구현예들에서, R^2 및/또는 R^{12} 가 $=CH-R^D$ 일 때, 각각의 기는 독립적으로 이하에 보인 입체배열 중 어느 하나를 가질 수 있다:



[0354]

[0355] 몇몇 구현예들에서, $=CH-R^D$ 는 입체배열 I에 있다. 몇몇 구현예들에서 R^D 는 C_3 알킬렌기 또는 C_5 알킬렌기이다.

[0356] PBD 이량체-val-cit-PAB-Ab 및 PBD 이량체-Phe-Lys-PAB-Ab의 링커는 프로테아제에 의해 절단 가능한 반면, PBD 이량체-말레이미드-아세트알의 링커는 산에 불안정하다.

[0357] PBD 이량체 및 PBD 이량체를 포함하는 ADC는 당 분야에 공지된 방법들에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어 WO 2009/016516; US 2009/304710; US 2010/047257; US 2009/036431; US 2011/0256157; WO 2011/130598를 참조한다.

[0358] (5) 안트라사이클린

[0359] 몇몇 구현예들에서, ADC는 안트라사이클린을 포함할 수 있다. 안트라사이클린은 세포독 활성을 보이는 항생제 화합물이다. 어떠한 특정 이론에 국한되고자 하지 않을 때, 연구는, 1) 약물 분자가 세포 DNA에 끼어들어 DNA 의존적 핵산 합성을 억제하는 기작; 2) 세포내 거대분자와 반응하여 세포에 손상을 일으킬 유리 라디칼의, 약물 에 의한 생성; 및/또는 3) 약물 분자의 세포막의 상호작용을 비롯하여 다수의 상이한 기작에 의해 안트라사이클린 이 세포를 사멸시키는 작용을 할 수 있음을 보여주었다(예를 들어 문헌(C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in *Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy*; N. R. Bachur, "Free Radical Damage" id. at pp. 97-102) 참조). 안트라사이클린의 세포독 잠재성으로 말미암아 이 안트라사이클린은 백혈병, 유방암종, 폐암종, 난소 선암종 및 유육종과 같은 다수의 암 을 치료하는데 사용되어 왔다(예를 들어 문헌(P. H-Wiernik, in *Anthracycline: Current Status And New Developments* p 11) 참조).

[0360] 비제한 예시적 안트라사이클린으로서 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 도노마이신, 네모루비신 및 이것 들의 유도체를 포함한다. 도노루비신과 독소루비신의 면역접합체 및 전구약물이 제조 및 연구되어 왔다(Kratz et al., *Current Med. Chem.*, vol. 13, pp. 477-523, 2006; Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, vol. 16, pp. 358-362, 1996; Torgov et al., *Bioconj. Chem.*, vol. 16, pp. 717-721, 2005; Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 97, pp. 829-834, 2000; Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, vol. 12, pp. 1529-1532, 2002; King et al., *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 4336-4343, 2002; EP 0328147; 미국 특허 제6,630,579호). 항체-약물 접합체 BR96-독소루비신은 종양 연관 항원 루이 (Lewis)-Y와 특이적으로 반응하며, 제I기 및 제II기 임상연구를 통하여 평가된 바 있다(Saleh et al., *J. Clin. Oncology*, vol. 18, pp. 2282-2292, 2000; Ajani et al., *Cancer Jour.*, vol. 6, pp. 78-81, 2000; Tolcher et al., *J. Clin. Oncology*, vol. 17, pp. 478-484, 1999).

- [0361] PNU-159682는 네모루비신의 강력한 대사물질(또는 유도체)이다(Quintieri et al., *Clinical Cancer Research*, vol. 11, pp. 1608-1617, 2005). 네모루비신은 독소루비신의 글리코시드 아미노산에 2-메톡시모폴리노기를 가지는, 독소루비신의 반합성 유사체로서, 제II기/제III기 실험(간세포 암종)(Sun et al., *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology*, vol. 22, Abs1448, 2003; Quintieri, *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, vol. 44:1st Ed, Abs 4649, 2003; Pacciarini et al., *Jour. Clin. Oncology*, vol. 24, p. 14116, 2006)을 비롯한 임상실험에서 임상 평가되고 있다(Grandi et al. *Cancer Treat. Rev.* vol.17, pp. 133-138, 1990; Ripamonti et al. *Brit. J. Cancer*, vol. 65, pp. 703-707, 1992).
- [0362] PNU-159682를 비롯한 안트라사이클린은 몇 개의 연결 부위와, 본원에 기술된 링커들을 비롯한 다양한 링커(US 2011/0076287; WO2009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124)를 통하여 항체에 접합될 수 있다.
- [0363] PNU-159682 말레이미드 아세탈-Ab의 링커는 산에 불안정한 한편, PNU-159682-val-cit-PAB-Ab, PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서-Ab, 및 PNU-159682-val-cit-PAB-스페이서(R^1R^2)-Ab의 링커는 프로테아제에 의해 절단될 수 있다.
- [0364] (6) 기타 약물기
- [0365] 약물기는 또한 켈다나마이신(Mandler et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, vol. 92, pp. 1573-1581, 2000; Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters*, vol. 10, pp. 1025-1028, 2000; Mandler et al., *Bioconjugate Chem.*, vol. 13, pp. 786-791, 2002); 및 이의 효소 활성 독소 및 단편, 예컨대 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, (슈도모나스 아에루기노사 유래) 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우라이테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 리스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어 WO 93/21232를 참조한다.
- [0366] 약물기는 또한 핵산분해 활성을 가지는 화합물(예컨대 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제)을 포함한다.
- [0367] 임의의 구현예들에서, 면역접합체는 방사성이 큰 원자를 포함할 수 있다. 방사성 접합 항체를 제조하기 위해서는 다수의 방사성 동위원소가 사용될 수 있다. 그 예들로서는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 면역접합체가 검출에 사용될 때, 이는 신티그래프 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 Tc^{99} 또는 I^{123} , 또는 핵 자기공명(NMR) 영상화(자기공명영상화, MRI라고도 공지됨)를 위한 스핀 표지, 예컨대 지르코늄-89, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오르-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다. 지르코늄-89는, 예를 들어 PET 영상화를 위해, 다양한 금속 킬레이트화제와 복합체를 형성할 수 있고, 또한 항체와 접합될 수 있다(WO 2011/056983).
- [0368] 방사성 표지 또는 기타 표지는 공지의 방법으로 면역접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어 펩티드는, 예컨대 하나 이상의 수소 대신에 하나 이상의 플루오르-19 원자를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하여 화학 합성 또는 생합성될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 표지, 예컨대 Tc^{99} , I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 은 항체 중 시스템인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 이트륨-90은 항체의 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 몇몇 구현예들에서, 요오드-123을 혼입하기 위해서는 IODOGEN 방법(Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 80, pp. 49-57, 1978)이 사용될 수 있다. 문헌("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", Chatal, CRC Press 1989)은 임의의 다른 방법들을 기술하고 있다.
- [0369] 임의의 구현예들에서, 면역접합체는 전구약물 활성화 효소에 접합된 항체를 포함할 수 있다. 이와 같은 몇몇 구현예들에서, 전구약물 활성화 효소는 전구약물(예컨대 펩티드 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 약물, 예컨대 항암 약물로 전환시킨다. 몇몇 구현예들에서, 이러한 면역접합체는 항체 의존적 효소 매개 전구약물 치료법("ADEPT")에 유용하다. 항체에 접합될 수 있는 효소로서는 포스페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 알칼리성 포스파타아제; 설페이트 함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 아릴설페타아제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암 약물, 5-플루오로우라실로 전환하는데 유용한 시토신 디아미나아제; 펩티드 함유 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 프로테아제, 예컨대 세라티아 프로테아제, 서모리시스, 서브틸리신, 카복시펩티다아제 및 카텝신(예컨대 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 전구약물로의 전환에 유용한 D-알라닐카복시펩티다아제; 당화 전구약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 탄수화물 절단 효소, 예컨대

대 β -갈락토시다아제 및 뉴라미니다아제; β -락탐으로 유도체화된 약물의 유리 약물로의 전환에 유용한 β -락타마아제; 그리고 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기 각각에 의한 유도체화가 일어난 약물을 유리 약물로 전환하는데 유용한 페니실린 아미다아제, 예컨대 페니실린 V 아미다아제 및 페니실린 G 아미다아제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 몇몇 구현예들에서, 효소는 당 분야에 널리 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 항체에 공유 결합될 수 있다. 예를 들어 문헌(Neuberger et al., *Nature*, vol. 312, pp. 604-608, 1984)을 참조한다.

[0370] c) 약물 담지율

[0371] 약물 담지율은 p 로 표시되는데, 이는 화학식 I의 분자 중 항체당 약물기의 평균수를 나타낸다. 약물 담지율은 항체당 약물기(D) 1개 내지 20개의 범위일 수 있다. 화학식 I의 ADC는 1개 내지 20개 범위의 다양한 약물기와 접합된 항체들의 집합을 포함한다. 접합 반응으로 ADC를 제조함에 있어 사용되는, 항체당 약물기의 평균 수는 종래의 방법, 예컨대 질량 분광분석법, ELISA 검정 및 HPLC에 의해 특징지어질 수 있다. p 의 관점에서 ADC의 정량적 분포도 또한 측정될 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 다른 약물 담지율을 보이는 ADC로부터 (p 가 임의의 값인) 동종 ADC를 분리, 정제 및 특성규명하는 것은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0372] 몇몇 항체-약물 접합체에 있어서, p 는 항체상 부착 부위의 수에 의해 한정될 수 있다. 예를 들어 상기 임의의 예시적 구현예들에서와 같이 부착이 시스테인 티올에서 일어나는 경우, 항체는 오로지 1개 또는 수 개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 오로지 1개 또는 수 개의 충분히 반응성인(즉 링커가 부착될 수 있는) 티올기를 가질 수 있다. 임의의 구현예들에서, 약물 담지율이, 예를 들어 $p > 5$ 로 크면, 임의의 항체-약물 접합체의 응집, 불용성, 독성 또는 세포 투과성 상실이 초래될 수 있다. 임의의 구현예들에서, ADC에 대한 평균 약물 담지율은 1 내지 약 8의 범위; 약 2 내지 약 6의 범위; 또는 약 3 내지 약 5의 범위이다. 실제로 임의의 ADC의 경우, 항체당 약물기의 최적 비율은 8 미만일 수 있으며, 약 2 내지 약 5일 수 있다(미국 특허 제7,498,298호).

[0373] 임의의 구현예들에서, 접합 반응 중 약물기는 이론상 최대량에 못미치는 양으로 항체에 접합된다. 이하에 논의된 바와 같이 항체는, 예를 들어 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 리신 잔기를 함유할 수 있다. 일반적으로 항체는 약물기에 연결될 수 있는 유리 반응성 시스테인 티올기 다수를 함유하지 않으며; 실제로 항체 중 존재하는 대부분의 시스테인 티올 잔기는 이황화물 가교로서 존재한다. 임의의 구현예들에서, 항체는 부분 환원 조건 또는 완전 환원 조건 하에서 환원제, 예컨대 디티오프레이톨(DTT) 또는 트리카보닐에틸포스핀(TCEP)으로 환원될 수 있으며, 그 결과 반응성 시스테인 티올기가 생성될 수 있다. 임의의 구현예들에서, 항체는 변성 조건에 놓이게 되고, 그 결과 반응성 친핵기, 예컨대 리신 또는 시스테인이 노출된다.

[0374] ADC의 담지율(약물/항체 비율)은 상이한 방식으로 제어될 수 있는데, 예를 들어 (i) 항체에 대한, 약물-링커 중간체 또는 링커 시약의 몰 과량을 제한하고, (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한하며, (iii) 시스테인 티올 변형을 위한 환원 조건을 부분적으로 제한함으로써 제어될 수 있다.

[0375] 하나를 초과하는 친핵성 기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하는 경우, 이로부터 수득된 생성물은 항체에 하나 이상의 약물기가 부착되어 분포하고 있는 ADC들의 혼합물임이 이해될 것이다. 항체당 약물의 평균 수는, 이중 ELISA 항체 검정에 의해 혼합물로부터 산정될 수 있는데, 이 혼합물은 항체에 특이적이기도 하고, 약물에 특이적이기도 하다. 개별 ADC가 혼합물 중에서 질량 분광분석법에 의해 동정되어, HPLC, 예컨대 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다(예를 들어 문헌(McDonagh et al., *Prot. Engr. Design & Selection*, vol. 19, pp. 299-307, 2006; Hamblett et al., *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, pp. 7063-7070, 2004) 참조). 임의의 구현예들에서, 하나의 담지율 값을 가지는 동종 ADC는 전기영동이나 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0376] d) 면역접합체를 제조하는 임의의 방법

[0377] 화학식 I의 ADC인 면역접합체는, 당 업자들에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하는 몇몇 경로, 예를 들어 (1) Ab-L을 제조하기 위한, 항체의 친핵성 기와 2가 링커 시약의 공유 결합을 통한 반응 $\rightarrow$ 약물기 D와의 반응; 및 (2) D-L을 제조하기 위한, 약물기의 친핵성 기와 2가 링커 시약의 공유 결합을 통한 반응 $\rightarrow$ 항체 친핵성 기와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 상기 경로 (2)를 통하여 화학식 I의 ADC를 제조하기 위한 예시적 방법은 미국 특허 제7,498,298호에 기술되어 있다.

[0378] 항체상 친핵성 기로서는 (i) N-말단 아민기, (ii) 예컨대 리신의 측쇄 아민기, (iii) 예컨대 시스테인의 측쇄 티올기, 그리고 (iv) 항체가 당화된 경우에는 당 하이드록실 또는 아미노 기를 포함하나, 이에 한정되는 것은

아니다. 아민, 티올 및 하이드록실 기는 친핵성으로서, 링커기 및 링커 시약에 존재하는 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; 그리고 (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다. 임의의 항체는 사슬간 환원성 이황화물 가교, 즉 시스테인 가교를 가진다. 항체는 링커 시약과의 접합을 위하여 환원제, 예컨대 DTT(디티오프레이톨) 또는 트리카보닐에틸포스핀(TCEP)으로의 처리에 의해 반응성으로 만들어질 수 있으며, 그 결과 전체적으로 또는 부분적으로 환원된다. 이로써 각각의 시스테인 가교는 이론상으로 2개의 반응성 티올 친핵체를 생성할 것이다. 추가의 친핵성 기는 리신 잔기의 변형, 예컨대 리신 잔기와 2-이미노티올란(Traut 시약)의 반응에 의하여 항체에 도입될 수 있으며, 그 결과 아민의 티올로의 전환이 초래된다. 반응성 티올기는 또한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써(예컨대 하나 이상의 비 원산 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 항체에 도입될 수 있다.

[0379] 본 발명의 항체-약물 접합체는 또한 항체상 친전자성 기, 예컨대 알데히드 또는 케톤 기와, 링커 시약 또는 약물 상 친핵성기 사이의 반응에 의해 제조될 수 있다. 링커 시약 상 유용한 친핵성 기로서는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트 및 아릴히드라지드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구현예에서, 항체는, 링커 시약이나 약물 상 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성기가 도입되도록 변형된다. 다른 구현예에서, 당화된 항체의 당은, 예컨대 과요오드산염 산화 시약으로 산화되어, 링커 시약이나 약물기의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 생성할 수 있다. 수득된 이민 Schiff 염기기는 안정적인 연결을 형성할 수 있거나, 예컨대 보로하이드라이드 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결을 형성할 수 있다. 일 구현예에서, 당화된 항체의 탄수화물부와, 갈락토스 옥시다아제 또는 메타과요오드산나트륨 중 어느 하나의 반응은 약물상 적당한 기와 반응할 수 있는 카보닐(알데히드 및 케톤) 기를 항체에 생성할 수 있다(Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). 다른 구현예에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체는 메타과요오드산나트륨과 반응할 수 있으며, 그 결과 첫 번째 아미노산 대신 알데히드가 생성된다(Geoghegan & Stroh, *Bioconjugate Chem.*, vol. 3, pp. 138-146, 1992; 미국 특허 제5,362,852호). 이러한 알데히드는 약물기 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0380] 약물기 상 예시적 친핵성 기로서는, 링커기 및 링커 시약 상 친전자성 기, 예컨대 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; 그리고 (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 하이드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트 및 아릴히드라지드 기들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0381] ADC를 제조하는데 사용될 수 있는 비제한 예시적 가교 링커 시약은 본원 중 "예시적 링커"라는 표제의 문단에 기술되어 있다. 2개의 기, 예컨대 단백질성 기와 화학 기를 연결하기 위해 이러한 가교 링커 시약을 사용하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 몇몇 구현예들에서, 항체와 세포독성 제제를 포함하는 융합 단백질은, 예컨대 재조합 기술이나 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. 재조합 DNA 분자는 항체를 암호화하는 영역과, 접합체의 원하는 특성들을 소멸시키지 않는 링커 펩티드를 암호화하는 영역에 의해 분리되어 있거나 서로 인접하여 존재하는, 접합체의 세포독성 부들을 포함할 수 있다.

[0382] 또 다른 구현예에서, 항체는 "수용체"(예컨대 스트렙타비딘)에 접합되어, 중앙 예비 표적화에 이용될 수 있는데, 이 경우 항체-수용체 접합체는 환자에게 투여되고, 미결합 접합체는 청소제(clearing agent)가 사용되어 혈류로부터 제거되고 나서, 세포독성 제제(예컨대 약물이나 방사성핵종)에 접합된 "리간드"(예컨대 아비딘)가 투여된다.

[0383] C. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0384] 임의의 구현예들에서, 본원에 제공된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것은 생물 시료 중 Ax1의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "검출하는 것"이라는 용어는 정량 검출 또는 정성 검출을 포함한다. 임의의 구현예들에서, 생물 시료는 세포나 조직, 예컨대 유방, 췌장, 식도, 폐 및/또는 뇌 세포나 조직을 포함한다.

[0385] 본 발명의 추가의 양태는, 체내 적어도 한 군데의 구역에서의 Ax1 수준이 정상 생리적 수준보다 증가하거나 감소하는 암 또는 기타 질환을 진단 및/또는 모니터링하기 위한, 본 발명의 항 Ax1 항체에 관한 것이다.

[0386] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 전술된 바와 같이 당 분야에 공지된 검출 가능 분자나

기질, 예컨대 형광 분자, 방사성 분자 또는 기타 임의의 표지로 표지화될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 항체는 방사성 분자로 표지화될 수 있다. 예를 들어 적합한 방사성 분자로서는 신티그래프 연구에 사용되는 방사성 원자, 예컨대 ^{123}I , ^{124}I , ^{111}In , ^{186}Re 및 ^{188}Re 를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 또한 핵 자기 공명(NMR) 영상화를 위한 스핀 표지, 예컨대 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 플루오르-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철로 표지화될 수 있다. 항체 투여 이후, 환자 체내 방사성 표지화된 항체의 분포가 검출된다. 공지된 임의의 방법으로서 적합한 방법이 사용될 수 있다. 몇몇 비제한적 예로서는, 컴퓨터단층촬영(CT), 양전자방출단층촬영(PET), 자기공명영상화(MRI), 형광, 화학발광 및 초음파 촬영술을 포함한다.

[0387] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 Ax1 과발현과 연관된 암 및 질환을 진단하고 이의 병기를 파악하는데 유용할 수 있다. Ax1 과발현과 연관된 암으로서는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암, 신경교세포종양, 예컨대 교모세포종 및 신경섬유종증, 자궁암, 난소암, 간의 암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 흑색종, 결장직장암, 자궁내막 암종, 타액선 암종, 콩팥암, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상샘암, 간 암종, 육종, 혈액암(백혈병), 성상세포종 및 다양한 유형의 두경부암, 또는 기타 Ax1 발현 또는 과발현 과증식성 질환을 포함할 수 있다.

[0388] 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 Ax1 발현이 증가 또는 감소하는 암 이외의 질환을 진단하는데 유용할 수 있다. 가용성 Ax1 형태 또는 세포성 Ax1 형태 둘 다가 이러한 진단에 이용될 수 있다. 통상적으로 이러한 진단 방법은, 환자로부터 수득된 생물 시료를 사용하는 것을 수반한다. 본원에 사용된 바와 같은 "생물 시료"라는 용어는, 진단 또는 모니터링 검정에 사용될 수 있는, 대상체로부터 수득된 다양한 유형의 시료를 포함한다. 생물 시료는 혈액 및 생물 기원의 기타 액체 시료, 고체 조직 시료, 예컨대 생검 표본, 또는 조직 배양액이나 이로부터 유래하는 세포 및 이의 자손을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 생물 시료는 Ax1 과발현과 연관된 암이 발병한 것으로 의심되는 개체에서 수집된 조직 시료에서 수득된 세포를 포함하고, 바람직한 구현예들에서는 신경교종, 위, 폐, 췌장, 유방, 전립선, 신장, 간 및 자궁내막에서 수득된 세포를 포함한다. 생물 시료는 임상 시료, 배양액 중 세포, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생물 유체 및 조직 시료를 포함한다.

[0389] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 이용하여 대상체로부터 유래한 세포상 Ax1을 검출함으로써 대상체 내 Ax1 과발현과 연관된 암을 진단하는 방법이다. 구체적으로 상기 방법은 하기 단계들을 포함할 수 있다:

[0390] (a) 본 발명에 따른 항체 또는 항체 단편이, Ax1을 발현하는 생물 시료의 세포와 복합체를 형성하는데 적합한 조건 하에서 대상체의 생물 시료를, 이러한 항체 또는 항체 단편과 접촉키는 단계; 및

[0391] (b) 상기 복합체를 검출 및/또는 정량하고, 이 복합체의 검출을 Ax1 과발현과 연관된 암의 지표로 삼는 단계.

[0392] 암의 진행을 모니터링하기 위해, 본 발명에 따른 방법은 상이한 시간에 반복 수행될 수 있고, 그 결과 항체와 시료의 결합이 증가 또는 감소하였는지를 확인할 수 있으며, 이로부터 암이 진행되었는지, 퇴행하였는지, 아니면 안정화되었는지가 확인될 수 있다.

[0393] 특정 구현예에서, 본 발명은 Ax1의 발현 또는 과발현, 또는 Ax1의 가용성 형태의 감소 또는 증가와 연관된 질환을 진단하는 방법이다. 이러한 질환의 예들로서는 인간 면역 장애, 혈전증성 질환(혈전증 및 죽상혈전증), 그리고 심혈관 질환을 포함할 수 있다.

[0394] 일 구현예에서, 진단 또는 검출 방법에 사용될 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 제공된다. 추가의 양태에서, 생물 시료 중 Ax1의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 추가의 양태에서, 생물 시료 중 Ax1의 양을 정량하는 방법이 제공된다. 임의의 구현예들에서, 본 방법은, 본원에 기술된 바와 같은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편과 Ax1의 결합이 허용되는 조건 하에서 생물 시료와 이러한 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 접촉시키는 단계와, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 및 Ax1 사이에 복합체가 형성되었는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 치료법에 타당한 대상체를 선택하는데 사용된다. 몇몇 구현예들에서, 치료법은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 것이다.

[0395] 임의의 구현예들에서, 표지화된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 제공된다. 표지로서는 직접 검출되는 표지나 기(예컨대 형광, 발색, 고전자, 화학발광 및 방사성 표지)뿐만 아니라, 예컨대 효소 반응이나 분자 상호작용을 통해 간접적으로 검출되는 기, 예컨대 효소나 리간드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적 표지로서는 방사성동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인과 이의 유

도체, 로다민 및 이의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시퍼라아제, 예컨대 반딧불이 루시퍼라아제 및 세균 루시퍼라아제(미국 특허 제4,737,456호), 루시페린, 2,3-디하이드로프탈라진디온, 서양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP), 알칼리 포스포타아제, β -갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소좀, 당체 옥시다아제, 예컨대 글루코스 옥시다아제, 갈락토스 옥시다아제 및 글루코스-6-포스페이트 디하이드로게나아제, 염료 전구체를 산화하기 위하여 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP와 커플링된 헤테로사이클릭 옥시다아제, 예컨대 우리카아제 및 잔틴 옥시다아제, 락토퍼옥시다아제, 또는 마이크로퍼옥시다아제, 바이오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지 및 안정한 유리 라디칼 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0396] D. 약학 제제

[0397] 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 세포 사멸 활성을 가지고 있다. 이러한 세포 사멸 활성은 다수의 상이한 유형의 세포주에도 확장되어 미친다. 또한 이러한 항체나 항체 단편이 일단 세포독성 제제와 접합되면, 종양 크기를 줄일 수 있으며, 감소한 독성을 보일 수 있다. 이러한 응용에 관하여 실시예 3과, 실시예 6 ~ 9를 참조한다. 그러므로 항 Ax1 항체, 이의 단편 또는 면역접합체는 Ax1 발현과 연관된 증식성 질환을 치료하는데 유용할 수 있다. 이 항체, 단편 또는 면역접합체는 단독으로 사용될 수 있거나, 아니면 임의의 적합한 제제나 기타 종래의 치료법과 병용 또는 병행될 수 있다.

[0398] 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 Ax1 및 Gas6 발현, 과발현 또는 활성화와 연관된 과증식성 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. Ax1 발현에 관한 요구조건 이외에, 치료될 수 있는 암이나 조직의 유형에 특별한 제한은 없다. 그 예로서는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암, 신경교세포 종양, 예컨대 교모세포종 및 신경섬유종증, 자궁암, 난소암, 간의 암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 흑색종, 결장직장암, 자궁내막 암종, 타액선 암종, 콩팥암, 신장암, 전립선암, 외음부암, 갑상샘암, 간 암종, 육종, 혈액암(백혈병), 성상세포종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다. 더욱 바람직한 암으로서는 신경교종, 위암, 폐암, 췌장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간암 및 자궁내막암이 있다.

[0399] 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 선천성 면역 반응의 잠재적 활성제로서, 인간 면역 질환, 예컨대 패혈증 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 또한 면역화를 위한 보조제, 예컨대 백신으로서, 그리고 세균, 바이러스 및 기생체에 대한 항 감염제로서 사용될 수 있다.

[0400] 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 혈전증성 질환, 예컨대 정맥 및 동맥 혈전증 및 죽상혈전증으로부터 보호하거나, 이를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 또한 심혈관 질환으로부터 보호하거나, 이를 예방하거나 치료하는데 뿐만 아니라, 라사(Lassa) 바이러스 및 에볼라(Ebola) 바이러스와 같은 바이러스의 침입을 예방 또는 억제하고, 바이러스 감염을 치료하는데에도 사용될 수 있다.

[0401] 본원에 기술된 치료 방법들에 관한 각각의 구현예들에 있어서, 항 Ax1 모노클로날 항체, 항체 단편 또는 항 Ax1 모노클로날 면역접합체가, 치료를 필요로 하는 질환 또는 장애를 관리하는 것과 연관된 종래의 방법에서와 일치하는 방식으로 전달될 수 있다. 본원의 개시내용에 따르면, 항체, 항체 단편 또는 면역접합체 유효량만큼이, 대상 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는데 충분한 시간 동안 이처럼 충분한 조건 하에, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에 투여된다. 그러므로 본 발명의 한 양태는, Ax1의 발현과 연관된 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 면역접합체 치료적 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는, 이와 같은 질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0402] 투여를 위하여, 항 Ax1 모노클로날 항체, 항체 단편 또는 면역접합체가 약학 조성물로서 제제화될 수 있다. 항 Ax1 모노클로날 항체, 항체 단편 또는 항체-약물 접합체를 포함하는 약학 조성물은 약학 조성물을 제조하기 위한 공지의 방법에 따라 제제화될 수 있다. 이러한 방법에서, 치료 분자는 통상 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 혼합물, 용액 또는 조성물과 합하여진다.

[0403] 약학적으로 허용 가능한 담체는 투여받는 환자에 의해 관용될 수 있는 물질이다. 멸균 포스페이트 완충 염수가 약학적으로 허용 가능한 담체의 일례이다. 기타 약학적으로 허용 가능한 담체로서 적합한 것이 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어 문헌(Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)) 참조). 제제는 단백질이 바이알 표면 등에서 소실되는 것을 막기 위해 하나 이상의 부형제, 보존제, 가용화제, 완충제, 알부민을 추가로 포함할 수 있다.

[0404] 약학 조성물의 제형, 투여 경로, 투여량 및 투여 계획은 원래 치료될 병태, 병증의 중증도, 환자의 나이, 체중 및 성별에 따라서 달라진다. 이러한 고려사항들은 적합한 약학 조성물을 제제화하기 위해 당 업자에 의해 고려될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 국소, 경구, 비경구, 비내, 정맥내, 근육내, 피하 또는 안내 투여 등을

위하여 제제화될 수 있다.

- [0405] 바람직하게, 본 약학 조성물은 주사될 수 있는 제제용으로서 약학적으로 허용 가능한 비이클을 함유한다. 이러한 비이클은, 구체적으로 등장성의 멸균 염수 용액(일나트륨 또는 이나트륨 포스페이트, 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼슘 또는 염화마그네슘 등, 또는 이러한 염들의 혼합물)일 수 있고, 건조, 특히 동결 건조 조성물은, 예를 들어 멸균수나 생리 염수가 첨가될 때 주사 용액의 구성을 허용한다.
- [0406] 몇몇 구현예들에서, 긴장제(종종 "안정화제"로서도 공지됨)는 조성물 중 액체의 긴장도를 조정 또는 유지하기 위해 존재한다. 긴장제가, 크기가 크고 하전된 생물분자, 예컨대 단백질 및 항체와 함께 사용될 때, 이 긴장제는 종종 "안정화제"라 칭하여지는데, 그 이유는 긴장제가 아미노산 측쇄의 하전기와 상호작용하여 분자내 상호작용 및 분자간 상호작용의 잠재성을 줄여줄 수 있기 때문이다. 긴장제는 약학 조성물의 0.1 중량% 내지 25 중량%, 바람직하게 1 중량% 내지 5 중량%의 양만큼 존재할 수 있다. 바람직한 긴장제로서는 다가 당 알코올, 바람직하게 3가 또는 그 이상의 다가 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트ρί톨, 아라비톨, 자일리톨, 솔비톨 및 만니톨을 포함한다.
- [0407] 추가의 부형제로서는 하기의 것들, 즉 (1) 증량제, (2) 용해 촉진제, (3) 안정화제 및 (4) 변성 또는 용기 벽에의 부착을 막아주는 제제 중 한 가지 이상으로서 사용될 수 있는 제제들을 포함한다. 이러한 부형제들로서는 (상기 열거된) 다가 당 알코올; 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 루신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 사이클리톨(예컨대 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 함황 환원제, 예컨대 우레아, 글루타치온, 티옥탄산, 티오글리콜나트륨, 티오글리세롤, α -모노티오글리세롤 및 티오황산나트륨; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 기타 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 단당체(예컨대 자일로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스); 이당체(예컨대 락토스, 말토스, 수크로스); 삼당체, 예컨대 라피노스; 그리고 다당체, 예컨대 덱스트린 또는 덱스트란을 포함할 수 있다.
- [0408] 비이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"라고도 공지됨)는, 활성 치료 단백질 또는 항체의 변성이 유발되지 않고, 치료제가 용해되는 것을 도와줄 뿐만 아니라, 치료 단백질이 교반에 의하여 응집(이러한 응집은 또한 제제가 전단 표면 응력에 노출될 수 있도록 만들)되지 않도록 보호하기 위해 사용될 수 있다. 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 바람직하게 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 농도 범위로 존재할 수 있다.
- [0409] 적합한 비이온성 계면활성제로서는 폴리솔베이트(20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머(184, 188 등), PLURONIC® 폴리올, TRITON®, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노에테르(TWEEN®-20, TWEEN®-80 등), 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아르산염, 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일 10, 50 및 60, 모노스테아르산 글리세롤, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 양이온성 세제는 라우릴황산나트륨, 설포숙신산디옥틸나트륨 및 설포산디옥틸나트륨을 포함한다. 양이온성 세제는 염화벤잘코늄 또는 염화벤제토늄을 포함한다.
- [0410] 투여에 적용되는 용량은, 다양한 매개변수에 따라 달리 적용될 수 있는데, 구체적으로 사용된 투여 방식, 유관 병상 또는 대안적으로 요망되는 치료 지속기간에 따라 달리 적용될 수 있다. 약학 조성물을 제조하기 위해, 항체 또는 항체 단편 유효량이 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 수성 매질 중에 용해 또는 분산될 수 있다.
- [0411] 주사용으로 사용되기 적합한 약학 제형으로서의 멸균 수용액 또는 수분산액; 참깨 오일, 피넛 오일 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제제; 그리고 멸균 주사 용액 또는 분산액을 즉석 제조하기 위한 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에 있어서, 제형은 멸균되어야 하고, 용이한 주사투여능을 보이는 정도로 유체이어야 한다. 이는, 제조 및 보관 조건 하에서 안정하여야 하고, 미생물, 예컨대 세균 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다.
- [0412] 유리 베이스 또는 약학적으로 허용 가능한 염으로서의 활성 화합물의 용액이 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중에 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이것들의 혼합물, 그리고 오일 중에 제조될 수 있다. 보통의 보관 및 사용 조건 하에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 예방하는 보존제를 함유한다.
- [0413] 항체 또는 항체 단편은 중성 또는 염 형태의 조성물로 제제화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 (단백질

의 유리 아미노기와) 무기산, 예컨대 염화수소산 또는 인산, 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 주석산 및 만델산 등으로 생성된 산 부가염을 포함한다. 유리 카복실기로 생성된 염은 또한 무기 염기, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화철과, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 및 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래할 수 있다.

[0414] 담체는 또한, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이것들의 적합한 혼합물, 그리고 식물성 오일을 함유하는 분산 매질 또는 용매일 수 있다. 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴을 사용하고, 분산액의 경우에는 필요 입도를 유지하며, 계면활성제를 사용함으로써 적당한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은, 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 및 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우에 있어서, 등장제, 예컨대 당이나 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수 지연제, 예컨대 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0415] 멸균 주사 용액은 요구될 수 있는 바와 같이, 상기 나열된 기타 성분들 하나 이상과 필요량만큼의 활성 화합물을 적당한 용매 중에 혼합한 다음, 여과 멸균을 수행함으로써 제조된다. 일반적으로 분산액은, 상기 나열된 것들과 같은 기타 필요 성분과 기본 분산 매질을 함유하는 멸균 비이클에 다양한 멸균 활성 성분을 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전에 멸균 여과된 용액(활성 성분과 추가로 요망되는 임의의 성분의 용액)으로부터 이와 같은 성분들의 분말을 만들어내는 진공 건조 기술 및 동결 건조 기술이다.

[0416] 직접 주사용으로서 더욱 또는 고도로 농축된 용액의 제제도 또한 고려되는데, 이 경우 디메틸 설폭사이드(DMSO)가 용매로서 사용되면 매우 신속한 침투, 고 농도 활성 제제의 작은 중앙 부위로의 전달이 달성될 것으로 예상된다.

[0417] 제제화시, 용액은 투여 제제와 양립 가능한 방식으로, 그리고 치료적으로 유효한 양만큼 투여될 것이다. 제제는 다양한 투여형, 예컨대 전술된 바와 같은 주사 용액의 유형으로서 용이하게 투여되지만, 약물 방출 캡슐 등도 또한 사용될 수 있다.

[0418] 수용액으로서의 비경구 투여를 달성하기 위해, 예를 들어 용액은 필요하다면 적합하게 완충되어야 하고, 액체 희석제는 우선 충분한 염수 또는 글루코스와 등장성이 되어야 한다. 이러한 특성의 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복막내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 발명에 비추어보았을 때 당 업자들에게 공지될 것이다. 예를 들어 1회 투여량은 등장성 NaCl 용액 1 ml 중에 용해될 수 있었고, 피하주입 유체 1000 ml에 가하여지거나 주입 제안 부위에 주사될 수 있었다(예를 들어 문헌(“Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580) 참조). 치료중인 대상체의 상태에 따라 투여량에 있어서 약간의 변차는 반드시 생길 것이다. 임의의 경우, 투여에 관여하는 인력은 개별 대상체에 적당한 용량을 결정할 것이다.

[0419] 항체 또는 항체 단편은, 용량당 약 0.0001 밀리그램 내지 약 10.0 밀리그램, 또는 약 0.001 밀리그램 내지 약 5 밀리그램, 또는 약 0.001 밀리그램 내지 약 1 밀리그램, 또는 약 0.001 밀리그램 내지 약 0.1 밀리그램, 또는 약 0.1 밀리그램 내지 약 1.0 밀리그램, 또는 심지어 약 10 밀리그램이 전달되도록 치료 혼합물 중에 제제화될 수 있다. 다수 용량은 또한 선택된 시간 간격으로 투여될 수 있다.

[0420] 비경구 투여, 예컨대 정맥내 주사 또는 근육내 주사용으로 제제화된 화합물에 더하여, 기타 약학적으로 허용 가능한 형태는, 예컨대 경구 투여용 정제 또는 기타 고체; 경시 방출 캡슐; 그리고 현재 사용되고 있는 기타 임의의 형태를 포함한다.

[0421] 임의의 구현예들에서, 항체 또는 항체 단편을 숙주 세포에 도입하는데 있어 리포솜 및/또는 나노입자의 사용이 고려된다. 리포솜 및/또는 나노입자 제법 및 용도는 당 업자들에게 공지되어 있다.

[0422] 나노캡슐은, 일반적으로 화합물을 안정하게 재현 가능한 방식으로 포집할 수 있다. 세포내 중합체 과다 담지로 인한 부작용을 피하기 위해, 일반적으로 생체 내 분해될 수 있는 중합체가 사용되어(크기 약 0.1 μm 의) 초미세 입자가 디자인된다. 이러한 요구조건들을 충족시키는 생분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자가 본 발명에 사용되도록 고려되고, 이러한 입자는 용이하게 제조될 수 있다.

[0423] 리포솜은 수성 매질 중에 분산되어 다중 겹의 동심원 이중층 소포(다중 겹 소포(MultiLamellar Vesicles; MLV)라 칭하여지기도 함)를 자발적으로 형성하는 인지질로 제조된다. MLV는, 일반적으로 직경이 25 nm 내지 4 μm 이다. MLV의 초음파 처리는 직경이 200 Å 내지 500 Å의 범위이고, 코어부에 수용액이 담겨있는 소형의 한겹 소

포(Small Unilamellar Vesicle; SUV)를 형성한다. 리포솜의 물리적 특성은 pH, 이온 세기 및 2가 양이온의 존재에 의존한다.

[0424] 본원에 기술된 바와 같은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 함유하는 약학 제제는, 요망되는 정도의 순도를 가지는 이와 같은 항체 또는 항체 단편과, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 선택적 담체를 혼합함으로써 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조된다(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). 약학적으로 허용 가능한 담체는, 일반적으로 적용된 투여량과 농도에서 투여받은 자에게 무독성으로서, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제(예컨대 염화옥타데실디메틸벤질암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당체, 이당체 및 기타 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당체, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예컨대 Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0425] 본원의 약학적으로 허용 가능한 예시적 담체는 간질성 약물 분산제, 예컨대 가용 중성 활성 히알루로니다아제 당단백질(sHASEGP), 예컨대 인간 가용성 PH-20 히알루로니다아제 당단백질, 예컨대 rHuPH20(HYLENEX®, Baxter International, Inc.)를 추가로 포함한다. 임의의 예시적 sHASEGP, 예컨대 rHuPH20 및 이의 사용 방법은 미국 특허출원공보 제2005/0260186호 및 동 제2006/0104968호에 기술되어 있다. 하나의 양태에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가 글리코사미노글리카나아제, 예컨대 콘드로이티나아제와 합하여진다.

[0426] 예시적 동결건조 항체 제제는 미국 특허 제6,267,958호에 기술되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 제6,171,586호 및 WO 2006/044908에 기술된 것들을 포함하는데, WO 2006/044908에 기술된 제제는 히스티딘-아세트레이트 완충제를 포함한다.

[0427] 본원의 제제는 또한 치료중인 특정 적응증에 필요한 바에 따라 활성 성분을 하나를 초과하여 함유할 수 있다. 바람직하게 상보적인 활성을 가지되 서로에 대하여 악영향을 미치지 않는 성분들은 하나의 제제로 합하여질 수 있다. 본 발명의 항 Ax1 항체, 항체 단편 또는 면역접합체에 더하여, 예를 들어 EGFR 길항제(예컨대 에를로티닙), 혈관신생억제제(예컨대 항 VEGF 항체일 수 있는 VEGF 길항제) 또는 화학요법제(예컨대 탁소이드 또는 백금 제제)를 제공하는 것이 요망될 수 있다. 이와 같은 활성 성분들은 합하여져 의도로 하는 목적에 유효한 양으로 적합하게 존재한다.

[0428] 활성 성분은, 예를 들어 코아세르베이트화 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐에 캡슐화될 수 있다. 예를 들어 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전 중 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 각각이 사용될 수 있다. 이러한 기술들은 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))에 개시되어 있다.

[0429] 서방형 제제가 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예들로서는, 항체 또는 항체 단편을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하는데, 이 경우 매트릭스는 성형 물품, 예컨대 필름 또는 마이크로캡슐의 형태를 가질 수 있다.

[0430] 생체 내 투여에 사용될 제제는, 일반적으로 멸균의 것이다. 멸균성은, 예컨대 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0431] E. 치료 방법 및 조성물

[0432] 본원에 제공된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것이 치료 방법에 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 의약품으로 사용될 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 제공된다. 추가의 양태들에서, 암(예컨대 유방암, 비 소세포 폐암, 췌장암, 뇌암, 췌장, 뇌, 콩팥, 난소, 위의 암, 백혈병, 자궁 내막, 결장, 전립선, 갑상샘, 간의 암, 골육종 및/또는 흑색종)을 치료하는데 이용될 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 제공된다. 임의의 구현예들에서, 치료 방법에 사용될 항 Ax1 항체 또는 항체 단편이 제공된다. 임의의 구현예들에서, 본 발명은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량만큼을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암이 발병한 개체를 치료하는 방법에 사용되기 위한, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 임의의 구현예들에서, 본 발명은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량

만큼을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역 장애(예컨대 자가면역성 장애), 심혈관 장애(예컨대 죽상경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환(예컨대 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스) 또는 당뇨병이 발병한 개체를 치료하는 방법에 사용되기 위한, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 이러한 일 구현예에서, 본 방법은 적어도 하나의 추가 치료제, 예컨대 이하에 기술된 바와 같은 치료제 유효량만큼을 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 구현예들에서, 본 발명은 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제에 사용되기 위한, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 제공한다.

[0433] 임의의 구현예들에서, 본 발명은 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조 발달(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조 발달) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제를 위하여, 개체에 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제 방법에 사용되기 위한, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 "개체"는, 바람직하게 인간이다.

[0434] 추가의 양태에서, 본 발명은 의약품 제작 또는 제조에 있어 항 Ax1 항체 또는 항체 단편의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 의약품은 암(몇몇 구현예들에서 유방암, 비 소세포 폐암, 췌장암, 뇌암, 췌장, 뇌, 콩팥, 난소, 위의 암, 백혈병, 자궁 내막, 결장, 전립선, 갑상샘, 간의 암, 골육종 및/또는 흑색종)을 치료하기 위한 것이다. 추가의 구현예에서, 의약품은 암이 발병한 개체에 의약품 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 추가의 구현예에서, 의약품은, 개체에 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는, 면역 장애(예컨대 자가면역성 장애), 심혈관 장애(예컨대 죽상경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환(예컨대 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스) 또는 당뇨병을 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 이러한 일 구현예에서, 방법은, 예컨대 하기 기술된 바와 같은 추가의 치료제 적어도 하나 유효량만큼을 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 구현예에서, 의약품은 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제를 위한 것이다. 추가의 구현예에서, 의약품은 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 촉진, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 유도, 종양 혈관구조 발달(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조 발달) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제를 위하여, 개체에 의약품 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함하는, 개체 내 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제 방법에 사용하기 위한 것이다. 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 "개체"는 인간일 수 있다.

[0435] 추가의 양태에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 이러한 암이 발병한 개체에 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 일 구현예에서, 본 방법은 이하에 기술된 바와 같은 추가의 치료제 적어도 하나를 유효량만큼 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 개체는 인간일 수 있다.

[0436] 추가의 양태에서, 본 발명은 면역 장애(예컨대 자가면역성 장애), 심혈관 장애(예컨대 죽상경화증, 고혈압, 혈전증), 감염성 질환(예컨대 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스) 또는 당뇨병을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 이러한 일 구현예에서, 본 방법은 이하에 기술된 바와 같은 추가의 치료제 적어도 하나를 유효량만큼 개체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 구현예들 중 임의의 것에 따른 개체는 인간일 수 있다.

[0437] 추가의 양태에서, 본 발명은 개체 내 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 억제제, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 억제제, 종양 혈관구조(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제를 위한 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 혈관신생 억제제, 세포 증식 억제제, 면역 기능 촉진, (예컨대 종양 연관 대식세포로부터의) 염증 시토킨 분비 유도, 종양 혈관구조 발달(예컨대 종양내 혈관구조 또는 종양 연관 혈관구조 발달) 억제 및/또는 종양 기질화 기능 억제제를 위하여, 개체에 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 유효량만큼을 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, "개체"는 인간이다.

[0438] 추가의 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 상기 치료 방법들 중 임의의 방법에 사용되기 위한, 본원에 제공된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것을 포함하는 약학 제제를 제공한다. 일 구현예에서, 약학 제제는 본원에 제공된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것과, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 다른 구현예에

서, 약학 제제는 본원에 제공된 항 Ax1 항체 또는 항체 단편 중 임의의 것과, 예컨대 이하에 기술된 바와 같은 추가의 치료제 적어도 하나를 포함한다.

[0439] 전술된 각각의 치료 및 모든 치료에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 단독으로 사용될 수 있거나, 면역접합체로서 사용될 수 있거나, 아니면 치료법에 사용되는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 항체는 추가의 치료제 적어도 하나와 함께 투여될 수 있다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 혈관신생억제제이다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 VEGF 길항제(몇몇 구현예들에서는, 항 VEGF 항체, 예를 들어 베바시주맵)이다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 EGFR 길항제이다(몇몇 구현예들에서는 에를로티닙)이다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 화학요법제 및/또는 세포증식억제성 제제다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 탁소이드(예컨대 파클리탁셀) 및/또는 백금 제제(예컨대 카보플라티닙)이다. 임의의 구현예들에서, 추가의 치료제는 환자의 면역성 또는 면역계를 증강시키는 제제이다.

[0440] 이처럼 상기 언급된 병행 치료법은, (2개 이상의 치료제가 동일한 제제 또는 별도의 제제에 포함되는 경우) 혼합 투여(combined administration)와, 항체 또는 항체 단편의 투여가 추가의 치료제 및/또는 보조제가 투여되진, 투여됨과 동시에, 그리고/또는 투여된 후에 진행될 수 있는 별도 투여(separate administration)를 포함한다. 항체 또는 항체 단편은 또한 방사선 치료법과 함께 사용될 수 있다.

[0441] 항체 또는 항체 단편은 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여될 수 있다. 이러한 경우에 고려될 인자들로서는, 치료중인 특정 장애, 치료중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 병태, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 계획, 그리고 기타 의료 실무자들에게 공지된 인자들을 포함한다. 항체 또는 항체 단편은, 미지의 장애를 예방 또는 치료하기 위해 현재 사용되고 있는 제제 하나 이상과 반드시 함께 제제화되어야 하는 것은 아니지만, 선택적으로 이러한 제제와 제제화되기도 한다. 이와 같은 기타 제제의 유효량은 제제 중에 존재하는 항체 또는 항체 단편의 양, 장애 및 치료의 유형, 그리고 기타 상기 논의된 인자들에 따라 달라진다. 이러한 기타 제제는, 일반적으로 동일한 투여량으로 본원에 기술된 바와 같은 투여 경로에 따라서 사용되거나, 또는 본원에 기술된 투여량의 약 1% 내지 약 99%만큼, 또는 실험상/임상상 적당하다고 판단되는 임의의 투여량만큼, 그리고 그와 같은 임의의 경로에 의해 사용된다.

[0442] 항체 또는 항체 단편의, 질환의 예방 또는 치료에 적당한 투여량은, (이 항체 또는 항체 단편이 단독으로 사용되거나, 아니면 하나 이상의 다른 추가 치료제와 함께 사용될 때) 치료될 질환의 유형, 항체 또는 항체 단편의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체 또는 항체 단편이 예방을 위해 투여되는지 아니면 치료를 위해 투여되는지 여부, 선행 치료법, 환자의 임상 병력과 항체 또는 항체 단편에 대한 반응, 그리고 참여 전문의의 판단력에 의존적일 것이다. 항체 또는 항체 단편은 한 번에 또는 일련의 치료 과정에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형과 중증도에 따라서, 항체 또는 항체 단편 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 40 mg/kg 은, 이 용량만큼이, 예를 들어 1회 이상의 별도 투여에 의해 투여되거나, 또는 연속 주입에 의해 투여되거나 간에, 환자에 투여되기 위한 초회 후보 투약량이 될 수 있다. 통상적인 1일 투여량 1회분은, 상기 언급된 인자들에 따라서 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 100 mg/kg 또는 이 이상의 범위일 수 있다. 병태에 따라 수 일 또는 이보다 더 긴 기간에 걸친 반복 투여가 실시되기 위해서는, 일반적으로 해당 질환의 증상의 원하는 억제 효과가 나타날 때까지 치료가 지속될 것이다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예컨대 매주 또는 3주마다(예컨대 환자가 항체 또는 항체 단편을 약 2회 내지 약 20회, 예를 들어 약 6회 투약을 받도록) 투여될 수 있다. 다량의 초회 담지 용량(initial loading dose)만큼이 투여되고 나서, 이후에 이보다 더 적은 용량만큼이 1회 이상 투여될 수 있다. 그러나 다른 투약 계획이 유용할 수 있다. 이러한 치료법의 진행은 종래의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0443] 상기 제제화 또는 치료 방법 중 임의의 것은, 항 Ax1 항체 대신에, 또는 이에 더하여 본 발명의 항체 단편 또는 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있음이 이해된다.

[0444] 숙주의 면역 기능을, 종양을 이길 정도로 증강시키는 것은 점점 더 많은 관심을 받고 있는 주제이다. 종래의 방법들은 (i) 예컨대 (a) 외래 MHC 동종항원을 암호화하는 DNA를 종양에 주사하거나, 또는 (b) 생검된 종양 세포를, 종양의 면역 항원 인지 가능성을 높이는 유전자(예컨대 면역자극성 시토카인, GM-CSF, 보조자극 분자 B7.1, B7.2)로 형질감염시켜 APC를 증강시키는 방법, (ii) 활성화된 종양 특이적 T 세포가 사용되는 입양 세포 면역요법(adoptive cellular immunotherapy) 또는 치료를 포함한다. 입양 세포 면역요법은, 종양 침윤성 숙주 T 림프구를 분리하는 단계, 이 집단을, 예컨대 IL-2 또는 종양, 아니면 이 둘 다에 의한 자극을 통해 시험관 내에서 증식시키는 단계를 포함한다. 추가로, 분리된 기능장애 T 세포는 또한 항 PD-L1 항체의 시험관 내 적용에 의해 활성화될 수 있다. 그 다음, 이처럼 활성화된 T 세포가 숙주에게 투여될 수 있다. 이와 같은 방법들 중 한 가지는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 면역접합체의 투여와 함께 사용될 수 있다.

- [0445] 전통적인 암 치료법으로서는 다음과 같은 방법들을 포함한다: (i) 방사선 치료법(예컨대 방사선요법, X-선 치료법, 조사) 또는 이온화 방사선을 적용하여 암세포를 사멸시키고 종양을 축소시키는 방법[방사선 요법은 외부 빔 방사선요법(EBRT) 또는 근접방사선치료를 통한 내부 방사선요법을 통해 실시될 수 있음]; (ii) 화학요법, 즉 일반적으로 급속하게 분열하는 세포에 영향을 미치는 세포독성 약물을 적용하는 방법; (iii) 암 세포의 탈조절된 단백질에 특이적으로 영향을 주는 표적 치료법 또는 이를 위한 제제(예컨대 티로신 키나아제 억제제 이마티닙, 데피티닙; 모노클로날 항체, 광역학 치료법); (iv) 면역요법, 즉 숙주 면역 반응을 증강시키는 방법(예컨대 백신); (v) 호르몬 요법, 즉 (예를 들어 종양이 호르몬에 감수성인 때) 호르몬을 봉쇄하는 방법; (vi) 혈관신생 억제제 사용법, 즉 혈관 형성 및 성장을 봉쇄하는 방법, 그리고 (vii) 완화 치료, 즉 통증, 메스꺼움, 구토, 설사 및 출혈을 감소시키기 위하여 케어의 질을 개선시키는 방향의 치료. 통증 의약품, 예컨대 모르핀 및 옥시코돈, 구토 방지제, 예컨대 온단세트론 및 아프레피탄트는 더욱 공격적인 치료 계획을 허용할 수 있다.
- [0446] 암 치료 방법 중, 전술된 바와 같은 종래의 암 면역 치료를 위한 치료 방법들 중 임의의 방법은 항 Ax1 항체 또는 항체 단편을 투여하기 전, 투여한 후 또는 투여함과 동시에 수행될 수 있다. 추가로, 항 Ax1 항체 또는 항체 단편은 종래의 암 치료 방법, 예컨대 종양 결합 항체(예컨대 모노클로날 항체, 독소-접합 모노클로날 항체)의 투여, 및/또는 화학요법제의 투여가 수행되기 전, 수행된 후, 또는 수행과 동시에 투여될 수 있다.
- [0447] **F. 제조 물품 및 키트**
- [0448] 본 발명의 또 다른 양태에서, 전술된 장애들을 치료, 예방 및/또는 진단하기에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 본 제조 물품은 용기, 그리고 이 용기상에 붙어있거나 또는 합체되어 있는 표지 또는 팩키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기로서는, 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리나 플라스틱으로 제조될 수 있다. 용기는 조성물만을 담고 있거나, 또는 조성물과, 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 또 다른 조성물을 함께 담고 있으며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 피하 주사용 바늘로 구멍이 뚫어질 수 있는 마개를 가지는, 정맥내 주사용액이 담긴 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성 제제는 본 발명의 항체 또는 항체 단편이다. 표지나 팩키지 삽입물은, 조성물이 특정 병태를 치료하기 위해 사용됨을 알려준다. 더욱이 제조 물품은 (a) 내부에 조성물이 담긴 제1 용기[다만 이 조성물은 항체 또는 항체 단편을 포함함]와; (b) 내부에 조성물이 담긴 제2 용기[다만 이 조성물은 추가의 세포독성 제제, 아니면 치료제를 포함함]를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 같은 구현예에 있어서 제조 물품은, 조성물이 특정 병태를 치료하는데 사용될 수 있음을 말해주는 팩키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 제조 물품은 약학적으로 허용 가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 포스페이트 완충 염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 담고 있는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 제조사 및 사용자의 입장에서 요망되는 기타 물질/부재, 예컨대 기타 완충제, 희석제, 충전제, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.
- [0449] 상기 제조 물품들 중 임의의 것은 항 Ax1 항체 대신에, 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있음이 이해된다.
- [0450] 마지막으로, 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 항체 단편 적어도 하나를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드, 항체 또는 항체 단편, 항체-약물 접합체를 담고 있는 키트는, Ax1 발현(증가 또는 감소)을 검출하거나, 치료 또는 진단을 위한 검정에 사용된다. 본 발명의 키트는 고체 지지체, 예컨대 조직 배양 평판이나 비드(예컨대 세포코스 비드)에 커플링된 항체를 함유할 수 있다. Ax1을 시험관 내에서 검출 및 정량(예컨대 ELISA 또는 웨스턴 블롯)하기 위한 항체를 담고 있는 키트가 제공될 수 있다. 이처럼 검출에 유용한 항체는 표지, 예컨대 형광표지나 방사성표지와 함께 제공될 수 있다.
- [0451] 본 키트는 자체의 사용에 관한 지침을 추가로 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 지침은 시험관 내 진단 키트에 관하여 미국 식품의약국에 의해 요구되는 지시사항을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 키트는 어떤 시료 중 Ax1의 존재 또는 부재를 바탕으로 이러한 시료 중 뇌척수액의 존재 또는 부재를 진단하기 위한 지침을 추가로 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 키트는 항체 또는 항체 단편 하나 이상을 포함한다. 다른 구현예들에서, 키트는 효소, 효소 억제제 또는 효소 활성화제 하나 이상을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예들에서, 키트는 크로마토그래피 화합물 하나 이상을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예들에서, 키트는 분광검정을 위한 시료를 제조하는데 사용되는 화합물 하나 이상을 추가로 포함한다. 추가의 구현예들에서, 키트는 지표(indicator)의 세기, 색 스펙트럼 또는 기타 물리적 속성에 따라 Ax1의 존재 또는 부재를 판별하기 위한 비교용 기준 물질을 추가로 포함한다.
- [0452] 이하 실시예들은 본 발명의 연질 젤라틴 캡슐을 예시로서 든 것이지만 이것에 한정되는 것은 아니다. 보통 당 분야에서 마주하게 되는 정도의 것으로서 당 업자들에게 명백한, 조건과 매개변수의 다양성에 관한 기타 적합한

변형 및 수정은 본 발명의 범위 내에 있다.

[0453] 실시예

[0454] 실시예 1: Ax1에 대한 조건부 활성 항체

[0455] Ax1은 조건부 활성 항체가 접근 가능한 세포의 도메인을 가지는 경막 티로신 키나아제이다. 이 세포 표면 단백질은 감상샘 암종 조직 내에서 고도로 발현되고, 다수의 기타 암, 예컨대 골수증식성 장애, 전립선 암종 세포 또는 유방암에서는 과발현된다. Ax1 단백질의 세포의 도메인에 대한 조건부 활성 항체는 본 발명을 통해 개발된 것이다.

[0456] Ax1에 대한 야생형 항체가 (도 1a의 063-hum10F10-HC 중쇄 가변 영역과, 도 1b의 063-hum10F10-HC 경쇄 가변 영역을 가지는) 주형 항체로서 선택되었다. 야생형 항체를 암호화하는 DNA가, 포괄적 위치상 진화 (Comprehensive Positional Evolution; CPE), 즉 주형 항체 중 각각의 위치가 한 번에 하나씩 랜덤화되는 방법을 이용하여 돌연변이 항체를 제조하기 위해 진화되었다. 라이브러리내 각각의 돌연변이 항체는 오로지 하나의 단일 점 돌연변이만을 가진다. 라이브러리내 돌연변이 항체는, ELISA에 의해 확인되는 바에 따라, pH 7.4에서의 Ax1에 대한 선택적 결합 친화성에 비한, pH 6.0에서의 Ax1에 대한 선택적 결합 친화성을 동시에 스크리닝함으로써 제조되었다.

[0457] 이와 동시에, 돌연변이 항체의 발현 수준은 또한 제조 과정에 있어서 더 높은 필드(field)를 지향하는 방향으로 최적화되었다. 스크리닝은 FLAG 태그를 사용하여 혈청 중에서 수행되었는데, 그 이유는 스크리닝에 있어서 위양성(false positive)을 유발할 수 있는 인간 항체가 혈청 중에 존재하였기 때문이다. 스크리닝 완충제는 탄산염 완충제(즉 링커-표준 완충제를 포함하되 PBS와는 상이한 Krebs 완충제)였다. 생성된 조건부 활성 항체는, pH 6.0에서는 Ax1에 대한 친화성이 더 컸지만, pH 7.4에서는 Ax1에 대한 친화성이 더 작았다(이 두 경우 모두 야생형 항체와 비교되었을 때임). 선택된 돌연변이 항체(scFv) 몇몇이 도 2에 도시되어 있는데, 이것들은 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 활성이 더 컸는데, pH 6.0에서의 활성과 pH 7.4에서의 활성은 비율상 적어도 11배 차이가 났다(도 3).

[0458] 뿐만 아니라, 이와 같은 조건부 활성 항체는 모두 이하 표 4에 나타난 바와 같이 발현 수준이 높다[다만 표 4에서 "클론" 컬럼은 항체를 보여주고, 발현 수준은 두 번째 컬럼에 "mg/ml"로 보여줌].

[0459] 이러한 항체 클론들은 요구되는 발현 수준("주문량", 예상 발현 수준)과 함께 서비스 제공자에게 보내어졌다. 그러나 이러한 항체의 실제 발현 수준("전달된 양")은 매우 높아서 예상 발현 수준을 초과하였다.

표 4

발현 수준이 높은 조건부 활성 항체

클론	[mg/mL]	예상 수득량	실제 수득량
BAP063.6-01-05	6.6	150	238
BAP063.2-01-10	7	150	294
BAP063.8-46-04	7	200	333
BAP063.8-62-02	5.8	200	220
BAP063.9-13-01	5.3	50	123
BAP063.9-29-02	4.9	50	102
BAP063.9-45-02	5.4	50	129
BAP063.9-13-03	5.9	50	130
BAP063.9-21-03	5.3	50	117
BAP063.9-21-04	7	50	176
BAP063.9-29-04	8.2	50	196
BAP063.9-48-03	7	50	125
BAP063.9-49-04	5.3	50	126
BAP063.9-61-01	5.1	50	97
BAP063.9-61-02	5	50	92

[0460]

- [0461] 조건부 활성 항체는, 일례로서 BAP063.9-13-1 항체가 사용될 때 도 4에 보인 바와 같이 완충제 중에 응집을 보이지 않았다. BAP063.9-13-1 항체는 크기별 배제 크로마토그래피에 의해 분석되었다. 도 4에 있어서, 오로지 하나의 피크만이 검출되었는데, 이는 항체의 응집이 아주 조금 일어났거나 전혀 일어나지 않았음을 입증하는 것이다.
- [0462] 조건부 활성 항체는 또한 이 항체의 Ax1에 대한 결합-해리 속도(on-off rate)를 측정하기 위해 표면 플라즈몬 공명법(SPR)을 이용하여 검정되었다. SPR 검정은, 조건부 활성 항체의 결합-해리 속도를 측정하기 위한 것으로 공지되어 있다. 이 SPR 검정은 중탄산염의 존재 하에 수행되었다. 조건부 활성 항체의 (동물 및 인간에서의) 생체 내에서의 결합-해리 속도는 본 조건부 활성 항체에 매우 중요한 특징이다.
- [0463] 조건부 활성 항체는 음성 대조군(pH 6.0과 pH 7.4 둘 다에서 결합 친화성이 유사한 BAP063 10F10)과 비교하였을 때, pH 6.0에서 결합 친화성이 더 컸고, pH 7.4에서는 결합 친화성이 더 작았던 것으로 관찰되었다(도 5). 더욱이, 온도가 실온에서 60℃로 상승하면, ELISA 검정 결과들은 거의 바뀌지 않았다(도 5). ELISA 검정은 또한, 이와 같은 조건부 활성 항체가 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서가 선택성이 더 컸음을 보여주었다(도 6a 및 도 6b는, 일례로서 하나의 항체의 경우를 보여줌).
- [0464] 조건부 활성 생물 항체는 표 5에 요약되어 있다. 이 항체들 중 2개는 scFv(BAP063.9-13.3 및 BAP063.9-48.3)로서 표시되어 있다. 항체가 60℃에서 1 시간 동안 항온처리되었을 때 항체 대부분의 친화성은 바뀌지 않았다("열 안정성").
- [0465] 조건부 활성 항체는 본 발명에 따라 CTC 표면의 Ax1 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다.

표 5

조건부 활성 항 Ax1 항체 요약

클론	mg/ml	예상 수득량	실제 수득량	응집 {PBS, pH 7.4}	열안정성 {1 시간 60 °C}	Ka [M·s]	Kd [s ⁻¹]	KD [M] pH 6.0
BAP063.1-01-10	7	150	294	No	100%	5.14E+06	8.38E-04	1.63E-10
BAP063.6-01-05	6.6	150	236	N.D.		2.41E+06	5.12E-03	2.12E-09
BAP063.9-13-01	5.3	50	123	No	100%	1.98E+06	2.88E-03	1.46E-09
BAP063.9-29-02	4.9	50	102	No	100%	1.19E+06	2.14E-03	1.79E-09
BAP063.9-45-02	5.4	50	129	No	감소	1.53E+06	2.31E-03	1.51E-09
BAP063.9-13-03	5.9	50	130	No	100%	1.42E+06	1.82E-03	1.28E-09
BAP063.9-21-03	5.3	50	117	No	100%	1.53E+06	4.13E-03	2.69E-09
BAP063.9-21-04	7	50	176	No	100%	1.03E+06	3.26E-03	3.16E-09
BAP063.9-29-04	8.2	50	196	No	100%	1.40E+06	2.21E-03	1.58E-09
BAP063.9-48-03	7	50	125	<5%	감소	8.92E+05	2.33E-03	2.61E-09
BAP063.9-49-04	5.3	50	126	No	100%	2.35E+06	3.42E-03	1.45E-09
BAP063.9-61-01	5.1	50	97	<10%	100%	n.d.	n.d.	
BAP063.9-61-02	5	50	92	<10%	100%	1.72E+06	2.85E-03	1.66E-09

- [0466]
- [0467] 실시예 2: 항 Ax1 항체의 pH 의존적 결합 친화성
- [0468] 본 발명의 항 Ax1 항체들 몇몇은 상이한 pH 수준의 완충제 중에서 시험되었다. 완충제 일 유형은, 1% 소 혈청 알부민(BSA)을 포함하는 KREBS 완충제였다. KREBS 완충제는 pH가 5 ~ 7.4의 범위가 되도록 적정되었다. 항체와 Ax1의 결합 친화성은 ELISA 검정(OD₄₅₀)에 의해 측정되었고, 그 결과는 도 7에 제시되어 있다. 2개의 대조군 항체(BAP063-3831 및 BAP063-3818)는 자체의 결합 친화성이 pH 변화에 거의 영향을 받지 않았던 것으로 보아 조건부 활성이 아니었다. 다른 한편, 본 발명의 항 Ax1 항체는 pH에 따라서 Ax1과의 결합 친화성이 달라졌던 것으로 보아 조건부 활성이다(도 7).
- [0469] 실시예 3: 항 Ax1 항체에 의한 세포 사멸
- [0470] 본 발명의 항 Ax1 항체의 세포 사멸 활성은 A549 세포를 사용하여 시험되었다. 그 결과가 도 8a 내지 도 8e에 제시되어 있다. 세포 사멸 활성은 2 가지 pH 수준(pH 6.0 및 pH 7.4)에서 측정되었는데; 이 pH 6.0 및 pH 7.4는 각각 종양 미세환경 pH와 정상 생리적 pH를 나타내는 것이다. 다양한 항체 농도에서의 세포 사멸%는 도 8a

내지 도 8e에 제시되어 있다.

[0471] 2가지 시험은 일관된 세포 사멸 결과를 보였다. 음성 대조군(항 Ax1 인간화 WT)은, pH 6.0 및 pH 7.4에서 A549 세포에 대해 유사한 세포 사멸 활성을 보였다(도 8a). 이와는 반대로, 본 발명의 항 Ax1 항체는, pH 7.4에서의 세포 사멸 활성에 비하여 유의미하게 더 큰, pH 6.0에서의 세포 사멸 활성을 보여주었는데, 이는 항체가 A549 세포를 포화시키지 않았던 낮은 항체 농도일 때 특히 그러하였다(도 8b 내지 도 8e).

[0472] **실시예 4: 사이노-Ax1에 대한 항 Ax1 항체의 결합 친화성**

[0473] 본 발명의 항 Ax1 항체의 사이노-Ax1에 대한 결합 친화성이 측정되어, 2개의 상이한 완충제(즉 pH가 6.0 및 7.4 인 완충제) 중 인간 Ax1(hAx1)의 결합 친화성과 비교되었다. 그 결과는 도 9a 내지 도 9d에 보였다. 사이노-Ax1 은 인간 이외의 영장류, 즉 사이노몰거스 마카쿠스(*cynomolgus macaques*) 원숭이로부터 유래한 Ax1 단백질이다.

[0474] 대조군(BA-3831-WT)은, 2가지 완충제 중 pH 6.0 및 7.4 두 경우에서 인간 Ax1(hAx1)과 사이노몰거스 Ax1(cyno-Ax1) 둘 다에 대해 유사한 결합 친화성을 보였다(도 9a). 본 발명의 항 Ax1 항체는 2개의 완충제 중 어느 하나 에서 hAx1 및 사이노-Ax1에 대하여 유사한 결합 친화성 프로파일(즉 pH 6.0에서의 사이노-Ax1에 대한 결합 친화성 에 비하여 더 작은, pH 7.4에서의 사이노-Ax1에 대한 결합 친화성)을 보였다(도 9b ~ 도 9d). 다른 완충제 중 pH 6.0 및 pH 7.0에서의 결합 친화성 간 차이는 유의미하지 않았다.

[0475] **실시예 5: 듀오마이신에 접합된 항 Ax1 항체의 세포독성**

[0476] 듀오마이신은 단백질 합성을 중지시켜 세포 성장을 억제하므로 세포독성이다. 본 발명의 항 Ax1 항체들 중 하나 인 BAP063.9 4007이 듀오마이신에 접합되었다. 2개의 대조군이 본 실험에 사용되었는데(BAP063 hum WT 및 B12 (항 B12 항체)), 이 둘 다도 또한 듀오마이신에 접합되었다.

[0477] 몇몇 세포주가, pH 6.0 및 7.4에서 3개의 듀오마이신 접합 항체(BAP063.9 4007, BAP063 hum WT 및 B12)로 처리 되었다(도 10a ~ 도 10h). 본 발명의 듀오마이신 접합 항체 BAP063.9 4007은 pH 7.4에서의 세포주 DU145(전립 선암 세포), MDA-MD-231(유방암 세포), PL45(췌장암 세포) 및 A549(선암종 세포)에 대한 세포 독성에 비하여 유 의미하게 더 큰, pH 6.0에서의 세포주 DU145(전립선암 세포), MDA-MD-231(유방암 세포), PL45(췌장암 세포) 및 A549(선암종 세포)에 대한 세포 독성을 보였다.

[0478] **실시예 6: 모델 독소에 접합된 항 Ax1 항체**

[0479] 본 발명의 항 Ax1 항체가 모델 독소(예컨대 겐시타빈)에 접합되었으며, 그 결과 조건부 활성 항체-약물 접합체 (CAB-Ax1-ADC)가 제조되었다. CAB-Ax1-ADC는 처음에, 조건부 세포 사멸 활성이 약물 접합 방법에 의해 변경되지 않았음을 확인하기 위해 시험되었다. 이 시험은, CAB-Ax1-ADC가 pH 7.4에서보다 pH 6.0에서 유의미하게 더 많은 세포를 사멸시켰음을 보여주었다(도 11).

[0480] 그 다음, MiaPaCa2 이종이식 종양을 보유하는 마우스에 CAB-Ax1-ADC가 1 mg/kg의 용량으로 1 주일에 2회씩 총 3 주 동안 주사되었다. 나출 CAB(접합이 이루어지지 않은 항 Ax1 항체), 비이클, 독소 단독(미접합 겐시타빈), 대 조군 ADC, 친화성 매칭 항 Ax1 ADC(AM ADC)를 비롯한 몇몇 대조군이 본 연구에 사용되었다. 본 연구는, CAB-Ax1-ADC(CAB ADC) 및 AM ADC가 대조군들에 비하여 종양 크기에 있어 유의미하게 더 많은 감소를 달성하였음을 보여주었다(도 12). 미접합 항 Ax1 항체는 종양의 크기를 감소시키지 못하였다. 본 연구는, 종양 크기를 감소시 키는데 있어서 독소가 접합된 항 Ax1 항체가 친화성 매칭 항체만큼 효과적임을 보여주었다.

[0481] **실시예 7: 사이노몰거스 마카쿠스 원숭이에 있어 항 Ax1 항체 약물 접합체의 혈청 중 농도**

[0482] 본 발명의 항 Ax1 항체의 약물(듀오마이신) 접합체(CAB-ADC)가 수컷 및 암컷 사이노몰거스 마카쿠스 원숭이에 3 가지 용량(0.1, 1 및 10 mg/kg)으로 주사되었다. 나출된 항 Ax1 항체는 대조군으로 사용되었다. 친화성 매칭 항 체 약물 접합체(AM-ADC)도 또한 대조군으로 사용되었다. 항체의 혈청 농도는 1주일의 기간에 걸쳐 측정되었다 (168 시간, 도 13a 및 도 13b 참조). CAB-ADC는 원숭이 혈청 중에서 AM-ADC 대조군보다 더 오랫동안 지속적으로 존재하였다(도 13b). 수컷 원숭이와 암컷 원숭이 사이에 유의미한 차이는 없었다(도 13a 및 도 13b).

[0483] **실시예 8: 사이노몰거스 마카쿠스 원숭이에 있어 항 Ax1 항체 약물 접합체의 독성**

[0484] 본 발명의 CAB-ADC 독성이 사이노몰거스 마카쿠스 원숭이를 대상을 시험되었다. 아스파르테이트 트랜스아미나아 제(AST)와 알라닌 트랜스아미나아제(ALT)가 식품의약국(FDA)에 의해 약물 간 독성에 관한 지표로서 사용되었다. 수컷 원숭이와 암컷 원숭이 둘 다를 대상으로 혈청중 AST 및 ALT 수준이 측정되었다(도 14a 및 도 14b). 비이클

(PBS)은 혈청 중 AST 및 ALT 수준을 변경시키지 않았던 반면, 매칭 항체 약물 접합체(AM)는 10 mg/kg의 용량으로 투여된 후 3일 경과시 매우 높은 AST 및 ALT 수준을 보였다. CAB-ADC는 AM 대조군에 비하여, 유의미하게 감소한 AST 및 ALT 수준을 보였다. 이는, 본 발명의 항 Ax1 항체 약물 접합체가 매칭 항체 약물 접합체 AM에 비하여 유의미하게 감소한 간 독성을 보였음을 말해주는 것이다.

[0485] 본 발명의 항 Ax1 항체 약물 접합체는 또한 원숭이에 있어서 염증을 덜 일으키는 것으로 확인되었다(도 15). CAB, AM 및 PBS 주사 후 원숭이 혈중 림프구 수가 수집되었다. 유의미한 염증을 일으켰던 AM과 비교되게, 본 발명의 항 Ax1 항체 약물 접합체(CAB-ADC)는 원숭이에 있어서 단지 가벼운 염증만을 일으켰을 따름이었다.

[0486] **실시예 9: 마우스를 대상으로 한 생체 내 실험**

[0487] 마우스에, 종양으로 발달할 종양 세포주 2개(LCLC103H 또는 DU145) 중 어느 하나가 이식되었다. 항 종양 약물 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE) 처리 후 종양 크기가 측정되었다. LCLC103H를 이식받은 마우스의 경우, 이 마우스에 단일 용량 비이클(음성 대조군)이 처리되었으며, CAB 항 Ax1 항체 접합 MMAE ADC(CAB Ax1-MMAE), 또는 비 CAB 항 Ax1 항체 접합 MMAE ADCC(비 CAB Ax1-MMAE)도 처리되었다(도 16a). ADC로 처리된 마우스의 종양은 축소되었던 반면에, 비이클 처리된 마우스의 종양은 계속해서 성장하였다.

[0488] 또한, DU145를 이식받은 마우스가 비이클(음성 대조군)로 처리되었으며, 또는 상이한 농도 2 가지, 즉 6 mg/kg 및 10 mg/kg의 CAB 항 Ax1 항체 접합 MMAE ADC(CAB Ax1-MMAE)로 처리되었다. 시간이 경과함에 따라서 종양 부피가 측정되었다. 음성 대조군(비이클)에서는 종양이 계속 성장하였던 반면에, ADC 처리된 마우스에서는 종양 성장이 늦추어졌다(도 16b).

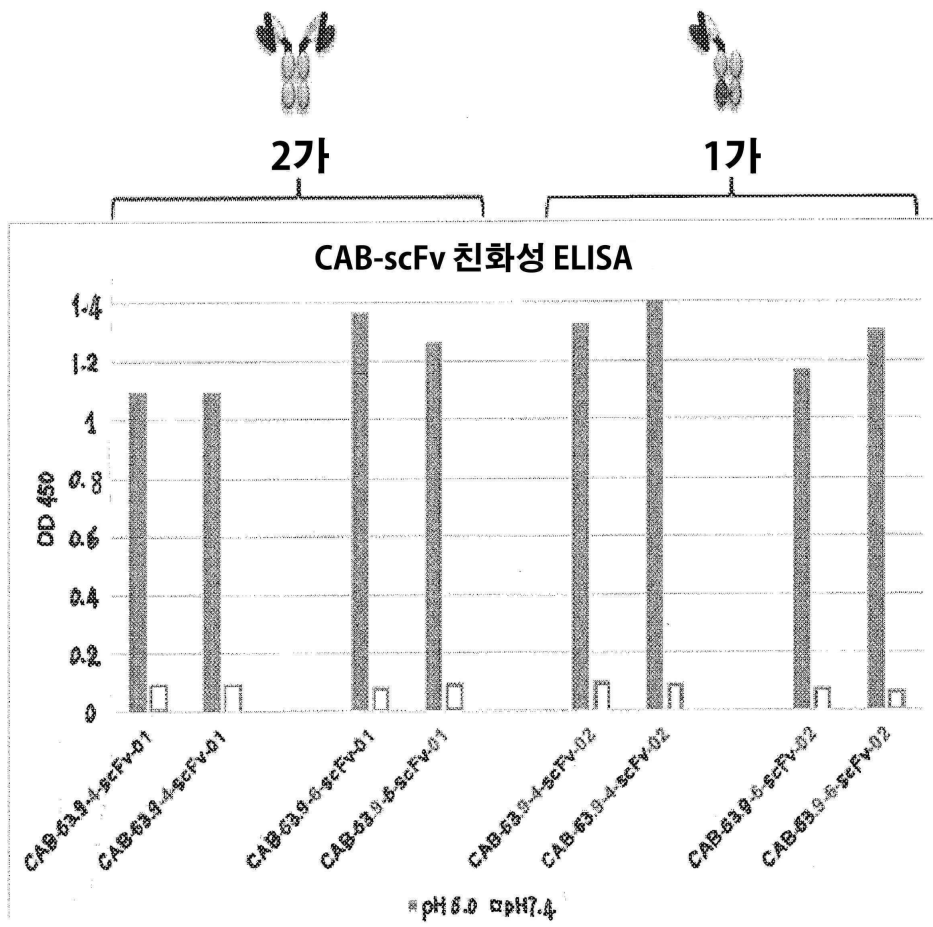
[0489] 그러나, 비록 본 발명의 다수의 특성들과 이점들이 본 발명의 구조 및 기능에 관한 상세한 설명과 함께 상기 발명의 설명 중에 제시되었을지라도, 본 개시내용은 오로지 예시를 위한 것일 뿐, 특히 본 발명의 원리 안에 속하는 부분들의 형상, 크기 및 정렬에 관한 사항 중 본원에 첨부된 특허청구범위에 표현된 용어들의 광범위하고 일반적인 의미에 의해 명시되는한 어떤 경우라도 상세한 부분까지 변화가 가하여질 수 있음이 이해될 것이다.

[0490] 본원에 인용된 모든 문헌들은, 본원에 그 전체로서, 또는 대안적으로 이 문헌들을 구체적으로 필요로하면서 본 개시내용을 제공하기 위해 참조로 인용되어 있다. 본 출원인(들)은 본원에 개시된 구현예들 그 어떠한 것도 공중에게 헌사할 의향이 없으며, 본원에 개시된 임의의 변형예들이나 변경들이 본 특허청구범위 내에 문자 그대로 포함될 수 없을지라도, 이러한 변형예들이나 변경들은 균등론 하에 본 발명의 일부인 것으로 간주된다.

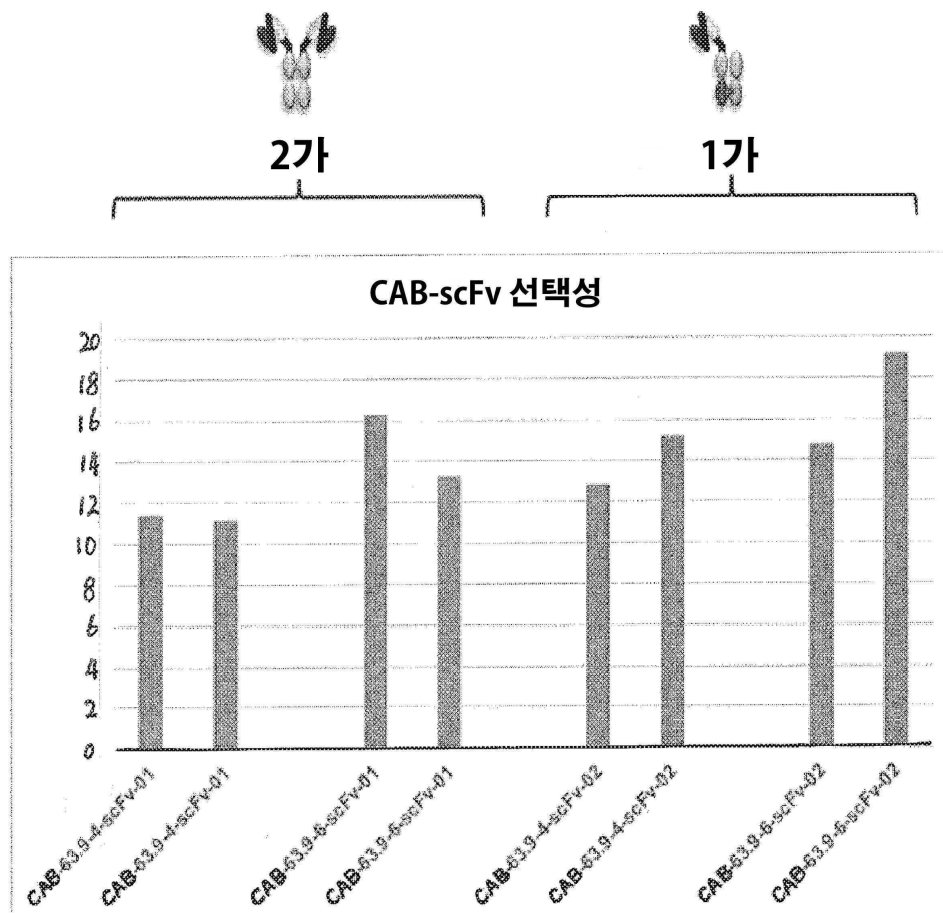
도면 1b

LC-WT	LC-V029D	D	LC-V029G	G	LC-V029N	N	LC-V029W	W	LC-S030V	V	LC-A032L	L	LC-A032M	M	LC-A034D	D	LC-A034N	N	LC-A034Q	Q	LC-W030F	F	LC-A051I	I	LC-A051N	N	LC-A051P	P	LC-A051Q	Q	LC-S052D	D	LC-H055D	D	LC-H091C	C	LC-H091F	F	LC-H091X	X	LC-H091L	L	LC-H091Q	Q	LC-H091S	S	LC-H091T	T	LC-H091V	V	LC-H091X	X	LC-F092C	C	LC-F092D	D	LC-F092E	E	LC-F092G	G	LC-F092N	N	LC-F092S	S	LC-T094C	C	LC-T094P	P	LC-P095A	A	LC-P095C	C	LC-F095D	D	LC-F095E	E	LC-F095H	H	LC-P095K	K	LC-F095S	S	LC-F095T	T	LC-F095V	V	LC-F095W	W	LC-L096G	G	LC-L096R	R	LC-T097I	I	LC-T097K	K
-------	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---	----------	---

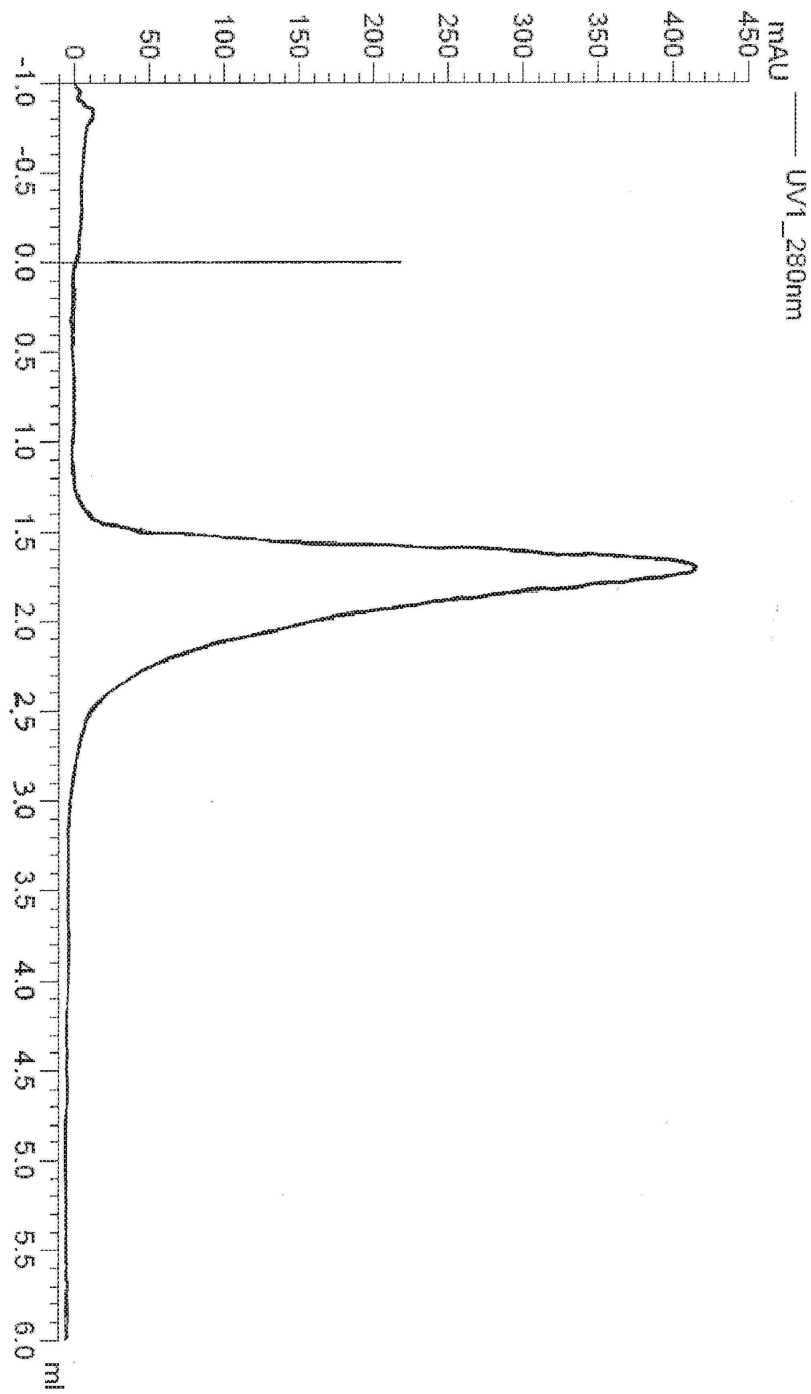
도면2



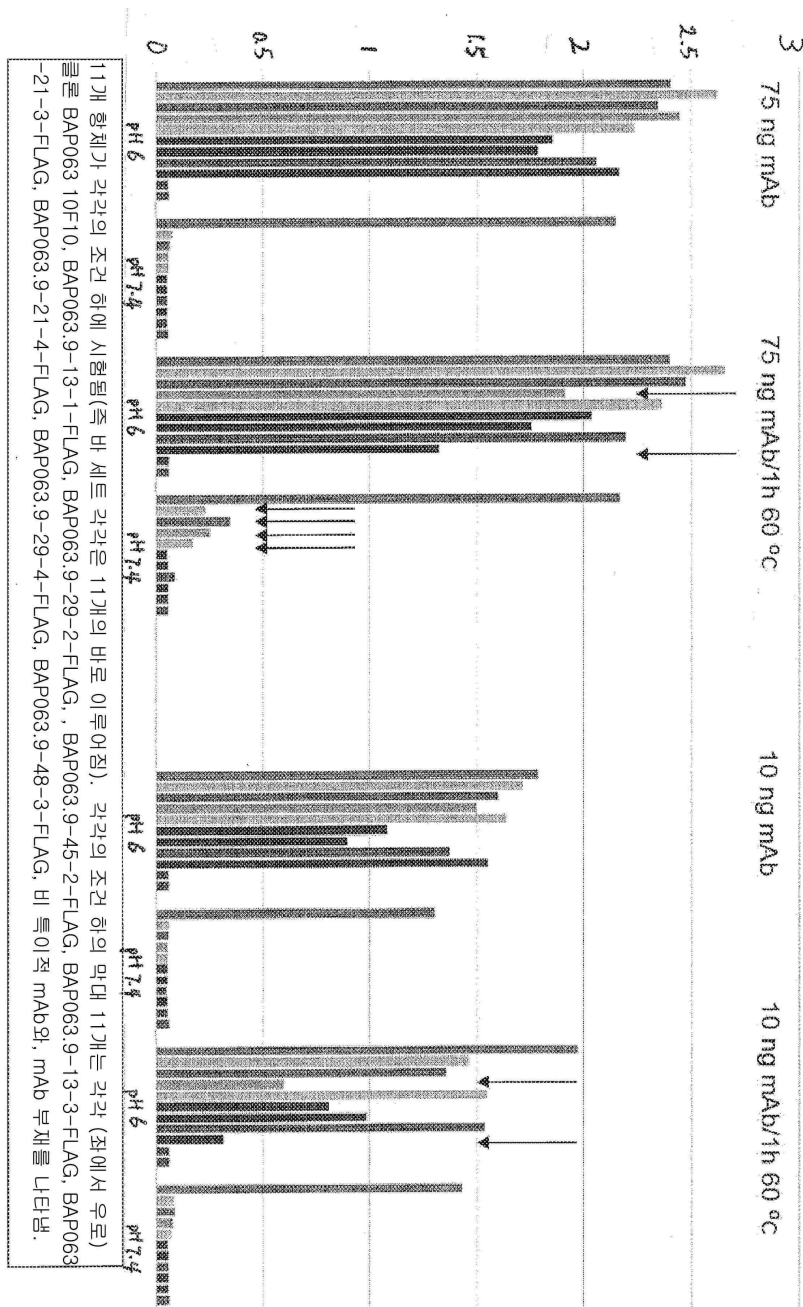
도면3



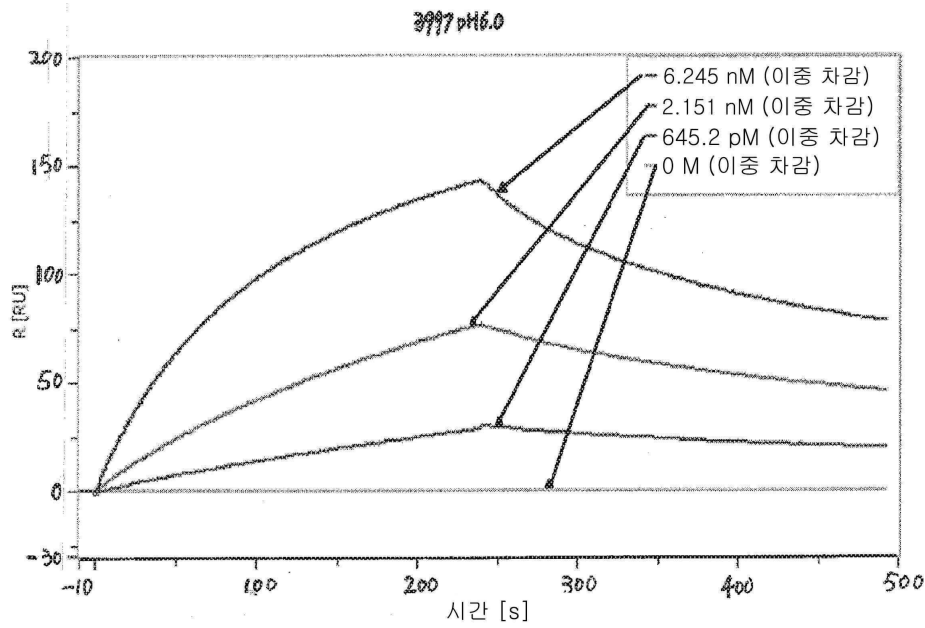
도면4



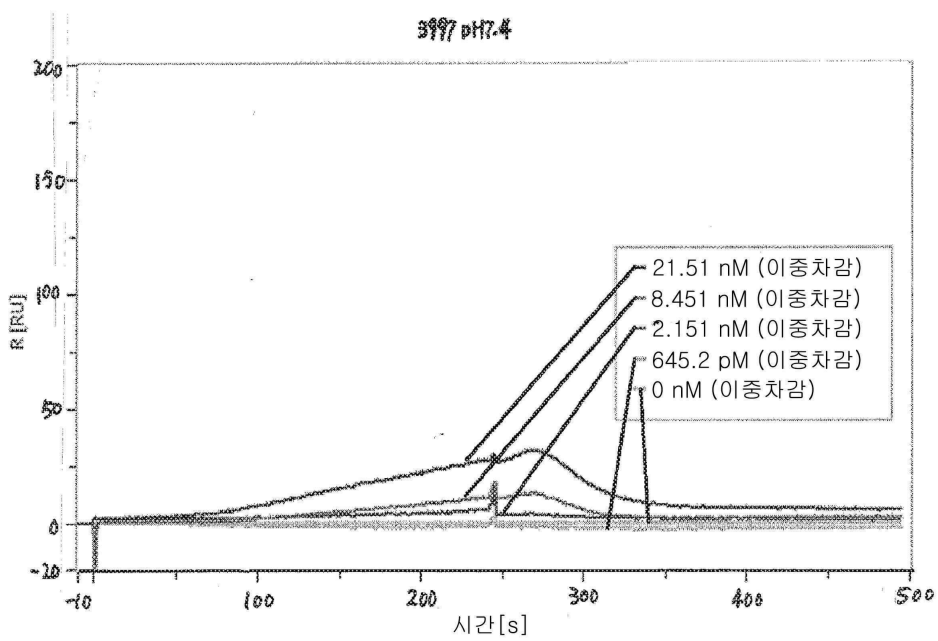
도면5



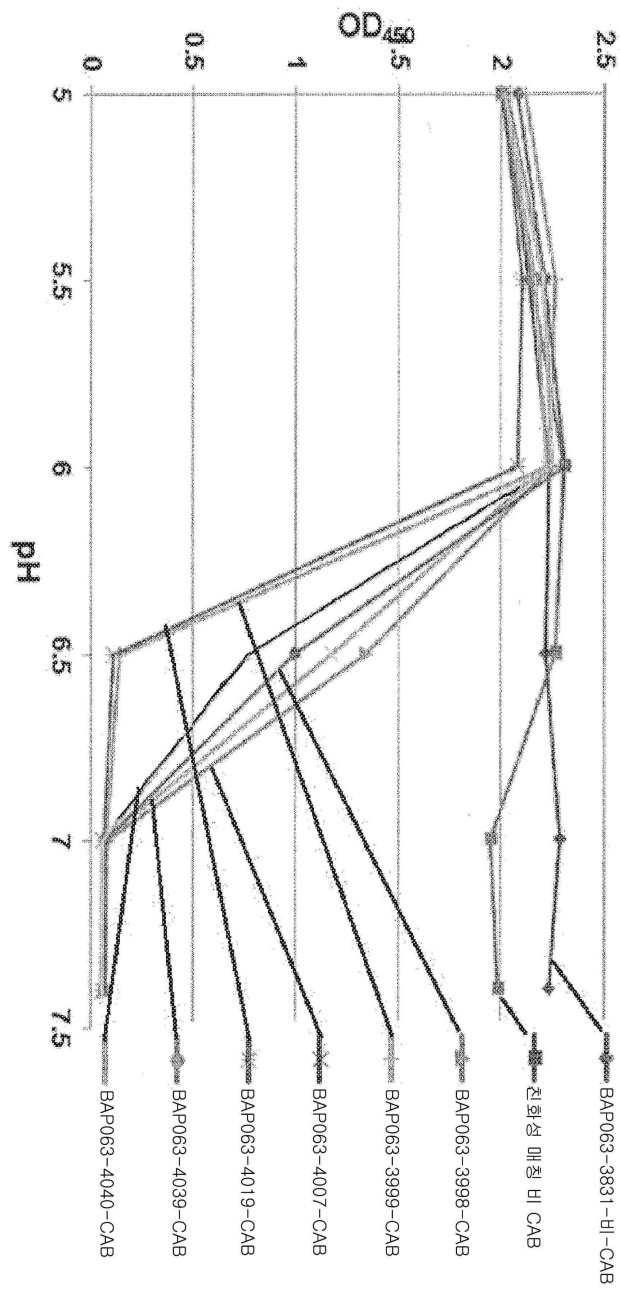
도면6a



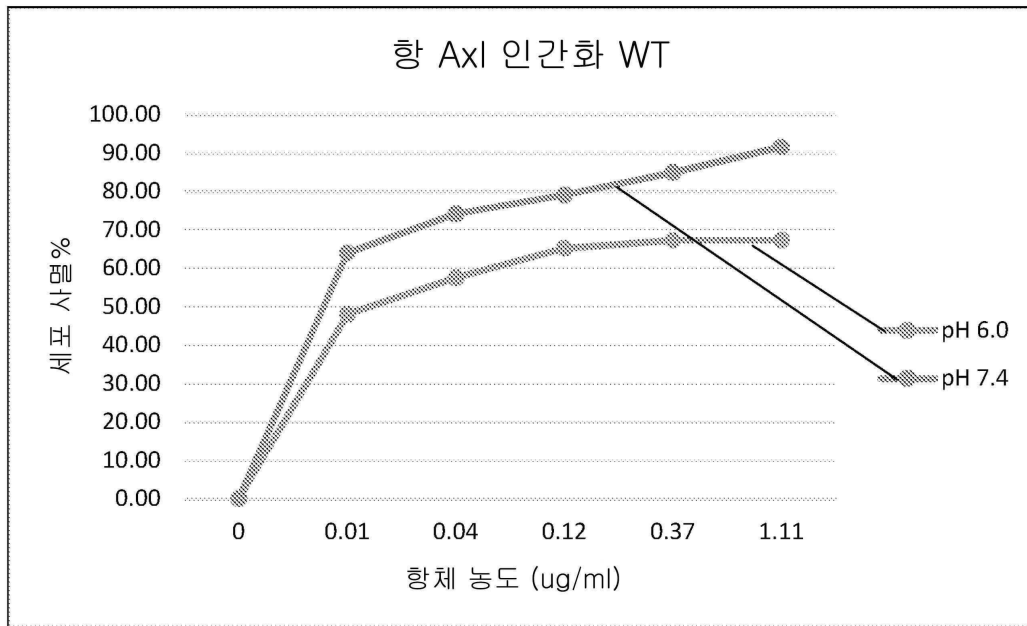
도면6b



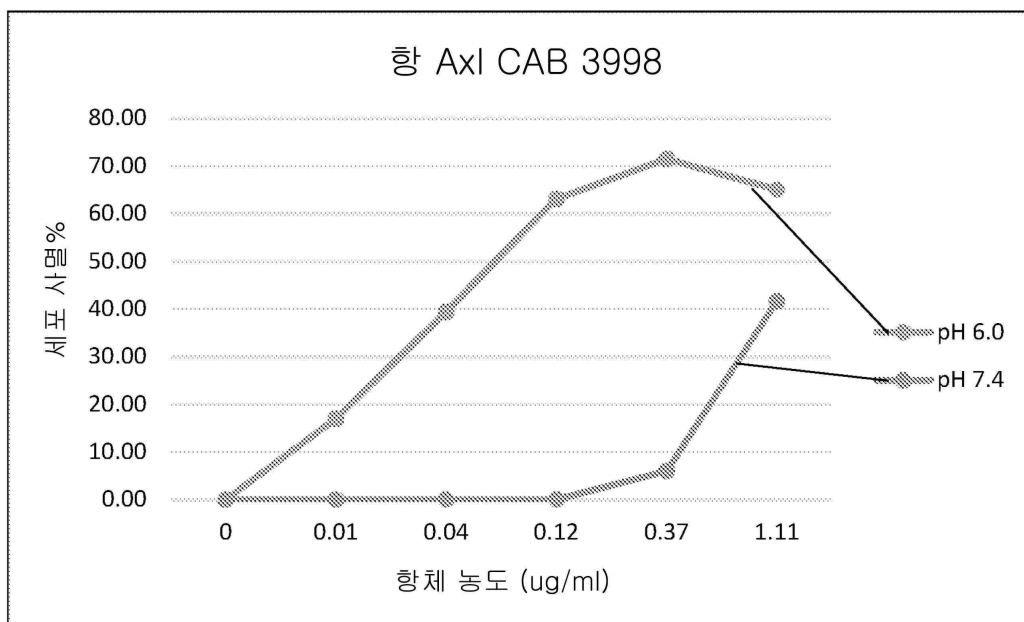
도면7



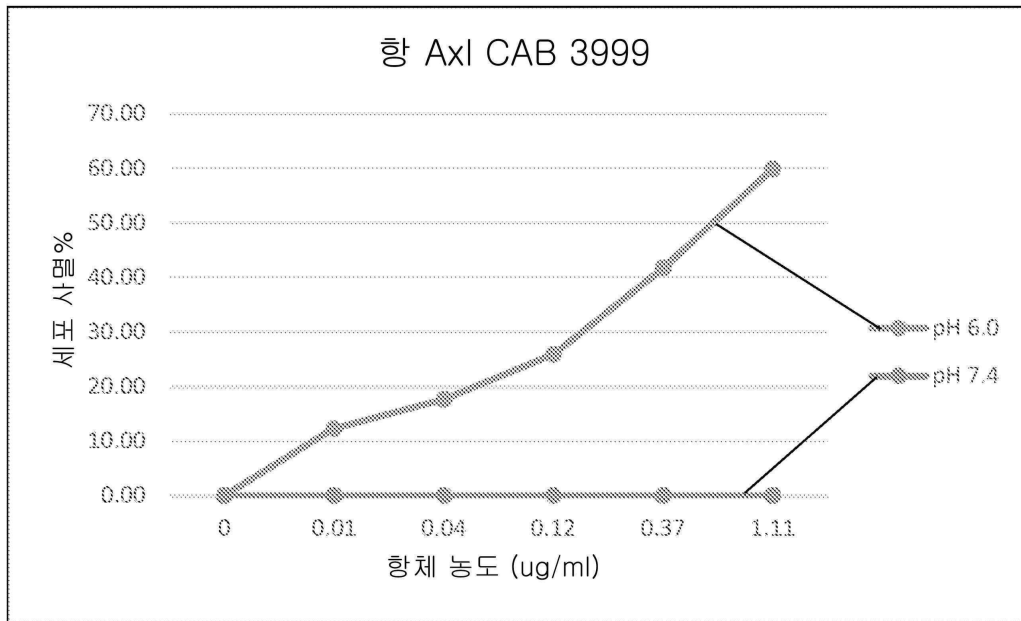
도면8a



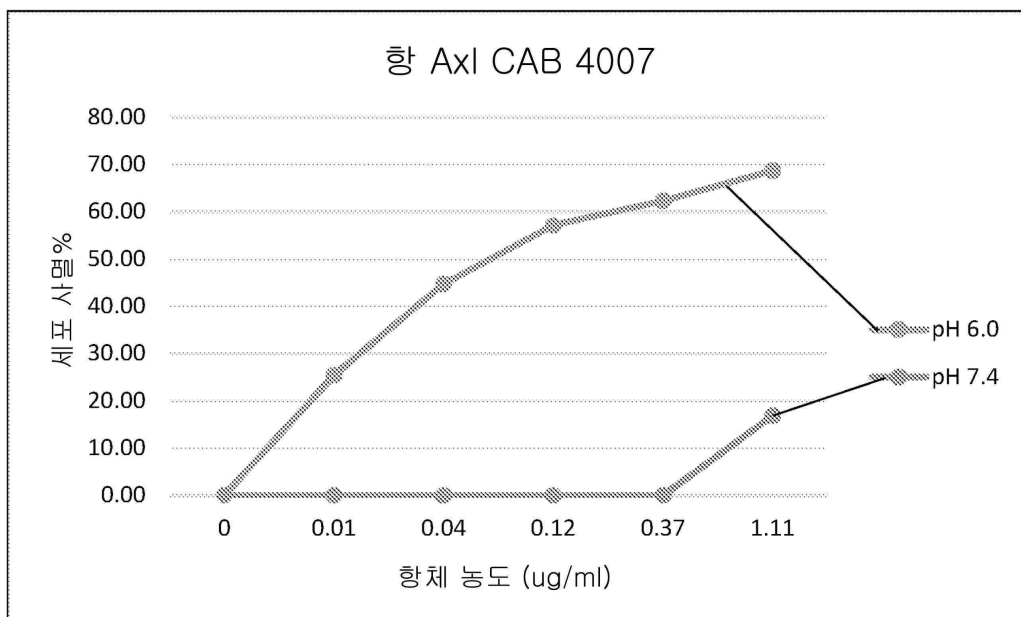
도면8b



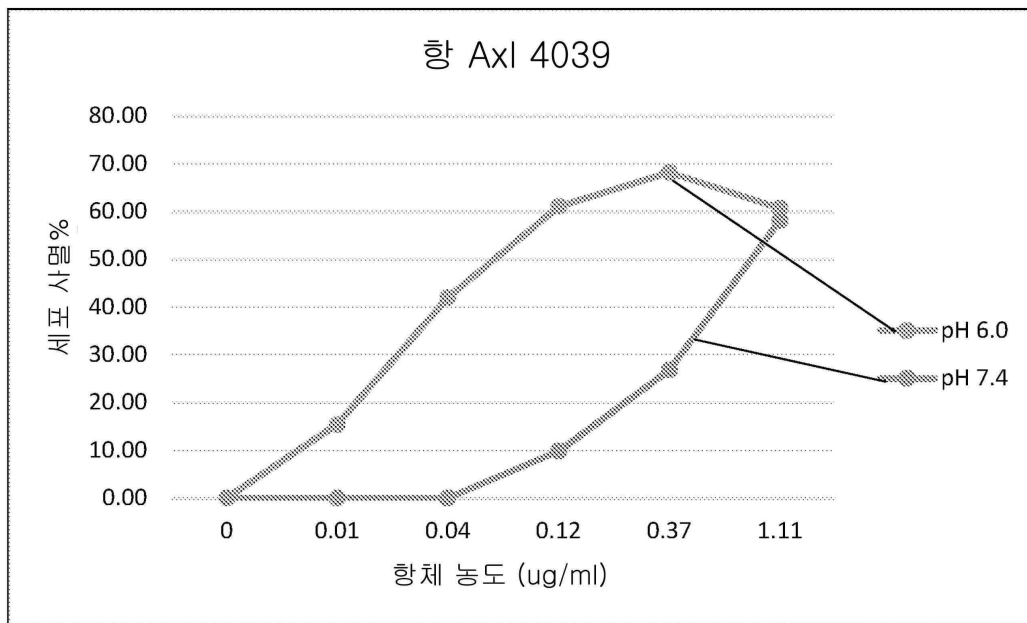
도면8c



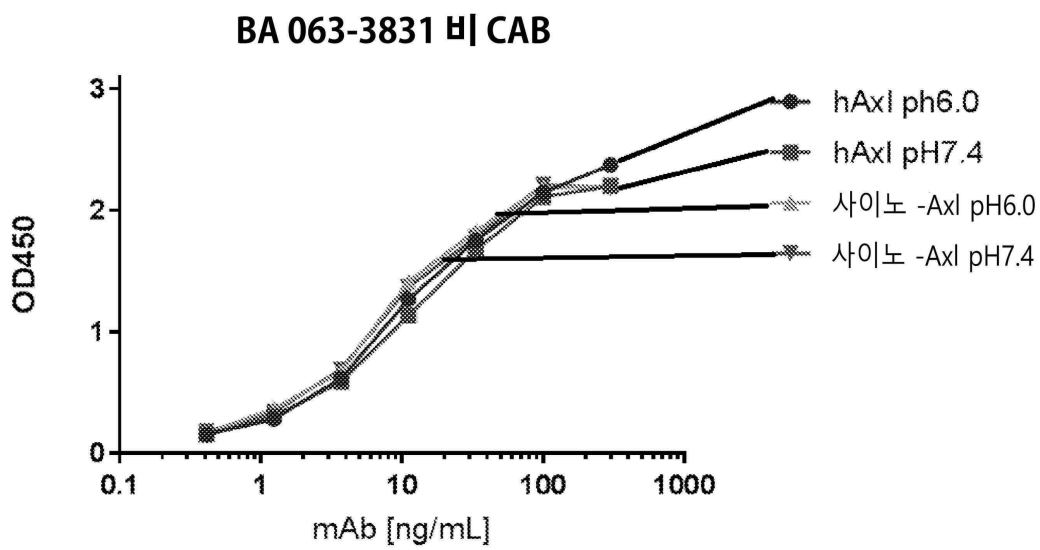
도면8d



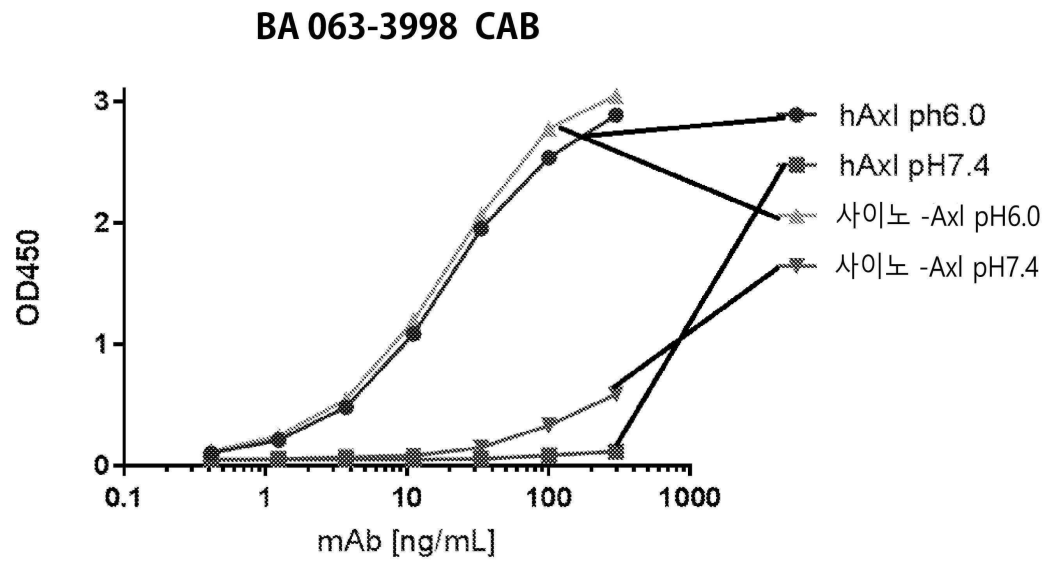
도면8e



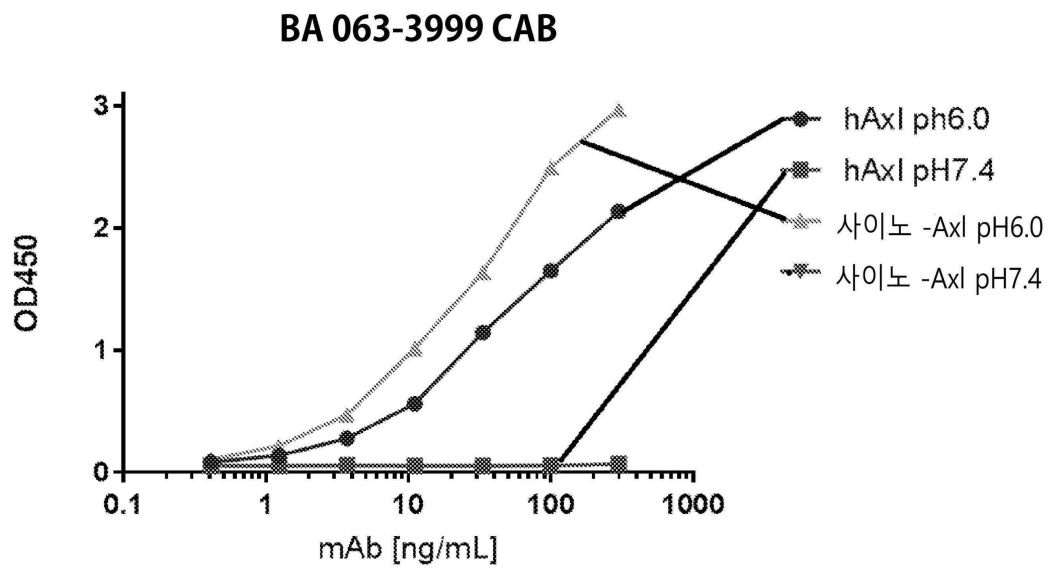
도면9a



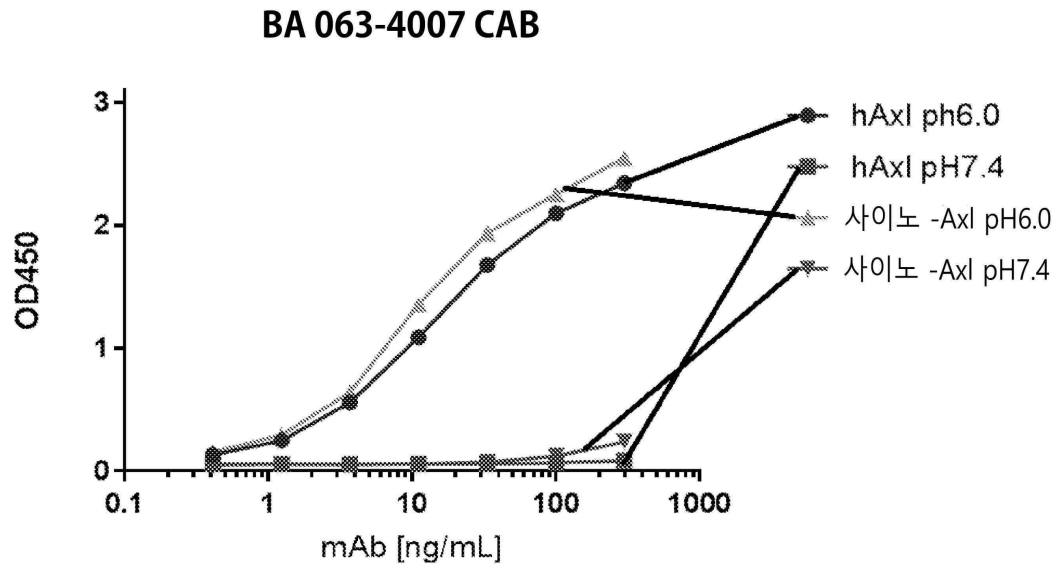
도면9b



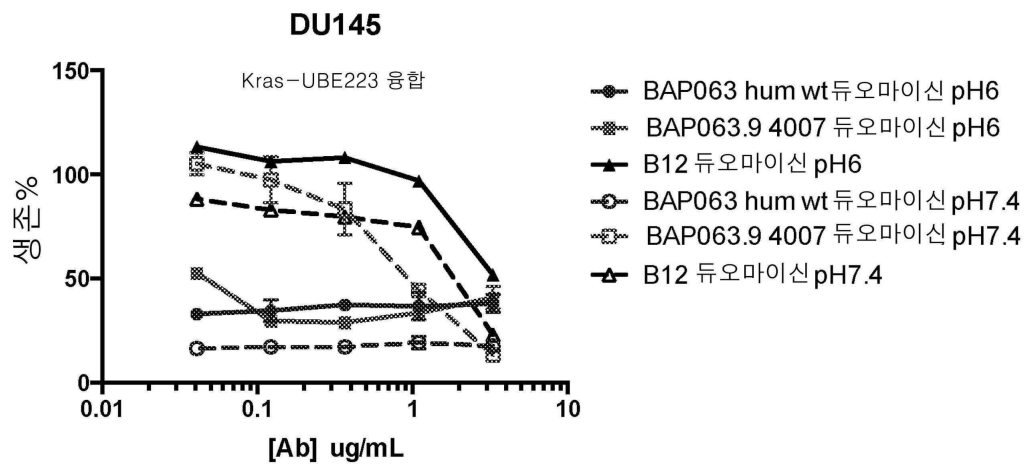
도면9c



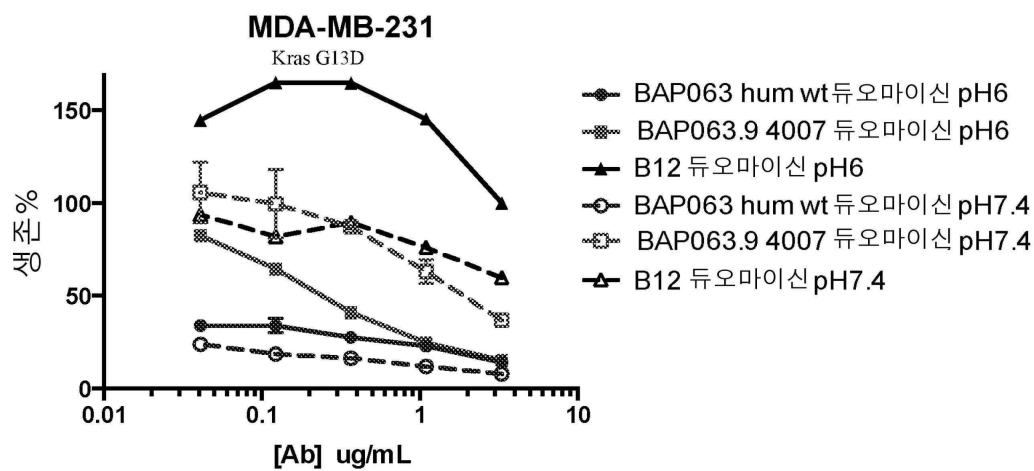
도면9d



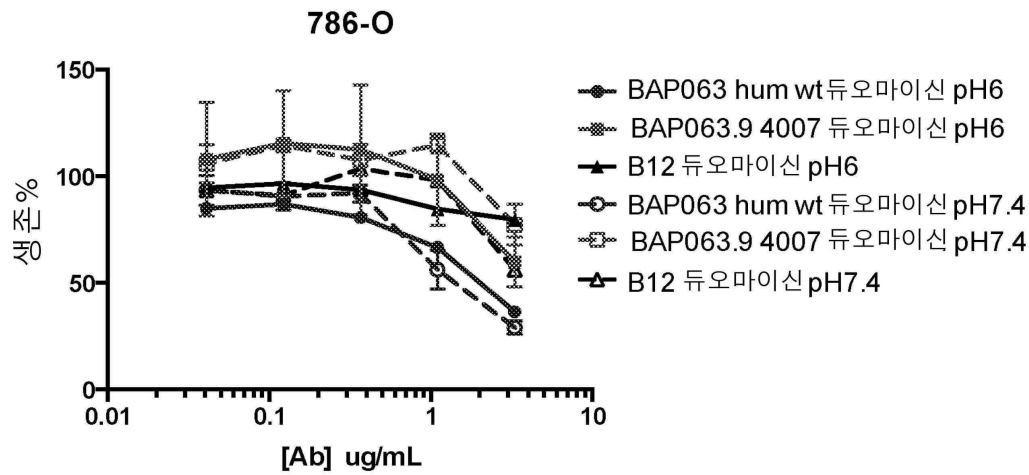
도면10a



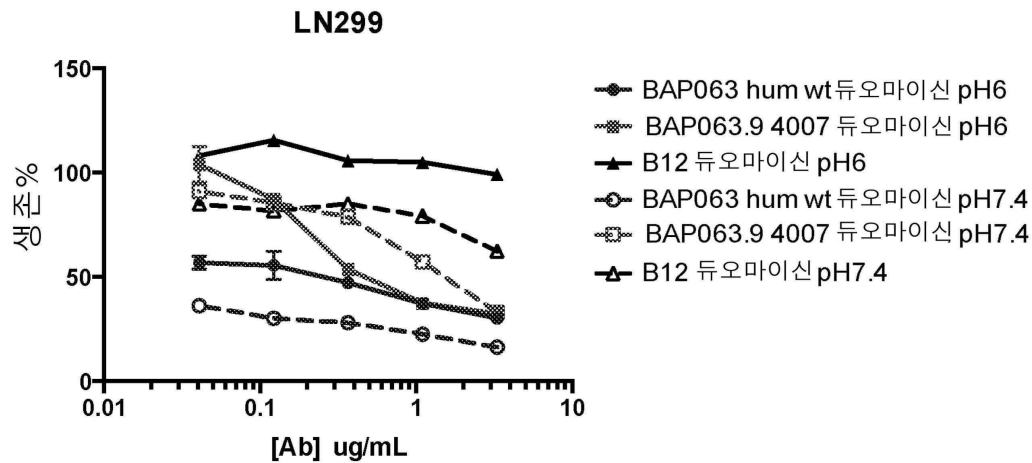
도면10b



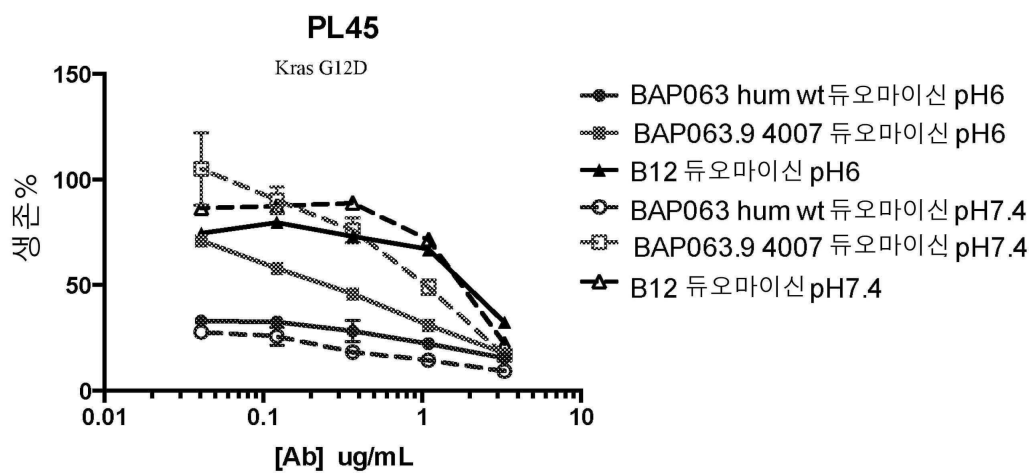
도면10c



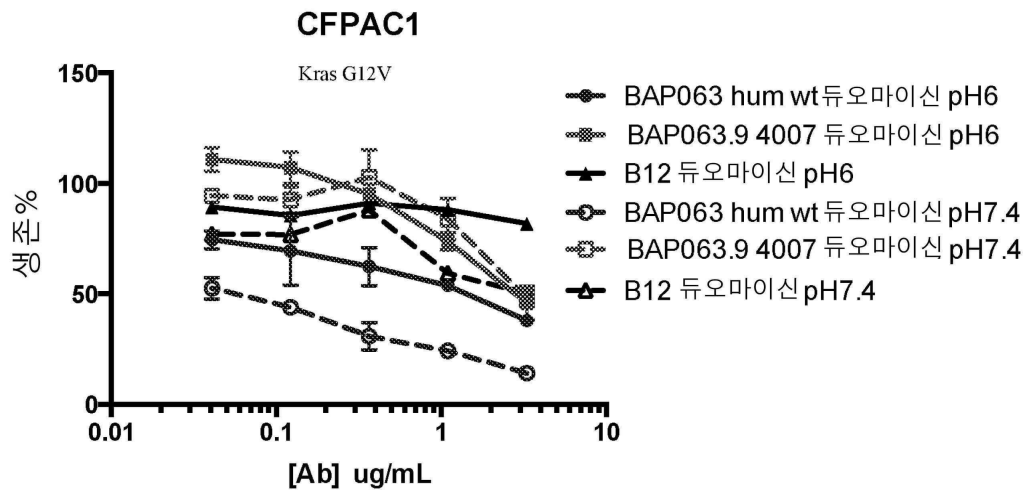
도면10d



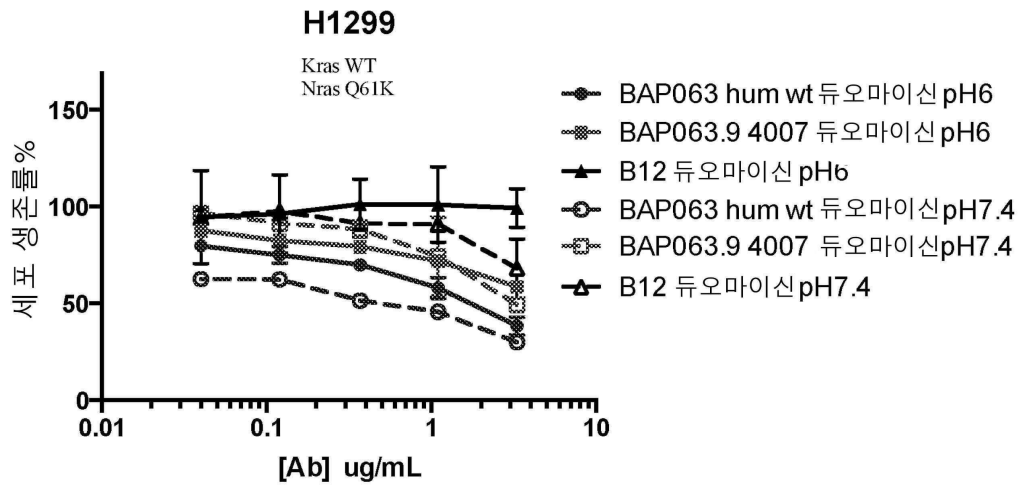
도면10e



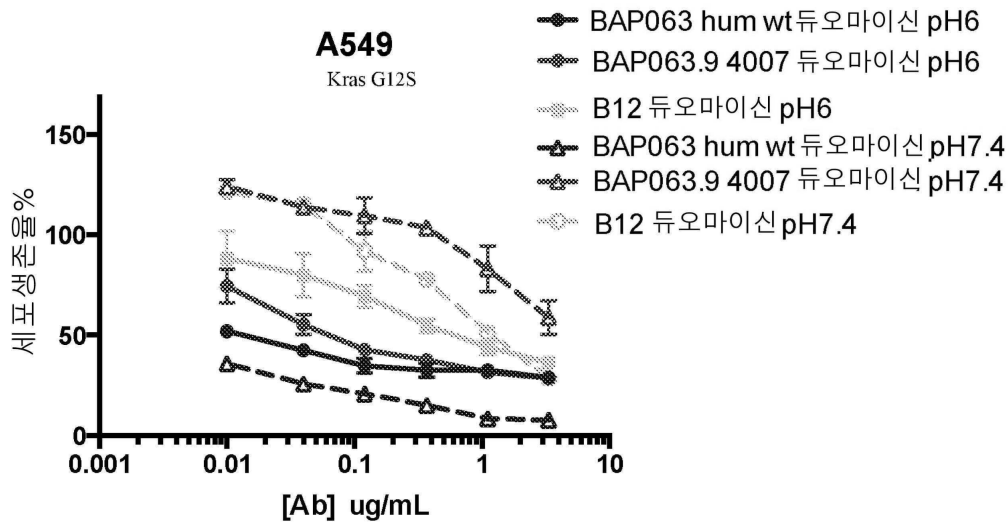
도면10f



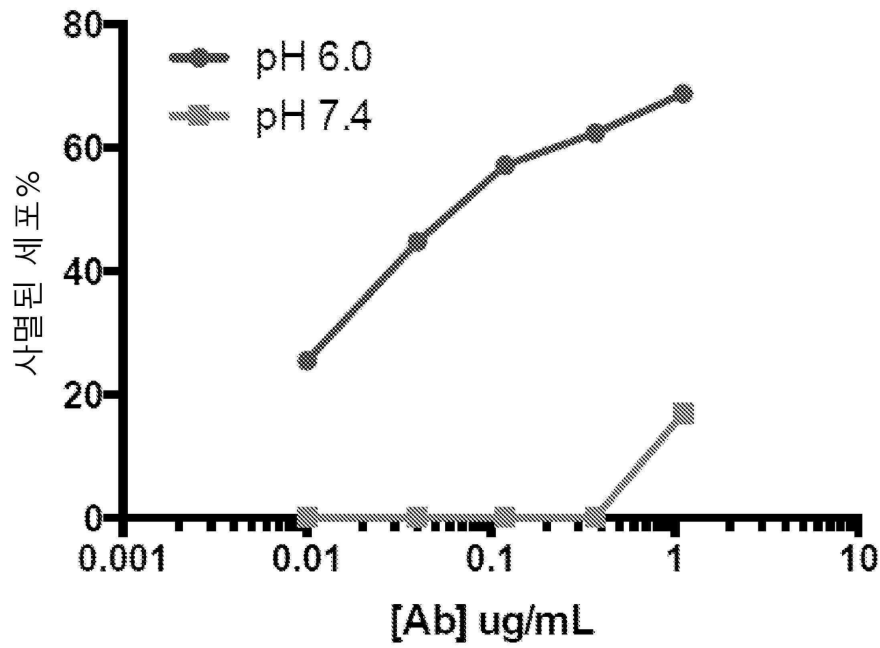
도면10g



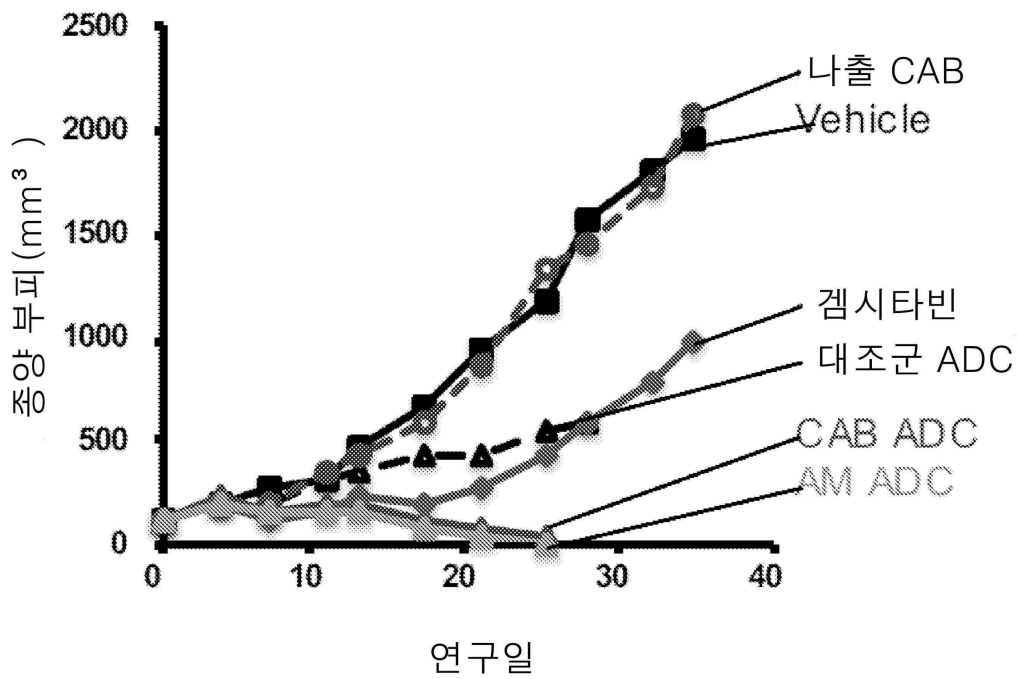
도면10h



도면11

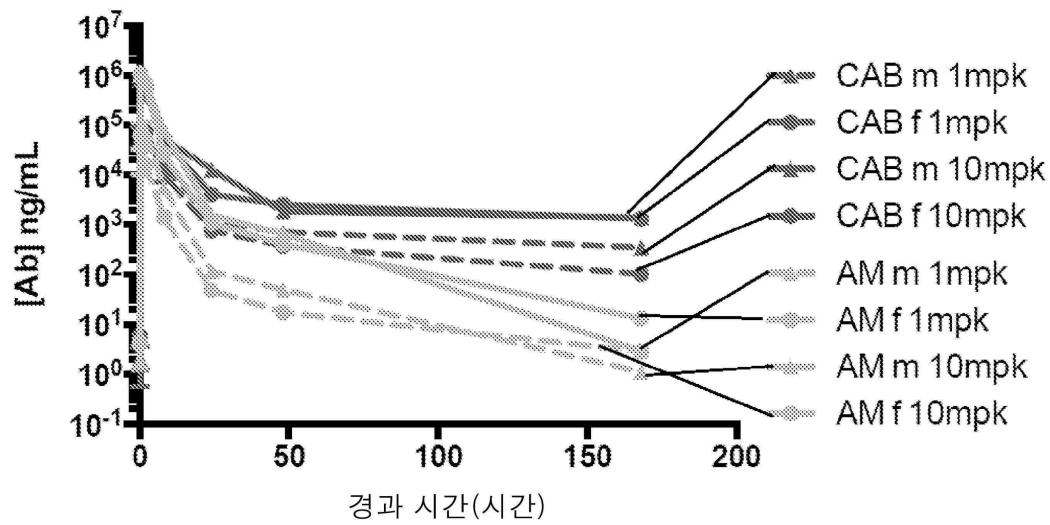


도면12



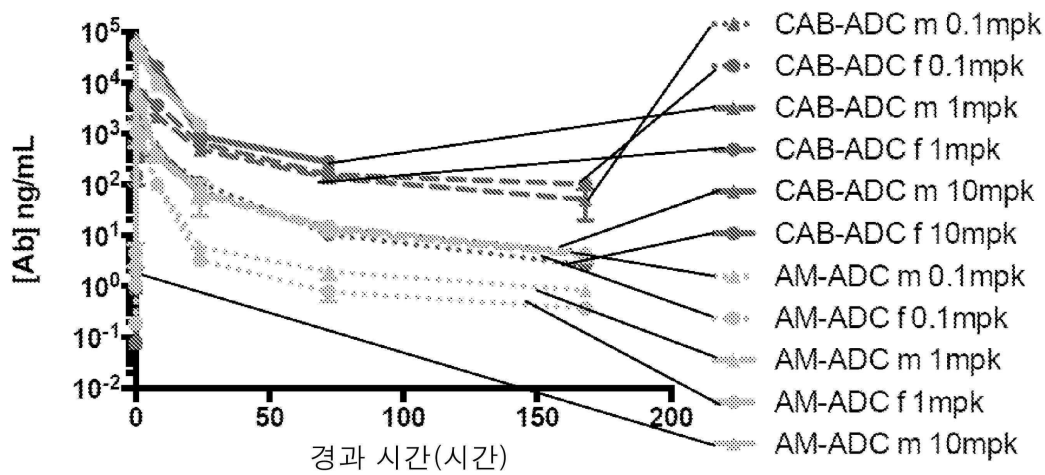
도면13a

나출 Ab

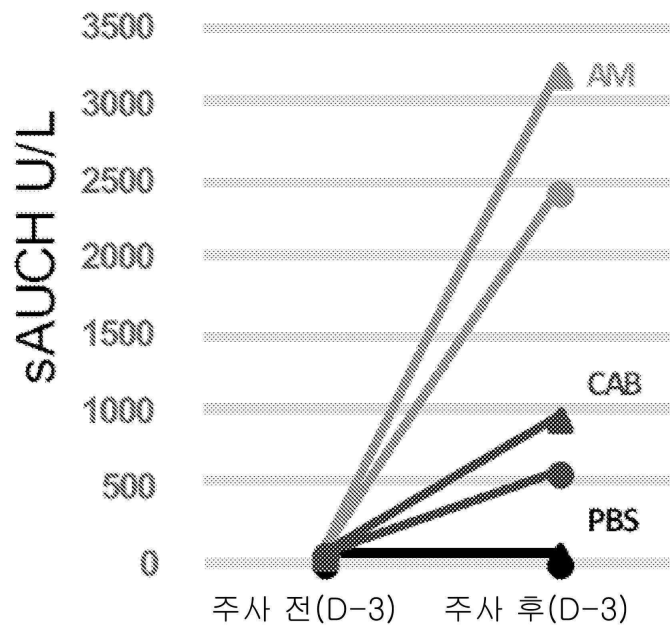


도면13b

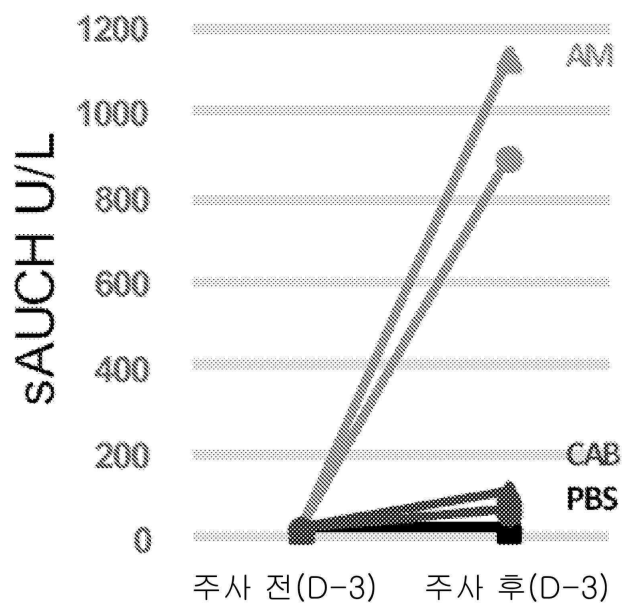
ADC



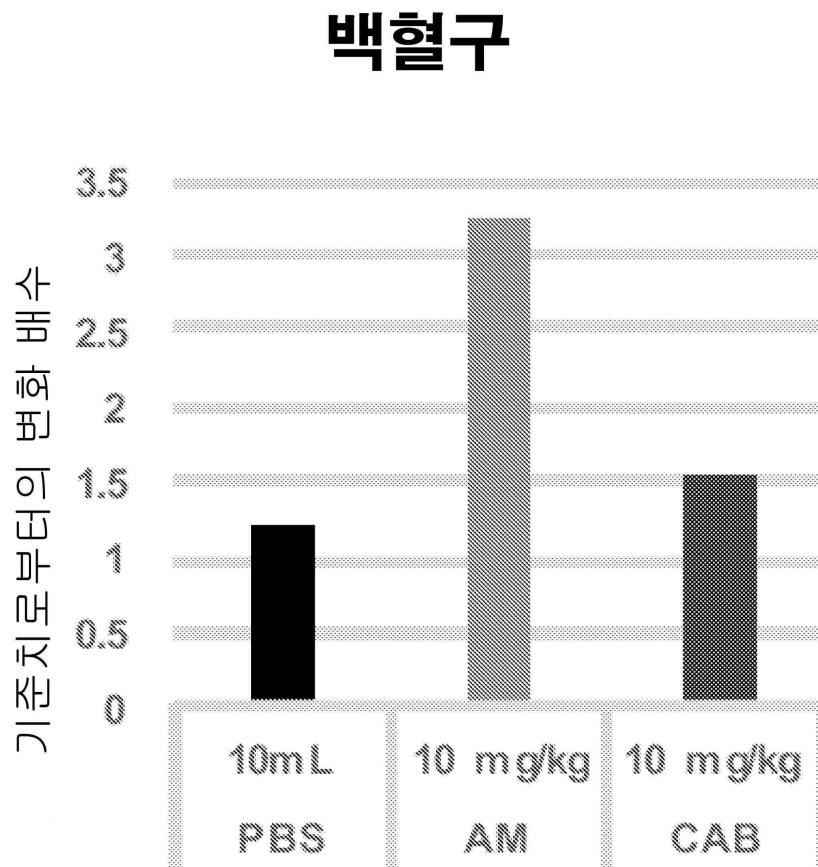
도면14a



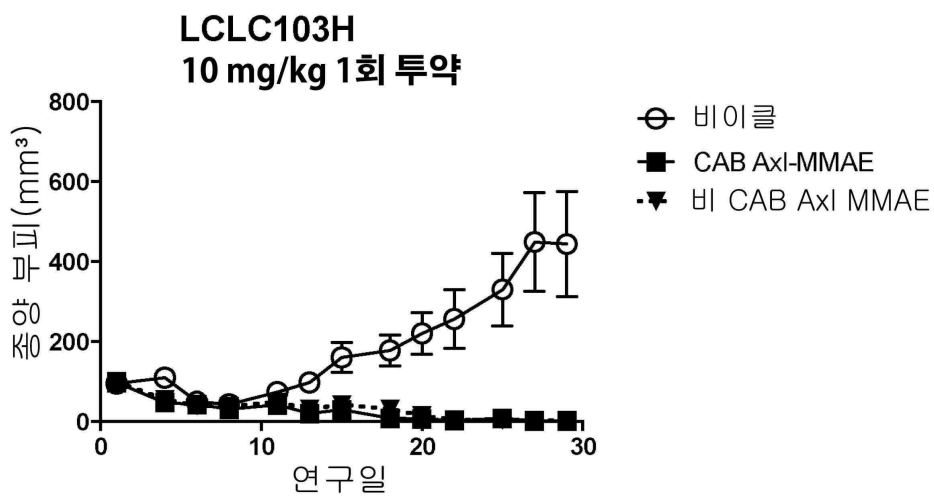
도면14b



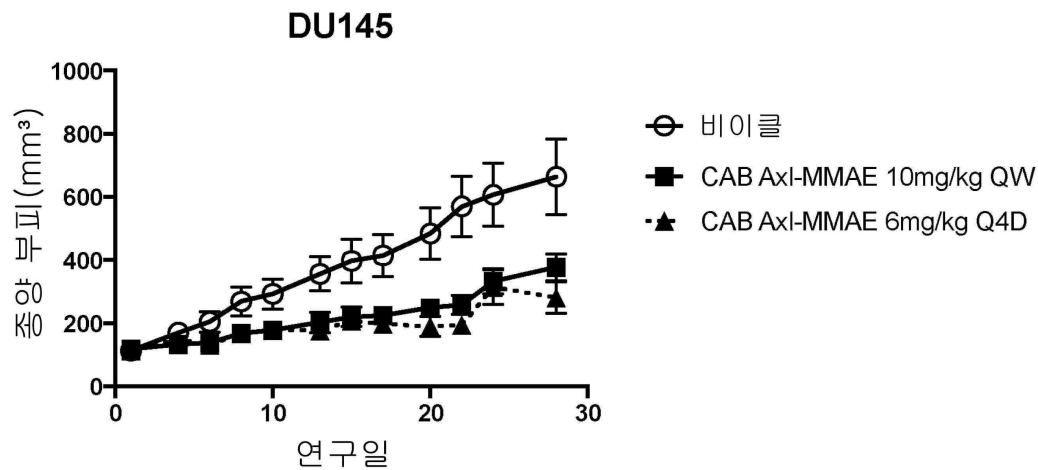
도면15



도면16a



도면16b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BioAtla Inc.

<120> Anti-Axl Antibodies

<130> BIAT-1019EP

<160> 116

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222> (1)..(1)

<223> It is is T or A or W

<220><221> Variants

<222> (3)..(3)

<223> It is is H or A

<220><221> Variants

<222> (4)..(4)

<223> It is T or I

<220><221> Variants

<222> (6)..(6)

<223> It is N or I

<400> 1

Xaa Gly Xaa Xaa Met Xaa

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222> (4)..(4)

<223> It is P or N

<220><221> Variants

<222> (10)..(10)

<223> It is S or I or T

<400> 2

Leu Ile Lys Xaa Ser Asn Gly Gly Thr Xaa Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222> (2)..(2)

<223> It is H or D or E or P or R or W

<220><221> Variants

<222> (3)..(3)

<223> It is Y or N

<220><221> Variants

<222> (4)..(4)

<223> It is E or A or D or F or G or H or I or L or M or N or R or V or
Y

<220><221> Variants

<222> (5)..(5)

<223> It is S or D or M or N or Q

<220><221> Variants

<222> (6)..(6)

<223> It is Y or C or E or P

<220><221> Variants

<222> (7)..(7)

<223> It is F or E or N or S or T or V

<220><221> Variants

<222> (8)..(8)

<223> It is A or D or G or L or Y

<220><221> Variants

<222> (9)..(9)

<223> It is M or E or F

<220><221> Variants

<222> (12)..(12)

<223> It is W or A or D or H or L or N or P or R or T

<220><221> Variants

<222> (13)..(13)

<223> It is G or H

<400> 3

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Xaa Xaa

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222> (6)..(6)

<223> It is V or D or G or N or W

<220><221> Variants

<222> (7)..(7)

<223> It is S or V

<220><221> Variants

<222> (9)..(9)

<223> It is A or L or M

<220><221> Variants

<222> (11)..(11)

<223> It is A or D or N or Q

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Xaa Xaa Ser Xaa Val Xaa

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222>

(1)..(1)

<223> It is W or F

<220><221> Variants

<222> (2)..(2)

<223> It is A or I or N or P or Q

<220><221> Variants

<222> (3)..(3)

<223> It is S or D

<220><221> Variants

<222> (6)..(6)

<223> It is H or D

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Thr Arg Xaa Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<220><221> Variants

<222> (3)..(3)

<223> It is H or C or F or I or L or Q or S or T or V or Y

<220>

><221> Variants

<222> (4)..(4)

<223> It is F or C or D or E or G or N or S

<220><221> Variants

<222> (6)..(6)

<223> It is T or C or P

<220><221> Variants

<222> (7)..(7)

<223> It is P or A or C or D or E or H or K or S or T or V or W

<220><221> Variants

<222> (8)..(8)

<223> It is L or G or R

<220><221> Variants

<222> (9)..(9)

<223> It is T or I or R

<400> 6

Gln Glu Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 7

<211> 323

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 7

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtc ggaatgtggtt tctgctgtag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctattgg caggataccc ggcacactgg agtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatattg caacttatta ctgtcaggaa cattttagca ctccgctcac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acc 323

<210> 8

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 8

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc g gatgtgagt tctgctgtag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctattgg caggataccc ggcacactgg agtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatattg caacttatta ctgtcaggaa cattttagcc ctccgctcac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acc 323

<210> 9

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtc g gatgtggtt tctgctgtag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctattgg caggataccc ggcacactgg agtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatattg caacttatta ctgtcaggaa cattttagcc ctccgctcac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acc 323

<210> 10

<211> 323

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 10

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca aggccagtc ggatgtggtt tctgctgtag cctggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctattgg caggataccc ggcacactgg agtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gatgattttg caacttatta ctgtcaggaa cattttagcc ctccgctcag gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaatcaa acc	323

<210> 11

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 11

gaggtccagc tggtacagtc tgggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc	60
tcctgcaagg tttctgggta ctattcact ggcgtacca tgaactggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggtctt attaaacctt ccaatggtgg tactagtta	180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc acatggtcac	300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccagggaa cgctgggtcac cgtcagctca	360

<210> 12

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 12

gaggtccagc tggtacagtc tgggctgag gtgaagaagc ctggggctac agtgaaaatc	60
tcctgcaagg tttctgggta ctattctgg ggcgtacca tgaactggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggtctt attaaacctt ccaatggtgg tactagtta	180
aaccagaagt tcaagggcag agtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc acatggtcac	300
tacgagagtt acgaggctat ggactactgg ggccagggaa cgctgggtcac cgtcagctca	360

<210> 13

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic sequence

<400> 13

```

gaggtccagc  tggtagagtc  tggggctgag  gtgaagaagc  ctggggctac  agtgaaaatc      60
tcctgcaagg  tttctgggta  ctcattcact  ggccacacca  tgaactggat  ccgccagccc     120
ccagggaagg  ggctggagtg  gattggcttt  attaaacctt  ccaatgggtg  tactagttac     180
aaccagaagt  tcaagggcag  agtcaccatc  tcagccgaca  agtccatcag  caccgcctac     240
ctgcagtgga  gcagcctgaa  ggcctcggac  accgccatgt  attactgtgc  acatggtcac     300
tacgagagtt  acgaggetat  ggactactgg  ggccagggaa  cgctggtcac  cgtcagctca     360

```

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 14

```

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

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

```

115 120

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequences

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Trp Gly His

20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Ala
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

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

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 19

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

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

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

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 20

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

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

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequences

<400> 21

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

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

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 23

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 24

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

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

<220><223> Synthetic sequence

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly Glu Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 27

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

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

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Asn Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Phe Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 30

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

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20

25

30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Ile Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 31

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

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

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 33

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

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

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

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 35

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

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

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

<210> 36

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 36

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

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

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 37

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

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

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 38

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210> 40

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 40

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

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

<210> 41

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 41

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Asp Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 42

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 44

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Gln Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 45

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 45

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Cys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 46

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

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20

25

30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Glu Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 47

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Pro Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 48

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

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

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 49

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

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

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

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 50

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

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

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 51

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

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

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

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 52

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

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

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 54

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

50 55 60

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

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

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 55

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 55

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

50 55 60

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

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

<210>	56
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Artificial
<220><223>	Synthetic sequence
<400>	56

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

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

$\langle 210 \rangle$	57
$\langle 211 \rangle$	120
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 57

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Glu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 58

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 58

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

<210> 59

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 59

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

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

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 60

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr His Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 61

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 61

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Thr Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 62

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

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20

25

30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Asn Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 63

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30

Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Leu Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 64

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His

20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Arg Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Lys Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala His Gly His Tyr Glu Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Asp Gly Gln

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

<210> 66

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 66

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

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

<210> 67

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 67

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

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

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

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 68

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

 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Leu

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 69
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence

<400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Asp Ser Ser Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 70
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence

<400> 70
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Gly Ser Ser Ala

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

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

<210> 71

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 71

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

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

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

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 72

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 73

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 74

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

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

<210> 75

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 75

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

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

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

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 76

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 78

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

1 5 10 15

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

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

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

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 79

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 81

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 82

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

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

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 83

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

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

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

Tyr Trp Gln Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 84

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

1 5 10 15

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

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

Tyr Trp Ala Asp Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 85
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 85
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 86
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 86
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 87

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 87

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

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

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

<210> 88

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 89

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 90

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

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

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 91

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

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

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

<210> 92

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 92

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

1 5 10 15

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 93
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 93
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Val Phe Ser Thr Pro Leu

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 94
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic sequence
 <400> 94
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 97

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Glu Ser Thr Pro Leu		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210>	98	
<211>	107	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220><223>	Synthetic sequence	
<400>	98	
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		

[illegible]

<400> 99

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 100

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 101

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 102

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 102

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

1 5 10 15

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

<210> 103

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 103

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Ala Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 104

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 104

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 105

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Asp Leu
85 90 95

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

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 106

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 109

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

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

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 110

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 110

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 111

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 111

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Val Leu
85 90 95

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

<210> 112

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

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

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

<210> 113

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 113

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

<210> 114

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 114

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

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

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu His Phe Ser Thr Pro Arg

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 115

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 115

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 116

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic sequence

<400> 116

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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