



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0011676
(43) 공개일자 2011년02월08일

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7027786

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년05월13일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년12월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/043757

(87) 국제공개번호 WO 2009/140361

국제공개일자 2009년11월19일

(30) 우선권주장

12/208,883 2008년09월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

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

(72) 발명자

아타왈, 자스빈더

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 세인트 프
랜시스 웨이 1425

테시어-라빈, 마크

미국 94062 캘리포니아주 우드사이드 릿지웨이 로
드 361

우, 안

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블라이스
스트리트 1160

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 43 항

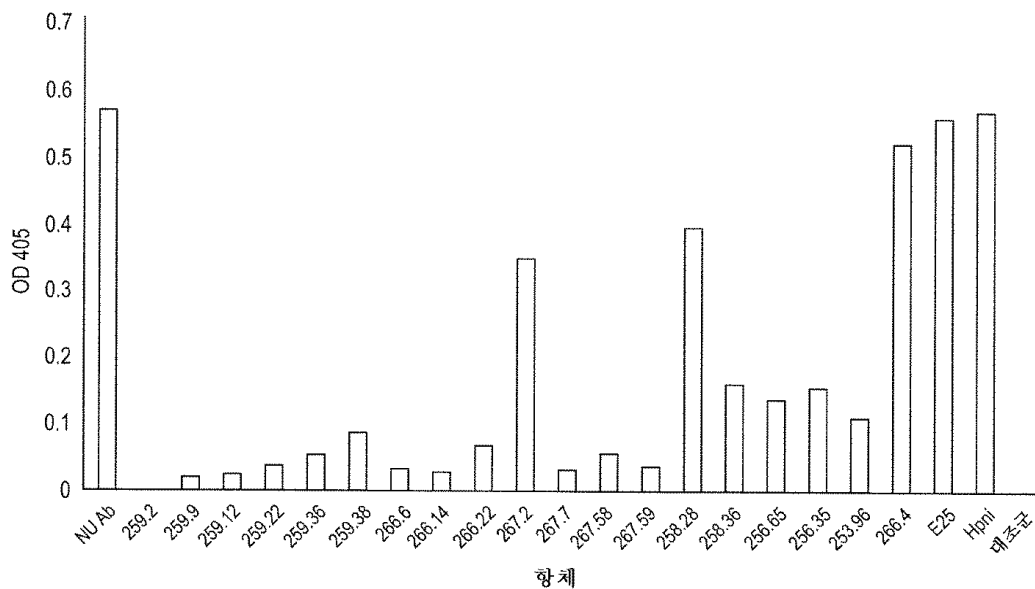
(54) 항-P i r B 항체

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 신경 발달 및 신경학적 장애에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 미엘린-관련 억제 시
스템의 신규한 조절인자의 확인 및 이렇게 확인된 조절인자의 다양한 용도에 관한 것이다.

대표도

상대적 AP-Nogo66 결합



(30) 우선권주장

12/316,130 2008년12월09일 미국(US)

61/052,949 2008년05월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

YW259.2, YW259.9 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된 항체로서 인간 PirB (LILRB) 상의 동일한 에피토프에 결합하는, 단리된 항-PirB/LILRB 항체.

청구항 2

YW259.2, YW259.9 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된 항체와 인간 PirB (LILRB)에 결합하는 것을 경쟁하는, 단리된 항-PirB/LILRB 항체.

청구항 3

YW259.2 중쇄 (서열 4 또는 11), YW259.9 중쇄 (서열 5 또는 12), 및 YW259.12 중쇄 (서열 6 또는 13)로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄로부터의 1개, 2개, 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함하는, 단리된 항-PirB/LILRB 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, YW259.2 항체 중쇄 (서열 4 또는 11)의 모든 추가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

제3항에 있어서, YW259.9 항체 중쇄 (서열 5 또는 12)의 모든 추가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 6

제3항에 있어서, YW259.12 항체 중쇄 (서열 6 또는 13)의 모든 추가변 영역 서열을 포함하는 항체.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 경쇄가 서열 15의 폴리펩티드 서열의 1개, 2개, 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 경쇄가 서열 7 또는 15의 폴리펩티드 서열의 모든 추가변 영역 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 10

제3항에 있어서, 항체 YW259.2, YW259.9, 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된 항체.

청구항 11

항체의 전장 IgG 형태가 5 nM 이상의 결합 친화도로 인간 PirB (LILRB)에 특이적으로 결합하는 단리된 항-PirB/LILRB 항체.

청구항 12

항체의 전장 IgG 형태가 1 nM 이상의 결합 친화도로 인간 PirB (LILRB)에 특이적으로 결합하는 단리된 항-PirB/LILRB 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 축삭 재생을 촉진하는 항체.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, CNS 뉴런의 재생을 촉진하는 항체.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, Nogo66 및 미엘린에 의한 신경돌기 생장 억제를 적어도 부분적으로 회복시키는 항체.

청구항 16

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 성숙 항체, 인간 항체 및 이중 특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체.

청구항 18

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편인 항체.

청구항 19

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 면역접합체인 항체.

청구항 20

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항체, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

제20항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

청구항 23

제21항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

제23항에 있어서, 원핵 세포인 숙주 세포.

청구항 25

제23항에 있어서, 진핵 세포인 숙주 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 27

(a) 제22항의 벡터를 적합한 숙주 세포에서 발현시키는 단계, 및 (b) 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항-PirB/LILRB 항체의 제조 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 숙주 세포가 원핵 세포인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 숙주 세포가 진핵 세포인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항-PirB/LILRB 항체, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 추가로 제2 의약을 포함하고, 여기서 항-PirB/LILRB 항체가 제1 의약인 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 제2 의약이 NgR 억제제인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, NgR 억제제가 항-NgR 항체인 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항-PirB/LILRB 항체를 포함하는 키트.

청구항 35

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항-PirB/LILRB 항체의 유효량을 이것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 축삭 재생을 촉진하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 대상체가 인간 환자인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 생존 또는 뉴런이 개선되는 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 뉴런의 생장이 유도되는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항-PirB/LILRB 항체의 유효량을 이것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환을 치료하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 신경변성 질환이 중추 신경계에 대한 물리적 손상을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 신경변성 질환이 뇌졸중과 관련된 뇌 손상인 방법.

청구항 42

제39항에 있어서, 신경변성 질환이 삼차 신경통, 설인 신경통, 벨 마비(Bell's Palsy), 중증 근무력증, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 다발성 경화증(MS), 진행성 근위축증, 진행성 연수 유전성 근위축증, 물리적 손상(예를 들어 화상, 상처) 또는 질환 상태, 예컨대 당뇨병, 신장 기능장애 또는 암 및 AIDS를 치료하는데 사용된 화학요법제의 독성 효과로 인해 유발된 말초 신경 손상, 추간판 헤르니아, 파열, 또는 이탈 무척추 디스크 증후군, 경부 척추증, 신경총 장애, 흉곽 출구 파괴 증후군, 낚, 답손, 진드기로 인해 유발된 것과 같은 말초 신경병증, 포르피린증, 길랑-바레 증후군(Gullain-Barre syndrome), 알츠하이머병, 헌팅턴병, 및 파킨슨병으

로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 항-PirB/LILRB 항체에 특이적으로 결합하는, 항-이디오타입 항체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 신경 발달 및 신경계 장애에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 미엘린-관련 억제 시스템의 신규한 조절인자의 확인 및 이렇게 확인된 조절인자의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미엘린 및 미엘린-관련 단백질

[0003] 성체 포유동물 CNS 뉴런의 축삭은 손상 후 재생되는 능력이 매우 제한된 반면, 말초 신경계 (PNS)의 축삭은 신속하게 재생되는 것으로 알려져 있다. CNS 뉴런의 제한된 재생 능력은 부분적으로는 CNS 축삭의 고유의 성질로 알려져 있지만, 또한 허용할 수 없는 환경으로 인한 것이기도 하다. CNS 미엘린은, 신경돌기 성장에 대한 억제 신호의 유일한 공급원은 아니지만, 축삭 성장을 활발하게 차단하는 수많은 억제 분자를 함유하고, 따라서 재생에 대한 상당한 장벽을 구성한다. 3개의 이같은 미엘린-관련 단백질 (MAP)이 확인되었다: Nogo (NogoA로 또한 알려짐)는 2개의 막횡단 도메인을 갖는 레티쿨론(Reticulon) 패밀리의 구성원이고, 미엘린-관련 당단백질 (MAG)은 Ig 슈퍼패밀리의 막횡단 단백질이며, OMgp는 글리코실포스파티딜이노시톨 (GPI) 앵커(anchor)가 있는, 류신이 풍부한 반복부 (LRR) 단백질이다. 문헌 [Chen et al., Nature 403:434-39 (2000)]; [GrandPre et al., Nature 417:439-444 (2000)]; [Prinjha et al., Nature 403:383-384 (2000)]; [McKerracher et al., Neuron 13:805-11 (1994)]; [Wang et al., Nature 417:941-4 (2002)]; [Kottis et al., J. Neurochem 82:1566-9 (2002)]. NogoA의 일부분인 Nogo66은 Nogo의 3가지 이소형 모두에서 발견되는 66개의 아미노산 세포외 폴리펩티드로서 기재되었다.

[0004] 구조적 차이에도 불구하고, 3가지 억제 단백질 모두 (Nogo66 포함)는 Nogo 수용체라 불리는 동일한 GPI-앵커 수용체 (NgR; Nogo 수용체-1 또는 NgR1로 또한 알려짐)에 결합하는 것으로 밝혀졌고, NgR이 Nogo, MAG 및 OMgp의 억제 작용을 매개하는데 필요할 수 있는 것으로 제안되었다. 문헌 [Fournier et al., Nature 409:341-346 (2001)]. 2개의 NgR1 상동체 (NgR2 및 NgR3)가 또한 확인되었다. US 2005/0048520 A1 (Strittmatter et al.) (2005년 3월 3일 공개). NgR이 GPI-앵커 세포 표면 단백질이라는 것을 감안하면, 이는 직접적인 신호 변환기는 아닐 것이다 (문헌 [Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:1205-1210 (2005)]). 뉴로트로핀 수용체 p75^{NTR}이 NgR에 대한 공동-수용체로서 작용하고, 수용체 복합체 내의 신호-변환 모이어티를 제공한다는 것이 제안되었다 (문헌 [Wang et al., Nature 420:74-78 (2002)]; [Wong et al., Nat. Neurosci. 5:1302-1308 (2002)]).

[0005] PirB 및 인간 오솔로그 (ortholog)

[0006] 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I은 원래 면역계에서 중요한 분자 패밀리를 코딩하는 영역으로서 확인되었다. 최근의 증거들은 MHC 클래스 I 분자가 발달 및 성체 CNS에서 추가적인 기능을 갖는다는 것을 나타내었다. 문헌 [Boulanger and Shatz, Nature Rev Neurosci. 5:521-531 (2004)]; US 2003/0170690 (Shatz and Syken) (2003년 9월 11일 공개). 다수의 MHC 클래스 I 구성원 및 이들의 결합 파트너가 CNS 뉴런에서 발견되는 것으로 밝혀졌다. 최근의 유전자 및 분자 연구는 CNS MHC 클래스 I의 생리학적 기능에 집중되었고, 초기의 결과들은 뉴런 활성화에 응답하여 기존의 시냅스 연결의 강도가 증가 또는 감소된 후, 회로에 대한 장기적인 구조적 변경이 이어지는 프로세스인 활성-의존적 시냅스 가소성에 MHC 클래스 I 분자가 수반될 수 있음을 시사하였다. 더욱이, MHC 클래스 I 코딩 영역은 신경계 증상이 있는 광범위한 장애와 유전적으로 또한 연계되어 있고, MHC 클래스 I 분자의 비정상적인 기능은 정상적인 뇌 발달 및 가소성의 파괴에 기여하는 것으로 생각된다.

[0007] 면역 환경에서 공지되어 있는 MHC 클래스 I 수용체들 중 하나는 문헌 [Kubagawa et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:5261-6 (1997)]에 최초로 기재된 뮤린(murine) 폴리펩티드인 PirB이다. 마우스 PirB는 여러 인간 오솔로그를 가지며, 이들은 백혈구 면역글로불린-유사 수용체, 서브패밀리 B (LILRB)의 구성원이고, "면역글로불린-유사 전사물" (ILT)로 또한 지칭된다. 인간 오솔로그들은 뮤린 서열에 대해 최고에서 최저로

LILRB3/ILT5, LILRB1/ILT2, LILRB5/ILT3, LILRB2/ILT4의 순서로 상당한 상동성을 나타내고, PirB와 같이, 모두 억제 수용체이다. LILRB3/ILT5 (NP_006855) 및 LILRB1/ILT2 (NP_006660)는 문헌 [Samaridis 및 Colonna, Eur. J. Immunol. 27(3):660-665 (1997)]에 최초로 기재되었다. LILRB5/ILT3 (NP_006831)은 문헌 [Borges et al., J. Immunol. 159(11):5192-5196 (1997)]에서 확인되었다. LILRB2/ILT4 (MIR10으로 또한 알려짐)는 문헌 [Colonna et al., J. Exp. Med. 186:1809-18 (1997)]에서 확인되었다. PirB 및 이의 인간 오솔로그들은 높은 정도의 구조적 가변성을 나타낸다. 다양하게 달리 스플라이싱된 형태의 서열들이 EMBL/GenBank로부터 입수가 가능하고, 예를 들어 인간 ILT4 cDNA에 대한 다음과 같은 등록 번호들이 포함된다: ILT4-c11 AF009634; ILT4-c117 AF11566; ILT4-c126 AF11565. 상기한 바와 같이, PirB/LILRB 폴리펩티드는 MHC 클래스 I (MHCI) 억제 수용체이고, 면역 세포 활성화를 조절하는데 있어서 그들의 역할이 공지되어 있다 (문헌 [Kubagawa et al., 상기 문헌]; [Hayami et al., J. Biol. Chem. 272:7320 (1997)]; [Takai et al., Immunology 115:433 (2005)]; [Takai et al., Immunol. Rev. 181:215 (2001)]; [Nakamura et al., Nat. Immunol. 5:623 (2004)]; [Liang et al., Eur. J. Immunol. 32:2418 (2002)]).

[0008] Syken et al.,에 의한 최근의 연구는 (문헌 [Science 313:1795-800 (2006)]) PirB가 뇌 전체에 걸쳐 뉴런의 하위세트에서 발현된다고 보고하였다. 기능성 PirB가 결여된 돌연변이 마우스에서, 피질 눈 우성 (OD) 가소성이 모든 연령에서 상당히 강화되고, 이는 시각 피질에서 활성-의존적 가소성을 제한하는 PirB의 기능을 시사한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은, 적어도 일부는, 기능-차단 항-PirB 항체를 이용하여 PirB의 활성을 방해하는 것이 Nogo66 및 미엘린에 의한 신경돌기 생장 억제로부터 벗어나게 하고, PirB와 NgR 활성을 동시에 차단하는 것이 미엘린 억제로부터 거의 완전히 벗어나게 한다는 발견에 기초한다.

과제의 해결 수단

[0010] 한 측면에서, 본 발명은 YW259.2, YW259.9 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된 항체로서 인간 PirB (LILRB) 상의 동일한 에피토프에 본질적으로 결합하는 단리된 항-PirB/LILRB 항체에 관한 것이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 YW259.2, YW259.9 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된 항체와 인간 PirB (LILRB)에 결합하는 것을 경쟁하는 단리된 항-PirB/LILRB 항체에 관한 것이다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 YW259.2 중쇄 (서열 4 또는 11), YW259.9 중쇄 (서열 5 또는 12), 및 YW259.12 중쇄 (서열 6 또는 13)로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄에서 1, 2, 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함하는, 단리된 항-PirB/LILRB 항체에 관한 것이다.

[0013] 한 실시양태에서, 항체는 YW259.2 항체 중쇄 (서열 4 또는 11)의 모든 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0014] 또 다른 실시양태에서, 항체는 YW259.9 항체 중쇄 (서열 5 또는 12)의 모든 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 항체는 YW259.12 항체 중쇄 (서열 6 또는 13)의 모든 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0016] 추가의 실시양태에서, 항체는 경쇄를 포함한다.

[0017] 또 다른 추가의 실시양태에서, 항체는 서열 7의 폴리펩티드 서열로부터 경쇄의 1, 2 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 7 또는 15의 폴리펩티드 서열을 포함하는 경쇄의 모든 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0019] 특정 실시양태에서, 항체는 중쇄 및 경쇄를 둘 다 포함하고, 이때 중쇄는 YW259.2 중쇄 (서열 4 또는 11), YW259.9 중쇄 (서열 5 또는 12), 및 YW259.12 중쇄 (서열 6 또는 13)로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄에서 1, 2, 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함하고/거나, 경쇄는 서열 7 또는 15의 폴리펩티드 서열로부터 경쇄의 1, 2 또는 3개의 추가변 영역 서열을 포함한다.

[0020] 추가의 실시양태에서, 항체는 항체 YW259.2, YW259.9, 및 YW259.12로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 추가의 측면에서, 본 발명은 항체의 전장 IgG 형태가 5 nM 이상, 또는 1 nM 이상의 결합 친화도로 인간 PirB에

특이적으로 결합하는, 단리된 항-PirB 항체에 관한 것이다.

- [0022] 한 실시양태에서, 항체는 축삭 재생, 예컨대 CNS 뉴런의 재생을 촉진한다.
- [0023] 또 다른 실시양태에서, 항체는, 적어도 부분적으로, Nogo66 및 미엘린에 의한 신경돌기 성장 억제를 벗어나게 한다.
- [0024] 모든 측면에서, 항체는 바람직하게는 모노클로날 항체이며, 예를 들어 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 성숙 항체, 인간 항체 또는 이중특이적 항체, 항체 단편 또는 면역접합체일 수 있다.
- [0025] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원의 항-PirB/LILRB 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.
- [0026] 다른 측면에서, 본 발명은 본원의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 (하나 이상의 항체 사슬의 코딩 서열을 포함)를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 원핵생물, 진핵생물 및 포유동물 숙주를 포함한다.
- [0027] 추가의 측면에서, 본 발명은 (a) 적합한 숙주 세포에서 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 발현시키는 단계, 및 (b) 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항-PirB/LILRB 항체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0028] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 본원의 항-PirB/LILRB 항체 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 임의로, 조성물은 제2 의약을 포함하며, 이때 항-PirB/LILRB 항체가 제1 의약이다. 제2 의약은, 예를 들어 NgR 억제제, 예컨대 항-NgR 항체일 수 있다.
- [0029] 다양한 측면에서, 본 발명은 본원의 항-PirB/LILRB 항체를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원의 항-PirB/LILRB 항체의 유효량을 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 축삭 재생을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 대상체는 인간 환자이다.
- [0031] 실시양태에서, 본원의 처리 방법은 뉴런의 생존을 개선하고/거나, 뉴런의 성장을 유도한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원의 항-PirB/LILRB 항체의 유효량을 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 신경변성 질환은, 예를 들어 중추신경계에 대한 물리적 손상을 특징으로 할 수 있고, 비제한적으로 뇌졸중과 관련된 뇌 손상을 포함한다.
- [0033] 특정 실시양태에서, 신경변성 질환은 삼차 신경통, 설인 신경통, 벨 마비(Bell's Palsy), 중증 근무력증, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 다발성 경화증 (MS), 진행성 근위축증, 진행성 연수 유전성 근위축증, 물리적 손상 (예를 들어 화상, 상처) 또는 질환 상태, 예컨대 당뇨병, 신장 기능장애 또는 암 및 AIDS를 치료하는데 사용된 화학요법제의 독성 효과로 인해 유발된 말초 신경 손상, 추간판 헤르니아, 파열, 또는 이탈 무척추 디스크 증후군, 경부 척추증, 신경총 장애, 흉곽 출구 파괴 증후군, 납, 답손, 진드기로 인해 유발된 것과 같은 말초 신경병증, 포토피린증, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 알츠하이머병, 헌팅턴병, 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0034] 본 발명은 추가로, 본원의 항-PirB 항체에 특이적으로 결합하는 항-이디오타입 항체에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1a 및 1b는 마우스 PirB 서열 (서열 1) 및 인간 LILRB2 서열 (서열 2)을 나타낸다.
- 도 2a 및 2b. PirB를 차단하는 것은 AP-Nogo66 또는 미엘린 상에서의 CGN 성장 억제를 역전시킨다. 분리된 마우스 P7 CGN을 PDL/라미닌 (대조군), AP-Nogo66, 또는 미엘린 상에 플레이팅하여 이들 기질에 의한 억제를 테스트하였다. (A) 대표적인 현미경 사진, (B) 하나의 대표적인 실험으로부터의 평균 신경돌기 길이 ($\pm$ SE)를 측정 한 그래프. PDL/라미닌, AP-Nogo66, 또는 미엘린 상에서 성장된 뉴런을 PirB에 대한 기능-차단 항체 (aPB1; 50 μ g/ml)의 존재 또는 부재하에 배양하였다. aPB1은 기질에 의한 억제를 상당히 감소시켰다. (* p <0.01; 눈금 막대, 50 μ m).
- 도 3a 내지 3d. PirB를 차단하는 것은 AP-Nogo66 또는 미엘린 상에서의 CGN 성장 억제를 역전시킨다. 분리된 마우스 P7 CGN을 PDL/라미닌 (대조군), AP-Nogo66, 또는 미엘린 상에 플레이팅하여 이들 기질에 의한 억제를 테스트하였다. 대표적인 현미경 사진을 도 3a 및 3c에 나타내고, 하나의 대표적인 실험으로부터의 평균 신경돌기 길이 ($\pm$ SE)를 측정한 그래프를 도 3b 및 3d에 나타낸다. PDL/라미닌, AP-Nogo66, 또는 미엘린 상에서 성장된 뉴런을 PirB에 대한 기능-차단 항체 (aPB1; 50 μ g/ml)의 존재 또는 부재하에 배양하였다. aPB1은 기질에 의한

억제를 상당히 감소시켰다. (* $p < 0.01$; 눈금 막대, 50 μm).

도 4a 및 4b. PirB 및 NgR은 둘 모두 미엘린 억제제에 의한 성장 원추 붕괴를 매개하는데 요구된다. 출생 후 DRG 축삭의 성장 원추를 매질 단독 (대조군), 미엘린 (3 $\mu\text{g/ml}$), 또는 AP-Nogo66 (100 nM)로 30분 동안 처리하여 붕괴를 자극하고, 로다민-팔로이딘으로 염색하여 성장 원추를 시각화하였다. (A) 대표적인 현미경 사진, (B) 누적 실험으로부터 성장 원추 붕괴 비율 ($\pm\text{SEM}$)을 측정한 그래프. 유전적인 NgR의 손실 또는 항-PirB 처리에 의한 PirB의 억제는 단독으로 미엘린 또는 AP-Nogo66의 성장 원추 붕괴 활성을 방지하는데 충분하다. 또한, 두 경로 모두의 억제는 붕괴를 완전히 차단한다. (눈금 막대, 50 μm).

도 5a 내지 5d. PirB를 차단하는 것은 DRG 뉴런에서 및 기질 MAG 상에서의 신경돌기 성장을 부분적으로 탈억제시킨다. 대표적인 현미경 사진을 도 5a 및 5c에 나타내고; 하나의 대표적인 실험으로부터의 평균 신경돌기 길이 ($\pm\text{SE}$)를 나타내는 그래프를 도 5b 및 5d에 나타낸다. (A) 및 (B) 분리된 P10 DRG 뉴런을 항-PirB의 존재 또는 부재하에서 PDL/라미닌, AP-Nogo66, 또는 미엘린 상에 플레이팅하였다. aPB1에 의해, AP-Nogo66 및 미엘린에 의한 억제가 상당히 감소되었다. (C) 및 (D) 분리된 P7 CGN 배양물을 aPB1을 함유하거나 또는 함유하지 않는 PDL/라미닌 또는 MAG-Fc 상에 플레이팅하였다. PirB에 대한 항체는 MAG-Fc에 의한 신경돌기 성장 억제를 감소시켰다. (* $p < 0.01$; 눈금 막대, 200 μm A, B; 50 μm C).

도 6. 항-PirB 항체 YW259.2 중쇄의 DNA 서열 (서열 8).

도 7. 항-PirB 항체 YW259.9 중쇄의 DNA 서열 (서열 9).

도 8. 항-PirB 항체 YW259.12 중쇄의 DNA 서열 (서열 3).

도 9. 항-PirB 항체 YW259.2 중쇄의 단백질 서열 (서열 4).

도 10. 항-PirB 항체 YW259.9 중쇄의 단백질 서열 (서열 5).

도 11. 항-PirB 항체 YW259.12 중쇄의 단백질 서열 (서열 6).

도 12. 모든 YW259 항체의 경쇄의 단백질 서열 (서열 7).

도 13. 항-PirB 항체 YW259.2 (IgG)의 His-태그된 마우스 PirB의 활성을 억제하는 능력.

도 14. 항-PirB 항체 YW259.9 (IgG)의 His-태그된 마우스 PirB의 활성을 억제하는 능력.

도 15. 항-PirB 항체 YW259.12 (IgG)의 His-태그된 마우스 PirB의 활성을 억제하는 능력.

도 16. YW259.2, YW259.9, 및 YW259.12를 비롯한 항-PirB 항체 패널의 상대적인 AP-Nogo66 결합.

도 17a 내지 17c. 항-PirB 항체 YW259.2 (서열 11); YW259.9 (서열 12) 및 YW259.12 (서열 13)의 중쇄 서열의 정렬. CDR H1, CDR H2 및 CDR H3 서열은 카뎀, 코티아 및 접촉 CDR H 도메인에 따른 CDR H 도메인과 함께 박스로 표시한다. Hum III은 서열 10으로 개시한다.

도 18a 내지 18c. 항-PirB 항체 YW259.2 (서열 15); YW259.9 (서열 15) 및 YW259.12 (서열 15), 및 Hu κ I (서열 14)의 경쇄 서열의 정렬. CDR L1, CDR L2 및 CDR L3 서열은 카뎀, 코티아 및 접촉 CDR L 도메인에 따른 CDR L 도메인과 함께 박스로 표시한다. Hum III은 서열 10으로 개시한다.

도 19. C1QTNF5 (CTRP5; NP_05646)는 후근 신경절 뉴런의 신경돌기 성장을 억제하고, 이러한 억제는 PirB이 PirB 기능-차단 항체 YW259.2에 의해 차단될 때 감소된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

용어 "쌍을 이룬 면역글로불린-유사 수용체 B" 및 "PirB"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 서열 1 (도 1) (NP_035225)의 천연-서열, 841-아미노산 마우스 억제 단백질, 및 래트 및 기타 비-인간 포유동물에서의 이의 천연-서열 상동체를 지칭하며, 여기에는 모든 자연 발생 변이체, 예컨대 별법적으로 스플라이싱된 변이체 및 대립유전자 변이체 및 이소형, 뿐만 아니라 이의 가용성 형태가 포함된다. 보다 상세한 사항은, 문헌 [Kubagawa et al., Proc Natl Acad Sci USA 94, 5261 (1997)]을 참조한다.

용어 "LILRB", "ILT" 및 "MIR"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 인간 "백혈구 면역글로불린-유사 수용체, 서브패밀리 B"의 모든 구성원을 지칭하며, 여기에는 모든 자연 발생 변이체, 예컨대 별법적으로 스플라

이성된 변이체 및 대립유전자 변이체 및 이소형, 뿐만 아니라 이의 가용성 형태가 포함된다. 이러한 LILR 수용체의 B-유형 서브패밀리 내의 개별적인 구성원은 두문자어에 이어지는 숫자, 예를 들어 LILRB3/ILT5, LILRB1/ILT2, LILRB5/ILT3, 및 LILRB2/ILT4로 명시되고, 이때 임의의 개별적인 구성원에 대한 언급은 달리 지시되지 않는 한 모든 자연 발생 변이체, 예컨대 별법적으로 스플라이싱된 변이체 및 대립유전자 변이체 및 이소형, 뿐만 아니라 이의 가용성 형태를 또한 포함한다. 따라서, 예를 들어 "LILRB2", "LIR2", 및 "MIR10"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 서열 2 (도 1) (NP_005865)의 598-아미노산 폴리펩티드, 및 이의 자연 발생 변이체, 예컨대 별법적으로 스플라이싱된 변이체 및 대립유전자 변이체 및 이소형, 뿐만 아니라 이의 가용성 형태를 지칭한다. 보다 상세한 사항은, 문헌 [Martin et al., Trends Immunol. 23, 81 (2002)]을 참조한다.

[0039] 용어 "PirB/LILRB"는 본원에서 상응하는 마우스 및 인간 단백질 및 기타 비-인간 포유동물에서의 천연 서열 상동체를 합동으로 지칭하는데 사용되고, 여기에는 모든 자연 발생 변이체, 예컨대 별법적으로 스플라이싱된 변이체 및 대립유전자 변이체 및 이소형, 뿐만 아니라 이의 가용성 형태가 포함된다.

[0040] 용어 "미엘린-관련 단백질"은 가장 넓은 의미로 사용되고, Nogo, MAG 및 OMgp를 포함하여 뉴런 재생을 억제하는, CNS 미엘린에 존재하는 모든 단백질을 포함한다.

[0041] "단리된"은, 본원에 개시된 다양한 단백질을 기재하는데 사용된 경우, 이의 자연 환경의 성분으로부터 확인되어 분리 및/또는 회수된 단백질을 의미한다. 이의 자연 환경의 오염물 성분은 단백질에 대한 진단 또는 치료 용도를 전형적으로 방해할 물질이고, 여기에는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 물질이 포함될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 단백질은 (1) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하는 것에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기 15개 이상을 획득하는데 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 염색을 사용하는 환원 또는 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성으로, 또는 (3) 질량분광법 기술 또는 펩티드 맵핑 기술에 의한 균질성으로 정제될 것이다. 단리된 단백질에는 재조합 세포 내의 계내 단백질이 포함되는데, 이는 문제의 단백질의 자연 환경의 1가지 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 단백질은 1회 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0042] "단리된" 핵산 분자는 문제의 핵산의 자연 공급원 내에서 통상적으로 회합되는 1개 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 환경 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 자연 세포 내에 존재하는 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는, 예를 들어 핵산 분자가 자연 세포의 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 있는 경우, 이같은 핵산을 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0043] 본원에서 사용된 용어 "PirB/LILRB 길항제"는 PirB/LILRB 활성을 차단하거나, 중화하거나, 억제하거나, 폐기하거나, 감소시키거나 방해할 수 있는 작용제를 지칭하는데 사용된다. 특히, PirB/LILRB 길항제는 미엘린 관련 억제 활성을 방해함으로써, 신경돌기 성장을 개선시키고/거나 뉴런 성장, 복구 및/또는 재생을 촉진한다. 바람직한 실시양태에서, PirB/LILRB 길항제는 PirB/LILRB에 결합함으로써 Nogo66 및/또는 MAG 및/또는 OMgp에 대한 PirB/LILRB의 결합을 억제한다. PirB/LILRB 길항제에는, 예를 들어 PirB/LILRB에 대한 항체 및 이의 항원 결합 단편, PirB/LILRB와 Nogo 66 사이, 또는 PirB/LILRB와 MAG 사이, 또는 PirB/LILRB와 OMgp 사이의 결합을 격리시킬 수 있는 PirB/LILRB, Nogo 66, MAG 또는 OMgp의 말단절단형 또는 가용형 단편 및 PirB/LILRB 관련 억제 경로의 소분자 억제제가 포함된다. PirB/LILRB 길항제에는 또한 PirB/LILRB mRNA의 발현을 억제하거나 감소시킬 수 있는 짧은 간섭 RNA (siRNA) 분자가 포함된다. 바람직한 PirB/LILRB 길항제는 항-PirB/LILRB 항체이다.

[0044] 본원에서의 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 목적으로 하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 무손상 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체), 및 항체 단편가 포함된다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉, 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대한 것으로 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정인자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대한 것이다. 이의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득되는 것으로서 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정한 방법으로 항체를 제조할 필요가 있는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 번호 제

4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수 있다. “모노클로날 항체”는 또한, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0046] 항체에는 구체적으로, 목적으로 하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종으로부터 유래된 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 반면, 사슬(들)의 나머지는 또다른 종으로부터 유래된 항체 또는 또다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 및 상기 항체의 단편이 포함된다 (미국 특허 번호 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]). 본원의 관심 키메라 항체에는 비-인간 영장류 (예를 들어 구세계 원숭이(Old World Monkey), 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 영장류화(primatized) 항체가 포함된다.

[0047] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부분을 포함하고, 바람직하게는 이의 항원-결합 영역 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편(들)로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0048] "무손상" 항체는 항원-결합 가변 영역, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (C_L) 및 중쇄 불변 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0049] 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역 유래의 잔기가 목적으로 하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간종 (공여 항체), 예를 들어 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역 유래의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수여 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 정련시키기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인 (Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv)을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 초가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 사항은, 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 서열 면에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 24-34, 50-56 및 89-97 및 중쇄 가변 도메인 내의 31-35, 50-65 및 95-102; 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 그러한 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인 내의 잔기 26-32, 50-52 및 91-96 및 중쇄 가변 도메인 내의 26-32, 53-55 및 96-101; 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다. 양쪽 모두의 경우에, 가변 도메인 잔기는 아래에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같이 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의된 바와 같은 초가변 영역 내의 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0051] "어버이 항체" 또는 "야생형" 항체는 본원에 개시된 항체 변이체와 비교하여 하나 이상의 아미노산 서열 변경이 없는 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 따라서, 일반적으로 어버이 항체는 본원에 개시된 바와 같은 항체 변이체의 상응하는 초가변 영역의 아미노산 서열과 아미노산 서열 면에서 상이한 하나 이상의 초가변 영역을 갖는다. 어버이 폴리펩티드는 천연 서열 (즉, 자연 발생) 항체 (자연 발생 대립유전자 변이체 포함), 또는 자연 발생 서열의 선제성 아미노산 서열 변형 (예컨대 삽입, 결실 및/또는 기타 변경)이 있는 항체를 포함할 수 있다. 명세서 전반에 걸쳐, "야생형", "WT", "wt", 및 "어버이" 또는 "어버이의" 항체는 상호교환가능하게 사용된다.

[0052] 본원에서 사용된 "항체 변이체" 또는 "변이체 항체"는 아미노산 서열이 어버이 항체의 아미노산 서열과 상이한 항체를 지칭한다. 바람직하게는, 항체 변이체는 자연에서 발견되지 않는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메

인 또는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 그러한 변이체는 어버이 항체와의 서열 동일성 또는 유사성이 반드시 100% 미만이다. 바람직한 실시양태에서, 항체 변이체의 아미노산 서열은 어버이 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 중 하나의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성이 약 75% 내지 100% 미만이고, 보다 바람직하게는 약 80% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 85% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 90% 내지 100% 미만, 및 가장 바람직하게는 약 95% 내지 100% 미만이다. 일반적으로 항체 변이체는 이의 하나 이상의 추가변 영역 내에 또는 이에 인접하여 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하는 것이다.

[0053] "아미노산 변경"은 미리 정해진 아미노산 서열의 아미노산 서열에서의 변화를 지칭한다. 예시적인 변경에는 삽입, 치환 및 결실이 포함된다. "아미노산 치환"은 미리 정해진 아미노산 서열 내의 기존의 아미노산 잔기를 다른 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다.

[0054] "대체" 아미노산 잔기는 아미노산 서열 내의 다른 아미노산 잔기를 대체하거나 치환하는 아미노산 잔기를 지칭한다. 대체 잔기는 자연 발생 아미노산 잔기 또는 비-자연 발생 아미노산 잔기일 수 있다.

[0055] "아미노산 삽입"은 미리 정해진 아미노산 서열 내로 하나 이상의 아미노산 잔기를 도입하는 것을 지칭한다. 아미노산 삽입은 펩티드 결합(들)에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드가 미리 정해진 아미노산 서열 내로 도입되는 경우인 "펩티드 삽입"을 포함할 수 있다. 아미노산 삽입이 펩티드의 삽입을 수반하는 경우, 삽입된 펩티드는 자연에서 존재하지 않는 아미노산 서열을 갖도록 무작위 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있다. "추가변 영역에 인접한" 아미노산 변경은 삽입 또는 대체 아미노산 잔기(들) 중 하나 이상이 문제의 추가변 영역의 N-말단 또는 C-말단 아미노산 잔기와 펩티드 결합을 형성하도록 하나 이상의 아미노산 잔기가 추가변 영역의 N-말단 및/또는 C-말단 끝부분에 도입 또는 치환되는 것을 지칭한다.

[0056] "자연 발생 아미노산 잔기"는 알라닌 (Ala); 아르기닌 (Arg); 아스파라긴 (Asn); 아스파르트산 (Asp); 시스테인 (Cys); 글루타민 (Gln); 글루탐산 (Glu); 글리신 (Gly); 히스티딘 (His); 이소류신 (Ile); 류신 (Leu); 리신 (Lys); 메티오닌 (Met); 페닐알라닌 (Phe); 프롤린 (Pro); 세린 (Ser); 트레오닌 (Thr); 트립토판 (Trp); 티로신 (Tyr); 및 발린 (Val)으로 이루어진 군으로부터 일반적으로 선택되는, 유전자 코드에 의해 코딩된 것이다.

[0057] 본원에서의 "비-자연 발생 아미노산 잔기"는 폴리펩티드 사슬 내의 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유 결합할 수 있는, 상기 열거된 자연 발생 아미노산 잔기 이외의 아미노산 잔기이다. 비-자연 발생 아미노산 잔기의 예로는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린, 및 기타 아미노산 잔기 유사체, 예컨대 문헌 [Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)]에 기재된 것들이 포함된다. 이같은 비-자연 발생 아미노산 잔기를 생성하기 위해, 문헌 [Noren et al., Science 244:182 (1989)] 및 [Ellman et al., 상기 문헌]의 절차를 사용할 수 있다. 간략하게, 이러한 절차들은 비-자연 발생 아미노산 잔기로 역제인자 tRNA를 화학적으로 활성화시킨 다음, RNA의 시험관내 전사 및 번역을 포함한다.

[0058] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 문헌 [Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))]으로부터의 넘버링 시스템을 참조한다. 이러한 개론에서, 카밧(Kabat)은 각각의 서브클래스의 항체들에 대한 다수의 아미노산 서열을 열거하고, 이러한 서브클래스 내의 각각의 잔기 위치에 대해 가장 통상적으로 발생하는 아미노산을 열거한다. 카밧은 열거된 서열 내의 각각의 아미노산에 잔기 번호를 할당하는 방법을 사용하고, 잔기 번호를 할당하는 이러한 방법이 당업계에서 표준이 되었다. 본 명세서에서는 카밧 넘버링 체계를 따른다. 본 발명의 목적을 위해, 카밧 개론에 포함되지 않은 후보 항체 아미노산 서열에 잔기 번호를 할당하기 위해, 하기의 단계들을 따른다. 일반적으로, 후보 서열을 카밧 내의 임의의 면역글로불린 서열 또는 임의의 컨센서스(consensus) 서열과 정렬한다. 수동으로, 또는 통상적으로 허용되는 컴퓨터 프로그램을 사용하여 컴퓨터에 의해 정렬할 수 있고; 이같은 프로그램의 예는 얼라인(Align) 2 프로그램이다. 대부분의 Fab 서열에 공통적인 일부 아미노산 잔기를 사용하여 정렬을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어 경쇄 및 중쇄는 각각 전형적으로 잔기 번호가 동일한 2개의 시스테인을 갖는데; V_L 도메인에서는 2개의 시스테인이 전형적으로 잔기 번호 23 및 88에 있고, V_H 도메인에서는 2개의 시스테인 잔기가 전형적으로 22 및 92로 넘버링된다. 항상 그런 것은 아니지만, 프레임워크 잔기는 일반적으로 대략 동일한 개수의 잔기를 갖지만, CDR은 크기가 다양할 것이다. 예를 들어 정렬된 카밧 내의 서열의 CDR보다 후보 서열로부터의 CDR이 더 긴 경우, 전형적으로 첨자가 잔기 번호에 부가되어, 추가적인 잔기의 삽입을 나타낸다 (예를 들어 도 1b 내의 잔기 100abc 참조). 예를 들어 잔기 34 및 36에 대해서는 카밧 서열과 정렬되지만, 이들 사이에 잔기 35와 정렬되는 잔기가 없는 후보 서열에 대해서는, 간단하게 번호 35가 잔기에 할당되지 않는다.

[0059] 본원에서 사용된, "고-친화도"를 가진 항체는 K_D 또는 해리 상수가 나노몰 (nM) 범위 이상인 항체이다. "나노

몰 범위 이상"인 K_D 는 X nM으로 표시될 수 있고, 이때 X 는 약 10 미만의 숫자이다.

- [0060] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 보유하지 않는 어버이 항체와 비교해서 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된, 그의 하나 이상의 CDR 내에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에서 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 V_H 및 V_L 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화도 성숙을 기재한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌 [Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, 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)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.
- [0061] 항체의 "기능적 항원 결합 부위"는 표적 항원과 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화도는 항원 결합 부위가 유도되는 어버이 항체만큼 반드시 강력하지 않아도 되지만, 항원과 결합할 수 있는 능력은 항원과 결합하는 항체를 평가하는 것으로 공지된 다양한 방법 중의 어느 하나를 사용하여 측정 가능해야만 한다.
- [0062] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 지닌 항체는 그것을 동일한 항원과 결합하는 다른 항체와 구별시켜 주는 항체의 한 가지 이상의 생물학적 특징을 보유하고 있는 것이다.
- [0063] 관심 항체가 결합한 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체들을 스크리닝하기 위해, 일상적인 교차-차단 검정, 예컨대 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재되어 있는 것을 수행할 수 있다.
- [0064] 용어 "필라멘트형 파지"는 이중 폴리펩티드를 그의 표면 상에 디스플레이할 수 있는 바이러스 입자를 지칭하고, 여기에는 비제한적으로 f1, fd, Pf1, 및 M13이 포함된다. 필라멘트형 파지는 선별가능한 마커, 예컨대 테트라 시클린 (예를 들어 "fd-tet")을 함유할 수 있다. 다양한 필라멘트형 파지 디스플레이 시스템이 당업자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Zacher et al., Gene 9: 127-140 (1980)], [Smith et al., Science 228: 1315-1317 (1985)]; 및 [Parmley and Smith Gene 73: 305-318 (1988)] 참조).
- [0065] 용어 "패닝(panning)"은 표적에 대해 높은 친화도 및 특이성을 갖는 화합물, 예컨대 항체를 운반하는 파지를 확인 및 단리하는데 있어서 여러 회의 스크리닝 프로세스를 지칭하는데 사용된다.
- [0066] 용어 "짧은-간섭 RNA (siRNA)"는 유전자 발현을 간섭하는 소형 이중-가닥 RNA를 지칭한다. siRNA는 이중 가닥 RNA가 상동성 유전자를 침묵시키는 프로세스인 RNA 간섭의 매개물질이다. siRNA는 전형적으로 듀플렉스(duplex)를 형성하는, 뉴클레오타이드 약 15-25개 길이의 2개의 단일-가닥 RNA로 구성되고, 이는 단일-가닥 오버행(들)을 포함할 수 있다. 이중-가닥 RNA가 효소 복합체, 예를 들어 중합효소에 의해 프로세싱되면, 이중-가닥 RNA가 절단되어 siRNA가 생성된다. siRNA의 안티센스 가닥은 RNA 간섭 (RNAi) 침묵 복합체에 의해 사용되어 mRNA 절단을 이끄므로써, mRNA 분해를 촉진한다. 예를 들어 포유동물 세포에서 siRNA를 사용하여 특정 유전자를 침묵시키기 위해, 관련없는 mRNA에 대한 우연한 상보성을 없애도록 염기 쌍형성 영역을 선택한다. RNAi 침묵 복합체는 당업계에서, 예를 들어 문헌 [Fire et al., Nature 391:806-811 (1998)] 및 [McManus et al., Nat. Rev. Genet. 3(10):737-47 (2002)]에 의해 확인되었다.
- [0067] 용어 "간섭 RNA (RNAi)"는 본원에서, 특정 mRNA의 촉매적 분해를 초래하고, 따라서 특정 유전자의 발현 억제/저하를 위해 사용될 수 있는 이중-가닥 RNA를 지칭하는데 사용된다.
- [0068] 용어 "다형성"은 본원에서 유전자 또는 이의 일부분 (예를 들어 대립유전자 변이체)의 하나를 초과하는 형태를 지칭하는데 사용된다. 2가지 이상의 상이한 형태가 존재하는 유전자의 일부분은 유전자의 "다형성 영역"으로 지칭된다. 유전자의 다형성 영역에서의 특정 유전자 서열이 "대립유전자"이다. 다형성 영역은 상이한 대립유전자들에서 상이한 단일 뉴클레오타이드일 수 있거나, 또는 여러 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.
- [0069] 본원에서 사용된 용어 "장애"는 일반적으로 PirB/LILRB2의 길항제, 예컨대 항-PirB 항체에 의한 치료로 인해 이익을 얻을 임의의 상태를 지칭하며, 이에는 축삭 재생 요법으로 이익을 얻고/거나 시냅스 가소성의 향상이 기대되는 신경계에서의 임의의 상태가 포함된다. 본원에서 치료될 장애의 비-제한적인 예에는 신경계 장애, 예컨대 물리적으로 손상된 신경 및 신경변성 질환을 비롯해서, 신경돌기 생장의 개선, 뉴런 성장, 복구 또는 재생의 촉진으로 이익을 얻을 질환 및 상태가 비제한적으로 포함된다. 그러한 장애에는 구체적으로 중추 신경계의 물리적 손상 (예를 들어 척수 손상 및 머리 외상); 뇌졸중과 관련된 뇌 손상; 및 신경변성과 관련된 신경계 장애, 예를 들어 삼차 신경통, 설인 신경통, 벨 마비, 중증 근무력증, 근이영양증, 근위축성 축삭 경화증 (ALS), 진행

성 근위축증, 진행성 연수 유전성 근위축증, 다발성 경화증 (MS), 추간관 헤르니아, 파열, 또는 이탈 무척추 디스크 증후군, 경부 척추증, 신경총 장애, 흉곽 출구 파괴 증후군, 물리적 손상 또는 질환 상태, 예컨대 당뇨병에 의해 유발된 말초 신경 손상, 납, 답손, 진드기로 인해 유발된 것과 같은 말초 신경병증, 포르피린증, 길랑-바레 증후군, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 또는 파킨슨병이 포함된다.

[0070] 본원에서 사용된 용어 "치료하는", "치료" 및 "치료법"은 치유 치료법, 예방 치료법, 및 방지 치료법을 지칭한다. 연속 치료 또는 투여는 1일 이상 치료가 중단되지 않으면서 적어도 매일 치료하는 것을 지칭한다. 간헐 치료 또는 투여, 또는 간헐 방식의 치료 또는 투여는 연속적이지 않지만, 사실상 주기적인 치료를 지칭한다.

[0071] 본원에서 사용된 용어 "신경변성 방지"는 (1) 신경변성 질환에 걸린 것으로 새롭게 진단되었거나 새로운 신경변성 질환이 발달될 위험이 있는 환자에서 신경변성을 억제 또는 방지하는 능력 및 (2) 신경변성 질환을 이미 앓고 있거나 신경변성 질환의 증상이 있는 환자에서 추가적인 신경변성을 억제 또는 방지하는 능력을 포함한다.

[0072] 본원에서 사용된 용어 "포유동물"은 인간, 비-인간 고등 영장류, 설치류, 가축 및 농장 동물, 예컨대 소, 말, 개 및 고양이를 비롯해서, 포유동물로 분류된 임의의 포유동물을 지칭한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0073] 1종 이상의 추가 치료제와의 "조합" 투여는 동시 (동시발생) 및 임의의 순서로의 순차적 투여를 포함한다.

[0074] "유효량"은 유의한 결과 또는 목적으로 하는 치료 (방지 포함) 결과를 야기하는데 충분한 양이다. 유효량은 1 회 이상의 투여로 투여될 수 있다.

[0075] 본원에서 사용된 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환가능하게 사용되며, 그러한 모든 명칭은 자손을 포함한다. 따라서, 단어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 전달 회수와 무관하게, 그로부터 유래된 1차 대상 세포 및 배양물을 포함한다. 또한, 모든 자손은 의도적이거나 의도하지 않은 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확히 일치하지 않을 수 있음을 이해한다. 용어 "자손"은 원래의 형질전환된 세포 또는 세포주에 대한 모든 후속 세대의 임의의 그리고 모든 후손을 지칭한다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 포함된다. 별개의 명칭이 의도되는 경우, 이는 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0076] 본원에서 확인된 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 참조 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하기 위한 정렬은 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성에 필요한 알고리즘의 배정을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있는 다양한 방식으로 당업계의 기술 범위 내에서 달성할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값은 제네테크, 인크. (Genentech, Inc.) 소유로서, 그 소스 코드가 미국 저작권국 (U.S. Copyright Office, 미국 워싱턴 디씨, 2055 9)에 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 번호 제TXU510087호 하에 등록된 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가 가능하다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며, 다양하지 않다.

[0077] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용융 온도 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 의존한다. 프로브와 혼성화가능한 서열 사이에 요구되는 동일성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성에 대한 추가의 상세한 사항 및 설명에 대해서는 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.

[0078] 본원에서 정의되는 "고엄격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도를 사용하는 것; 50°C 에서 0.015 M 염화 나트륨/0.0015 M 시트르산 나트륨/0.1% 나트륨 도데실 황산염; (2) 혼성화 동안 변성제를 사용하는 것; 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산 나트륨 완충액 (pH 6.5) + 750 mM 염화 나트륨, 75 mM 시트르산 나트륨 (42°C); 또는 (3) 42°C에서 0.2 x SSC (염화 나트륨/시트르산 나트륨) 및 55°C에서 50% 포름아미드를 사용한 세척에 이어 55°C에서 EDTA 함유

0.1 x SSC로 이루어지는 고염격성 세척과 함께, 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산 나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산 나트륨, 5 x 덴하르트 (Denhardt) 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트 (42℃)를 사용하는 것에 의해 확인된다.

[0079] "중등 염격성 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있고, 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산 삼나트륨), 50 mM 인산 나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트, 및 20 mg/ml 변성 전단 처리 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37℃에서 밤새 인큐베이션한 다음, 약 37-50℃의 1 x SSC 중에서 필터를 세척하는 것을 포함한다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하는데 요구되는 온도, 이온 강도 등을 조정하는 방법을 알 것이다.

[0080] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 조절 서열에는, 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위가 포함된다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0081] 핵산은, 이것이 또다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어 프리서열(presequence) 또는 분비 리더(secretory leader)를 위한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구단백질로서 발현되는 경우에, 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동가능하게 연결된 것이고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우에, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이고; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치한 경우에, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"이란, 연결된 DNA 서열들이 연속적이고, 분비 리더의 경우에는 연속적이면서 관독 단계에 있음을 의미한다. 그러나, 인핸서는 반드시 연속적일 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상적인 실무에 따라 사용된다.

[0082] "소형 분자"는 본원에서, 분자량이 약 1000 달톤 미만, 바람직하게는 약 500 달톤 미만인 것으로 정의된다.

[0083] B. 항-PirB/LILRB 항체의 생산

[0084] 본 발명의 항-PirB 항체는 재조합 DNA 기술의 기술을 비롯해서, 당업계에 공지된 방법으로 생산할 수 있다.

[0085] i) 항원 제조

[0086] 가용성 항원 또는 이의 단편 (임의적으로 다른 분자에 접합된 것)이 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막형단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 이의 단편 (예를 들어 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 별법적으로, 막형단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이같은 세포는 자연 공급원 (예를 들어 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막형단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 기타 항원 및 이의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0087] (ii) 폴리클로날 항체

[0088] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 어쥬번트 (adjuvant)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성시킬 수 있다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl₂, 또는 R₁N=C=NR (식중, R 및 R₁은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0089] 동물은, 예를 들어 100 µg 또는 5 µg의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대한 것)를 3 부피의 프로인트 (Freund) 완전 어쥬번트와 합하고, 용액을 다중 부위에 피내 주사하는 것에 의해 항원, 면역원성 접합체, 또는 유도체에 대해 면역화된다. 1개월 후, 프로인트 완전 어쥬번트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스터시킨다. 7일 내지 14일 후에, 동물에서 채혈하여 혈청의 항체 역가를 검정한다. 동물은 역가 안정기까지 부스터한다. 바람직하게는, 동물을 동일한 항원의 접합체로 부스터하지만, 이것은 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교결합 시약을 통해 접합된 것이다. 접합체는 또한 단백질 용합체로서 재조합 세포 배양으로 제조될 수도 있다. 또한, 면역 반응을 개선시키기 위해 응집제, 예를 들어 명반을 적절하게 사용한다.

[0090] (iii) 모노클로날 항체

- [0091] 모노클로날 항체를 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 제4,816,567호)에 의해 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 짧은꼬리 원숭이를 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 별법적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 이어서, 림프구는 하이브리도마 세포를 형성하기 위해 적합한 융합제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합된다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).
- [0092] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 어버이 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어 어버이 골수종 세포에 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우, 하이브리도마의 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.
- [0093] 바람직한 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고-수준 생성을 지지하고, 배지, 예를 들어 HAT 배지에 민감한 세포이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 무린 골수종 세포주, 예컨대 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 어메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection; 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주도 인간 모노클로날 항체 생성을 위해 설명된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984)]; 및 [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987)]).
- [0094] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 항원에 대해 작용하는 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정된다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들어 방사 면역검정 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.
- [0095] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인된 후에, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고 표준 방법 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)])으로 성장시킬 수 있다. 상기 목적에 적합한 배양 배지에는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다.
- [0096] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리한다.
- [0097] 통상적인 절차 (예를 들어 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용하는 것)를 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA를 쉽게 분리하고 서열분석한다. 하이브리도마 세포는 상기 DNA의 바람직한 공급원 역할을 한다. 일단 분리되면, DNA를 발현 벡터 내에 놓을 수 있고, 그 후 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(E. coli) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성시켰다. 항체의 재조합 생산은 아래에서 더욱 상세하게 기재될 것이다.
- [0098] 추가의 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리할 수 있다.
- [0099] 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에서는 파지 라이브러리를 사용한, 각각 무린 및 인간 항체의 단리를 기재한다. 후속 문헌은 사슬 서플링에 의한 고친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생성 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]), 및 매우 큰 파지 라이브러리를 제조하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)])을 기재한다. 즉, 이들 기술은 모노클로날 항체 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술의 실행가능한 대안이다.
- [0100] DNA는 또한, 예를 들어 상동성 무린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 번호 제4,816,567호; 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 면역

글로불린 코딩 서열을 비-면역글로불린 폴리펩티드의 코딩 서열의 전부 또는 일부와 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다.

[0101] 전형적으로, 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인과 치환되거나 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인과 치환되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.

[0102] (iv) 인간화 및 인간 항체

[0103] 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 내에 도입되어 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 "도입" 잔기로서 종종 지칭되고, 이는 전형적으로 "도입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 윈터 (Winter) 및 공동연구자의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는, 실질적으로 보다 적은 무손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0104] 인간화 항체 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 선택은 항원성 감소를 위해 매우 중요하다. 소위 "최적-맞춤(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 받아들여진다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 특정 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).

[0105] 항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 더욱 중요하다. 이를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 어버이 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 어버이 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수가능하고, 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형상적 구조를 보여주고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이를 조사하면 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 끼치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 목적하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적이고, 가장 실질적으로 수반된다.

[0106] 별법적으로, 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어 키메라 및 생식-라인 돌연변이 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동형 접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 기재되어 있다. 이러한 생식-라인 돌연변이 마우스 내로 인간 생식-라인 면역글로불린 유전자 어레이를 전달하면, 항원 시험 접종시에 인간 항체가 생성될 것이다. 예를 들어 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)]; 및 [Duchosal et al., Nature 355:258 (1992)]을 참조한다. 또한, 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유도될 수 있다 (문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]; [Vaughan et al., Nature Biotech 14:309 (1996)]). 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 인간 항체의 생성이 하기에 추가로 기재된다.

[0107] (v) 항체 단편

[0108] 항체 단편을 생성하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질 분해에 의한 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어 항체 단편은 상기 논의한 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 별법적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어

F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 하기 실시예에 기재되는 다른 실시양태에서, F(ab')₂는 F(ab')₂ 분자의 조립을 촉진하기 위해 류신 지퍼 GCN4를 사용하여 형성된다. 다른 방법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 분리할 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다. WO 93/16185를 참조한다.

[0109] (vi) 다중특이적 항체

[0110] 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖고, 이때 에피토프들은 일반적으로 상이한 항원들로부터의 것이다. 이같은 분자들은 일반적으로는 2개의 상이한 에피토프에만 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가적인 특이성이 있는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에서 사용되는 경우 이러한 표현에 포함된다. BsAb의 예에는 PirB/LILRB2에 대해 작용하는 하나의 암(arm)과 Nogo 또는 MAG 또는 OMgp에 대해 작용하는 다른 암을 갖는 것이 포함된다. BsAB의 추가의 예에는 PirB/LILRB2에 대해 작용하는 하나의 암과 NgR에 대해 작용하는 다른 암을 갖는 것이 포함된다.

[0111] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 사슬은 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 무작위적으로 모으기 때문에, 이들 하이드로마 (쿠아드로마 (quadroma))는 그 중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생산 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다. 상이한 방법에 따라, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)를 갖는 항체 가변 도메인을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체 및 필요한 경우 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이는 제작에 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 불균등한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 균등 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현 수율이 높은 경우 또는 상기 비가 특정 의의를 갖지 않는 경우, 단일 발현 벡터 내에 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0112] 상기 방법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 암에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성체 면역글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 암에 혼성체 면역글로불린 중쇄-경쇄쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것은 손쉬운 분리 방법을 제공하므로, 상기 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터 목적하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 상기 방법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 보다 상세한 사항은, 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0113] WO96/27011에 기재된 또다른 방법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터 하나 이상의 소형 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 대형 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동 (cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치 않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체 (homodimer)에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0114] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어 이중접합체 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이같은 항체들은, 예를 들어 원치 않는 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 번호 제4,676,980호), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373)를 위해서 제안되었다. 이중접합체 항체는 임의의 통상적인 가교 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 다수의 가교 기술과 함께, 적합한 가교제가 당업계에 널리 알려져 있고, 미국 특허 번호 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0115] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어 이중특이적 항체는 화학적 연결기를 이용하여 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)]에는

무손상 항체가 단백질 분해 방식으로 절단되어 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab' -TNB 유도체 중 하나는 머캅토테일아민에 의한 환원에 의해 Fab' -티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab' -TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용체로서 사용할 수 있다.

[0116] Fab' -SH 단편을 이. 콜라이로부터 또한 직접 회수할 수 있고, 화학적으로 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성시킬 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)]에는 완전 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산이 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 따로 분비되었고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관 내에서 유도 화학 커플링 반응시켰다.

[0117] 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양물로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되어 있다. 예를 들어 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 힌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 후, 재산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용할 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 별법적인 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 형성하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보적 VL 및 VH 도메인과 쌍을 형성하게 되고, 이에 의해 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이중특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0118] 2가를 초과하는 항체가 고려된다. 예를 들어 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tuft et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0119] (vii) 이펙터 기능 조작

[0120] 항체의 유효성을 개선하기 위해, 이펙터 기능과 관련하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입함으로써, 이러한 영역 내에 사슬간 디설피드 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 내재화 능력이 개선되고/되거나 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존적 세포형 세포독성 (ADCC)이 증가될 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이중이관능성 가교제를 사용하여 항-종양 활성이 개선된 동종이량체 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 항체의 보체 용해 및 ADCC 능력이 개선될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0121] (viii) 항체-셀비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 융합체

[0122] 본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어 종양 투과를 증가시키기 위해, 무손상 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 그의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는, 예를 들어 셀비지 수용체 결합 에피토프를 항체 단편 내로 혼입시킴으로써 달성될 수 있다 (예를 들어 항체 단편 내의 적합한 영역의 돌연변이에 의해, 또는 에피토프를 펩티드 태그 내로 혼입시킨 후, 항체 단편의 어느 한쪽 말단 또는 중간에 융합시킴 (예를 들어 DNA 또는 펩티드 합성에 의해)으로써).

[0123] 바람직하게는, 셀비지 수용체 결합 에피토프는 Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 옮겨진 영역을 구성한다. 더욱 더 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 옮겨진다. 더더욱 바람직하게는, 에피토프가 Fc 영역 (예를 들어 IgG의 Fc 영역)의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체의 CH1, CH3, 또는 V_H 영역, 또는 하나를 초과하는 이같은 영역으로 옮겨진다. 별법적으로, 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체 단편의 CL 영역 또는 VL 영역 또는 둘 모두로 옮겨진다.

[0124] (ix) 항체의 기타 공유결합 변형

- [0125] 항체의 공유결합 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이는 화학적 합성에 의해 또는 적용가능하다면 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 항체의 또다른 유형의 공유결합 변형을 분자 내로 도입한다. 공유결합 변형의 예가 미국 특허 번호 제5,534,615호 (본원에 참고로 명확하게 포함됨)에 기재되어 있다. 항체의 바람직한 유형의 공유결합 변형은 미국 특허 번호 제4,640,835호; 동 제4,496,689호; 동 제4,301,144호; 동 제4,670,417호; 동 제4,791,192호 또는 동 제4,179,337호에 기재된 방식으로 항체를 다양한 비-단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 연결시키는 것을 포함한다.
- [0126] (x) 합성 항체 파지 라이브러리로부터 항체의 생성
- [0127] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 독특한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 신규 항체를 생성시키고 선별하는 방법을 제공한다. 이 방법은 단일 프레임워크 주형을 기초로 하는 합성 항체 파지 라이브러리의 생성, 가변 도메인 내에 충분한 다양성의 디자인, 다양화된 가변 도메인이 있는 폴리펩티드의 디스플레이, 항원을 표적화하는 높은 친화도를 가진 후보 항체의 선별, 및 선별된 항체의 단리를 수반한다.
- [0128] 파지 디스플레이 방법의 상세한 사항은, 예를 들어 W003/102157 (2003년 12월 11일 공개)에서 확인할 수 있고, 상기 문헌의 전체 개시내용은 본원에 참고로 명확하게 포함된다.
- [0129] 한 측면에서, 본 발명에서 사용된 항체 라이브러리는 항체 가변 도메인의 하나 이상의 CDR 내의 용매가 접근가능하고/하거나 고도로 다양한 위치를 돌연변이시킴으로써 생성될 수 있다. 본원에서 제공된 방법을 사용하여 일부 또는 모든 CDR을 돌연변이시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 다양한 항체 라이브러리를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0130] 예를 들어 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 용매가 접근가능하고/하거나 고도로 다양한 위치에 돌연변이가 있는 항체 가변 도메인의 라이브러리가 생성될 수 있다. CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 내에 돌연변이가 있는 또다른 라이브러리가 생성될 수 있다. 또한 이러한 라이브러리들은 목적하는 친화도의 결합체를 생성시키기 위해 서로 함께 사용될 수 있다. 예를 들어 표적 항원에의 결합에 대한 중쇄 라이브러리의 1회 이상의 라운드의 선별 후에, 결합체의 친화도를 증가시키기 위한 추가적인 라운드의 선별을 위해 경쇄 라이브러리가 중쇄 결합체의 집단 내로 대체될 수 있다.
- [0131] 바람직하게는, 중쇄 서열의 가변 영역의 CDRH3 영역에서 원래의 아미노산을 변이체 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 생성된 라이브러리는 서열 다양성이 주로 중쇄 서열의 CDRH3 영역 내에 있는 다수의 항체 서열을 함유할 수 있다.
- [0132] 한 측면에서, 인간화 항체 4D5 서열, 또는 인간화 항체 4D5 서열의 프레임워크 아미노산의 서열의 정황에서 라이브러리가 생성된다. 바람직하게는, 중쇄의 적어도 잔기 95-100a를 DVK 코돈 세트에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성되고, 이때 DVK 코돈 세트는 이러한 위치의 모든 개체에 대한 변이체 아미노산의 세트를 코딩하는데 사용된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예에는 서열 (DVK)₇이 포함된다. 일부 실시양태에서, 잔기 95-100a를 DVK 및 NNK 코돈 세트 둘 모두에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예에는 서열 (DVK)₆(NNK)가 포함된다. 또다른 실시양태에서, 적어도 잔기 95-100a를 DVK 및 NNK 코돈 세트 둘 모두에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예에는 서열 (DVK)₅(NNK)가 포함된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 또다른 예에는 서열 (NNK)₆이 포함된다. 본원에 기재된 기준에 따라 당업자가 적합한 올리고뉴클레오타이드 서열의 또다른 예를 결정할 수 있다.
- [0133] 또다른 실시양태에서, 상이한 CDRH3 디자인들이 고친화도 결합체의 단리 및 다양한 에피토프에 대한 결합체의 단리를 위해 이용된다. 이러한 라이브러리 내에 생성된 CDRH3의 길이의 범위는 아미노산 11개 내지 13개이지만, 이와 상이한 길이가 또한 생성될 수 있다. NNK, DVK 및 NVK 코돈 세트, 뿐만 아니라 N 및/또는 C-말단에서의 더욱 제한된 다양성을 사용함으로써 H3 다양성이 확장될 수 있다.
- [0134] CDRH1 및 CDRH2에서 다양성이 또한 생성될 수 있다. CDR-H1 및 H2 다양성의 디자인은 이전의 디자인보다 자연

적인 다양성에 더욱 밀접하게 매칭되는 다양성에 초점을 맞춘 변형과 함께, 기재된 바와 같은 자연 항체 레퍼토리를 모방하기 위한 표적화 전략을 따른다.

- [0135] CDRH3에서의 다양성을 위해, H3의 길이가 상이한 다수의 라이브러리들을 따로따로 구축한 후 조합하여 표적 항원에 대한 결합제를 선별할 수 있다. 기존에 기재되어 있고 본원에서 하기에 기재된 바와 같은 고체 지지체 선별 및 용액 분류 방법을 사용하여 다수의 라이브러리들을 풀링(pooling) 및 분류할 수 있다. 다중 분류 전략을 사용할 수 있다. 예를 들어 한 변형은 고체에 결합된 표적 상에서 분류한 후, 용합 폴리펩티드 상에 존재할 수 있는 태그 (예를 들어 항-gD 태그)에 대해 분류하고, 고체에 결합된 표적 상에서 또다르게 분류하는 것을 수반한다. 별법적으로, 먼저 라이브러리를 고체 표면에 결합된 표적 상에서 분류할 수 있고, 이어서 용출된 결합제를 표적 항원의 농도를 감소시키면서 용액 상 결합을 사용하여 분류한다. 상이한 분류 방법들의 조합을 이용하는 것은 고도로 발현된 서열만 선별되는 것을 최소화하고, 다수의 상이한 고친화도 클론이 선별되게 한다.
- [0136] 표적 항원에 대한 고친화도 결합제를 라이브러리로부터 단리할 수 있다. H1/H2 영역에서의 다양성을 제한하는 것은 축퇴성을 약 10^4 배 내지 10^5 배 감소시키고, H3 다양성을 더욱 허용하는 것은 더욱 높은 친화도의 결합제를 제공한다. CDRH3에서의 다양성의 유형이 상이한 라이브러리들을 이용하는 것 (예를 들어 DVK 또는 NVT를 이용하는 것)은 표적 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 결합제가 단리되게 한다.
- [0137] 상기 기재된 바와 같이 풀링된 라이브러리로부터 단리된 결합제들 중에서, 경쟁에서의 제한된 다양성을 제공함으로써 친화도가 추가로 개선될 수 있다는 것이 발견되었다. 이러한 실시양태에서 경쟁 다양성은 다음과 같이 생성된다: CDRL1에서는, 아미노산 위치 28이 RDT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 29가 RKT에 의해 코딩되며; 아미노산 위치 30이 RVW에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 31이 ANW에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 32가 THT에 의해 코딩되고; 임의적으로, 아미노산 위치 33이 CTG에 의해 코딩되고; CDRL2에서는, 아미노산 위치 50이 KBG에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 53이 AVC에 의해 코딩되고; 임의적으로, 아미노산 위치 55가 GMA에 의해 코딩되고; CDRL3에서는, 아미노산 위치 91이 TMT 또는 SRT 또는 둘 모두에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 92가 DMC에 의해 코딩되며; 아미노산 위치 93이 RVT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 94가 NHT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 96이 TWT 또는 YKG 또는 둘 모두에 의해 코딩된다.
- [0138] 또다른 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역에서 다양성이 있는 라이브러리 또는 라이브러리들이 생성된다. 이러한 실시양태에서, 다양한 길이의 H3 영역을 사용하고, 주로 코돈 셋트 XYZ 및 NNK 또는 NNS를 사용하여 CDRH3에서의 다양성을 생성한다. 개별적인 올리고뉴클레오타이드들을 사용하여 라이브러리를 형성하고 풀링할 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드들을 풀링하여 라이브러리의 서브셋트를 형성할 수 있다. 이러한 실시양태의 라이브러리를 고체에 결합된 표적에 대해 분류할 수 있다. 다중 분류로부터 단리된 클론을 특이성 및 친화도에 대해 ELISA 검정을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 특이성에 대해, 목적하는 표적 항원, 뿐만 아니라 다른 비-표적 항원에 대해 클론을 스크리닝할 수 있다. 그후, 표적 항원에 대한 결합제를 용액 결합 경쟁 ELISA 검정 또는 스팟(spot) 경쟁 검정에서 친화도에 대해 스크리닝할 수 있다. 상기 기재된 바와 같이 제조된 XYZ 코돈 셋트를 이용하여 라이브러리로부터 고친화도 결합제를 단리할 수 있다. 이러한 결합제는 세포 배양물에서 높은 수율로 항체 또는 항원 결합 단편으로서 쉽게 생산될 수 있다.
- [0139] 일부 실시양태에서, CDRH3 영역의 길이에서의 다양성이 더 큰 라이브러리들을 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어 아미노산 약 7개 내지 19개 범위의 CDRH3 영역이 있는 라이브러리들을 생성시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0140] 이러한 실시양태의 라이브러리로부터 단리된 고친화도 결합제는 박테리아 및 진핵생물 세포 배양물에서 높은 수율로 쉽게 생산된다. gD 태그, 바이러스 코트 단백질 성분 서열과 같은 서열을 쉽게 제거하고/하거나, 높은 수율의 전장 항체 또는 항원 결합 단편의 생산을 제공하기 위해 불변 영역 서열을 포함하도록 벡터를 디자인할 수 있다.
- [0141] CDRH3 내에 돌연변이가 있는 라이브러리가 다른 CDR, 예를 들어 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 및/또는 CDRH2의 변이체 버전을 함유하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 따라서, 예를 들어 한 실시양태에서, CDRH3 라이브러리가 미리 정해진 코돈 셋트를 사용하여 위치 28, 29, 30, 31, 및/또는 32에 변이체 아미노산이 있는 인간화 4D5 항체 서열의 상황에서 생성된 CDRL3 라이브러리와 조합된다. 또다른 실시양태에서, CDRH3에 돌연변이가 있는 라이브러리가 변이체 CDRH1 및/또는 CDRH2 중쇄 가변 도메인을 포함하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 한 실시양태에서, 위치 28, 30, 31, 32 및 33에 변이체 아미노산이 있는 인간화 항체 4D5 서열로 CDRH1 라이브러리가 생성된다. 미리 정해진 코돈 셋트를 사용하여 위치 50, 52, 53, 54, 56 및 58에 변이체 아미노산이 있는 인간

화 항체 4D5의 서열로 CDRH2 라이브러리가 생성될 수 있다.

[0142] (xi) 항체 돌연변이체

[0143] 파지 라이브러리로부터 생성된 신규 항체를 추가로 변형시켜, 어버이 항체에 비해 물리적, 화학적 및/또는 생물학적 성질이 개선된 항체 돌연변이체를 생성시킬 수 있다. 사용된 검정이 생물학적 활성 검정인 경우, 바람직하게는, 선택된 검정에서의 항체 돌연변이체의 생물학적 활성이 이러한 검정에서의 어버이 항체의 생물학적 활성보다 적어도 약 10배 더 양호하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 양호하며, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50배 더 양호하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 양호하다. 예를 들어 바람직하게는, 항-PriB/LILRB 항체 돌연변이체는 PriB/LILRB에 대한 결합 친화도가 어버이 항체의 결합 친화도보다 적어도 약 10배 더 강하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 강하며, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50배 더 강하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 강하다.

[0144] 항체 돌연변이체를 생성하기 위해, 하나 이상의 아미노산 변경 (예를 들어 치환)이 어버이 항체의 추가변 영역 중 하나 이상에 도입된다. 별법적으로, 또는 추가적으로, 프레임워크 영역 잔기의 하나 이상의 변경 (예를 들어 치환)이 어버이 항체에 도입될 수 있고, 이는 제2 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 항체 돌연변이체의 결합 친화도를 개선시킨다. 변형될 프레임워크 영역 잔기의 예로는 비-공유결합적으로 항원에 직접적으로 결합하고/하거나 (문헌 [Amit et al., (1986) Science 233:747-753]); CDR의 형상과 상호작용/이를 야기하고/거나 (문헌 [Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917]); V_L - V_H 경계면에 참여 (EP 239 400B1)하는 것들이 포함된다. 특정 실시양태에서, 이같은 프레임워크 영역 잔기들 중 하나 이상의 변형은 제2 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 항체의 결합 친화도를 개선시킨다. 예를 들어 약 1개 내지 약 5개의 프레임워크 잔기가 본 발명의 이러한 실시양태에서 변경될 수 있다. 때때로 이는, 추가변 영역 잔기가 변경되지 않은 경우에도, 임상 전 실험에서 사용하기에 적합한 항체 돌연변이체를 생성하는데 충분할 수 있다. 그러나, 일반적으로 항체 돌연변이체는 추가적인 추가변 영역 변경(들)을 포함할 것이다.

[0145] 변경되는 추가변 영역 잔기는, 특히 어버이 항체의 출발 결합 친화도가 무작위로 생산된 항체 돌연변이체가 쉽게 스크리닝될 수 있도록 하는 경우에, 무작위로 변화될 수 있다.

[0146] 이같은 항체 돌연변이체를 생성시키기 위한 하나의 유용한 절차가 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다 (문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085]). 여기서, 추가변 영역 잔기(들) 중 하나 이상이 알라닌 또는 폴리알라닌 잔기(들)로 대체되어, 제2 포유동물 종으로부터의 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 민감성을 나타내는 추가변 영역 잔기(들)를 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 돌연변이를 도입함으로써 정련한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 결정할 필요가 없다. 이러한 방식으로 생산된 ala-돌연변이체를 본원에 기재된 바와 같이 이의 생물학적 활성에 대해 스크리닝한다.

[0147] 통상적으로, 보존적 치환 예컨대 "바람직한 치환"의 표제 하에 하기에 제시된 것들로 치환이 시작될 것이다. 이같은 치환으로 생물학적 활성 (예를 들어 결합 친화도)에서의 변화가 초래되면, 하기 표에서 "예시적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입되고, 생성물이 스크리닝된다.

[0148] 바람직한 치환:

원래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0149]

[0150] 항체의 생물학적 성질에 있어서의 보다 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상과 같은, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기 군으로 분류된다:

[0151] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0152] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr, asn, gln;

[0153] (3) 산성: asp, glu;

[0154] (4) 염기성: his, lys, arg;

[0155] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

[0156] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0157] 비-보존적 치환은 상기 클래스의 하나의 구성원을 다른 클래스와 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0158] 또다른 실시양태에서, 변형을 위해 선택된 부위는 파지 디스플레이 (상기 참조)를 사용하여 친화도가 성숙된다.

[0159] 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 아미노산 서열 돌연변이체를 코딩하는 핵산 분자가 제조된다. 이러한 방법에는 어버이 항체의 앞서 제조된 돌연변이체 또는 비-돌연변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 돌연변이체를 제조하기 위한 바람직한 방법은 부위 지정 돌연변이유발이다 (예를 들어 문헌 [Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488] 참조).

[0160] 특정 실시양태에서, 항체 돌연변이체에서 단일 추가변 영역 잔기만이 치환될 것이다. 또다른 실시양태에서, 어버이 항체의 추가변 영역 잔기들 중 2개 이상, 예를 들어 약 2개 내지 약 10개의 추가변 영역이 치환될 것이다.

[0161] 통상적으로, 생물학적 성질이 개선된 항체 돌연변이체는 어버이 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성이 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 및 가장 바람직하게는 95% 이상인 아미노산 서열을 가질 것이다. 이

러한 서열에 관한 동일성 또는 유사성은 본원에서, 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭을 도입시킨 후, 어버이 항체 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 동일한 잔기) 또는 유사한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 공통적인 측쇄 성질을 기초로 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기, 상기 참조)의 백분율로 정의된다. 가변 도메인의 바깥쪽 항체 서열에서의 N-말단, C-말단, 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입은 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 끼치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0162] 항체 돌연변이체의 생산 후, 어버이 항체와 비교하여 이러한 분자의 생물학적 활성을 결정한다. 상기 언급된 바와 같이, 이는 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 활성을 결정하는 것을 수반할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 항체 돌연변이체들의 패널을 제조하여, 항원 또는 이의 단편에 대한 결합 친화도를 스크리닝한다. 이러한 초기 스크리닝으로부터 선별된 항체 돌연변이체들 중 하나 이상에 하나 이상의 추가적인 생물학적 활성 검정을 임의적으로 적용하여, 결합 친화도가 개선된 항체 돌연변이체(들)이, 예를 들어 임상전 연구에, 실제로 유용한지를 확인한다.

[0163] 이렇게 선별된 항체 돌연변이체(들)에, 종종 항체의 의도된 용도에 따라, 추가적인 변형을 적용할 수 있다. 이 같은 변형은 추가적인 아미노산 서열 변경, 이중 폴리펩티드(들)에의 융합 및/또는 공유결합 변형 예컨대 하기에 상세히 설명되는 것들을 수반할 수 있다. 아미노산 서열 변경과 관련하여, 예시적인 변형이 상기에 상세하게 설명되어 있다. 예를 들어 항체 돌연변이체의 적합한 형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스테인 잔기가 또한 치환되어 (일반적으로는 세린으로 치환됨), 분자의 산화 안정성을 개선시키고, 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 그의 안정성을 개선시키기 위해 시스테인 결합(들)이 항체에 첨가될 수 있다 (특히 항체가 항체 단편, 예를 들어 Fv 단편인 경우). 아미노산 돌연변이체의 또다른 유형에서는 글리코실화 패턴이 변경된다. 이는 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가함으로써 달성될 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄로의 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내의 상기 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 사용될 수 있다. 항체에 글리코실화 부위를 첨가하는 것은 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 치환에 의해 또한 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0164] (xii) 항체의 재조합 생산

[0165] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하여, 추가적인 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써), 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 쉽게 단리되고 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용될 수 있다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다 (예를 들어 본원에 참고로 명확하게 포함되는 미국 특허 번호 제5,534,615호에 기재되어 있음).

[0166] 본원에서 벡터 내 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물에는 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그람(Gram)-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세에 (Enterobacteriaceae), 예컨대 에셰리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어 살모넬라 타이피무리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실러스(Bacillus), 예컨대 B. 서브틸리스(B. subtilis) 및 B. 리케니포르미스(B. licheniformis) (예를 들어 DD 266,710 (1989년 4월 12일 공개)에 개시된 B. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 P. 아에루기노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)가 포함된다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이들 예는 제한적인 것이 아니라 설명적인 것이다.

- [0167] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대 사상형 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상적인 빵 효모가 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예컨대 *K. 락티스*(*K. lactis*), *K. 프라길리스*(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), *K. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), *K. 위커라미*(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), *K. 왈티*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *K. 드로소필라룸*(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906), *K. 테르모톨레란스*(*K. thermotolerans*) 및 *K. 마르시아누스*(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코데르마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 쉬반니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 쉬반니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상형 진균, 예를 들어 뉴로스포라, 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 *A. 니둘란스*(*A. nidulans*) 및 *A. 니거*(*A. niger*)가 본원에서 통상적으로 이용가능하고 유용하다.
- [0168] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예에는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 다수의 배칼로바이러스 균주 및 변이체, 및 스포돔테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (애벌레), 아에데스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (초파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용된 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 오토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 대중적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스들은 본원에서, 특히 스포돔테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위한, 본 발명에 따른 바이러스로서 사용될 수 있다. 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.
- [0169] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양으로 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포들 (문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 라인 (Hep G2)이다.
- [0170] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양시킨다.
- [0171] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예컨대 햄 (Ham) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) (시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 제4,767,704호; 동 제4,657,866호; 동 제4,927,762호; 동 제4,560,655호; 또는 동 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 번호 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이러한 배지에 필요하다면 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN; 상표명)), 미량원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지 공급원이 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물 또한 당업자에게 잘 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 당업자에게는 명백할 것이다.
- [0172] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내 원형질막 주위 공간에서 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다.

항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 세포인 미립자 잔해물을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에는, 상기 발현 시스템으로부터의 상정액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축시킨다. 단백질 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF가 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 증가를 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0173] 세포로부터 제조된 항체 조성물을, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 조절형 공극을 갖는 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스보다 달성할 수 있는 것보다 빠른 유동 속도 및 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (J. T. Baker, 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전법을 회수되는 항체에 따라 또한 사용할 수 있다.

[0174] C. 항-PirB/LILRB 항체의 용도

[0175] 본 발명의 항-PirB/LILRB 항체는 신경 세포의 생존을 개선시키거나 이의 성장을 유도하기 위한 작용제로서의 용도가 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 이는 예를 들어 중추 신경계 (척수 및 뇌)에 대한 물리적 손상; 뇌졸중과 관련된 뇌 손상; 및 신경변성과 관련된 신경계 장애, 예를 들어 삼차 신경통, 설인 신경통, 벨 마비, 중증 근무력증, 근이영양증, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 다발성 경화증 (MS), 진행성 근위축증, 진행성 연수 유전성 근위축증, 물리적 손상 (예를 들어 화상, 상처) 또는 질환 상태, 예컨대 당뇨병, 신장 기능장애 또는 암 및 AIDS를 치료하는데 사용된 화학요법제의 독성 효과로 인해 유발된 말초 신경 손상, 추간판 헤르니아, 파열, 또는 이 탈 무척추 디스크 증후군, 경부 척추증, 신경총 장애, 흉곽 출구 파괴 증후군, 납, 담손, 진드기로 인해 유발된 것과 같은 말초 신경병증, 포르피린증, 길랑-바레 증후군, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 또는 파킨슨병을 비롯한, 신경계의 변성 장애 ("신경변성 질환")의 치료법에서 유용하다.

[0176] 본원의 항-PirB/LILRB 항체는 또한, 시험관 내에서 신경 세포를 배양하는데 사용하기 위한 배양 배지의 성분으로서 유용하다

[0177] 마지막으로, 본원의 항-PirB/LILRB 항체를 포함하는 제제는 방사성 요오드, 효소, 형광단, 스핀(spin) 표지 등으로 표지되는 경우 경쟁적 결합 검정에서 표준물질로서 유용하다.

[0178] 목적하는 정도의 순도를 지니는 확인된 화합물 (예컨대 항체)을 임의적인 생리화적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌])와 혼합함으로써 본원의 항-PirB/LILRB 항체의 치료 제형이 동결건조 케이크 또는 수용액의 형태로 보관용으로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충액, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기)의 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이팅제 예컨대 EDTA; 당 알콜 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 카운터 이온 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제 예컨대 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronic) 또는 PEG가 포함된다.

[0179] 생체내 투여를 위해 사용되는 항-PirB/LILRB 항체는 멸균성이어야 한다. 이는 동결건조 및 재구성 전 또는 후에 무균성 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0180] 치료 조성물은 무균성 접근 포트(port)가 있는 용기, 예를 들어 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 놓일 수 있다.

- [0181] 본 발명의 항-PirB/LILRB 항체는 임의적으로 신경영양성 인자 (NGF, NT-3, 및/또는 BDNF 포함)와 조합될 수 있거나 이와 동시에 투여될 수 있고, 변성 신경 장애에 대한 다른 통상적인 치료법과 함께 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 항-PirB/LILRB 항체는 NgR 억제제, 예컨대 항체, 소형 분자 또는 펩티드와 함께 유익하게 투여되어, NgR에의 Nogo-66, MAG 및/또는 OMgp의 결합을 차단할 수 있다.
- [0182] 투여 경로는 공지된 방법에 따르고, 예를 들어 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내 또는 병변내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 또는 하기에서 언급되는 바와 같은 서방성 시스템에 의한다.
- [0183] 뇌내 사용을 위해, CNS의 체액 저장소 내로의 주입에 의해 연속적으로 화합물이 투여될 수 있지만, 볼루스(bolus) 주사가 허용가능하다. 바람직하게는 화합물이 뇌실 내로 투여되거나, 또는 달리 CNS 또는 척수액 내로 도입된다. 연속 투여 수단, 예컨대 펌프를 사용하여 유치 카테터(indwelling catheter)에 의해 투여가 수행될 수 있거나, 또는 서방성 비히클의 이식, 예를 들어 뇌내 이식에 의해 투여될 수 있다. 보다 구체적으로, 화합물은 만성적으로 이식된 삽입관을 통해 주사될 수 있거나 또는 삼투 미니펌프의 도움으로 만성적으로 주입될 수 있다. 소형 튜빙(tubing)을 통해 뇌실에 단백질을 전달하는 피하 펌프가 이용가능하다. 고도로 정교한 펌프가 피부를 통해 재충전될 수 있고, 이의 전달 속도는 수술적 개입없이 설정될 수 있다. 피하 펌프 기구 또는 완전 이식형 약물 전달 시스템을 통한 연속적인 뇌실내 주입을 수반하는 적합한 투여 프로토콜 및 전달 시스템의 예는 문헌 [Harbaugh, J. Neural Transm. Suppl. 24:271 (1987)]; 및 [DeYebenes, et al., Mov. Disord. 2:143 (1987)]에 기재된, 알츠하이머 환자 및 파킨슨 질환에 대한 동물 모델에게 도파민, 도파민 작용제, 및 콜린작용성 작용제를 투여하기 위해 사용되는 것들이다.
- [0184] 서방성 제제의 적합한 예에는 성형품, 예를 들어 필름, 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 중합체 매트릭스가 포함된다. 서방성 매트릭스에는 폴리에스테르, 히드로겔, 폴리락티드 (미국 특허 번호 제3,773,919호, EP 58,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (문헌 [Sidman, et al., 1983, Biopolymers 22:547]), 폴리 (2-히드록시에틸-메타크릴레이트) (문헌 [Langer, et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167]; [Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98]), 에틸렌 비닐 아세테이트 (문헌 [Langer, et al.], 동일문헌) 또는 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988A)이 포함된다. 서방성 조성물은 또한, 그 자체가 공지된 방법에 의해 제조될 수 있는, 리포솜으로 봉입된 화합물을 포함한다 (문헌 [Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:3688 (1985)]; [Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 미국 특허 번호 제 4,485,045호 및 동 제4,544,545호; 및 EP 102,324A). 통상적으로, 리포솜은 지질 함량이 약 30 몰% 콜레스테롤을 초과하는 소형 (약 200-800 옹스트롬)의 단층 유형이고, 선택된 비율은 최적의 치료법을 위해 조정된다.
- [0185] 치료적으로 사용될 활성 화합물의 유효량은, 예를 들어 치료 목적, 투여 경로, 및 환자의 상태에 좌우될 것이다. 따라서, 최적의 치료 효과를 얻기 위해 필요한 대로 치료사가 투여량을 적정하고 투여 경로를 변형시키는 것이 필요할 것이다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자들에 따라 약 1 μ g/kg에서 100 mg/kg 이상까지의 범위일 것이다. 전형적으로, 임상의는 뉴런 기능을 회복시키고, 유지하며, 최적으로는 재확립시키는 투여량에 도달할 때까지 활성 화합물을 투여할 것이다. 통상적인 검정에 의해 이러한 치료법의 진행이 쉽게 모니터링된다.
- [0186] 본 발명의 추가의 상세한 사항이 하기의 비-제한적인 예들에 의해 설명된다.
- [0187] 실시예 1
- [0188] 발현 클로닝 LILRB2
- [0189] 억제성 미엘린 단백질에 대한 신규 수용체를 확인하기 위해, 발현 클로닝 방법을 사용하였다. 예시(bait)로서, 알칼라인 포스파타제 (AP)를 다음과 같은 특성화된 미엘린 억제제의 N- 및/또는 C-말단에 융합시킨 구조체를 생성하였다 (인간 cDNA 사용): Nogo66, NogoA의 2개의 추가의 억제 도메인 (NiR<텔타>D2 및 NiG<텔타>20) (문헌 [Oertle T, J Neurosci. 2003, 23(13): 5393-406]), MAG, 및 OMgp. 이들 구조체를 293개의 세포 내로 형질감염시켜, 예시 단백질을 함유하는 조건화된 배지 (DMEM/2% FBS 중의 것)를 제조하였다. 스크리닝에 사용된 cDNA 라이브러리는 오리젠 (Origene)에 의해 생성된 발현-준비 벡터 내의 전장 인간 cDNA 클론으로 이루어졌다. 이들 cDNA를 컴파일링하고, 정렬시키고, 풀링하였다. 약 100 cDNA의 풀을 COS7 세포 내로 일시적으로 형질감염시켰다.
- [0190] 특히, 제1일에, COS7 세포를 85,000 세포/웰의 밀도로 12-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 제2일에, 지질-기초의 형질감염 시약 퓨젠 6(FuGENE 6) (로슈 (Roche))을 사용하여, 1 mg의 풀링된 cDNA로 각각의 웰을 형질감염시켰다. 제4일에, 스크리닝을 수행하였다. 간단히 설명하면, 배양 배지를 세포로부터 제거하고, AP-융합 예시

단백질을 함유하는 0.5 ml의 293 세포-조건화된 배지 (20-50 nM)로 대체하였다. 세포를 실온에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 포스페이트-완충 염수 (PBS)로 3회 세척하고, 7분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, HEPES-완충 염수 (HBS) 내에서 3회 세척하고, 65°C에서 90분 동안 열 불활성화시켜 내인성 AP 활성을 파괴하였다. 세포를 AP 완충액 (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9.5) 내에서 1회 세척하고, 발색 기질 (웨스턴 블루(Western Blue), 프로메가 (Promega)) 내에서 인큐베이션하고, 인큐베이션 및 다시 밤새 인큐베이션하고 1시간 후에 반응 생성물의 존재에 대해 분석하였다. 양성 세포는 막 표면 상의 암청색 침전물의 존재에 의해 확인되었다. 후속 라운드의 스크리닝에 의해 개개의 양성 클론을 확인하기 위해서 양성 풀을 추가로 붕괴시켰다.

[0191] 스크리닝으로부터, 다음의 양성 히트 (hit)가 확인되었다:

[0192] MAG-AP 예시는 4개의 양성 히트를 생성시켰다. 하나는 이전에 특성화된 Nogo 수용체였다 (문헌 [Fournier et al., Nature 409, 342-346 (2001)]). 상기 히트 중의 2개는 당분해 프로세싱 효소였고, 관련이 없을 것으로 간주되었다. 4번째는 "클론 643 (LOC57228), mRNA로부터의 호모 사피엔스 (Homo sapiens) 가상 단백질"로 설명되었다. cDNA에 대한 보다 면밀한 분석은 이전에 기재된 단백질 SMAG에 상동성인 다른 ORF를 보여주었다.

[0193] AP-Nogo66 예시는 2개의 양성 히트를 생성시켰다. 하나는 이전에 특성화된 Nogo 수용체였다. 다른 하나는 "호모 사피엔스 백혈구 면역글로불린-유사 수용체, 서브패밀리 B (TM 및 ITIM 도메인 보유), 멤버 2 (LILRB2), mRNA" (서열 2)였다. 상기 유전자는 또한 MIG10, ILT4, 및 LIR2를 포함하여 여러 개의 다른 명칭으로도 알려져 있다 (문헌 [Kubagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5261-6 (1997)]; [Colonna et al., J. Exp. Med. 186:1809-18 (1997)]).

[0194] 실시예 2

[0195] PirB 기능-차단 항체의 제조 및 테스트

[0196] *PirB* 기능-차단 항체

[0197] PirB 세포의 도메인에 대해 합성 파지 항체 라이브러리를 패닝하는 것에 의해 PirB에 대한 항체가 생성되었다 (문헌 [W. C. Liang et al., J Mol Biol 366, 815 (2007)]). 그 후, 항체 클론 (10 µg/ml)이 PirB-발현 COS7 세포에 AP-Nogo66 (50 nM)이 결합하는 것을 차단하는 능력을 시험관 내에서 테스트하였다. 다양한 YW259 항-마우스 PirB (항-mPirB) 항체의 중쇄 및 경쇄 서열의 뉴클레오타이드와 아미노산 서열을 도 6 내지 16, 및 17 및 18에 나타낸다. 도 17 및 18은 또한 각각 YW259.2, YW250.9 및 YW259.12의 중쇄 및 경쇄 내의 추가 변 영역 서열을 나타낸다.

[0198] 신경돌기 생장 검정

[0199] 폴리-D-리신 (바이오코트(Biocoat) (BD))으로 예비 코팅된 96-웰 플레이트를 미엘린 (0.75 µg/ml)으로 밤새, 또는 AP-Nogo66 또는 MAG-Fc (150-300 ng/스폿)로 2 시간 동안 코팅한 다음, 라미닌 (F-12 중의 10 µg/ml)으로 2 시간 (CGN 배양물) 또는 4 시간 (DRG 배양물) 동안 처리하였다. 마우스 P7 소뇌 뉴런을 앞서 기재된 바와 같이 배양하고 (문헌 [B. Zheng et al., Proc Natl Acad Sci U S A 102, 1205 (2005)]), 웰 당 약 2×10^4 개의 세포로 플레이팅하였다. 마우스 P10 DRG 뉴런을 종래 기재된 바와 같이 배양하고 (문헌 [Zheng et al., 2005, 상기 문헌]), 웰 당 약 5×10^3 개의 세포로 플레이팅하였다. 배양물을 22시간 동안 37°C에서 (5% CO₂가 존재함) 성장시킨 후, 4% 파라포름알데히드/10% 수크로스로 고정하고, 항-β III-튜불린 (TuJ1, 코반스 (Covance))으로 염색하였다. 각각의 실험에 대해, 모든 조건을 6개의 복제 웰에서 수행하였고, 이로부터 최대 신경돌기 길이를 측정하고, 6개의 웰들 간의 평균을 결정하였다. 각각의 실험을 3회 이상 수행하였고, 유사한 결과를 얻었다. p-값은 스튜던트(Student)의 t 테스트를 이용하여 결정하였다.

[0200] 성장 원추 붕괴 검정

[0201] DRG 외식편은 3-주령의 마우스로부터 DRG를 떼어내고, 이를 3 조각으로 슬라이싱하여 단리하였다. 이어서, 각각의 DRG 외식편을 8개의 웰 플레이트로부터 개개의 PDL (100 µg/ml)- 및 라미닌 (10 µg/ml)-코팅된 웰에서 배양하였다. 플레이팅 72시간 후, 외식편을 AP-Nogo66 (100 nM) 또는 미엘린 (3 µg/ml)과 함께 30 분 동안 배양하여 붕괴를 자극하였다. 배양물을 4% 파라포름알데히드/10% 수크로스로 고정시킨 다음, 성장 원추를 로다민-팔로이딘 (분자 프로브(Molecular Probes)) 염색으로 시각화하고, 붕괴를 계측하였다. 평균 성장 원추 붕괴는 3개 이상의 복제 웰을 평균을 내어 결정하였다.

- [0202] **결과**
- [0203] PirB가 Nogo66의 기능적 수용체인지를 확인하기 위해, 본 발명자들은 청소년 (P7)의 소뇌 과립 뉴런 (CGN)에 초점을 맞췄으며, 신경돌기 생장은 AP-Nogo66 상에서 성장될 경우 억제되었다 (문헌 [K.C. Wang et al., Nature 420, 74 (2002)]). 성인 CGN은 PirB를 발현하는 것으로 밝혀졌고 (문헌 [J. Syken et al., Science 313, 1795 (2006)]), 본 발명자들은 그것을 또한 RT-PCR, 면역조직화학 및 계내 혼성화에 의한 평가에 의해 청소년 CGN 케이스에서도 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음).
- [0204] 먼저, PirB (PirB-His)의 가용성 엑토도메인의 AP-Nogo66 억제를 방해하는 능력을 시험관내에서 테스트하였다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, AP-Nogo66은 P7 CGN의 신경돌기 생장을 처리되지 않은 대조군 수준의 대략 66%까지 억제하였다. 본 검정에 PirB-His를 포함시키는 것은 AP-Nogo66 억제를 역전시키는 한편, 신경돌기 생장을 본질적으로 대조군 수준으로 되돌렸다. 이러한 결과는 Nogo66에 의한 억제를 차단하기 위해 NgR의 엑토도메인을 이용하여 보고된 결과와 유사하며 (문헌 [B Zeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1205 (2005)]; [A. E. Fournier, et al., J. Neurosci. 22, 8876 (2000)]; [Z. L. He et al., Neuron 38, 177 (2003)]), 이는 PirB가 Nogo66의 기능적 억제 도메인에 결합할 수 있음을 나타내지만, CGN의 내인성 PirB가 AP-Nogo66에 의한 억제를 매개하는지 여부를 확인시켜주는 것은 아니다.
- [0205] 이에, PirB-Nogo66 상호작용을 방해할 수 있는 PirB에 대한 항체 (항-PirB)를 생성하였다. PirB의 세포외 도메인에 대한 파지 디스플레이 플랫폼 (문헌 [W.C. Liang et al., J. Mol. Biol. 366, 815 (2007)])을 이용하여, 다중 클론에 대해 AP-Nogo66이 PirB에 결합하는 것을 차단하는 능력을 스크리닝 하였다. AP-Nogo66-PirB 결합을 가장 방해하는 클론 YW259.2 (이하, aPB1이라 지칭함)는 PirB에 대한 Kd가 5 nM이었다 (도 13 내지 16 참조).
- [0206] aPB1은 CGN의 기준치 축삭 성장에는 어떤 영향도 미치지 않았다. 그러나, aPB1은 배양된 CGN에서 AP-Nogo66 또는 미엘린에 의한 억제를 상당히 감소시켰고 (도 2b), AP-Nogo66 상에서의 신경돌기 생장을 41%에서 59%로, 미엘린 상에서는 47%에서 62%로 회복시켰다. 억제 기질로서 MAG를 사용하거나, 또는 다른 세포 유형 (후근 신경절 (DRG) 뉴런)을 사용한 경우에 유사한 결과가 관찰되었다 (도 5). 이러한 결과는 PirB가 신경돌기 생장의 장기간의 억제를 매개하는 기능적 수용체임을 입증한다.
- [0207] 이러한 결과를 확인하기 위해, PirBTM 마우스로부터 뉴런을 배양하고, 막횡단 도메인 및 PirB 세포내 도메인의 일부를 코딩하는 4개의 엑손을 제거함으로써, 세포 표면 PirB의 유전적 제거가 또한 AP-Nogo66 또는 미엘린에 의한 억제를 역전시키는지 여부를 테스트하였다 (문헌 [J. Syken et al., Science 313, 1795 (2006)]). CGN은 대조군 기질, AP-Nogo66 또는 미엘린 상에서 PirBTM 마우스 또는 야생형 (WT) 한배새끼로부터 배양하였다. 대조군 기질 (PDL/라미닌) 상에서, PirBTM 뉴런은 WT 뉴런과 유사하게 거동했다 (도 2c). 그러나, PirBTM 뉴런으로부터의 신경돌기 생장은 AP-Nogo66 또는 미엘린 상에서의 WT 뉴런으로부터의 신경돌기 성장보다 현저하게 덜 억제되었다. AP-Nogo66 상에서, WT 뉴런으로부터의 생장은 대조군 수준의 50%로 억제된 반면, PirBTM 뉴런은 단지 66% 만이 억제되었다. 유사하게, 미엘린 상에서 WT 뉴런은 대조군 수준의 52%로 억제된 반면, PirBTM 뉴런은 단지 70% 만이 억제되었다. 또한, 본 발명자들은 미엘린 및 AP-Nogo66 둘 모두에서의 PirBTM DRG 뉴런의 유사한 부분적인 탈억제를 관찰하였다 (도 5). 이러한 발견은 PirB가 사실상 AP-Nogo66에 대한 기능적 수용체이고, 신경돌기 생장의 미엘린-매개 억제체임을 나타낸다. 그러나, PirB 활성의 손실은 생장을 완전히 회복시키지 않는다.
- [0208] NgR이 종래 미엘린 억제제에 대한 수용체로 기재되었기 때문에, PirB와 NgR이 함께 신경돌기 생장의 억제를 매개하는 기능을 하는 것이 가능하다. 이를 확인하기 위해, 항-PirB의 존재하에 NgR-결손 마우스로부터 뉴런을 배양하여, CGN에서 PirB 및 NgR 둘 모두의 기능을 함께 차단하였다. 본 발명자들이 이전에 보고한 바와 같이 (문헌 [B. Cheng et al., PNAS 2005, 상기 문헌]), NgR-/- CGN 신경돌기 생장은 AP-Nogo66 또는 미엘린에 의해 WT 뉴런에서의 그것과 동일한 정도로 억제된다 (50% 및 49%; 도 3). NgR+/- 뉴런의 aPB1 항체 처리는, 상기 WT 뉴런의 aPB1 처리에서 관찰된 바와 같이 AP-Nogo66 또는 미엘린에 의한 억제를 부분적으로 역전시켰다. 유사하게, NgR-/- 뉴런의 aPB1 처리는 AP-Nogo66에 의한 억제를 부분적으로 역전시켰지만, NgR+/- 뉴런 또는 WT 뉴런의 aPB1 처리에서 관찰되는 것 보다 어떤 추가의 회복은 제공하지 않았다. 대조적으로, NgR-/- 뉴런의 aPB1 처리는 미엘린 상에서의 신경돌기 생장을 거의 대조군 수준으로 회복시켰다. 따라서, NgR이 아닌 PirB가 CGN에서 APNogo66에 의한 기질 억제를 위해 요구되지만, 단지 부분적으로만 그러한 것으로 보인다. 또한, PirB 및 NgR 둘 모두는 함께 미엘린에 의해 부여된 기질 억제에 기여한다.
- [0209] NgR이 다양한 미엘린 억제제에 대응하여 성장 원추 붕괴를 위해 요구되는 것으로 여겨지기 때문에 (문헌 [J.E.

Kim et al., Neuron 44, 439 (2004)], [O.Chivatakarn et al., J. Neurosci. 27, 7117 (2007)]), PirB는 또한 보다 급성인 반응에 수반될 수 있다. PirB를 발현하는 것으로 확인된 3 주령의 마우스의 후근 신경절 (DRG)로부터의 감각 뉴런을 본 실험에 사용하였다. 본 배양 시스템에서의 성장 원추는 붕괴의 기준치 수준이 높고 (약 30%), 이는 APNogo66 또는 미엘린과의 인큐베이션에 의해 더욱 증가되는 것이 확인되었다 (도 4). 이러한 붕괴는 NgR-/- 뉴런에서는 거의 일어나지 않았다. 또한, aPB1에 의해 PirB 기능을 차단하는 것도 이들 억제제에 의해 성장 원추 붕괴를 역전시키는데 충분하였다. PirB 및 NgR 둘 모두의 경로를 함께 차단하는 것은 (NgR-/- 마우스로부터의 뉴런에 aPB1을 처리하는 것을 이용함) 또한 성장 원추 붕괴를 완전히 역전시켰지만, 단독 처리가 본 검정에서 완전한 회복을 가져왔으므로 이러한 결과는 유익하지 않다.

[0210] 또다른 실험에서, C1QTNF5는 소뇌 과립 뉴런 (CGN)의 신경돌기 성장을 억제하였고, 이러한 억제는 PirB 기능-차단 항체 YW259.2에 의해 역전되었다. 본 결과를 도 19에 도시한다.

[0211] 또한, 이러한 결과는 미엘린 추출물에 의한, 및 보다 구체적으로는 미엘린-관련 억제제 Nogo66 및 MAG에 의한 신경돌기 억제를 위해 필요한 수용체로서의 PirB의 신규한 역할을 지지한다. 사실상, (유전적으로 또는 항체를 사용하여) PirB 기능을 단독으로 제거한 것이 미엘린 추출물- 및 미엘린 억제제 둘 모두에서의 성장을 부분적으로 탈억제하는 반면, NgR 만을 유전적으로 제거한 것은 이들 기질 중 어디에서도 탈억제하지 않기 때문에, PirB는 NgR 보다 기질 억제의 더욱 유의한 매개자인 것으로 보인다. 그러나, NgR의 유전적 제거가 미엘린 (그러나 Nogo66은 아님)에 대한 항-PirB 항체에 의해 유발되는 탈억제를 증가시킬 수 있기 때문에, NgR은 미엘린 추출물 (그러나 Nogo66은 아님)에 의한 억제를 매개하는데 있어서 부가적인 역할을 하는 것으로 보인다. 본 발명자들의 발견은 NgR 엑토도메인과 융합된 설치류에서 관찰되어 보고된 재생 또는 발아에도 불구하고 (문헌 [S. Li et al., J. Neurosci. 24, 10511 (2004)]), NgR 녹아웃 마우스에서 개선된 CST 재생이 놀랍게도 결여되어 있음을 설명하는데 도움이 될 수 있다 (문헌 [J.E. Kim et al., 상기 문헌], [B. Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1205 (2005)]). 따라서, 생체내에서 상당한 재생을 달성하기 위해 PirB 및 NgR 둘 모두를 제거하는 것이 필요할 수 있다. 또한, Nogo66 기질에 대해, NgR의 유전적 제거는 PirB 제거의 부분적인 탈억제 효과를 더욱 증가시키지 않기 때문에, Nogo66에 대한 추가의 결합 수용체(들)이 존재하는 것으로 보인다.

[0212] 비록 PirB가 NgR 보다 기질 억제를 위한 보다 유의한 수용체인 것으로 보이지만, PirB 또는 NgR 만을 비활성화시키는 것은 미엘린 억제제의 첨가에 의해 유발되는 급성 성장 원추 붕괴를 차단하는데 충분하다. 이러한 관찰은, 붕괴가 PirB 및 NgR 둘 모두의 활성이 평행하게 또는 함께 작용하는 것을 필요로 하는 보다 힘든 과정임을 제안한다. 이와 관련해서, 최근에 PirB 및 NgR 수용체가 시각 피질에서의 시냅스 연결의 가소성을 제한하는데 있어서 유사한 역할을 하는 것으로 밝혀진 것이 흥미롭다: 수용체가 결여된 마우스에서, 중요한 발생 기간 중의 눈 감기가 개안을 통한 연결을 지나치게 강화한다 (문헌 [J. Syken et al., 2006, 상기 문헌], [A.W. McGee et al., Science 309, 2222 (2005), 상기 문헌]). 성장 원추 붕괴를 매개하는데 있어서의 수용체 둘 모두의 효과와 관련된 메커니즘은 또한 눈 우세 가소성에서의 그들의 역할의 공통점에 기초가 될 수 있다.

[0213] 손상 이후 성체 축삭의 재생 불능은 CNS에 대한 외상성 손상 이후에 기능을 다시 획득하는데 있어서의 주요 장애물이다. 시냅스 가소성 능력에 따른 재생 잠재력의 감소는 과잉의 또는 무성한 시냅스 연결의 발달을 제한하기 위한 노력의 일환으로 연령에 의해 제한되는 것으로 예측된다. 이러한 예측은 발생 중 및 성인기 둘 모두에서 시냅스 가소성을 제한하는데 종래부터 연루되어 온 PirB (문헌 [J. Syken et al., 2006, 상기 문헌])가 또한 미엘린에 의한 축삭 억제의 매개자라는 발견과 더불어, 처음부터 축삭 억제에 연루되어 온 NgR이 시냅스 가소성을 유사하게 조절한다는 발견 (문헌 [S. Li et al., J. Neurosci. 24, 10511 (2004)])으로부터 지지를 얻는다.

[0214] 본 발명자들의 발견은 또한 잠재적인 PirB 리간드의 레퍼토리를 클래스 I MHC 분자의 범위를 넘어 뉴런 체성장 억제제를 포함하는 것으로 넓힌다. 반대로, 알려진 미엘린 억제제 Nogo 또는 MAG의 유전적 제거가 미엘린에 의한 억제를 어느 정도로만 감소시키기 때문에 - 이는 다른 억제제가 존재함을 암시하며 - 본 발명자들의 발견은 희소돌기아교세포에 의해 통상적으로 낮은 수준으로 발현되는 MHCI 분자가 손상 이후에 상향 조절되고 중심 미엘린에서 Nogo 및 MAG와 협력하여 성장 억제에 기여할 수 있다는 가능성을 대두시킨다.

[0215] PirB가 미엘린 억제제에 대응하여 축삭 성장을 억제하게 하는 신호를 보내는 메커니즘은 분명하지 않다. 그러나, PirB는 인테그린 수용체의 기능과 길항작용을 하며 (문헌 [S. Pereira et al., J. Immunol. 173:5757 (2004)]), SHP-1 및 SHP-2 포스포타제 둘 모두를 이용하는 것으로 밝혀졌고; 이러한 사건은 각각 또는 둘 모두 정상적인 신경돌기 성장을 감쇄시킬 수 있다. 본원의 항-PirB 항체를 이용하거나 또는 다른 수단에 의해 PirB 활성을 봉쇄하는 것은 축삭 재생을 자극하기 위한 치료적 개입을 위해 중요하고 새로운 표적을 제공한다.

[0216] 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 명확하게 포함된다.

[0217] 본 발명이 특정 실시양태로 간주되는 것을 참조로 기재되었지만, 본 발명이 이같은 실시양태로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 이와 반대로, 본 발명은 첨부된 청구항의 취지 및 범위 내에 포함되는 다양한 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

도면

도면1a

PirB (마우스) 서열 (서열 1)

```

1  msctftallr  lgltlslwip  vltgslpkpi  lrvqpdsvvs  rwtkvtfce  etiganeyrl
61  ykdgklyktv  tknkqkpank  aefslsnvdl  rnaggyrcsy  stqykssgys  dplelvvtgd
121  ywtpsllaga  spvvtsggyv  tlqcesshnd  hkfiltvegp  qklswtqdsq  ynysrkyyna
181  lfsvgpvtpn  qrwicrcysy  drnrpyvwsp  psesvellvs  gnlqkptika  epgpviaskr
241  amtiwcqgnl  daevyflhne  gsqktqstqt  lqqpgnkgkf  fipsmtrqna  ggyrcycygs
301  agwsqpsdtl  elvvtgiyeh  ykprlsvlps  pvvtagnmt  lhcasdfhyd  kfiltkedkk
361  fgnsldtehi  sssrqyralf  iigpttptht  gtfrcygyfk  napqlwsvps  dlqqilisgl
421  skkpsllthq  ghildpgmtl  tlqcysdiny  drfalhkvgg  adimghsssq  tdtgfsvanf
481  tlgyvssstg  ggyrcygahn  lssewsasse  pldilitgql  pltpslsvkp  nhtvhsetv
541  sllcwsmdsv  dtfilskegs  aqqplrlksk  shdqqsgaef  smsavtshls  gtyrcygaqn
601  ssfyllssas  spveltvsqp  ietstppptm  smplggllmy  lkalgvsva  filflfilif
661  illrrrrhrgk  frkdvqkekd  lqlssgaeep  itrkgelqkr  pnpaaatqee  slyasvedmq
721  tedgvelnsw  tppeedpqge  tyavkpsrl  rkaghvpsv  msreqlntey  eqaeegqgan
781  nqaagesgsg  dvtyaqlcsr  tlrqgaaasp  lsqageapee  psvyatlaaa  rpeavpkdve
841  q
    
```

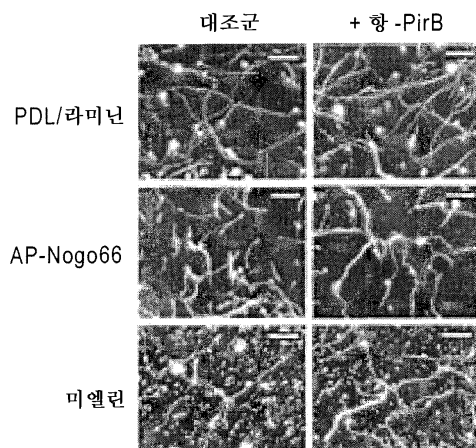
도면1b

LILRB2 (인간) 서열 (서열 2)

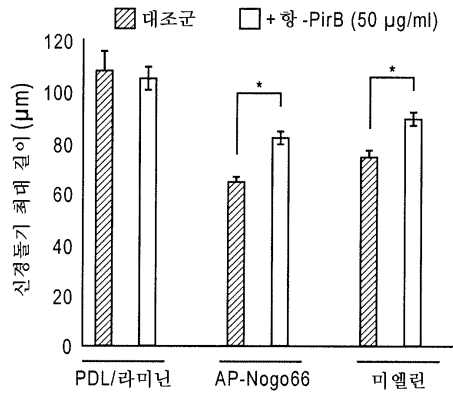
```

1  mtpivtvlic  lglslgprth  vqtgtipkpt  lwaepdsvit  qgspvtlscq  gsleaqeyrl
61  yrekksaswi  trirpelvkn  gqfhipsitw  ehtgrygcqy  ysrrarwsels  dplvlvmtga
121  ypkptlsaqp  spvvtsggrv  tlqcesqvaf  ggfilckege  dehpgqlnsq  phargssrai
181  fsvgpvsnr  rwsrhcyygd  lnsipyvwssp  sdlllellvp  vskkpslsqv  pgpvvapgcs
241  ltlqcvsdvg  ydrfvlykeg  erdlrqlpgr  qpqaglsqan  ftlgpvsrsy  ggyrcygyay
301  nlsewsaps  dpldilitgq  ihgtpfisiv  pgptvasgen  vtllcqsqrq  fhtflltkag
361  aadaplrlrs  iheykyqae  fpmsspvtsh  agtyrcygs1  nsdpyllshp  sepelvvsg
421  psmgsspppt  gpistpagpe  dqpltptgsd  pqsglgrhlg  vvigilvavv  lllllllllf
481  lilrhrrogk  hwtstqrkad  fqhpagavgp  eptdrqlgwr  ssapaadaqee  nlyaaavkdtq
541  pedgvemdtr  aaaseapqdv  tyaqhlsltl  rrkateppps  qereppaeps  iyatlaih
    
```

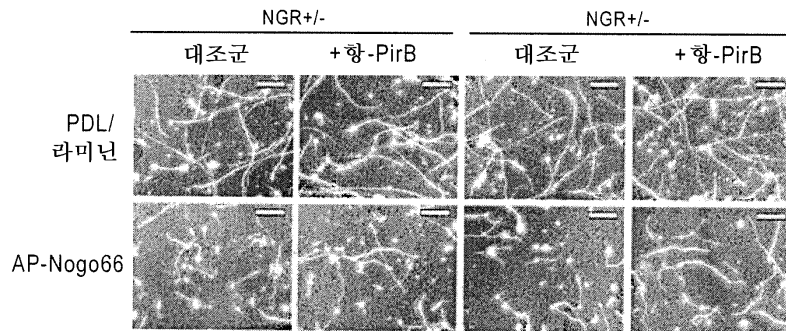
도면2a



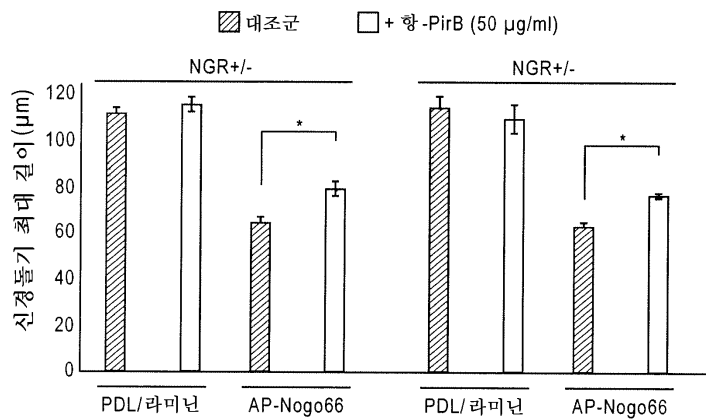
도면2b



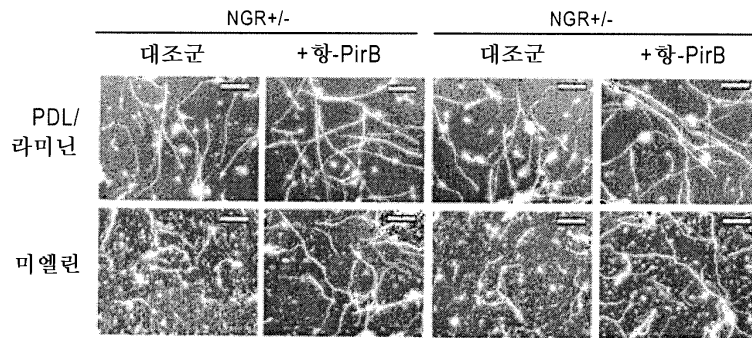
도면3a



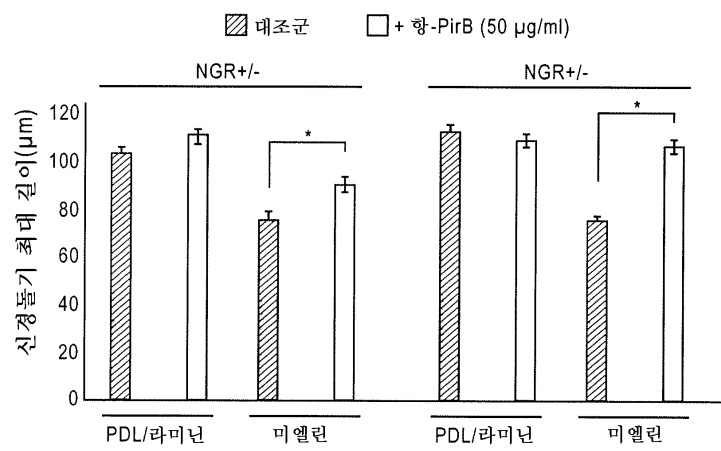
도면3b



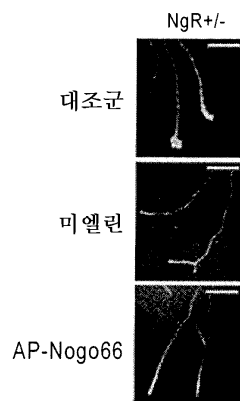
도면3c



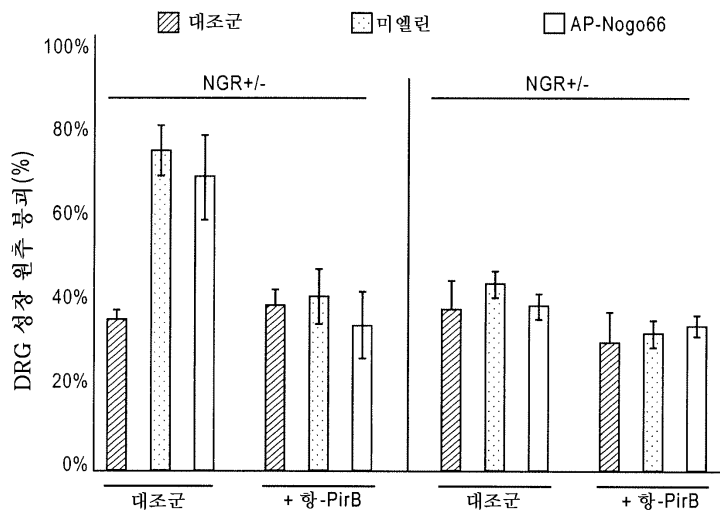
도면3d



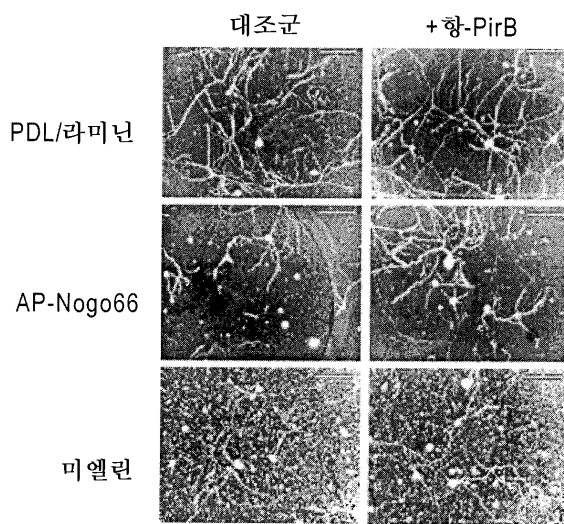
도면4a



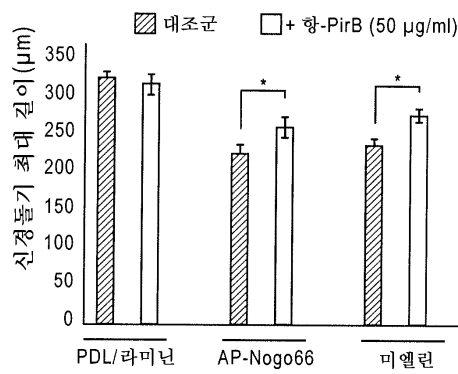
도면4b



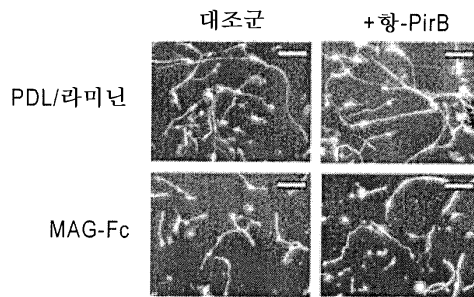
도면5a



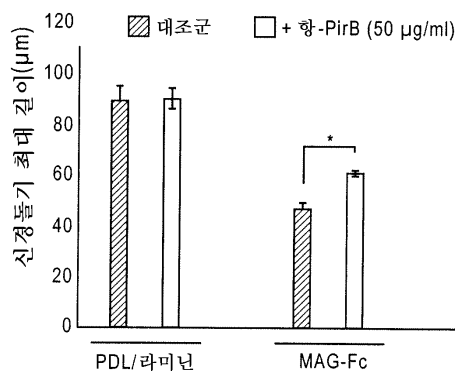
도면5b



도면5c



도면5d



도면6

YW259.2 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTACAGTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACTTCAGTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGT
GGGATTTATCCTTCTGGCGGTAACTAACTATGCCGATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAAAGCGCCT
GGCAGTTCGCTTACTGGGTCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACACACATGCCCAACCGTGGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGG
GACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACACAAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

도면7

YW259.9 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCTTCAGTAGTAACT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGT
GGGATTAATCCTACTGGCGGTTATACTTACTATGCCCATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCGTGT
GGGTGTTTCGATTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCGGCCT
CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGACAC
CTTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGC
GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGC
GTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

도면8

YW259.12 DNA:

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGCGT
ACGCTGAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGG
GGCTCACTCCGTTTGTCTGTGCAGCTTCTGGCTTACCTTCACCTAATTCCT
ATATTAGCTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGT
GGGATTTCTCCTTCTGGCGGTTCTACTTACTATGCCCATAGCGTCAAGGGC
CGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAATCGGTCTG
GGCGTTTCGCTTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCGGCCTC
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGACACC
TTCCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGC
TCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC
CTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCGACGGCCCTAGAGTCGA

도면9

YW259.2 단백질:

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGIYPSGGNTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSAWQFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면10

YW259.9 단백질:

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGINPTGGYTYAHSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARSVWVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면11

YW259.12 단백질:

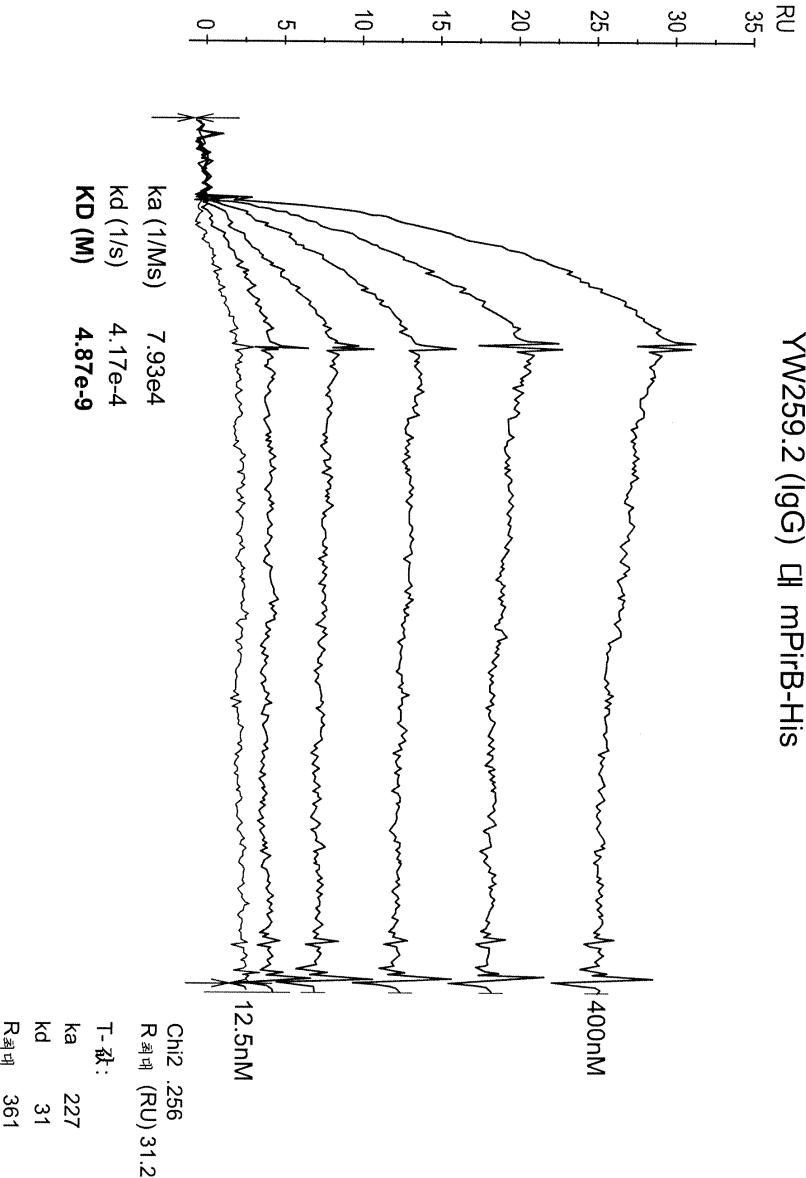
MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNSYIS
WVRQAPGKGLEWVGGISPSGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKSVWAFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면12

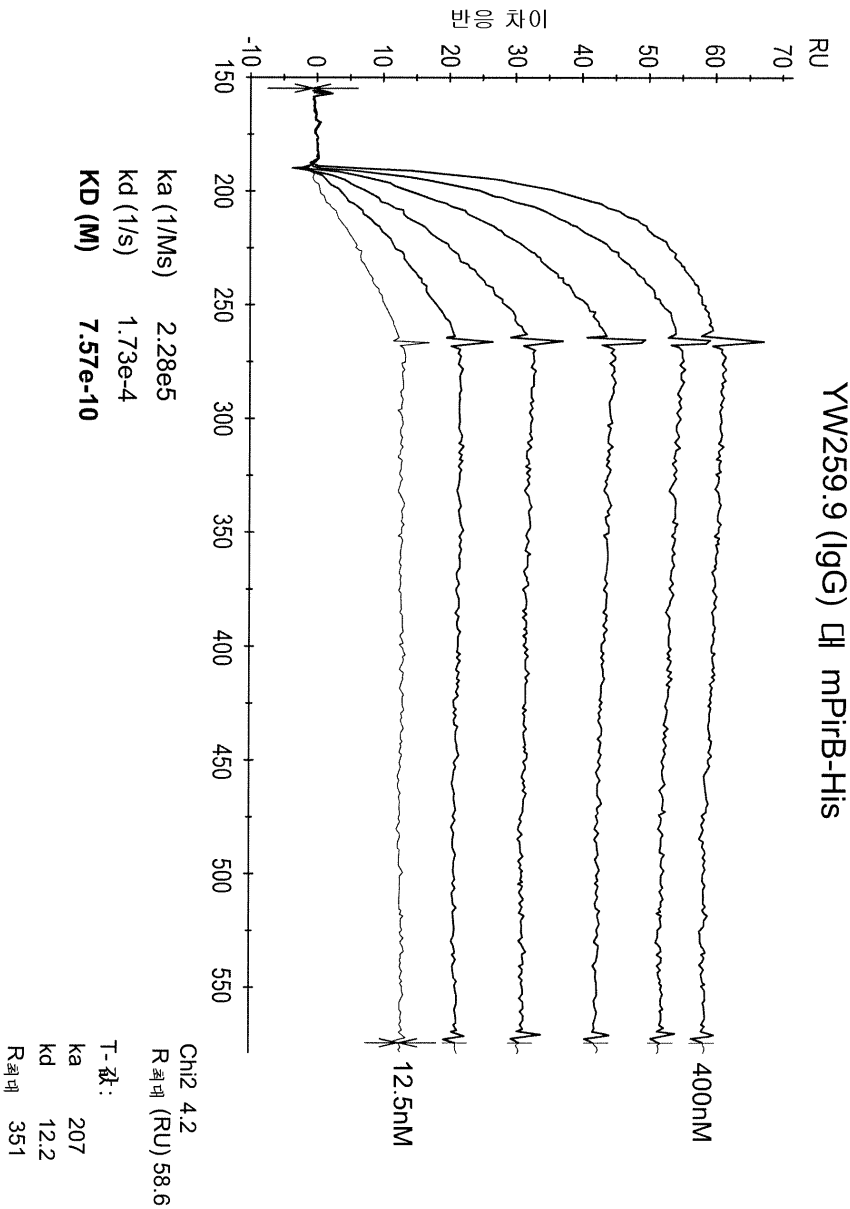
단백질 (경쇄 전체)

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW
YQQKPGKAPKLLISASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QSYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

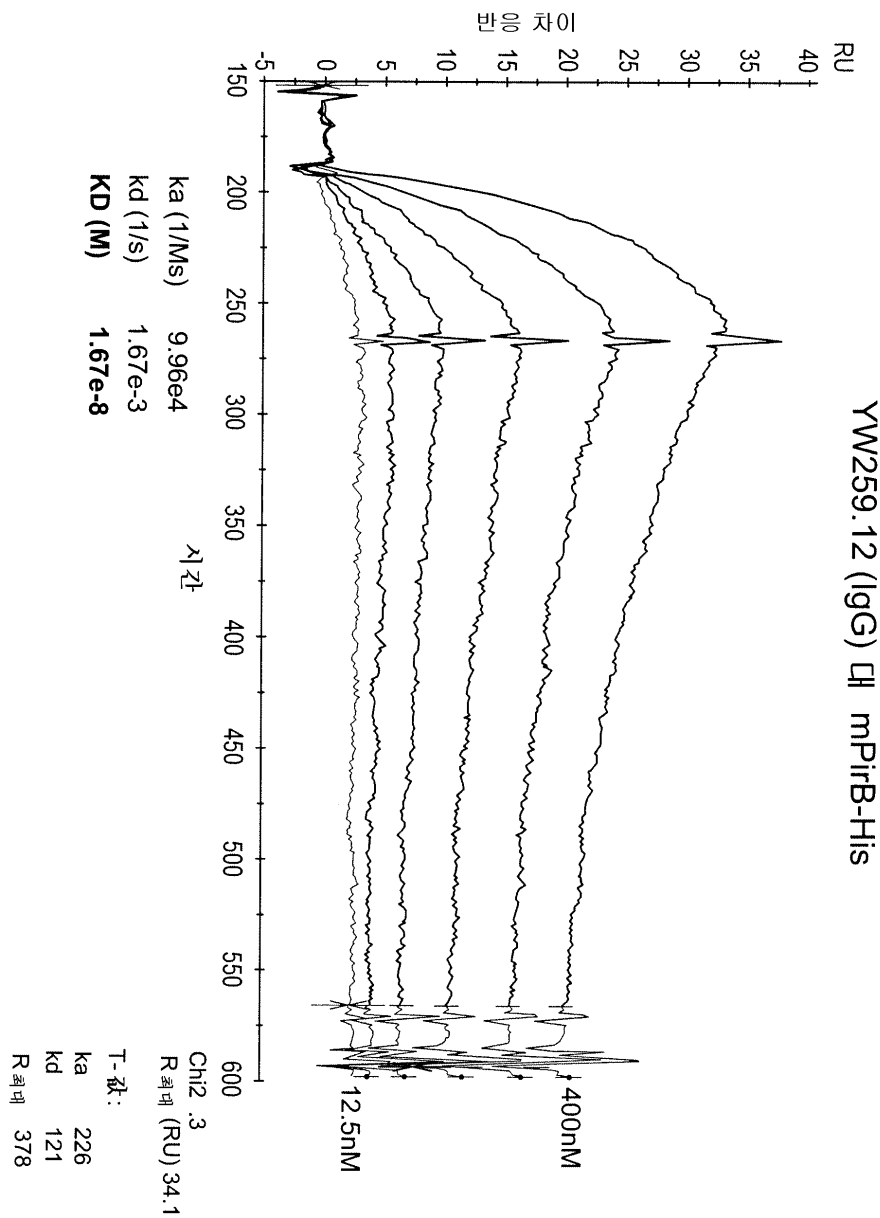
도면13



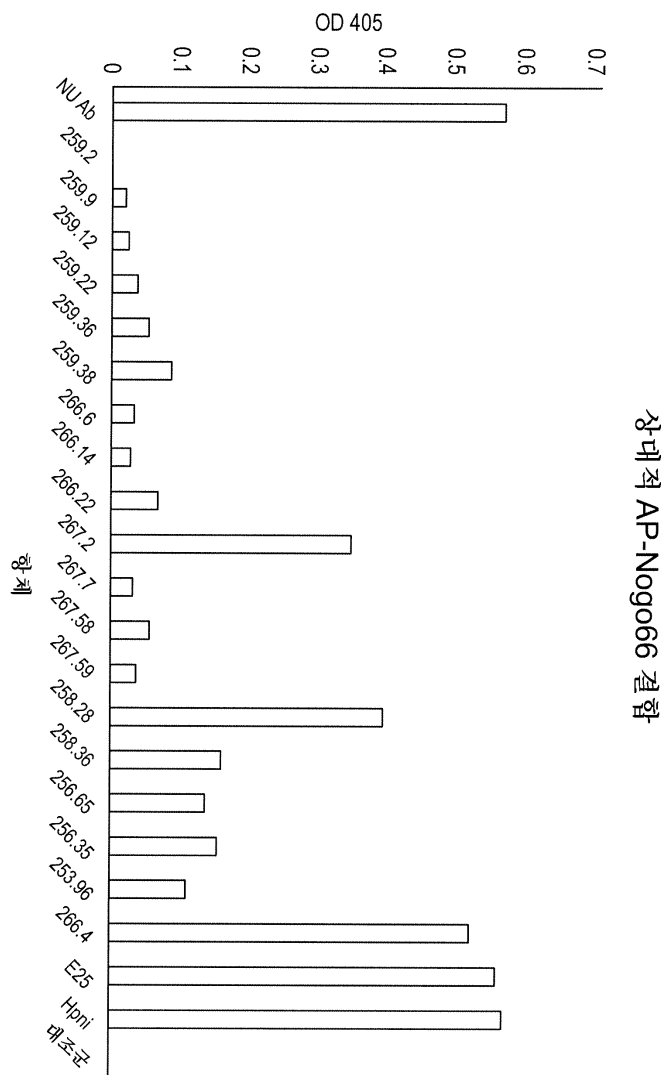
도면14



도면15



도면16



YW259/항-mPirB 중쇄 서열 정렬

카뎃 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.9	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R
YW259.12	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R

카뎃 # 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

	코티아 - CDR H1											카뎃 - CDR H1							
	코티아 - CDR H1											접촉 - CDR H1							

hum III	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q
YW259.2	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.9	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	N	Y	I	S	W	V	R	Q
YW259.12	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	T	N	S	Y	I	S	W	V	R	Q

도면17a

YW259/ 항-mPirB 중쇄 서열 정렬

카뎨 #	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58
	코티아 - CDR H2																			
	카뎨 - CDR H2																			
	절충 - CDR H2																			
hum III	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	G	I	S	G	D	G	G	S	T	Y
YW259.2	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	Y	P	S	G	G	N	T	N
YW259.9	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	N	P	T	G	G	Y	T	Y
YW259.12	A	P	G	K	G	L	E	W	V	G	G	I	S	P	S	G	G	S	T	Y
카뎨 #	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	

hum III	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.2	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.9	Y	A	H	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	
YW259.12	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	

도면17b

YW259/항-mPirB 중쇄 서열 정렬

카펫 #	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
hum III	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.2	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.9	A		L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A
YW259.12	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A

카펫 # 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G 101 102 103 104 105 106 107

카펫 - CDR H3
코터야 - CDR H3

접촉 - CDR H3

hum III	R	G														F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.2	K	S	A	W	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T
YW259.9	R	S	V	W	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T
YW259.12	K	S	V	W	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	A	Y	W	G	Q	G	T

도면17c

YW259/항-mPIIB 경쇄 서열 정렬

카펫 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
huKl	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
YW259.12	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T

카펫 #	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
카펫 - CDR L1																						
코터아 - CDR L1																						
접속-CDRL1																						
huKl	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.2	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.9	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
YW259.12	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P

YW259/항-mPirB 경쇄 서열 정렬

카펫 #	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
	카펫 - CDR L2																					
	코티아 - CDR L2																					
	접촉 - CDR L2																					
huK1	K	L	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S
YW259.2	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G
YW259.9	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G
YW259.12	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G

카펫 # 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87

huK1	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Y
YW259.2	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Y
YW259.9	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Y
YW259.12	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Y

도면18b

도면18c

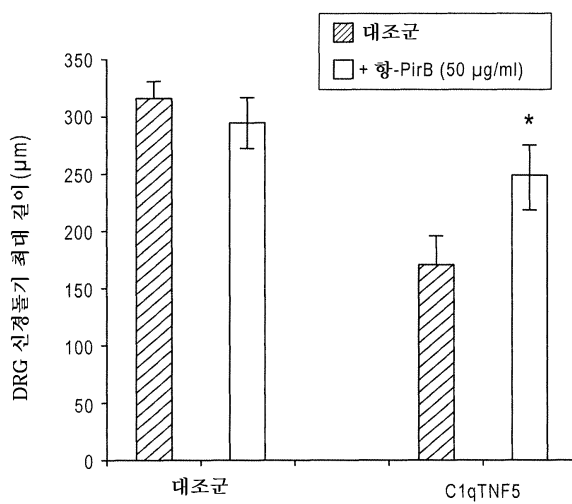
YW259/항-mPirB 경쇄 서열 정렬

카펫 #	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
					카펫 - CDR L3																
					코티아 - CDR L3																
					접촉 - CDR L3																

huK1	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.2	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.9	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW259.12	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

도면19

C1qTNF5는 후근 신경절(DRG) 뉴런의 신경돌기 성장을 억제하고, 이러한 억제는 PirB가 차단된 경우 감소된다



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

Jasvinder Atwal

Marc Tessier-Lavigne

Yan Wu

<120> ANTI-PIRB ANTIBODIES

<130> GNE-0324PCT

<140> Not yet Assigned

<141> Herewith

<150> 61/052,949

<151> 2008-05-13

<150> 12/316,130

<151> 2008-12-09

<150> 12/208,883

<151> 2008-09-11

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 841

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Met Ser Cys Thr Phe Thr Ala Leu Leu Arg Leu Gly Leu Thr Leu Ser

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

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

 130 135 140
 Glu Ser Trp His Asn Asp His Lys Phe Ile Leu Thr Val Glu Gly Pro
 145 150 155 160
 Gln Lys Leu Ser Trp Thr Gln Asp Ser Gln Tyr Asn Tyr Ser Thr Arg
 165 170 175
 Lys Tyr His Ala Leu Phe Ser Val Gly Pro Val Thr Pro Asn Gln Arg
 180 185 190
 Trp Ile Cys Arg Cys Tyr Ser Tyr Asp Arg Asn Arg Pro Tyr Val Trp

 195 200 205
 Ser Pro Pro Ser Glu Ser Val Glu Leu Leu Val Ser Gly Asn Leu Gln
 210 215 220
 Lys Pro Thr Ile Lys Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Ala Ser Lys Arg
 225 230 235 240
 Ala Met Thr Ile Trp Cys Gln Gly Asn Leu Asp Ala Glu Val Tyr Phe
 245 250 255
 Leu His Asn Glu Gly Ser Gln Lys Thr Gln Ser Thr Gln Thr Leu Gln

 260 265 270
 Gln Pro Gly Asn Lys Gly Lys Phe Phe Ile Pro Ser Met Thr Arg Gln
 275 280 285
 His Ala Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Cys Tyr Gly Ser Ala Gly Trp Ser
 290 295 300
 Gln Pro Ser Asp Thr Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ile Tyr Glu His
 305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Asn Met Thr Leu His Cys Ala Ser Asp Phe His Tyr Asp Lys Phe

340 345 350

Ile Leu Thr Lys Glu Asp Lys Lys Phe Gly Asn Ser Leu Asp Thr Glu

355 360 365

His Ile Ser Ser Ser Arg Gln Tyr Arg Ala Leu Phe Ile Ile Gly Pro

370 375 380

Thr Thr Pro Thr His Thr Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Phe Lys

385 390 395 400

Asn Ala Pro Gln Leu Trp Ser Val Pro Ser Asp Leu Gln Gln Ile Leu

405 410 415

Ile Ser Gly Leu Ser Lys Lys Pro Ser Leu Leu Thr His Gln Gly His

420 425 430

Ile Leu Asp Pro Gly Met Thr Leu Thr Leu Gln Cys Tyr Ser Asp Ile

435 440 445

Asn Tyr Asp Arg Phe Ala Leu His Lys Val Gly Gly Ala Asp Ile Met

450 455 460

Gln His Ser Ser Gln Gln Thr Asp Thr Gly Phe Ser Val Ala Asn Phe

465 470 475 480

Thr Leu Gly Tyr Val Ser Ser Ser Thr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr

485 490 495

Gly Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Trp Ser Ala Ser Ser Glu Pro Leu

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Trp Ser Met Asp Ser Val Asp Thr Phe Ile Leu Ser Lys Glu Gly Ser

545 550 555 560

Ala Gln Gln Pro Leu Arg Leu Lys Ser Lys Ser His Asp Gln Gln Ser

565 570 575
 Gln Ala Glu Phe Ser Met Ser Ala Val Thr Ser His Leu Ser Gly Thr

 580 585 590
 Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Gln Asn Ser Ser Phe Tyr Leu Leu Ser Ser
 595 600 605
 Ala Ser Ala Pro Val Glu Leu Thr Val Ser Gly Pro Ile Glu Thr Ser
 610 615 620
 Thr Pro Pro Pro Thr Met Ser Met Pro Leu Gly Gly Leu His Met Tyr
 625 630 635 640
 Leu Lys Ala Leu Ile Gly Val Ser Val Ala Phe Ile Leu Phe Leu Phe

 645 650 655
 Ile Leu Ile Phe Ile Leu Leu Arg Arg Arg His Arg Gly Lys Phe Arg
 660 665 670
 Lys Asp Val Gln Lys Glu Lys Asp Leu Gln Leu Ser Ser Gly Ala Glu
 675 680 685
 Glu Pro Ile Thr Arg Lys Gly Glu Leu Gln Lys Arg Pro Asn Pro Ala
 690 695 700
 Ala Ala Thr Gln Glu Glu Ser Leu Tyr Ala Ser Val Glu Asp Met Gln

 705 710 715 720
 Thr Glu Asp Gly Val Glu Leu Asn Ser Trp Thr Pro Pro Glu Glu Asp
 725 730 735
 Pro Gln Gly Glu Thr Tyr Ala Gln Val Lys Pro Ser Arg Leu Arg Lys
 740 745 750
 Ala Gly His Val Ser Pro Ser Val Met Ser Arg Glu Gln Leu Asn Thr
 755 760 765
 Glu Tyr Glu Gln Ala Glu Glu Gly Gln Gly Ala Asn Asn Gln Ala Ala

 770 775 780
 Glu Ser Gly Glu Ser Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu Cys Ser Arg
 785 790 795 800
 Thr Leu Arg Gln Gly Ala Ala Ala Ser Pro Leu Ser Gln Ala Gly Glu
 805 810 815

Ala Pro Glu Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ala Ala Arg Pro
820 825 830
Glu Ala Val Pro Lys Asp Val Glu Gln
835 840

<210> 2
<211> 598
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15
Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20 25 30
Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser
35 40 45
Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys
50 55 60
Lys Ser Ala Ser Trp Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn
65 70 75 80
Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr
85 90 95
Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro
100 105 110
Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala
115 120 125
Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys
130 135 140
Glu Ser Gln Val Ala Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu
145 150 155 160
Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser
165 170 175

Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp

180 185 190

Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser

195 200 205

Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu

245 250 255

Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro

260 265 270

Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg

275 280 285

Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Tyr Asn Leu Ser Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Ile His Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala

325 330 335

Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His

340 345 350

Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu

355 360 365

Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser

370 375 380

Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu

385 390 395 400

Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu

405 410 415

Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro

420 425 430
Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly

435 440 445
Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly

450 455 460
Ile Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe

465 470 475 480
Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln

485 490 495
Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro

500 505 510
Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln

515 520 525
Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp Gly

530 535 540
Val Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val

545 550 555 560
Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr Glu

565 570 575
Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr

580 585 590
Ala Thr Leu Ala Ile His

595

<210> 3

<211> 1419

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 3

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagc gtacgctgag 60

gttcagctgg tggagctctgg cggtaggcctg gtgcagccag ggggctcact ccgtttgtcc 120

tgtgcagctt ctggcttcac cttcactaat tcctatatta gctgggtgcg tcaggccccg 180

ggtaagggcc tggaatgggt tggtagggatt tctccttctg gcggttctac ttactatgcc 240

gatagcgtca agggccggtt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta 300

caaatgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaaa atcgggtctgg 360

gcgttcgctt actggggica aggaaccctg gtcaccgtct cctcggcctc caccaagggc 420

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 480

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 600

agcagcgtgg tgactgtgcc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtig agcccaaac tttgtgacaaa 720

actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840

gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 960

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgtaatg gcaaggagta caagtgaag 1020

gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080

ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aagagatgac caagaaccag 1140

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260

tccttcttcc tctacagcaa gtccaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380

ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

<210> 4

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

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

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

 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Ala Trp Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 5

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

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

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

130 135 140
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

195 200 205
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
210 215 220
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

 450 455 460
 Lys
 465

<210> 6

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Ser Val Trp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

130 135 140

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

145 150 155 160

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

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

420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

450	455	460													
Lys															
465															
<210> 7															
<211> 233															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide															
<400> 7															
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly															
1	5	10	15												
Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
20			25			30									
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val
35			40			45									
Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
50			55			60									
Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
65			70			75			80						
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
85			90			95									
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr
100			105			110									
Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr
115			120			125									
Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu
130			135			140									
Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro
145			150			155			160						
Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly
165			170			175									
Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr

180	185	190	
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His			
195	200	205	
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val			
210	215	220	
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230		
<210> 8			
<211> 1419			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide			
<400> 8			
atgggatggt catgtatcat ctttttcta gtagcaactg caactggagc gtacgtgag	60		
gttcagctgg tggagtctgg cggtagcctg gtcagccag ggggtcact ccgtttgtcc	120		
tgtgcagctt ctggcttcac cttcagtaat tcctatatta gctgggtgcg tcaggccccg	180		
ggtaagggcc tggaatgggt tggtaggatt tatccttctg gcggaatac taactatgcc	240		
gatagcgtca agggccgttt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta	300		
caaatgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaa aagcgcttg	360		
cagttcgctt actggggcca aggaacctg gtcaccgtct cctcggcctc caccaagggc	420		
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggcctg	480		
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc	540		
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtctacagt cctcaggact ctactcctc	600		
agcagcgtgg tgactgtgcc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	660		
aatcacaagc ccagcaacac caagtggtgac aagaaagttg agcccaaac ttgtgacaaa	720		
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc	780		
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg	840		
gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	900		
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg	960		
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	1020		
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1080		

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aagagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gaggctctcc 1380

 ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtga 1419
 <210> 9
 <211> 1419
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide
 <400> 9
 atgggatggt catgtatcat cttttttcta gtagcaactg caactggagc gtacgtgag 60
 gtacagctgg tggagtctgg cggtggcctg gtgcagccag ggggctcact ccgtttgtcc 120
 tgtgcagctt ctggcttcac cttcagtagt aactatatta gctgggtgcg tcaggccccg 180
 ggtaagggcc tggaatgggt tgggtgggatt aatcctactg gcggttatac ttactatgcc 240

 catagcgtca agggccgttt cactataagc gcagacacat ccaaaaacac agcctaccta 300
 caaatgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgtgcaag aagcgtgtgg 360
 gtgttcgatt actgggggtca aggaaccctg gtcaccgtct cctcggcctc caccaagggc 420
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtctggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcttacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgactgtgcc ctctagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660

 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgt agcccaaattc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc 780
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080

 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aagagatgac caagaaccag 1140

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc cctgtctgga ctccgacggc 1260
 tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatgagt gcgacggccc tagagtcga 1419

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 11

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

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

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

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 12

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

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

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

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

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

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

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 15
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide
 <400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

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

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