



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0114443
(43) 공개일자 2009년11월03일

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7018734

(22) 출원일자 2008년02월08일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년09월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/053376

(87) 국제공개번호 WO 2008/100805

국제공개일자 2008년08월21일

(30) 우선권주장

60/889,214 2007년02월09일 미국(US)

60/891,475 2007년02월23일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

필, 주니어, 프랭클린, 브이.

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 필 애비뉴
416

왓츠, 리안 제이.

미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 예일 드라이브
524

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

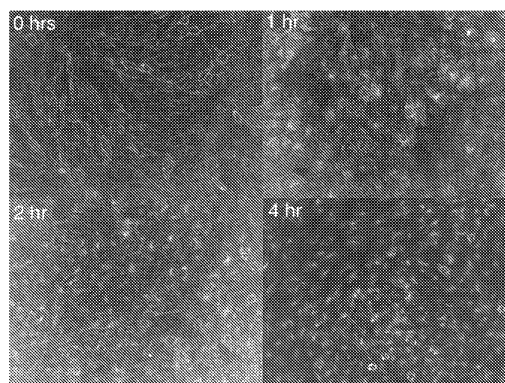
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 항-R o b o 4 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-Robo4 항체, 및 이러한 항체를 포함하는 조성물 및 이들 항체의 사용 방법 (진단 및 치료 방법 포함)을 제공한다.

대표도 - 도15C



시간 경과에 따른 항-Robo4 YW71.22.S1.16 제분포

(72) 발명자

코치, 알렉산더 더블유.

미국 94030 캘리포니아주 밀브래 포플라 애비뉴 넘버309 500

유, 안

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블리드 스트리트 1160

스타위키, 스캇

미국 94105 캘리포니아주 샌프란시스코 피프틴쓰 스트리트 - 2022

카라노, 리차드

미국 94583 캘리포니아주 샌 라몬 패독 드라이브 2470

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 서열 A1-A11을 포함하는 HVR-L1 [여기서, A1-A11은 RASQDVSTAVA (서열 1)이다];
 - (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 [여기서, B1-B7은 SASFLYS (서열 2)이다];
 - (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 [여기서, C1-C9는 QSYTTPPT (서열 3)이다];
 - (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 [여기서, D1-D10은 GFTINGYYIH (서열 17)이다];
 - (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 [여기서, E1-E18은 GFIYPAGGDTDYADSVKG (서열 18)이다];
 - (vi) 서열 F1-F17을 포함하는 HVR-H3 [여기서, F1-F17은 ARLIGNKFGWSSYGM DY (서열 19)이다]; 및
 - (vii) 서열 1, 2, 3, 17, 18, 또는 19에 제시된 서열의 1개 이상의 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 하나 이상의 변이체 HVR
- 로 이루어진 군 중에서 선택된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 추가변 영역 (HVR) 서열(들)을 포함하는 항-Robo4 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 도 1A 및 2A에 도시된 바와 같은 서열 72-97로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 도 1B 및 2B에 도시된 바와 같은 서열 140-165로 이루어진 군 중에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,
 서열 1을 포함하는 HVR-L1,
 서열 2를 포함하는 HVR-L2, 및
 서열 20을 포함하는 HVR-L3
 을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,
 서열 17을 포함하는 HVR-H1,
 서열 18을 포함하는 HVR-H2, 및
 서열 19를 포함하는 HVR-H3
 을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,
 (i) 서열 1을 포함하는 HVR-L1,
 서열 2를 포함하는 HVR-L2, 및
 QQSRSDHPT (서열 20)을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 경쇄 가변 도메인; 및
(ii) 서열 17을 포함하는 HVR-H1,
서열 18을 포함하는 HVR-H2, 및
서열 19를 포함하는 HVR-H3
을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 인간화 항체인 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, Fab, Fab' 및 (Fab')₂로 이루어진 군 중에서 선택되는 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 세포독성제를 추가로 포함하는 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포독성제가 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (maytansine) (DM1), 모노메틸 아우리스타틴 (auristatin) E (MMAE), 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF), 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 검출가능한 표지를 추가로 포함하는 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 검출가능한 표지가 바이오틴, 형광성 염료, 방사성 핵종, 킬레이트제 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA), 마이크로버블, 퍼플루오로카본 나노입자 에멀션, 금속성 입자, 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 항체.

청구항 13

제11항에 있어서, 검출가능한 표지가 시스테인 잔기에서 항체에 공유 결합에 의해 부착되는 것인 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 시스테인 잔기가 EU 넘버링에 따라서 중쇄 Fc 영역의 위치 118에 위치하는 것인 항체.

청구항 15

세포 또는 조직을 유효량의 제1항의 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 혈관형성 (angiogenesis)을 조정하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 항체가 세포독성제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 혈관형성이 억제되는 것인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 혈관형성이 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직

및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선, 및 그의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 장애와 연관이 있는 것인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 혈관형성이 암과 연관이 있는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 암이 편평 세포암, 폐암, 복막 암, 간세포암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종, 뇌암, 두경부암, 골원성 육종 및 혈관육종, 및 관련 전이 및 그의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 세포 또는 조직이 포유동물의 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 세포를 항종양제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택된 작용제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 작용제가 항-VEGF 항체인 방법.

청구항 25

제11항의 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 생체내 영상화 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 포유동물이 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선, 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 질병 또는 장애가 있는 것으로 추정되는 것인 방법.

명세서

<1> 관련 출원

<2> 본 출원은 2007년 2월 9일자로 출원된 미국 가특허원 제60/889,214호 및 2007년 2월 23일자로 출원된 미국 가특허원 제60/891,475호의 이권을 청구하고 있다 (이들 각각의 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입된다).

기술 분야

<3> 본 발명은 일반적으로, 혈관형성 (angiogenesis), 및 내피 세포 증식 및 이동 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로 언급하면, 본 발명은 Robo4의 조정제, 및 이러한 조정제의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

<4> 라운드어바웃 (Roundabout) 계열의 수용체는 슬릿 (Slit) 단백질과의 상호 작용에 반응하여 백혈구 화학주성,

액손 (axon) 유도 및 신경세포 이동을 조절시켜 주는 분자상 유도 분자이다 [참고: Suchting et al., *FASEB J.* 19:121-123 (2005)]. 라운더어바우트 수용체 분자는 그의 세포외 영역 내에 5개의 면역글로불린과 3개의 피브로넥틴 도메인을 함유하고 있다. 매직 (Magic) 라운더어바우트 [즉, Robo4 또는 내피 세포-특이적 분자 4 (ECSM4)]는 기타 라운더어바우트 계열 구성원과는 구조적으로 별개이다. 인간 매직 라운더어바우트 (Robo4)는 2개의 면역글로불린 및 주요 조직적합성 복합체 도메인 (아미노산 46-116 및 151-209), 2개의 피브로넥틴 유형 III 도메인 (아미노산 252-335 및 347-432), 막관통 (transmembrane) 영역 (468-490), 및 프롤린 풍부 영역 (아미노산 715-772)을 포함한다 ([참고: Huminiecki et al., *Genomics* 79(4):547-552 (2002), 및 내부의 도 1]. 마우스 Robo4와 인간 Robo4는 75% 뉴클레오티드 서열 동일성을 나타낸다 [Huminiecki et al., 상기 참고 (2002)].

<5> Robo4 발현 분석 결과, Robo4 발현이 고도로 제한되는데, 뇌, 방광 및 결장 종양이 간으로 전이되는 것을 포함한 종양 및 태반에서 강력한 발현이 나타났다 [Huminiecki et al., 상기 참고 (2002)]. 또한, Robo4 발현은 활성 혈관형성 부위와 연관이 있지만, 신경세포 조직에서는 검출되지 않는다 [Huminiecki, L. et al., 상기 참고 (2002)].

<6> 세포외 도메인을 수반한 막 관련 수용체로서, Robo4는 혈관형성 동안 혈관 내피 세포 증식을 억제하기 위하여 세포독성 치료제를 전달하기 위한 유용한 표적이다. Robo4는 또한, 증식성 혈관 내피 세포에 대한 검출가능한 마커를 전달하는 데에 유용한 표적이다. Robo4 (ECSM4로서 지칭되기도 함)를 표적으로 한 항체 접합체가 또한, 잠재적 치료 화합물로서 보고되었는데, 이러한 접합체는 세포독소를 포함하고 잠재적 진단 마커로서 검출가능한 표지를 포함한다 [참고: 예를 들어, WO 2002036771].

<7> 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 암을 치료하는 데에 있어서 종양 세포를 사멸시키거나 억제시키는 약물을 국소 전달하기 위하여 항체-약물 접합체를 사용하면 [참고: Syrigos and Epenetos, *Anticancer Res.* 19:605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172 (1997); 미국 특허 제4,975,278호], 이러한 약물 부분을 종양에 표적화 전달할 수 있으며 약물이 세포내 축적될 수 있다.

<8> 기타 분자를 표적으로 하는 수 많은 항체-약물 접합체가 개발되었거나 개발 중에 있다. 예를 들어, ZEVALIN® [이브리투모마브 티옥세탄 (ibritumomab tiuxetan), 공급처: Biogen/Idec]은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에 발견된 CD20 항원에 대하여 유도된 무린 IgG1 카와 모노클로날 항체와, 티오우레아 링커-킬레이트제에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성 동위원소로 구성된 항체-방사성 동위원소 접합체이다 [참고: Wiseman et al., *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77 (2000); Wiseman et al. *Blood* 99(12):4336-42 (2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63 (2002); Witzig et al., *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69 (2002)]. ZEVALIN이 B-세포 비호지킨 림프종 (NHL)에 대항한 활성을 지니고 있긴 하지만, 이를 투여하게 되면 대부분의 환자에게서 중증의 혈구감소증이 장기간 나타난다. 칼리케아미신 (calicheamicin)과 연결된 huCD33 항체로 구성된 MYLOTARG™ [젠티주마브 오조가미신 (gentuzumab ozogamicin); 공급처: Wyeth Pharmaceuticals]은 주사에 의해 급성 골수성 백혈병을 치료하기 위한 것으로 2000년에 승인되었다 [참고: *Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 미국 특허 제4,970,198호; 제5,079,233호; 제5,585,089호; 제5,606,040호; 제5,693,762호; 제5,739,116호; 제5,767,285호; 제5,773,001호]. 디설파이드 링커 SPP를 통하여 마이탄시노이드 (maytansinoid) 약물 부분 DM1에 연결된 huC242 항체로 구성된 칸투주마브 메르탄신 [Cantuzumab mertansine (공급처: Immunogen, Inc.)]이, CanAg 항원을 발현하는 암, 예를 들어 결장암, 췌장암, 위암 등을 치료하기 위해 개발 중에 있다. 마이탄시노이드 약물 부분 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 구성된 MLN-2704 (공급처: Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)는 현재 전립선 종양의 잠재적 치료를 위해 개발 중에 있다. 동일한 마이탄시노이드 약물 부분 DM1은 비-디설파이드 비-절단 가능한 링커 SMCC를 통하여 마우스 무린 모노클로날 항체 TA.1에 연결시켰다 [참고: Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992)]. 이러한 접합체는 상응하는 디설파이드 링커 접합체 보다 200배 정도 덜 강력한 것으로 보고되었다.

<9> 아우리스타틴 (auristatin) 펩티드인 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) [돌라스타틴의 합성 유사체]을 (i) 암종 상의 루이스 Y에 대해 특이적인 키메라 모노클로날 항체 cBR96; (ii) 혈액학적 악성 종양 상의 CD30에 대해 특이적인 cAC10 [참고: Klussman et al., *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773 (2004); Doronina et al. *Nature Biotech.* 21(7):778-784 (2003); Francisco et al. *Blood* 102(4):1458-1465 (2003); 미국 공개특허공보 제2004/0018194호]; (iii) CD20-발현성 암 및 면역 장애를 치료하기 위한 항-CD20 항체, 예를 들어 리툭산 (Rituxan®) (리툭시마브: rituximab) [참고: WO 04/032828]; (iv) 결장직장암을 치료하기 위한 항-EphB2 항체 2H9 및 항-IL-8 [참고: Mao et al. *Cancer Res.* 64(3):781-788 (2004)]; (v) E-선택틴

(selectin) 항체 [참고: Bhaskar et al. *Cancer Res.* 63:6387-6394 (2003)]; 및 (vi) 기타 항-CD30 항체 [참고: WO 03/043583]에 접합시켰다. 모노메틸아우리스타틴 (MMAE)을 또한, 마우스와 인간 간에 유사한 상동성을 지닌 유형 1 TM 티로신 키나제 수용체이고 결장직장암 세포에서 과발현되는 EphB2R에 대항한 항체인 2H9에 접합시켰다 [참고: Mao et al., *Cancer Res.* 64:781-788 (2004)].

<10> C-말단에 페닐알라닌을 수반한 아우리스타틴 E (MMAE)의 변이체인 모노메틸아우리스타틴 MMAF [참고: 미국 특허 제5,767,237호 및 제6,124,431호]는 MMAE 보다 덜 강력하지만, 모노클로날 항체와 접합되는 경우에 더 강력한 것으로 보고되었다 [참고: Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004]. MMAE의 페닐알라닌 변이체인 아우리스타틴 F 페닐렌 디아민 (AFP)은 페닐렌 디아민 스페이서를 통하여 1F6의 C-말단을 통하여 항-CD70 mAb인 1F6에 연결시켰다 [참고: Law et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004].

<11> 혈관형성, 예를 들어 내피 기원 혈관계의 성장 및 증식에 의존적인 암과 연관된 이상한 혈관형성과 연관된 질병 및 장애를 치료하기 위한 부가의 약물이 당해 분야에 요구된다. 또한, 예를 들어 혈관의 과도한 증식에 의해 유발되거나 이로써 뒷받침되는 암 또는 안과 장애 뿐만 아니라 혈관 성장을 모니터링하는 것이 생리학적 상태를 이해하거나 치료하는 데에 유용한 장애 또는 기타 생리학적 상태에 있어서의 혈관 성장 및 증식을 검출 및 가시화하기 위한 부가의 내피 세포-표적화 항-Robo4 항체-약물 접합체가 당해 분야에 요구된다. 본 발명은 이러한 요구와 기타 요구를 충족시켜 준다.

<12> 발명의 요약

<13> 본 발명은 Robo4 (예를 들어, 영장류 및/또는 설치류 Robo4, 예를 들면 인간 및/또는 마우스 Robo4 포함)와 특이적으로 결합하는 항체, 및 이러한 항체를 사용하는 진단 및 치료 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 상기 항체는 인간화 또는 인간이다. 몇몇 양태에서, 항체는 본래의 항체, 항체 변이체, 및 항체 유도체, Fab, Fab', (Fab')₂, 및 Fv로 이루어진 군 중에서 선택된다. 한 양태에서, 본 발명은 인간 Robo4, 및 임의로, 뮤린 Robo4에 대한 친화성 및 특이성을 지닌 항-Robo4 항체를 제공하는데, 이러한 항체는 도 1A, 1B, 2A, 및 2B (서열 1-8, 17-71)에 도시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열의 추가변 영역 (HVR)을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 Robo4, 및 임의로, 뮤린 Robo4에 대한 친화성 및 특이성을 지닌 항-Robo4 항체를 제공하는데, 이러한 항체는 도 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 및 4B [서열 9-16, 서열 12 (여기서, V는 M으로 대체된다), 및 서열 99-139]에 도시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열의 프레임워크 영역 (FR)을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 Robo4, 및 임의로, 뮤린 Robo4에 대한 친화성 및 특이성을 지닌 항-Robo4 항체를 제공하는데, 이러한 항체는 도 1A 및 1B (서열 72-97) 및 도 2A 및 2B (서열 140-165)에 도시된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나 필수적으로 이루어진다.

<14> 한 양태에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 군 중에서 선택된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-Robo4 항체를 제공한다:

<15> (i) 서열 A1-A11을 포함하는 HVR-L1 [여기서, A1-A11은 RASQDVSTAVA (서열 1)이다];

<16> (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 [여기서, B1-B7은 SASFLYS (서열 2)이다];

<17> (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 [여기서, C1-C9는 QSYTTTPPT (서열 3)이다];

<18> (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 [여기서, D1-D10은 GFTINGYYIH (서열 17)이다];

<19> (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 [여기서, E1-E18은 GFYYPAGGDTDYADSVKG (서열 18)이다];

<20> (vi) 서열 F1-F17을 포함하는 HVR-H3 [여기서, F1-F17은 ARLIGNKFGWSSYGM DY (서열 19)이다]; 및

<21> (vii) 하나 이상의 변이체 HVR [이러한 변이체 HVR은 서열 1, 2, 3, 17, 18, 또는 19에 제시된 서열의 1개 이상의 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다].

<22> 또 다른 양태에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 군 중에서 선택된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항-Robo4 항체를 제공한다:

<23> (i) 서열 A1-A11을 포함하는 HVR-L1 [여기서, A1-A11은 RASQDVSTAVA (서열 1)이다];

- <24> (ii) 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2 [여기서, B1-B7은 SASFLYS (서열 2)이다];
- <25> (iii) 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3 [여기서, C1-C9는 QQSYTTPPT (서열 3)이다];
- <26> (iv) 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1 [여기서, D1-D10은 GFTISGSWIH (서열 4)이다];
- <27> (v) 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2 [여기서, E1-E18은 AVITPAGGYTYADSVKG (서열 5)이다]; 및
- <28> (vi) 서열 F1-F16을 포함하는 HVR-H3 [여기서, F1-F16은 SNRYSGQFVPAYAMDY (서열 6)이다].
- <29> 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-L1은 서열 1의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-L2는 서열 2의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-L3은 서열 3의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-H1은 서열 4의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-H2는 서열 5의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 HVR-H3은 서열 6의 서열을 포함한다. 한 양태에서, HVR-L1은 RASQSISSYLA (서열 7) 또는 RASQDGARSLA (서열 39) 또는 RASQDGAIYLA (서열 40)을 포함한다. 한 양태에서, HVR-L2는 GASSRAS (서열 8) 또는 SASFLAS (서열 41) 또는 SASLES (서열 42) 또는 SATLAS (서열 43) 또는 SASFLAS (서열 44) 또는 SASNLAS (서열 45) 또는 SASTLAS (서열 46)을 포함한다. 한 양태에서, 이들 서열을 (본원에 기재된 바와 같이 조합하여) 포함하는 본 발명의 항체는 인간화 또는 인간이다.
- <30> 한 국면에서, 본 발명은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 HVR을 포함하는 항체를 제공하는데, 각 HVR은 서열 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8로 이루어진 군 중에서 선택된 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어지고, 서열 1 또는 7은 HVR-L1에 상응하며, 서열 2 또는 8은 HVR-L2에 상응하며, 서열 3은 HVR-L3에 상응하고, 서열 4는 HVR-H1에 상응하며, 서열 5는 HVR-H2에 상응하고, 서열 6은 HVR-H3에 상응한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 7을 포함하는 HVR-L1, 서열 2를 포함하는 HVR-L2, 서열 3을 포함하는 HVR-L3, 서열 4를 포함하는 HVR-H1, 서열 5를 포함하는 HVR-H2, 및 서열 6을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 1을 포함하는 HVR-L1, 서열 8을 포함하는 HVR-L2, 서열 3을 포함하는 HVR-L3, 서열 4를 포함하는 HVR-H1, 서열 5를 포함하는 HVR-H2, 및 서열 6을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 1을 포함하는 HVR-L1, 서열 2를 포함하는 HVR-L2, 서열 3을 포함하는 HVR-L3, 서열 4를 포함하는 HVR-H1, 서열 5를 포함하는 HVR-H2, 및 서열 6을 포함하는 HVR-H3을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 1을 포함하는 HVR-L1, 서열 2를 포함하는 HVR-L2, 서열 20을 포함하는 HVR-L3, 서열 17을 포함하는 HVR-H1, 서열 18을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 19를 포함하는 HVR-H3을 포함한다.
- <31> 본 발명의 항체 중의 변이체 HVR은 이러한 HVR 내에 1개 이상의 잔기의 변형을 지닐 수 있다. 한 양태에서, HVR-L1 변이체는 서열 1을 포함하는데, A1-11은 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 6개 (1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개) 치환을 포함한다: A5 (S), A6 (I 또는 G), A7 (A), A8 (S, R, 또는 I), A9 (Y 또는 S), 및 A10 (L). 한 양태에서, HVR-L2 변이체는 서열 2를 포함하는데, B1-7은 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 6개 (1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개) 치환을 포함한다: B1 (G), B3 (T), B4 (S, L, N, 또는 T), B5 (R, E, 또는 A), B6 (A 또는 S) 및 B7 (Y). 한 양태에서, HVR-L3 변이체는 서열 3을 포함하는데, C1-9는 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 6개 (1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개) 치환을 포함한다: C3 (Y, P, T, F 또는 G), C4 (W, F, R 또는 N), C5 (S, N, A, D, F, H, V 또는 G), C6 (Y, S, A, D, N, L, I, M, Y 또는 G), C7 (L, H, 또는 T) 및 C8 (L, F, A, M 또는 S). 한 양태에서, HVR-H1 변이체는 서열 4를 포함하는데, D1-10은 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 9개 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개) 치환을 포함한다: D2 (Y), D3 (S), D4 (F 또는 L), D5 (N, T, Y, D, 또는 K), D6 (N 또는 S), D7 (Y, N 또는 R), D8 (Y 또는 A), D9 (M, F, L 또는 N) 및 D10 (S, E 또는 Q). 한 양태에서, HVR-H2 변이체는 서열 5를 포함하는데, E1-18은 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 10개 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개) 치환을 포함한다: E1 (G 또는 S), E2 (F, G, I, T, 또는 R), E4 (Y 또는 S), E5 (G 또는 S), E6 (T, Y, 또는 M), E7 (D 또는 L), E8 (S), E9 (D, S, T, H, K, A 또는 V), E10 (I), 및 E11 (D, N, A, E, 또는 I). 한 양태에서, HVR-H3 변이체는 서열 6을 포함하는데, F1-18은 다음 위치의 모든 조합에서 1 내지 17개 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개) 치환을 포함한다: F2 (S), F3 (L, G, D, M 또는 W), F4 (I, G, V, 또는 S), F5 (G, Y, 또는 N), F6 (N, S, 또는 V), F7 (K, Y, W, 또는 M), F8 (F, S, P, 또는 결실), F9 (G, A, S, Y, 또는 결실), F10 (W, R, P, E, G, 또는 결실), F11 (S, W, G, H, 또는 결실), F12 (S, W, H, 또는 결실), F13 (Y, D, G, V, 또는 결실), F14 (G 또는 결실), F15 (V 또는 결실), F16 (L 또는 F), F17 (a), 및 F18 (V). 각 위치 다음의 괄호 안의 문자(들)는 예시되는 치환 (즉, 대체) 아미노산, 또는 표시되는 경우 아미노산 결실을 나타낸다. 한 양태에서, HVR-L1은 서열 1을 포함하고; HVR-L2는 서열 2를 포함하며; HVR-L3 변이체는 서열 3을 포함하는데, C4, C5, C6, 및 C6은 각각 R, S, D, 및 H이고; HVR-H1은 서열 17을 포함하며; HVR-H2는 서열 18을 포함하고; HVR-H3은 서열 19를 포함하거나 HVR-H3 변이체는 서열 19를 포함한다.

다. 이들 항체의 한 양태에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 한 양태에서, 경쇄의 프레임워크 영역 4 (LC-FR4) 내의 위치 104 (카바트 넘버링)는 V이다. 한 양태에서, LC-FR4의 위치 104는 M이다.

<32> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 D1-D10으로 넘버링된 변이체 HVR-H1 서열 4를 포함하는데, 1 내지 6개 치환은 다음 중에서 선택된다: D2 (Y), D3 (S), D4 (F 또는 L), D5 (S, T, Y, D, 또는 K), D6 (N 또는 S), D7 (S, N, 또는 R), D8 (W 또는 A), D9 (M, F, L 또는 N), 및 D10 (S, E, 또는 Q). 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 24, 25, 26, 27 또는 28을 포함하는 변이체 HVR-H1을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 E1-E18로 넘버링된 변이체 HVR-H2 서열 5를 포함하는데, 1 내지 7개 치환은 다음 중에서 선택된다: E1 (A 또는 S), E2 (V, G, I, T 또는 R), E4 (T 또는 S), E5 (G 또는 S), E6 (T, Y, 또는 M), E7 (D 또는 L), E8 (S), E9 (Y, S, T, H, K, A 또는 V), E10 (I) 및 E11 (Y, N, A, E, 또는 I). 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 29, 30, 31, 32, 또는 33을 포함하는 변이체 HVR-H2를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 F1-F16으로 넘버링된 서열 6을 포함하는 변이체 HVR-H3을 포함하는데, 1 내지 15개 치환은 다음 중에서 선택된다: F1 (S, G, D, M, 또는 W), F2 (N, G, V, 또는 S), F3 (R, Y 또는 N), F4 (Y, S, 또는 V), F5 (S, Y, W 또는 M), F6 (G, S, P 또는 결실), F7 (Q, A, S, Y, 또는 결실), F8 (F, R, P, E, G, 또는 결실), F9 (V, W, G, H, 또는 결실), F10 (P, W, H, 또는 결실), F11 (A, D, G, V, 또는 결실), F12 (Y 또는 결실), F13 (A 또는 V), F14 (L 또는 F), 및 F15 (V). 본 발명에 따르면, 아미노산 치환은 소정의 서열에서의 아미노산 결실을 포괄할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 34, 35, 36, 37, 또는 38을 포함하는 변이체 HVR-H3을 포함한다. 이들 항체의 한 양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서의 치환을 포함한다. 이들 항체의 몇몇 양태에서, 위치 71은 A이고/이거나, 위치 73은 T이고/이거나 위치 78은 A이다. 이들 항체의 한 양태에서, 이들 항체는 인간 아군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다.

<33> 한 국면에서, 본 발명은 도 1, 2, 3 및 (서열 1-8, 17-71)에 도시된 HVR 서열 중의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 이상을 포함하는 항-Robo4 항체를 제공한다.

<34> 한 양태에서, 본 발명은 인간화 항-Robo4 항체를 제공한다. 본 발명의 인간화 항-Robo4 항체는 그의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인 내에 하나 이상의 인간 및/또는 인간 컨센서스 비-초가변 영역 (예: 프레임워크) 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 하나 이상의 부가의 변형이 상기 인간 및/또는 인간 컨센서스 비-초가변 영역 서열 내에 존재한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 중쇄 가변 도메인은 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는데, 한 양태에서 이는 아군 III 컨센서스 프레임워크 서열이다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된 변이체 아군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 예를 들어, 한 양태에서, 변이체 아군 III 컨센서스 프레임워크 서열은 위치 71, 73 및/또는 78 중의 하나 이상에서의 치환을 포함할 수 있다. 한 양태에서, 상기 치환은 R71A, N73T 및/또는 N78A 및/또는 L/78A인데, 그의 모든 조합으로 존재한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 경쇄 가변 도메인은 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는데, 한 양태에서 이는 아군 κ I 컨센서스 프레임워크 서열이다. 한 양태에서, 경쇄 컨센서스 프레임워크 서열은 하나 이상의 위치에서 변형된다. 한 양태에서, 경쇄 컨센서스 서열은 위치 104에 아미노산 V를 갖는다. 한 양태에서, 경쇄 컨센서스 서열은 카바트 넘버링 시스템에 따라서 위치 104에서 변형되는데, 위치 104는 M이다.

<35> 한 국면에서, 본 발명은 경쇄 FR 서열 LC-FR1 (서열 9), LC-FR2 (서열 10), LC-FR3 (서열 11), 및 LC-FR4 (서열 12) 중의 1 내지 4개 또는 모두를 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, LC-FR4 (서열 12)는 위치 104가 M인 변이체이다.

<36> 한 국면에서, 본 발명은 중쇄 FR 서열 HC-FR1 (서열 13), HC-FR2 (서열 14), HC-FR3 (서열 15), 및 HC-FR4 (서열 16) 중의 1 내지 4개 또는 모두를 포함하는 항체를 제공한다.

<37> 한 양태에서, 본 발명은 숙주 대상체에게서 치료제에 대한 면역원성 반응을 거의 또는 전혀 유발시키지 않는 숙주 대상체에게 사용하기 위한 치료제를 제공한다. 예를 들어, 한 양태에서 본 발명은 인간 Robo4에 대하여 생성된 무관 항체와 비교해서 숙주 대상체에게서 실질적으로 저하된 수준으로 인간 항-마우스 항체 반응 (HAM A)을 유발시키고/시키거나 유발시키는 것으로 예상되는 인간화 항체를 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 인간 항-마우스 항체 반응 (HAMA)을 전혀 또는 최소한도로 유발시키고/시키거나 유발시키는 것으로 예상되는 인간화 항체를 제공한다. 한 예에서, 본 발명의 항체는 임상적으로 허용 가능한 수준 또는 그 이하로 항-마우스 항체 반응을 유발시킨다.

<38> 본 발명은 또한, 다음에 기재되는 바와 같이 하이브리드 초가변 위치에서의 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 하이브리드 초가변 위치에서 변형된 변이체 인간 아군 컨센서스 프

레이프워크 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 위치 26-35, 49-65, 95-102, 및 94 중의 하나 이상에서 변형된 변이체 인간 아군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 위치 24-34, 50-56, 및 39-97 중의 하나 이상에서 변형된 변이체 인간 카파 아군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

- <39> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 인간 κ 경쇄의 프레임워크 서열의 적어도 일부 (또는 전부)를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 인간 κ 아군 I 프레임워크 컨센서스 서열의 적어도 일부 (또는 전부)를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 3A 및 3B에 도시된 프레임워크 서열을 포함한다.
- <40> 본 발명의 항체는 적합한 모든 인간 또는 인간 컨센서스 중쇄 프레임워크 서열을 포함할 수 있는데, 단 상기 항체는 목적하는 생물학적 활성 (예를 들어, 목적하는 결합 친화도)을 나타내야 한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 인간 아군 III 중쇄의 프레임워크 서열의 적어도 일부 (또는 전부)를 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 4A 및 4B에 도시된 프레임워크 서열을 포함한다.
- <41> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 서열 72-137 (도 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A 및 4B)에 제시된 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- <42> 한 국면에서, 본 발명의 항체는 인간 Robo4 혈관 내피 세포 마커와 결합하는 인간화 항-Robo4 항체이다. 예를 들어 한 양태에서, 본 발명의 항체는 인간 Robo4와 1000 nM 미만, 500 nM 미만, 200 nM 미만, 100 nM 미만, 50 nM 미만, 30 nM 미만, 20 nM 미만, 10 nM 미만, 5 nM 미만, 3 nM 미만, 1 nM 미만, 0.1 nM 미만, 또는 0.01 nM 미만인 IC50 값으로 결합한다. 그의 수용체와 결합하는 리간드를 억제할 수 있는 능력 비교는 다음 실시예에 기재된 바와 같이, 당해 분야에 공지된 각종 방법에 따라서 수용할 수 있다.
- <43> 한 국면에서, 본 발명의 항체는 세포독성 부분과 접합된 항-Robo4 항체 (항-Robo4 항체 약물 접합체; 항-Robo4 ADC로서 지칭되기도 함)인데, 이러한 항-Robo4 ADC는 Robo4를 발현하는 세포에서 Robo4-의존성 세포 증식을 억제한다. Robo4 발현성 세포에는 내피 세포, 예를 들어 혈관 내피 세포가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 항-Robo4 ADC는 본원에 기재되어 있다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 인간화이다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 인간 항체이다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 파아지 디스플레이 (phage display) 돌연변이 유발 및 선별로부터 유래된다.
- <44> 한 국면에서, 본 발명의 항체는 세포독성제와 접합되지 않은 기준 항-Robo4 항체 보다 우수하게 Robo4-의존성 세포 증식을 억제시키는 항-Robo4 항체 ADC이다. 예를 들어, 한 양태에서 본 발명의 항-Robo4 ADC 항체는 세포 독성제와 접합되지 않은 기준 항-Robo4 항체의 IC50 값의 약 절반 미만인 IC50 값으로 세포 증식을 억제시킨다. 한 양태에서, 본 발명의 ADC의 IC50 값은 비-ADC 기준 항체의 약 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3 또는 0.4이다. 세포 증식을 억제할 수 있는 능력 비교는 다음 실시예에 기재된 바와 같이, 당해 분야에 공지된 각종 방법에 따라서 수용할 수 있다. 한 양태에서, IC50 값은 항체 농도 범위 약 0.01 nM 내지 약 100 nM에 걸쳐서 결정한다.
- <45> 한 양태에서, 인간화 항체와 키메라 항체 둘 다는 1가이다. 한 양태에서, 인간화 항체와 키메라 항체 둘 다는 Fc 영역과 연결된 단일 Fab 영역을 포함한다. 한 양태에서, 기준 키메라 항체는 인간 Fc 영역과 연결된 도 7에 제시된 가변 도메인 서열 (서열 9 및 10)을 포함한다. 한 양태에서, 인간 Fc 영역은 IgG (예를 들어, IgG1, 2, 3 또는 4)의 해당 영역이다.
- <46> 한 국면에서, 본 발명의 항체는 Fc 영역을 포함한다. 특정 양태에서, Fc 영역은 IgG1, 2, 3 또는 4이다. 한 양태에서, IgG는 천연 IgG이다. 한 양태에서, Fc 영역은 천연 IgG1, 2, 3 또는 4의 야생형 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 활성과 비교해서 증강된 ADCC를 나타낸다. 한 양태에서, IgG는 천연 IgG로부터 변경된 Fc 영역이므로, 이와 같이 변경된 Fc 영역은 천연 Fc 영역과 비교해서 증강된 ADCC 활성을 나타낸다.
- <47> 한 국면에서, 본 발명의 항체는 검출가능한 부분, 예를 들어 조영제와 접합된 항-Robo4 항체이다. 한 국면에서, 본 발명의 항체는 반응성 부분, 활성화 부분, 또는 반응성 시스테인 티올 기를 통하여 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있는 모든 표지 부분과 접합시킬 수 있다 [참고: Singh et al., *Anal. Biochem.* 304:147-15 (2002); Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL]. 이와 같이 부착된 표지는 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나; (ii) 예를 들어, FRET (형광 공명 에너지 전이)를 제공하기 위하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공된 검출가능한 신호를 변형시키기 위해 제2 표지와 상호 작용하거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 또는 결합 친화도를 증가시키거나; (iv) 전하, 소수성, 외형 또는 기타 물리적 파라미터에 의해 이

동도, 예를 들어 전기영동 이동도 또는 세포-침투성에 영향을 미치거나; 또는 (v) 포획 부분을 제공하여 리간드 친화도, 항체/항원 결합성, 또는 이온성 복합체 형성을 조정하기 위한 기능을 할 수 있다. 본 발명의 표지된 항체는 본원에 추가로 기재되어 있다.

<48> 특정 양태에서, 검출가능한 표지는 시험관내 또는 생체 내에서 검출가능한 수성 불용성 입자이다. 특정 양태에서, 입자는 자기 또는 금속성 입자이다. 금속성 입자는 자기 공명 영상화 (MRI), 단일-입자 또는 단일-분자 트래킹 (tracking), 면역세포화학, 암시야 조명을 수반한 플라스몬 주파수, 시차 간섭 조영 및 비디오 증강, 총 내부 반사, 및 광열 간섭 조영 (PIC) 기술과 같은 방법에 의해 검출 가능하다 [참고: 예를 들어, *PNAS USA* 100(20):11350-11355 (2003); Sheetz et al., *Nature* 340:284-288 (1989); Baschong et al., *Histochemistry* 83:409-411 (1985); Slot and Geuze, *Eur. J. Cell Biol.* 38:87-93 (1985); Frey and Frey, *J. Struct. Biol.* 127:94-100 (1999); Hainfeld and Powell, *J. Histochem. Cytochem.* 48:471-480 (2000); Schultz et al., *PNAS USA* 97:996-1001 (2000); Gelles et al., *Nature* 331:450-453 (1988); Sonnichsen et al., *Appl. Phys. Lett.* 77:2949-2951 (2000); Boyer et al., *Science* 297:1160-1163 (2002)]. 본 발명의 나노미립형 작용제에는 음향적으로 활성인 지질구 (AAL)로서 지칭되기도 하는 [참고: Tartis et al., *Ultrasound Med. Biol.* 32(11):1771-80 (2006)] 마이크로버블 [참고: Ellegala et al., *Circulation* 108:336-341 (2003)], 초상자성 작용제, 리포솜, 퍼플루오로카본 나노입자 에멀션 [참고: WO 2005104051], 및 덴드리머 (dendrimer) [참고: Caruthers et al., *Methods in Molecular Medicine*, 124:387-400 (2006) 및 그 내부에 인용된 문헌]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 [이들 문헌 모두는 전문이 본원에 참고로 도입된다].

<49> 한 국면에서, 본 발명은 도 1B 및 2B에 도시된 HVR-H1, HVR-H2 및/또는 HVR-H3 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 가변 도메인은 도 1B, 2B, 4A 및 4B에 도시된 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 및/또는 HC-FR4 서열을 포함한다. 한 양태에서, 항체는 CH1 및/또는 Fc 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 1B, 2B, 4A 및 4B에 도시된 HVR-H1, HVR-H2 및/또는 HVR-H3 서열, 및 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 및/또는 HC-FR4 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 1B, 2B, 4A 및 4B에 도시된 HVR1-HC, HVR2-HC 및/또는 HVR3-HC 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 CH1 및/또는 Fc 서열을 포함한다.

<50> 한 국면에서, 본 발명은 도 1A 또는 2A에 도시된 HVR1-LC, HVR2-LC 및/또는 HVR3-LC 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 가변 도메인은 도 3A 및 3B에 도시된 FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC 및/또는 FR4-LC 서열을 포함한다.

<51> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 앞서 두 문단에서 기재된 바와 같은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 1가이고 Fc 영역을 포함한다. 한 양태에서, Fc 영역은 하나 이상의 융기 (knob)와 하나 이상의 공동 (hole)을 포함하는데, 이러한 융기와 공동의 존재는 융기를 포함하는 Fc 폴리펩티드와 공동을 포함하는 Fc 폴리펩티드 간의 복합체 형성을 증강시켜 준다 [참고: 예를 들어, WO 2005/063816]. 한 양태에서, 본 발명의 항체의 Fc 영역은 제1 Fc 폴리펩티드와 제2 Fc 폴리펩티드를 포함하는데, 이러한 제1 및 제2 폴리펩티드는 각각 야생형 인간 Fc와 비교해서 한 가지 이상의 돌연변이를 포함한다. 한 양태에서, 공동 돌연변이는 T366S, L368A 및/또는 Y407V이다. 한 양태에서, 융기 돌연변이는 T366W이다. 한 양태에서, 제1 폴리펩티드는 도 13에 도시된 Fc 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 도 14에 도시된 Fc 서열을 포함한다.

<52> 한 양태에서, 본 발명은 항-Robo4 항체를 대상체 (예를 들어, 포유동물 대상체, 예를 들면 인간)에게 투여함으로써, Robo4 관련 효과 [예를 들어, Robo4 활성화, 하류 분자 신호전달 (예: 분열촉진물질 활성화 단백질 키나제 (MAPK) 인산화), 세포 증식, 세포 이동, 세포 생존, 세포 형태발생 및 혈관형성] 중의 한 가지 이상 국면을 조정하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 항-Robo4 항체는 Robo4에 대한 리간드 결합을 붕괴시킨다 [예를 들어, Robo4 세포외 도메인 내의 서열과 결합함으로써, 상기 결합된 도메인과 그의 결합 파트너 (예: 리간드 분자)와의 상호 작용을 억제함으로써 이루어진다]. 기타 양태에서, Robo4 항체는 Robo4 리간드 결합 부위 내에 있지 않은 서열과 결합하는데, 이러한 결합으로 인해 Robo4가 그의 결합 파트너와 상호 작용할 수 있는 능력이 붕괴된다.

<53> 본 발명의 한 양태에서, 본 발명의 항체가 Robo4와 결합하면 Robo4 관련 내피 세포 증식이 억제된다. 본 발명의 Robo4 항체의 또 다른 양태에서, 항체가 세포 내에서 Robo4와 결합하면 이러한 세포의 증식, 생존, 산란, 형태발생 및/또는 이동성이 억제된다. 또 다른 양태에서, 세포는 내피 세포, 예를 들어 혈관 내피 세포지만, 이에 제한되지 않는다.

<54> 한 양태에서, 본 발명의 Robo4 항체는 도 5 (서열 138)에 도시된 Robo4의 적어도 일부 또는 그의 변이체와 특이

적으로 결합한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 리더 서열이 결합된 (즉, 도 5에서 점선으로 밀줄친 영역이 결합된) 완전한 길이의 Robo4 아미노산 서열 내에서 특이적으로 결합된다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 5에 도시된 세포의 도메인 서열 (도 5에서 실선으로 밀줄친) 내에서 특이적으로 결합된다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 Robo4 세포의 도메인의 일부 또는 전부에 의해 형성된 입체 형태적 에피토프와 특이적으로 결합한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 도 5에 도시된 서열 (서열 138)과의 서열 동일성 또는 유사율이 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 이상인 아미노산 서열과 특이적으로 결합한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 리더 서열이 결합된 (즉, 도 5에서 점선으로 밀줄친 영역이 결합된) Robo4 완전한 길이의 아미노산 서열과의 서열 동일성 또는 유사율이 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 이상인 아미노산 서열과 특이적으로 결합한다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 Robo4 세포의 도메인 (도 5에서 실선으로 밀줄친 영역)의 서열과의 서열 동일성 또는 유사율이 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 이상인 아미노산 서열과 특이적으로 결합한다.

<55> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 제1 동물 종의 Robo4와 특이적으로 결합하고, 제2 동물 종의 Robo4와는 특이적으로 결합하지 않는다. 한 양태에서, 제1 동물 종은 인간 및/또는 영장류 [예: 시노몰구스 (*cynomolgus*) 원숭이]이고, 제2 동물 종은 래투스 (*ratus*) (예: 랫트), 뮤린 (예: 마우스) 및/또는 개이다. 한 양태에서, 제1 동물 종은 인간이다. 한 양태에서, 제1 동물 종은 영장류, 예를 들어 시노몰구스 원숭이이다. 한 양태에서, 제2 동물 종은 뮤린, 예를 들어 마우스이다. 한 양태에서, 제2 동물 종은 개이다. 한 양태에서, 본 발명의 항체는 2가지 이상 종의 Robo4와 특이적으로 결합한다. 한 양태에서, 제1 동물 종은 인간 및/또는 영장류 (예: 시노몰구스 원숭이)이고, 제2 동물 종은 뮤린 (예: 마우스)이다. 한 가지 이상 종과 결합하는 본 발명의 항체는 치료제 또는 진단제에 대한 동물 모델링 연구에 사용된다.

<56> 한 국면에서, 본 발명은 포유동물의 혈청에서 Robo4를 검출하는 방법을 제공하는데, 이러한 혈청 중의 Robo4의 농도가 Robo4의 정상 수준 보다 높다는 것은 포유동물에게서 혈관형성이 존재한다는 지표이다. 본 발명의 방법에 따르면, 검출 가능하거나 검출 가능하게 표시시킨 본 발명의 항-Robo4 항체를 시험 포유동물 (이에는 인간이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다)로부터의 혈청 샘플과 접촉시킨다. 본 발명의 항-Robo4 항체는 검출가능한 표지를 통하여 직접 검출하거나, 또는 예를 들어, 검출 가능하게 표시시키거나 검출가능한 이차 항체와의 접촉에 의해 간접적으로 검출한다. 시험 포유동물 내에서의 항-Robo4의 혈청 농도 (수준)가 정상 포유동물로부터의 항-Robo4 혈청 농도 보다 더 높다는 것은 시험 포유동물 내에서의 혈관형성의 지표이다. 정상 포유동물은 혈관형성을 경험하지 않은 것으로 공지된 포유동물 또는 혈관형성을 경험하지 않은 포유동물 집단을 지칭한다. 한 양태에서, 시험 및 정상 포유동물 또는 포유동물 집단은 동일한 종인데, 이에는 인간이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. Robo4 단백질의 혈청 수준은 진행성 비소세포 폐암 인간 환자에게서 검출되었다 [참고: Gorn et al., *Lung Cancer* 49:71-76 (2005)]. 혈청 항-Robo4 수준은 암과 연관된 혈관형성의 진단 및 예후에 유용하다.

<57> 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항체와 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 양태에서, 담체는 제약상 허용 가능하다.

<58> 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 Robo4 항체를 암호화하는 핵산, 이러한 핵산을 포함하는 벡터, 및 본 발명의 핵산 및/또는 벡터를 포함하는 숙주 세포 [예: 이. 콜라이 (*E. coli*) 또는 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포]를 제공한다. 벡터는 모든 유형일 수 있는데, 예를 들면 재조합 벡터 (예: 발현 벡터)이다. 각종의 모든 숙주 세포를 사용할 수 있다. 한 양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이이다. 한 양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예를 들면 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.

<59> 한 국면에서, 본 발명은 항-Robo4의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 Robo4 항체 (또는 그의 단편)를 암호화하는 본 발명의 재조합 벡터를 적합한 숙주 세포에서 발현시키고, 상기 항체를 회수하는 것을 포함하는, Robo4 항체의 제조 방법을 제공한다.

<60> 한 국면에서, 본 발명은 용기; 및 이러한 용기 내에 함유된 조성물을 포함하는 제조품을 제공하는데, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 항-Robo4 항체를 포함한다. 한 양태에서, 조성물은 본 발명의 핵산을 포함한다. 한 양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 담체를 추가로 포함하는데, 몇몇 양태에서 담체는 제약상 허용 가능하다. 한 양태에서, 본 발명의 제조품은 조성물 (예를 들어, 항체)을 대상체에게 투여하는 것에 관한 지시사항을 추가로 포함한다.

<61> 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항-Robo4 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기와, 완충제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 양태에서, 완충제는 제약상 허용 가능하다. 한 양태

에서, 항체를 포함하는 조성물은 담체를 추가로 포함하는데, 몇몇 양태에서 담체는 제약상 허용 가능하다. 한 양태에서, 키트는 조성물 (예를 들어, 항체)을 대상체에게 투여하는 것에 관한 지시사항을 추가로 포함한다.

- <62> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 Robo4 항체의 용도를 제공한다.
- <63> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다.
- <64> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다.
- <65> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 질환 (예: 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스성 관절염) 및/또는 혈관형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다.
- <66> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 질환 (예: 자가면역 질환, 예를 들어 류마티스성 관절염) 및/또는 혈관형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다.
- <67> 한 국면에서, 본 발명은 질병, 예를 들어 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예: 자가면역) 질환 및/또는 혈관 형성 관련 장애를 치료적 및/또는 예방적 처치하기 위한 약물을 제조하는데 있어서의, 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.
- <68> 본 발명은 Robo4 신호전달 축의 조절이상과 연관된 질병 상태를 조정하는 데에 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. Robo4 신호전달 경로는 다수의 생물학적 및 생리학적인 기능, 예를 들어 세포 증식 및 혈관형성에 관여한다. 따라서, 한 국면에서 본 발명은 대상체에게 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- <69> 한 국면에서, 본 발명은 세포 또는 조직을 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시킴으로써, Robo4 활성화와 연관된 세포 증식을 억제시키는 것을 포함하는, Robo4 활성화 세포 증식을 억제하는 방법을 제공한다.
- <70> 한 국면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여함으로써, Robo4 활성화의 조절이상과 연관된 병리학적인 질환을 치료하는 것을 포함하는, 대상체에게서 Robo4 활성화의 조절이상과 연관된 병리학적인 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- <71> 한 국면에서, 본 발명은 Robo4를 발현하는 세포를 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 상기 세포의 성장 억제를 유발시키는 것을 포함하는, 상기 Robo4를 발현하는 세포의 성장을 억제시키는 방법을 제공한다.
- <72> 한 국면에서, 본 발명은 Robo4를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물에게 유효량의 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체를 투여함으로써, 상기 포유동물을 유효하게 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치료적으로 처치하는 방법을 제공한다.
- <73> 한 국면에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체를 투여함으로써, 세포 증식성 장애를 유효하게 치료 또는 예방시키는 것을 포함하는, Robo4의 증가된 발현 또는 활성화와 연관된 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 양태에서, 상기 증식성 장애는 암, 고형 종양 및 전이와 연관된 (예를 들어, 해당 장애를 경험한 조직 내에서의 내피 세포 증식에 의해 증대된) 혈관형성 및 장애, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 예를 들어 증식성 망막병증, 예를 들면 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 및 건선을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 장애에 있어서 비정상적이거나 불필요한 내피 세포 증식, 예를 들어 비정상적이거나 불필요한 혈관 세포 증식과 연관된 병리학적인 질환이다.
- <74> 또 다른 국면에서, 본 발명은 내피 세포를 유효량의 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체와 접촉시킴으로써, 예를 들어 종양과 연관된 혈관형성에 있어서 내피 세포의 성장을 억제시킴으로써 상기 종양을 유효하

게 처치하는 것을 포함하는, 포유동물에게서 종양을 치료적으로 처치하는 방법을 제공하는데, 이러한 종양의 성장은 내피 세포, 예를 들어 혈관 내피 세포 등에서 발현된 Robo4의 성장 증강 효과에 적어도 부분적으로 의존적이다.

<75> 본 발명의 또 다른 양태는 세포 또는 조직을 유효량의 본원에 기재된 항-Robo4 항체와 접촉시킴으로써, 혈관형성을 조정하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 상기 항체는 세포독성제를 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 혈관형성이 억제된다. 몇몇 양태에서, 혈관형성이 증강된다. 몇몇 양태에서, 혈관형성은 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선 및 그의 조합 중에서 선택된 장애와 연관이 있다. 몇몇 양태에서, 혈관형성은 암과 연관이 있다. 몇몇 양태에서, 암은 육종 (골원성 육종 및 혈관육종 포함), 편평 세포암, 폐암, 복막 암, 간세포암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종, 뇌암, 두경부암, 및 관련 전이 및 그의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된다. 몇몇 양태에서, 세포 또는 조직은 포유동물의 것이다. 몇몇 양태에서, 포유동물은 인간이다. 몇몇 양태에서, 상기 방법은 세포를, 항종양제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 항혈관형성제, 및 그의 조합물 중에서 선택된 작용제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 작용제는 항-VEGF 항체이다. 몇몇 양태에서, 상기 방법은 세포를, 항종양제, 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 항혈관형성제, 및 그의 조합물 중에서 선택된 제2, 제3 또는 제4 작용제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 몇몇 양태에서, 제2, 제3 또는 제4 작용제는 항-VEGF 항체이다.

<76> 본 발명의 방법을 사용하여 적합한 모든 병리학적 상태, 예를 들어 Robo4 발현의 상향 조절과 연관된 세포 및/또는 조직에 영향을 미칠 수 있다. 한 양태에서는, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포가 종양 [예를 들어, 유방암, 결장직장암, 폐암, 유두 암종 (예: 갑상선의 유두 암종), 결장암, 췌장암, 난소암, 자궁경부암, 중추 신경계암, 골원성 육종, 신 암종, 간세포 암종, 방광암, 위 암종, 두경부 편평 암종, 흑색종 및 백혈병 포함], 또는 육종 (예: 골원성 육종 또는 혈관육종), 또는 그의 성장이 혈관형성에 있어서 내피 세포 증식에 의해 지지되는 모든 암 내에서 증식하는 내피 세포 또는 혈관 내피 세포이다. 한 양태에서, 병리학적 질환은 비정상적이거나 불필요한 내피 세포 증식과 연관이 있다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 항-Robo4 항체 또는 항체-약물 접합체의 표적에는 암 (예를 들어, 고형 종양 및 전이 포함), 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 예를 들어 증식성 망막병증 (예: 당뇨병성 망막병증), 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선, 및 혈관형성과 연관된 장애 (예를 들어, 해당 장애를 경험한 조직 내에서의 내피 세포 증식에 의해 증대된 장애)를 포함하지만, 그에 제한되지 않는 장애에 있어서의 비정상적이거나 불필요한 혈관 세포 증식이 포함된다.

<77> 본 발명의 방법은 부가의 치료 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 양태에서는, 특정 방법이 표적화된 세포 및/또는 조직 (예: 암 세포)을 방사선 처치 또는 화학요법제에 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

<78> 본 발명의 방법의 한 양태에서, 표적화되는 세포 (예를 들어, 종양 조직 또는 망막의 내피 세포)는 Robo4 발현이 동일한 조직 기원의 정상 조직 내의 내피 세포와 비교해서 증가되는 것이다. 한 양태에서, 본 발명의 방법은 표적된 세포의 사멸을 유발시킨다. 예를 들어, 본 발명의 항-Robo4 항체와 접촉시키면 (본 발명의 항체-약물 접합체와의 접촉 포함) 세포 사멸을 유발시키는 세포독성 부분이 흡수된다. 또 다른 한편, 세포독성 화합물과 접합된 본 발명의 항-Robo4 항체와 접촉시키면 세포 사멸을 가져다 주는 세포독성 화합물의 내재화가 일어날 수 있다. 또 다른 대체 양태에서, 검출가능한 부분과 접합된 본 발명의 항-Robo4 항체와 접촉시키면, 예를 들어 조직 (예: 종양 조직 또는 망막)의 혈관계의 내피 세포를, 예를 들어 관련 분야에 널리 공지된 영상화 기술에 의해 검출할 수 있게 된다.

<79> 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 항-Robo4 항체를 포유동물에게 투여함으로써 생체내 영상화하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 포유동물은 인간이다. 몇몇 양태에서, 포유동물은 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선 및 그의 조합 중에서 선택된 질환 또는 장애를 갖고 있는 것으로 추정된다.

<80> 본 발명의 또 다른 양태는 Robo4를 발현하는 세포를 본원에 기재된 항-Robo4 항체와 접촉시킴으로써, 상기 Robo4를 발현하는 세포를 검출하는 방법을 제공한다. 몇몇 양태에서, 세포는 혈관 내피 세포이다. 몇몇 양태

에서, 세포는 포유동물 내의 세포이다. 몇몇 양태에서, 포유동물은 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선 및 그의 조합 중에서 선택된 질환 또는 장애를 갖고 있는 것으로 추정된다. 몇몇 양태에서, 포유동물은 편평 세포암, 폐암, 복막암, 간세포암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종, 뇌암, 두경부암, 및 관련 전이 및 그의 조합 중에서 선택된 암을 갖고 있는 것으로 추정된다.

발명의 상세한 설명

I. 도입부

본 발명은 Robo4 또는 그의 일부와 결합하는 조성물, 이러한 조성물을 포함하는 키트 및 제조품, 및 상기 조성물의 사용 방법, 예를 들어 Robo4 수용체에 대한 리간드 결합을 조정하고 Robo4 수용체에 대한 리간드 결합과 연관된 생물학적/생리학적 활성을 조정하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 부분적으로, 치료적 및 진단적 (예를 들어, 생체내, 시험관내 또는 생체의 영상화) 표적으로서 유용한 수용체인 Robo4 수용체와 결합하는 각종 항-Robo4 항체를 확인하는 것에 기초한다. 본 발명의 항-Robo4 항체는 편리하게, 암, 해당 장애를 경험한 조직 내에서의 내피 세포 증식과 연관된 (예를 들어, 내피 세포 증식에 의해 증대된) 조절이상된 혈관형성 및 장애, 고형 종양 및 전이, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 예를 들어 증식성 망막병증 (예: 당뇨병성 망막병증), 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염 및 건선을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 장애에 있어서의 비정상적이거나 불필요한 내피 세포 증식, 예를 들어 비정상적이거나 불필요한 혈관 세포 증식과 연관된 병리학적 질환을 표적화하는 데에 사용하기 위한 치료제 및 진단제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 항-Robo4 항체는 단독으로 또는 부가의 작용제 (항종양 조성물, 화학요법제, 세포독성제, 성장 억제제 포함)와 병용해서 사용할 수 있다. 몇몇 양태에서, 본 발명은 Robo4 기능을 차단시키고/시키거나, 세포독성제를 (예를 들어, 세포 표면 상에서) Robo4 발현성 세포로 전달하고/하거나, 조영제를 세포 표면 상에서 Robo4 발현성 세포로 전달하기 위하여 Robo4-표적화 항체를 확인 및/또는 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 몇몇 양태에서, 검출 가능하게 표지된 항-Robo4 항체는 편리하게, 증가된 혈관화가 해로운 질병 상태 (예를 들어, 암 및 황반 변성) 또는 내피 세포 증식, 혈관 세포 증식 및/또는 혈관형성이 (예를 들어, 상처 치유에 있어서) 목적하는 상태인 생리학적 상태에 대한 조영제로서 사용할 수 있다.

II. 정의

본원에 사용된 바와 같이, 다음 용어는 달리 명시되지 않는 한 다음에 기재된 의미를 갖는다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "Robo4" 또는 "매직 라운드어바웃", "내피 세포-특이적 분자 4" 또는 "ECSM4"는 도 5에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 모든 천연 또는 변이체 (천연이거나 합성이든 간에) Robo4 폴리펩티드, 본 발명의 항체와 특이적으로 결합하는 변이체 또는 그의 아서열, 예를 들어 Robo4의 세포의 도메인 또는 그의 모든 아서열을 지칭한다. 용어 "야생형 Robo4"는 일반적으로, 천연 발생적 Robo4 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 용어 "야생형 Robo4 서열"은 일반적으로, 천연 발생적 Robo4에서 발견되는 아미노산 서열을 지칭한다. 본 발명의 Robo4 폴리펩티드는 포유동물 Robo4 폴리펩티드, 예를 들어 인간, 말, 소, 돼지, 개, 고양이, 설치류 Robo4 등이다. "Robo4," "매직 라운드어바웃", "내피 세포-특이적 분자 4" 또는 "ECSM4"는 또한, (1) 바람직하게 약 25, 50, 100, 200, 500, 1000개 이상의 아미노산 영역에 걸쳐, Robo4 핵산에 의해 암호화된 아미노산 서열 (인간 Robo4 폴리펩티드 서열의 경우에는, 예를 들어 도 5 및 7 및 서열 138 및 171을 참고하고; 무린 Robo4 폴리펩티드 서열의 경우에는, 예를 들어 서열 172를 참고한다)과의 아미노산 서열 동일성이 약 60% 초과, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 바람직하게 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 갖고 있고; (2) Robo4 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 면역원에 대항하여 생성된 항체, 예를 들어 폴리클로날 항체 및/또는 모노클로날 항체, 및 그의 보존적으로 변형된 변이체와 결합하며; (3) 엄격한 혼성화 조건 하에, Robo4 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 및 그의 보존적으로 변형된 변이체에 상응하는 안티-센스 가닥과 특이적으로 혼성화하고; (4) 바람직하게 약 25, 50, 100, 200, 500, 1000개 이상의 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐, Robo4 핵산 (예를 들어, 도 5 및 7 및 서열 138, 171 또는 172에 제시된 폴리펩티드를 암호화하는 핵산)과의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 약 95% 초과, 바람직하게 약 96%, 97%, 98%, 99% 이상인 핵산 서열을 갖는, 핵산 및 폴리펩티드 다형체성 변이체, 대립 유

전자, 돌연변이체, 및 중간 동족체를 지칭한다. 바람직하게, Robo4 핵산은 바람직하게 약 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개 이상의 뉴클레오타이드 영역에 걸쳐, 서열 138, 171 또는 172를 암호화하는 핵산과의 동일성이 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과이다.

<123> 용어 "항-Robo4 항체" 또는 "Robo4와 결합하는 항체"는 이러한 항체가 Robo4를 표적화하는 데에 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하기에 충분한 친화도로 Robo4와 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 바람직하게, 무관한 비-Robo4 단백질에 대한 항-Robo4 항체의 결합 정도는, 예를 들어 방사성 면역검정 (RIA)에 의해 측정된 바와 같이 Robo4에 대한 항체 결합도의 약 10% 미만이다. 특정의 양태에서, Robo4와 결합하는 항체는 해리 상수 (Kd)가 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 이다. 특정의 양태에서, 항-Robo4 항체는 상이한 종들 간에 Robo4를 보존하고 있는 Robo4의 에피토프와 결합한다. 기타 양태에서, 항-Robo4 항체는 상이한 종들 간에 Robo4를 보존하고 있지 않은 Robo4의 에피토프와 결합한다.

<124> 본원에서 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 본래의 항체로부터 형성된 다중-특이적 항체 (예: 이중-특이적 항체), 및 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편이 포함된다.

<125> "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 구성분으로 확인되어 이러한 천연 환경으로부터 분리 및/또는 회수시킨 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 조사, 진단적 또는 치료적 용도를 방해할 수도 있는 물질인데, 이에에는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질이 포함될 수 있다. 몇몇 양태에서는, 항체를 (1) 예를 들어, 로리 (Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과, 및 몇몇 양태에서는 99 중량% 초과로 정제시키거나, (2) 예를 들어, 스피닝 컵 시퀀세이터 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상 잔기를 수득하기에 충분한 정도로 정제시키거나, 또는 (3) 예를 들어, 쿠마시 블루, 또는 은 염색 (silver stain)을 이용하여 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하도록 정제할 것이다. 단리된 항체에는 제조할 세포 내의 계내 항체가 포함되는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 한 가지 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

<126> "천연 항체"는 통상적으로, 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중-사량체성 당단백질이다. 각 경쇄는 1개의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄와 연결되지만, 디설파이드 연쇄 수는 상이한 면역글로불린 이소형의 중쇄들 간에 다양하다. 각 중쇄 및 경쇄는 규칙적으로 이격된 쇠내 디설파이드 브릿지를 또한 갖고 있다. 각 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_H)에 이어 수 많은 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖는데; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간에 계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

<127> 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄의 가변 도메인은 " VH "로서 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 " VL "로서 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로, 항체의 가장 가변 부분이고, 항원 결합 부위를 함유한다.

<128> 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체들 간의 서열에 있어 광범위하게 상이하고, 그의 특별한 항원에 대한 특별한 각 항체의 결합성과 특이성에 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 균등한 수준으로 분포되지는 않는다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역 (HVR)으로 불리우는 3가지 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분이 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이는 베타-시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에는 이러한 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개의 HVR에 의해 연결된 베타-시트 입체 배치를 상당 부분 채택하고 있다. 각 쇠 내의 HVR은 상기 FR 영역에 의해 아주 근접하게 함께 결합되어 있고, 다른 쇠로부터의 HVR은 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 [참고: Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. 불변 영역은 항원에 대한 항체 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 각종의 효과기 기능, 예를 들어 항체-의존성 세포성 독성에 있어서의 항체 참여를 나타낸다.

<129> 모든 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 2가지 명백한 별개 유형 [카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭됨] 중의 하나로 지정될 수 있다.

- <130> 그들 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라서, 항체 (면역글로불린)는 상이한 부류로 지정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 면역글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있고, 이들 중의 몇 가지는 아부류 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 분할될 수 있다. 상이한 부류의 면역글로불린에 상응하는 중쇄 불변 영역은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 명명된다. 상이한 부류의 면역글로불린의 소단위체 구조 및 3차원적 입체 배치는 널리 공지되어 있고, 일반적으로, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)]. 항체는 이러한 항체와 하나 이상의 기타 단백질 또는 펩티드와의 공유적 또는 비-공유적 연합에 의해 형성된 보다 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.
- <131> 용어 "완전한 길이의 항체", "본래의 항체" 및 "완전 항체"는 다음에 정의된 바와 같은 항체 단편이 아니라, 그의 실질적인 본래 형태의 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 상기 용어는 특히, Fc 영역을 함유하는 중쇄를 수반한 항체를 지칭한다.
- <132> 본원에서의 목적상 "있는 그대로의 항체"는 세포독성 부분 또는 방사성 표지와 접합되지 않은 항체이다.
- <133> "항체 단편"은 본래 항체의 일부, 바람직하게 그의 항원 결합성 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아보디 (diabody); 선형 항체; 단일 쇠 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중-특이적 항체가 포함된다.
- <134> 항체를 파과인 분해시키면, "Fab" 단편으로 불리우는 2개의 동일한 항원 결합성 단편 (각각은 단일 항원 결합 부위를 갖는다)과 잔류성 "Fc" 단편 (이의 명칭은 용이하게 결정화될 수 있는 그의 능력을 반영한다)이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 있고 항원과 여전히 가교 결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다.
- <135> "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 양태에서, 2-쇄 Fv 중은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단하게 비공유 결합에 의해 연합된 이량체로 이루어진다. 단일 쇠 Fv (scFv) 중에서는, 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인을 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 결합에 의해 연결시켜 경쇄와 중쇄가 2-쇄 Fv 중에서의 것과 유사한 "이량체성" 구조로 연합될 수 있도록 한다. 이러한 형상에서는, 각 가변 도메인의 3개 HVR이 상호 작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상의 항원 결합 부위를 규정한다. 집합적으로, 6개의 HVR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여해 준다. 그러나, 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화도이긴 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 특정 항원에 대해 특이적인 3개의 HVR 만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 지니고 있다.
- <136> Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 1개 이상 시스테인을 포함한 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에 수 개의 잔기를 부가한다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기 (들)가 자유 티올기를 보유하고 있는, Fab'에 대한 본원의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래에는, 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링물이 또한 공지되어 있다.
- <137> "단일 쇠 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠 내에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 해주는, VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 관한 고찰은 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315].
- <138> 용어 "디아보디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하는데, 이들 단편은 동일한 폴리펩티드 쇠 내에 경쇄 가변 도메인 (VL)과 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다 (VH-VL). 동일한 쇠 상에서 두 도메인 간에 짝짓기를 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 이들 도메인을 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 짝짓기하여, 2개의 항원-결합 부위를 창출시킨다. 디아보디는 2가 또는 이중-특이적일 수 있다. 디아보디는, 예를 들어 문헌 [참고: EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9: 129-134 (2003); and Hollinger et al., *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 트리아보디 (triabody) 및 테트라보디 (tetrabody) 또한, 문헌 [참고: Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.
- <139> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개

개의 항체가 미량으로 존재할 수도 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 천연 발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한 집단으로부터 수득한 항체를 지칭한다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 별개의 항체의 혼합물이 아니라 항체의 특질을 표시한다. 특정의 양태에서, 이러한 모노클로날 항체에는 전형적으로, 표적과 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체가 포함되는데, 표적-결합성 폴리펩티드 서열은 복수 개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합성 폴리펩티드 서열을 선별하는 것을 포함하는 공정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 이러한 선별 공정은 복수 개의 클론, 예를 들어 하이브리도마 클론, 파아지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀(pool)로부터 독특한 클론을 선별하는 것일 수 있다. 이와 같이 선별된 표적 결합성 서열을 추가로 변경시켜, 예를 들어 표적에 대한 친화도를 개선시키고, 표적 결합성 서열을 인간화시키며, 세포 배양액 중에서의 그의 생성을 개선시키며, 생체 내에서의 그의 면역원성을 저하시키고, 다중-특이적 항체를 창출시킬 수 있으며, 상기와 같이 변경된 표적 결합성 서열을 포함하는 항체 또한 본 발명의 모노클로날 항체이기도 하다는 것을 인지해야 한다. 전형적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대항하여 유도된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대항하여 유도된다. 모노클로날 항체 제제는 그의 특이성 이외에도, 전형적으로 기타 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 채로 있다는 점에서 유리하다.

<140> 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 수득되는 바와 같은 항체의 형질을 표시하고, 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 추론되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법 [참고: Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981), 재조합 DNA 방법 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호], 파아지 디스플레이 기술 [참고: 예를 들어, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004); and Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)]을 포함한 각종 기술, 및 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 유전자 또는 인간 면역글로불린 유전자 자리의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성시키는 기술 [참고: 예를 들어, WO 1998/24893, WO 1996/34096, WO 1996/33735, 및 WO 1991/10741; Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 및 제5,661,016호, 및 Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)]에 의해 만들 수 있다.

<141> 본원에서의 모노클로날 항체에는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 특별한 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지 쇠(들)은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 아부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편이 포함된다 [참고: 미국 특허 제4,816,567호; Morrison et al., *PNAS USA*, 81: 6851-6855 (1984)]. 키메라 항체에는 항체의 항원-결합성 영역이, 예를 들어 짧은꼬리 (macaque) 원숭이를 관심있는 항원으로 면역시킴으로써 생성된 항체로부터 유래되는 PRIMATIZED® 항체가 포함된다.

<142> "인간화" 형태의 비-인간 (예: 뮤린) 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는, 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 랫트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 추가변 영역으로부터의 잔기로 대체시킨 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더우기, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정련시키기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로, 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세 내역에 관해

서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]. 또한, 다음 문헌 및 그 내에서 인용된 참고 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)].

<143> "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하고/하거나 본원에 기재된 바와 같은 인간 항체를 제조하기 위한 모든 기술을 이용하여 만든 아미노산 서열을 보유하고 있는 항체이다. 인간 항체의 정의에는 구체적으로, 비-인간 항원 결합성 잔기를 포함하는 인간화 항체가 배제된다. 인간 항체는 파아지-디스플레이 라이브러리를 포함한 당해 분야에 공지된 각종 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다 [참고: Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. 다음 문헌에 기재된 방법 또한, 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위해 이용 가능하다 [참고: Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991); van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)]. 인간 항체는 항원을, 항원 시험감염에 반응하여 항체를 생성시키도록 변형시켰지만, 그의 내인성 유전자 위치는 무력화시킨 트랜스제닉(transgenic) 동물, 예를 들어 면역시킨 제노마우스(xenomouse) [참고: 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술에 관한 미국 특허 제6,075,181호 및 제6,150,584호]에 투여함으로써 제조할 수 있다. 또한, 예를 들어 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통하여 생성된 인간 항체에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Li et al., *PNAS USA*, 103:3557-3562 (2006)].

<144> "항원"은 항체와 선택적으로 결합할 수 있는 예정된 항원(예: Robo4 서열)이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 기타 천연 발생적 또는 합성 화합물일 수 있다. 바람직하게, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

<145> 본원에서의 목적상 "수용체 인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크로부터 유래되거나 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 몇몇 양태에서, 기존의 아미노산 변화 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 기존의 아미노산 변화가 VH에 존재하는 경우, 바람직하게는 이들 변화가 위치 71H, 73H 및 78H 중의 단지 3개, 2개 또는 1개에서만 일어나는 경우, 예를 들어 이들 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 양태에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열상 동일하다. 기존의 아미노산 변화가 VH에 존재하는 경우, 바람직하게는 이들 변화가 위치 71H, 73H 및 78H 중의 단지 3개, 2개 또는 1개에서만 일어나는 경우, 예를 들어 이들 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 양태에서, VL 수용체 인간 프레임워크는 VL 인간 면역글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열상 동일하다.

<146> "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선별시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 면역글로불린 VL 또는 VH 서열의 선별은 가변 도메인 서열 아군으로부터이다. 일반적으로, 이러한 서열 아군은 카바트 등에서와 같은 아군이다. 한 양태에서, VL에 대한 아군은 카바트 등에서와 같은 아군 카파 I이다. 한 양태에서, VH에 대한 아군은 카바트 등에서와 같은 아군 III이다.

<147> "VH 아군 III 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 중쇄 아군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 양태에서, VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 128)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 129)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYC (서열 131)-H3-WGQGLTVTVSS (서열 16). 또 다른 양태에서, VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 128)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 129)-H2-RFTISADTSKNTAYLQMSLRLRAEDTAVYYC (서열 137)-H3-WGQGLTVTVSS (서열 16).

<148> "VL 아군 I 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 경쇄 카파 아군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다. 한 양태에서, VH 아군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 다음 서열 각각의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 9)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 10)-L2-

GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (서열 99)-L3-FGQGTKVEIK (서열 100).

<149> "변형되지 않은 인간 프레임워크"는 수용체 인간 프레임워크와 동일한 아미노산 서열을 갖는, 예를 들어 수용체 인간 프레임워크에서 인간 대 비-인간 아미노산 치환(들)이 결여된 인간 프레임워크이다.

<150> 본원에 사용된 경우의 용어 "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열 내에 초가변적이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함하는데, VH에 3개가 있고 (H1, H2, H3), VL에 3개가 있다 (L1, L2, L3). 서술된 수의 초가변 영역이 사용되고 있고 본원에 포괄된다. 카바트 (Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성에 기초한 것이며, 가장 흔히 사용되고 있다 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 초티아 (Chothia)는 대신 구조적 루프의 위치를 지칭한다 [참고: Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]. AbM 초가변 영역은 카바트 CDR과 초티아 구조적 루프 간의 절충을 나타내고, 이는 옥스포드 분자 (Oxford Molecular's) AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용되고 있다. "접촉" 초가변 영역은 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기초한 것이다. 이들 초가변 영역 각각으로부터의 잔기가 다음에 제시된다:

루프	카바트	AbM	초티아	접촉
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (초티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

<151> 항체의 초가변 영역을 서술한 아미노산 위치/경계는 당해 분야에 공지된 각종 정의 (다음에 기재된 바와 같음) 및 맥락에 따라서 다양할 수 있다. 가변 도메인 내의 몇몇 위치는 이들 위치가 하나의 기준 세트 하에서는 초가변 영역 내인 것으로 간주될 수 있지만, 상이한 기준 세트 하에서는 초가변 영역을 벗어난 것으로 간주된다는 점에서 하이브리드 초가변 위치로서 관찰될 수 있다. 이들 위치 중의 1개 이상이 연장된 초가변 영역에서 발견될 수도 있다. 한 양태에서, 이들 하이브리드 초가변 위치에는 중쇄 가변 도메인 내의 위치 26-30, 26-35 33-35B, 47-49, 49-65, 57-65, 95-102, 93, 94 및 102 중의 하나 이상의 포함된다. 한 양태에서, 이들 하이브리드 초가변 위치에는 경쇄 가변 도메인 내의 위치 24-29, 24-34, 35-36, 46-49, 50-56, 89-97, 56 및 97 중의 하나 이상이 포함된다.

<153> 본원에 사용된 바와 같은 경쇄의 HVR은 상호 교환적으로, HVR-L1, -L2, 또는 -L3, 또는 HVR1-LC, HVR2-LC 또는 HVR3-LC, 또는 경쇄 HVR이 기준이 된다는 것을 표시하는 기타 유사한 명칭으로서 지칭된다. 본원에 사용된 바와 같은 중쇄의 HVR은 상호 교환적으로, HVR-H1, -H2, 또는 -H3, 또는 HVR1-HC, HVR2-HC, 또는 HVR3-HC, 또는 중쇄 HVR이 기준이 된다는 것을 표시하는 기타 유사한 명칭으로서 지칭된다.

<154> 초가변 영역은 다음과 같은 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH 내의 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 이들 정의 각각에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 참고]에 따라서 넘버링된다.

<155> 본원에서의 목적상 "변경된 초가변 영역"은 내부에 1개 이상 (예를 들어, 1개 내지 약 16개) 아미노산 치환(들)을 포함하는 초가변 영역이다.

<156> 본원에서의 목적상 "변형되지 않은 초가변 영역"은 이것이 유래된 비-인간 항체와 동일한 아미노산 서열, 즉 내부에 1개 이상의 아미노산 치환이 결여된 아미노산 서열을 갖는 초가변 영역이다.

<157> "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 규정된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다. 본원에 사용된 바와 같은 LC-FR1-4 또는 FR1-4-LC 또는 유사한 명칭은 상호 교환적으로 사용되고, 경쇄의 프레임워크 영역을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 HC-FR1-4 또는 FR1-4-HC 또는 유사한 명칭은 상호 교환적으로 사용되고, 중쇄의 프레임워크 영역을 지칭한다.

<158> "친화도 성숙된" 항체는 변경(들)을 나타내지 않는 모 항체와 비교해서 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시켜

주는, 그의 하나 이상의 CDR 내에서의 한 가지 이상의 변경을 수반한 항체이다. 바람직한 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 지닐 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당해 분야에 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌 [참고: Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙이 기재되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Barbas et al., *PNAS USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)].

<159> "차단성" 항체 또는 "길항제" 항체는 이와 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 저하시키는 것이다. 예를 들어, 차단성 항체 또는 길항제 항-Robo4 항체는 Robo4와 결합함으로써 혈관형성을 실질적으로 또는 완전히 억제시킨다.

<160> 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 그의 변수들은 문헌 [참고: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서의 항체 편집에서 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이러한 FR 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 몇 개 적거나 부가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따르는 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예: 카바트에 따르는 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 카바트 잔기 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬함으로써 소정의 항체에 대해 결정할 수 있다.

<161> 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"이란 당업자가 두 수치 간의 차이가 이러한 값 (예: Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없다고 간주할 수 있을 정도로 두 수치 (일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 연관된 것이고, 다른 하나는 기준/비교 항체와 연관된 것이다) 간의 충분한 고도의 유사성을 의미한다. 상기 두 수치 간의 차이는 기준/비교 항체에 대한 값의 함수로서 바람직하게 약 50% 미만, 바람직하게 약 40% 미만, 바람직하게 약 30% 미만, 바람직하게 약 20% 미만, 바람직하게 약 10% 미만이다.

<162> "결합 친화도"는 일반적으로, 분자 (예: 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예: 항원) 간의 비공유적 상호 작용 총 합의 세기를 지칭한다. 달리 표시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화도"는 결합 쌍 구성원 (예를 들어, 항체와 항원) 간의 1:1 상호 작용을 반영하고 있는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 그의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로, 해리 상수 (K_d)로써 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 바와 같은, 당해 분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로, 항원과 서서히 결합하고 용이하게 해리되는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로, 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 길게 결합된 상태로 있다. 결합 친화도를 측정하는 각종 방법이 당해 분야에 공지되어 있는데, 이들 모두가 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시 양태가 다음에 기재되어 있다.

<163> 한 양태에서, " K_d ", " K_b " 또는 " K_d 값"은 표시되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (^{125} I)-표지된 항원으로 Fab를 평형시킨 다음, 결합된 항원을 항-Fab 항체-피복된 판으로 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 검정에 의해 기재된 바와 같이 관심있는 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 이용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다 [참고: Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881]. 이러한 검정에 대한 조건을 확립시키기 위해, 미소역가판 (공급처: Dynex)을 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 μ g/ml의 포획성 항-Fab 항체 (공급처: Cappel Labs)로 밤새 피복시킨 후, 실온 (대략 23°C) 하에 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단시킨다. 비-흡착성 판 (Nunc #269620)에 서는, 100 pM 또는 26 pM [^{125} I]-항원을 관심있는 Fab, 예를 들어 문헌 [참고: Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)]에 기재된 바와 같은 Fab-12의 일련의 희석물과 혼합한다. 이어서, 관심있는 Fab를 밤새 항온 배양하지만, 이러한 항온 배양은 평형에 도달시키기 위해 장기간 (예: 65시간) 동안 지속할 수 있다. 그 후, 혼합물을 실온에서, 예를 들어 1시간 동안 항온 배양하기 위해 포획 판에 옮긴다. 그 다음, 용액을 제거하고 판을 PBS 중의 0.1% 트윈 (Tween[®])-20으로 8회 세척한다. 판이 건조되면, 150 μ l/웰의 신틸런트 (scintillant) (MicroScint-20; Packard)를 가하고, 판을 10분 동안 탑카운트 (Topcount) 감마 계수기 (Packard) 상에서 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공해주는 각 Fab의 농도를 경쟁적 결합 검정에 사용하

기 위해 선택한다. 또 다른 양태에 따르면, K_d 또는 K_d 값은 약 10 반응 단위 (RU)에서 고정화 항원 CM5 칩을 수반하여 25°C 하에 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 (공급처: BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)를 이용하여 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용함으로써 측정한다. 간략하게 설명하면, 카복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, BIAcore Inc.)을 공급자의 지시에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시석신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.8로 희석시켜 5 µg/ml (약 0.2 µM)로 만든 후, 대략 10 반응 단위 (RU)의 커플링된 단백질을 달성하기 위해 5 µl/min의 유속으로 주사한다. 항원을 주사한 후, 1 M 에탄올아민을 주사하여 반응되지 않은 기를 차단시킨다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 일련의 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 µl/min의 유속으로 25°C 하에 PBS 중에 0.05% 트윈 20 (PBST)과 함께 주사한다. 연합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 연합 및 해리 센서그램을 동시에 고정시킴으로서 간단한 일-대-일 랑뮈르 (Langmuir) 결합성 모델 (BIAcore Evaluation Software version 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 비로서 계산한다 [참고: 예를 들어, Chen, Y., et al., *J. Mol Biol* 293:865-881 (1999)]. 작동 속도가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 M^{-1}S^{-1}$ 를 초과하는 경우에는, 분광계, 예를 들어 스톱-플로우 장착된 분광광도계 (공급처: Aviv Instruments) 또는 교반된 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코 (Aminco™) 분광광도계 (공급처: ThermoSpectronic)에서 측정된 바와 같은 항원의 증가 농도의 존재 하에, 25°C에서 PBS, pH 7.2 중의 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 형광 발광 세기 (여기 = 295 nm; 발광 = 340 nm, 16 nm 밴드-패스) 상의 증가 또는 감소를 측정하는 형광성 쉐칭 기술을 사용함으로써 작동 속도를 결정할 수 있다.

<164> 본원에 사용된 바와 같은 "실질적으로 저하된" 또는 "실질적으로 상이한"이란 당업자가 두 수치 간의 차이가 이러한 값 (예: K_d 값, HAMA 반응)에 의해 측정된 생물학적 특징 맥락 내에서 통계적 유의성이 있다고 간주할 수 있을 정도로 두 수치 (일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 연관된 것이고, 다른 하나는 기준/비교 항체와 연관된 것이다) 간의 충분한 고도의 상이성을 의미한다. 상기 두 수치 간의 차이는 기준/비교 항체에 대한 값의 함수로서 바람직하게 약 10% 초과, 바람직하게 약 20% 초과, 바람직하게 약 30% 초과, 바람직하게 약 40% 초과, 바람직하게 약 50% 초과이다.

<165> 펩티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련한 "아미노산 서열 동일성 (%)"은 서열들을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 서열 동일성을 달성하며, 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환물도 고려하지 않은 후에, 특이적 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 비율 (%)로서 규정된다. 아미노산 서열 동일성 (%)을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어, 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 메갈라인 (Megalign) (DNASTAR™) 소프트웨어를 사용하여 당해 분야의 기술 수준 내의 각종 방식으로 달성할 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기에 적당한 파라미터를 결정할 수 있는데, 이에 는 비교하고자 하는 완전한 길이의 서열 전반에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데에 필요한 모든 알고리즘이 포함된다. 그러나, 본원의 목적상 아미노산 서열 동일성 (%) 값은 서열 비교용 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성시킨다. ALIGN-2 서열 비교용 컴퓨터 프로그램은 제네테크, 인코포레이티드 (Genentech, Inc.)에 의해 만들어졌고, 제시된 원시 코드는 미국 저작권국 (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)에 사용자 문서로 출원되었는데, 이는 미국 저작 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제네테크, 인코포레이티드 (소재지: South San Francisco, California)를 통하여 공개적으로 입수 가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D 상에서 사용하도록 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터가 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 이는 달라지지 않는다.

<166> 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2를 이용하는 상황 하에서는, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와 의 또는 이에 대항한 소정의 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 (%) (달리 언급하면, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와 의 또는 이에 대항한 특정의 아미노산 서열 동일성 (%))을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 다음과 같이 계산한다:

<167> $100 \times \text{분율 } X/Y$

<168> 상기에서, X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매칭물 (match)로서 스코어된 아미노산 잔기 수이고; Y는 B 중의 아미노산 잔기 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않는 경우에는, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 (%)이 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 (%)과 동등하지 않다는 것을 인지해야 할 것이다.

<169> 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 (%) 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프

로그그램을 사용하여 바로 앞 단락에서 기재된 바와 같이 수득한다.

<170>

본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 이와 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 한 가지 유형의 벡터가 "플라스미드"인데, 이는 부가의 DNA 절편을 연결시킬 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 파아지 (phage) 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스성 벡터인데, 여기서는 부가의 DNA 절편을 바이러스성 게놈 내로 연결할 수 있다. 특정의 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포 내에서 자기 복제할 수 있다 (예를 들어, 세균성 복제 기점을 갖는 세균성 벡터 및 에피솜성 포유동물 벡터). 기타 벡터 (예: 비-에피솜성 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시 이러한 숙주 세포의 게놈 내로 통합됨으로써, 숙주 게놈과 함께 복제할 수 있다. 더우기, 특정 벡터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터가 본원에서 "재조합 발현 벡터 (또는 간단히, "재조합 벡터")로서 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호 교환적으로 사용될 수 있는데, 이는 플라스미드가 가장 흔히 사용되고 있는 벡터 형태이기 때문이다.

<171>

본원에서 상호 교환적으로 사용되는 바와 같은 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 모든 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고, 이에 DNA 및 RNA가 포함된다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 도입될 수 있는 모든 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 합성 후에, 예를 들어 표지와 접합에 의해 추가로 변형시킬 수 있다. 기타 유형의 변형에는, 예를 들어 "캡스 (caps)", 하나 이상의 천연 발생적 뉴클레오티드의 특정 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 전하를 띠지 않은 연쇄물 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등)을 수반한 것 및 전하를 띤 연쇄물 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 수반한 것, 펜던트 부분, 예를 들어 단백질 (예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입체 (예: 아크리딘, 포스칼렌 등)을 수반한 것, 킬레이트제 (예: 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화적 금속 등)를 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 변형된 연쇄물 (예: 알파 아노머성 핵산 등)을 수반하는 것 뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드(들)가 포함된다. 추가로, 당에 통상적으로 존재하는 모든 히드록실기는, 예를 들어 포스포네이트기, 포스포에이트기로 대체될 수 있거나, 표준 보호기에 의해 보호될 수 있거나, 또는 부가의 뉴클레오티드에 대한 부가의 연쇄물을 제조하도록 활성화될 수 있거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체와 접합시킬 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH를 인산화시키거나, 또는 탄소수 1 내지 20의 유기 캡핑기 부분 또는 아민으로 치환시킬 수 있다. 기타 히드록실을 또한 유도체화하여 표준 보호기를 수득할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있는 유사한 형태의 리보스 또는 데옥시리보스 당, 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카복실성 당 유사체, α -아노머성 당, 에피머성 당, 예를 들어 아라비노스, 크실로스 또는 리복스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 아크릴성 유사체 및 아염기성 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연쇄물을 대체 연결기로 대체시킬 수 있다. 이들 대체 연결기에는 포스페이트를 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") [여기서, R 또는 R' 각각은 독립적으로, H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연쇄를 함유하는 치환되거나 치환되지 않은 알킬 (1-20C), 알릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬이다]로 대체시킨 양태들이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연쇄물이 반드시 동일할 필요는 없다. 앞서의 설명은 본원에 지칭된 모든 폴리뉴클레오티드 (RNA 및 DNA 포함)에 적용된다.

<172>

본원에 사용된 바와 같은 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 길이가 약 200개 미만 뉴클레오티드이긴 하지만 반드시 그럴 필요가 없는 짧은, 일반적으로 단일 가닥, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 관한 상기 설명이 올리고뉴클레오티드에도 동등하고도 완전히 적용 가능하다.

<173>

"장애" 또는 "질병"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 이용한 처치 (치료)로부터 이득을 얻을 수 있는 모든 질환이다. 이에 만성 및 급성 장애 또는 질병 (포유동물이 문제의 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 질환 포함)이 포함된다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비-제한적 예에는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프계 악성 종양; 신경원성, 신경교성, 성상세포성, 시상하부 및 기타 선상, 대식세포성, 상피성, 간질성 및 포배강성

장애; 및 염증성, 면역학적 및 기타 혈관형성 관련 장애가 포함된다.

- <174> 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 몇몇 비정상적인 세포 증식 정도와 연관되는 장애를 지칭한다. 한 양태에서는, 세포 증식성 장애가 암이다. 한 양태에서는, 세포 증식성 장애가 혈관형성이다.
- <175> 본원에 사용된 바와 같은 "종양"은 악성이든 양성이든지 간에 모든 종양성 세포 성장 및 증식을 지칭하고, 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- <176> 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 증식을 특징으로 하는 포유동물에게서의 생리적 질환을 지칭하거나 기재한다. 암의 예에는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평 세포 암, 폐암 (소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종 포함), 복막암, 간세포암, 위암 (위장암 포함), 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 각종 유형의 두경부암 뿐만 아니라; B-세포 림프종 [저 악성도/소포 비호지킨 림프종 (NHL); 소 림프구성 (SL) NHL; 중간 악성도/소포 NHL; 중간 악성도 확산성 NHL; 고 악성도 면역모세포성 NHL; 고 악성도 림프아구성 NHL; 고 악성도 소 비-절단 세포 NHL; 거대 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종 및 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로블린혈증 포함]; 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프아성 백혈병 (ALL); 모발 세포 백혈병; 만성 골수아구성 백혈병; 및 이식 후 림프증식성 장애 (PTLD) 뿐만 아니라 모반증 (phakomatoses)과 연관된 비정상적인 혈관 증식, 부종 (예를 들어, 뇌 종양과 연관된 부종), 및 메이그스 (Meigs) 증후군이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- <177> 용어 "항종양 조성물" 또는 "항암 조성물" 또는 "항암제"는 한 가지 이상의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암을 치료하는 데에 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제 (항암제)의 예에는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용된 작용제, 항혈관형성제, 세포소멸제, 항투블린제, 및 암을 치료하기 위한 기타 작용제, 예를 들어 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 [예: 티로신 키나제 억제제], HER1/EGFR 억제제 [예: 에를로티니브 (erlotinib) (Tarceva™)], 혈소판 유래 성장 인자 억제제 [예: Gleevec™ (이마티니브 메실레이트)], COX-2 억제제 [예: 셀레코시브 (celecoxib)], 인터페론, 사이토킨, 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들), TRAIL/ Apo2, 및 기타 생활성 및 유기 화합제 등 중의 하나 이상과 결합하는 길항제 (예: 중화 항체)가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 그의 조합물 역시 본 발명에 포함된다.
- <178> "혈관형성성 인자 또는 혈관형성제"는 혈관 발생을 자극하는, 예를 들어 혈관형성, 내피 세포 성장, 혈관 안정성, 및/또는 혈관생성 등을 증진시키는 성장 인자이다. 예를 들어, 혈관형성성 인자에는 VEGF 및 VEGF 계열 구성원, PIGF, PDGF 계열, 섬유아세포 성장 인자 계열 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴: Angiopoietin), 에프린, Del-1, 섬유아세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스타틴 (Follistatin), 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/스캐터 인자 (SF), 인터루킨-8 (IL-8), 렙틴 (Leptin), 미드카인 (Midkine), 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토프린 (Pleiotrophin) (PTN), 프로그래놀린, 프롤리페린, 전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)/혈관 침투성 인자 (VPF) 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 이에에는 또한, 상처 치유를 촉진시켜 주는 인자, 예를 들어 성장 호르몬, 인슐린 유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 표피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 계열 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타가 포함될 수 있다 [참고: 예를 들어, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (e.g., Table 1 listing known angiogenic factors); and, Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)].
- <179> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "VEGF"는 문헌 [참고: Leung et al. *Science*, 246:1306 (1989), and Houck et al. *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)]에 기재된 바와 같이, 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189-, 및 206-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자를 그의 천연 발생적 대립 유전자성 및 프로세싱된 형태와 함께 지칭한다. 용어 "VEGF"는 또한, 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 랫트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 종종, 특이적 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF에 대한 hVEGF 또는 뮤린 VEGF에 대한 mVEGF 등의 용어으로써 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한, 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 절단된 형태를 지칭하기 위해 사용된다. 이러한 모든 형태의

VEGF에 대한 참고는 본원에서, 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF₁₆₅"로써 확인될 수 있다. "절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 절단된 천연 VEGF 중의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한, 천연 VEGF 중의 위치 17 (메티오닌)이다. 절단된 천연 VEGF는 천연 VEGF와 거의 동등한 수준으로 KDR 및 Flt-1 수용체에 대한 결합 친화도를 갖는다. 바람직한 양태에 따르면, VEGF는 인간 VEGF이다.

<180> "VEGF 길항제"는 VEGF 활성화 (이에는 VEGF 또는 하나 이상의 VEGF 수용체 또는 이를 암호화하는 핵산과의 결합성이 포함된다)을 중화, 차단, 억제, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 바람직하게, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 결합한다. VEGF 길항제에는 항-VEGF 항체 및 그의 항원 결합성 단편; VEGF 및 VEGF 수용체와 결합하고 리간드-수용체 상호 작용을 차단시키는 폴리펩티드 (예: 면역부착인자, 펩티도이드); 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예를 들어 VEGF 티로신 키나제의 소분자 억제제; VEGF와 결합하는 앵타머 (aptamer); 및 엄격한 조건 하에서, VEGF 또는 VEGF 수용체를 암호화하는 핵산 서열과 혼성화하는 핵산 (예: RNAi)이 포함된다. 한 가지 바람직한 양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF와 결합하고, 시험관 내에서 VEGF-유도된 내피 세포 증식을 억제시킨다. 한 가지 바람직한 양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 비-VEGF 또는 비-VEGF 수용체 보다 큰 친화도로 결합한다. 한 가지 바람직한 양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 1 μ M 내지 1 pM의 Kd로 결합한다. 또 다른 바람직한 양태에 따르면, VEGF 길항제는 VEGF 또는 VEGF 수용체와 500 nM 내지 1 pM으로 결합한다.

<181> 바람직한 양태에 따르면, VEGF 길항제는 폴리펩티드, 예를 들어 항체, 펩티도이드, 면역부착인자, 소분자 또는 앵타머로 이루어진 군 중에서 선택된다. 바람직한 양태에서, 항체는 항-VEGF 항체, 예를 들어 AVASTIN[®] 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체, 예를 들어 항-VEGFR2 또는 항-VEGFR3 항체이다. VEGF 길항제의 기타 예에는 VEGF-트랩, 무카젠 (Mucagen), PTK787, SU11248, AG-013736, Bay 439006 (소라페니브: sorafenib), ZD-6474, CP632, CP-547632, AZD-2171, CDP-171, SU-14813, CHIR-258, AEE-788, SB786034, BAY579352, CDP-791, EG-3306, GW-786034, RWJ-417975/CT6758 및 KRN-633이 포함된다.

<182> "항-VEGF 항체"는 VEGF와 충분한 친화도와 특이성으로 결합하는 항체이다. 바람직하게, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성화와 관련된 질병이나 질환을 표적으로 하여 이를 방해하는 데에 있어서 치료제로서 사용할 수 있다. 항-VEGF 항체는 통상적으로, 기타 VEGF 상동체, 예를 들어 VEGF-B 또는 VEGF-C와는 결합하지 않을 뿐만 아니라 기타 성장 인자, 예를 들어 PIGF, PDGF 또는 bFGF와도 결합하지 않을 것이다. 바람직한 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프와 결합하는 모노클로날 항체이다. 보다 바람직하게, 항-VEGF 항체는 문헌 [참고: Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]에 따라서 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체인데, 이에는 베바시주마브 (BV; Avastin[®])로서 공지된 항체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 또 다른 양태에 따르면, 사용될 수 있는 항-VEGF 항체에는 WO 2005/012359에 기재된 항체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 한 양태에 따르면, 항-VEGF 항체는 WO 2005/012359의 도 24, 25, 26, 27 및 29에 기재된 항체 중의 어느 하나의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 영역을 포함한다 (예를 들어, G6, G6-23, G6-31, G6-23.1, G6-23.2, B20, B20-4 및 B20.4.1). 또 다른 바람직한 양태에서, 라니비주마브 (ranibizumab)로서 공지된 항-VEGF 항체는 안과 질병, 예를 들어 당뇨병성 망막병증 및 AMD을 위해 투여된 VEGF 길항제이다.

<183> "rhuMab VEGF" 또는 "Avastin[®]"로서 공지되기도 한 항-VEGF 항체 "베바시주마브 (BV)"는 문헌 [참고: Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]에 따라서 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 이는 인간 VEGF가 그의 수용체와 결합하는 것을 차단시키는 무린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원 결합성 상보성 결정 영역과 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역을 포함한다. 대부분의 프레임워크 영역을 포함한, 베바시주마브의 아미노산 서열의 대략 93%가 인간 IgG1로부터 유래되고, 이 서열의 약 7%는 무린 항체 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주마브는 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 기타 항-VEGF 항체에는 미국 특허 제6884879호 및 WO 2005/044853에 기재된 항체가 포함된다.

<184> 항-VEGF 항체 라니비주마브 또는 LUCENTIS[®] 항체 또는 rhuFab V2는 인간화, 친화도 성숙된 항-인간 VEGF Fab 단편이다. 라니비주마브는 에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*) 발현 벡터 및 세균성 발효에 있어서의 표준 재조합 기술 방법에 의해 생성된다. 라니비주마브는 글리코실화되지 않고 분자량이 약 48,000 달톤이다 [참고: WO98/45331 및 US20030190317].

<185> 혈관형성의 조절이상은 비정상적인 혈관형성을 유발시킬 수 있는데, 즉 새로운 혈관이 질병 상태에서 과도하게

또는 부적절하게 (예를 들어, 혈관형성 부위, 시기 또는 발병이 의학적 관점에서 볼 때 바람직하지 못하다) 성장하는 경우, 또는 이로 인해 질병 상태가 유발되는 경우에 일어난다. 과도한, 부적절한 또는 제어되지 않은 혈관형성은 병든 상태를 유발시키거나 병든 상태를 악화시키는 데에 일조하는 새로운 혈관 성장이 있는 경우에 일어난다. 새로운 혈관은 병든 조직에 영양을 공급하고, 정상 조직을 파괴시키며, 암의 경우에는 새로운 혈관이 종양 세포를 순환계 내로 도피시켜 다른 기관에 머무르게 할 수 있다 (종양 전이). 비정상적인 혈관형성과 관련된 질병 상태에는 비-종양성 및 종양성 질환, 예를 들어 암, 특히 혈관화 고형 종양 및 전이성 종양 [결장암, 유방암, 폐암 (특히, 소세포 폐암) 또는 전립선암 포함], 바람직하지 못하거나 이상한 비대증, 관절염, 류마티스성 관절염 (RA), 염증성 장 질환 또는 IBD [크론병 (Crohn's disease) 및 궤양성 결장염], 건선, 건선성 반점, 사르코이드증 (sarcoidosis), 아테롬성 경화증, 아테롬성 경화성 반점, 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 예를 들어 미숙아 망막병증, 후수정체 섬유증식증, 신생혈관성 녹내장, 연령 관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관증식, 각막 이식편 신생혈관증식, 각막 이식편 거부, 망막/용모막 신생혈관증식, 전방각 신생혈관증식 (홍색증), 안과 신생혈관 질환, 혈관성 재발 협착증, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 과형성 [그레이브스병 (Grave's disease) 포함], 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 발작/폐쇄성 두부 손상/외상과 연관된 부종), 활막 염증, 골화성 근육염, 비대성 뼈 형성, 골관절염 (OA), 난치성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3 유체 공간형성 질환 (체장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 근종, 조산, 만성 염증, 예를 들어 IBD, 신 동종이식편 거부, 염증성 장 질환, 신 증후군, 바람직하지 못하거나 이상한 조직 덩어리 성장 (비-암), 혈우병성 관절, 비대성 흉터, 모발 성장 억제, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 화농성 육아종, 후수정체 섬유증식증, 피부 경화증, 트라코마 (trachoma), 혈관 부착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 심낭 삼출 (예를 들어, 심막염과 연관된 삼출), 및 흉막 삼출이 포함된다.

<186> 본원에 사용된 바와 같은 "치료 (치치)"는 치료하고자 하는 개체 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 전이를 예방하고, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차단시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 몇몇 양태에서는, 본 발명의 항체를 사용하여 질병 또는 장애 발생을 지연시킨다.

<187> "유효량"은 필요한 시간 동안 및 투여량에서, 목적하는 치료적 또는 예방적 결과를 달성하는 데에 유효한 양을 지칭한다.

<188> 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 "치료적 유효량"은 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 유도시킬 수 있는 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 능력과 같은 요인들에 따라서 다양할 수 있다. 치료적 유효량은 또한, 본 발명의 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 치료상 이로운 효과가 이러한 물질/분자, 작동제 또는 길항제의 어떠한 독성이나 해로운 효과도 능가하는 양이다. 용어 "치료적 유효량"은 특정 포유동물 (환자)에게서 질병 또는 장애를 "치료"하는 데에 유효한 본 발명의 항체, 폴리펩티드 또는 길항제의 양을 지칭한다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암 세포 수를 감소시키고/시키거나; 종양 크기 또는 중량을 감소시키고/시키거나; 암 세포가 말초 기관 내로 침윤되는 것을 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 전이를 억제 (즉, 어느 정도 느리게 하고, 바람직하게는 중지시킨다)시키고/시키거나; 종양 성장을 어느 정도 억제시키고/시키거나; 암과 연관된 한 가지 이상의 증상을 어느 정도 경감시킬 수 있다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 방지시키고/시키거나 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도까지는 이러한 약물이 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 한 양태에서, 치료적 유효량은 성장 억제량이다. 또 다른 양태에서, 치료적 유효량은 환자의 생존율을 연장시키는 양이다. 또 다른 양태에서, 치료적 유효량은 환자의 질병 진행이 없는 생존율을 개선시켜 주는 양이다.

<189> "예방적 유효량"은 필요한 시간 동안 및 투여량에서, 목적하는 예방적 결과를 달성하는 데에 유효한 양을 지칭한다. 반드시 그런 것은 아니지만 전형적으로, 예방적 용량은 질병이 발생하기에 앞서 또는 질병의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량 보다 적다.

<190> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/하거나 세포의 파괴를 유발시키는 물질을 지칭한다. 이 용어에는 방사성 동위원소 (예: At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토타렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타

삽입제, 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산 분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함), 및 다음에 기재되는 각종 항종양 또는 항암제가 포함된다. 기타 세포독성제가 다음에 기재된다. 살종양제는 종양 세포를 파괴시킨다.

<191>

"화학요법제"는 암을 치료하는 데에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 CYTOXAN[®] 시클로포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리에틸몰로멜라민; 아세토게닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, MARINOL[®]); 베타-라파곤; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 캄프토테신 [합성적으로 유사한 토포테칸 (HYCAMTIN[®]), CPT-11 (이리노테칸, CAMPTOSAR[®]), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함]; 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노베티킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로수레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님무스틴; 항생제, 예를 들어 엔디인 (enediynes) 항생제 [예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (참고: Agnew, *Chem Int'l. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994)); 디네미신 (디네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키르지노스타틴 발색단 및 관련 색단백질 엔디인 항생제 발색단], 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르루이신, ADRIAMYCIN[®] 독소루비신 [모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함], 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예: 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리에트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스타탄, 테스토라톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타탄; 엽산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 쉐토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸 히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (공급처: JHS Natural Products, Eugene, OR); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (ELDISINE[®], FILDESIN[®]); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL[®] 파클리탁셀 (공급처: Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE[™] 파클리탁셀의 크렘포르-무함유의 알부민-공학 처리시킨 나노입자 제형 (공급처: American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), 및 TAXOTERE[®] 독세탁셀 (공급처: Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로란부실; 겐시타빈 (GEMZAR[®]); 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (VELBAN[®]); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (ONCOVIN[®]); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (NAVELBINE[®]); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드 (예: 레티노산); 카페시타빈 (XELODA[®]); 및 상기 언급된 제제의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라

상기 제제의 2가지 이상 병용물, 예를 들어 CHOP (이는 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 병용 요법에 대한 약어이다), 및 FOLFOX (이는 5-FU 및 류코보빈과 병용된 옥살리플라틴 (ELOXATIN™)을 이용한 치료 섭생에 대한 약어이다)이 포함된다. 부가의 화학요법제에는 항체-약물 접합체로서 유용한 세포독성제, 예를 들어 마이탄시노이드 (예: DM1) 및 아우리스타틴, 예를 들어 MMAE 및 MMAF가 포함된다.

<192>

"화학요법제"에는 또한, 암의 성장을 증진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 저하, 차단 또는 억제시키는 작용을 하는 "항호르몬제"가 포함되고, 종종, 전신성 치료 형태이다. 이들은 호르몬 그 자체일 수 있다. 그의 예에는 항에스트로겐제 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM)가 포함되는데, 예를 들어 타목시펜 (NOLVADEX® 타목시펜 포함), EVISTA® 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON® 토레미펜; 항프로게스테론제; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 난소를 저해하거나 난소의 활동을 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 작동제, 예를 들어 LUPRON® 및 ELIGARD® 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 기타 항안드로겐제, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASIN® 엑세메스탄, 포르메스타니에, 파드로졸, RIVISOR® 보로졸, FEMARA® 레트로졸 및 ARIMIDEX® 아나스트로졸이 포함된다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예: BONEFOS® 또는 OSTAC®), DIDROCAL® 에티드로네이트, NE-58095, ZOMETA® 졸레드론산/졸레드로네이트, FOSAMAX® 알렌드로네이트, AREDIA® 파미드로네이트, SKELID® 틸루드로네이트, 또는 ACTONEL® 리세드로네이트; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상한 세포 증식에 밀접한 영향을 미치는 신호 전달 경로에 있어 유전자, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)의 발현을 억제시키는 안티센스 올리고뉴클레오티드; 백신, 예를 들어 THERATOPE® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들면, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신 및 VAXID® 백신; LURTOTECAN® 토포이소머라제 1 억제제; ABARELIX® rmRH; 라파티니브 디토실레이트 (GW572016으로서 공지되기도 한 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 이들의 제약상 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

<193>

본원에 사용된 경우의 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체 내에서 세포 (예를 들어, Robo4를 발현하는 세포)의 성장 및/또는 증식을 억제시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S 상의 Robo4-발현성 세포 비율을 상당히 저하시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예에는 (S 상 이외의 위치에서) 세포 주기 진행을 차단시키는 작용제, 예를 들어 GI 정지와 M-상 정지를 유도시키는 작용제가 포함된다. 전통적인 M-상 차단제에는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 포함된다. GI를 정지시키는 작용제가 또한 S-상 정지로까지 영향을 미치는데, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예를 들면 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토타렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C가 있다. 추가의 정보는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakaini et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13]. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 모두 주목 (yew tree)으로부터 유래된 항암 약물이다. 유립산 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (TAXOTERE®, 공급처: Rhone-Poulenc Rorer)은 파클리탁셀 (TAXOL®, 공급처: Bristol-Myers Squibb)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀과 도세탁셀은 튜불린 (tubulin) 이량체로부터 미소관 (microtubulin)의 어셈블리를 증진시키고, 탈중합을 방지함으로써 미소관을 안정화시켜 세포에서의 유사분열을 억제시킨다.

<194>

"독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 정식 화학 명칭은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-릭소스-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

<195>

III. 항-Robo4 항체

<196>

한 국면에서, 본 발명은 Robo4와 결합하는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 모노클로날 항체이

다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다. 한 양태에서, 항-Robo4 항체는 정제된다.

- <197> 본 발명의 또 다른 국면에서, 항-Robo4 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특정의 양태에서, 항-Robo4 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 특정의 양태에서, 상기 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 본 발명의 또 다른 국면에서, 항-Robo4 항체 또는 항-Robo4 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정의 양태에서, 조성물이, 예를 들어 암, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 증식성 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 건선 및 그의 조합을 포함한 질병 및 장애를 치료하기 위한 제약 제형이다.
- <198> 파아지 라이브러리로부터 유래된 예시되는 모노클로날 항체가 본원에 제공되고 다음 실시예에 기재되어 있다. 이들 항체는 YW71.6, YW71.1, YW71.22, YW71.89, YW79.1, YW79.8, 및 YW79.11로 명명된다. 이들 항체는 친화도 성숙되어 YW71.22.S1.2, YW71.22S1.8, YW71.22S1.16, YW71.22S1.23, YW71.22S1.24, YW71.22S1.27, YW71.22S1.31, YW71.22S1.38, YW71.22S1.77, YW71.22.S2.21, YW71.22.S2.79, YW71.22.H1.2, YW71.22.H1.9, YW71.22.H1.46, YW71.22.H1.77, YW71.22.H1.91, 및 YW71.22.H2.31을 생성한다. 상기 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 서열이 도 1 및 2에 제시되어 있다.
- <199> 본 발명의 항체는 적합한 모든 인간 또는 인간 컨센서스 경쇄 프레임워크 서열을 포함할 수 있는데, 단 상기 항체는 목적하는 생물학적 특징 (예를 들어, 목적하는 결합 친화도)을 나타내야 한다.
- <200> 한 양태에서, 본원에서의 인간 컨센서스 프레임워크는 VH 아군 III (도 4A 및 4B 참고) 및/또는 VL 카파 아군 I (도 3A 및 3B 참고) 컨센서스 프레임워크 서열로부터이거나 이로부터 유래된다.
- <201> 따라서, VH 수용체 인간 프레임워크는 다음 프레임워크 서열 중의 1개, 2개, 3개 또는 4개 모두를 포함할 수 있다:
- <202> EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 13)을 포함하는 FR1,
- <203> WVRQAPGKGLEWV (서열 14)을 포함하는 FR2,
- <204> RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 15)을 포함하는 FR3,
- <205> WGQGTILVTSS (서열 16)을 포함하는 FR4.
- <206> 기타 양태에서, VH 컨센서스 프레임워크에는 다음이 포함된다:
- <207> 인간 VH 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 CDR (서열 111, 112, 113, 16);
- <208> 인간 VH 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 114, 115, 113, 16 또는 서열 114, 115, 116, 16 또는 서열 114, 115, 117, 16);
- <209> 인간 VH 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 CDR (서열 118, 119, 120, 16);
- <210> 인간 VH 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 121, 122, 120, 16 또는 서열 121, 122, 123, 16 또는 서열 121, 122, 124, 16);
- <211> 인간 VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 CDR (서열 125, 126, 127, 16);
- <212> 인간 VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 128, 129, 127, 16 또는 서열 128, 129, 130, 16 또는 서열 128, 129, 131, 16);
- <213> 인간 VH 수용체 1 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 CDR (서열 132, 126, 133, 16);
- <214> 인간 VH 수용체 1 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 128, 129, 133, 16 또는 서열 128, 129, 134, 16);
- <215> 인간 VH 수용체 2 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 CDR (서열 132, 126, 135, 16); 또는
- <216> 인간 VH 수용체 2 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 128, 126, 135, 16 또는 서열 128, 126, 136, 16 또는 서열 128, 126, 137, 16).

- <217> 한 양태에서, VH 수용체 인간 프레임워크 영역 4 (H-FR4)는 WGQGLTVTVSS (서열 45)를 포함한다.
- <218> VL 수용체 인간 프레임워크는 다음 프레임워크 서열 중의 1개, 2개, 3개 또는 4개를 포함할 수 있다:
- <219> DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 9)를 포함하는 FR1,
- <220> WYQQKPGKAPKLLIY (서열 10)를 포함하는 FR2,
- <221> GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (서열 11)를 포함하는 FR3,
- <222> FGQGTKVEIKR (서열 173) 또는 FGQGTKMEIKR (서열 139)를 포함하는 FR4.
- <223> 기타 양태에서, VL 컨센서스 프레임워크에는 다음이 포함된다:
- <224> 인간 VL 카파 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 9, 10, 99, 100);
- <225> 인간 VL 카파 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 9, 101, 99, 100);
- <226> 인간 VL 카파 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 102, 103, 104, 100);
- <227> 인간 VL 카파 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 105, 106, 107, 100); 또는
- <228> 인간 VL 카파 아군 IV 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 108, 109, 110, 100).
- <229> 상기 수용체가 인간 면역글로불린으로부터 유래되든지 아니면 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래되든지 간에, 선별된 인간 프레임워크 서열과 서열상 동일할 수 있긴 하지만, 본 발명은 수용체 서열이 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 비교해서 기존의 아미노산 치환을 포함할 수 있다는 것을 고려한다. 이들 기존의 치환은 바람직하게 최소인데, 통상적으로 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 비교해서 단지 4개, 3개, 2개 또는 1개 아미노산 차이만이다.
- <230> 비-인간 항체의 추가변 영역 잔기가 VL 및/또는 VH 수용체 인간 프레임워크 내로 혼입된다. 예를 들어, 카바트 CDR 잔기, 초티아 추가변 루프 잔기, Abm 잔기, 및/또는 접촉 잔기에 상응하는 잔기를 혼입시킬 수 있다. 임의로, 다음과 같은 연장된 추가변 영역 잔기가 혼입된다: 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3).
- <231> 추가변 영역 잔기의 "혼입"이 본원에 논의되어 있긴 하지만, 이는 각종 방식으로 달성할 수 있다는 것을 인지해야 하는데, 예를 들어 목적하는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산은 마우스 가변 도메인 서열을 암호화하는 핵산을 돌연변이시켜 그의 프레임워크 잔기가 수용체 인간 프레임워크 잔기로 변화하도록 함으로써 생성시킬 수 있거나, 인간 가변 도메인 서열을 암호화하는 핵산을 돌연변이시켜 추가변 도메인 잔기가 비-인간 잔기로 변화하도록 함으로써 생성시킬 수 있거나, 또는 목적하는 서열을 암호화하는 핵산을 합성함으로써 생성시킬 수 있다.
- <232> 본원의 실시예에서, 추가변 영역-이식된 변이체는 각 추가변 영역에 대한 별개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 인간 수용체 서열을 암호화하는 핵산을 쿤켈 (Kunkel) 돌연변이 유발시키으로써 생성시켰다 [참고: Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)]. 적당한 추가변 영역-항원 상호 작용을 교정하고 재정립하기 위한 통상적인 기술을 사용하여, 적당한 변화를 프레임워크 및/또는 추가변 영역 내에 도입시킬 수 있다.
- <233> **A. 항체 단편**
- <234> 본 발명은 항체 단편을 포괄한다. 항체 단편은 전통적인 방식, 예를 들어 효소적 분해, 또는 재조합 기술에 의해 생성시킬 수 있다. 특정 상황 하에서는 완전한 항체 보다는 오히려 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편은 신속한 청소를 허용해 주고, 고형 종양에 대한 접근을 증진시킬 수 있다. 특정의 항체 단편에 관한 고찰은 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134].
- <235> 항체 단편을 생성시키기 위한 각종 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 본래의 항체를 단백질 분해적 절단시킴으로써 유래되었다 [참고: 예를 들어, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)]. 그러나, 이들 단편은 현재, 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성시킬 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현하여 이로부터 분비될 수 있으므로, 이들 단편의 대량 생산이 용이해진다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파아지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 또 다른 한편, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 이를 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성시킬 수 있다 [참고: Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167

(1992)]. 또 다른 접근법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 분리시킬 수 있다. 재이용 수용체 결합성 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편을 생성시키기 위한 기타 기술은 전문의에게 명백할 것이다. 특정의 양태에서는 항체가 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다 [참조: WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 미국 특허 제5,587,458호]. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 본래의 결합 부위를 갖는 유일한 종이므로, 이들은 생체내 사용 동안 비특이적 결합 감소를 위해 적합하다. scFv 용합 단백질을 구축하여 scFv의 아미노 말단 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 용합을 산출시킬 수 있다 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 참고]. 항체 단편은 예를 들어, 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일-특이적 또는 이중-특이적일 수 있다.

<236> B. 인간화 항체

<237> 본 발명은 인간화 항체를 포괄한다. 비-인간 항체를 인간화시키기 위한 각종 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입(import)" 잔기로서 지칭되는데, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 필수적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 대체함으로써, 다음 문헌의 방법에 따라서 수행할 수 있다 [참고: Winter and co-workers (Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science*, 239:1534-1536]. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 본래의 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 키메라 항체 [참고: 미국 특허 제4,816,567호]이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 몇몇 초가변 영역 잔기와 가능하게는 몇몇 FR 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다.

<238> 인간화 항체를 제조하는데 사용될, 경쇄 및 중쇄의 인간 가변 도메인의 선택이 항원성을 저하시키는 데에 있어서 중요할 수 있다. 소위 "최량 적합(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 허용한다 [참고: Sims et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901]. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크를 여러 개의 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 [참고: 예를 들어, Carter et al. (1992) *PNAS USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623].

<239> 항원에 대한 높은 친화도와 기타 바람직한 생물학적 특성을 유지하고 있는 항체로 인간화시키는 것이 추가로 일반적으로 요망된다. 이를 달성하기 위한 한 가지 방법에 따르면, 모 서열과 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열과 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 번역글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업자에게 널리 알려져 있다. 선별된 후보 번역글로불린 서열의 추정상의 3차원적 입체 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램도 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 번역글로불린 서열의 기능에 있어 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있는데, 즉 후보 번역글로불린이 그의 항원과 결합할 수 있는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별하고, 이를 수용자로부터 유입 서열과 합하여, 목적하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도를 달성하도록 한다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합성에 영향을 미치는 데에 있어 직접적이면서도 가장 실제로도 관여한다.

<240> 몇몇 양태에서, 본 발명은 인간화되는 항체를 제공하는데, 이로써 HAMA 반응이 저하되거나 제거된다. HAMA 반응의 저하 또는 제거는 적합한 치료제의 임상 개발에 있어 유의적인 국면이다 [참고: 예를 들어, Khazzaeli et al., *J. Natl. Cancer Inst.* (1988), 80:937; Jaffers et al., *Transplantation* (1986), 41:572; Shawler et al., *J. Immunol.* (1985), 135:1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.* (1984), 3:138; Miller et al., *Blood* (1983), 62:988; Hakimi et al., *J. Immunol.* (1991), 147:1352; Reichmann et al., *Nature* (1988), 332:323; Junghans et al., *Cancer Res.* (1990), 50:1495]. 이들 항체의 변이체는 당해 분야에 공지된 통상적인 방법 (이들 중의 몇몇이 다음에 추가로 기재되어 있다)을 사용하여 추가로 수득할 수 있다.

<241> 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체로부터의 아미노산 서열은 프레임워크 및/또는 초가변 서열(들)의 다양화를 위한 출발 (모) 서열로서 제공될 수 있다. 출발 초가변 서열이 연결되는 선별된 프레임워크 서열이 본원에서 수용체 인간 프레임워크로서 지칭된다. 수용체 인간 프레임워크가 인간 번역글로불린 (그의 VL 및/또는

VH 영역)으로부터이거나 이로부터 유래되긴 하지만, 바람직하게 수용체 인간 프레임워크는 인간 컨센서스 프레임워크 서열로부터이거나 이로부터 유래되는데, 프레임워크 그 자체는 인간 환자에게서 면역원성을 최소한도로 나타내거나 전혀 나타내지 않은 것으로 입증되었다.

<242> 수용체가 인간 면역글로불린으로부터 유래되는 경우에는, 공여자 프레임워크 서열을 인간 프레임워크 서열의 집합에서 각종 인간 프레임워크 서열과 정렬시킴으로써 공여자 프레임워크 서열과의 그의 상동성에 기준하여 선별되는 인간 프레임워크 서열을 임의로 선별하고, 수용체로서 대부분의 상동성 프레임워크 서열을 선별할 수 있다.

<243> C. 인간 항체

<244> 본 발명의 인간 항체는 인간-유래된 파아지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 언급된 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 함함으로써 구축할 수 있다. 또 다른 한편, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종-골수종 세포주가, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991)].

<245> 면역시 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 완전한 레퍼토리의 인간 항체를 생성시킬 수 있는 트랜스제닉 동물 (예: 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식 계열 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자의 동형접합성 결실로 인해, 내인성 항체 생성이 완전히 억제되는 것으로 보고되었다. 이러한 생식 계열 돌연변이체 마우스 내로 인간 생식 계열 면역글로불린 유전자 어레이를 전이시키면, 항원 시험감염시 인간 항체가 생성될 것이다 [참고: 예를 들어, Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)].

<246> 유전자 서플링을 또한 사용하여 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체로부터 인간 항체를 유도시킬 수 있는데, 이러한 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도와 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅 (imprinting)"으로 지칭되기도 하는 상기 방법에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 파아지 디스플레이 기술에 의해 수득된 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체시키면, 비-인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라 집단이 창출된다. 항원을 이용하여 선별하면 비-인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되고, 여기서 인간 쇄는 일차 파아지 디스플레이 클론 내의 상응하는 비-인간 쇄의 제거시 파괴된 항원 결합 부위가 복원되는데, 즉 에피토프가 인간 쇄 파트너의 선택을 좌우한다 (영향을 미친다). 나머지 비-인간 쇄를 대체시키기 위해 상기 공정을 반복하는 경우, 인간 항체가 수득된다 [참고: 1993년 4월 1일자로 공개된 PCT WO 93/06213]. CDR 이식화에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 전혀 없는 완전한 인간 항체를 제공해 준다.

<247> D. 항체 변이체

<248> 몇몇 양태에서는, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 요망될 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 내로 적당한 변화를 도입하거나, 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형에는, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환이 포함된다. 모든 결실, 삽입 및 치환 조합을 만들어 최종 구조물에 도달시키는데, 단 이러한 최종 구조물은 목적하는 특성을 보유하고 있어야 한다. 아미노산 변경은 대상 항체 아미노산 서열이 만들어지는 시점에 이러한 서열 내에 도입할 수 있다.

<249> 돌연변이 유발을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 데에 유용한 방법은 문헌 [참고: Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085]에 기재된 바와 같은 소위 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이다. 여기서는 특정 잔기, 또는 표적 잔기 군을 확인하고 (예를 들어, arg, asp, his, lys, 및 glu 등의 전하를 띤 잔기), 이를 중성 또는 음전하를 띤 아미노산 (예: 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체시켜, 상기 아미노산과 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이어서, 이러한 치환물에 대한 기능적 민감도를 입증하는 아미노산 위치는 치환 부위에 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 정련시킨다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되긴 하였지만, 돌연변이 자체의 특성이 예정될 필요는 없다. 예를 들어, 소

정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 면역글로불린을 대상으로 하여 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

- <250> 아미노산 서열 삽입물에는 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물 뿐만 아니라 1개 잔기에서부터 수 백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 길이의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합물이 포함된다. 말단 삽입물의 예에는 N-말단 메티오닐 잔기를 수반한 항체가 포함된다. 항체 분자의 기타 삽입형 변이체에는 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 융합물 (예를 들어, ADEPT), 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합물이 포함된다.
- <251> 특정의 양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 항체가 글리코실화되는 정도로 증가 또는 감소시키도록 변경시킨다. 항체의 글리코실화는 전형적으로, N-연결 또는 O-연결된다. N-연결된이란 탄수화물 부분을 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시킨 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이다)은 탄수화물 부분을 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 어느 하나가 폴리펩티드에 존재하는 것은 잠재적 글리코실화 부위를 창출시켜 준다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나를 히드록시 아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.
- <252> 글리코실화 부위를 항체에 부가하거나 결실시키는 것은 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우에는) 상기 언급된 트리펩티드 서열 중의 하나 이상을 창출시키거나 제거하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수행된다. 이러한 변경은 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래의 항체 서열에 부가하거나, 결실시키거나 또는 이들 잔기에 의해 치환시킴으로써 만들 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- <253> 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에는, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 전형적으로, Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297의 N-연쇄에 의해 일반적으로 부착되는 분지된 이분지의 올리고당류를 포함한다 [참고: 예를 들어, Wright et al. (1997) *TIBTECH* 15:26-32]. 이러한 올리고당류에는 각종 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 이분지 올리고당류 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스가 포함될 수 있다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고당류의 변형은 특정의 개선된 특성을 지닌 항체 변이체를 창출시키기 위해 이루어질 수 있다.
- <254> 예를 들어, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 지닌 항체 변이체가 제공된다. 이러한 변이체는 개선된 ADCC 기능을 지닐 수 있다 [참고: 예를 들어, 미국 공개특허공보 제US 2003/0157108호 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)]. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍성" 항체 변이체에 관한 공개공보의 예에는 다음 문헌이 포함된다 [참고: 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)]. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예에는 단백질 푸코실화에 있어 결핍성인 Lec13 CHO 세포 [참고: Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); 미국 공개특허공보 US 2003/0157108 A1, Presta, L; 및 WO 2004/056312 A1, Adams et al., 특히 실시예 11], 및 녹아웃 (knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 [참고: 예를 들어, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); 및 WO2003/085107]가 포함된다.
- <255> 이등분된 올리고당류를 수반한 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이분지의 올리고당류가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 저하된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean- Mairet et al.); 미국 특허 제 6,602,684호 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당류 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.
- <256> 특정 양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 추가로 개선시켜 주는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 수반한 Fc 영역을 포함한다. 이러한 치환은 상기 언급된 모든 변이와 조합해서 일어날 수 있다.

<257>

특정 양태에서, 본 발명은 모든 효과기 기능은 아니지만, 몇몇 효과기 기능을 보유하고 있으므로, 생체 내에서의 항체의 반감기가 중요하긴 하지만 특정의 효과기 기능 (예: 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. 특정 양태에서는, 항체의 Fc 활성을 측정하여, 단지 목적하는 특성 만이 유지되도록 한다. 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 저하/고갈을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행하여, 항체에게 Fc γ R 결합성은 결여되지만 (이로써 ADCC 활성이 결여되는 것으로 추정됨), FcRn 결합 능력은 보유하도록 할 수 있다. ADCC를 매개하는 데에 있어 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면, 단구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [참고: Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예가 미국 특허 제5,500,362호 [참고: 예를 들어, Hellstrom, I., et al. *PNAS USA* 83:7059-7063 (1986)) and Hellstrom, I et al., *PNAS USA* 82: 1499-1502 (1985)]; 제5,821,337호 [참고: Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166: 1351-1361 (1987)]에 기재되어 있다. 또 다른 한편, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 [참고: 예를 들어, 유동 계수법을 위한 ACTI™ 비-방사성 세포독성 검정 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); 및 CytoTox 96® 비-방사성 세포독성 검정 (Promega, Madison, WI)]. 이러한 검정에 유용한 효과기 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 또 다른 한편 또는 부가적으로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [참고: Clynes et al. *PNAS USA* 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. Clq 결합 검정을 또한 수행하여 항체가 Clq와 결합할 수 없으므로 CDC 활성이 결여된다는 사실을 확인할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정을 수행할 수 있다 [참고: 예를 들어, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003); and Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)]. FcRn 결합성 및 생체내 청소/반감기 결정은 또한, 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다 [참고: 예를 들어, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)].

<258>

하나 이상의 아미노산 치환물을 갖는 기타 항체 변이체가 제공된다. 치환형 돌연변이 유발을 위한 관심있는 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변형물도 또한 고려된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환물"이란 표제 하에 표 1에 나타나 있다. 표 1에서 "예시 치환물"로 명명되거나 아미노산 부류와 관련하여 다음에 추가로 기재되는 바와 같은 보다 실제적인 변화를 도입한다. 아미노산 치환물을 관심있는 항체 내로 도입하고, 생성물을 대상으로 하여, 예를 들어 목적 활성, 예를 들면 개선된 항원 결합성, 저하된 면역원성, 개선된 ADCC 또는 CDC 등에 관하여 스크리닝할 수 있다.

표 1

본래의 잔기	예시 치환물	바람직한 치환물
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; 노르루이신	Leu
Leu (L)	노르루이신; 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; 노르루이신	Leu

<259>

<260>

항체의 생물학적 특성 면에 있어서의 변형은 (a) 예를 들어, 시트 또는 나선 입체 형태로서의, 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조에 영향을 미치거나, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성에 영향을 미치거나, 또는 (c) 측쇄의 벌크에 영향을 미치는 치환을 선택함으로써 달성할 수 있다. 아미노산은 그들의 측쇄 특성 면에서의 유사성에 따라서 분류될 수 있다 [참고: A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]:

<261>

(1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

<262>

(2) 전하를 띠지 않은 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

<263>

(3) 산성: Asp (D), Glu (E)

<264>

(4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

<265>

또 다른 한편, 천연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 나눌 수 있다:

<266>

(1) 소수성: 노르루이신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

<267>

(2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

<268>

(3) 산성: Asp, Glu;

<269>

(4) 염기성: His, Lys, Arg;

<270>

(5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

<271>

(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

<272>

비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류의 구성원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기는 보존적 치환 부위, 또는 나머지 (비-보존적) 부위 내로 도입할 수도 있다.

<273>

한 가지 유형의 치환형 변이체는 모 항체 (예: 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환

시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 이로써 생성된 추가의 개발을 위해 선택된 변이체(들)는, 이들을 생성시킨 모 항체와 비교해서 변형된 (예를 들어, 개선된) 생물학적 특성을 지닐 것이다. 예시되는 치환형 변이체는 친화도 성숙된 항체이고, 이는 파아지 디스플레이에 의거한 친화 돌연변이 기술을 사용하여 편리하게 생성시킬 수 있다. 간략하게 언급하면, 몇 가지 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환을 생성시킨다. 이로써 생성된 항체를, 각 입자 내에 패키징된 파아지 외피 단백질 (예: M13의 유전자 III 생성물)의 적어도 일부에 대한 융합물로서 섬유상 파아지 입자로부터 디스플레이한다. 이어서, 이와 같이 파아지-디스플레이된 변이체를 대상으로 하여, 그들의 생물학적 활성 (예: 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형시키기 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 스캐닝 돌연변이 유발 (예: 알려진 스캐닝)을 수행하여 항원 결합성에 상당히 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 간의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이와 이웃하는 잔기는 본원에서 상세히 설명된 기술을 포함한, 당해 분야에 공지된 기술에 따라서 치환시키기 위한 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 대상으로 하여 본원에 기재된 기술을 포함한, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 지닌 변이체를 추가 개발을 위해 선별할 수 있다.

<274> 항체의 아미노산 서열 변이체를 암호화하는 핵산 분자는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 제조한다. 이들 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 방법 (천연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 항체의 비-변이체 버전을 올리고뉴클레오타이드-매개된 (또는 부위-지시된) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발시킴으로써 제조하는 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<275> 본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입함으로써, Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 요망될 수 있다. 이러한 Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인을 포함한 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 변형 (예: 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예: 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

<276> 본 명세서와 당해 분야의 교시에 따라서, 몇몇 양태에서는 본 발명의 항체가 야생형 대응물 항체와 비교해서, 예를 들어 Fc 영역에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 항체는 그들의 야생형 대응물과 비교해서 치료적 유용성을 위해 요구되는 바와 실질적으로 동일한 특징을 보유할 것이다. 예를 들어, 특정의 변형이 Fc 영역에서 이루어져, 예를 들어 W099/51642에 기재된 바와 같이 Clq 결합성 및/또는 보체 의존적 세포독성 (CDC)이 변경될 수 있을 것이다 (즉, 개선되거나 저하됨). Fc 영역 변이체의 기타 예에 관해서는 또한 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 미국 특허 제5,648,260호; 미국 특허 제5,624,821호; 및 W094/29351]. W000/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 개선되거나 저하된 결합성을 나타내는 항체 변이체가 기재되어 있다 (이들 특허공개공보의 전문이 본원에 참고로 구체적으로 도입되어 있다) [참고: Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)]. 모계 IgG를 태아에게 전이시키는 데에 책임이 있는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) [참고: Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)]에 대한 개선된 결합성과 증가된 반감기를 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합성을 개선시켜 주는 하나 이상의 치환물을 내부에 수반한 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열과 증가되거나 감소된 Clq 결합 능력을 지닌 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 제6,194,551B1호, W099/51642에 기재되어 있다. (이들 특허공개공보의 전문이 본원에 참고 문헌으로 구체적으로 도입되어 있다) [참고: Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)].

<277> 또 다른 국면에서, 본 발명은 Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 계면 내에서의 변형을 포함하는 항체를 제공하는데, 이러한 변형은 이중-이량체화를 촉진시키고/시키거나 증진시켜 준다. 이들 변형은 용기를 제1 Fc 폴리펩티드 내로 도입하고, 공동을 제2 Fc 폴리펩티드 내로 도입하는 것을 포함하는데, 이러한 용기는 제1 Fc 폴리펩티드와 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체 형성을 증진시키도록 공동 내에 위치 가능하다. 이들 변형을 수반한 항체의 생성 방법은 당해 분야에 공지되어 있는데, 예를 들어 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 바와 같다.

<278> 또 다른 국면에서, 항체의 하나 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 대체시킨, 시스테인 공학 처리시킨 항체, 예를 들어 "티오MAB" 및 "티오Fab"를 창출시키는 것이 요망될 수 있다. 특별한 양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 위치에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써, 반응성 티올기가 항체의 접근 가능한 위치에 위치 설정하고, 이를 사용하여 항체를 본원에 추가로 기재되는 바와 같은 기타 부분, 예를 들어 약물 부분 또는 링커-약물 부분에 접합시킬 수 있다. 특정의 양태에서, 다음 잔기 중의 하나 이상을 시스테인으로 치환시킬 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400

(EU 넘버링). 바람직한 양태에서, 시스템을 중쇄의 A118 (EU 넘버링)로 치환시킨다. 시스템인 공학 처리시킨 티오Mab 및 티오Fab은 다음에 추가로 상세히 후술되는 바와 같다.

<279> E. 항체 유도체

<280> 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지되어 있고 용이하게 입수 가능한 부가의 비단백질성 부분을 함유하도록 추가로 변형시킬 수 있다. 바람직하게, 항체를 유도체화하는 데에 적합한 부분은 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적 예에는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈) 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예: 글리세롤), 폴리비닐 알코올, 및 그들의 혼합물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 수중 안정성으로 인해 제조하는 데에 있어 이점을 지닐 수 있다. 중합체는 어떠한 분자량일 수도 있고, 분지되거나 분지되지 않을 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 1개 초과인 중합체가 부착되는 경우에는, 이들이 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용된 중합체의 수 및/또는 유형은 항체 유도체가 규정된 조건 하의 요법에 사용되든지 아니든지 간에, 개선시키고자 하는 항체의 특별한 특성이나 기능 등을 고려하여 결정할 수 있다.

<281> 또 다른 양태에서, 방사선에 대한 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 부분과 항체의 접합체가 제공된다. 한 양태에서, 비단백질성 부분은 탄소 나노튜브이다 [참고: Kam et al., *PNAS USA* 102:11600-11605 (2005)]. 방사선은 어떠한 파장일 수 있으며, 이에는 통상의 세포에 해가 되지 않지만, 항체-비단백질성 부분에 매우 근접한 세포를 사멸시키는 온도로 비단백질성 부분을 가열시키는 파장이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

<282> IV. 항체의 제조 방법

<283> A. 파아지-유래된 항체의 생성

<284> 본 발명의 항체는 문헌 [참고: Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93]에 기재된 바와 같은 파아지(미드) 디스플레이 기술에 의해 제조할 수 있다. 파아지(미드) 디스플레이는 표적 분자와 고 친화도로 결합하는 서열에 대해 신속하게 분류할 수 있는 단백질 변이체의 대형 라이브러리를 생성시켜 준다. 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 일반적으로, 바이러스성 외피 단백질, 예를 들어 유전자 III 단백질 또는 유전자 VIII 단백질을 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨다. 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 유전자 III 단백질의 일부를 암호화하는 핵산 서열과 융합시킨 1가 파아지미드 디스플레이 시스템을 개발하였다 [참고: Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)]. 1가 파아지미드 디스플레이 시스템에서는, 유전자 융합물이 저 수준으로 발현되고, 야생형 유전자 III 단백질이 또한 발현되어 입자의 감염성이 유지된다. 펩티드 라이브러리의 생성 방법 및 이들 라이브러리의 스크리닝 방법이 많은 특허에 보고되었다 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,723,286호, 미국 특허 제5,432,018호, 미국 특허 제5,580,717호, 미국 특허 제5,427,908호 및 미국 특허 제5,498,530호].

<285> 항체 또는 항원 결합성 폴리펩티드의 라이브러리를 수 많은 방식으로 제조하였는데, 이에는 무작위 DNA 서열을 삽입함으로써 단일 유전자를 변경시키는 방법 또는 관련 유전자 계열을 클로닝하는 방법이 포함된다. 파아지(미드) 디스플레이를 이용하여 항체 또는 항원 결합성 단백을 디스플레이하는 방법이 미국 특허 제5,750,373호, 제5,733,743호, 제5,837,242호, 제5,969,108호, 제6,172,197호, 제5,580,717호, 및 제5,658,727호에 보고되었다. 이어서, 상기 라이브러리를 대상으로 하여 목적하는 특징을 지닌 항체 또는 항원 결합성 단백질의 발현에 관하여 스크리닝한다.

<286> 선택된 아미노산을 주형 핵산으로 치환시키는 방법은 당해 분야에 널리 정립되어 있는데, 이들 중의 몇 가지가 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 쿤켈 방법을 사용하여 초가변 영역 잔기를 치환시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)].

<287> 올리고뉴클레오타이드의 서열에는 변경시키고자 하는 초가변 영역 잔기에 대해 설계된 코돈 세트 중의 하나 이상이 포함된다. 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 암호화하기 위해 사용되어 온 상이한 뉴클레오타이드 삼중자 서열 세트이다. 코돈 세트는 IUB 코드에 따라서 다음에 제시된 바와 같은 특별한 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 등물 혼합물을 지정하기 위한 부호를 사용하여 나타낼 수 있다.

- <288> IUB 코드
- <289> G 구아닌
- <290> A 아데닌
- <291> T 티민
- <292> C 시토신
- <293> R (A 또는 G)
- <294> Y (C 또는 T)
- <295> M (A 또는 C)
- <296> K (G 또는 T)
- <297> S (C 또는 G)
- <298> W (A 또는 T)
- <299> H (A 또는 C 또는 T)
- <300> B (C 또는 G 또는 T)
- <301> V (A 또는 C 또는 G)
- <302> D (A 또는 G 또는 T) H
- <303> N (A 또는 C 또는 G 또는 T).
- <304> 예를 들어, 코돈 세트 DVK에서, D는 뉴클레오티드 A 또는 G 또는 T일 수 있고; V는 A 또는 G 또는 C일 수 있으며; K는 G 또는 T일 수 있다. 이러한 코돈 세트는 18개의 상이한 코돈을 제시할 수 있고 아미노산 Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, 및 Cys을 암호화할 수 있다.
- <305> 표준 방법을 사용하여 올리고뉴클레오티드 또는 프라이머 세트를 합성할 수 있다. 코돈 세트에 의해 제공되고 목적하는 아미노산 군을 암호화할 뉴클레오티드 삼중자의 가능한 모든 조합을 나타내는 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드 세트는, 예를 들어 고체 상 합성에 의해 합성할 수 있다. 특정 위치에서 선별된 뉴클레오티드 "축퇴 (degeneracy)"을 수반한 올리고뉴클레오티드의 합성은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 특정의 코돈 세트를 갖는 뉴클레오티드 세트는 시판용 핵산 합성기 [공급처: 예를 들어, Applied Biosystems, Foster City, CA]를 사용하여 합성할 수 있거나 또는 상업적으로 수득할 수 있다 [공급처: 예를 들어, Life Technologies, Rockville, MD]. 따라서, 특별한 코돈 세트를 갖는 합성된 올리고뉴클레오티드 세트는 전형적으로, 상이한 서열을 갖는 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는데, 그 차이는 전반적인 서열 내의 코돈 세트에 의해 정립된다. 본 발명에 따라서 사용된 바와 같은 올리고뉴클레오티드는 가변 도메인 핵산 주형과 혼성화시켜 주는 서열을 갖고 있고 클로닝 목적을 위한 제한 효소 부위를 포함할 수도 있다.
- <306> 한 가지 방법에서, 변이체 아미노산을 암호화하는 핵산 서열은 올리고뉴클레오티드-매개된 돌연변이 유발에 의해 창출시킬 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [참고: Zoller et al., *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504 (1987)]에 기재된 바와 같이 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 간략하게 설명하면, 변이체 아미노산을 암호화하는 핵산 서열은 목적하는 코돈 세트를 암호화하는 올리고뉴클레오티드 세트를 DNA 주형과 혼성화시킴으로써 창출시키는데, 이러한 주형은 가변 영역 핵산 주형 서열을 함유하는 단일 가닥 형태의 플라스미드이다. 혼성화한 후, DNA 폴리머라제를 사용하여 주형의 전체 제2 상보성 가닥을 합성함으로써, 이를 올리고뉴클레오티드 프라이머 내로 혼입시키고 올리고뉴클레오티드 세트에 의해 제공된 바와 같은 코돈 세트를 함유할 것이다.
- <307> 일반적으로, 길이가 25개 이상의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 최적의 올리고뉴클레오티드는 12 내지 15개 뉴클레오티드를 가질 것인데, 이는 돌연변이물(들)을 암호화하는 뉴클레오티드(들)의 어느 한 측면 상의 주형에 완전히 상보적이다. 이로써, 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 DNA 주형 분자와 적절하게 혼성화될 것이다. 올리고뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 기술, 예를 들어 문헌 [참고: Crea et al., *PNAS USA*, 75:5765 (1978)]에 기재된 바와 같은 기술을 사용하여 용이하게 합성한다.
- <308> DNA 주형은 박테리오파지 M13 벡터 (시판용 M13mp18 및 M13mp19 벡터가 적합하다)로부터 유래된 벡터 또는 문

현 [참고: Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987)]에 의해 기재된 바와 같은 단일 가닥 파아지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이시키고자 하는 DNA를 이들 벡터 중의 하나 내로 삽입하여 단일 가닥 주형을 생성시킬 수 있다. 단일 가닥 주형의 생성은 상기 삼브룩 (Sambrook) 등의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.

<309> 천연 DNA 서열을 변경시키기 위하여, 올리고뉴클레오타이드를 적합한 혼성화 조건 하에 단일 가닥 주형과 혼성화시킨다. 이어서, DNA 중합화 효소, 통상적으로 T7 DNA 폴리머라제 또는 DNA 폴리머라제 I의 클레노우 (Klenow) 단편을 가하여, 합성을 위한 프라이머로서 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 주형의 상보성 가닥을 합성한다. 이로써, 이중-이중체 분자가 형성되므로 DNA의 하나의 가닥은 유전자 1의 돌연변이된 형태를 암호화하고, 다른 가닥 (본래의 주형)은 유전자 1의 천연의 변경되지 않은 서열을 암호화한다. 이어서, 이러한 이중-이중체 분자를 적합한 숙주 세포, 통상적으로 원핵생물, 예를 들어 이. 콜라이 JM101 내로 형질전환시킨다. 세포를 성장시킨 후, 이를 아가로스 판 상으로 도말하고 32-포스페이트로 방사성 표지시킨 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 스크리닝하여 돌연변이된 DNA를 함유하는 세균성 집락을 확인한다.

<310> 바로 위에 언급된 방법을 변형시켜 플라스미드의 양 가닥이 돌연변이물(들)을 함유하는 동중-이중체 분자를 창출시킬 수 있다. 이러한 변형은 다음과 같다: 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 상기 언급된 바와 같은 단일 가닥 주형과 어닐링시킨다. 3개의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보아데노신 (dATP), 데옥시리보구아노신 (dGTP), 및 데옥시리보티미딘 (dTTP)의 혼합물을 변형된 티오데옥시리보시토신 [dCTP-(aS) (공급처: Amersham)]과 합한다. 이 혼합물을 주형-올리고뉴클레오타이드 복합체에 가한다. 이 혼합물에 DNA 폴리머라제를 부가하면, 돌연변이된 염기를 제외하고는 주형과 동일한 DNA 가닥이 생성된다. 또한, 이러한 새로운 DNA 가닥은 dCTP 대신 dCTP-(aS)를 함유할 것인데, 이는 제한 엔도뉴클레아제 분해되지 못하게 하는 작용을 한다. 이중 가닥 이중-이중체의 주형 가닥을 적당한 제한 효소로 틸을 낸 후, 주형 가닥을 돌연변이 유발시키고자 하는 부위(들)를 함유하는 영역을 지나 ExoIII 뉴클레아제 또는 또 다른 적당한 뉴클레아제로 분해시킬 수 있다. 이어서, 상기 반응을 중단하여 단지 부분적으로만 단일 가닥인 분자를 남겨 둔다. 그 다음, 4가지 모든 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, ATP 및 DNA 리가제의 존재 하에 DNA 폴리머라제를 사용하여, 완전한 이중 가닥 DNA 동중-이중체를 형성시킨다. 이어서, 이러한 동중-이중체 분자를 적합한 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있다.

<311> 앞서 나타낸 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 세트의 서열은 주형 핵산과 혼성화하기에 충분한 길이이고, 반드시 아니지만 제한 부위를 함유할 수도 있다. DNA 주형은 박테리오파아지 M13 벡터로부터 유래된 벡터 또는 문헌 [참고: Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987)]에 의해 기재된 바와 같은 단일 가닥 파아지 복제 기점을 함유하는 벡터에 의해 생성된다. 따라서, 돌연변이시키고자 하는 DNA를 이들 벡터 중의 하나 내로 삽입하여 단일 가닥 주형을 생성시켜야 한다. 단일 가닥 주형의 생성은 상기 삼브룩 (Sambrook) 등의 섹션 4.21-4.41에 기재되어 있다.

<312> 또 다른 방법에 따르면, 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트를 제공함으로써 라이브러리를 생성시킬 수 있는데, 각 세트는 상이한 서열을 갖는 복수 개의 올리고뉴클레오타이드를 갖고 있고, 그 차이는 올리고뉴클레오타이드 서열 내에 제공된 코돈 세트에 의해 정립된다. 상류 및 하류 올리고뉴클레오타이드 세트를 가변 도메인 주형 핵산 서열과 함께 폴리머라제 연쇄 반응에 사용하여 PCR 생성물의 "라이브러리"를 생성시킬 수 있다. 이러한 PCR 생성물은 "핵산 카세트"로서 지칭될 수 있는데, 이는 정립된 분자 생물학 기술을 사용하여 상기 생성물이 기타 관련되거나 무관한 핵산 서열, 예를 들어 바이러스성 외피 단백질 및 이량체화 도메인과 융합시킬 수 있기 때문이다.

<313> PCR 프라이머의 서열에는 추가변 영역 내의 용매 접근 가능하고 고도로 다양한 위치에 대해 설계된 코돈 세트 중의 하나 이상이 포함된다. 상기 언급된 바와 같이, 코돈 세트는 목적하는 변이체 아미노산을 암호화하기 위해 사용되어 온 상이한 뉴클레오타이드 삼중자 서열 세트이다.

<314> 적당한 스크리닝/선별 단계를 통하여 선별된 바와 같은, 목적하는 기준을 충족시켜 주는 항체 선별제는 표준 재조합 기술을 사용하여 단리 및 클로닝할 수 있다.

<315> 한 국면에서, HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 서열은 아미노산을 특별한 위치에서 일정하게 유지시키고 기타 위치에서는 아미노산을 다양하게 함으로써 변화시킨다.

<316> 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:

<317> (i) 서열 1의 서열을 포함하는 HVR-L1;

- <318> (ii) 서열 2의 서열을 포함하는 HVR-L2;
- <319> (iii) 서열 3의 서열을 포함하는 HVR-L3.
- <320> 서열 1, 2 및 3의 아미노산 서열은 도 1A (각각 위치 24-34, 50-56, 및 89-97) 및 2A (각각 위치 24-34, 50-56, 및 89-97)에 표시된 바와 같이 개별적 HVR (즉, L1, L2, 또는 L3)과 관련하여 넘버링되는데, 이러한 넘버링은 다음에 기재되는 바와 같은 카바트 넘버링 시스템과 일관된다.
- <321> 한 국면에서, 본 발명은 다음 중의 1개 이상, 2개 이상, 또는 3개 모두를 포함하는 항체를 제공한다:
- <322> (i) 서열 4의 서열을 포함하는 HVR-H1;
- <323> (ii) 서열 5의 서열을 포함하는 HVR-H2;
- <324> (iii) 서열 6의 서열을 포함하는 HVR-H3.
- <325> 서열 4, 5 및 6의 아미노산 서열은 도 1B (각각 위치 26-35, 49-65, 및 93-102) 및 2B (각각 위치 26-35, 49-65, 및 93-102)에 표시된 바와 같이 개별적 HVR (즉, H1, H2, 또는 H3)과 관련하여 넘버링되는데, 이러한 넘버링은 다음에 기재되는 바와 같은 카바트 넘버링 시스템과 일관된다.
- <326> 한 국면에서, 본 발명은 도 1A 및 2A에 도시된 바와 같은 경쇄 HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다.
- <327> 한 국면에서, 본 발명은 1B 및 2B에 도시된 바와 같은 중쇄 HVR 서열을 포함하는 항체를 제공한다.
- <328> 본 발명의 항체의 몇몇 양태는 다음 서열 98에 제시된 바와 같이 인간화 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN[®] 항-HER2 항체; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 and Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93]의 경쇄 가변 도메인을 포함한다:
- 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열: 98)
- <329>
- <330> (HVR 잔기가 밀줄쳐져 있다)
- <331> 한 양태에서, huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 서열은 위치 30, 66 및 91 (각각 상기 진한/이탤릭체로 표시된 바와 같은 Asn, Arg 및 His) 중의 하나 이상에서 변형시킨다. 한 양태에서, 이와 같이 변형된 huMAb4D5-8 서열은 위치 30에 Ser, 위치 66에 Gly 및/또는 위치 91에 Ser를 포함한다. 따라서, 한 양태에서 본 발명의 항체는 다음 서열 167에 제시된 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다:
- 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열:167)
- <332>
- <333> (HVR 잔기가 밀줄쳐져 있다)
- <334> huMAb4D5-8과 관련하여 치환된 잔기는 상기 진한/이탤릭체로 표시된다.
- <335> 본 발명의 항체는 적합한 모든 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있는데, 단 Robo4에 대한 결합 활성은 실질적으로 유지되어야 하는데, 예를 들어 본원에 기재된 본 발명의 항체와 비교해서 1% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 100% 이상의 결합 활성이 실질적으로 유지되어야 한다. 예를 들어, 몇몇 양태에서 본 발명의 항체는 인간 아군 III 중쇄 프레임

워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및 78에 서의 치환을 포함한다. 이들 항체의 몇몇 양태에서, 위치 71은 A이고, 73은 T이고/이거나 78은 A이다. 한 양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호, 및 Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5):1073-93 (2004)]의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 양태에서, 이들 항체는 인간 κ I 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 한 양태에서, 이들 항체는 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-8의 경쇄 HVR 서열을 포함한다. 한 양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®] 항-HER2 항체; 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) [참고: 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,821,337호, 및 Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5):1073-93 (2004)]의 경쇄 가변 도메인 서열 (서열 98 또는 167)을 포함한다.

<336> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 다음에 제공된 바와 같은 huMAb4D5-8 경쇄 및 중쇄의 프레임워크 영역 서열을 포함할 수 있다 [서열 9, 10, 168, 12 (경쇄) 및 서열 13, 14, 15, 16 (중쇄)]. 위첨자에 진하게 나타낸 숫자는 카바트에 따르는 아미노산 위치를 표시한다.

<337> huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 :9)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 :10)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 :168)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 :12)

<338>

<339> huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 :13)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 :14)

HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg⁸³ Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 :15)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 :16)

<340>

<341> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 다음에 제공된 바와 같은 huMAb4D5-8 경쇄 및 중쇄의 변형된/변이체 프레임워크 영역 서열을 포함할 수 있다 [서열 9, 10, 11, 12 (경쇄) 및 서열 13, 14, 15, 16 (중쇄)]. 위첨자에 진하게 나타낸 숫자는 카바트에 따르는 아미노산 위치를 표시한다.

<342> 위치 66에서 변형된 (밑줄침) huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 :9)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 :10)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 :11)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 :12)

<343>

<344> 위치 71, 73 및 78에서 변형된 (밑줄침) huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 :13)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 :14)

HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
Asn^{82a} Ser^{82b} Leu^{82c} Arg⁸³ Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 :15)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 :16)

<345> 한 양태에서, 본 발명의 항체는 목적하는 표적 결합 친화도를 획득하기 위하여 친화도 성숙시킨다. 한 예에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 다음과 같은 경쇄의 아미노산 위치에서의 치환을 포함한다. 한 양태에서, 변이체 HVR-L1 A1-A11 (카바트 위치 24-34)는 다음 위치의 모든 조합으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환을 갖는 RASQDVSTAVA (서열 1)이다: A6 (G), A7 (A), A8 (R 또는 I), A9 (S 또는 Y), 및 A10 (L). 한 양태에서, 변이체 HVR-L2 B1-B7 (카바트 위치 50-56)은 다음 위치의 모든 조합으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환을 갖는 SASFLYS (서열 2)이다: B3 (T), B4 (L, N 또는 T), B5 (E 또는 A), B6 (A 또는 S), 및 B7 (Y 또는 결실). 한 양태에서, 변이체 HVR-L3 C1-C9 (카바트 위치 89-97)는 다음 위치의 모든 조합으로 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 치환을 갖는 QQSYTPPT (서열 3)이다: C3 (P, T, F, 또는 G), C4 (F, R, 또는 N), C5 (A, S, D, F, H, N, V, 또는 G), C6 (A, D, N, L, I, M, Y, 또는 G), C7 (L, H, 또는 T), 및 C8 (A, M, F, 또는 S).

<347> 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 다음과 같은 중쇄의 아미노산 위치에서의 치환을 포함한다. 한 양태에서, 변이체 HVR-H1 D1-D10 (카바트 위치 26-35)는 다음 위치의 모든 조합으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환을 갖는 GFTINGYYIH (서열 17)이다: D3 (S), D4 (L), D5 (Y, D, 또는 K), D9 (F, L 또는 N), 및 D10 (E 또는 Q). 한 양태에서, 변이체 HVR-H2 E1-E18 (카바트 위치 49-65)은 다음 위치의 모든 조합으로 1, 2, 3, 4 또는 5개 치환을 갖는 GFITYPAGGDTDYADSVKG (서열 18)이다: E2 (R), E5 (S), E7 (L), E9 (H, K, A, 또는 V), 및 E11 (A, E 또는 I). 한 양태에서, HVR-H3 F1-F18 (카바트 위치 93-102)는 ARLIGNKFGWSSYG*MDY (서열 19)인데, 여기서 아미노산 서열 내의 "*"은 위치 F15, 카바트 위치 100에서의 결실을 표시한다.

<348> 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2A에 도시된 1개, 2개 또는 3개의 HVR (L1, L2, 및/또는 L3)을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2B에 도시된 1개, 2개 또는 3개의 HVR (H1, H2, 및/또는 H3)을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2A 및 2B에 도시된 HVR 중에서 선택된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 모든 HVR을 포함한다.

<349> 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2A에 도시된 서열의 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2B에 도시된 서열의 중쇄 가변 영역 서열을 포함한다.

<350> 한 양태에서, 본 발명의 친화도 성숙된 항체는 도 2A에 도시된 경쇄 가변 영역 서열 (프레임워크 서열 및 HVR 서열을 포함함) 및 도 2B에 도시된 상응하는 항체의 중쇄 가변 영역 서열 (프레임워크 서열 및 HVR 서열을 포함함)을 포함한다.

<351> 한 국면에서, 본 발명은 Robo4와의 결합을 놓고 상기 언급된 항체와 경쟁하는 항체를 제공한다. 한 국면에서, 본 발명은 상기 언급된 항체와 동일한 Robo4 상의 에피토프와 결합하는 항체를 제공한다.

<352> B. 하이브리도마에 의거한 방법

<353> 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌 [참고: Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 최초로 기재되고, 인간-인간 하이브리도마에 관한 문헌 [참고: Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), and Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)]에 추가로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 만들 수도 있다. 부가의 방법에는, 예를 들어 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 천연 IgM 항체의 생성에 관한 미국 특허 제 7,189,826호에 기재된 방법이 포함된다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) and Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)]. 기타 하이브리도마 기술은, 예를 들어 US 2006/258841; US 2006/183887 (완전한 인간 항체), US 2006/059575; US

2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 및 미국 특허 제7,078,492호 및 제7,153,507호를 참고할 수 있다.

<354> C. 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

<355> 항체는 재조합 방법을 사용하여 생성시킬 수도 있다. 예를 들어, 항-Robo4 항체를 재조합 생성하기 위해, 이러한 항체를 암호화하는 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 상기 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 증쇄와 경쇄를 암호화하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리하고 서열 분석할 수 있다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터 성분에는 일반적으로, 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

<356> 1. 신호 서열 성분

<357> 본 발명의 항체는 직접적으로 뿐만 아니라 이중 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 기타 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생성될 수 있다. 선별된 이중 신호 서열은 바람직하게는, 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 원핵성 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정한 엔테로톡신 II 리더로 이루어진 군 중에서 선택된 원핵성 신호 서열로 대체시킨다. 효모 분비의 경우에는, 천연 신호 서열을, 예를 들어 효모 전효소 리더, α 인자 리더 [삭카로마이세스 (*Saccharomyces*) 및 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) α -인자 리더 포함], 산-포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 문헌 [참고: WO 90/13646]에 기재된 신호로 대체시킬 수 있다. 포유동물 세포 발현에서는, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호를 이용할 수 있다.

<358> 2. 복제 기점

<359> 발현 벡터와 클로닝 벡터 둘 다는 이러한 벡터가 하나 이상의 선별된 숙주 세포에서 복제될 수 있게 해주는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서는 상기 서열이 벡터가 숙주 염색체성 DNA와는 독립적으로 복제할 수 있게 해주는 것이고, 이에는 복제 기점 또는 자기 복제 서열이 포함된다. 이러한 서열은 각종 세균, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 세균에 적합하고, 2 μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 각종 바이러스성 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)는 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 필요치 않다 (SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 이는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다).

<360> 3. 선별 유전자 성분

<361> 발현 및 클로닝 벡터는 선별성 마커로 명명되기도 하는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어 앰피실린, 네오마이신, 메토포렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여해주는 단백질; (b) 영양요구성 결핍증을 보충해주는 단백질; 또는 (c) 복합 배지로부터 입수 가능하지 않은 중요한 영양분, 예를 들어 바실루스 (*Bacillus*)에 대한 D-알라닌 라세마제를 암호화하는 유전자를 공급해 주는 단백질을 암호화한다.

<362> 선별 도식의 한 가지 예는 숙주 세포의 성장을 중지시키기 위한 약물을 활용한다. 이중 유전자를 이용하여 성공적으로 형질전환시킨 세포는 약물 내성을 부여해 주는 단백질을 생산하므로, 선별 섭생에서 살아 남는다. 이러한 우성 선별의 예들은 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.

<363> 포유동물 세포에 적합한 선별성 마커의 또 다른 예는 항체-암호화 핵산을 흡수하기에 적합한 세포를 확인시켜 줄 수 있는 것인데, 예를 들면 DHFR, 글루타민 신데타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카복실라제 등이 있다.

<364> 예를 들어, DHFR 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토포렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, DHFR 유전자를 기타 모든 공동-형질전환된 핵산과 함께 증폭된다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예: ATCC CRL-9096)을 사용할 수 있다.

- <365> 또 다른 한편, GS 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 설포시딘 (Mtx)을 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, GS 유전자를 기타 모든 공동-형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선별/증폭 시스템을 상기 언급된 DHFR 선별/증폭 시스템과 병용해서 사용할 수 있다.
- <366> 또 다른 한편, 관심있는 항체, 야생형 DHFR 유전자, 및 또 다른 선별성 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 암호화하는 DNA 서열로 형질전환시켰거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선별성 마커, 예를 들어 아미노글리코시드성 항생제 (예: 카나마이신, 네오마이신 또는 G418)에 대한 선별제를 함유하는 배지에서 세포 증식시킴으로써 선별할 수 있다 [참고: 미국 특허 제4,965,199호].
- <367> 효모에 사용하기 적합한 선별 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 [참고: Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)]. 이러한 *trp1* 유전자는 트립토판에서 성장할 수 있는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선별 마커를 제공한다 [참고: Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)]. 이때, 효모 숙주 세포 계능 내에 *trp1* 병변이 존재한다는 것은 트립토판 부재 하의 성장에 의한 형질전환을 검출하는 데에 유효한 환경을 제공해준다. 유사하게, *Leu2*-결핍성 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하고 있는 공지된 플라스미드에 의해 보충된다.
- <368> 또한, 1.6 μ m 환상 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터를 클루이베로마이세스 효모의 형질전환을 위해 사용할 수 있다. 또 다른 한편, 재조합 송아지 카이모신 (chymosin)을 대규모로 생성하기 위한 발현 시스템이 케이. 락티스 (*K. lactis*)에 대해 보고되었다 [참고: Van den Berg, *Bio/Technology* 8:135 (1990)]. 클루이베로마이세스의 산업용 균주에 의해 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민을 분비시키는 데에 안정적인 다중-카피 발현 벡터가 또한 보고되었다 [참고: Fleer et al., *Bio/Technology* 9: 968-975 (1991)].
- <369> **4. 프로모터 성분**
- <370> 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체를 암호화하는 핵산에 작동적으로 연결되는 프로모터를 함유한다. 원핵성 숙주를 이용한 경우에 사용하기 적합한 프로모터에는 *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스포타제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 *tac* 프로모터가 포함된다. 그러나, 기타 공지된 세균성 프로모터도 적합하다. 세균성 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한, 항체를 암호화하는 DNA에 작동적으로 연결된 샤인-달가르노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.
- <371> 진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 사실상 모든 진핵성 유전자가, 전사가 개시되는 부위로부터의 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시 부위로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견된 또 다른 서열은 CNCAAT 영역인데, 여기서 N은 모든 뉴클레오타이드일 수 있다. 대부분의 진핵성 유전자의 3' 말단에는 AATAAA 서열이 존재하는데, 이는 폴리 A 미부 (tail)를 암호화 서열의 3' 말단에 부가하기 위한 신호일 수 있다. 이들 서열 모두는 진핵성 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.
- <372> 효모 숙주를 이용한 경우에 사용하기 적합한 프로모터 서열의 예에는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 기타 당분해 효소, 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카복실라제, 포스포프럭토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 무타제, 피루베이트 키나제, 트리오포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터가 포함된다.
- <373> 성장 조건에 의해 제어된 전사의 부가 이점을 지니고 있는 유도성 프로모터인 기타 효모 프로모터는 알코올 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스포타제, 질소 대사와 연관된 분해성 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 활용에 책임이 있는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 있어 사용하기 적합한 벡터 및 프로모터가 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 효모 인헨서가 또한 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.
- <374> 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류포크스 (fowlpox) 바이러스, 아데노바이러스 (예: 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 등의 바이러스 계능으로부터 수득한 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 악틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 및 열-속 프로모터에 의해 제어될 수 있는데, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 화합성이어야 한다.

<375> SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 함유하기도 하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토크로마리 바이러스의 즉발형 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 벡터로서 소 유두종 바이러스를 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템이 미국 특허 제4,419,446호에 기재되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 제4,601,978에 기재되어 있다. 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982)]. 또 다른 한편, 라우스 (Rous) 육종 바이러스 장-말단 반복 서열을 프로모터로서 사용할 수 있다.

<376> 5. 인헨서 요소 성분

<377> 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 암호화하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입 함으로써 증가된다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자로부터 공지되어 있다 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린). 그러나, 전형적으로는, 진핵성 세포 바이러스로부터의 인헨서가 사용될 것이다. 이의 예에는 복제 기점의 후기 측면 (bp 100-270) 상의 SV40 인헨서, 시토크로마리 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 후기 측면 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서가 포함된다. 진핵성 프로모터 활성화를 위한 증강 요소에 관해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)]. 인헨서는 항체 암호화 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 분할될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.

<378> 6. 전사 종결 성분

<379> 진핵성 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 기타 다세포 유기체로부터의 핵형성 세포)에 사용된 발현 벡터는 또한, 전사를 종결시키고 mRNA를 안정화시키는데 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵성 또는 바이러스성 DNA 또는 cDNA의 비해독 영역의 5' 말단, 및 종종 3' 말단으로부터 통상 이용 가능하다. 이들 영역은 항체를 암호화하는 mRNA의 비해독 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다. 한 가지 유용한 전사 종결 성분은 소의 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다 [참고: WO 1994/11026; 및 이에 기재된 발현 벡터].

<380> 7. 숙주 세포의 선별 및 형질전환

<381> 본원 내의 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하는 데에 적합한 숙주 세포는 상기 언급된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물에는 유박테리아 (*eubacteria*), 예를 들어, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들면, 엔테로박테리아세아 (*Enterobacteriaceae*), 예를 들어 에스케리차 (*Escherichia*), 예를 들면, 이. 콜라이 (*E. coli*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 에르위니아 (*Erwinia*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 살모넬라 (*Salmonella*), 예를 들면, 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 (*Serratia*), 예를 들면, 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*), 및 쉬겔라 (*Shigella*) 뿐만 아니라 바실루스 (*Bacillus*), 예를 들어 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스 (*B. licheniformis*) (예: 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710에 기재된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 예를 들면, 피. 에루기노사 (*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)가 포함된다. 한 가지 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 기타 균주, 예를 들어 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이들 예는 제한적이기 보다는 예시적이다.

<382> 완전한 길이의 항체, 항체 융합 단백질, 및 항체 단편은 특히 글리코실화 및 Fc 효과기 기능이 필요하지 않은 경우, 예를 들어 치료적 항체를 그 자체만으로도 종양 세포 파괴에 있어서 유효한 세포독성제 (예: 독소)와 결합시킨 경우에 세균에서 생성시킬 수 있다. 완전한 길이의 항체는 순환시 반감기가 더 크다. 이. 콜라이에서의 생성은 보다 신속하고 비용면에서 보다 효율적이다. 세균에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 제5,648,237호 (Carter et al.), 미국 특허 제5,789,199호 (Joly et al.), 미국 특허 제5,840,523호 (Simmons et al.)를 참고할 수 있는데, 이에는 발현과 분비를 최적화하기 위한 신호 서열 및 해독 개시 영역 (TIR)이 기재되어 있다. 문헌 [참고: Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254]에는 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있다. 발현 후, 항체를 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 단리시킬 수 있고, 예를 들어 이소형에 따라서 단백질 A 또는 G 칼럼을 통하여 정제할 수 있다. 최종 정제는, 예를 들어 CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하기 위한 공정과 유사하게 수행할 수 있다.

- <383> 원핵생물 이외에도, 진핵성 미생물, 예를 들어 섬유상 진균 또는 효모가 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 삭카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상의 빵 효모가 하등 진핵성 숙주 미생물 중에 가장 흔히 사용되는 것이다. 그러나, 수 많은 기타 속, 종 및 균주가 통상적으로 입수 가능하고 본원에 유용한데, 예를 들면 시조삭카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어 케이. 락티스 (*K. lactis*), 케이. 프라질리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이 (*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906), 케이. 더모톨레란스 (*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레에시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*); 쉬와니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 쉬와니오마이세스 옥시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*); 및 섬유상 진균, 예를 들어 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실룸 (*Penicillium*), 톨리포클라둠 (*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (*A. nidulans*) 및 에이. 니거 (*A. niger*)가 있다. 치료적 단백질을 생성하기 위하여 효모 및 섬유상 진균을 사용하는 것에 관한 논의 고찰은 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)].
- <384> 글리코실화 경로를 "인간화"시킴으로써, 부분적으로 또는 완전한 인간 글리코실화 패턴을 지닌 항체를 생성시키는 특성의 진균 및 효모 균주를 선별할 수 있다 [참고: 예를 들어, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (피치아 파스토리스에서의 글리코실화 경로의 인간화가 기재되어 있다); 및 Gerngross et al., 상기 참고].
- <385> 글리코실화 항체를 발현하기에 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 유기체 (척추 동물 및 무척추 동물)로부터 유래된다. 무척추 동물 세포의 예에는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 수 많은 바쿨로바이러스성 균주 및 변이체, 및 숙주, 예를 들어 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (모충: caterpillar), 애데스 애깅티 (*Aedes aegypti*) (모기: mosquito), 애데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르 (*Drosophila melanogaster*) (초파리: fruitfly), 및 봄빅스 모리 (*Bombyx mori*)로부터의 상용하는 증식 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염시키기 위한 각종 바이러스성 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 입수 가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따르는 바이러스로서 사용할 수 있다.
- <386> 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아 (petunia), 토마토, 개구리밥 (duckweed) [렘나세아 (*Lemnaceae*)], 알파파 [엠펜. 트룬카툴라 (*M. truncatula*)] 및 담배의 식물 세포 배양물을 숙주로서 활용할 수도 있다 [참고: 미국 특허 제5,959,177호, 제6,040,498호, 제6,420,548호, 제7,125,978호 및 제6,417,429호 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생성시키기 위한 PLANTIBODIES™ 기술이 기재되어 있다)].
- <387> 척추동물 세포를 숙주로서 사용할 수 있고, 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것이 (조직 배양) 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 현탁 배양 하에 성장하도록 서브클로닝된 인간 배아 신장주 293 세포 [참고: Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)]; 유아 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 [TM4; 참고: Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)]; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카산 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개의 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [참고: Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 주 (Hep G2)이다. 기타 유용한 포유동물 숙주 세포주에는 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포 [DHFR⁻ CHO 세포 (참고: Urlaub et al., *PNAS USA* 77:4216 (1980)) 포함]; 및 골수종 세포주, 예를 들어 NSO 및 Sp2/0가 포함된다. 항체 생성에 적합한 특성의 포유동물 숙주 세포주에 관한 고찰은 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: 예를 들어, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268].
- <388> 숙주 세포를 항체 생성을 위해 상기 언급된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 암호화하는 유전자를 증폭시키기에 적당한 바 대로 변형시킨 통

상적인 영양 배지에서 배양한다.

8. 숙주 세포 배양

본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 숙주 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지, 예를 들면 햄스 (Ham's) F10 (공급처: Sigma), 최소 필수 배지 [(MEM); 공급처: Sigma], RPMI-1640 (공급처: Sigma), 및 둘백코 변형 이글 배지 [(DMEM); 공급처: Sigma]가 상기 숙주 세포를 배양하는 데에 적합하다. 또한, 다음 문헌에 기재된 배지 중의 어떠한 것도 숙주 세포에 대한 배양 배지로서 사용할 수 있다 [참고: Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979); Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980); 미국 특허 제4,767,704호; 제 4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 제(제)30,985호]. 이들 배지 모두는 필요에 따라, 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예: 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예: 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예: HEPES), 뉴클레오티드 (예: 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예: GENTAMYCIN™ 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가 에너지원으로 보충시킬 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

9. 항체의 정제

제조할 기술을 사용하는 경우, 항체를 주변세포질 공간에서 세포내적으로 생성시킬 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비할 수 있다. 항체가 세포내적으로 생성되는 경우에는, 제1 단계로서 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미세 잔해물을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [참고: Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 주변세포질 공간 내로 분비되는 항체를 분리하는 과정이 기재되어 있다. 간략하게 언급하면, 세포 페이스트를 약 30분에 걸쳐 나트륨 아세테이트 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 해동시킨다. 세포 잔해물을 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에는, 이러한 발현 시스템으로부터의 상등액을 먼저 일반적으로, 시판용 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 전술된 단계들 중의 어느 단계에 포함시켜 단백질 분해를 억제시킬 수 있고, 항생제를 포함시켜 우발적 오염물의 성장을 방지시킬 수 있다.

세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중의 하나이다. 단백질 A가 친화도 리간드로서 적합한지의 여부는 항체에 존재하는 모든 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질을 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 의거하여 항체를 정제할 수 있다 [참고: Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소형과 인간 $\gamma 3$ 에 권장된다 [참고: Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)]. 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔히는 아가로스지만, 기타 매트릭스도 이용 가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스, 예를 들어 제어 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 이용하여 달성된 것 보다 더 신속한 유속 및 보다 짧은 처리 시간을 허용해 준다. 항체가 C₃ 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 (Bakerbond) ABX™ 수지 (공급처: J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제에 유용하다. 단백질을 정제하기 위한 기타 기술, 예를 들어 이온 교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예: 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토분획 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전을, 회수하고자 하는 항체에 따라서 이용하기도 한다.

모든 예비 정제 단계(들) 후, 관심있는 항체와 오염물을 포함하는 혼합물을 대상으로 하여 pH 약 2.5 내지 4.5, 바람직하게는 저염 농도 (예: 약 0 내지 0.25 M 염)에서 용출 완충제를 사용하여 저 pH 소수성 상호 작용 크로마토그래피할 수 있다.

일반적으로, 조사, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하는 각종 방법론이 당해 분야에 널리 정립되고 있고, 이는 상기 언급된 방법론과 일치하고/하거나 관심있는 특별한 항체에 대해 당업자에게 인지되는 바와 같다.

V. 면역접합체

본 발명은 또한, 하나 이상의 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예: 세균, 진균,

식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)와 접합된 본 발명의 항-Robo4 항체를 포함하는 면역접합체 (이는 상호 교환적으로, "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로서 지칭된다)를 제공한다. 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 마이탄시노이드, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 지닌 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에 고려된다.

<398> 특정의 양태에서, 면역접합체는 항-Robo4 항체와 화학요법제 또는 기타 독소를 포함한다. 면역접합체를 생성시키는 데에 유용한 화학요법제는 본원에 기재되어 있다 (예를 들어, 상기에 기재됨). 효소적 활성 독소 및 그의 단편을 사용할 수도 있고, 이는 본원에 기재되어 있다.

<399> 특정의 양태에서, 면역접합체는 항-Robo4 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 마이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 세포독성 활성을 지닌 이들 약물의 유도체 등의 소분자 약물을 포함한다. 이러한 면역접합체의 예는 다음에 추가로 상세히 기재되어 있다.

<400> A. 예시되는 면역접합체

<401> 본 발명의 면역접합체 [또는 "항체-약물 접합체" ("ADC")]는 다음 화학식 I일 수 있는데, 여기서 항-Robo4 항체를 임의의 링커 (L)를 통하여 하나 이상의 약물 부분 (D)과 접합 (즉, 공유 결합에 의해 부착)시킨다:

화학식 I

<402> Ab-(L-D)_p

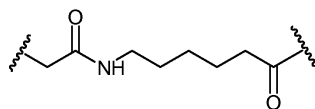
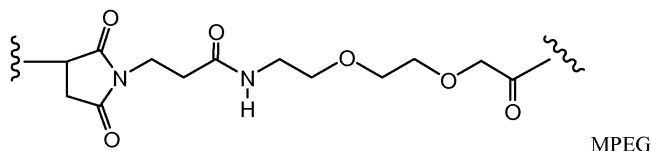
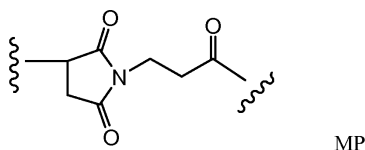
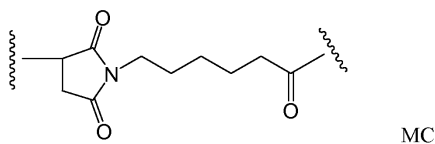
<403> 따라서, 항-Robo4 항체는 약물과 직접적으로 또는 링커를 통하여 접합시킬 수 있다. 화학식 I에서, p는 항체당 약물 부분의 평균 수이고, 이는 예를 들어, 항체당 약 1 내지 약 20개 약물 부분일 수 있고, 특정 양태에서는 항체당 1 내지 약 8개 약물 부분일 수 있다.

<404> B. 예시되는 링커

<405> 예시되는 링커 및 약물 부분이 본원 및 미국 공개특허공보 제20050238649 A1호; 제20050276812 A1호; 및 제20070092940 A1호에 기재되어 있다. 링커는 하나 이상의 링커 성분을 포함할 수 있다. 예시되는 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카보닐 ("PAB"), N-석신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카복실레이트 ("SMCC"), 및 N-석신이미딜 (4-요오도아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB"), N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) [참고: 예를 들어, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)], N-석신이미딜 4-(2-피리딜디티오) 부타노에이트 (SPDB) [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,563,304호], N-석신이미딜 4-메틸-4-[2-(5-니트로피리딜)-디티오] 펜타노에이트 (SMNP), 및 폴리에틸렌 글리콜 유도체, 메톡시-폴리에틸렌 옥사이드 (mPEO)가 포함된다. 각종 링커 성분이 당해 분야에 공지되어 있고, 이들 중의 몇몇이 다음에 기재된다.

<406> 링커는 세포에서 약물의 방출을 촉진시켜 주는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정한 링커 (예: 히드라존), 프로테아제-민감성 (예: 펩티다제-민감성) 링커, 광불안정한 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드 함유 링커 [참고: Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992); 미국 특허 제5,208,020호]를 사용할 수 있다.

<407> 몇몇 양태에서, 링커 성분은 항체를 또 다른 링커 성분이나 약물 부분에 연결시켜 주는 "신장기 단위 (stretcher unit)"를 포함할 수 있다. 예시되는 신장기 단위는 다음에 제시된다 (여기서, 파선은 항체, 또 다른 링커 성분 또는 약물 부분에 대한 공유적 부착 부위를 표시한다):



<408>

<409>

몇몇 양태에서, 링커 성분은 아미노산 단위를 포함할 수 있다. 이러한 하나의 양태에서, 아미노산 단위는 프로테아제에 의한 링커의 절단을 허용해줌으로써, 세포내 프로테아제, 예를 들어 라이소솜성 효소에 대한 노출시면역접합체로부터 약물의 방출을 촉진시켜 준다 [참고: 예를 들어, Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784]. 예시되는 아미노산 단위체는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 및 펜타펩티드가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예시되는 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-리신 (fk 또는 phe-lys); 또는 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit)이 포함된다. 예시되는 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 단위는 천연적으로 발생하는 아미노산 잔기 뿐만 아니라 소수 아미노산 및 비-천연적으로 발생하는 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함할 수 있다. 아미노산 단위는 특별한 효소, 예를 들어 종양 관련 프로테아제, 카텝신 (cathepsin) B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그들의 선택성 측면에서 설계 및 최적화할 수 있다.

<410>

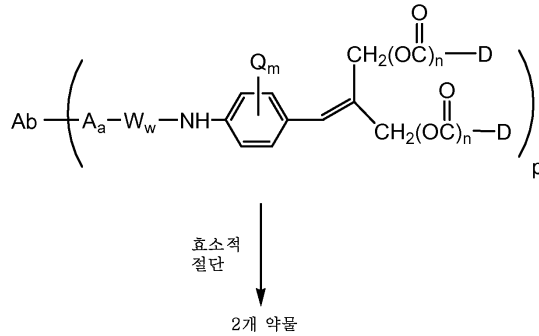
몇몇 양태에서, 링커 성분은 항체를 약물 부분에 직접적으로 또는 신장기 단위 및/또는 아미노산 단위를 통하여 연결시켜 주는 "스페이서" 단위를 포함할 수 있다. 스페이서 단위는 "자가 희생성 (self-immolative)" 또는 "비-자가 희생성"일 수 있다. "비-자가 희생성" 스페이서 단위는 스페이서 단위의 일부 또는 전부가 ADC의 효소적 (예: 단백질 분해적) 절단시 약물 부분과 결합된 채로 있는 것이다. 비-자가 희생성 스페이서 단위의 예에는 글리신 스페이서 단위 및 글리신-글리신 스페이서 단위가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 서열-특이적 효소적 절단에 대해 감수성인 펩티드성 스페이서의 기타 조합이 또한 고려된다. 예를 들어, 글리신-글리신 스페이서 단위를 함유하는 ADC를 종양 세포 관련 프로테아제에 의해 효소적 절단시키면 ADC의 나머지 부분으로부터 글리신-글리신-약물 부분이 방출될 것이다. 이러한 한 가지 양태에서, 글리신-글리신-약물 부분을 대상으로 하여 종양 세포에서 별개의 가수분해 단계를 수행함으로써, 약물 부분으로부터 글리신-글리신 스페이서 단위를 절단시킨다.

<411>

"자가 희생성" 스페이서 단위는 별도의 가수분해 단계 없이도 약물 부분을 방출시켜 준다. 특정의 양태에서, 링커의 스페이서 단위는 p-아미노벤질 단위를 포함한다. 이러한 한 양태에서, p-아미노벤질 알코올을 아미드 결합을 통하여 아미노산 단위에 부착시키고, 벤질 알코올과 세포독성제 간에 카바메이트, 메틸카바메이트 또는 카보네이트를 만든다 [참고: 예를 들어, Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103]. 한 양태에서, 스페이서 단위는 p-아미노벤질옥시카보닐 (PAB)이다. 특정의 양태에서, p-아미노 벤질 단위의 페닐렌 부분은 Qm [여기서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이다]으로 치환시킨다. 자가 희생성 스페이서 단위의 예에는 p-아미노벤질 알코올과 전기적으로 유사한 방향족 화합물 [참고: 예를 들어, US 2005/0256030 A1], 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 [참고: Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237] 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈이 추

가로 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 아마이드 결합 가수분해시 폐환 반응을 진행하는 스페이서, 예를 들어 치환된 및 치환되지 않은 4-아미노부티르산 아마이드 [참고: Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223]; 적당하게 치환된 바이시클로[2.2.1] 및 바이시클로[2.2.2] 환 시스템 [참고: Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc, 1972, 94, 5815]; 및 2-아미노페닐프로피온산 아마이드 [참고: Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867]을 사용할 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환되는 아민 함유 약물의 제거 [참고: Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447]가 또한, ADC에 유용한 자가 희생성 스페이서의 예이다.

<412> 한 양태에서, 스페이서 단위는 다음에 제시된 바와 같은 분지된 비스(히드록시메틸)스티렌 (BHMS) 단위인데, 이를 사용하여 다중 약물을 혼입 및 방출시킬 수 있다:



<413>

<414> 상기에서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0 내지 4의 정수이며; n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 약 20의 범위이다.

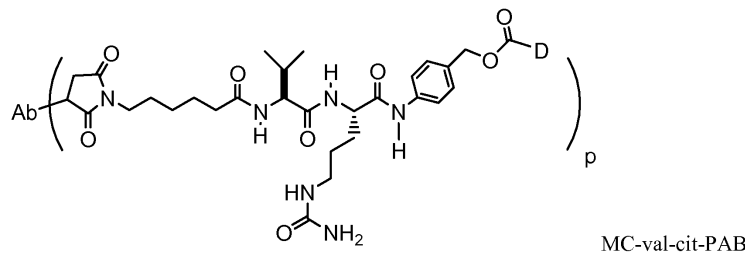
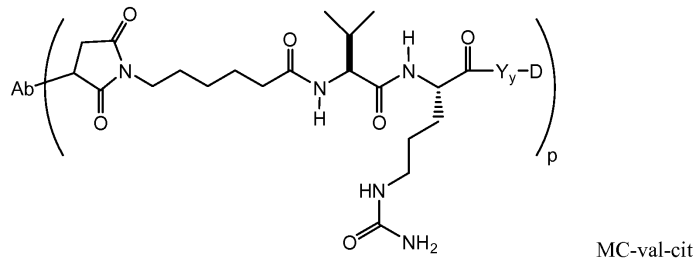
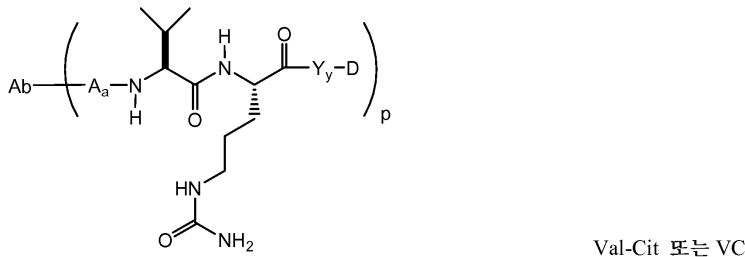
<415> 링커는 하나 이상의 상기 링커 성분을 포함할 수 있다. 특정의 양태에서, 링커는 다음 화학식 II의 ADC에서 각 괄호 ([])에 제시된 바와 같다:

화학식 II

<416> Ab-([Aa-Ww-Yy]-D)_p

<417> 상기에서, A는 신장기 단위이고, a는 0 내지 1의 정수이며; W는 아미노산 단위이고; w는 0 내지 12의 정수이며; Y는 스페이서 단위이고, y는 0, 1, 또는 2이며; Ab, D, 및 p는 화학식 I에 대해 상기 정의된 바와 같다. 이러한 링커의 예시 양태가 US 20050238649 A1 (이 문헌은 본원에 참고로 도입된다)에 기재되어 있다.

<418> 예시되는 링커 성분 및 그의 조합이 화학식 II의 ADC의 맥락에서 다음에 제시된다:



<419>

<420> 신장기, 스페이서 및 아미노산 단위를 포함한 링커 성분은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 US 2005-0238649 A1에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있다.

<421> C. 예시되는 약물 부분

<422> 1. 마이탄신 및 마이탄시노이드

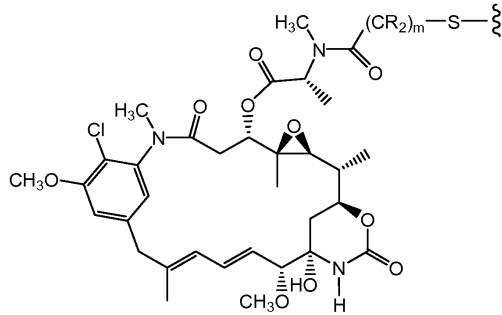
<423> 몇몇 양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 마이탄시노이드 분자와 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 마이탄시노이드는 튜블린 중합 반응을 억제함으로써 작용하는 핵분열 억제제이다. 마이탄신은 동아프리카산 관목 마이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리하였다 [참고: 미국 특허 제3,896,111호]. 연속해서, 특정 미생물이 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄시놀 및 C-3 마이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 [참고: 미국 특허 제4,151,042호]. 합성 마이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체가, 예를 들어 미국 특허 제4,137,230호; 제4,248,870호; 제4,256,746호; 제4,260,608호; 제4,265,814호; 제4,294,757호; 제4,307,016호; 제4,308,268호; 제4,308,269호; 제4,309,428호; 제4,313,946호; 제4,315,929호; 제4,317,821호; 제4,322,348호; 제4,331,598호; 제4,361,650호; 제4,364,866호; 제4,424,219호; 제4,450,254호; 제4,362,663호; 및 제4,371,533호 (이들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 보고되었다.

<424> 마이탄신 화합물은 마이크로튜블린 단백질, 튜블린의 중합 반응 억제를 통하여 유사분열 동안 미소관의 형성을 억제함으로써 세포 증식을 억제시킨다 [참고: Remillard et al (1975) Science 189:1002-1005; US 5208020]. 마이탄신과 마이탄시노이드는 고도로 세포독성이지만, 암 요법에 있어서의 그들의 임상적 용도는 상당히 제한되는데, 이는 주로 중양에 대한 선택성 불량으로 인한 중증의 전신 부작용 때문이다. 마이탄신을 이용한 임상 시험은 중추 신경계와 위장계에 대한 심각한 부작용으로 인해 중단되었다 [참고: Issel et al (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207].

<425> 마이탄시노이드 약물 부분은 항체-약물 접합체에 있어 관심을 끄는 약물 부분인데, 이는 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형에 의해, 또는 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기가 비교적 용이하고, (ii) 비-디설파이드 링커를 통하여 항체와 접합시키는 데에 적합한 관능기를 이용하여 유도체화될 수 있으며, (iii) 혈장 내에서 안정적이고, (iv) 각종 종양 세포주에 대항하여 유효하기 때문이다.

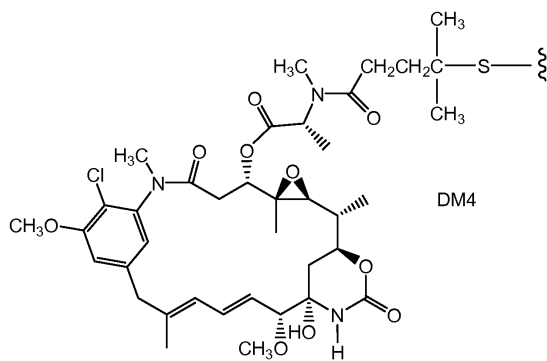
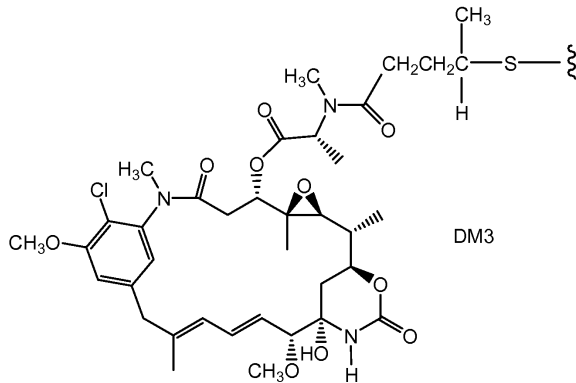
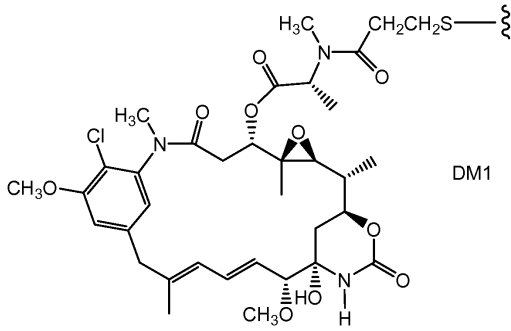
<426> 마이탄시노이드 약물 부분으로서 사용하기 적합한 마이탄신 화합물은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 공지된 방법에 따라서 천연 공급원으로부터 단리할 수 있거나, 유전 공학 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다 [참고: Yu et al (2002) PNAS 99: 7968-7973]. 마이탄시놀 및 마이탄시놀 유사체는 공지된 방법에 따라서 합성적으로 제조할 수도 있다. 마이탄시노이드 약물 부분의 예시 양태에는 다음에 기재되는 바와 같은 DM1, DM3 및 DM4가 포함된다.

<427> 기타 약물 부분과 같이, 마이탄시노이드 약물 부분의 모든 입체이성체, 즉 D의 키랄 탄소에서 R 배위와 S 배위의 모든 조합물이 본 발명의 화합물에 대해 고려된다. 한 양태에서는, 마이탄시노이드 약물 부분 (D)이 다음 입체 화학을 가질 것이다:



<428>

<429> 마이탄시노이드 약물 부분의 예시 양태에는 다음 구조를 갖는 DM1 [여기서, (CR₂)_m은 CH₂CH₂이다]; DM3 [여기서, (CR₂)_m은 CH₂CH₂CH(CH₃)이다]; 및 DM4 [여기서, (CR₂)_m은 CH₂CH₂C(CH₃)₂이다]이 포함된다:



<430>

<431>

표적화 항체의 치료 지수를 개선시키기 위한 시도로, 마이탄신 및 마이탄시노이드를 종양 세포 항원과 특이적으로 결합하는 항체와 접합시켰다. 마이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 그의 치료적 용도가, 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 (그의 전문이 본원에 참고로 도입되어 있다)에 기재되어 있다. 문헌 [참고: Liu et al., *PNAS USA* 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대하여 유도된 모노클로날 항체 C242와 연결된 DM1로 지정된 마이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 이러한 접합체는 배양된 결장암 세포에 대하여 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타내었다. 문헌 [참고: Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에는 마이탄시노이드를 디설파이드 링커를 통하여, 인간 결장암 세포주 상의 항원과 결합하는 뮤린 항체 A7 또는 HEK-2/neu 종양형성 유전자와 결합하는 또 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1와 접합시킨 면역접합체가 기재되어 있다. TA.1-마이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 개 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3 상에서 시험관내 시험하였다. 약물 접합체는 자유 마이탄시노이드 약물과 유사한 세포독성 정도를 달성하였으며, 이는 항체 분자당 마이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있었다. A7-마이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.

<432>

항체-마이탄시노이드 접합체는 항체 또는 마이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 상당히 저하시키지 않으면서 항체를 마이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조한다. 항체 분자당 평균 3 내지 4개의 마이탄시노이드 분자가 접합된 것이 항체의 기능이나 용해도에 불리한 영향을 미치지 않으면서 표적 세포의 세포독성을 증강시키는 데에 효능을 나타내었지만, 심지어 독소/항체 1개 분자도 있는 그대로의 항체 사용에 비해 세포독성을 증강시키는 것으로 예상할 수 있을 것이다. 마이탄시노이드는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 공지된 기

술에 의해 합성할 수 있거나 천연 공급원으로부터 분리할 수 있다. 적합한 마이탄시노이드는, 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 및 기타 특허 및 상기 언급된 비특허 공보에 기재되어 있다. 바람직한 마이탄시노이드는 방향족 환 또는 마이탄시노이드 분자의 기타 위치에서 변형된 마이탄시놀 및 마이탄시놀 유사체, 예를 들어 각종 마이탄시놀 에스테르이다.

<433> 항체-마이탄시노이드 접합체를 제조하는 것으로 당해 분야에 공지된 많은 연결성 기가 있는데, 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 또는 EP 특허 제0 425 235 B1호, 및 문헌 [참고: Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에 기재된 것이 포함된다. 연결성 기에는 상기 언급된 특허에 기재된 바와 같은, 디설파이드 기, 티오에테르 기, 산 불안정한 기, 광불안정한 기, 펩티다제 불안정한 기 또는 에스테라제 불안정한 기가 포함되고, 디설파이드 및 티오에테르 기가 바람직하다.

<434> 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 마이탄시노이드의 접합체를 만들 수 있다. 특히 바람직한 커플링제에는 디설파이드 연쇄를 제공하기 위한 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP) [참고: Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)] 및 N-석신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)가 포함된다.

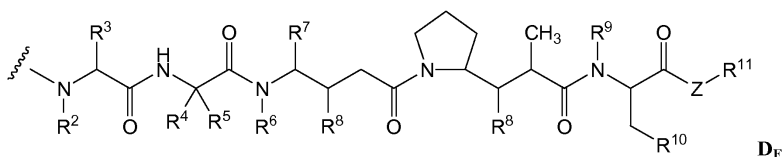
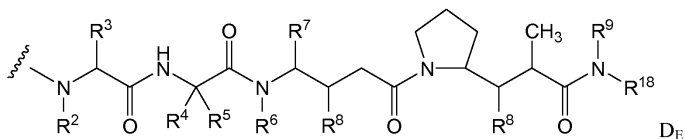
<435> 링커는 연결 유형에 따라서 각종 위치에서 마이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연쇄는 통상적인 커플링 기술을 사용하여 히드록실 기와 반응시킴으로써 형성시킬 수 있다. 이러한 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형시킨 C-14 위치, 히드록실 기로 변형시킨 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 양태에서, 연쇄는 마이탄시놀 또는 마이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

<436> 2. 아우리스타틴, 돌라스타틴

<437> 몇몇 양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드성 유사체 또는 유도체, 예를 들어 아우리스타틴과 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 [참고: 미국 특허 제5635483호; 제5780588호]. 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미소관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분할을 방해하고 [참고: Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584], 항암 활성 [참고: 미국 특허 제5663149호] 및 항진균 활성 [참고: Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965]을 지닌 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 부분은 펩티드성 약물 부분의 N (아미노) 말단 또는 C (카복실) 말단을 통하여 항체에 부착시킬 수 있다 [참고: WO 02/088172].

<438> 예시되는 아우리스타틴 양태에는 문헌 [참고: Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004; 이의 전문이 본원에 참고로 도입된다]에 기재된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 부분 DE 및 DF가 포함된다.

<439> 펩티드성 약물 부분은 다음 화학식 D_E 및 D_F 중에서 선택될 수 있다:



<440>

<441> 상기식에서, D_E 및 D_F의 파선은 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유 부착 부위를 표시하고, 독립적으로 각 위치에서:

- <442> R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되고;
- <443> R^3 은 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 중에서 선택되며;
- <444> 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 중에서 선택되고;
- <445> R^5 는 H 및 메틸 중에서 선택되거나; 또는
- <446> R^4 와 R^5 는 함께, 카보사이클릭 환을 형성하고 식 $-(CR^aR^b)_n-$ (여기서, R^a 및 R^b 는 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카보사이클 중에서 독립적으로 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 선택된다)을 가지며;
- <447> R^6 은 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되고;
- <448> R^7 은 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 중에서 선택되며;
- <449> 각 R^8 은 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카보사이클 및 $O-(C_1-C_8)$ 알킬) 중에서 독립적으로 선택되고;
- <450> R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되며;
- <451> R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤테로사이클 중에서 선택되고;
- <452> Z는 O, S, NH, 또는 NR^{12} (여기서, R^{12} 는 C_1-C_8 알킬이다)이며;
- <453> R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 중에서 선택되고; m은 1 내지 1000의 정수이며;
- <454> R^{13} 은 C_2-C_8 알킬이고;
- <455> R^{14} 는 H 또는 C_1-C_8 알킬이며;
- <456> R^{15} 의 각 존재는 독립적으로, H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;
- <457> R^{16} 의 각 존재는 독립적으로, H, C_1-C_8 알킬 또는 $-(CH_2)_n-COOH$ 이며;
- <458> 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) 중에서 선택되고;
- <459> n은 0 내지 6의 정수이다.
- <460> 한 양태에서, R^3 , R^4 및 R^5 는 독립적으로 이소프로필 또는 2급-부틸이고, R^5 는 -H 또는 메틸이다. 예시 양태에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^5 는 -H이며 R^7 은 2급-부틸이다.
- <461> 또 다른 양태에서, R^2 및 R^6 은 각각 메틸이고, R^9 는 -H이다.
- <462> 또 다른 양태에서, R^8 의 각 존재는 $-OCH_3$ 이다.

<463> 예시 양태에서, R^3 및 R^4 는 각각 이소프로필이고, R^2 및 R^6 은 각각 메틸이며, R^5 는 -H이고, R^7 은 2급-부틸이며, R^8 의 각 존재는 -OCH₃이고, R^9 는 -H이다.

<464> 한 양태에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.

<465> 한 양태에서, R^{10} 은 아릴이다.

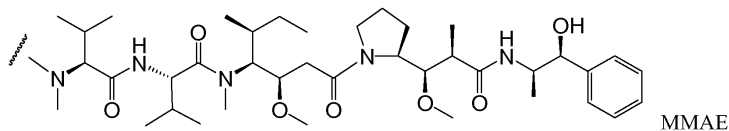
<466> 예시 양태에서, R^{10} 은 -페닐이다.

<467> 예시 양태에서, Z가 -O-인 경우, R^{11} 은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.

<468> 한 양태에서, Z가 -NH인 경우, R^{11} 은 -CH(R^{15})₂ (여기서, R^{15} 는 -(CH₂)_n-N(R^{16})₂이고 R^{16} 은 C₁-C₈ 알킬 또는 -(CH₂)_n-COOH이다)이다.

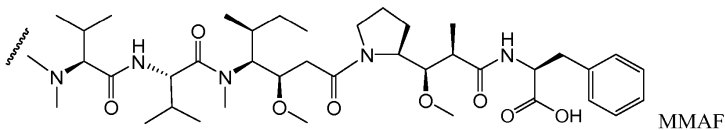
<469> 또 다른 양태에서, Z가 -NH인 경우, R^{11} 은 -CH(R^{15})₂ (여기서, R^{15} 는 -(CH₂)_n-SO₃H이다)이다.

<470> 화학식 D₂의 예시되는 아우리스타틴 양태는 MMAE인데, 여기서 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 표시한다:



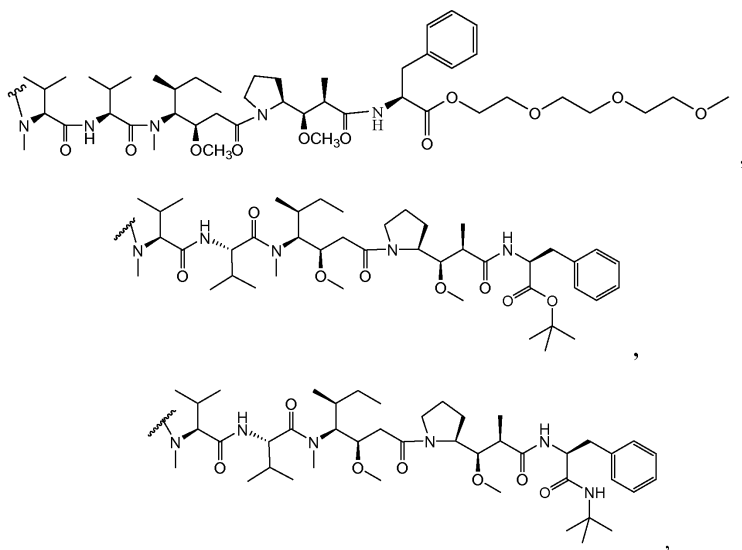
<471>

<472> 화학식 D₂의 예시되는 아우리스타틴 양태는 MMAF인데, 여기서 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 표시한다 [참고: US 2005/0238649 and Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124]:

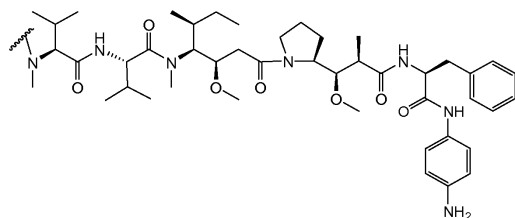
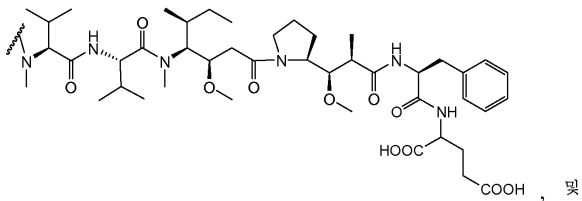
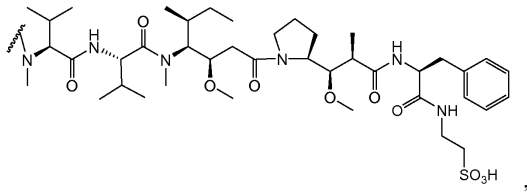
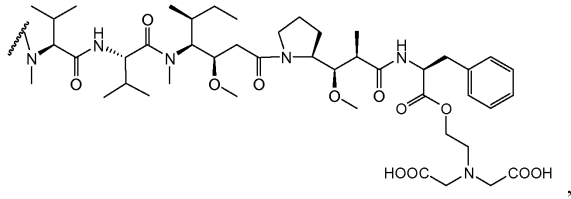
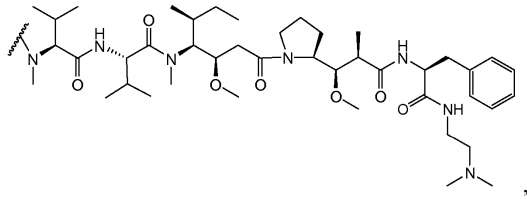
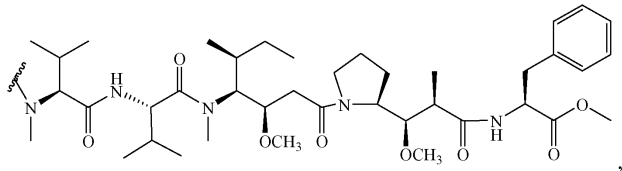


<473>

<474> 기타 약물 부분에는 다음 MMAF 유도체가 포함되는데, 파선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 부착을 표시한다:



<475>



<476>

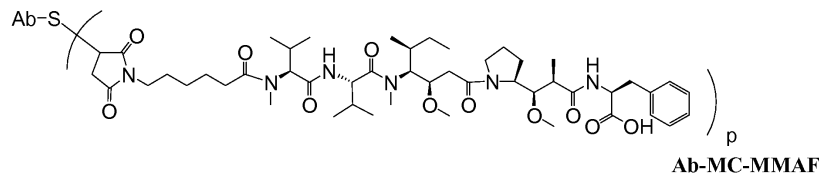
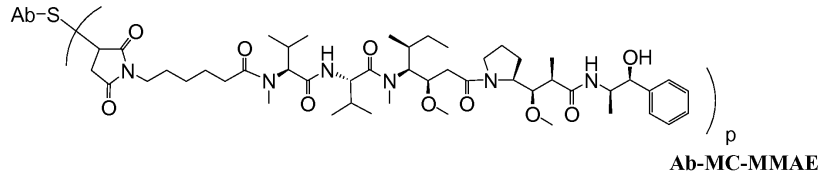
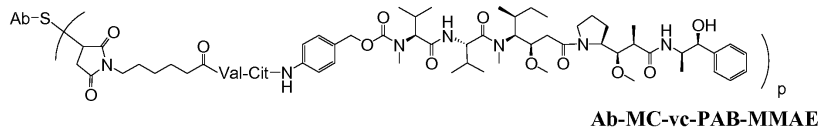
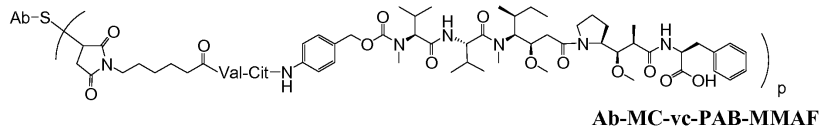
<477>

<478>

한 국면에서는, 상기 제시된 바와 같은, 트리에틸렌 글리콜 에스테르 (TEG)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 친수성 기를 R¹¹에서 약물 부분에 부착시킬 수 있다. 특별한 이론에 얽매이는 것은 아니지만, 친수성 기는 약물 부분의 내재화 및 비-응집에 도움을 준다.

<479>

아우리스타틴/돌라스타틴 또는 그의 유도체를 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시 양태는 문헌 [참고: US 2005-0238649 A1 and Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124; 그의 전문이 본원에 참고로 도입된다]에 기재되어 있다. MMAE 또는 MMAF 및 각종 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시 양태는 다음 구조 및 약어 (여기서, "Ab"는 항체이고; p는 1 내지 약 8이며; "Val-Cit"는 발린-시트룰린 디펩티드이고; "S"는 황 원자이다)를 갖는다:



<480>

<481>

MMAF 및 각종 링커 성분을 포함하는 화학식 I의 ADC의 예시 양태에는 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF가 추가로 포함된다. 흥미롭게도, 단백질 분해적으로 절단 가능하지 않은 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는 단백질 분해적으로 절단 가능한 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체와 거의 동등한 수준의 활성을 보유하고 있는 것으로 밝혀졌다 [참고: Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]. 이러한 경우에는, 약물 방출이 세포에서의 항체 분해에 의해 수행되는 것으로 여겨진다.

<482>

전형적으로, 펩티드에 의거한 약물 부분은 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 간에 펩티드 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 이러한 펩티드 결합은, 예를 들어 펩티드 화학 분야에 널리 공지되어 있는 액상 합성 방법 [참고: E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press]에 따라서 제조할 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 부분은 다음 문헌의 방법에 따라서 제조할 수 있다 [참고: US 2005-0238649 A1; 미국 특허 제5635483호; 미국 특허 제5780588호; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al.(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; and Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784].

<483>

특히, 화학식 D_F의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 부분, 예를 들어 MMAF 및 그의 유도체는 문헌 [참고: US 2005-0238649 A1 and Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 화학식 D_E의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 부분, 예를 들어 MMAE 및 그의 유도체는 문헌 [참고: Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784]에 기재된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 약물-링커 부분 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는, 예를 들어 문헌 [참고: Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21 :778-784, 및 미국 공개특허공보 제20050238649 A1호]에 기재된 바와 같은 통상적인 방법에 의해 편리하게 합성한 다음, 관심있는 항체에 접합시킬 수 있다.

<484>

3. 칼리케아미신

<485>

관심있는 또 다른 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 계열의 항생제는 이중 가닥 DNA 절단물을 피코몰 이하 농도로 생성시킬 수 있다. 칼리케아미신 계열의 접합체를 제조하는 방법에 관해서는 미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 제5,877,296호 (American Cyanamid Company)를 참고할 수 있다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 θ_1^I 이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 [참고: Hinman et al., Cancer Research, 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research, 58: 2925-2928 (1998); 및 전술된 American Cyanamid의 미국 특허들]. 항체와 접합될 수 있는 또 다른 항종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신과 QFA 둘 다 다른 세포내 작용 부위를 갖고 있고 혈장 막

을 용이하게 교차하지 않는다. 따라서, 항체 매개된 내재화를 통한 이들 작용제의 세포성 섭취는 그들의 세포 독성 효과를 상당히 증강시켜 준다.

4. 기타 세포독성제

본 발명의 항체와 접합될 수 있는 기타 항종양제에는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실 [미국 특허 제5,053,394호, 제5,770,710호에 기재되고 집합적으로 LL-E33288 복합체로서 공지된 작용제 계열이다] 뿐만 아니라 에스페라미신 (esperamicin) [참고: 미국 특허 제5,877,296호]이 포함된다.

사용될 수 있는 효소적 활성 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합성 활성 단편, 외독소 A 쇄 [슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨], 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모테신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신 (curcin), 크로틴 (croton), 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다 [참고: 예를 들어, WO 93/21232 (1993년 10월 28일자로 공개됨)].

본 발명은 추가로, 항체와 핵산 분해 활성을 지닌 화합물 (예: 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 간에 형성된 면역접합체를 고려한다.

종양을 선택적으로 파괴시키기 위해, 항체가 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 각종 방사성 동위원소가 방사성접합된 항체 생성을 위해 이용 가능하다. 이의 예에는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다.

방사성 표지 또는 기타 표지를 공지된 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성할 수 있거나, 또는 수소 대신, 예를 들어 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 이용하는 화학적 아미노산 합성에 의해 합성할 수 있다. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 또는 ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re 및 ^{111}In 등의 표지를 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통하여 부착시킬 수 있다. IODOGEN 방법 [참고: Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57]을 사용하여 요오드-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 [참고: "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 기타 방법이 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 항-Robo4 항체를 나노미립형 작용제와 접합시킬 수 있는데, 이는 궁극적으로 세포독성 부분과 접합될 수 있다. 적합한 나노미립형 작용제에는 음향적으로 활성인 지질구 (AAL)로서 지칭되기도 하는 [참고: Tartis et al., *Ultrasound Med. Biol.* 32(11):1771-80 (2006)] 마이크로버블 [참고: Ellegala et al., *Circulation* 108:336-341 (2003)], 초상자성 작용제, 리포솜, 퍼플루오로카본 나노입자 에멀션 [참고: WO 2005104051], 및 덴드리머 [참고: Caruthers et al., *Methods in Molecular Medicine*, 124:387-400 (2006) 및 그 내부에 인용된 문헌]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 [이들 문헌 모두는 전문이 본원에 참고로 도입된다].

각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [참고: Vitetta et al., *Science*. 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이, 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 키레이트제의 한 예이다 [참고: WO 94/11026]. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시켜 주는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정한 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광불안정한 링커, 디메틸 링커 또는 디설파이드 함유 링커 [참고: Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992); 미국 특허 제5,208,020호]를 사용할 수 있다.

본 발명의 화합물은 특별히, 교차 결합제 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB (석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트) [공급처: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL. U.S.A.]을

사용하여 제조된 ADC를 고려하지만, 이에 제한되지 않는다 [참고; pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog].

<495> 5. 약물 부하비

<496> 약물 부하비는 p 로써 나타내는데, 이는 화학식 I, Ia, Ia' 또는 II의 분자에서 항체당 평균 약물 부분의 수이다. 약물 부하비는 항체당 1 내지 20개의 약물 부분 (D) 범위일 수 있다. 화학식 I의 ADC에는 1 내지 20개 범위의 약물 부분과 접합된 항체 컬렉션이 포함된다. 접합 반응으로부터 ADC를 제조하는 데에 있어서 항체당 평균 약물 부분 수는 통상적인 수단, 예를 들어 질량 분광법, ELISA 검정, 및 HPLC에 의해 특성화할 수 있다. p 측면에서의 ADC의 정량적 분포도를 결정할 수도 있다. 몇몇 경우에는, 동질적 ADC (여기서, p 는 기타 약물 부하비를 나타내는 ADC로부터의 특정 값이다)의 분리, 정제 및 특성화가 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.

<497> 몇몇 항체-약물 접합체의 경우에는, p 가 항체 상의 부착 부위 수로써 제한될 수 있다. 예를 들어, 부착이 상기 예시 양태에서와 같이 시스테인 티올인 경우에는, 항체가 단지 1개 또는 수 개의 시스테인 티올기를 가질 수 있거나, 또는 링커를 통하여 부착시킬 수 있는 단지 1개 또는 수 개의 충분히 반응성인 티올기를 가질 수 있다. 특정의 양태에서, 약물 부하비가 더 클 수록, 예를 들어 $p > 5$ 이면, 특정 항체-약물 접합체의 세포성 투과성 상실, 응집, 불용성 또는 독성이 유발될 수 있다. 특정의 양태에서, 본 발명의 ADC에 대한 약물 부하비는 1 내지 약 8; 약 2 내지 약 6; 약 3 내지 약 5; 약 3 내지 약 4; 약 3.1 내지 약 3.9; 약 3.2 내지 약 3.8; 약 3.2 내지 약 3.7; 약 3.2 내지 약 3.6; 약 3.3 내지 약 3.8; 또는 약 3.3 내지 약 3.7의 범위이다. 실제로, 특정의 ADC의 경우, 항체당 약물 부분의 최적의 비는 8 미만일 수 있고, 약 2 내지 약 5일 수 있는 것으로 밝혀졌다 [참고: US 2005-0238649 A1 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)].

<498> 특정의 양태에서, 이론적 최대 수 보다 적은 수의 약물 부분이 접합 반응 동안 항체와 접합된다. 항체는, 예를 들어 다음에 논의되는 바와 같은 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응하지 않는 리신 잔기를 함유할 수 있다. 일반적으로, 항체는 약물 부분과 연결될 수 있는 많은 반응성 및 자유 시스테인 티올기를 함유하지 않으며; 실제로, 항체 내의 대부분의 시스테인 티올 잔기는 디설파이드 브릿지로서 존재한다. 특정의 양태에서, 항체는 부분 또는 완전한 환원 조건 하에 환원제, 예를 들어 디티오프레이톨 (DTT) 또는 트리카보닐에틸 포스핀 (TCEP)로 환원시켜 반응성 시스테인 티올기를 생성시킬 수 있다. 특정의 양태에서, 항체를 대상으로 하여 변성 조건을 적용시켜 반응성 친핵기, 예를 들어 리신 또는 시스테인을 드러내야 한다.

<499> ADC의 부하비 (약물/항체 비)는, 예를 들어 다음과 같은 상이한 방식으로 제어할 수 있다: (i) 항체와 비교하여 물 과량의 약물-링커 중간체 또는 링커 시약을 제한하고; (ii) 접합 반응 시간 또는 온도를 제한하며; (iii) 시스테인 티올 변형에 대한 환원적 조건을 부분적으로 제한하고; (iv) 링커-약물 부착물의 수 및/또는 위치를 제어하기 위해 시스테인 잔기의 수 및 위치를 변형시키도록, 재조합 기술에 의해 항체의 아미노산 서열을 공학 처리한다 [예를 들어, 본원 및 W02006/034488 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같이 제조된 티오Mab 또는 티오Fab]. 본 발명의 양태에서, 본 발명의 항체의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨다. 특정 양태에서, 항체의 중쇄 Fc 영역의 위치 118에서의 아미노산은 시스테인이거나 또는 이를 시스테인 잔기로 치환시킨다 (여기서, 118은 EU 넘버링에 따라서 넘버링된 항체의 Fc 영역 내의 아미노산 위치를 지칭한다) [참고: Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (U.S. Dept. of Health and Hum. Serv., Bethesda (1991))]. 특정 양태에서, 중쇄 Fc 영역의 위치 118에서의 시스테인 잔기 (EU 넘버링)를 약물 부분 또는 검출가능한 표지, 예를 들어 본원에 기재된 약물 부분 또는 검출가능한 표지에 공유 결합에 의해 부착시킨다. 도 6A에서, 진하게 표시되고 밀줄친 중쇄 Fc 영역의 알라닌은 티오MAB를 생성시키기 위해 시스테인을 치환시켰던 위치이다.

<500> 하나 이상의 친핵기가 약물-링커 중간체 또는 링커 시약과 반응한 다음, 약물 부분 시약과 반응하는 경우에는, 이로써 생성되는 생성물이, 항체와 부착된 일정 분포도의 하나 이상의 약물 부분을 수반한 ADC 화합물의 혼합물이라는 것을 인지해야 한다. 항체당 약물의 평균 수는 항체에 대해 특이적이고 약물에 대해 특이적인 이중 ELISA 항체 검정에 의해 상기 혼합물로부터 계산할 수 있다. 개개의 ADC 분자는 질량 분광법에 의해 혼합물에서 확인할 수 있고, HPLC, 예를 들어 소수성 상호 작용 크로마토그래피에 의해 분리시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates,"

Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004]. 특정의 양태에서, 단일 부하비를 갖는 균질한 ADC는 전기영동 또는 크로마토그래피에 의해 접합 혼합물로부터 분리할 수 있다.

<501> D. 항체-약물 접합체의 대사물

<502> 또한 본 발명의 범위 내에는, 본원에 기재된 ADC 화합물의 생체내 대사 산물이 포함되는데, 이러한 대사 산물은 신규하고 선행 기술에 비해 불명확하다. 이러한 산물은, 예를 들어 투여된 화합물의 산화, 환원, 가수분해, 아미드화, 에스테르화, 효소적 절단 등으로부터의 결과일 수 있다. 따라서, 본 발명에는 본 발명의 화합물을 그의 대사 산물을 산출시키기에 충분한 시간 동안 포유동물과 접촉시키는 것을 포함하는 공정에 의해 생성된 신규하고 불명확한 화합물이 포함된다.

<503> 대사 산물은 전형적으로, 방사성 표지된 (예를 들어, ^{14}C 또는 ^3H) ADC를 제조하고, 이를 검출가능한 용량 (예를 들어, 약 0.5 mg/kg 초과)으로 동물, 예를 들어 랫트, 마우스, 기니아 피그, 원숭이 또는 인간에게 비경구 투여하며, 대사가 일어나기에 충분한 시간을 허용한 다음 (전형적으로, 약 30초 내지 30시간), 뇨, 혈액 또는 기타 생물학적 샘플로부터 그의 전환 생성물을 분리함으로써 확인한다. 이들 생성물은 표지되었기 때문에 용이하게 분리시킨다 (다른 것은 대사물 내에 생존하는 에피토프와 결합할 수 있는 항체를 사용함으로써 분리시킨다). 대사물 구조는 통상적인 방식, 예를 들어 MS, LC/MS 또는 NMR 분석에 의해 결정한다. 일반적으로, 대사물의 분석은 당업자에게 널리 공지된 통상적인 약물 대사 연구와 동일한 방식으로 수행한다. 전환 생성물은 이들이 생체 내에서 달리 발견되지 않는 한은, 본 발명의 ADC 화합물의 치료적 투약에 관한 진단 검정에 유용하다.

<504> VI. 면역접합체의 제조 방법

<505> 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서는, 항체 (Ab)를 하나 이상의 약물 부분 (D), 예를 들어 항체당 약 1 내지 약 20개 약물 부분에 링커 (L)를 통하여 접합시킨다. 화학식 I, Ia, Ia' 또는 II의 ADC는 다음을 포함한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 다음, 이를 약물 부분 D와 반응시키는 방법; 및 (2) 약물 부분의 친핵기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵기와 반응시키는 방법. 후자 경로를 통하여 화학식 I의 ADC를 제조하기 위한 예시 방법이 미국 공개특허공보 제20050238649 A1호 (본원에 참고로 도입되어 있다)에 기재되어 있다.

<506> 항체 상의 친핵기에는 (i) N-말단 아민기; (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신; (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인; 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (여기서, 항체가 글리코실화된다)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 부분 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들면 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들면 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원 가능한 쇠간 디설파이드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체를 환원제, 예를 들어 DTT (디티오프레이톨) 또는 트리카보닐에틸포스핀 (TCEP)으로 처리함으로써 링커 시약과의 접합을 위해 반응성이 되도록 하여, 항체를 완전히 또는 부분적으로 환원시킨다. 이로써, 각 시스테인 브릿지는 이론적으로, 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 예를 들어, 리신 잔기와 2-아미노티올란 [트라우트 (Traut) 시약]과 반응시킴으로써, 리신 잔기의 변형을 통하여 부가의 친핵기를 항체 내로 도입할 수 있는데, 이로써 아민이 티올로 전환된다. 1개, 2개, 3개, 4개 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 변이체 항체를 제조함으로써) 반응성 티올기를 항체 내로 도입할 수 있다.

<507> 링커 시약 또는 약물 상의 친핵기와 항체 상의 친전자기, 예를 들어 알데히드 또는 케톤 카보닐기 간을 반응시킴으로써, 본 발명의 항체-약물 접합체를 또한 생성시킬 수 있다. 링커 시약 상의 유용한 친핵기에는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트, 및 아릴히드라지드가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 한 양태에서, 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환체와 반응할 수 있는 친전자성 부분을 도입하도록 항체를 변형시킨다. 또 다른 양태에서, 글리코실화 항체의 당을, 예를 들어 펄로오테이트 산화 시약으로 산화시켜 링커 시약 또는 약물 부분의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 이로써 생성된 이민 슈프 (Schiff) 염기 기는 안정한 연쇄를 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어, 수소화 붕소 시약에 의해 환원시켜 안정한 아민 연쇄를 형성시킬 수 있다. 한 양태에서는, 글리코실화 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼요오테이트와 반응시키면, 약물 상의 적당한 기와 반응할 수 있는 항체 내에 카보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 생성될 수 있다 [참고: Hermanson, Bioconjugate

Techniques]. 또 다른 양태에서는, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 항체를 나트륨 메타-퍼요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신 알데히드가 생성될 수 있다 [참고: Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138-146; US 5362852]. 이러한 알데히드는 약물 부분 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

<508> 약물 부분 상의 친핵기에는 링커 부분 및 링커 시약 상의 친전자기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예를 들면 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예를 들면 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성하기 위해 반응할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카복실레이트, 및 아릴히드라지드가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<509> 본 발명의 화합물은 특별히, 교차 결합제 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB (석신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트) [공급처: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL. U.S.A.]을 사용하여 제조된 ADC를 고려하지만, 이에 제한되지 않는다 [참고; pages 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog].

<510> 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들어 N-석신이미딜-3-(2-피리디디티올)프로피오네이트 (SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들면, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예: 디석신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예: 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 [예: 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민], 비스-디아조늄 유도체 [예: 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민], 디이소시아네이트 (예: 톨루엔 2,6-디아소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예: 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [참고: Vitetta et al., Science. 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이, 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 킬레이트제의 한 예이다 [참고: WO 94/11026].

<511> 또 다른 한편, 항체와 세포독성제를 포함하는 융합 단백질을, 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 만들 수 있다. 재조합 DNA 분자는 접합체의 목적하는 특성을 파괴시키지 않는 링커 펩티드를 암호화하는 영역에 의해 분리되거나 또는 서로 인접해 있는 접합체의 세포독성 부분과 항체를 암호화하는 영역을 포함할 수 있다.

<512> 본 발명의 화합물에는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 자유 시스테인 아미노산으로 대체시킨 시스테인 공학 처리시킨 항체가 포함된다. 시스테인 공학 처리시킨 항체는 0.6 내지 1.0 범위의 티올 반응도 값을 갖는 하나 이상의 자유 시스테인 아미노산을 포함한다. 자유 시스테인 아미노산은 모 항체로 공학 처리시킨 시스테인 잔기이고, 디설파이드 브릿지의 일부가 아니다.

<513> 한 국면에서, 시스테인 공학 처리시킨 항체는

<514> (a) 모 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 시스테인으로 대체시키는 단계; 및

<515> (b) 시스테인 공학 처리시킨 항체를 티올-반응성 시약과 반응시킴으로써 시스테인 공학 처리시킨 항체의 티올 반응도를 결정하는 단계

<516> 를 포함하는 공정에 의해 제조한다.

<517> 시스테인 공학 처리시킨 항체는 모 항체 보다 티올-반응성 시약과 더 반응성일 수 있다.

<518> 자유 시스테인 아미노산 잔기는 중쇄 또는 경쇄, 또는 불변 또는 가변 도메인 내에 위치할 수 있다. 항체 단편, 예를 들어 Fab를 또한, 항체 단편의 아미노산을 대체하는 하나 이상의 시스테인 아미노산으로 공학 처리시켜 시스테인 공학 처리시킨 항체 단편을 형성시킬 수 있다.

<519> 본 발명의 또 다른 국면은

<520> (a) 하나 이상의 시스테인 아미노산을 모 항체 내로 도입하여 시스테인 공학 처리시킨 항체를 생성시키는 단계; 및

<521> (b) 시스테인 공학 처리시킨 항체와 티올-반응성 시약의 티올 반응도를 결정하는 단계

- <522> 를 포함하는, 시스템인 공학 처리시킨 항체의 제조 방법을 제공하는데, 이러한 시스템인 공학 처리시킨 항체는 모 항체 보다 티올-반응성 시약과 더 반응성이다.
- <523> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 제조하는 방법의 단계 (a)는
- <524> (i) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이 유발시키고;
- <525> (ii) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 발현시키며;
- <526> (iii) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 단리 및 정제하는 것을 포함할 수 있다.
- <527> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는 파아지 또는 파아지미드 입자 중에서 선택된 바이러스성 입자 상에 시스템인 공학 처리시킨 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- <528> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 제조하는 방법의 단계 (b)는
- <529> (i) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체를 생성시키고;
- <530> (ii) 포획 매질에 대한 이러한 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체의 결합도를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- <531> 본 발명의 또 다른 국면은
- <532> (a) 하나 이상의 시스템인 아미노산을 모 항체 내로 도입하여 시스템인 공학 처리시킨 항체를 생성시키는 단계;
- <533> (b) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체를 생성시키는 단계;
- <534> (c) 포획 매질에 대한 상기 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체의 결합도를 측정하는 단계; 및
- <535> (d) 시스템인 공학 처리시킨 항체와 티올-반응성 시약의 티올 반응도를 결정하는 단계
- <536> 를 포함하는, 티올 반응도를 알아보기 위하여 고도로 반응성이고 쌍을 이루지 않은 시스템인 아미노산을 수반한 시스템인 공학 처리시킨 항체를 스크리닝하는 방법이다.
- <537> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (a)는
- <538> (i) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 암호화하는 핵산 서열을 돌연변이 유발시키고;
- <539> (ii) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 발현시키며;
- <540> (iii) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 단리 및 정제하는 것을 포함할 수 있다.
- <541> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는 파아지 또는 파아지미드 입자 중에서 선택된 바이러스성 입자 상에 시스템인 공학 처리시킨 항체를 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- <542> 시스템인 공학 처리시킨 항체를 스크리닝하는 방법의 단계 (b)는
- <543> (i) 시스템인 공학 처리시킨 항체를 티올-반응성 친화도 시약과 반응시켜 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체를 생성시키고;
- <544> (ii) 포획 매질에 대한 상기 친화도 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체의 결합도를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- <545> 시스템인 공학 처리시킨 항체는 암을 치료하는 데에 유용할 수 있고, 이에는 세포 표면 및 막관통 수용체, 및 종양 관련 항원 (TAA)에 대해 특이적인 항체가 포함된다. 이러한 항체는 있는 그대로의 항체 (약물이나 표지 부분과 접합되지 않음)로서 또는 화학식 I, Ia, Ia' 또는 II 항체-약물 접합체 (ADC)로서 사용할 수 있다.
- <546> 시스템인 공학 처리시킨 항체의 제조 및 스크리닝 방법의 양태에는 모 항체가 항체 단편, 예를 들어 hu4D5Fabv8 인 양태가 포함된다. 모 항체는 알부민 결합성 펩티드 서열 (ABP)을 포함하는 융합 단백질일 수도 있다.
- <547> 본 발명의 시스템인 공학 처리시킨 항체는 티올-반응성 시약과 부위-특이적이고도 효율적으로 커플링될 수 있다. 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획 표지 시약, 형광단 시약, 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 시스템인 공학 처리시킨 항체는 검출가능한 표지로 표지시키고, 고체 상 지지체 상에 고정화시키고/시키거

나 약물 부분과 접합시킬 수 있다.

<548> 본 발명의 또 다른 국면은 시스테인 공학 처리시킨 항체 (Ab), 및 약물 부분 (D)을 포함하는 항체-약물 접합체 화합물인데, 시스테인 공학 처리시킨 항체는 링커 부분 (L)에 의해 하나 이상의 자유 시스테인 아미노산을 통하여 D에 부착되고; 상기 화합물은 다음 화학식 Ia를 가지며; 시스테인 공학 처리시킨 항체는 모 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 하나 이상의 자유 시스테인 아미노산으로 대체시키는 것을 포함하는 공정에 의해 제조된다:

화학식 Ia

<549> Ab(LD)_p

<550> 상기식에서, p는 1, 2, 3, 또는 4이다.

<551> 약물 부분에는 마이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 트리코테센, CC1065, 칼리케아미신 및 기타 엔딘인 항생제, 타산, 안트라사이클린, 및 그의 입체 이성체, 동배체, 유사체 또는 유도체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 예시되는 약물 부분에는 DM1, MMAE, 및 MMAF가 포함된다. 예시되는 항체-약물 접합체는 미국 공개 특허공보 제20070092940 A1호에 제시되어 있다.

<552> 화학식 Ia의 항체-약물 접합체는 알부민 결합성 펩티드 (ABP) 서열을 추가로 포함할 수 있고; 조성물은 다음 화학식 Ia'를 갖는다:

<553> <화학식 Ia'>

<554> ABPAAb(LD)_p

<555> ABP 서열과의 융합 단백질을 포함하는 본 발명의 항체는 다음 문헌에 교시되어 있다 [참고: (i) Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038; (ii) US 20040001827 at [0076] SEQ ID NOS: 9-22; and (iii) WO 01/45746 at pages 12-13, SEQ ID NOS: z1-z14 (이들 문헌 모두가 본원에 참고로 도입된다)].

<556> VII. 시스테인 공학 처리시킨 항체 (티오Mab 및 티오Fab)

<557> 본 발명의 화합물에는 야생형 또는 모 항체의 하나 이상의 아미노산을 시스테인 아미노산으로 대체시킨 시스테인 공학 처리시킨 항체가 포함된다. 어떠한 형태의 항체도 상기와 같이 공학 처리, 즉 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 모 Fab 항체 단편을 공학 처리시켜 시스테인 공학 처리시킨 Fab (이는 본원에서 "티오Fab"로서 지칭된다)를 형성할 수 있다. 유사하게, 모 모노클로날 항체를 공학 처리시켜 "티오Mab"를 형성시킬 수 있다. 단일 부위 돌연변이는 티오Fab에서 단일 공학 처리시킨 시스테인 잔기를 산출시키는 반면, 단일 부위 돌연변이는 티오Mab에서 2개의 공학 처리시킨 시스테인 잔기를 산출시키는데, 이는 IgG 항체의 이량체성 특성 때문이라는 것을 인지해야 한다. 대체된 ("공학 처리시킨") 시스테인 (Cys) 잔기를 수반한 돌연변이체를 대상으로 하여, 새로이 도입되고 공학 처리시킨 시스테인 티올 기의 반응도를 평가한다. 티올 반응도 값은 0 내지 1.0 범위의 수치 측면에서 상대적이고, 모든 시스테인 공학 처리시킨 항체에 대해 측정할 수 있다. 본 발명의 시스테인 공학 처리시킨 항체의 티올 반응도 값은 0.6 내지 1.0; 0.7 내지 1.0; 또는 0.8 to 1.0의 범위 내이다.

<558> 본 발명의 설계, 선별 및 제조 방법을 이용하여, 친전자성 관능기와 반응성인 시스테인 공학 처리시킨 항체로 만들 수 있다. 이들 방법을 이용하여, 지정되고, 설계되며 선택적인 부위에 약물 분자를 수반한 항체-약물 접합체 (ADC) 화합물과 같은 항체 접합체 화합물로 만들 수 있다. 항체 표면 상의 반응성 시스테인 잔기는 티올 반응성 기, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통하여 약물 부분과 특이적으로 접합시켜 준다. 말레이미드 기에 대한 Cys 잔기의 티올 관능기의 친핵성 반응도는 단백질 내의 기타 모든 아미노산 관능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노 기 또는 N-말단 아미노 기와 비교해서 약 1000배 정도 더 높다. 요오도아세틸 및 말레이미드 시약 내의 티올 특이적 관능기는 아민 기와 반응할 수도 있지만, 더 높은 pH (>9.0)와 더 긴 반응 시간이 요구된다 [참고: Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London].

<559> 본 발명의 시스테인 공학 처리시킨 항체는 바람직하게, 그의 야생형, 모 항체 대응물의 항원 결합 능력을 보유하고 있다. 따라서, 시스테인 공학 처리시킨 항체는 항원과 바람직하고도 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 항원에는, 예를 들어 종양 관련 항원 (TAA), 세포 표면 수용체 단백질 및 기타 세포 표면 분자, 막관통 단백질, 신호 전달 단백질, 세포 생존 조절성 인자, 세포 증식 조절성 인자, 조직 발생 또는 분화와 연관된 (예를 들어,

이에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되어 있거나 추정되는) 분자, 림포카인, 사이토킨, 세포 주기 조절에 관여하는 분자, 혈관생성에 관여하는 분자, 및 혈관형성과 연관된 (예를 들어, 이에 기능적으로 기여하는 것으로 공지되어 있거나 추정되는) 분자가 포함된다. 종양 관련 항원은 군집 분화 인자 (즉, CD 단백질)일 수 있다. 시스테인 공학 처리시킨 항체와 결합할 수 있는 항원은 상기 언급된 범주 중의 하나의 일부의 구성원일 수 있는데, 이러한 범주의 기타 일부는 (관심있는 항원과 관련하여) 별개의 특징을 지니는 기타 분자/항원을 포함한다.

<560> 모 항체는 본원에 기재된 HVR 서열 중의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개를 갖는 인간 또는 인간화 항-Robo4 항체 또는 Fab일 수도 있다. 본 발명의 시스테인 공학 처리시킨 항체는 티올-반응성 시약과 부위 특이적이고도 효율적으로 커플링시킬 수 있다. 티올-반응성 시약은 다관능성 링커 시약, 포획물, 즉 친화도 표지 시약 (예: 바이오틴-링커 시약), 검출 표지 (예: 형광단 시약), 고체 상 고정화 시약 (예: SEPHAROSE™, 폴리스티렌 또는 유리), 또는 약물-링커 중간체일 수 있다. 티올-반응성 시약의 한 가지 예는 N-에틸 말레이미드 (NEM)이다. 예시 양태에서, 티오Fab를 바이오틴-링커 시약과 반응시키면 바이오티닐화 티오Fab가 제공되는데, 이로써 공학 처리시킨 시스테인 잔기의 존재와 반응도가 검출되고 측정될 수 있다. 티오Fab를 다관능성 링커 시약과 반응시키면 관능화 링커를 수반한 티오Fab가 제공되는데, 이를 약물 부분 시약 또는 기타 표지와 추가로 반응시킬 수 있다. 티오Fab를 약물-링커 중간체와 반응시키면 티오Fab 약물 접합체가 제공된다.

<561> 이러한 접근 방식은 반응성 기가, 예를 들어 말레이미드, 요오도아세트아미드, 피리딜 디설파이드, 또는 기타 티올-반응성 접합 파트너인 기타 티올-반응성 작용제의 접합에 적용할 수 있다 [참고: Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671]. 상기 파트너는 세포독성제 (예: 독소루비신 또는 백일해 독소 등의 독소), 형광단, 예를 들어 플루오레세인 또는 로다민과 같은 형광성 염료, 영상화 또는 방사성 치료 금속용 킬레이트제, 펩티드 또는 비-펩티드 표지 또는 검출 태그, 또는 청소용 조정제, 예를 들어 폴리 에틸렌 글리콜의 각종 이성체, 제3 성분과 결합하는 펩티드, 또는 또 다른 탄수화물 또는 친지성 작용제일 수 있다.

<562> 예시되는 항체 단편 상에서 확인된 부위는 주로, 모든 종의 항체 전반에 걸쳐 잘 보존되는 항체의 불변 도메인 내에 있다. 이들 부위는 특이적 항체 구조에 관한 구조적 설계 또는 지식을 추가로 필요로 하지 않으면서, 그리고 항체의 가변 도메인에 대한 고유의 항원 결합 특성을 간섭하지 않으면서도 기타 항체에 광범위하게 적용 가능해야 한다.

<563> PHESELECTOR 검정 [WO2006/034488 (그의 전문이 본원에 참고로 도입되어 있다)에 기재된, 반응성 티올의 선별을 위한 파아지 ELISA]으로, 항체 내의 반응성 시스테인 기를 ELISA 파아지 포맷으로 검출할 수 있게 된다. 웰 표면 상의 관심있는 단백질 (예: 항체)를 피복시킨 다음, 파아지 입자와 함께 항원 배양한 후, 흡광도 검출을 나타내는 HRP 표지된 이차 항체와 함께 항원 배양하는 공정이 WO2006/034488에 상세히 기재되어 있다. 파아지 상에 디스플레이된 돌연변이체 단백질을 신속하고, 원기양성한 고-처리량 방식으로 스크리닝할 수 있다. 시스테인 공학 처리시킨 항체의 라이브러리를 생성시키고, 이를 대상으로 하여 항체 또는 기타 단백질의 무작위 단백질-파아지 라이브러리로부터 자유 Cys 혼입의 적당하게 반응성인 부위를 확인하기 위한 동일한 접근 방식을 사용하여 결합성 선별을 수행할 수 있다. 이러한 기술에는 파아지 상에 디스플레이된 시스테인 돌연변이체 단백질을 친화도 시약 또는 리포터 (reporter) 기 (이 또한 티올-반응성이다)와 반응시키는 것이 포함된다.

<564> 암을 치료하는 데에 유용할 수 있는 시스테인 공학 처리시킨 항체에는 세포 표면 수용체 및 종양 관련 항원 (TAA)에 대항한 항체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항체는 있는 그대로의 항체 (약물이나 표지 부분과 접합되지 않음)로서 또는 화학식 I, Ia, Ia' 또는 II 항체-약물 접합체 (ADC)로서 사용할 수 있다. 종양 관련 항원은 당해 분야에 공지되어 있고, 당해 분야에 널리 공지되어 있는 방법 및 정보를 이용하여 항체를 생성시키는 데에 사용하기 위해 제조할 수 있다. 암 진단 및 치료를 위해 유효한 세포성 표적을 발견하고자 하는 시도로, 조사자는 하나 이상의 정상적인 비-암성 세포(들) 상에서와 비교해서 암 세포의 하나 이상의 특별한 유형(들)의 표면 상에 특이적으로 발현되거나 또는 암과 연관이 없는 비-내피 세포와 비교해서 혈관형성성 세포 (예: 혈관 내피 세포)의 표면 상에 특이적으로 발현되는 막관통 또는 종양 관련 폴리펩티드를 확인하고자 하였다. 종종, 이러한 종양 관련 폴리펩티드는 비암성 세포 또는 비-혈관형성성 세포의 표면 상에서와 비교해서 암 세포 또는 혈관형성성 세포의 표면 상에 더 풍부하게 발현된다. 이러한 종양 관련 세포 표면 항원 폴리펩티드의 확인으로, 항체에 의거한 요법을 통하여 파괴시키기 위한 암 세포 또는 혈관형성성 세포를 특이적으로 표적

화할 수 있는 능력이 유발되었다.

<565> 또 다른 양태에서는, 항체를 종양 예비-표적화에 활용하기 위한 "수용체" (예: 스트렙타비딘)과 접합시킬 수 있는데, 이러한 항체-수용체 접합체는 환자에게 투여한 다음, 제거제를 이용하여 순환시 결합되지 않은 접합체를 제거한 후, 세포독성제 (예: 방사성뉴클레오타이드)과 접합시킨 "리간드" (예: 아비딘)을 투여한다.

<566> VIII. 항-Robo4 항체를 이용한 치료 방법

<567> 본 발명의 항-Robo4 항체 (예를 들어, 있는 그대로의 항-Robo4 항체 및 ADC 포함)를 사용하여, 예를 들어 종양 또는 혈관형성 관련 항원 (예: Robo4)의 과발현을 특징으로 하는 각종 질병 또는 장애를 치료할 수 있는 것으로 고려된다. 과증식성 장애의 예시되는 질환에는 암, 고형 종양 및 전이와 연관된 (예를 들어, 해당 장애를 경험한 조직 내에서의 내피 세포 증식에 의해 증대된) 혈관형성 및 장애, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 예를 들어 증식성 망막병증, 예를 들면 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 및 건선을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 장애에 있어서 비정상적이거나 불필요한 내피 세포 증식, 예를 들어 비정상적이거나 불필요한 혈관 세포 증식과 연관된 병리학적 질환이 포함된다.

<568> 동물 모델 및 세포에 의거한 검정에서 확인되는 항-Robo4 항체 및 ADC 화합물은 종양을 보유하고 있는 고등 영장류 및 인간 임상 시험에서 추가로 시험할 수 있다. 인간 임상 시험은 암, 고형 종양 및 전이와 연관된 (예를 들어, 해당 장애를 경험한 조직 내에서의 내피 세포 증식에 의해 증대된) 혈관형성 및 장애, 아테롬성 경화증, 후수정체 섬유증증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 질환, 예를 들어 증식성 망막병증, 예를 들면 당뇨병성 망막병증, 연령 관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부반응, 류마티스성 관절염, 및 건선을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 장애에 있어서 비정상적이거나 불필요한 내피 세포 증식, 예를 들어 비정상적이거나 불필요한 혈관 세포 증식과 연관된 병리학적 질환을 포함하지만, 그에 제한되지 않는 세포 증식성 장애를 경험한 환자에서 본 발명의 항-Robo4 모노클로날 항체 또는 면역접합체의 효능을 시험하도록 설계할 수 있다. 임상 시험은 공지된 치료적 섭생, 예를 들어 공지된 화학요법제 및/또는 세포독성제를 포함한 화학요법 및/또는 방사선과 병용한 항-Robo4 항체의 효능을 평가하도록 설계할 수 있다.

<569> 암은 Robo4-발현성 세포를 포함할 수 있으므로, 본 발명의 항-Robo4 항체는 암 조직 내의 Robo4-발현성 내피 세포와 결합할 수 있다. 암에서의 Robo4 발현을 결정하기 위하여, 각종 진단/예후 검정을 이용할 수 있다. 한 양태에서, Robo4 과발현은 IHC에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀-봉매된 조직 박편을 대상으로 하여 IHC 검정을 수행할 수 있고, 이는 염색 정도와 조사된 종양 세포의 비율과 관련하여 Robo4 단백질 염색 세기 기준에 부합되었다. 한 양태에서, Robo4 과발현은 생체 내에서 Robo4-발현성 세포와 접촉된 검출가능한 마커로 표지된 항-Robo4 항체의 생체내 또는 시험관내 검출에 의해 분석할 수 있다. 검출가능한 마커에는 방사성 동위원소, 형광성 화합물, 금속성 및/또는 자기 나노입자, 마이크로버블, 킬레이트 리간드, 및 본원에 기재된 바와 같은 기타 검출가능한 마커가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

<570> 질병을 예방 또는 치료하기 위한 항-Robo4 항체의 적당한 투여량은 상기 규정된 바와 같은 치료하고자 하는 질병의 유형, 분자가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되는지 간에 질병의 중증도 및 과정, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 분자는 환자에게 1회 투여하거나 치료 전 기간에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 질병의 유형과 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속적 주입에 의해서든 간에, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예: 0.1 내지 20 mg/kg)의 분자가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 전형적인 1일 투여량 범위는 상기 언급된 요인들에 따라서 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 환자에게 투여될 ADC의 예시 투여량은 약 0.1 내지 약 10 mg/환자 체중 kg의 범위이다.

<571> 상태에 따라서 수일에 걸쳐 반복 투여하는 경우의 치료는 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 예시되는 투여 섭생은 항-Robo4 항체 약 4 mg/kg의 초기 부하 용량을 투여한 다음, 매주 약 2 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 기타 투여량 섭생도 유용할 수 있다. 또 다른 양태에서, 투여량 범위는 275 내지 375 mg/m²이다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링한다.

<572> A. 항-Robo4 항체의 투여

<573> 본 발명의 항-Robo4 항체 (및 보조 치료제)는 치료하고자 하는 질환에 적당한 모든 경로, 예를 들어 비경구, 피하, 복강내, 폐내, 및 비내 투여하고, 국소적으로 치료하고자 하는 경우에는, 병변내 투여할 수 있다. 항-Robo4 항체는 전형적으로, 비경구적으로 투여할 것인데, 즉 주입, 피하, 근육내, 정맥내, 폐내, 수막강내,

경막, 동맥내 및 복강내 투여할 것이다. 또한, 항체는, 특히 항체 용량을 감소시키면서 펄스 주입에 의해 투여하는 것이 적합하다. 부분적으로는 투여가 단기인지 만성인지에 따라서, 예를 들어 주사에 의한 적합한 모든 경로, 예를 들면 정맥내 또는 피하 주사에 의해 투여할 수 있다.

<574> 혈관형성이 일어나는 암 또는 모든 질병의 경우에는, 항-Robo4 항체 또는 항체-약물 접합체를 정맥내 주입을 통하여 투여한다. 주입을 통하여 투여된 투여량은 1회분당, 일반적으로 주당 총 1회, 2회, 3회 또는 4회분에 대한 1회분당 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $10,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 범위이다. 또 다른 한편, 투여량 범위는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 또는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다. 용량은 1일 1회, 매주 1회, 매주 수회로 투여할 수 있지만, 1일 1회 미만, 1개월에 수회, 또는 매주 1회 미만, 1개월에 1회, 또는 해당 질병의 증상을 경감 또는 완화시키도록 간헐적으로 투여할 수 있다. 투여는 치료하고자 하는 질병 또는 장애의 증상이 저하, 완화 또는 제거될 때까지 [예를 들어, 종양의 수축, 림프종, 백혈병 증상의 저하 또는 제거, 원발성 종양의 수축없이 전이성 확산의 억제 (즉, 질병 진행이 없는 생존), 안구 신생혈관증식의 억제로써 표시된 바와 같음] 상기 언급된 간격으로 지속할 수 있다. 투여는 증상의 차도 또는 구체가 달성된 후에도 지속할 수 있는데, 이러한 차도 또는 구체는 지속된 투여에 의해 연장된다.

<575> 본 발명은 또한, 다음 장애로 인해 고통받고 있는 환자에게, 전술된 양태 중의 어느 하나의 항-Robo4 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 (항체는 세포독성 분자 또는 검출가능한 분자와 접합되지 않는다), 암, 및/또는 암의 전이, 및/또는 혈관 내피 세포의 증식을 특징으로 하는 안과 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 항체는 전형적으로, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 투여량 범위로 투여할 것이다. 또 다른 한편, 투여량 범위는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 또는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다.

<576> 본 발명은 또한, 다음 장애로 인해 고통받고 있는 환자에게, 전술된 양태 중의 어느 하나의 항-Robo4 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 (항체는 세포독성 분자 또는 검출가능한 분자와 접합된다), 암, 및/또는 암의 전이, 및/또는 혈관 내피 세포의 증식을 특징으로 하는 안과 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 항체는 전형적으로, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 투여량 범위로 투여할 것이다. 또 다른 한편, 투여량 범위는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 약 $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$, 또는 약 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 내지 약 $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 이다.

<577> B. 제약 제형

<578> 한 국면에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 항-Robo4 항체 및/또는 그의 하나 이상의 면역접합체 및/또는 본 발명의 하나 이상의 항-Robo4 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제형을 추가로 제공한다. 몇몇 양태에서, 제약 제형은 1) 항-Robo4 항체 및/또는 항-Robo4 항체-약물 접합체 및/또는 그의 면역접합체, 및 2) 제약상 허용 가능한 담체를 포함한다. 몇몇 양태에서, 제약 제형은 1) 항-Robo4 항체 및/또는 그의 면역접합체, 및 임의로, 2) 한 가지 이상의 부가의 치료제를 포함한다.

<579> 본 발명의 항체 또는 면역접합체 또는 본 발명의 항체-약물 접합체를 포함하는 제약 제형은, 목적하는 순도를 지닌 항체 또는 항체-약물 접합체를 임의의 생리적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합하여, 수성 용제, 동결건조되거나 기타 건조된 제형 형태로 저장하기 위해 제조한다. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이에 는 완충제, 예를 들어 인산염, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예: 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당, 예를 들어 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 염 형성 반대-이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물 (예: Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예를 들어 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에

틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다. 생체내 투여에 사용하고자 하는 제약 제형은 일반적으로 멸균성이다. 이는 멸균 여과 막을 통하여 여과시킴으로써 용이하게 달성된다.

<580> 활성 성분을, 예를 들어 액적형성 (coacervation) 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 미소캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴 미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐; 콜로이드상 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노-캡슐); 또는 매크로에멀션 내에 포착시킬 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

<581> 생체내 투여에 사용하고자 하는 제형은 멸균성이어야만 한다. 이는 멸균 여과 막을 통하여 여과시킴으로써 용이하게 달성된다.

<582> 지속 방출 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예에는 본 발명의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 미소캡슐 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 [예를 들면, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)], 폴리락티드 [참고: 미국 특허 제3,773,919호], L-글루탐산과 γ -에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체가 100일 간에 걸친 분자 방출을 가능케 하지만, 특성의 히드로겔은 보다 단기간 동안 단백질을 방출한다. 피막화된 항체 또는 면역접합체가 체내에 장시간 동안 잔존할 경우, 이들은 37°C 하 수분에 대한 노출 결과로서 변성 또는 응집되어, 생물학적 활성이 상실될 수 있고 면역원성 상의 변화가 가능해진다. 관련 기전에 따라서, 안정화를 위한 합리적 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 기전이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 설피히드릴 잔기를 변형시키고, 산성 용액으로부터 동결건조시키며, 수분 함량을 제어하고, 적당한 부가제를 사용하며 특이적 중합체 매트릭스 조성을 전개함으로써, 안정화를 달성시킬 수 있다.

<583> 본원에서의 제형은 치료하고자 하는 특별한 적응증에 대해 필요한 만큼의 한 가지 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 지닌 한 가지 이상의 활성 화합물을 함유할 수도 있다. 이러한 분자들은 의도한 목적에 유효한 양으로 병용해서 존재하는 것이 적합하다.

<584> C. 병용 요법

<585> 본 발명의 항-Robo4 항체는 병용 요법으로서의 투여 섭생 또는 제약 병용 제형에서, 항암 특성을 지닌 한 가지 이상의 부가 화합물과 병용할 수 있다. 제약 병용 제형 또는 투여 섭생의 한 가지 이상의 부가 화합물은 항-Robo4 항체 조성물에 대한 상보적 활성을 지니, 이들이 서로 불리한 영향을 미치지 않도록 하는 것이 바람직하다.

<586> 한 가지 이상의 부가 화합물은 화학요법제, 세포독성제, 사이토킨, 성장 억제제, 항호르몬제, 및 그의 조합물일 수 있다. 이러한 분자는 의도하는 목적에 대해 유효한 양으로 병용해서 존재하는 것이 적합하다. 본 발명의 항-Robo4 항체를 함유하는 제약 조성물은 또한, 치료적 유효량의 화학요법제, 예를 들어 투불린-형성 억제제, 토포이소머라제 억제제 또는 DNA 결합제를 포함할 수 있다.

<587> 한 국면에서, 제1 화합물은 본 발명의 항-Robo4 ADC이고, 한 가지 이상의 부가 화합물은 항-Robo4 이외의 치료적 항체 (있는 그대로의 항체 또는 ADC)이다. 한 양태에서, 한 가지 이상의 부가 화합물은 암 세포 표면 마커와 결합하는 항체이다. 한 양태에서, 한 가지 이상의 부가 화합물은 항-HER2 항체인 트라스투주마브 (trastuzumab) [예: Herceptin®, 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA]이다. 한 양태에서, 한 가지 이상의 부가 화합물은 항-HER2 항체인 페르투주마브 (pertuzumab) (Omnitarg™, 공급처: Genentech, Inc., South San Francisco, CA) [참고: US6949245]이다. 한 양태에서, 한 가지 이상의 부가 화합물은 항-VEGF 항체 (예: AVASTIN®, 공급처: Genentech, Inc.)이다. 한 양태에서, 한 가지 이상의 부가 화합물은 항체 (있는 그대로의 항체 또는 ADC)이고, 부가의 항체는 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 이상의 항체이므로, 이러한 제2, 제3, 제4, 제5, 제6 또는 그 이상의 항체 (있는 그대로의 항체 또는 ADC)의 조합물이 Robo4를 발현하는 조직에서 세포 증식성 질병을 치료하는 데에 효능이 있다.

<588> 기타 치료 섭생을 본 발명에 따라서 확인된 항암제의 투여와 병용할 수 있는데, 이에에는 방사선 요법 및/또는 골수 및 말초혈 이식제, 및/또는 세포독성제, 화학요법제 또는 성장 억제제가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

이러한 양태 중의 한 가지에서, 화학요법제는, 예를 들어 시클로포스파미드, 히드록시다우노루비신, 아드리아마이신, 독소루비신, 빈크리스틴 (ONCOVIN™), 프레드니솔론, CHOP, CVP, 또는 COP, 또는 면역요법제, 예를 들어 항-PSCA, 항-HER2 (예: HERCEPTIN®, OMNITARG™) 또는 항-VEGF (예: AVASTIN®) 등의 작용제 또는 작용제 조합물이다. 병용 요법은 동시 또는 순차적 섭생으로서 투여할 수 있다. 순차적으로 투여되는 경우에는, 병용물을 2회 이상 투여물로 투여할 수 있다. 병용 투여에는 별개의 제형 또는 단일 제약 제형을 사용하여 동시-투여하는 것과, 어느 한 순서로 순차적으로 투여하는 것 [2가지 (또는 모든) 활성제가 그들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 데에는 일정 시간이 소요된다]이 포함된다.

<589> 한 양태에서는, 항-Robo4 항체를 이용한 치료가 본원에서 확인된 항암제와, 하나 이상의 화학요법제 또는 성장억제제를 병용 투여 (이에는 상이한 화학요법제의 카테일을 동시-투여하는 것이 포함된다)하는 것을 포함한다. 화학요법제에는 탁산 (예: 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라사이클린 항생제가 포함된다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업자의 지시에 따라서 또는 전문의에 의해 실험적으로 결정된 바와 같이 사용할 수 있다. 상기 화학요법에 대한 제조 및 투여 스케줄은 또한 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD].

<590> 상기 동시 투여되는 작용제에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이며, 이는 새로이 확인된 작용제와 기타 화학요법제 또는 치료의 병용 작용 (상승 작용)으로 인해 낮아질 수 있다.

<591> 병용 요법은 "상승 작용"을 제공해줄 수 있고, "상승적"인 것으로 입증되었는데, 즉 활성 성분들을 함께 사용한 경우에 달성된 효과는 화합물을 개별적으로 사용하여 얻은 효과들의 합 보다 크다. 상승적 효과는 활성 성분들을 (1) 병용된 단위 투여 제형으로 동시-제형화하고 투여하거나 동시에 전달하거나; (2) 별개의 제형으로서 교대로 또는 나란히 전달하거나; 또는 (3) 몇몇 기타 섭생에 의할 경우에 획득할 수 있다. 교대 요법으로 전달한 경우에는, 화합물을, 예를 들어 별개의 주사기로 상이한 주사제로써 순차적으로 투여 또는 전달할 경우에 상승적 효과가 획득될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 동안에는 각 활성 성분의 유효 투여량을 순차적으로, 즉 일련으로 투여하는 반면, 병용 요법에서는 2가지 이상 활성 성분의 유효 투여량을 함께 투여한다.

<592> 질병을 예방 또는 치료하기 위한 본 발명의 항체의 적당한 투여량 (단독으로 사용되거나 또는 기타 작용제, 예를 들어 화학요법제와 병용해서 사용되는 경우)은 치료하고자 하는 질병의 유형, 항체의 유형, 항체가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되는지 간에 질병의 중증도 및 과정, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 항체는 환자에게 1회 투여하거나 치료 전 기간에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 질병의 유형과 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속적 주입에 의해서든 간에, 약 1 µg/kg 내지 15 mg/kg (예: 0.1 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 투여량 후보이다. 한 가지 전형적인 1일 투여량 범위는 상기 언급된 요인들에 따라서 약 1 µg/kg 내지 100 mg/kg 이상일 수 있다. 상태에 따라서 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우의 치료는 질병 증상이 목적하는 수준으로 억제될 때까지 지속한다. 한 가지 예시되는 항체의 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 그의 모든 조합)의 1회 이상 용량을 환자에게 투여할 수 있다. 이러한 용량을 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 투여할 수 있다 (예를 들어, 이로써 환자에게 약 2 내지 약 20회분, 예를 들어 약 6회분 용량의 항체가 투여된다). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 다음, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 예시되는 투여 섭생은 항체 약 4 mg/kg의 초기 부하 용량을 투여한 다음, 매주 항체 약 2 mg/kg의 유지 용량을 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 기타 투여량 섭생도 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링한다.

<593> IX. 표지된 항체 및 그의 용도

<594> 본 발명은 또한, 표지된 항-Robo4 항체를 제공한다. 표지된 항체는 진단 검정, 예를 들어 특이적 세포 또는 조직에서의 Robo4의 발현을 검출하기 위한 (예를 들어, 혈관형성, 신생혈관증식 및/또는 종양 혈관계를 영상화하기 위한) 시험관내, 생체외, 또는 생체내 검정에 유용할 수 있다. 몇몇 양태에서, 표지된 항체는 생체내 영상화 검정에 사용된다. 본 발명의 항-Robo4 항체는 이러한 항체에 공유 결합에 의해 부착될 수 있는 모든 표지 부분과 접합시킬 수 있다. 몇몇 양태에서, 본 발명의 항-Robo4 항체 (예를 들어, 시스테인 공학 처리시킨 항-Robo4 항체 포함)는 항체 상의 반응성 기, 예를 들어 반응성 리신 또는 시스테인 잔기를 통하여 항체에 공유 결합에 의해 부착시킨다. 반응성 시스테인 티올 기를 통한 공유 부착이 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Singh et al., *Anal. Biochem.* 304:147-15 (2002); Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad RX. (1991) *Chemical*

Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL].

- <595> 이와 같이 부착된 표지는 (i) 검출가능한 신호를 제공하거나; (ii) 예를 들어, FRET (형광 공명 에너지 전이)를 제공하기 위하여 제1 또는 제2 표지에 의해 제공된 검출가능한 신호를 변형시키기 위해 제2 표지와 상호 작용하거나; (iii) 항원 또는 리간드와의 상호 작용을 안정화시키거나 또는 결합 친화도를 증가시키거나; (iv) 전하, 소수성, 외형 또는 기타 물리적 파라미터에 의해 이동도, 예를 들어 전기영동 이동도 또는 세포 투과성에 영향을 미치거나; 또는 (v) 포획 부분을 제공하여 리간드 친화도, 항체/항원 결합성, 또는 이온성 복합체 형성을 조정하기 위한 기능을 할 수 있다.
- <596> 진단 적용하는 경우에는, 항체를 전형적으로, 검출가능한 부분으로 표지시킬 것이다. 일반적으로 다음 범주로 나눌 수 있는 수 많은 표지가 이용 가능하다:
- <597> (a) 몇몇 양태에서, 본 발명의 항-Robo4 항체는 방사성 동위원소 (방사성핵종), 예를 들어 ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{19}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At 또는 ^{213}Bi 로 표지시킨다. 방사성 동위원소 표지된 항-Robo4 항체는 Robo4를 발현하는 세포의 수용체 표적화 영상화에 유용하다 (예를 들어, 본 발명의 진단 용도, 예를 들면 종양 내피 세포, 종양 혈관계, 혈관형성 및 신생혈관증식의 생체내 영상화에 사용하는 데에 유용하다).
- <598> (b) 몇몇 양태에서, 항-Robo4 항체는 방사성 동위원소 금속과 결합하거나, 킬레이트하거나 또는 착화되는 리간드 시약으로 표지시키는데, 이러한 시약은 다음 문헌에 기재된 기술을 사용하여 항체의 공학 처리시킨 시스템인 티올과 반응성이다 [참고: *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)]. 금속 이온과 착화될 수 있는 킬레이트 리간드에는 DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA 및 TETA (공급처: Macrocyclics, Dallas, TX)가 포함된다. 킬레이트 링커 시약, 예를 들어 DOTA-말레이미드 (4-말레이미도부티르아미도벤질-DOTA)은 문헌 [참고: Axworthy et al. (2000) *PNAS USA* 97(4):1802-1807]의 과정에 따라서 아미노벤질-DOTA를, 이소프로필클로로포르메이트 (공급처: Aldrich)로 활성화시킨 4-말레이미도부티르산 (공급처: Fluka)과 반응시킴으로써 제조할 수 있다. DOTA-말레이미드 시약은 시스템인 공학 처리시킨 항체의 자유 시스템인 아미노산과 반응하고, 항체 상에 금속 착화 리간드를 제공한다 [참고: Lewis et al., *Bioconj. Chem.* 9:72-86 (1998)]. 킬레이트 링커 표지화 시약, 예를 들어 DOTA-NHS (1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 모노 (N-히드록시석신이미드 에스테르)는 시판중이다 (공급처: Macrocyclics, Dallas, TX). 방사성 핵종은 본 발명의 항체-약물 접합체와의 복합체 형성을 통하여 표적화될 수 있다 [참고: Wu et al. *Nature Biotech.* 23(9):1137-1146 (2005)]. 방사성 핵종 표지된 항체를 이용하여 수용체 표적 영상화하면, 종양 조직 내에서의 항체의 점진적인 축적을 검출 및 정량화함으로써 증가된 표적 발현 마커를 제공할 수 있다 [참고: Albert et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210 (1998)]. 접합된 방사성-금속은 라이소솜성 분해 후에 세포내에 잔존할 수 있다.
- <599> 영상화 실험을 위한 항체 표지로서 적합한 금속-킬레이트 착물은 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al.(1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares et al., *Anal. Biochem.* 142:68-78 (1984); Mirzadeh et al., *Bioconjugate Chem.* 1:59-65 (1990); Meares et al., *J. Cancer, Suppl.* 10:21-26 (1990); Izard et al., *Bioconjugate Chem.* 3:346-350 (1992); Nikula et al., *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90 (1995); Camera et al., *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62 (1993); Kukis et al., *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110 (1998); Verel et al., *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670 (2003); Camera et al., *J. Nucl. Med.* 21:640-646 (1994); Ruegg et al., *Cancer Res.* 50:4221-4226 (1990); Verel et al., *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670 (2003); Lee et al., *Cancer Res.* 61:4474-4482 (2001); Mitchell, et al., *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112 (2003); Kobayashi et al., *Bioconjugate Chem.* 10:103-111 (1999); Miederer et al., *J. Nucl. Med.* 45:129-137 (2004); DeNardo et al., *Clinical Cancer Research* 4:2483-90 (1998); Blend et al., *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363 (2003); Nikula et al., *J. Nucl. Med.* 40:166-76 (1999); Kobayashi et al., *J. Nucl. Med.* 39:829-36 (1998); Mardirossian et al., *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74 (1993); Roselli et al., *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20 (1999)].
- <600> (c) 몇몇 양태에서, 본 발명의 항-Robo4 항체는 형광성 표지, 예를 들어 희토류 킬레이트 (예우로퓸 킬레이트), 플루오레세인 유형, 예를 들어 FITC, 5-카복실플루오레세인, 6-카복시 플루오레세인; 로다민 유형, 예를 들어 TAMRA; 단질, 리사민 (Lissamine); 시아닌; 피코에리트린; 텍사스 레드 (Texas Red); 및 그의 유사체로 표지시킨다. 형광성 표지는, 예를 들어 문헌 [*Current Protocols in Immunology*, 상기 참고]에 기재된 기술을 사용

하여 항체에 접합시킬 수 있다. 형광성 염료 및 형광성 표지 시약에는 공급처 [Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) and Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)]로부터 시판중인 것이 포함된다.

- <601> (d) 몇몇 양태에서, 본 발명의 항-Robo4 항체는 입수 가능하거나 보고된 (미국 특허 제4,275,149호) 각종 효소-기질 표지로 표시시킨다. 효소는 일반적으로, 각종 기술을 사용하여 측정할 수 있는 발색 기질의 화학적 변형을 촉매한다. 예를 들어, 효소는 기질에서의 색상 변화를 촉매할 수 있는데, 이는 분광광도계를 이용하여 측정할 수 있다. 또 다른 한편, 효소는 기질의 형광 또는 화학발광을 변경시킬 수 있다. 형광 상의 변화를 정량화하는 기술이 상기 언급되어 있다. 화학발광성 기질은 화학적 반응에 의해 전자적으로 여기된 다음, 예를 들어 화학발광계를 사용하여 측정할 수 있는 빛을 방출하거나 에너지를 형광 수용체에 기증할 수 있다. 효소적 표지의 예에는 루시페라제 (예를 들어, 개뿔벌레 루시페라제 및 세균성 루시페라제; 참고: 미국 특허 제4,737,456호), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데히드로게나제, 우레아제, 퍼옥시다제, 예를 들어 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알킬리성 포스파타제 (AP), β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 당류 옥시다제 (예: 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제), 헤테로사이클릭 옥시다제 (예: 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등이 포함된다. 효소를 항체에 접합시키는 기술은 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: O'Sullivan et al. (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzym.* (Ed., J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166].
- <602> 효소-기질 조합물의 예에는, 예를 들어 다음이 포함된다:
- <603> (i) 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)와 기질로서의 수소 퍼옥시다제의 조합물 [여기서는, 수소 퍼옥시다제가 염료 전구체 (예: 오르토포페닐렌 디아민 (OPD) 또는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 히드로클로라이드 (TMB))를 산화시킨다];
- <604> (ii) 알칼리성 포스파타제 (AP)와 발색 기질로서의 파라-니트로페닐 포스페이트의 조합물; 및
- <605> (iii) β -D-갈락토시다제 (β -D-Gal)와 발색 기질 (예: p-니트로페닐- β -D-갈락토시다제) 또는 형광발생 기질 4-메틸움벨리페릴- β -D-갈락토시다제의 조합물.
- <606> 당업자는 수 많은 기타 효소-기질 조합물을 입수할 수 있다. 이들에 관한 일반적인 고찰을 위해, 미국 특허 제4,275,149호 및 제4,318,980호를 참고할 수 있다.
- <607> 표지를 항-Robo4 항체 (예를 들어, 시스템 공학 처리된 항-Robo4 항체 포함)와 간접적으로 접합시킬 수 있다. 예를 들어, 항-Robo4 항체를 바이오틴과 접합시키고, 상기 언급된 3 가지 광범위한 범주의 표지 중의 어느 하나를 아비딘 또는 스트렙타비딘과 접합시킬 수 있는데, 그 반대의 경우도 가능하다. 바이오틴은 스트렙타비딘과 선택적으로 결합하므로, 표지를 이러한 간접 방식으로 항-Robo4 항체와 접합시킬 수 있다. 또 다른 한편, 표지를 항-Robo4 항체와 간접적으로 접합시키기 위해, 항-Robo4 항체를 작은 합텐 [예: 디곡신 (digoxin)]과 접합시키고, 상기 언급된 상이한 유형의 표지 중의 하나를 항-합텐 폴리펩티드 변이체 (예: 항-디곡신 항체)와 접합시킨다. 이로써, 표지와 항-Robo4 항체와의 간접적 접합이 달성될 수 있다 [참고: Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego].
- <608> 본 발명의 항-Robo4 항체는 공지된 모든 검정 방법, 예를 들어 ELISA, 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드위치 검정, 및 면역침전 검정에 이용할 수 있다 [참고: Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc.)].
- <609> 본 발명의 표지된 항-Robo4 항체는 세포-표면 수용체를 검출할 수 있고, 내피 세포 (예: 종양 내피 세포), 혈관 형성 부위, 신생혈관증식 부위 및/또는 종양 혈관계를 국재화, 가시화 및 정량화하는 데에 유용하다. 검출 가능하게 표지된 항체에 대한 또 다른 용도는 비드를 형광성 표지된 항체와 접합시키고, 리간드의 결합시 형광 신호를 검출하는 것을 포함하는, 비드에 의거한 면역포획 방법이다. 유사한 결합 검출 방법론은 항체-항원 상호작용을 측정 및 검출하기 위한 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 효과를 활용한다. 본 발명의 검출 가능하게 표지된 항-Robo4 항체는 공지된 모든 검정 방법, 예를 들어 ELISA, 경쟁적 결합 검정, 직접 및 간접 샌드위치 검정, 및 면역침전 검정에 이용할 수 있다 [참고: Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.].
- <610> 검출 표지, 예를 들어 형광성 염료 및 화학발광성 염료 [참고: Briggs et al., *J. Chem. Soc.*, Perkin-Trans. 1:1051-1058 (1997)]은 검출가능한 신호를 제공해주고 일반적으로 항체를 표지화시키는 데에 적용 가능하며, 바람직하게는 다음 특성을 지니고 있다: (i) 표지된 항체는 낮은 배경을 지니면서도 극히 높은 신호를 생성시켜

세포-무함유 검정과 세포에 의거한 검정 둘 다에서 소량의 항체라도 민감하게 검출할 수 있어야 하고; (ii) 표지된 항체는 광안정적이어서 상당한 광 표백없이도 형광성 신호를 관찰하고, 모니터링하며 기록할 수 있어야 한다. 표지된 항체를 막 또는 세포 표면, 특히 생체 세포에 세포 표면 결합시키는 것과 관련한 적용의 경우에는, 표지가 바람직하게는 (iii) 유효한 접합체 농도와 검출 감도를 달성하기에 우수한 수 용해도를 지니고, (iv) 세포의 정상적인 대사 과정을 붕괴시키지 않거나 미성숙 세포 사멸을 유발시키지 않도록 생체 세포에 대해 비독성이다.

<611> 세포성 형광 세기를 직접적으로 정량화하고, 형광적으로 표지시킨 사건, 예를 들어 펩티드-염료 접합체의 세포 표면 결합을 계산하는 것은 생체 세포 또는 비드를 이용하는 믹스-앤-리드 (mix-and-read), 비-방사성 검정을 자동화하는 시스템 (FMAT[®] 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 상에서 수행할 수 있다 [참고: Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204]. 표지된 항체의 용도에는 또한, 세포 표면 수용체 결합 검정, 면역포획 검정, 형광 연결 면역흡착 검정 (FLISA), 카스파타제-절단 [참고: Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) PNAS USA 95:618-23; 미국 특허 제6,372,907호], 세포소멸 [참고: Vermes, J. Immunol. Methods 184:39-51 (1995)] 및 세포독성 검정이 포함된다. 형광측정 미소용적 검정 기술을 사용하여 세포 표면을 표적화하는 분자에 의한 상향 조절 또는 하향 조절을 확인할 수 있다 [참고: Swartzman, Anal. Biochem. 271:143-51(1999)].

<612> 본 발명의 표지된 시스템인 공학 처리시킨 항체는 각종 생물 의학적 및 분자상 영상화 방법 및 기술, 예를 들어 (i) MRI (자기 공명 영상화); (ii) X-선 컴퓨터 단층촬영술; (iii) SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술); (iv) PET (양전자 방출 단층촬영술) [참고: Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49]; (v) 생물발광; (vi) 형광; 및 (vii) 초음파에 의한 조영 바이오마커 및 프로브로서 유용하다. 면역형광조영술은 방사성 물질로 표지시킨 항체를 동물 또는 인간 환자에게 투여하고, 항체가 국재되는 신체 부위 (예를 들어, 종양 혈관계를 포함한 종양, 또는 그의 전이)의 사진을 찍는 영상화 과정이다 [참고: US 6528624]. 조영 바이오마커는 객관적으로 측정할 수 있고, 정상적인 생물학적 과정, 발병 과정, 또는 치료적 시술에 대한 약리학적 반응의 지표로서 평가할 수 있다. 바이오마커는 여러 가지 유형일 수 있다: 유형 0은 천연 병력 마커이고, 공지된 임상 지수, 예를 들어 류마티스성 관절염에서 활막 염증의 MRI 평가와 장기적으로 상관 관계가 있다; 유형 I 마커는 작용 기전이 임상적 결과와 연관이 없을 수도 있긴 하지만, 이러한 작용 기전에 따라서 시술 효과를 포착한다; 유형 II 마커는 바이오마커 상의 변화 또는 이러한 마커로부터의 신호가 표적화 반응, 예를 들어 평면 X-선, MRI 또는 CT에 의한 류마티스성 관절염 상의 측정된 골 침식을 "검증하기" 위한 임상적 유익을 예측하는 대리 종말점으로서 기능한다. 따라서, 조영 바이오마커는 (i) 표적 단백질의 발현, (ii) 표적 단백질에 대한 치료제의 결합성, 즉 선택도, 및 (iii) 청소율 및 반감기 약동학적 데이터에 관한 약력학적 (PD) 치료 정보를 제공할 수 있다. 실험실에 의거한 바이오마커와 비교해서 생체내 조영 바이오마커의 이점에는 비-침습성 처치, 정량화 가능한 전신 평가, 반복적인 투약 및 평가, 즉 다수의 시점, 및 전임상 결과 (소형 동물)에서 임상 결과 (인간)로 잠재적으로 전이 가능한 결과가 포함된다. 몇몇 적용의 경우에는, 생체 영상화가 전임상 연구시 동물 실험 횟수를 최소화시켜 주거나 이를 대신한다.

<613> 펩티드 표지화 방법이 널리 공지되어 있다 [참고: Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al. (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al. (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al. (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al.(2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237].

<614> 2개의 부분, 즉 형광성 리포터 및 켄처로 아주 근접하여 표지시킨 펩티드 및 단백질은 형광 공명 에너지 전이 (FRET)를 진행한다. 리포터 기는 전형적으로, 특정의 파장에서 빛에 의해 여기되고, 에너지를 수용체 기 또는 켄처 기로 전이시켜 주는 형광성 염료인데, 최대 밝기에서 방출하기 위한 적당한 스톱스 이동을 수반한다. 형

광성 염료에는 방향족성이 연장된 분자, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민, 및 그의 유도체가 포함된다. 형광성 리포터는 본래의 펩티드 내의 켄처 부분에 의해 부분적으로 또는 상당히 켄칭될 수 있다. 펩티드를 펩티다제 또는 프로테아제에 의해 절단시키면, 검출가능한 수준으로 형광 상의 증가가 측정될 수 있다 [참고: Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34].

<615> 본 발명의 항-Robo4 표지된 항체는 친화도 정제 작용제로서 사용할 수도 있다. 이러한 과정에서는, 당해 분자에 널리 공지된 방법을 사용하여 표지된 항체를 고체 상, 예를 들어 세파덱스 (Sephadex) 수지 또는 필터지 상에 고정화시킨다. 이와 같이 고정화시킨 항체는 정제시키고자 하는 항원을 함유하는 샘플과 접촉시킨 후, 지지체를 적합한 용매로 세척시키는데, 이러한 용매는 고정화 항체와 결합되는 정제될 항원을 제외하고는 샘플 내의 실질적으로 모든 물질을 제거시킬 것이다. 최종적으로, 지지체를 또 다른 적합한 용매, 예를 들어 글리신 완충액 (pH 5.0)으로 세척시키는데, 이로써 항원이 항체로부터 방출될 것이다.

<616> 표지화 시약은 전형적으로, (i) 시스테인 공학 처리시킨 항체의 시스테인 티올과 직접적으로 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있거나, (ii) 링커 시약과 반응하여 링커-표지 중간체를 형성할 수 있거나, 또는 (iii) 링커 항체와 반응하여 표지된 항체를 형성할 수 있는 반응성 관능기를 보유하고 있다. 표지화 시약의 반응성 관능기에는 말레이미드, 할로아세틸, 요오도아세트아미드 석신이미드 에스테르 (예: NHS, N-히드록시석신이미드), 이소티오시아네이트, 설포닐 클로라이드, 2,6-디클로로트리아지닐, 펜타플루오로페닐 에스테르, 및 포스포르아미다이트가 포함되지만, 기타 관능기를 사용할 수도 있다.

<617> 예시되는 반응성 관능기는 검출가능한 표지, 예를 들어 바이오틴 또는 형광성 염료의 카복실 기 치환체의 N-히드록시석신이미드 에스테르 (NHS)이다. 표지의 NHS 에스테르를 미리 형성시키고, 단리하며, 정제하고/하거나 특성화할 수 있거나, 또는 이를 계내에서 형성시키고 항체의 친핵기와 반응시킬 수 있다. 전형적으로, 카복실 형태의 표지는 카보디이미드 시약, 예를 들어 디시클로헥실카보디이미드, 디이소프로필카보디이미드, 또는 우로늄 시약, 예를 들어 TSTU (O-(N-석신이미드)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트, HBTU (O-벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트), 또는 HATU (O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, 활성인자, 예를 들어 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt), 및 표지의 NHS 에스테르를 제공하기 위한 N-히드록시석신이미드의 몇몇 조합물과 반응시킴으로써 활성화시킨다. 몇몇 경우에는, 표지를 계내 활성화시키고 항체와 반응시켜 표지-항체 접합체를 1 단계로 형성시킴으로써 표지와 항체를 커플링시킬 수 있다. 기타 활성화 및 커플링 시약에는 TBTU (2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트), TFFH (N,N',N'',N'''-테트라메틸우로늄 2-플루오로-헥사플루오로포스페이트), PyBOP (벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트), EEDQ (2-에톡시-1-에톡시카보닐-1,2-디히드로퀴놀린), DCC (디시클로헥실카보디이미드); DIPCDI (디이소프로필카보디이미드), MSNT (1-(메시틸렌-2-설포닐)-3-니트로-1H-1,2,4-트리아졸, 및 아릴 설포닐 할라이드, 예를 들어 트리이소프로필벤젠설포닐 클로라이드가 포함된다.

<618> 본 발명의 검출 가능하게 표지된 항체는 자기 입자 또는 나노입자 또는 금속성 입자 또는 나노입자와 연결됨으로써 (이와 공유 결합에 의해 접합되는 것 포함) 검출 가능해질 수 있다. 금속성 입자는 자기 공명 영상화 (MRI), 단일-입자 또는 단일-분자 트래킹, 면역세포화학, 암시야 조명을 수반한 플라스몬 주파수, 시차 간섭 조명 및 비디오 증강, 총 내부 반사, 및 광열 간섭 조명 (PIC) 기술과 같은 방법에 의해 검출 가능하다 [참고: 예를 들어, *PNAS USA* 100(20):11350-11355 (2003); Sheetz et al., *Nature* 340:284-288 (1989); Baschong et al., *Histochemistry* 83:409-411 (1985); Slot and Geuze, *Eur. J. Cell Biol.* 38:87-93 (1985); Frey and Frey, *J. Struct. Biol.* 127:94-100 (1999); Hainfeld and Powell, *J. Histochem. Cytochem.* 48:471-480 (2000); Schultz et al., *PNAS USA* 97:996-1001 (2000); Gelles et al., *Nature* 331:450-453 (1988); Sonnichsen et al., *Appl Phys. Lett.* 77:2949-2951 (2000); Boyer et al., *Science* 297:1160-1163 (2002)]. 본 발명의 항-Robo4 항체는 음향적으로 활성인 지질구 (AAL)로서 지칭되기도 하는 [참고: Tartis et al., *Ultrasound Med. Biol.* 32(11):1771-80 (2006)] 마이크로버블 [참고: Ellegala et al., *Circulation* 108:336-341 (2003)], 초상자성 작용제, 리소솜, 퍼플루오로카본 나노입자 에멀션 [참고: WO 2005104051], 및 덴드리머 [참고: Caruthers et al., *Methods in Molecular Medicine*, 124:387-400 (2006) 및 그 내부에 인용된 문헌]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는 나노미립형 작용제를 포함할 수 있다 [상기 문헌 모두는 전문이 본원에 참고로 도입된다].

<619> 표지된 항-Robo4 항체를 검출을 위해 사용하는 경우 (예를 들어, 섬광조영술 연구에 사용하는 경우), 표지는 방

사성 원소 (예: At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹⁶ 및 Lu의 방사성 동위원소) 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화 mri로서 공지되기도 함)를 위한 스핀 표지, 예를 들어 Tc^{99m}, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹⁹F, ¹H, ¹⁴N, ¹⁵N, ¹⁷O, ²³Na, ³¹P 또는 ¹³C, 가돌리늄, 망간, 철, 또는 산화철 [예: 초상자성 산화철 입자 (SPIL) 초소형 상자성 산화철 입자 (USPIL)], 또는 기타 NMR 관찰 가능한 작용제를 포함할 수 있다.

<620> X. 제조품

<621> 본 발명의 또 다른 국면에서는, 상기 언급된 장애를 치료, 예방 및/또는 진단하는 데에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 본 발명의 제조품은 용기, 및 이러한 용기와 연합되거나 그 위의 표지 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는 데에 유효한 조성물 만을 보유하고 있거나, 또는 이러한 조성물을 상기와 같이 유효한 또 다른 조성물과 병용해서 보유하고 있고, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 항체이다. 표지 또는 패키지 삽입물은 해당 조성물이 선택 질환, 예를 들어 암을 치료하는 데에 사용된다는 것을 표시한다. 더욱이, 본 발명의 제조품은 (a) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함한다); 및 (b) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (이 조성물은 추가의 세포 독성제를 포함한다)를 포함할 수 있다. 이러한 본 발명의 양태에서의 제조품은 상기 제1 및 제2 항체 조성물을 사용하여 특별한 질환, 예를 들어 암을 치료할 수 있다는 것을 표시한 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 본 발명의 제조품은 제약상 허용 가능한 완충제, 예를 들어 제균성 주사용 수 (BWWI), 인산염 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들어 기타 완충액, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 추가로 포함할 수 있다.

<622> 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제공된 일반적인 설명이 제시되는 한, 각종의 기타 양태들이 실시될 수 있다는 것을 인지해야 한다.

실시예

<623> 항체 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기는 카바트에 따라서 넘버링된다 [참고: Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. 단일 문자 아미노산 약어가 사용된다. DNA 축되는 IUB 코드를 사용하여 나타낸다 (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

<624> 실시예 1: 출발 항체의 추가변 영역을 암호화하는 파아지로부터 유래된 항체

<625> HERCEPTIN[®] 항-HER2 항체 rhuMAB 4D5-8 (공급처: Genentech, Inc.)의 VL 및 VH 도메인의 핵산 서열을, HVR의 돌연변이 유발을 위한 출발 서열 및 도 5B에 도시된 인간 Robo4 His-태그화 항원 또는 인간 Robo4-Fc 융합 단백질과의 결합에 대한 파아지 선별을 위한 출발 서열로서 사용하였다. 항체 4D5는 Her-2 (erbB2)로서 공지된 암 관련 항원에 대해 특이적인 인간화 항체이다. 이러한 항체에는 컨센서스 프레임워크 영역을 갖는 가변 도메인이 포함되는데; 수 개의 위치가 인간화 항체의 친화도를 증가시키는 과정 동안에 마우스 서열로 복귀되었다. 인간화 항체 4D5의 서열 및 결정 구조가 문헌 [참고: 미국 특허 제6,054,297호, Carter et al., *PNAS USA* 89:4285 (1992)]에 기재되었는데, 결정 구조는 문헌 [참고: *J. Mol. Biol.* 229:969 (1993)] 및 온라인 [www.ncbi.nih.gov/structure/mmdb(MMDB#s-990-992)]에 제시되어 있다. HERCEPTIN[®] VL 및 VH 도메인은 컨센서스 인간 카파 I VL 도메인 및 인간 아군 III 컨센서스 VH 도메인의 변이체를 각각 포함하고 있다. 변이체 VH 도메인은 인간 컨센서스로부터 3개의 변화물을 갖고 있다: R71A, N73T 및 L78A.

<626> 본 연구를 위해 사용된 파아지미드는, 특허 문헌 [참고: Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93]에 기재된 바와 같이, phoA 프로모터의 제어 하에 2개의 개방 판독 프레임 갖는 1가 Fab-g3 디스플레이 벡터 (pV0350-2B)이다. 제1 개방 판독 프레임은 수용체 경쇄의 VL 및 CH1 도메인과 융합된 stII 신호 서열로 이루어지고, 제2 개방 판독 프레임은 수용체 중쇄의 VH 및 CH1 도메인과 융합된 stII 신호 서열에 이어 절단된 소형 파아지 외피 단백질 P3으로 이루어진다 [참고: Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93].

<627> 실시예 2: 중쇄 HVR의 돌연변이 유발에 의해 생성된 항체

<628> Fab 클론 YW71.6, YW71.1, YW71.22, 및 YW71.89는 huMAb 4D5-8 (HERCEPTIN[®] 항-HER2 항체, 공급처: Genentech, Inc.) 중쇄의 HVR-H1, H2, 및 H3의 돌연변이 유발 및 인간 Robo4-His 태그화 항원 융합 단백질에 대항한 선별에 의해 생성되었다. HVR-H1에서는, 카바트 위치 26 (G), 27 (F), 28 (T), 29 (I), 34 (I), 및 35 (H)가 일정하게 유지되었고, 위치 30-33에서의 아미노산이 가변적이었다. HVR-H2에서는, 카바트 위치 51 (I), 52a (P), 55 (G), 57 (T), 59 (Y), 60 (A), 61 (D), 62 (S), 63 (V), 64 (K), 및 65 (G)가 일정하게 유지되었고, 위치 49, 50, 52, 53, 54, 56, 및 58이 가변적이었다. HVR-H3에서는, 카바트 위치 93 (A) 및 102 (Y)가 일정하게 유지되었고, 위치 94-100, 100a-h, 및 101이 가변적이었다. YW71.22의 경쇄는 변형된 huMAb 4D5-8 서열 (HVR-L1, L2, 및 L3으로서 각각 서열 1, 2 및 3을 포함하고, 위치 30, 66 및 91에서 변형되어 서열 168을 생성시킨다)이었고, 그의 HVR은 파아지 선별 동안 가변적이지 않았다. 표준 돌연변이 유발 기술을 사용하여 선별된 아미노산 위치를 돌연변이 유발시킴으로써, 서열 다양성을 각 초가변 영역 내로 도입하였다.

<629> **파아지 라이브러리의 생성** - 각 초가변 영역에 대해 설계된 무작위화 올리고뉴클레오타이드 풀은 660 ng의 올리고뉴클레오타이드, 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, 및 5 U 폴리뉴클레오타이드 키나제를 함유하는 6개의 20 μ l 반응물에서 37°C 하에 1시간 동안 별개로 인산화시켰다. 이어서, 이와 같이 인산화된 6개의 올리고뉴클레오타이드 풀을 최종 용적 500 μ l로 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂ 중의 20 μ g의 쿼켈 주형과 합하여 올리고뉴클레오타이드 대 주형 비가 3이 되도록 하였다. 혼합물을 90°C 하에 4분 동안, 50°C 하에 5분 동안 어닐링시킨 다음, 얼음 상에 냉각시켰다. 과량의 어닐링되지 않은 올리고뉴클레오타이드는 어닐링된 DNA의 과도한 변성을 방지하기 위하여 변형된 프로토콜을 이용하여 QIAQUICK[™] PCR 정제용 키트 (공급처: Qiagen kit 28106)로 제거하였다. 어닐링된 혼합물 500 μ l에 150 μ l의 PB를 가하고, 혼합물을 2개 실리카 칼럼 사이에 분할시켰다. 각 칼럼을 750 μ l의 PE로 세척하고 별도의 스핀을 가하여 칼럼을 건조시킨 후, 각 칼럼을 110 μ l의 10 mM 트리스, 1 mM EDTA, pH 8로 용출시켰다. 이어서, 어닐링되고 정화시킨 주형 (220 μ l)에 1 μ l 100 mM ATP, 10 μ l 25 mM dNTP (각각의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 25 mM), 15 μ l 100 mM DTT, 25 μ l 10 X TM 완충액 (0.5 M 트리스 pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 2400 U T4 리가제, 및 30 U T7 폴리머라제를 실온 하에 3시간 동안 가함으로써 상기 주형을 충전시켰다.

<630> 이와 같이 충전시킨 생성물을 트리스-아세트레이트-EDTA/아گار로스 겔 [참고: Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)] 상에서 분석하였다. 3개의 밴드가 통상적으로 가시적이었다: 바닥 밴드는 정확하게 충전되고 연결된 생성물이고, 중간 밴드는 충전되긴 하였지만 연결되지 않은 생성물이며, 상부 밴드는 가닥 전위된 생성물이다. 상부 밴드는 T7 폴리머라제의 고유 부차 활성화에 의해 생성되고 피하기가 어렵지만 [참고: Lechner et al., *J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983)], 이 밴드는 바닥 밴드 보다 30배 정도 덜 효율적으로 변환되고, 통상적으로 라이브러리에 거의 일조하지 않는다. 중간 밴드는 최종 연결 반응을 위한 5' 포스페이트의 부재에 기인하는데, 이러한 밴드는 효율적으로 변환되고 주로 야생형 서열을 제공해준다.

<631> 이어서, 충전된 생성물을 정제하고 SS320 세포 내로 전기천공시키며, 문헌 [참고: Sidhu et al., *Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)]에 기재된 바와 같이 M13/K07 헬퍼 (helper) 파아지의 존재 하에 증식시켰다. 라이브러리 크기는 1 내지 2 x 10⁹개 범위의 독립적인 클론이었다. 초기 라이브러리로부터의 무작위 클론을 서열 분석하여 라이브러리 질을 평가하였다.

<632> **파아지 선별** - 인간 Robo4-Fc 및 Robo4-His-태그화 단백질을 선별 항원으로서 사용하였다. 인간 Robo4-Fc 및 Robo4-His를 PBS 중에서 10 μ g/ml로 맥시소르프 (MaxiSorp) 미소역가 판 (Nunc) 상에 피복시키고, 4°C 하에 밤새 항온 배양하였다. 선별 제1 회전 동안에는 12개 웰의 표적을 사용하였다. 파아지 차단성 완충액 (1% BSA, 0.05% Tween[®] 20, PBS)을 사용하여 웰을 실온 하에 1시간 동안 차단시켰다. 파아지 라이브러리를 동결된 글리세롤 스톱으로부터 PEG 침전시키고, 파아지 차단성 완충액에 재현탁시킨 다음, 실온 하에 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 파아지 라이브러리를 실온 하에 밤새 항온 배양된 상기 차단된 항원 판에 가하였다. 밤새 결합시킨 후, 결합되지 않거나 비-특이적으로 결합된 파아지를 세척 완충액 (PBS, 0.5% Tween[®] 20)으로 세척함으로써 항원 판으로부터 제거하였다. 결합된 파아지는 웰을 50 mM HCl, 0.5 M KCl과 함께 30분 동안 항온 배양함으로써 용출시켰다. XL-1 블루 (Blue) 세포 및 M13/K07 헬퍼 파아지를 사용하여 파아지를 증폭시키고, 이를 2 YT, 50 μ g/ml 카르바네실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 μ g/ml 테트라사이클린 중에서 30°C 하에 36시간 동안 성장시켰다. 이어서, 변형된 PEG 침전 프로토콜 [참고: Clackson & Lowman 2004]을 사용하여, 상기 증폭

시킨 파아지를 회수하였다. 표적 피복된 웰로부터 용출된 파아지의 역가를 비-표적 피복된 웰로부터 회수된 파아지의 역가와 비교하여 증강을 평가하였다. 표적 웰의 수를 4 (2회전) 및 2 (3 및 4회전)로 감소시키면서 파아지 선별 4회전을 완료하였다. 카세인 차단성 완충액 (공급처: Pierce)을 항원 판에 대한 차단성 시약 및 2회전과 4회전에 대한 파아지로서 사용하였다. 선별 2회전 내지 4회전은 3 내지 4시간 파아지-항원 결합 기간을 사용하였고 세척 엄격도를 증가시켰다. 4개의 파아지 클론을 선별하였다: YW71.6, YW7.1, YW71.22, 및 YW71.89. 경쇄 및 중쇄 도메인의 서열을 결정하였고, 이는 도 1A 및 1B에 도시되어 있다. Robo4 결합 특징을 다음에 기재되는 바와 같이 결정하였다.

<633> 실시예 3: HVR H1, H2, H3 및 L3의 변이에 의해 생성된 항체

<634> 클론 YW79.1, YW79.8, 및 YW79.11은 huMAb 4D5-8 (HERCEPTIN[®] 항-HER2 항체, 공급처: Genentech, Inc.) 중쇄 가변 도메인 및 huMAb 4D5-8 변형된 경쇄 가변 도메인, 서열 168의 HVR-H1, H2, H3 및 L3을 돌연변이 유발시킴으로써 생성시켰다. HVR-H1에서는, 카바트 위치 26 (G), 28 (T), 29 (F), 30 (S), 31 (S), 및 35 (S)가 일정하게 유지되었고, 위치 27, 32-34에서의 아미노산이 가변적이었다. HVR-H2에서는, 카바트 위치 49 (S), 51 (I), 55 (G), 57 (T), 59 (Y), 60 (A), 61 (D), 62 (S), 63 (V), 64 (K), 및 65 (G)가 일정하게 유지되었고, 위치 50, 52, 52a, 53, 54, 56, 및 58이 가변적이었다. HVR-H3에서는, 카바트 위치 93 (A), 94 (R), 100f-g (결실)이 일정하게 유지되었고, 위치 95-100, 100a-e, 100h, 및 102가 가변적이었다. HVR-L3에서는, 카바트 위치 89 (Q), 90 (Q), 95 (P) 및 97 (T)이 일정하게 유지되었고, 위치 91-94 및 96이 가변적이었다. HVR-L1의 서열은 RASQSISSYLA (서열 7)로서 일정하게 유지되었고, HVR-L2의 서열은 GASSRAS (서열 8)로서 일정하게 유지되었다. 표준 돌연변이 유발 기술을 사용하여 선별된 아미노산 위치를 돌연변이 유발시킴으로써, 서열 다양성을 각 초가변 영역 내로 도입하였다. 항-Robo4 항체 클론 YW79.1, YW79.8, 및 YW79.11을 선별하고 서열 분석하였다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열이 도 1A 및 1B에 도시되어 있다.

<635> 실시예 4: 가용성 Robo4 및 항-Robo4 항체의 정제

<636> 본 실시예는 본 발명의 항-Robo4 항체 및 Robo4 항원의 정제에 유용한 방법을 기술하고 있다. Robo4 항원은 도 5B에 도시된 바와 같이 히스티딘 태그와 융합된 가용성 Robo4 세포의 도메인으로서 정제하였다.

<637> Robo4 항원 정제

<638> 인간 Robo4 구조물 (아미노산 M1 내지 아미노산 L461 및 아미노산 M1 내지 아미노산 Y231)을 인간 IgG1의 Fc 부분과의 융합물 또는 C-말단 히스티딘 태그와의 융합물로서 진핵성 발현 벡터 pRK5 내로 클로닝하였다. 유린 Robo4 (M1 내지 H232)을 단지 C-말단 히스티딘 태그와의 융합물로서 pRK5 내로 클로닝하였다. 모든 단백질은 CHO 세포를 일시적으로 형질감염시킴으로써 생성시켰다. Fc 융합 단백질의 경우에는 단백질-A 세파로즈[™] (공급처: GE Healthcare)를 사용하거나 또는 히스티딘 태그 융합물의 경우에는 NiNTA 슈퍼플로우 (Superflow[™]) (공급처: Qiagen)를 사용하여 친화 크로마토그래피함으로써 단백질을 >90% 순도로 정제하였다. 필요한 경우에는, 이온 교환 크로마토그래피 단계 (Q- 또는 SP-세파로즈[™], 공급처: GE Healthcare)를 가하고/가하거나 크기 배제 크로마토그래피 단계 (Superdex[™] 75, 공급처: GE Healthcare)를 가하였다. 에드만 (Edman) 분해 방법을 사용하여 N-말단 서열 분석함으로써 단백질 실체를 확증하고, BCA 검정 및 OD 280 흡광도 측정에 의해 농도를 결정하며, 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE에 의해 순도를 평가하였다.

<639> 항체 정제

<640> 완전한 길이의 Robo4 항체를 CHO 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질-A 세파로즈[™] (공급처: GE Healthcare)를 사용하여 친화 크로마토그래피한 다음, SP-세파로즈[™] (공급처: GE Healthcare)를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피함으로써 >95% 순도로 정제하였다. 필요한 경우에는, 부가의 크기 배제 크로마토그래피 단계 (Superdex[™] 200, 공급처: GE Healthcare)를 가하였다. 항체 농도는 제조업자의 지시 (Pierce Chemical Co.)에 따라서 BCA 검정에 의해 결정하고 OD 280 흡광도 측정에 의해 결정하며, 크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE에 의해 순도를 평가하였다. 모든 항체 정제에 대해서, 레이저 광 산란에 의해 결정된 바와 같이 응집체 수준이 5% 아래였고, 단백질 A ELISA에 의해 결정된 바와 같은 단백질 A 수준은 50 ppm 아래였으며, LAL (리몰러스 변형유주 세포 용해물) 발색 내독소 검정에 의해 결정된 바와 같은 내독소 수준은 0.5 EU/mg 아래였다.

<641> 실시예 5: YW71.22의 친화도 성숙

<642> 항-Robo4 항체 YW71.22의 친화도를 개선시키기 위하여, 3개의 파아지 디스플레이 라이브러리를 YW71.22의 배경

하에 생성시켰는데, 각각은 문헌 [참고: Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-93 (2004)]에 기재된 바와 같이 연결 무작위화 돌연변이 유발을 위해 다수의 HVR을 표적으로 한다. 주형의 잠재적 고 배경으로부터 YW71.22를 재선별하는 것을 피하기 위해, 각 라이브러리를 생성시키기에 앞서, 정지 코돈을 돌연변이될 HVR 내로 도입하였다. 용액 분류 방법을 사용하여 친화도에 의거한 파아지 선별 공정의 효율을 증강시켰다. 바이오티닐화 표적 농도를 조작하고, 파아지 포획 시간을 단축시켜 배경을 저하시키며 바이오티닐화되지 않은 표적을 부가하여 클론을 보다 신속한 이탈 속도로 제거시킴으로써, 고 친화도 클론을 능숙하게 선별할 수 있다 [참고: Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93]. 선별 제1 회전으로부터 증강 (표적 의존성 파아지 포획)이 관찰되었는데, 이는 다수의 클론이 인간 Robo4에 대한 상당한 고 친화도로 각 라이브러리에 존재하였다는 것을 제안하고 있다. 후속 회전에서는 선별 엄격도를 증가시켰다. 선별 5회전 후, 각 라이브러리로부터의 클론을 분석하였다. 6개의 HVR 각각을 표적으로 하는 라이브러리에서 새로운 서열이 관찰되었다 (도 2A 및 2B). 선별된 클론을 파아지 ELISA에 의해 스크리닝한 다음, IgG 단백질로서 발현시키고 Biacore™ 결합 분석을 이용하여 그들의 친화도를 특성화하였다.

<643> 고체/용액 분류 방법을 사용하여, 친화도 성숙된 클론의 파아지 라이브러리를 분류하였다. 인간 Robo4-His는 PBS 중의 500 μ l의 3.6 mg/ml 인간 Robo4-His 및 10 μ l의 1 M 인산칼륨, pH 8을 20 μ l 4 mM 설포-NHS-LC-바이오틴 (공급처: Pierce)과 혼합함으로써 바이오티닐화하였다. 선별 제1 회전 동안에는, 바이오티닐화 Robo4-His를 PBS 중에서 10 μ g/ml로 맥시소르프 미소역가 판 (Nunc) 상에 피복시키고, 4°C 하에 밤새 항온 배양하였다. 선별 제1 회전 동안에는 16개 웰의 표적을 사용하였다. 슈퍼블록 (SuperBlock) (공급처: Pierce)를 사용하여 웰을 실온 하에 1시간 동안 차단시켰다. 성숙 파아지 라이브러리를 슈퍼블록 완충액에서 희석시키고 실온 하에 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 파아지 라이브러리를 실온 하에 2시간 동안 항온 배양된 상기 차단된 항원 판에 가하였다. 결합시킨 후, 결합되지 않은 파아지 및 비-특이적으로 결합된 파아지를 세척 완충액 (PBS, 0.5% Tween® 20)으로 세척함으로써 항원 판으로부터 제거하였다. 결합된 파아지는 웰을 50 mM HCl, 0.5 M KCl과 함께 30분 동안 항온 배양함으로써 용출시켰다. XL-1 블루 세포 및 M13/K07 헬퍼 파아지를 사용하여 파아지를 증폭시키고, 이를 2 YT, 50 μ g/ml 카르바네실린, 50 μ g/ml 카나마이신, 10 μ g/ml 테트라사이클린 중에서 30°C 하에 36시간 동안 성장시켰다. 이어서, 변형된 PEG 침전 프로토콜 [참고: Clackson & Lowman 2004]을 사용하여, 증폭시킨 파아지를 회수하였다. 표적 피복된 웰로부터 용출된 파아지의 역가를 비-표적 피복된 웰로부터 회수된 파아지의 역가와 비교하여 증강을 평가하였다. 선별 2 내지 5회전 동안에는, 용액 분류 프로토콜을 이행하였다. 미소역가 웰을 4°C 하에 밤새 PBS 중의 10 μ g/ml 뉴트라비딘과 함께 피복시킨 다음, 슈퍼블록 (공급처: Pierce)을 사용하여 1시간 동안 차단시켰다. 회수된 파아지 라이브러리를 슈퍼블록에 현탁시키고 50 nM 바이오티닐화 Robo4-His와 1시간 동안 혼합시켰다. 바이오티닐화 Robo4-His와 결합된 파아지를 뉴트라비딘 피복된 웰 상에서 30분 동안 포획하고, 결합되지 않은 파아지는 세척 완충액으로 세척 제거하였다. 50 mM HCl, 500 mM KCl을 사용하여 파아지를 30분 동안 용출시키고, 중화시킨 다음, K07 헬퍼 파아지 (공급처: New England Biolabs)의 존재 하에 XL1 블루 세포 (공급처: Stratagene)에서 증식시켰다. 분류의 후속 회전은 다음을 제외하고는 유사하게 수행하였다: 2회전에서는 최종 바이오티닐화 Robo4-His 농도가 50 nM였고, 3회전에서는 최종 바이오티닐화 Robo4-His 농도가 25 nM였으며, 4회전에서는 최종 바이오티닐화 Robo4-His 농도가 5 nM였고, 5회전에서는 최종 바이오티닐화 Robo4-His 농도가 0.5 nM였는데, 뉴트라비딘 상에서 포획하기 1시간 전에 50 nM 바이오티닐화되지 않은 Robo4-His를 혼합물에 가하였다.

<644> 몇 가지 친화도 성숙된 클론을 대상으로 하여 인간 Robo4-His와의 결합에 관하여 선별하고 서열 분석하였다. 클론 YW71.22의 친화도 성숙에 의해 유래된 항체 클론의 가변 영역 서열이 도 2A (경쇄 가변 영역) 및 도 2B (중쇄 가변 영역)에 도시되어 있다.

<645> 실시예 6: 선별된 항-Robo4 항체 클론의 특성화

<646> 파아지 ELISA - 파아지 경쟁 결합 검정을 수행하여 Robo4에 대한 파아지-디스플레이된 Fab의 대략적인 결합 친화도 (파아지 IC₅₀으로서 결정됨)를 결정하였다. 본 검정을 다음과 같이 수행하였다. 간략하게 언급하면, 상기 언급된 바와 같은 변형된 PEG 침전 프로토콜을 사용하여, 각 클론으로부터 정제된 파아지 상등액을 생성시켰다. 정제된 파아지 상등액을 파아지 차단성 완충액에서 일련으로 희석시킨 다음, Robo4-His (1 μ g/ml)으로 피복시킨 판 상에서 15분 동안 항온 배양하였다. 판을 세척 완충액으로 세척하고, 서양고추냉이 퍼옥시다제/항-M13 항체 접합체 (PBS 완충액 중에서 1:5000으로 희석시킴) (공급처: Amersham Pharmacia Biotech)와 함께 30분 동안 항온 배양하였다. 판을 세척하고, 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 (공급처: Kirkegaard and Perry Laboratories)로 전개시키며, 0.1 N H₂SO₄로 켄칭하였다. 흡광도를 450 nm 하에 분광측정법으로 측정하여 포화시 신호의 약

50%를 제공해주는 파아지 농도를 결정하였다. 파아지의 고정된 포화 아래 농도를, 350 nM Robo4 내지 5 nM Robo4의 Robo4-His 단백질의 일련의 2배 희석물을 함유하는 파아지 차단성 완충액에서 희석시켰다. 혼합물을 실온 하에 온화하게 진탕시키면서 1시간 동안 항온 배양하고, Robo4-His (1 µg/ml)으로 피복시킨 판에 옮긴 다음, 판을 20분 동안 항온 배양하였다. 판을 세척하고, 상기와 같이 처리하였다. 결합 친화도는 IC₅₀ 값 (고정화된 항원에 대한 파아지 결합의 50%를 차단시키는 항원의 농도로서 정의됨)으로서 추정하였다. 7개 클론에 대한 IC₅₀ 결과가 표 2에 제시되어 있다.

표 2

항-Robo4 파아지 경쟁 요약

클론	인간 Robo4에 대한 파아지 IC ₅₀
YW71.6	15nM
YW71.22	5nM
YW71.1	15nM
YW71.89	20nM
YW79.1	15nM
YW79.11	<5nM
YW79.8	<5nM

<647>

<648>

Fab 생성 및 친화도 결정 - 친화도 측정을 위하여 Fab 단백질을 발현시키기 위해, 정지 코돈을 파아지 디스플레이 벡터 내의 g3과 중쇄 사이에 도입하였다. 클론을 이. 콜라이 34B8 세포 내로 형질전환시키고, 30℃ 하에 AP5 배지에서 성장시켰다 [참고: Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)]. 세포를 원심분리함으로써 수거하고, 10 mM 트리스, 1 mM EDTA pH 8에 현탁시키며, 미소유동화기를 이용하여 붕괴시켜 개방하였다. 단백질 G 친화 크로마토그래피를 이용하여 Fab를 정제하였다.

<649>

친화도 결정은 BIAcore™ 2000 시스템 (공급처: BIAcore, Piscataway, NJ)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다. Robo4-His를 CM5 칩 상에 고정화시키고 [약 1000 반응 단위 (RU)], PBST 중의 Fab의 다양한 농도 (4 내지 500 nM)를 주사하였다. 각 주사 후, 100 mM HCl을 사용하여 상기 칩을 재생시켰다.

<650>

가용성 Robo4 세포의 도메인 (ECD)에 대한 3개의 파아지-유래된 항-Robo4 항체의 결합 친화도는 BIAcore® 3000 시스템 (공급처: Biacore Inc., Piscataway, NJ)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 측정에 의해 결정하였다. 시험된 항체에는 YW71.6, YW71.22, 및 YW79.8이 포함되었다. 간략하게 언급하면, 카복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, Biacore Inc.)을 공급업자의 지시에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시석신이미드 (NHS)로 활성화시켰다. 이들 활성화된 칩을, 10 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.8을 이용하여 5 µg/ml가 되도록 희석시킴으로써 항-Robo Fab로 피복시킨 후, 분당 5 µl의 유속으로 주사하여 대략 500 반응 단위 (RU)의 커플링된 항체를 달성하였다. 이어서, 1 M 에탄올아민을 주사하여 반응되지 않은 기를 차단시켰다. 역학 측정을 위해, 인간 또는 마우스-ECD-His 태그화 가용성 항원의 일련의 2배 희석물 (대략 500 nM 내지 대략 7.8 nM)을 25℃ 하에 분당 25 µl의 유속으로 0.05% Tween® 20과 함께 PBS 중에서 주사하였다. 블랭크 유동 세포로부터 RU를 공제함으로써 결합 반응을 교정하였다. 간단한 일-대-일 랑뮤르 결합 모델 (BIAevaluation Software version 3.2)을 이용하여 연합 속도 (k_{on})와 해리 속도 (k_{off})를 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)는 k_{해리}/k_{연합} 비로서 계산하였다. 이러한 실험 결과가 다음 표 3에 제시되어 있다. 항체 YW71.22는 인간 및 마우스 Robo4와 교차 반응한다.

표 3

항-Robo4 BIAcore™ 결합 분석 요약

클론	인간 Robo4		
	ka	kd	K _D
YW71.22	2.90E+05	3.70E-03	1.30E-08
	뮤린 Robo4		
	ka	kd	K _D
YW71.22	4.50E+05	2.80E-03	6.20E-09

<651>

<652>

YW71.22로부터 유래된 친화도 성숙된 항-Robo4 항체를 대상으로 하여, HUVEC 세포에서 내적으로 발현된 인간 Robo4에 대한 결합 및 MS1 세포에서 내적으로 발현된 뮤린 Robo4에 대한 결합에 관하여 시험하였다. FACS 분석 결과, 클론 YW71.22.S1.16 및 YW71.22.S1.21이 인간과 뮤린 Robo4 둘 다와 결합하였고, 이러한 결합이 YW71.22 항체와 거의 동등한 수준인 것으로 밝혀졌다 (도 18).

<653>

실시예 7: 친화도 성숙된 Robo4 항체의 결합 분석

<654>

친화도 성숙된 YW71.22.S1.16을 사용하여, 둘 다 EU 넘버링에 따라서 중쇄 Fc 영역의 위치 118에서 Cys 치환을 수반한 완전한 길이의 IgG1과 Fab 단편을 생성시켰다. 이러한 Cys는 항체를 관심있는 표지 또는 약물과 부위 특이적 접합시키는 데에 사용된다.

<655>

인간 및 마우스 Robo4에 대한 결합 친화도는 완전한 길이의 YW71.22.S1.16 (Mab), 공학 처리시킨 Cys를 수반한 완전한 길이의 YW71.22.S1.16 (티오Mab), 및 공학 처리시킨 Cys를 수반한 YW71.22.S1.16의 Fab 단편 (티오Fab)에 대한 방사성 표지된 세포 결합에 의해 및 시험관내 결합 측정에 의해 결정하였다.

<656>

시험관내 결합 실험은 25°C 하에 프로테온 (ProteOn) XPR36 기기 (공급처: Bio-Rad Laboratories, Inc.) 상에서 SPR 측정함으로써 수행하였다. 친화도 성숙된 Robo4 항체 (Mab, 티오Mab 및 티오Fab)는 제조업자에 의해 기재된 바와 같은 표준 아민 커플링 과정을 사용하여 활성화 프로테온 GLC 센서 칩 (공급처: Bio-Rad Laboratories, Inc.) 상에 500 내지 1000 RU의 표면 밀도로 고정화시켰다. 간략하게 언급하면, 항체를 20 mM 나트륨 아세테이트, pH 4.5 중에서 10 µg/ml의 농도 및 30 µl/min의 유속으로 5분 동안 주사하였다. 반응되지 않은 군은 1 M 에탄올아민을 주사함으로써 차단시켰다. 결합 검정을 수행하기 위하여, 샘플을 30 µl/min의 유속으로 주사하였다. 역학 측정을 위해, 정제된 인간 또는 마우스 Robo4-His의 일련의 희석물 (대략 25 nM 내지 0.8 nM)을 0.01% Tween-20과 함께 PBS 중에서 주사하고, 연합 및 해리 상을 위한 센서그램을 기록하였다. 블랭크 표면을 배경 교정에 사용하였다. 프로테온 단백질 상호 작용 어레이 시스템은 6가지 결합 실험을 동일한 표면 상에서 나란히 수행할 수 있도록 해주기 때문에 표면을 재생시킬 필요는 없었다. 간단한 일-대-일 랑뮈르 결합 모델 (ProteOn Manager Software V2.0, Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 이용하여 연합 속도 (k_a)와 해리 속도 (k_d)를 계산하였고, 평형 해리 상수 (K_D)는 k_d/k_a 비로서 계산하였다. 이러한 실험 결과가 다음 표 4에 요약되어 있다.

표 4

항-Robo4 항체 친화도 (K_D) 요약

항체 포맷 (YW71.22.S1.16)	시험관내 (SPR)		방사성 표지된 세포 결합	
	hRobo4	mRobo4	HUVEC	MS1
티오MAB	1.2E-09	1.1E-09	1.2E-09	1.0E-09
MAB	1.1E-09	0.9E-09	ND	ND
티오Fab	8.0E-09	1.5E-09	ND	3.2E-09

<657>

- <658> Robo4 단백질을 내적으로 발현하는 HUVEC 및 MS1 세포를 방사성 리간드 세포 결합 실험에 사용하였다.
- <659> 세포 결합 실험을 위해, 요오도젠 (Iodogen) 방법을 사용하여 항-Robo4 티오Mab 및 티오Fab 항체를 요오드화하였다. 각 방사성 표지된 항체는 NAP-5 칼럼을 사용하여 겔 여과함으로써 자유 ^{125}I -Na로부터 정제하였는데; 정제된 티오Mab 항체는 특이 활성이 $6.96 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 였고, 정제된 티오Fab 항체는 특이 활성이 $16.05 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 였다. 고정 농도의 요오드화 항체와 감소 농도의 표지되지 않은 항체를 함유하는 $50 \mu\text{l}$ 경쟁 혼합물을 96-웰 판에 도말하였다. MS1 및 HUVEC 세포를 5% CO_2 중의 37°C 하에 성장 배지에서 배양한 다음, 후속 결합 연구를 위해 비-효소적 세포 해리성 용액 (Sigma #C5914)을 사용하여 조직 배양 판으로부터 분리시켰다. 세포를 결합 완충액 (2% FBS, 2 mM 나트륨 아지드 및 50 mM HEPES, pH 7.2를 함유하는 50:50 DMEM/F12 배지)으로 세척하고, 0.2 ml 결합 완충액 중의 대략 200,000개 세포로 경쟁 혼합물을 함유하는 96-웰 판에 놓아두었다. 세포와의 각 항은 배양시 요오드화 Mab 항체의 최종 농도는 약 150 pM (약 70,000 cpm/0.25 ml)였고, 세포와의 항은 배양시 표지되지 않은 항체의 최종 농도는 400 nM에서 시작하였으며, 10 농도에 대해 2배로써 일련으로 희석시켰다. 세포와의 각 항은 배양시 요오드화 Fab 항체의 최종 농도는 약 400 pM (약 150,000 cpm/0.25 ml)였고, 세포와의 항은 배양시 표지되지 않은 항체의 최종 농도는 1.0 μM 에서 시작하였으며, 10 농도에 대해 2배로써 일련으로 희석시켰다. 경쟁 반응을 세번 되풀이 하여 검정하였다. 경쟁 반응물을 실온 하에 2시간 동안 항은 배양하였다. 이어서, 이를 밀리포어 멀티스크린 필터 판에 옮기고 결합 완충액으로 3회 세척하여 자유 요오드화 항체를 결합된 요오드화 항체로부터 분리시켰다. 필터를 왈라 위자드 (Wallac Wizard) 1470 감마 계수기 (공급처: PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc. Wellesley, MA) 상에서 계수하였다. 웰당 결합 부위의 농도와 항체의 결합 친화도를 결정하기 위하여, 문헌 [참고: Munson and Robard, *Anal. Biochem.* 107:220-39 (1980)]의 맞춤 알고리즘을 이용하는 뉴리간드 (NewLigand) 소프트웨어 (공급처: Genentech)를 사용하여 결합 데이터를 평가하였다. 세포당 결합 부위의 수는 총 결합 부위를 웰당 세포 수로 나눔으로써 결정하였다.
- <660> 실시예 8: 항-Robo4 항체는 HUVEC 판 연장을 억제시킨다
- <661> 항-Robo4 항체 (YW71.22)는 비드 증식 검정에서 HUVEC 판 연장을 상당히 억제시킨다. 판의 총수와 길이 둘 다는 대조군 항체 E25와 비교해서 감소되었다 (도 20). 예를 들어, 길이가 300 μm 이상인 판의 수는 60% 정도 감소되었다.
- <662> 비드 증식 검정의 경우에는, 텍스트란-피복된 시토크스 (Cytodex) 3 마이크로캐리어 비드 (공급처: Amersham)를 37°C 및 5% CO_2 하에 밤새 EGM-2 중의 HUVEC (비드당 400개 세포)와 함께 항은 배양하였다. 응고를 유도시키기 위하여, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 피브리노젠을 수반한 PBS 중의 0.5 ml 세포-피복된 비드 (200 비드/ml)를, 0.625 단위 트롬빈을 함유하는 24-웰 조직 배양 판의 1개 웰에 가하고, 실온 하에 5분 동안 항은 배양한 다음, 37°C 하에 20분 동안 항은 배양하였다. 혈병 (clot)을 37°C 하에 30분 동안 EGM-2에서 평형시켰다. 이어서, 배지를 피부 섬유아세포를 함유하는 EGM-2으로 대체시켰다 (Detroit 551, 20,000개 세포/ml). 항체 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 각 웰에 가하고, 격일로 배지를 변화시키면서 8일 동안 검정을 모니터링하였다. 비드 영상을 도립 현미경으로 포착하였는데, 100, 200 및 300 μm 이격된 동심 환이 각 영상에서 비드 주변에 그려져있다. 각 환을 교차하는 혈관 수를 계수하고, 정량화를 위한 조건당 10 내지 12개 비드를 사용하였다 [참고: Nakatsu et al., *Microvascular Research* 66:102-112 (2003)].
- <663> 실시예 9: 치료제로서의 항-Robo4 항체 및 항-Robo4 항체 약물 접합체
- <664> 항-Robo4 항체를 약물-링커 부분 MCC-DM1, SPDB-DM4, 및 mPEO-DM1과 접합시킴으로써 항-Robo4 ADC를 생성시켰다. 접합에 앞서, WO 2004/010957에 기재된 방법론에 따라서 표준 방법을 사용하여 항체를 TCEP로 부분적으로 환원시켰다. 이와 같이 부분적으로 환원시킨 항체를 문헌 [참고: Doronina et al., *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 (2003) 및 미국 공개특허공보 제2005/0238649호]에 기재된 방법론에 따라서 표준 방법을 사용하여 상기 약물-링커 부분과 접합시켰다. 간략하게 언급하면, 부분적으로 환원시킨 항체를 약물 링커 부분과 합하여 이러한 부분이 시스테인 잔기 (본원에 기재된 바와 같은 티오Mab의 시스테인 공학 처리시킨 잔기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다)와 접합되도록 하였다. 접합 반응물을 케칭하고, ADC를 정제하였다. 각 ADC에 대한 약물 부하비 (항체당 약물 부분의 평균 수)를 HPLC에 의해 결정하였다. 예를 들어, spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE 및 MC-MMAF를 포함한 약물 링커 부분을 사용하여 부가의 항-Robo4 ADC를 만들었다 [참고: 예를 들어, WO 2004/010957, 및 WO2006/034488 (각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)].
- <665> 실시예 10: 생체내 종양 용적 감소 검정

- <666> 있는 그대로의 항-Robo4 항체: 종양 성장은 인간 비소세포 폐암종 SK-MES-1의 마우스 이종이식편 모델에서 있는 그대로의 항-Robo4 항체 YW71.22 (세포독성제 또는 기타 작용제와 접합되지 않은 항체)에 의해 억제되지 않았다. 본 연구를 위해, 각 HRLN 암컷 누드 마우스의 옆구리에 1 mm³ 종양 단편 피하 이식체를 투여하였다. 종양 성장을 캘리퍼 측정함으로써 매주 2회 모니터링하였다. 종양의 평균 크기가 80 내지 120 mm³이 되면, 마우스를 거의 동일한 군 평균 종양 크기를 제공하는 것으로 분류하고, 처리를 개시하였다 (1일). 동물에게 10 mg/kg 항-Robo4 및/또는 5 mg/kg 항-VEGF 또는 대조군 항체를 매주 2회씩 5주 동안 복강내 투여하였다. 모든 처리는 0.2 mg/20 g으로 체중 조정되었다. 그 결과가 도 17에 도시되어 있다. 또한, MDA-MB-231 유방암 이종 이식편을 수반한 Fo5 마우스 모델에서는 종양 성장 저하가 관찰되지 않았다.
- <667> ADCC 활성이 증강된 Fc 영역을 포함하는 항-Robo4 항체를 사용하여 종양 성장을 억제시킬 수 있다. ADCC-증강된 항-Robo4 항체는 있는 그대로의 항체이거나 또는 본원에 기재된 바와 같은 항체 약물 접합체일 수 있다. ADCC 증강은, 예를 들어 항체 Fc 영역과 연결된 탄수화물 부분에 의존적인 IgG1-Fc감마RIII 상호 작용을 증강시킴으로써 달성된다. ADCC 증강을 위한 비제한적 예시 방법에는 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제를 암호화하는 GnTIII를 과발현하는 숙주 세포 [참고: Narishimhan, *J. Biol. Chem.* 257:10235-10242 (1982) and Umana et al., *Nature Biotech.* 17:176-180 (1999)]; 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제를 암호화하는 FUT8의 발현이 결여되거나 이를 불충분하게 발현하는 숙주 세포 [참고: Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473 (2003)]; 또는 UDP-N-아세틸글루코사민 2-에피네라제를 불충분하게 발현하거나 이의 발현이 결여된 숙주 세포 (예를 들어, Lec3 CHO 세포) [참고: Hong and Stanley, *J. Biol. Chem.* 278:53045-53054 (2003)]에서 항-Robo4를 발현시킴으로써 항체 푸코실화를 저하시키는 방법이 포함된다. 또한, ADCC는 Fc 영역 상의 아미노산 변화에 의해 증강된다 [참고: 예를 들어, W02000042072 및 W02004029207]. 따라서, 본 발명의 항-Robo4 항체는 세포독성제로서 유용하고, 이에 야생형 Fc ADCC 활성을 나타내는 항-Robo4 항체와 비교해서 증강된 ADCC 기능을 나타내는 항-Robo4 항체가 포함된다.
- <668> 항-Robo4 항체 약물 접합체 (항-Robo4 ADC): 생체 내에서 종양 용적을 감소시킬 수 있는 능력을 알아보기 위하여 독소-접합된 항-Robo4 ADC의 효능을 시험하기 위해, 다음 프로토콜을 이용하였다.
- <669> SCID 마우스의 옆구리에 인간 암 세포주의 세포를 각각 피하 접종하였다. 인간 암 세포주에는 SK-MES-1 인간 비소세포 폐암 세포 및 MDA-MB-231 유방암 세포가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 종양이 대략 80 내지 200 mm³의 평균 종양 용적에 도달하면, 마우스를 여러 군으로 나누고, 독소-접합된 항체 또는 접합되지 않은 항체를 정맥내 주사함으로써 처리하였다.
- <670> 고형 종양 용적을 감소시키기 위한 항-Robo4 마이탄신 약물 접합체의 용도
- <671> SCID 마우스의 옆구리에 인간 종양 세포를 마우스 체중 20 g당 0.2 ml의 용적으로 피하 주사하였다. 세포를 HBSS에 현탁시켰다. 평균 종양 크기가 대략 80 내지 200 mm³에 도달하면, 마우스를 무작위로 여러 군으로 나누고, 마이탄신과 접합된 항-Robo4 ADC 또는 대조군 항체로 단일 또는 다중 정맥내 처리하였다 (꼬리 정맥을 통하여 처리함).
- <672> 항체를 주사한지 대략 30일 후에 각 처리군에서 평균 종양 용적을 모니터링하였다. 종양은, 예를 들어 잔여 루시페라제를 형광 검출함으로써 검출할 수 있는데, 여기서 종양 세포는 루시페라제를 발현하도록 공학 처리시켰다. 독소-접합된 항-CD22 항체의 효능은 대조군 및 접합되지 않은 항체와 비교함으로써 결정하였다.
- <673> 항체와 접합된 약물이 아우리스타틴인 항-Robo4 ADC를 사용하여 동일한 실험을 수행하였다.
- <674> ADCC 활성이 증강된 Fc 영역을 포함하는 항-Robo4 ADC를 사용하여 동일한 실험을 반복하였다.
- <675> 실시예 11: 검출가능한 마커와 접합된 항-Robo4 항체
- <676> sDOTA-표지된 항-Robo4 항체를 다음과 같이 제조하였다. DOTA-NHS-에스테르를 디메틸아세트아미드 (DMA, Fluka Chemika, Switzerland)에 용해시키고, 60 내지 100 mg/ml의 농도가 되도록 제조하였다. 전형적인 과정은 MAB를 pH 7.2 하에 2 mM EDTA를 수반한 PBS로 완충제 교환시키는 것을 포함하였다. 반응은 1 분자 Mab 대 4 DOTA 분자의 비 (1:4)로 수행하고, 더모믹서 (Thermomixer) 판 (공급처: Eppendorf, Westbury, NY) 상에 온화하게 교반시키면서 25°C 하에 수행하였다. DOTA-표지된 항-Robo4 항체는 비제한적 예로서 이트륨 ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu 등과 연합되는 경우에 시험관내 또는 생체 내에서 검출가능한 마커로서 유용하다. Mab 접합체는, 예를 들어 이러한 접합체를 43°C 하에 45분 동안 0.25 M 암모늄 아세테이트 중의 ¹¹¹InCl₃과 함께 항은 배양함으로써 ¹¹¹In으로

표지시켰다. EDTA를 1 mM의 최종 농도에 가하고, 혼합물을 37℃ 하에 15분 동안 항온 배양하였다. 예를 들어, ⁹⁰Y으로 표지시키는 것은 43℃ 하에 1시간 동안 항온 배양하여 수행한 후, DTPA를 1 mM의 최종 농도에 가하고, 혼합물을 37℃ 하에 15분 더 항온 배양하였다. 방사성금속-표지된 mAb 접합체는 토소하스 (TosoHaas) TSKgel G2000 SW 칼럼 및 정상 식염수의 이동 상을 사용하여 크기 배제 HPLC함으로써 정제하였다.

실시예 12: Robo4 및 항-Robo4 항체의 부가의 특성화

Robo4는 내피 세포 (EC) 이동을 차단하지 않는다. HUVEC 이동 검정을 사용하고 VEGF의 존재 또는 부재 하에 Robo4-Fc 및 Robo4-His를 혈관 EC와 접촉시켰다. 도 8은 본 검정 결과를 도시한 것이다. Robo4-Fc 또는 Robo4-His 단독은 EC 이동을 유도하지 못하였고, VEGF-유도된 EC 이동은 Robo4에 의해 증강되지 못하였다.

Robo4는 Slit2와 결합하지 않는다. Slit2와 접촉된 Robo4-Fc는 Biocore™ 분석에 의해 결합을 나타내지 않은 반면, Robo1 및 Slit2는 동일한 검정에서 결합을 나타내었다 (도 9). Slit2-His (히스티딘 태그된 완전한 길이의 Slit2)를 CM5 Biacore™ 칩 상에 고 밀도로 고정화시켰다. 각 분석물 (Robo4-Fc 또는 Robo1-Fc 융합 단백질)의 5 μl 분취액을 주사하고, 완충액 (HEPES/EDTA/NaCl, pH 7.5) 중의 고정화된 리간드와 상호 작용하도록 하였다.

Robo4는 혈관 유도에 관여하는 세포 표면 수용체인 UNC5B와 시험관 내에서 상호 작용한다. 연계되지 않은-5 (UNC5) 계열의 수용체 구성원 (UNC5A, B, C, 및 D)과 네트린 (netrin)이 결합하면 신경 액손 퇴행이 일어나는 것으로 밝혀졌다 [참고: Klagsbrun, M. and Eichmann, A., Cytokine & Growth Factor Reviews 16(4-5):535-548 (2005)]. 네트린-UNC5B 상호 작용은 혈관형성에 밀접한 영향을 끼쳐 왔다 [참고: Klagsbrun, M. and Eichmann, A., supra (2005) and Lu, X. et al., Nature 432:179-186 (2004)]. 시험관 내에서 Robo4와 UNC5B의 상호 작용은 SPR 결합 측정에 의해 결정하였는데, 여기서는 UNC5B-Fc 융합 단백질 (Fc 영역과 융합된 UNC5B의 세포외 도메인)을 칩 상에 고정화시키고, 가용성 Robo4-Fc 또는 Robo4-His가 이와 상이한 농도 하에 반응하도록 하였다. SPR 측정을 실시예 7에 기재된 바와 같이 수행하였고, 상호 작용 결과가 도 10에 도시되어 있다.

Robo4는 Robo4 특이적 RNA 프로브를 사용하여 ISH 검정에 의해 나타난 바와 같이 태아 마우스 내피에서 발현된다 (도 11). Robo4는 또한, 결장 종양의 마우스 종양 모델 (인간 HM-7 결장 종양 이종이식편, 도 12A 및 12B) 및 유방 종양 (인간MDA-MB-175 유방암 종양 이종이식편, 도 12C 및 12D)에서 발현된다. Robo4는 정상 조직 (도 13B 및 13D)와 비교한 도 13A 및 13C에서 명백한 바와 같이 (악성 흑색종에서 발현이 증가됨), 정상적인 인간 조직과 비교해서 인간 종양 조직에서 증가된 발현을 나타낸다. Robo4 발현은 또한, 인간 소세포 폐암 (도 14A-D), 인간 결장암 (도 14G-H), 인간 췌장 종양, 및 마우스 혈관육종에서 관찰된다. Robo4는 결장암, 비소세포 폐암, 신세포 암종 (RCC), 이행 세포 암종 (TCC, 방광암의 통상적인 형태), 유방암, 신경아교종 및 육종 내의 종양 내피 세포에서 발현된다.

항-Robo4 항체 YW71.22는 2시간에 걸쳐 Robo4-발현성 마우스 미소혈관 내피 MS1 세포에 의해 내재화시켰다. 이러한 YW71.22 항체가 0℃ 하에 30분 동안 마우스 미소혈관계 내피 MS1 세포 상의 Robo4와 결합하도록 하고, 37℃ 하에 0 내지 2시간 동안 항온 배양하였다. 일정한 간격으로 세포를 고정시키고 침투시키거나 침투시키지 않았다. 세포 표면 상에 있거나 세포에 의해 내재화된 항-Robo4 항체를 형광성 표지된 (알렉사-표지된) 항-인간 IgG 이차 항체와 상호 작용시켰다. 그 결과가 도 15A 및 15B에 도시되어 있다. YW71.22.S1.16 항-Robo4 항체는 항-Robo4를 37℃ 하에 0 내지 4시간 동안 MS1 세포 상에서 항온 배양한 것을 제외하고는 동일한 프로토콜에 의해 내재화시켰다. 세포를 침투시키고 상기와 같이 염색시켰다. 그 결과가 도 15C에 도시되어 있다.

내피 세포 이동은 인간 제대 혈관 내피 세포 (HUVEC) 세포성 이동 검정을 이용하는 시험관내 검정에서 항-Robo4 항체에 의해 차단되지 않았다. HUVEC는 인간 Robo4를 내적으로 발현한다. 본 검정은 다음과 같이 수행하였다. HUVEC를 VEGF와 함께 2시간 동안 예비-항온 배양하였다. 세포성 이동을 항-Robo4 항체 YW71.22, 항-VEGF 항체, 또는 Robo4-Fc 또는 Robo4-His의 존재 하에 16시간 동안 지속시켰다. 항-Robo4 뿐만 아니라 가용성 Robo4 세포외 도메인 융합 단백질 (Robo4-Fc 및 Robo4-His)도 이들 조건 하에서 EC 이동을 차단시키지 못하였다 (도 16).

항-Robo4 항체는 생체 내에서 혈관계와 연합한다. 50 마이크로그램의 항-Robo4 항체 71.22 (도 19A) 또는 대조군 항체 (항-HER2, 도 19B)를 꼬리 정맥을 통하여 주사하고, 10분 동안 순환시켰다. 100 마이크로그램의 FITC-리코페르시쿰 에스쿨렌툼 (Lycopersicon esculentum)을 주사하고, 5분 동안 순환시켰다. 마우스를 PBS 중의 1% PFA로 관류시키고, 조직을 30% 슈크로스 내로 수집하며 OCT에서 동결시켰다. 항체를 Cy3 염소 항-인간 IgG로 검출하였다. 도 19A는 혈관계에서의 FITC-리코페르시쿰 에스쿨렌툼 염색 위치가, 주변 조직 내로 이동된 대

조군 항체와는 달리 항-Robo4 Cy3 염색 위치와 중복된다는 것을 도시하고 있다.

<685> 전술된 본 발명이 명확한 이해를 목적으로 예시으로써 보다 상세히 기재되긴 하였지만, 상세한 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원에 인용된 모든 특허, 특허원, 과학 참고 문헌, 및 유전자은행 승인 번호에 관한 설명은 각 특허, 특허원, 과학 참고 문헌, 및 유전자은행 승인 번호가 구체적이고도 개별적으로 참고 문헌으로 도입된다고 언급한 것 처럼 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에 참고로 명백히 도입된다.

도면의 간단한 설명

- <81> 도 1A 및 1B는 본 발명의 각종 항-Robo4 클론에 대한 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열 (각각 도 1A 및 1B)의 정렬을 도시한 것이다. 경쇄 및 중쇄의 초가변 영역 (HVR)은 상자에 담은 상보성 결정 영역 (CDR) 아래에 표시되어 있다. 도 1A에서, 경쇄 HVR-L1, L2, 및 L3은 각각 카바트 위치 24-34, 50-56, 및 89-102이다. 도 1B에서, 중쇄 HVR-H1, H2, 및 H3은 각각 카바트 위치 26-35, 49-65, 및 93-102이다. 클론은 본 실시예에 기재된 바와 같은 파아지 디스플레이에 의해 제조하였고 서열 분석하였다.
- <82> 도 2A 및 2B는 개별적으로 무작위된 HVR을 수반한 라이브러리로부터 선별된 친화도 성숙된 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역 (각각 도 2A 및 2B)의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 도 2A 및 2B 내의 HVR은 도 1A 및 1B에 도시된 바와 동일한 위치이다.
- <83> 도 3A, 3B, 4A 및 4B는 다음과 같은 서열 식별자를 이용하여 본 발명을 실시하는 데에 사용하기 위한 예시되는 수용체 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한 것이다:
- <84> 가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 영역 마이너스 카바트 HVR (도 3A 및 3B)
- <85> 인간 VL 카파 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 9, 10, 99, 100)
- <86> 인간 VL 카파 아군 I' 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 9, 101, 99, 100)
- <87> 인간 VL 카파 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 102, 103, 104, 100)
- <88> 인간 VL 카파 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 105, 106, 107, 100)
- <89> 인간 VL 카파 아군 IV 컨센서스 프레임워크 1-4 (서열 108, 109, 110, 100)
- <90> 프레임워크 서열 내에서의 카바트 HVR L1, L2, 및 L3의 위치는 음영 상자로서 도시된다.
- <91> 가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 영역 마이너스 카바트 HVR (도 4A 및 B)
- <92> 인간 VH 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 HVR (아군 IA, 서열 111, 112, 113, 16) 및 (아군 IB, 서열 114, 115, 113, 16)
- <93> 인간 VH 아군 I 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 HVR (아군 IC, 서열 114, 115, 116, 16) 및 (아군 ID, 서열 114, 115, 117, 16)
- <94> 인간 VH 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 HVR (아군 IIA, 서열 118, 119, 120, 16), (아군 IIB, 서열 121, 122, 120, 16)
- <95> 인간 VH 아군 II 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 HVR (아군 IIC, 서열 121, 122, 123, 16), (아군 IID, 서열 121, 122, 124, 16)
- <96> 인간 VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 HVR (아군 IIIA, 서열 125, 126, 127, 16), (아군 IIIB, 서열 128, 129, 127, 16)
- <97> 인간 VH 아군 III 컨센서스 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 HVR (아군 IIIC, 서열 128, 129, 130, 16), (아군 IIID, 서열 128, 129, 131, 16)
- <98> 인간 VH 수용체 1 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 HVR (아군 수용체 1A, 서열 132, 126, 133, 16) 및 (아군 수용체 1B, 서열 128, 129, 133, 16)
- <99> 인간 VH 수용체 1 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 HVR (아군 수용체 1C, 서열 128, 129, 134, 16)
- <100> 인간 VH 수용체 2 프레임워크 1-4 마이너스 카바트 HVR (아군 수용체 2A, 서열 132, 126, 135, 16) 및 (아군

수용체 2B, 서열 128, 129, 135, 16)

- <101> 인간 VH 수용체 2 프레임워크 1-4 마이너스 연장된 HVR (아군 수용체 2C, 서열 128, 129, 136, 16) 및 (아군 수용체 2D, 서열 128, 129, 137, 16).
- <102> 도 5A는 Robo4 폴리펩티드의 완전한 길이의 아미노산 서열을 도시한 것이다. 잠재적 신호 서열이 점선으로 밑줄쳐져 있다. 세포의 도메인의 일부가 실선으로 밑줄쳐져 있다. 도 5B는, 예를 들어 본원에 기재된 항-Robo4 Fab 파아지 디스플레이 실험에 사용된 His-태그화 가용성 Robo4 세포의 도메인 단편의 서열 (서열 171)을 도시한 것이다. 이러한 Robo4 세포의 도메인은 회수 또는 검출을 용이하게 하기 위하여 히스티딘 태그와 연결되었다.
- <103> 도 6A는 항-Robo4 항체 YW71.22 중쇄의 완전한 길이의 서열 (서열 169)을 도시한 것이다. 진하게 표시되고 밑줄친 알라닌은 시스템인으로 치환시켜 티오Mab를 생성시킨 위치이다. 도 6B는 항-Robo4 항체 YW71.22 경쇄의 완전한 길이의 서열 (서열 170)을 도시한 것이다.
- <104> 도 7은 잠재적 신호 서열을 포함하고 위치 H232에 부착된 히스티딘 태그 RRA(H)₅를 갖는 뮤린 Robo4 세포의 도메인의 아미노산 서열 (서열 172)을 도시한 것이다. 점선의 밑줄은 포유동물 세포에서 발현 동안 절단되는 잠재적 신호 서열을 나타낸다.
- <105> 도 8은 Robo4 구조물을 이용한 HUVEC 이동 검정 결과의 막대 그래프이다.
- <106> 도 9는 Robo4가 Slit2와 결합하지 않는다는 것을 표시하는 BiaCore 검정 결과를 도시한 것이다.
- <107> 도 10은 Robo4가 UNC5B와 상호 작용한다는 것을 표시하는 BiaCore 검정 결과를 도시한 것이다.
- <108> 도 11은 Robo4가 태아 마우스 내피에서 발현된다는 것을 나타내는 ISH 검정 사진이다.
- <109> 도 12A 및 12B는 인간 HM-7 결장암 마우스 이종이식편 종양 모델에서의 Robo4의 발현을 도시한 것이다. 도 12C 및 12D는 인간 MDA-MB-175 유방암 종양 마우스 이종이식편 모델에서의 Robo4 발현을 도시한 것이다.
- <110> 도 13A-D는 인간 악성 흑색종에서의 Robo4의 발현을 도시한 것이다.
- <111> 도 14A-D는 소세포 폐암에서의 Robo4의 발현을 도시한 것이다. 도 14E-H는 결장암에서의 Robo4 발현을 도시한 것이다.
- <112> 도 15A - 15C는 마우스 MS1 세포에 의한 항-Robo4 항체 71.22의 내재화 (도 15A 및 15B), 및 마우스 MS1 세포에 의한 친화도 성숙된 항-Robo4 항체 71.22.S1.16의 내재화 (도 15C)를 도시한 것이다.
- <113> 도 16은 내피 세포 이동 검정 결과를 도시한 막대 그래프이다. 항-Robo4 항체는 VEGF 유도된 EC 이동을 차단시키지 않았다.
- <114> 도 17은 대조군, 항-VEGF, 항-Robo4 (YW71.22), 및 항-Robo4 플러스 항-VEGF 항체를 투여한 이종이식편 마우스 모델에서 시간의 함수로서 평균 종양 용적 상의 변화 그래프이다. 있는 그대로의 (naked) Robo4 항체는 이들 실험에서 종양 성장을 억제하지 못하였다.
- <115> 도 18A 및 18B는 친화도 성숙된 항-Robo4 클론 71.22.S1.16 및 71.22.S1.21이 HUVEC 세포 상에서 내적으로 발현된 Robo4와 결합한다는 것을 표시하는 FACS 플롯 결과를 도시한 것이다. 도 18C 및 18D는 동일한 친화도 성숙된 항-Robo4 항체 클론이 뮤린 MS1 세포 상에서 내적으로 발현된 뮤린 Robo4와 결합한다는 것을 표시하는 FACS 플롯 결과를 도시한 것이다. 이들 플롯은 모 항체인 71.22가 또한, 인간 및 뮤린 Robo4와 교차 반응한다는 것을 나타낸다.
- <116> 도 19A 및 19B는 항-Robo4 항체 71.22가 실시예 12에 기재된 바와 같이 마우스 내로 주사한 후 혈관계와 연합된다는 것을 도시한 것이다.
- <117> 도 20A 및 20B는 항-Robo4 항체 71.22가 HUVEC 관 연장을 억제한다는 것을 표시하는 비드 증식 검정 결과를 도시한 것이다. 도 20A는 관의 총 수와 길이 둘 다가 무관한 대조군 항체 (항-두드러기쐬, E25)와 비교해서, HUVEC를 71.22로 처리한 경우에 감소된다는 것을 도시한 것이다. 항-VEGF가 양성 대조군 항체로서 사용되었다. 도 20B는 100, 200 및 300 μ m에서 묘사된 동심 환을 갖는 대표적 예를 도시한 것이다.

항-Robo4 항체 가변 경쇄 정렬

카바트#	HVR-L1																																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	카바트 - CDR L1																																							
	초타아 - CDR L1																																							
	접촉 - CDR L1																																							
	LC-FR2																																							
YW71.6VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW71.1VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW71.22VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW71.89VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW79.1VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW79.8VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
YW79.11VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	I	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P

도면
도면1A1

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

HVR12

카바트 - CDR12

조티아 - CDR12

결속 - CDR12

LC-FR3

YW71.6VL G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW71.1VL G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW71.22VL G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW71.89VL G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW79.1VL G K A P K L L I Y G A S S R A S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW79.8VL G K A P K L L I Y G A S S R A S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
YW79.11VL G K A P K L L I Y G A S S R A S G V P S S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

HVR13

카바트#

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

서열 :

카바트 - CDR13

조티아 - CDR13

결속 - CDR13

LC-FR4

YW71.6VL E D F A T T Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R 72
YW71.1VL E D F A T T Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R 73
YW71.22VL E D F A T T Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R 74
YW71.89VL E D F A T T Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R 75
YW79.1VL E D F A T T Y C Q Q S W S Y P L T F G Q G T K V E I K R 76
YW79.8VL E D F A T T Y C Q Q S Y N T P P T F G Q G T K V E I K R 77
YW79.11VL E D F A T T Y C Q Q Y Y S S P L T F G Q G T K V E I K R 78

형-Robo4 형제 가변 중쇄 정렬

카바트#	HVR-H1																																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
HC-FR1	YMW71.6VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	S	G	S	W	I	H	W	V	R	Q	A	P
HC-FR2	YMW71.1VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	T	N	Y	W	I	H	W	V	R	Q	A	P
HC-FR1	YMW71.22VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P
HC-FR1	YMW71.89VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	N	N	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P
HC-FR1	YMW79.1VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	S	W	V	R	Q	A	P
HC-FR1	YMW79.8VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	S	W	V	R	Q	A	P
HC-FR1	YMW79.11VH																																								
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P

도면1B2

카바트# 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a

HVR-H2

카바트 - CDR H2

접속 - CDR H2

HC-FR3

YW71.6VH K G L E W V A V I T P A G G Y T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW71.1VH K G L E W V G G I Y P A D G Y T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW71.22VH K G L E W V G F I Y P A G G Y T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW71.89VH K G L E W V A I I S P T G G Y T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW79.1VH K G L E W V S T I Y G Y D G S T N Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW79.8VH K G L E W V S G I Y P M G G Y T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N
 YW79.11VH K G L E W V S G I S P Y G G Y T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N

HVR-H3

카바트# b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a b c d e f g h 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 서열 :

카바트 - CDR H3

접속 - CDR H3

HC-FR4

YW71.6VH S L R A E D T A V Y Y C A R S N R Y S G Q F V P A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 140
 YW71.1VH S L R A E D T A V Y Y C A S G G Y S S - - - - - L A Y W G Q G T L V T V S S 141
 YW71.22VH S L R A E D T A V Y Y C A R L I G N K F G W S S Y G - M D Y W G Q G T L V T V S S 142
 YW71.89VH S L R A E D T A V Y Y C A R D V N V Y S A R W W D Y V M D Y W G Q G T L V T V S S 143
 YW79.1VH S L R A E D T A V Y Y C A R M S Y N W S S P G H G - - M D V W G Q G T L V T V S S 144
 YW79.8VH S L R A E D T A V Y Y C A R G N Y Y S G S E - - - - F D Y W G Q G T L V T V S S 145
 YW79.11VH S L R A E D T A V Y Y C A R W G Y Y M P Y G H P V - - M D V W G Q G T L V T V S S 146

항-Robo4 항체 - 친화성 상속된 변이체 가변 경쇄 정렬

* HVR-L1
** HVR-L2
*** HVR-L3

카바트#																																							*																																				
	카바트 - CDR1																																																																										
	조타아 - CDR1																																																																										
LC-FR1																																						LC-FR2																																					
접촉 - CDR1																																																																											
YW71.22.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.2.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.8.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.16.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.23.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.24.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.27.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.31.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.38.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S1.77.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S2.21.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S2.29.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S2.39.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.S2.79.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H1.2.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H1.9.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H1.46.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H1.77.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H1.91.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			
YW71.22.H2.31.VL	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P																																			

도면2A2

[illegible]

도면2A3

카바트#

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100101 102103 104105106 107108

서열:

카바트 - CDR L3
초타아 - CDR L3
접촉 - CDR L3

LC-FR4

YW71.22.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	74
YW71.22.S1.2.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	F	A	T	P	A	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	79
YW71.22.S1.8.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	A	A	L	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	80
YW71.22.S1.16.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	S	D	H	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	81
YW71.22.S1.23.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	A	N	T	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	82
YW71.22.S1.24.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	83
YW71.22.S1.27.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	P	F	D	L	P	M	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	84
YW71.22.S1.31.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	P	N	S	T	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	85
YW71.22.S1.38.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	F	D	H	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	86
YW71.22.S1.77.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	H	T	H	S	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	87
YW71.22.S2.21.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	D	I	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	88
YW71.22.S2.29.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	R	N	M	P	A	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	89
YW71.22.S2.39.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	T	R	V	M	P	A	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	90
YW71.22.S2.79.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	T	Y	T	I	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	91
YW71.22.H1.2.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	A	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	92
YW71.22.H1.9.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	D	L	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	93
YW71.22.H1.46.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	G	G	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	94
YW71.22.H1.77.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	S	Y	N	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	95
YW71.22.H1.91.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	F	Y	S	D	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	96
YW71.22.H2.31.VL	E	D	F	A	T	T	T	Y	C	Q	Q	G	Y	N	Y	P	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	97

항-Robo4 항체 - 친화성 성숙된 변이체 가변 중쇄 정렬

* HVR-H1
** HVR-H2
*** HVR-H3

카바트#																																											* 39
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	40	41	42		
카바트#	HC-FR1																																										* 39
	초타아 - CDR H1																														HC-FR2										* 39		
YW71.22.H1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A		P	G
YW71.22.S1.2.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.8.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.16.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.23.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.24.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.27.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.31.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.38.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S1.77.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S2.21.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S2.29.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S2.39.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.S2.79.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H1.2.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H1.9.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H1.46.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H1.77.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H1.91.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	
YW71.22.H2.31.VH	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	I	N	G	Y	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	

도면2B2

카바트#

43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a

조티아 - CDR H2
접속 - CDR H2

카바트 - CDR H2

HC-FR3

YW71.22	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	
YW71.22.S1.2	21	YH	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	A	G	G	H	T	A	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.8	14	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.16	16	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.23	23	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.24	24	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.27	27	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.31	31	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	A	T	I	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.38	38	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S1.77	77	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	L	S	V	I	E	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S2.21	21	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S2.29	29	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S2.39	39	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.S2.79	79	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H1.2	12	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H1.9	19	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H1.46	46	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H1.77	77	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H1.91	91	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N
YW71.22.H2.31	31	YH	K	G	L	E	W	V	G	F	I	Y	P	A	G	G	D	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N

도면2B3

카바트#	b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a b c d e f g h 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113																														서열:											
	카바트 - CDR H3																																									
	초타아 - CDR H3																																									
	접속 - CDR H3																																									
	HC-FR4																																									
YW71.22.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	142
YW71.22.S1.2.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	147
YW71.22.S1.8.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	148
YW71.22.S1.16.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	149
YW71.22.S1.23.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	150
YW71.22.S1.24.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	151
YW71.22.S1.27.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	152
YW71.22.S1.31.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	153
YW71.22.S1.38.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	154
YW71.22.S1.77.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	155
YW71.22.S2.21.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	156
YW71.22.S2.29.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	157
YW71.22.S2.39.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	158
YW71.22.S2.79.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	159
YW71.22.H1.2.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	160
YW71.22.H1.9.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	161
YW71.22.H1.46.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	162
YW71.22.H1.77.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	163
YW71.22.H1.91.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	164
YW71.22.H2.31.VH	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	L	I	G	N	K	F	G	W	S	S	Y	G	-	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	165

도면3A

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
kv1' DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
kv2 DIVMTQSPFLSLPVTGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVE
kv3 EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ

도면3B

kv1 PEDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열: 9, 10, 99, 100
kv1' PEDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열: 9, 101, 99, 100
kv2 AEDVGYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열: 102, 103, 104, 100
kv3 PEDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열: 105, 106, 107, 100
kv4 AEDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK 서열: 108, 109, 110, 100

도면4A

I			
A	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKASGFTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG
B	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
C	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
D	QVQLVQSGAEVKKRPGASVKVSCSKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
II			
A	QVQLQESGPGILVLRPSQTLSLTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG
B	QVQLQESGPGILVLRPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
C	QVQLQESGPGILVLRPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
D	QVQLQESGPGILVLRPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
수용체-1			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
수용체-2			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV

도면4B

I			
A	ADTSTSTAYMEISSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	ADTSTSTAYMEISSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	ADTSTSTAYMEISSLRSEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	ADTSTSTAYMEISSLRSEDTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
II			
A	VDTSKNQFSLKISSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	VDTSKNQFSLKISSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	VDTSKNQFSLKISSVTADTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	VDTSKNQFSLKISSVTADTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
III			
A	RDN SKNTLYIQMNSLR AEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	RDN SKNTLYIQMNSLR AEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	RDN SKNTLYIQMNSLR AEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	RDN SKNTLYIQMNSLR AEDTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS
수용체-1			
A	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGTIVTVSS
수용체-2			
A	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
B	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
C	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGTIVTVSS
D	ADTSKNTAYLIQMN SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGTIVTVSS

도면5A

MSGGDSLLGGRGSLPLLLLLIMGGMAQDSPPQILVHPQDQLFQGPGRPARMSCRASGQPPPTIR
 WLLNGQPLSMVPPDPHLLPDGTLLLLQPPARGHAHDGQALSTDLGVYTCEASNRLGTAVSRGA
 RLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFTLECGPPWGHPEPTVSWWKDGKPLALQGRHTVSGGSL
 LMARAEKSDEGTYMCVATNSAGHRESRAARVSIQEPQDYTEPVVELLAVRIQLENTLLNPDPAE
 GPKPRPAVWLSWKVSGPAAPQSYTALFRTQTAPGGQCAPWAEELLAGWQSSELGGLHWGQDYE
 FKVRPSSGRARGPDSNVLLRLPEKVPSAPPQEVTLKPGNGTVFVSWVPPPAENHNGIIRGYQV
 WSLGNTSLPPANWTVVGEQTQLEIATHMPGSYCVQVAAVTGAGAGEPSRPVCLLLEQAMERATQ
 EPSEHGPTLEQLRATLKRPEVIATCGVALWLLLLGTAVCIHRRRRARVHLGPLYRYTSEDAI
 LKHRMDHSDSQWLADTWRSTSGSRDLSSSSSLSSRLGADARDPLDCRRSLLSWDSRSPGVPLLP
 DTSTFYGSLIAELPSSTPARPSPQVPAVRRLLPPQLAQLSSPCSSSDSLCSRRLSSPRLSLAPA
 EAWKAKKKQELQHANSPLLRGSHSLELRACELGNRGSKNLSQSPGAVPQALVAWRALGPKLLS
 SSNELVTRHLPPAPLFPHETPPTQSQTQPPVAPQAPSSILLPAAPIPILSPCSPSPQASSLS
 GPSPASSRLSSSSSLSSLEDQDQSVLTPEEVALCLELSEGEETPRNSVSPMPRAPSPPTTYGYS
 VPTASEFTDMGRGTGGGVGPKGGVLLCPPRPCLTPTPSEGLANGWGSASEDNAASARASLVSS
 DGSFLADAHFARALAVAVDSFGGLEPREADCVFIDASSPPSPRDEIFLTPNLSLPLWEWRPDW
 LEDMEVSHSTQRLGRGMPPWPDPDSQISSQRSQLHCRMPKAGASFPVDYS

도면5B

QDSPPQILVHPQDQLFQGPGRPARMSCQASGQPPPTIRWLLNGQPLSMVPPDPHLLPDGTLLLL
 QPPARGHAHDGQALSTDLGVYTCEASNRLGTAVSRGARLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFT
 LECGPWGHPEPTVSWWKDGKPLALQGRHTVSGGSLLMARAEKSDEGTYMCVATNSAGHRESR
 AARVSIQEPQDYRAHHHHHHHH

도면6A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINGYYIHWRQAPGKGLEWVGFIYPAGGDTDYADSV
 KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARLIGNKFGWSSYGMIDYWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQKSL
 SLSPGK

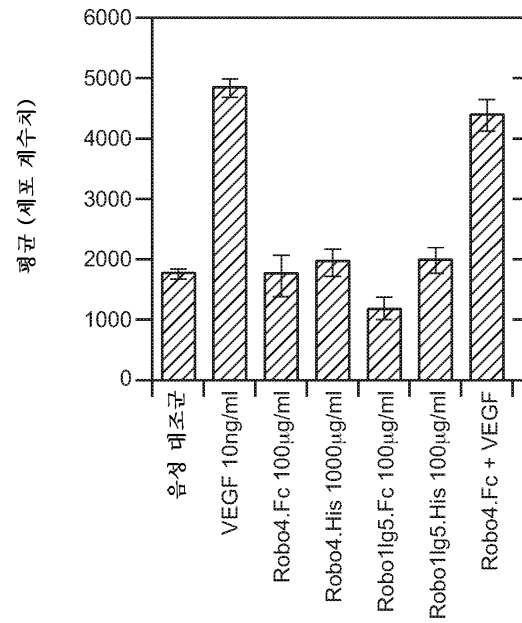
도면6B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSG
 SGSGTDFTLTISSSLQPEDFATTYCQOSYTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

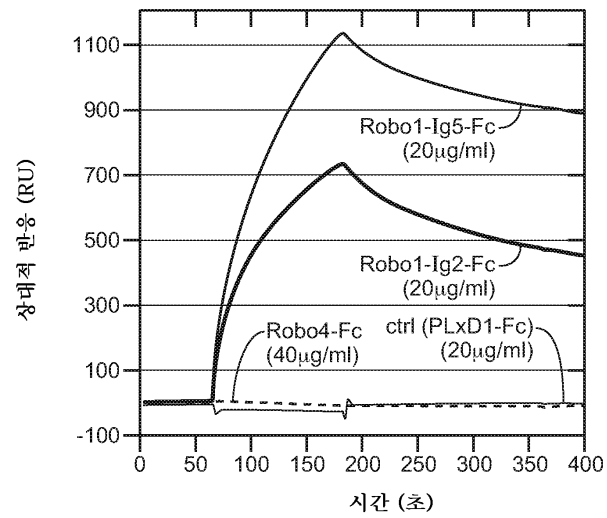
도면7

MCSGGTGLLGTEWPLPLLLLLIMGGEALDSPQILVHPQDQLLQSGGPAKMRCRSSGQPPPTIR
 WLLNGQPLSMATPDLHYLLPDGTLLHRLPSVQGRPDQDQNILSAILGVYTCEASNRLGTAVSRG
 ARLSVAVLQEDFQIQPRDTVAVVGESLVLECGPPWGYPKPSVSWWKDGKPLVLQGRRTVSGDS
 LMVSRAEKNDSTYMCMATNNAGQRESRAARVSIQESQDHRAHHHHHHHH

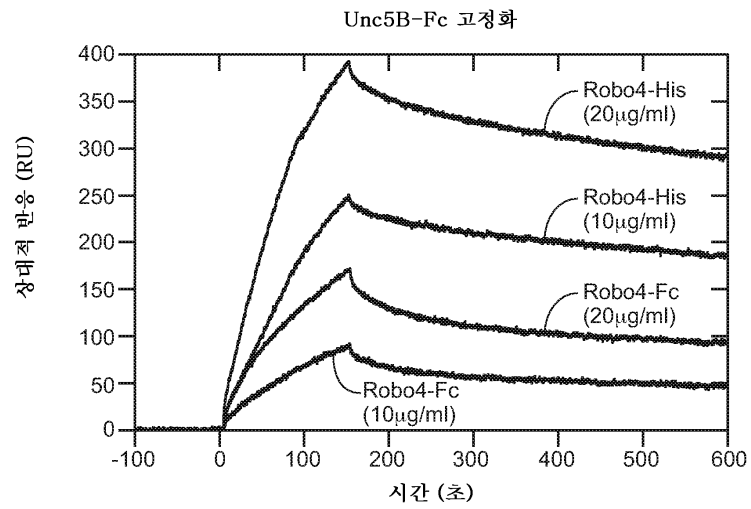
도면8



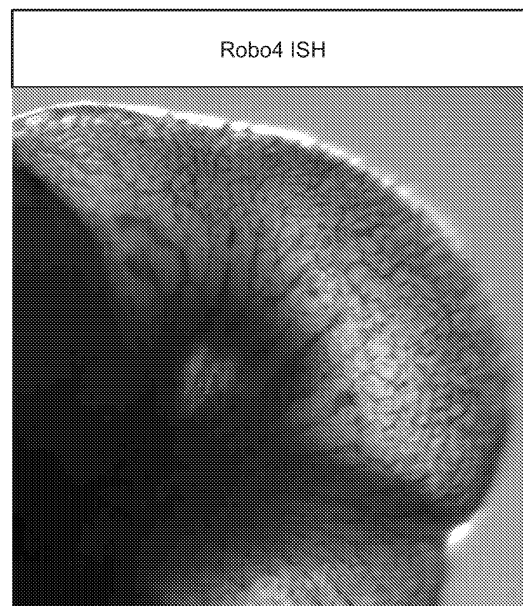
도면9



도면10

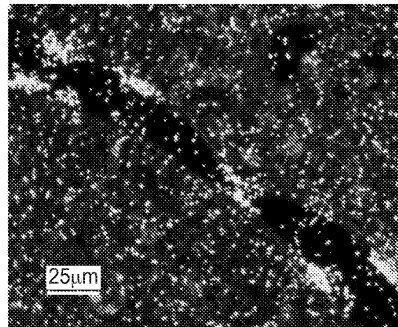


도면11



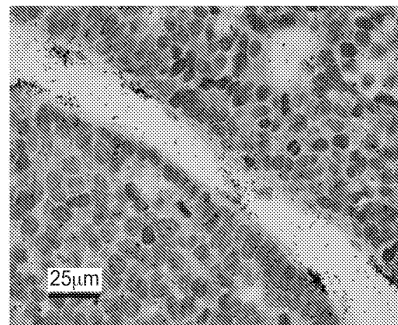
도면12A

HM-7 결장 중앙



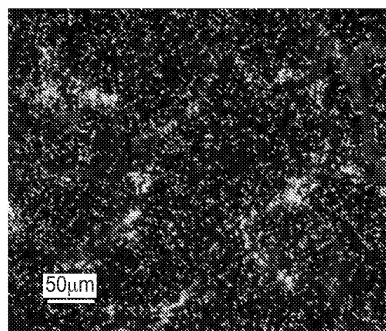
도면12B

HM-7 결장 중앙



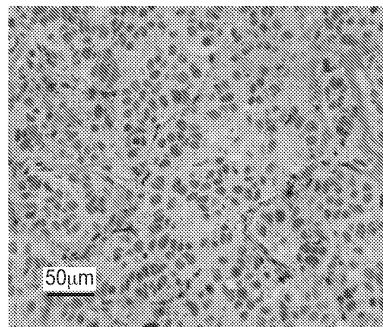
도면12C

MDA-MB175 유방 중앙



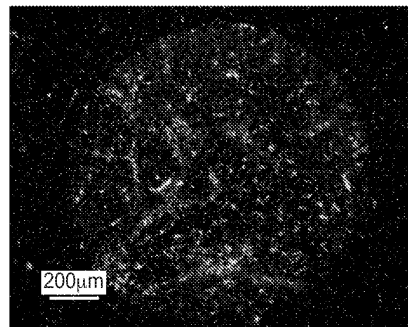
도면12D

MDA-MB175 유방 종양



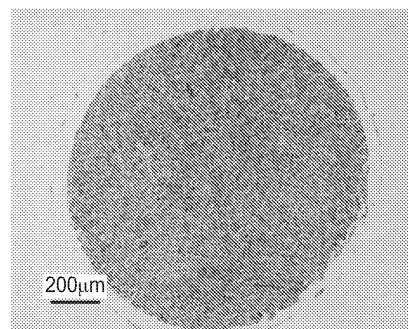
도면13A

악성 흑색종



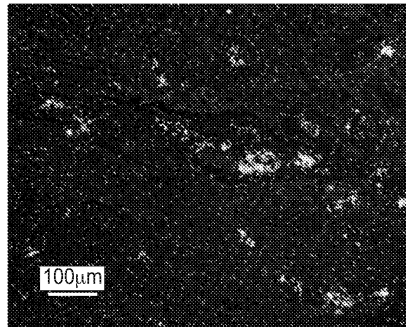
도면13B

악성 흑색종



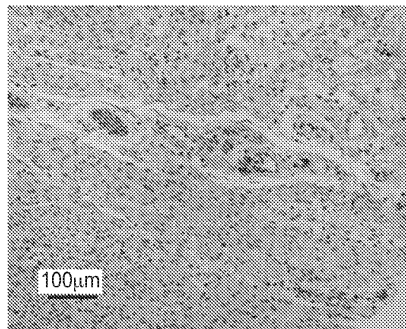
도면13C

악성 흑색종



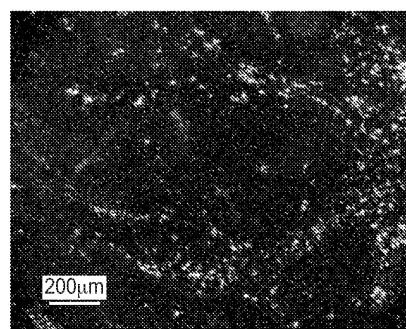
도면13D

악성 흑색종



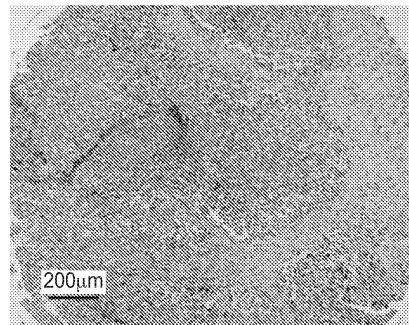
도면14A

소세포 폐암



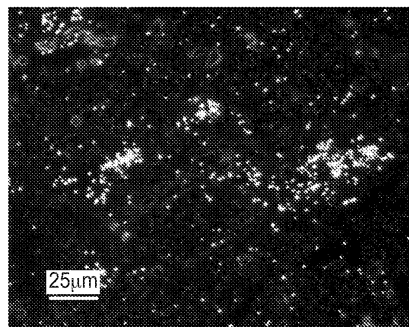
도면14B

소세포 폐암



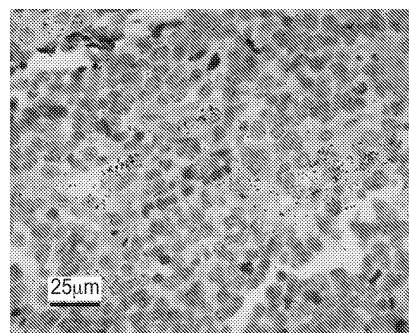
도면14C

소세포 폐암



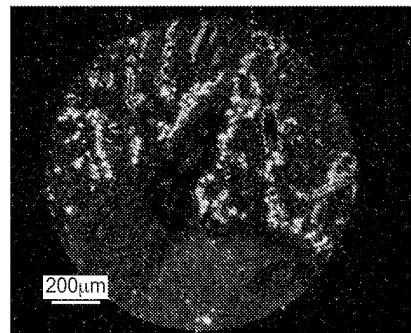
도면14D

소세포 폐암



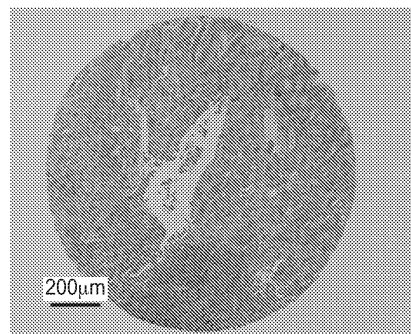
도면14E

결장암



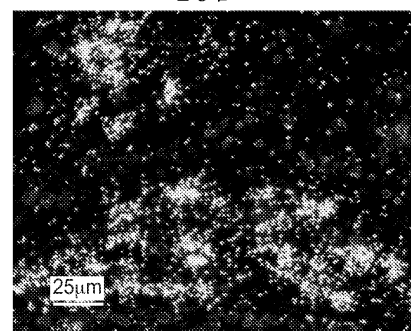
도면14F

결장암



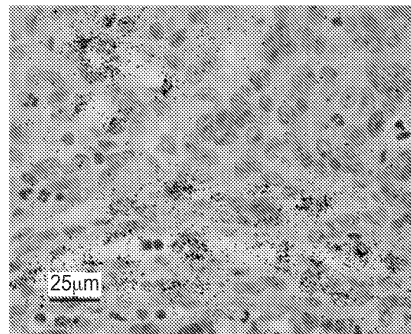
도면14G

결장암

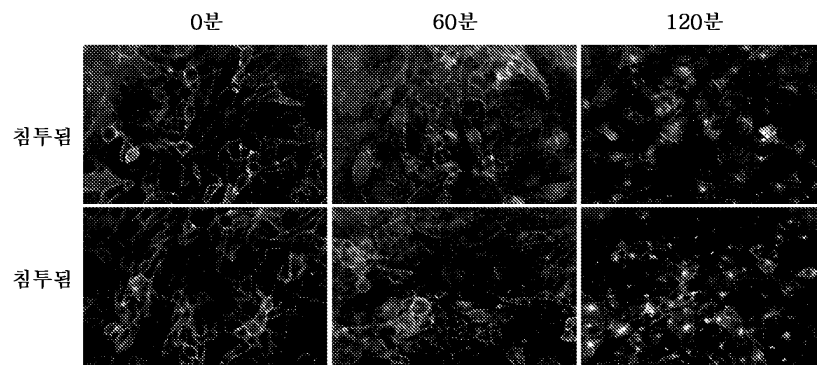


도면14H

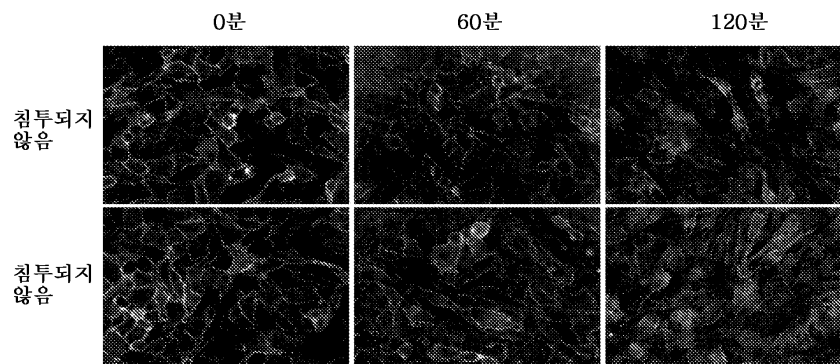
결장암



도면15A

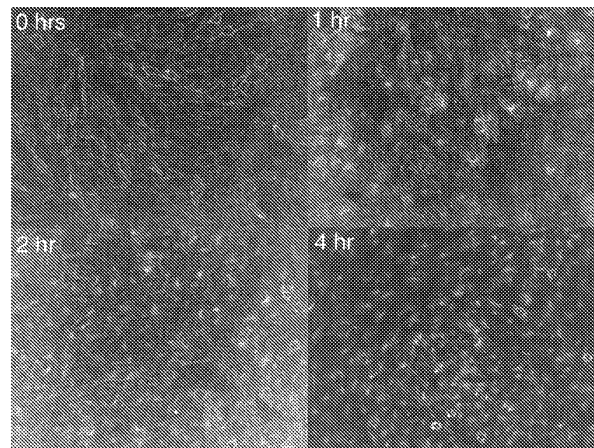


도면15B



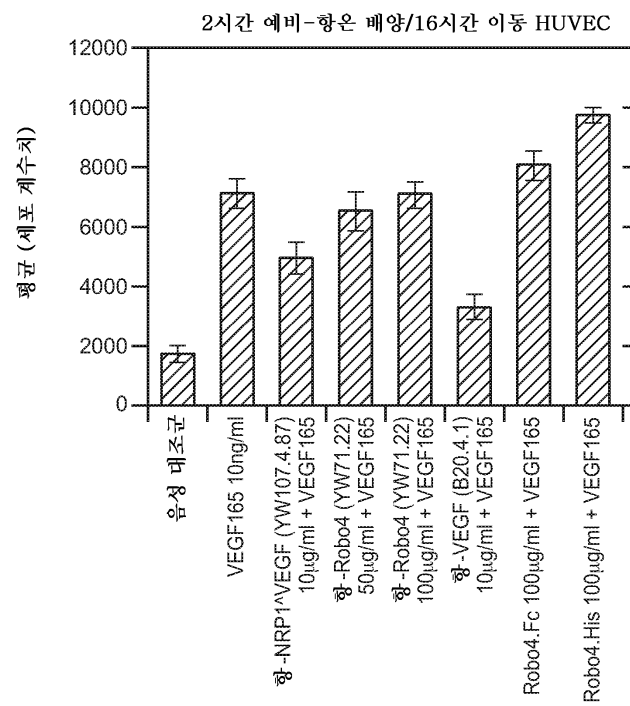
시간 경과에 따른 항-Robo4 YW71.22 재분포

도면15C

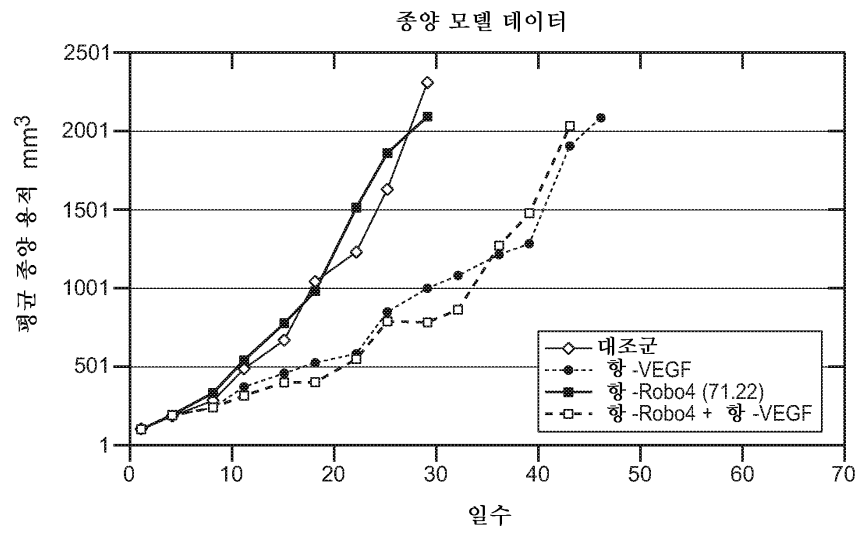


시간 경과에 따른 항-Robo4 YW71.22.S1.16 재분포

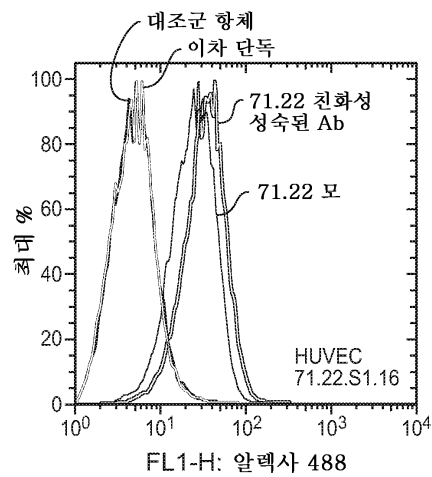
도면16



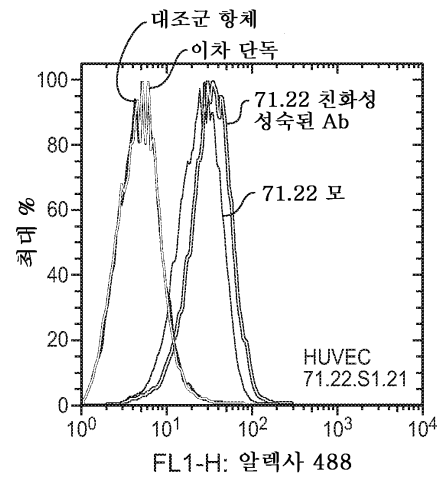
도면17



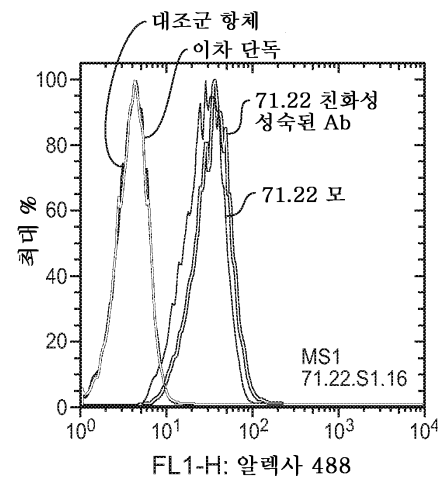
도면18A



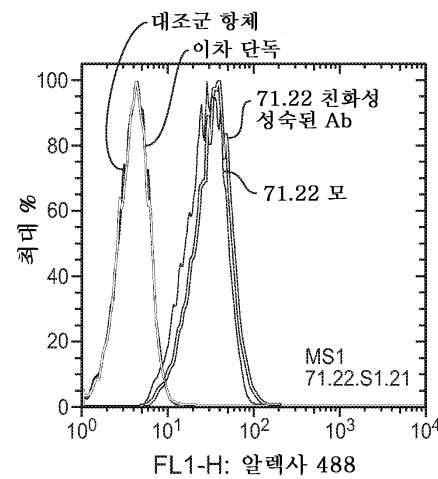
도면18B



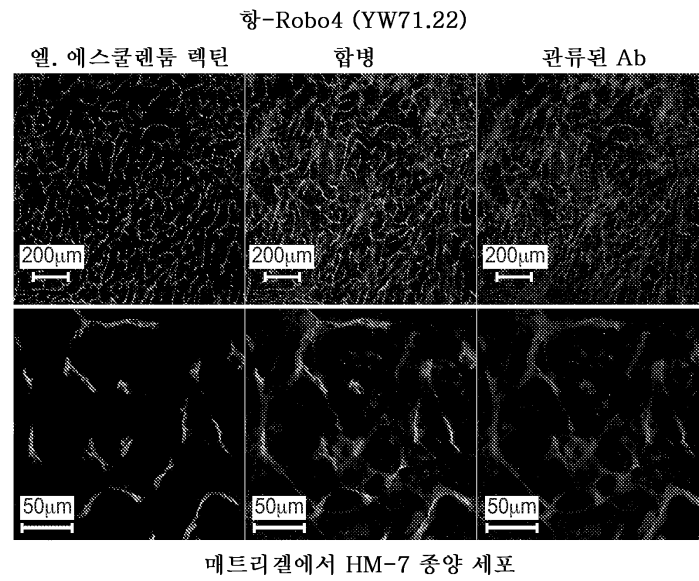
도면18C



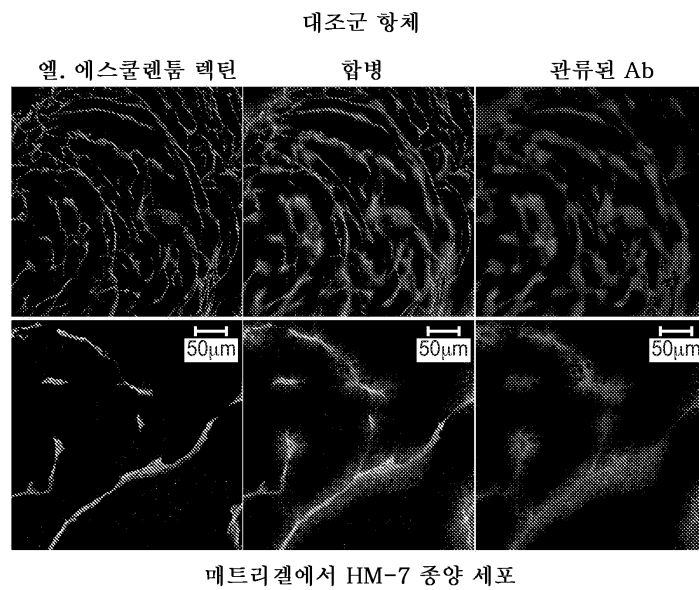
도면18D



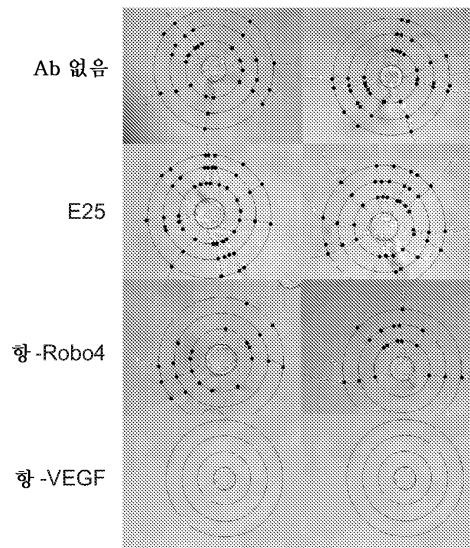
도면19A



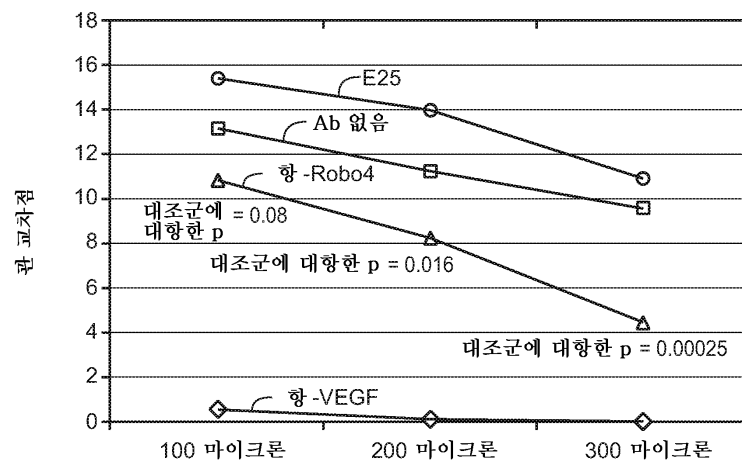
도면19B



도면20A



도면20B



서열 목록

Sequence Listing

<110> Genentech, Inc.
 Peale Jr., Franklin V.
 Watts, Ryan J.
 Koch, Alexander W.
 Wu, Yan
 Stawicki, Scott
 Carano, Richard

<120> ANTI-ROBO4 ANTIBODIES AND USES THEREFOR

<130> P2275R1 WO

<150> US 60/889,214

<151> 2007-02-09

<150> US 60/891,475

<151> 2007-02-23

<160> 187

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 1

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
				5					10	

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 2

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
				5		

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 3

Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

5

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 4
 Gly Phe Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ile His
 5 10

<210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

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

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 6
 Ala Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Gln Phe Val Pro Ala Tyr Ala
 1 5 10 15

Met Asp Tyr

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 7
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 8
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
 5

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain framework region

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 10

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 11

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 12

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5					10

<210> 13

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 13

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody light chain framework region

<400> 14
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 15
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody light chain framework region

<400> 15
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody heavy chain framework region

<400> 16
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 17
 Gly Phe Thr Ile Asn Gly Tyr Tyr Ile His
 5 10

<210> 18
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 18
 Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 19
 Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly Trp Ser Ser Tyr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 20

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 20
 Gln Gln Ser Arg Ser Asp His Pro Thr
 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 21
 Gln Gln Ser Trp Ser Tyr Pro Leu Thr
 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 22
 Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 23
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

5

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 24
 Gly Phe Thr Ile Thr Asn Tyr Trp Ile His
 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 25
 Gly Phe Thr Ile Asn Asn Asn Tyr Ile His
 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 26
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Ser
 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Arg Tyr Met Ser
5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
5 10

<210> 29

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 29

Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 30

Ala Ile Ile Ser Pro Thr Gly Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 31
 Ser Thr Ile Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 32
 Ser Gly Ile Tyr Pro Met Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 33
 Ser Gly Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 34

Ala Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Ala Tyr
5 10

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 35

Ala Arg Asp Val Asn Val Tyr Ser Ala Arg Trp Trp Asp Tyr Val
1 5 10 15

Met Asp Tyr

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 36

Ala Arg Met Ser Tyr Asn Trp Ser Ser Pro Gly His Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 37
 Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Ser Gly Ser Glu Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 38
 Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Met Pro Tyr Gly His Pro Val Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 39
 Arg Ala Ser Gln Asp Gly Ala Arg Ser Leu Ala
 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Asp Gly Ala Ile Tyr Leu Ala
5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 41

Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser
5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 42

Ser Ala Ser Leu Glu Ser
5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 43

Ser Ala Thr Leu Ala Ser
5

<210> 44

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 44
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Tyr
 5

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 45
 Ser Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 5

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 46
 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 47
 Gln Gln Ser Phe Ala Thr Pro Ala Thr

5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 48
 Gln Gln Ser Arg Ala Ala Leu Pro Thr
 5

<210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 49
 Gln Gln Ser Arg Ala Asn Thr Pro Thr
 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 50
 Gln Gln Ser Arg Thr Thr Pro Pro Thr
 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 51
Gln Gln Pro Phe Asp Leu Pro Met Thr
5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 52
Gln Gln Pro Asn Ser Thr Pro Phe Thr
5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 53
Gln Gln Ser Arg Phe Asp His Pro Thr
5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 54
Gln Gln Ser Tyr His Thr His Ser Thr
5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 55
Gln Gln Ser Arg Asp Ile Pro Pro Thr
5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 56
Gln Gln Ser Arg Asn Met Pro Ala Thr
5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 57
Gln Gln Thr Arg Val Met Pro Ala Thr
5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<400> 58
Gln Gln Thr Tyr Thr Ile Pro Pro Thr
5

<210> 59

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 59
 Gln Gln Ser Tyr Ala Tyr Pro Phe Thr
 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 60
 Gln Gln Ser Tyr Asp Leu Pro Phe Thr
 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 61
 Gln Gln Ser Tyr Gly Gly Pro Phe Thr
 5

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 62
 Gln Gln Ser Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr

5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 63
 Gln Gln Phe Tyr Ser Asp Pro Phe Thr
 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 64
 Gln Gln Gly Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr
 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 65
 Gly Phe Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Phe Glu
 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 66

Gly Phe Thr Leu Asp Gly Tyr Tyr Leu Gln
5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 67

Gly Phe Ser Ile Asn Gly Tyr Tyr Asn Gln
5 10

<210> 68

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 68

Gly Arg Ile Tyr Ser Ala Gly Gly His Thr Ala Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 69

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<400> 69

Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Lys Thr Glu Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 70
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 70
 Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Ile Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 71
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<400> 71
 Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Leu Ser Val Ile Glu Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 72
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 72
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 73

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 74

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 75

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 75

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

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

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60

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

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 76

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Trp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 77

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 77

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

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

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

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 78

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 78

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

80 85 90

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 79

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 79

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Phe Ala Thr Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 80

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 80
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Ser Arg Ala Ala Leu Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 81
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 81
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Arg Ser Asp His Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 82

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 82

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Arg Ala Asn Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 83

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 83

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

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

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody light chain

<400> 84
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Pro Phe Asp Leu Pro Met Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 85
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 85

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

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

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60

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

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Pro	Asn	Ser	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile Lys Arg

<210> 86

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 86

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

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Arg Phe Asp His Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Met Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 87

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 87

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Tyr Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr His Thr His Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 88

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 88

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Arg Asp Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 89
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 89
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Ser Arg Asn Met Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 90

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Thr Arg Val Met Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 91

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 91

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Tyr Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Thr Tyr Thr Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 92

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 92

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

80 85 90

Ser Tyr Ala Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 93

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
80 85 90

Tyr Asp Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 94

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 94
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 80 85 90
 Tyr Gly Gly Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 Lys Arg

<210> 95
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 95
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Ser Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 96

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 96

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

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

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

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

50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Phe Tyr Ser Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 97

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 97

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

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly Tyr Asn Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody light chain

<400> 98
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 99
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 99

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5				10						15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20				25						30

Tyr Cys

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 100

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				5				10	

<210> 101

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 101

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				5				10					

<210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 102

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

Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys
				20			

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 103

Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10					15	

<210> 104

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 104

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5				10					15	

Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr
				20				25					30	

Tyr Cys

<210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 105

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

Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
				20			

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 106

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 107

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 107

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 108

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 108

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

Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys
				20			

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 109

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10					15	

<210> 110

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 110

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5				10					15	

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr
				20				25						30

Tyr Cys

<210> 111

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 111

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

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

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 112

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
				5					10				

<210> 113

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 113

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5					10					15

Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala Arg

<210> 114

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 114

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

Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
				20				25	

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 115

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			5					10				

<210> 116

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 116

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5					10					15

Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala

<210> 117

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain framework region

<400> 117
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 118
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain framework region

<400> 118
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30

<210> 119
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain framework region

<400> 119
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 5 10

<210> 120
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 120

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

Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala Arg

<210> 121

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 121

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

Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser
				20				25	

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 122

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

<210> 123

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 123

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

Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala

<210> 124

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 124

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

Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

<210> 125

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 125

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

20

25

30

<210> 126

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 126

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

<210> 127

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 127

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 128

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 128

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 129

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

<210> 130

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 130

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 131

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 131

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 132
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain framework region

<400> 132
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30

<210> 133
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain framework region

<400> 133
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

Ser Arg

<210> 134
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 134

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

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ser

<210> 135

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 135

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

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala Arg

<210> 136

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain framework region

<400> 136

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

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

20 25 30

Ala

<210> 137
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody heavy chain framework region

<400> 137
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 138
<211> 1007
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 138
Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Gln Asp Ser
20 25 30

Pro Pro Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu Phe Gln Gly
35 40 45

Pro Gly Pro Ala Arg Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Gln Pro Pro
50 55 60

Pro Thr Ile Arg Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu Ser Met Val
65 70 75

Pro Pro Asp Pro His His Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu Leu Leu
80 85 90

Leu Gln Pro Pro Ala Arg Gly His Ala His Asp Gly Gln Ala Leu
95 100 105

Ser Thr Asp Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser Asn Arg Leu
110 115 120

Gly Thr Ala Val Ser Arg Gly Ala Arg Leu Ser Val Ala Val Leu
125 130 135

Arg Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Met Val Ala Val Val
140 145 150

Gly Glu Gln Phe Thr Leu Glu Cys Gly Pro Pro Trp Gly His Pro
155 160 165

Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Ala Leu
170 175 180

Gln Pro Gly Arg His Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Leu Met Ala
185 190 195

Arg Ala Glu Lys Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Met Cys Val Ala Thr
200 205 210

Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser Ile
215 220 225

Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val
230 235 240

Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala
245 250 255

Glu Gly Pro Lys Pro Arg Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val
260 265 270

Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg
275 280 285

Thr Gln Thr Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro Trp Ala Glu Glu

290	295	300
Leu Leu Ala Gly Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp		
305	310	315
Gly Gln Asp Tyr Glu Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala		
320	325	330
Arg Gly Pro Asp Ser Asn Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu Lys		
335	340	345
Val Pro Ser Ala Pro Pro Gln Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn		
350	355	360
Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val Pro Pro Pro Ala Glu Asn His		
365	370	375
Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val Trp Ser Leu Gly Asn Thr		
380	385	390
Ser Leu Pro Pro Ala Asn Trp Thr Val Val Gly Glu Gln Thr Gln		
395	400	405
Leu Glu Ile Ala Thr His Met Pro Gly Ser Tyr Cys Val Gln Val		
410	415	420
Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser Arg Pro Val		
425	430	435
Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Gln Glu Pro		
440	445	450
Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr Leu		
455	460	465
Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala Leu Trp Leu		
470	475	480
Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala		
485	490	495

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

Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg His Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe
710 715 720

Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro
725 730 735

Val Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala Pro
740 745 750

Ile Pro Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser
755 760 765

Ser Leu Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser
770 775 780

Ser Leu Ser Ser Leu Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Leu Thr Pro
785 790 795

Glu Glu Val Ala Leu Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Thr
800 805 810

Pro Arg Asn Ser Val Ser Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro
815 820 825

Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Val Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr
830 835 840

Asp Met Gly Arg Thr Gly Gly Gly Val Gly Pro Lys Gly Gly Val
845 850 855

Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu Thr Pro Thr Pro Ser Glu
860 865 870

Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala Ser Glu Asp Asn Ala
875 880 885

Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe
890 895 900

Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val Ala Val Asp

905 910 915

Ser Phe Gly Phe Gly Leu Glu Pro Arg Glu Ala Asp Cys Val Phe
920 925 930

Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Glu Ile Phe Leu
935 940 945

Thr Pro Asn Leu Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp
950 955 960

Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly
965 970 975

Met Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser
980 985 990

Gln Leu His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp
995 1000 1005

Tyr Ser

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 139

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 140

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 140

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Ala Val Ile Thr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Gln
95 100 105

Phe Val Pro Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
110 115 120

Val Thr Val Ser Ser
125

<210> 141

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 141

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Leu Ala
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 142

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 142

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 143

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 143

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

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

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Val Asn Val Tyr Ser Ala

95 100 105

Arg Trp Trp Asp Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
110 115 120

Val Thr Val Ser Ser
125

<210> 144

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 144

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Ser Thr Ile Tyr Gly Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Ser Tyr Asn Trp Ser Ser
95 100 105

Pro Gly His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 145
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 145
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Arg Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Tyr Pro Met Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Tyr Ser Gly Ser
 95 100 105
 Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 146
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 146

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Met Pro Tyr
95 100 105

Gly His Pro Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 147

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 147

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Ser Ala Gly Gly His Thr Ala Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 148

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 148

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr

50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 149

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 149

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 150

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 150

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 151

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 151

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 152

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 152
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp
 20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Lys Thr Glu Tyr
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
 95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 153
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 153

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Ile Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 154

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 154

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 155

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 155

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

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

50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 156

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 156

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 157

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 157

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 158

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 158

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 159

<211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 159
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
 20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
 50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
 95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 160
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody heavy chain variable region

<400> 160

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 161

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 161

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 162

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 162

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr

50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 163

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 163

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 164

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 164

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 165

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain variable region

<400> 165

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Phe Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Asp Thr Asp Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ile Gly Asn Lys Phe Gly
95 100 105

Trp Ser Ser Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
110 115 120

Thr Val Ser Ser

<210> 166

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain framework region

<400> 166
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys
 5 10

<210> 167
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody light chain

<400> 167
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 168

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 168

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15

Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
				20					25					30

Tyr Cys

<210> 169

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody heavy chain

<400> 169

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Ile	Asn
				20					25					30

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

Glu	Trp	Val	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr
				50					55					60

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

Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Lys	Phe	Gly
				95					100					105
Trp	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				110					115					120
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
				125					130					135
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
				140					145					150
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
				155					160					165
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				170					175					180
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
				185					190					195
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
				200					205					210
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
				215					220					225
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
				230					235					240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
				245					250					255
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
				260					265					270
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
				275					280					285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
320 325 330

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
335 340 345

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
350 355 360

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
365 370 375

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
380 385 390

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
395 400 405

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
410 415 420

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
425 430 435

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
440 445 450

Ser Pro Gly Lys

<210> 170

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain

<400> 170

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

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

Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
				50					55					60

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

Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
				95					100					105

Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro
				110					115					120

Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
				125					130					135

Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
				140					145					150

Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu
				155					160					165

Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr
				170					175					180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 171

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> His-tagged Robo4

<400> 171

Gln Asp Ser Pro Pro Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu
1 5 10 15

Phe Gln Gly Pro Gly Pro Ala Arg Met Ser Cys Gln Ala Ser Gly
20 25 30

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

Ser Met Val Pro Pro Asp Pro His His Leu Leu Pro Asp Gly Thr
50 55 60

Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg Gly His Ala His Asp Gly
65 70 75

Gln Ala Leu Ser Thr Asp Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser
80 85 90

Asn Arg Leu Gly Thr Ala Val Ser Arg Gly Ala Arg Leu Ser Val
95 100 105

Ala Val Leu Arg Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Met Val
110 115 120

Ala Val Val Gly Glu Gln Phe Thr Leu Glu Cys Gly Pro Pro Trp
125 130 135

Gly His Pro Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Pro
140 145 150

Leu Ala Leu Gln Pro Gly Arg His Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu
155 160 165

Leu Met Ala Arg Ala Glu Lys Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Met Cys
170 175 180

Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg
185 190 195

Val Ser Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Arg Ala His His His His
200 205 210

His His His His

<210> 172

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> His-tagged Robo4

<400> 172

Met Gly Ser Gly Gly Thr Gly Leu Leu Gly Thr Glu Trp Pro Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Leu Phe Ile Met Gly Gly Glu Ala Leu Asp Ser
20 25 30

Pro Pro Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu Leu Gln Gly
35 40 45

Ser Gly Pro Ala Lys Met Arg Cys Arg Ser Ser Gly Gln Pro Pro
50 55 60

Pro Thr Ile Arg Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu Ser Met Ala
65 70 75

Thr Pro Asp Leu His Tyr Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu Leu Leu
80 85 90

His Arg Pro Ser Val Gln Gly Arg Pro Gln Asp Asp Gln Asn Ile
95 100 105

Leu Ser Ala Ile Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser Asn Arg
110 115 120

Leu Gly Thr Ala Val Ser Arg Gly Ala Arg Leu Ser Val Ala Val
125 130 135

Leu Gln Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Thr Val Ala Val
140 145 150

Val Gly Glu Ser Leu Val Leu Glu Cys Gly Pro Pro Trp Gly Tyr
155 160 165

Pro Lys Pro Ser Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Val
170 175 180

Leu Gln Pro Gly Arg Arg Thr Val Ser Gly Asp Ser Leu Met Val
185 190 195

Ser Arg Ala Glu Lys Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Met Cys Met Ala
200 205 210

Thr Asn Asn Ala Gly Gln Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser
215 220 225

Ile Gln Glu Ser Gln Asp His Arg Arg Ala His His His His His
230 235 240

His His His

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody light chain framework region

<400> 173

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> X1 is D or S

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> X2 is V, I or G

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> X3 is S or A

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> X4 is T, S, R, or I

<220>

<221> Xaa

<222> 9

<223> X5 is A, Y or S

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> X6 is V or L

<400> 174
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 5 10

<210> 175
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 1
 <223> X1 is S or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X2 is T or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X3 is F, S, L, N, or T

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X4 is L, R, E, or A

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X5 is Y, A, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X6 is S or Y

<400> 175
 Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X1 is S, Y, P, T, F or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X2 is Y, W, F, R or N

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X3 is T, S, N, A, D, F, H, V or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X4 is T, Y, S, A, D, N, L, I, M, Y or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X5 is P, L, H, or T

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X6 is P, L, F, A, M or S

<400> 176
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr

<210> 177
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 2
 <223> X1 is F or Y

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X2 is T or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X3 is I, F, or L

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X4 is S, N, T, Y, D, or K

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X5 is G, N, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X6 is S, Y, N or R

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X7 is W, Y or A

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> X8 is I, M, F, L or N

$\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 10

<223> X9 is H, S, E or Q

<400> 177

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
5 10

<210> 178

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> antibody hypervariable region

 $\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 1

<223> X1 is A, G or S

 $\langle 220 \rangle$ $\langle 221 \rangle$ Xaa

<222> 2

<223> X2 is V, F, G, I, T or R

 $\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 4

<223> X3 is T, Y or S

 $\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 5

<223> X4 is P, G or S

 $\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 6

<223> X5 is A, T, Y, or M

 $\langle 220 \rangle$

<221> Xaa

<222> 7

<223> X6 is G, D, or L

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X7 is G or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> X8 is Y, D, S, T, H, K, A or V

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> X9 is T or I

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> X10 is Y, D, N, A, E, or I

<400> 178
 Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 179
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 2
 <223> X1 is R or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X2 is S, L, G, D, M or W

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X3 is N, I, G, V, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X4 is R, G, Y or N

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X5 is Y, N, S, or V

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X6 is S, K, Y, W, or M

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X7 is G, F, S, P or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> X8 is Q, G, A, S, Y or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> X9 is F, W, R, P, E, G or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> X10 is V, S, W, G, H, or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 12
 <223> X11 is P, S, W, H, or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 13
 <223> X12 is A, Y, D, G, V, or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 14
 <223> X13 is Y, G or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 15
 <223> X14 is A, V or a deletion

<220>
 <221> Xaa
 <222> 16
 <223> X15 is M, L, or F

<220>
 <221> Xaa
 <222> 17
 <223> X16 is D or A

<220>
 <221> Xaa
 <222> 18
 <223> X17 is Y or V

<400> 179
 Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa

<210> 180
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>

<221> Xaa
 <222> 2
 <223> X1 is F or Y

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X2 is T or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X3 is I, F, or L

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X4 is S, T, Y, D, or K

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X5 is G, N, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X6 is S, N or R

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X7 is W or A

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> X8 is I, M, F, L or N

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> X9 is H, S, E or Q

<400> 180
 Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

<210> 181
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 1
 <223> X1 is A or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 2
 <223> X2 is V, G, I, T, or R

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X3 is T or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X4 is P, G, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X5 is A, T, Y, or M

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X6 is G, D, or L

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X7 is G or S

<220>

<221> Xaa
 <222> 9
 <223> X8 is Y, S, T, H, K, A or V

<220>
 <221> Xaa
 <222> 10
 <223> X9 is T or I

<220>
 <221> Xaa
 <222> 11
 <223> X10 is Y, N, A, E, or I

<400> 181
 Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 182
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 1
 <223> X1 is S, G, D, M or W

<220>
 <221> Xaa
 <222> 2
 <223> X2 is N, G, V, or S

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X3 is R, Y, or N

<220>
 <221> Xaa

<222> 4
<223> X4 is Y, S, or V

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> X5 is S, Y, W, or M

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> X6 is G, S, P, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 7
<223> X7 is Q, A, S, Y, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> X8 is F, R, P, E, G, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 9
<223> X9 is V, W, G, H, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> X10 is P, W, G, H, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 11
<223> X11 is A, D, G, V, or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 12
<223> X12 is Y or a deletion

<220>
<221> Xaa
<222> 13

<223> X13 is A or V

<220>

<221> Xaa

<222> 14

<223> X14 is M, L, or F

<220>

<221> Xaa

<222> 16

<223> X15 is Y or V

<400> 182

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp
1				5					10						15

Xaa

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> X1 is V or G

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> X2 is S or A

<220>

<221> Xaa

<222> 8

<223> X3 is T, R, or I

<220>

<221> Xaa

<222> 9

<223> X4 is A, S, or Y

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> X5 is V or L

<400> 183

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala
					5				10	

<210> 184

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antibody hypervariable region

<220>

<221> Xaa

<222> 3

<223> X1 is S or T

<220>

<221> Xaa

<222> 4

<223> X2 is F, L, N or T

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> X3 is L, E, or A

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> X4 is Y, A, or S

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> X5 is S, Y or a deletion

<400> 184

Ser Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

<210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antibody hypervariable region

<220>
 <221> Xaa
 <222> 3
 <223> X1 is S, P, T, F, or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> X2 is Y, F, R, or N

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X3 is T, A, S, D, F, H, N, V, or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> X4 is T, A, D, N, L, I, M, Y, or G

<220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> X5 is P, L, H, or T

<220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> X6 is P, A, M, F, or S

<400> 185
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr

<210> 186
 <211> 10

<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<220>
<221> Xaa
<222> 3
<223> X1 is T or S

<220>
<221> Xaa
<222> 4
<223> X2 is I or L

<220>
<221> Xaa
<222> 5
<223> X3 is N, Y, D, or K

<220>
<221> Xaa
<222> 9
<223> X4 is I, F, L or N

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> X5 is H, E, or Q

<400> 186
Gly Phe Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Tyr Xaa Xaa
5 10

<210> 187
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antibody hypervariable region

<220>
<221> Xaa
<222> 2

<223> X1 is F or R

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> X2 is P or S

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> X3 is G or L

<220>

<221> Xaa

<222> 9

<223> X4 is D, H, K, A, or V

<220>

<221> Xaa

<222> 11

<223> X5 is D, A, E or I

<400> 187

Gly	Xaa	Ile	Tyr	Xaa	Ala	Xaa	Gly	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15

Val Lys Gly