



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0091221
(43) 공개일자 2012년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/26 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7012677
(22) 출원일자(국제) 2010년10월15일
심사청구일자 2012년05월16일
(85) 번역문제출일자 2012년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/006329
(87) 국제공개번호 WO 2011/045080
국제공개일자 2011년04월21일
(30) 우선권주장
61/252,625 2009년10월16일 미국(US)

(71) 출원인
바이오레알리테스
프랑스 수레즈네스 세텍스 튀 드 베르둔 35 (우:
92284)
쎝뜨르 나쇼날르 드 라 르쉴르쉴 씨엥띠삐끄
프랑스 파리 세텍스 16 튀 미셸-앙쥐 3 (우:
75794)
**인쎜(인스티튜트 내셔널 드 라 썬테 에 드 라 리
세르세메디칼르)**
프랑스. 에프-75013 파리 튀 드 툴비아크 101
(72) 발명자
팰퀸, 줄리
프랑스 34200 세트 바르뷔스 앙리 13 거리
부디에, 로르
프랑스 03270 부젯 차모이루 리쥬-딧 9
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **프로가스트린에 대한 모노클로날 항체 및 이들의 용도**

(57) 요약

본 발명은 프로가스트린 모노클로날 항체, 이의 단편, 프로가스트린 모노클로날 항체를 포함하는 조성물, 및 프로가스트린 모노클로날 항체 및 이의 조성물을 제조하고 이용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 프로가스트린 모노클로날 항체 및 프로가스트린 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 포함하는 조성물로 결장직장암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 결장직장암의 진단 방법 및 결장직장암 피검체에서 항암 요법의 효능을 모니터링하는 방법을 포함하여, 추가로 프로가스트린의 검출을 포함하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

쥬베르, 도미니크

프랑스 34200 세트 페리 가브리엘 10 거리

올랑드, 프레드릭

프랑스 34790 그라벨 카프리제 9 거리

특허청구의 범위

청구항 1

인간 프로가스트린 (hPG)에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 2

제 1항에 있어서, hPG의 N-말단 영역에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 3

제 2항에 있어서, SEQ ID NO:25에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 펩티드 항원을 포함하는 면역원을 이용하여 수득될 수 있는 모노클로날 항체.

청구항 4

제 2항에 있어서, hPG와의 결합에 대해 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 및 1C11F5E8로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 참조 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체.

청구항 5

제 2항에 있어서, 서열에 있어서 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 및 1C11F5E8로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 모노클로날 항체의 V_L 및 V_H CDR에 상응하는 V_L 및 V_H CDR을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 6

제 2항에 있어서, 하기 군의 V_L 및 V_H CDR 서열 중 하나로부터 선택된 서열을 지니는 V_L 및 V_H CDR을 포함하는 모노클로날 항체:

- (i) V_H CDR1.3, V_H CDR 2.3, V_H CDR 3.3, V_L CDR 1.3, V_L CDR 2.3, 및 V_L CDR 3.3;
- (ii) V_H CDR 1.4, V_H CDR 2.4, V_H CDR 3.4, V_L CDR 1.4, V_L CDR 2.4, 및 V_L CDR 3.4;
- (iii) V_H CDR 1.16, V_H CDR 2.16, V_H CDR 3.16, V_L CDR 1.16, V_L CDR 2.16, 및 V_L CDR 3.16; 및
- (iv) V_H CDR 1.19, V_H CDR 2.19, V_H CDR 3.19, V_L CDR 1.19, V_L CDR 2.19, 및 V_L CDR 3.19.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 모노클로날 항체.

청구항 8

제 7항에 있어서, 하기 군의 V_H 및 V_L 서열 중 하나로부터 선택된 서열을 지니는 V_H 및 V_L 사슬을 포함하는 모노클로날 항체:

- (i) h V_H 3 (SEQ ID NO:21) 및 h V_L 3 (SEQ ID NO:22);
- (ii) h V_H 4 (SEQ ID NO:23) 및 h V_L 4 (SEQ ID NO:24);
- (iii) h V_H 16a (SEQ ID NO:84) 및 h V_L 16a (SEQ ID NO:85);
- (iv) h V_H 16b (SEQ ID NO:86) 및 h V_L 16b (SEQ ID NO:87);
- (v) h V_H 16c (SEQ ID NO:88) 및 h V_L 16c (SEQ ID NO:89);
- (vi) h V_H 19a (SEQ ID NO:90) 및 h V_L 19a (SEQ ID NO:91);

(vii) hV_H 196b (SEQ ID NO:92) 및 hV_L 19b (SEQ ID NO:93); 및

(viii) hV_H 19c (SEQ ID NO:94) 및 hV_L 19c (SEQ ID NO:95).

청구항 9

제 1항에 있어서, hPG의 C-말단 영역에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 10

제 9항에 있어서, SEQ ID NO:27에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 펩티드 항원을 포함하는 면역원을 이용하여 수득될 수 있는 모노클로날 항체.

청구항 11

제 9항에 있어서, hPG와의 결합에 대해 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 참조 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체.

청구항 12

제 9항에 있어서, 서열에 있어서 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 모노클로날 항체의 V_L 및 V_H CDR에 상응하는 V_L 및 V_H CDR을 포함하는 모노클로날 항체.

청구항 13

제 9항에 있어서, 하기 군의 V_H 및 V_L CDR 서열 중 하나로부터 선택된 서열을 지니는 V_H 및 V_L CDR을 포함하는 모노클로날 항체:

(i) V_H CDR 1.8, V_H CDR 2.8, V_H CDR 3.8, V_L CDR 1.8, V_L CDR 2.8, 및 V_L CDR 3.8; 및

(ii) V_H CDR 1.13, V_H CDR 2.13, V_H CDR 3.13, V_L CDR 1.13, V_L CDR 2.13, 및 V_L CDR 3.13.

청구항 14

제 9항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 모노클로날 항체.

청구항 15

제 14항에 있어서, 하기 군의 V_H 및 V_L 서열 중 하나로부터 선택된 서열을 지니는 V_H 및 V_L 사슬을 포함하는 모노클로날 항체:

(i) hV_H 8a (SEQ ID NO:75) 및 hV_L 8a (SEQ ID NO:76);

(ii) hV_H 8b (SEQ ID NO:77) 및 hV_L 8b (SEQ ID NO:78);

(iii) hV_H 8c (SEQ ID NO:79) 및 hV_L 8c (SEQ ID NO:76);

(iv) hV_H 13a (SEQ ID NO:80) 및 hV_L 13a (SEQ ID NO:81); 및

(v) hV_H 13b (SEQ ID NO:82) 및 hV_L 13b (SEQ ID NO:83).

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 친화성 범위가 약 1 pM 내지 약 7 nM인 모노클로날 항체.

청구항 17

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:28, 29, 30, 31, 및 32로 구성된 군으로부터 선택된

서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 18

제 1항, 또는 제 9항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, SEQ ID NO:33, 34, 35, 및 36으로 구성된 군으로부터 선택된 서열에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체.

청구항 19

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, hPG와의 결합에 대해 항-hPG MAb1, 항-hPG MAb2, 항-hPG MAb3, 항-hPG MAb4, 항-hPG MAb15, 항-hPG MAb16, 항-hPG MAb17, 항-hPG MAb18, 항-hPG MAb19, 및 항-hPG MAb20으로 구성된 군으로부터 선택된 참조 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체.

청구항 20

제 1항, 또는 제 9항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, hPG와의 결합에 대해 항-hPG MAb5, 항-hPG MAb6, 항-hPG MAb7, 항-hPG MAb8, 항-hPG MAb9, 항-hPG MAb10, 항-hPG MAb11, 항-hPG MAb12, 항-hPG MAb13, 항-hPG MAb14, 항-hPG MAb21, 항-hPG MAb22, 및 항-hPG MAb23으로 구성된 군으로부터 선택된 참조 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체.

청구항 21

제 1항에 있어서, LS174T 세포로 수행된 시험관내 검정에서 hPG 활성을 중화시키는 모노클로날 항체.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 모노클로날 항체 및 부형제, 담체, 및/또는 희석제를 포함하는 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서, 약학적 용도를 위해 제형화된 조성물.

청구항 24

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 가변 경쇄 (V_L)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 가변 중쇄 (V_H)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 26

제 1항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 가변 경쇄 (V_L)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 27

제 1항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 가변 중쇄 (V_H)를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 28

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체를 발현하기에 적합한 폴리뉴클레오티드의 쌍으로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 29

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 항-hPG 모노클로날 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마.

청구항 30

제 29항에 있어서, 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마.

청구항 31

제 29항에 있어서, 43B9G11, WE5H2G7, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마.

청구항 32

제 29항에 있어서, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 및 1E9A4A4로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마.

청구항 33

- (a) 제 29항의 하이브리도마를 적합한 조건하에 배양하고,
- (b) 배양 배지 또는 하이브리도마 세포로부터 항-hPG 모노클로날 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항-hPG 모노클로날 항체를 수득하는 방법.

청구항 34

결장직장암을 치료하는데 효과적인 양의 인간화 중화성 항-hPG 모노클로날 항체를 피검체에게 투여하는 것을 포함하는, 결장직장암을 치료하는 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 상기 중화성 항-hPG 모노클로날 항체가 결합에 대해 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 방법.

청구항 36

제 34항에 있어서, 상기 중화성 항-hPG 모노클로날 항체가 서열에 있어서 항-hPG MAb1, 항-hPG MAb2, 항-hPG MAb3, 항-hPG MAb4, 항-hPG MAb5, 항-hPG MAb6, 항-hPG MAb7, 항-hPG MAb8, 항-hPG MAb9, 항-hPG MAb10, 항-hPG MAb11, 항-hPG MAb12, 항-hPG MAb13, 항-hPG MAb15, 항-hPG MAb16, 항-hPG MAb17, 항-hPG MAb18, 항-hPG MAb19, 항-hPG MAb20, 항-hPG MAb21, 항-hPG MAb22, 또는 항-hPG MAb23으로 구성된 군으로부터 선택된 항-hPG 모노클로날 항체의 CDR에 상응하는 CDR을 지니는 방법.

청구항 37

결장직장 종양 세포를 중화성 항-hPG 모노클로날 항체에 노출시키는 것을 포함하는, 결장직장 종양 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 중화성 항-hPG 모노클로날 항체가 결합에 대해 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마로부터 수득할 수 있는 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 방법.

청구항 39

제 37항에 있어서, 상기 중화성 항-hPG 모노클로날 항체가 서열에 있어서 항-hPG MAb1, 항-hPG MAb2, 항-hPG MAb3, 항-hPG MAb4, 항-hPG MAb5, 항-hPG MAb6, 항-hPG MAb7, 항-hPG MAb8, 항-hPG MAb9, 항-hPG MAb10, 항-hPG MAb11, 항-hPG MAb12, 항-hPG MAb13, 항-hPG MAb15, 항-hPG MAb16, 항-hPG MAb17, 항-hPG MAb18, 항-hPG MAb19, 항-hPG MAb20, 항-hPG MAb21, 항-hPG MAb22, 또는 항-hPG MAb23으로 구성된 군으로부터 선택된 항-hPG 모노클로날 항체의 CDR에 상응하는 CDR을 지니는 방법.

청구항 40

제 37항에 있어서, 시험관내에서 수행되는 방법.

청구항 41

제 37항에 있어서, 생체내에서 수행되는 방법.

청구항 42

제 2항에 따른 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체 및 hPG의 C-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, hPG를 검출하는데 유용한 키트.

청구항 43

제 42항에 있어서, hPG의 C-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항체가 폴리클로날 항체인 키트.

청구항 44

제 9항에 따른 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 및 hPG의 N-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, hPG를 검출하는데 유용한 키트.

청구항 45

제 44항에 있어서, hPG의 N-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항체가 폴리클로날 항체인 키트.

청구항 46

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 모노클로날 항체를 이용하여 피검체로부터의 혈청 샘플 중 프로가스트린의 양을 정량하는 것을 포함하는, 피검체에서 결장직장암을 진단하는 방법으로서, 약 20 내지 400 pM 범위의 프로가스트린의 양이 결장직장암의 표시인 방법.

청구항 47

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 모노클로날 항체를 이용하여 결장직장암 환자로 부터의 혈청 샘플 중 프로가스트린의 양을 정량하는 것을 포함하는, 항-hPG 요법에 적합한 환자를 선택하는 방법으로서, 약 20 내지 400 pM 범위의 프로가스트린의 양이 항-hPG 요법에 대한 적합함의 표시인 방법.

청구항 48

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 모노클로날 항체를 이용하여 결장직장암에 대해 치료되는 피검체의 혈중 프로가스트린 수준을 시간의 함수로서 정량하는 것을 포함하는, 결장직장암 치료의 유효성을 모니터링하는 방법으로서, 피검체의 혈청 프로가스트린 수준의 시간-의존적 감소가 치료가 효과적임을 나타내는 방법.

청구항 49

hPG를 분비하는 세포를 프로가스트린-의존적 신호 전달을 억제하기에 유효한 양의 중화성 항-PG 모노클로날 항체에 노출시키는 것을 포함하는, 세포에서 프로가스트린-의존적 신호 전달 캐스케이드를 억제하는 방법.

명세서

발명의 내용

1. 관련 출원의 교차 참조

[0001]

- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2009년 10월 16일자 출원된 가특허출원 61/252,625호의 이익을 주장하며, 상기 가특허출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.
- [0003] 2. 연방 후원된 연구에 관한 언급
- [0004] 없음
- [0005] 3. 합동 연구 동의 당사자
- [0006] 없음
- [0007] 4. 서열 목록, 표 또는 컴퓨터 프로그램에 대한 언급
- [0008] 서열 목록이 동봉되어 있다.
- [0009] 5. 기술분야
- [0010] 본 기술은 특히 프로가스트린에 대한 모노클로날 항체, 조성물 및 이러한 항체를 제조하는 방법, 및 이러한 항체를, 예를 들어 결장직장암의 진단 및/또는 치료에 이용하는 방법에 관한 것이다.
- [0011] 6. 배경기술
- [0012] 결장직장암 (CRC)은 매년 백만명이 넘는 사람이 걸리고 매년 50십만 명 넘게 사망하는 공공연한 주요 건강 문제이다. CRC는 암으로 인한 사망의 두 번째 주된 원인이다. 미국에서만, 2009년에, CRC로 인해 대략 147,000건의 새로운 사례와 49,900건을 초과하는 사망이 보고되었다. 세 가지 형태의 CRC가 있다: 산발성 CRC; DNA 미스매치 복구 유전자에서 생식세포계열(germline) 돌연변이에 의해 야기된 유전 비-폴립증 결장암 (HNPCC); 및 APC 유전자에서 생식세포계열 돌연변이로 인한 가족성 샘종 폴립증(FAP). 산발성 CRC가 사례의 거의 85%를 차지하는 한편, HNPCC는 약 5% 및 FAP는 약 1%를 차지한다 (Heyer *et al.*, 1999, *Oncogene* 18:5325-5333).
- [0013] CRC의 임상적 관리는 전형적으로 종종 화학요법을 병용하는 수술적 절제를 포함한다. 현재, CRC 환자의 약 50%가 진단받은 지 5년 내에 사망한다. 신뢰할 만한 스크리닝 시험의 부족 및 현재 이용가능한 요법의 비유효성은 높은 사망률의 주요 원인이다. CRC를 진단하기 위한 새로운 임상적 접근법 뿐만 아니라 다른 건강관리 조직에 최소의 부작용을 지니는 결장직장암 증양에 대한 효과적인 치료가 시급한 상황이다.
- [0014] 7. 개요
- [0015] 본 발명은 인간을 포함하는 동물에서 결장직장암(CRC)를 진단하고/거나 치료하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 출원에 기재된 다양한 발명은, CRC 증양 세포에 의해 생산된 폴리펩티드인 프로가스트린 (PG), 예를 들어 인간 프로가스트린 (hPG)에 특이적으로 결합하고 CRC의 시험관내 모델에서 항증식 성질을 나타내는 모노클로날 항체의 발견에 부분적으로 기반한다.
- [0016] 프로가스트린은 결장직장 증양 세포에 의해 생산되고, 세포 사멸을 초래하는 과정을 포함하는, 세포의 정상적인 분화 과정을 차단하는 신호 전달 경로를 촉발함에 의해 이러한 세포의 증식을 자극하는 것으로 여겨진다. 프로가스트린을 엔코딩하는 가스트린 유전자 전사체의 고갈은 시험관내 및 생체내 CRC 모델에서 증양 세포의 프로그래밍된 세포 사멸 및 세포 분화를 유도하며, 세포 증양 증식을 감소시킨다. 어떠한 작동 이론에 구속 시키고자 하는 것은 아니지만, PG의 결합을 통해, 항-hPG 항체가 그 신호전달 파트너(들)와 상호작용하는 능력을 차단하거나 억제하는 것으로 여겨진다. 이것은, 다시, 그렇지 않을 경우 증식될 결장직장 증양 세포의 신호 전달 경로를 억제한다.
- [0017] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 PG, 예를 들어 hPG에 특이적으로 결합하나, 가스트린 유전자의 다른 생성물에는 결합하지 않는 모노클로날 항체를 제공한다. 도 1을 참조하면, 가스트린 유전자는 프리-가스트린이라 불리는 101개-아미노산 폴리펩티드로 번역되는데, 프리-가스트린은 절단되어 80개-아미노산 폴리펩티드인 프로가스트린을 생성하는 신호 서열 (밀줄침)을 함유한다. 프로가스트린은, 다시, 절단되어 프로가스트린의 잔기 38 내지 71에 상응하는 34개-아미노산 생성물을 발생시키며, 이것은 그 후에 글리신 잔기를 지니는 이의 카르복시 말단에서 연장되어 글리신-연장 G34 ("G34-Gly")를 발생시킨다. 이러한 절단의 부산물은 프로가스트린의 잔기 75 내지 80을 포함하는, C-말단 플렉킹 펩티드, 또는 CTFP라 불리는 5개-아미노산 펩티드이다. G34-Gly은 그 후 추가로 절단되어 서열에 있어서 프로가스트린의 잔기 55 내지 71에 상응하고 G17-Gly라고 불리는 17개 잔기의 폴리펩티드를 생성한다. G34-Gly 및 G17-Gly의 C-말단 글리신의 제거에 이은 C-말단 아미드화에 의해 G34 및 G17을 각각 생성하는데, 둘 모두는 C-말단 아미드화된다. 따라서, 프로가스트린의 처음

37개 잔기는 프로가스트린에 유일하고 (즉, G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, 또는 CFTP와 같은 이의 가공 생성물에는 존재하지 않음), 잔기 38 내지 80은 가스트린 유전자의 번역후 생성물에도 존재한다.

[0018] 본 출원인은, 항-PG 모노클로날 항체가 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 생성될 수 있으나, 항원의 선택이 중요하다는 것을 발견하였다. hPG로부터 유래된 모든 항원이 생리적 조건하에 hPG에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 생산을 자극하는 것은 아니다. 하기 기술된 대로, hPG에 대한 폴리클로날 항체를 생성하는데 사용된 다양한 항원, 예컨대 전장 재조합 인간 프로가스트린 (예컨대 Singh WO 08/076454호 참조) 및 hPG의 C-말단 끝에서 마지막 10개의 아미노산에 상응하는 펩티드 (예컨대 Hollande WO 07/135542호 참조)는 항-hPG 모노클로날 항체를 생성하지 못하였다. 그러나, 본 출원인은 hPG에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생성하는데 사용될 수 있는 hPG 서열 내에서 항원성 N- 및 C-말단 서열을 발견하였다. 매우 놀랍게도, 본 출원인은 PG에는 특이적으로 결합하지만 다른 가스트린 유전자 유래 생성물에는 결합하지 않는 모노클로날 항체를 획득하기 위해 항원 서열을 이것에 유일한 PG 서열의 스트레치(stretch)로 한정할 필요할 없다는 것을 발견하였다. 가스트린 유전자의 다른 생성물과 공통인 서열을 지니는 펩티드 항원, 예를 들어 G17, G34, 및 CFTP는 hPG에 결합할 뿐만 아니라 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 생성하였다.

[0019] 본 출원인은 hPG 분자의 상이한 영역에서 유래된 항원을 이용하여 모노클로날 항체를 생성하였다. hPG의 N-말단 영역에 상응하는 서열을 지니는 펩티드 항원을 이용하여 획득될 수 있고/거나 hPG의 N-말단 영역에 결합하는 모노클로날 항-PG 항체를 본원에서 "N-말단 항-hPG 모노클로날 항체"라고 지칭한다. N-말단 항-PG 모노클로날 항체를 획득하는데 유용한 면역원을 작제하기 위해 이용될 수 있는 특수한 예시적인 항원성 영역은 hPG의 잔기 1 내지 14에 상응한다: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO:25). N-말단 항-PG 모노클로날 항체를 획득하는데 유용한 이러한 항원을 포함하는 예시적인 면역원이 표 1A 및 실시예 섹션에 기재되어 있다.

[0020] hPG의 C-말단 영역에 상응하는 서열을 지니는 펩티드 항원을 이용하여 획득될 수 있고/거나 hPG의 C-말단 영역에 결합하는 모노클로날 항-PG 항체를 본원에서 "C-말단 항-hPG 모노클로날 항체"라고 지칭한다. C-말단 항-PG 모노클로날 항체를 획득하는데 유용한 면역원을 작제하기 위해 이용될 수 있는 특수한 예시적인 항원성 영역은 hPG의 잔기 55 내지 80에 상응한다: QGPWLEEEEEAYGWMDFG RRS AEDEN (SEQ ID NO:27). C-말단 항-PG 모노클로날 항체를 획득하는데 유용한 이러한 항원을 포함하는 예시적인 면역원이 표 1B 및 실시예 섹션에 기재되어 있다.

[0021] 몇몇 용도를 위해, hPG에 대해 높은 친화성을 갖는 항-hPG 모노클로날 항체를 갖는 것이 바람직하다. 치료적 용도와 같은 특정 용도를 위해, 항체가 더 큰 친화성을 지닐 수 있으나, 적어도 약 100 nM의 친화성이 바람직하고, 예를 들어 적어도 약 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM, 또는 심지어 그 초과 친화성이 바람직할 수 있다. 본원에 기재된 여러 특수한 예시적인 항-PG 모노클로날 항체가 10^{-6} 내지 10^{-12} M 범위의 친화성을 나타낸다 (표 6 참조). 특히 요망되는 적용에 특히 적합한 친화성을 갖는 항-PG 모노클로날 항체를 이들 중에서 용이하게 선택할 수 있거나, 다양한 면역원, 상보성 결정 영역 (CDR) 서열, 가변 중쇄 V_H 및 가변 경쇄 V_L 서열 및 본원에 기재된 방법을 이용하여 생성하거나 고안할 수 있다. 임의의 특정 항-PG 모노클로날 항체의 친화성은, 예를 들어 ELISA, 등온 적정 열량측정법 (ITC), BIAcore, 또는 형광 분극 검정과 같은 당 분야에 널리 공지되거나 본원에 기재된 기술을 이용하여 측정될 수 있다.

[0022] hPG는 비교적 소형 폴리펩티드이고, 단지 80개 아미노산의 길이이다. 비교적 높은 친화성 (예컨대, 적어도 약 10 nM)으로 hPG에 특이적으로 결합하는 어떠한 모노클로날 항체는 이의 신호전달 파트너(들)와 상호작용하는 PG의 능력을 방해하여, 결과적으로 CRC 세포의 증식을 억제할 것으로 예상되었을 것이다. 그러나, 본 출원인은 모든 항-PG 모노클로날 항체가 중화성은 아니라는 것을 발견하였다 (즉, PG에 결합하는 모든 모노클로날 항체가 이의 생물학적 신호전달 활성을 방해하거나 억제하는 것은 아님). 실제로, 실시예 섹션에서 보다 상세하게 논의되는 대로, 본 출원인은 일부 항-PG 모노클로날 항체가, PG에 대한 높은 특이성 및 높은 친화성을 나타냄에도 불구하고, PG를 중화시키지 않는 것을 발견하였다. 예를 들어, 항-hPG MAb14는 하기 실시예 섹션에서 상세히 설명된 대로 hPG에 약 6 pM의 K_D 로 결합하지만 시험관내에서 CRC 세포의 성장을 억제하지 않는다. hPG에 특이적으로 결합하는 비-중화성 모노클로날 항체가 진단 용도로 유용하지만, PG를 중화시키는 그러한 항-hPG 모노클로날 항체는 CRC를 치료하는 치료적 적용에 특히 적합하다.

[0023] 본원에서 사용된 "중화성 항-hPG 모노클로날 항체"는 비특이적 모노클로날 항체로 처리한 대조군 샘플에 비해 항-hPG 모노클로날 항체로 처리한 시험 샘플에서 살아 있는 CRC 세포의 수를 통계적으로 유의하게 감소시키는 항-hPG 모노클로날 항체이다. hPG를 중화시키는 임의의 특정 항-hPG 모노클로날 항체의 능력을 평가하는 특

수한 검정은 하기 상세한 설명 섹션에 기재되어 있다. 상기 검정에서 살아 있는 세포의 수에 있어서 적어도 약 50%의 감소를 나타내는 그러한 항-hPG 모노클로날 항체가 CRC를 치료하는데 특히 유용한 것으로 여겨지나, 더 낮은 수준의 중화 활성, 예를 들어 상기 검정에서 살아 있는 세포의 수에 있어서 40%, 30%, 20%, 15%, 또는 심지어 10%의 통계적으로 유의한 감소를 나타내는 항-hPG 모노클로날 항체도 치료적 이익을 제공할 것으로 예상된다.

[0024] 따라서, 일부 구체예에서, 항-PG 모노클로날 항체는 중화성 항-PG 모노클로날 항체이다. PG를 중화시키는 항-PG 모노클로날 항체의 능력은 에피토프 의존적이지 않다는 것이 발견되었다. 실시예 섹션에서 예시된 대로, N-말단 및 C-말단 항-PG 항체 둘 모두가 중화 활성을 지닌다. 따라서, 일부 구체예에서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 N-말단 중화성 항체이고, 다른 구체예에서, 항-PG 모노클로날 항체는 C-말단 중화성 항체이다.

[0025] 에피토프 맵핑(mapping)은, 심지어 동일한 면역원에 대해 생성될 때에도, N-말단 항-PG 모노클로날 항체가 모두 동일한 에피토프에 결합하는 것은 아님을 나타낸다. 이것은 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체에도 적용된다. 알려진 스캐닝 및 SPOT 기술을 통해 확인된 대로, 예시적인 N-말단 및 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체에 의해 결합된 에피토프가 실시예 섹션, 표 8과 9에 제공된다.

[0026] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 N-말단 부분에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합한다. 특수한 구체예에서, N-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 잔기 10 내지 14 (SEQ ID NO:28), hPG의 잔기 9 내지 14 (SEQ ID NO:29), hPG의 잔기 4 내지 10 (SEQ ID NO:30), hPG의 잔기 2 내지 10 (SEQ ID NO:31), 또는 hPG의 잔기 2 내지 14 (SEQ ID NO:32)를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0027] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 C-말단 영역의 부분에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합한다. 특수한 구체예에서, C-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 잔기 71 내지 74 (SEQ ID NO:33), hPG의 잔기 69 내지 73 (SEQ ID NO:34), hPG의 잔기 76 내지 80 (SEQ ID NO:35), 또는 hPG의 잔기 67 내지 74 (SEQ ID NO:36)를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0028] 대략 동일한 에피토프에 결합하는 항-hPG 모노클로날 항체의 상응하는 CDR 및/또는 V_H and V_L 사슬은 상호교환되어 새로운 항-hPG 모노클로날 항체를 생성할 수 있었을 것으로 예상된다. 예를 들어, 표 9에 지시된 대로, 예시적인 항-hPG 모노클로날 항체 MAb 5 및 MAb 6은 동일한 에피토프에 결합한다. 항-hPG 모노클로날 항체는 그 V_L 사슬에 이러한 두 개 항체의 V_L CDR들의 다양한 조합, 및/또는 그 V_H 사슬에 이러한 두 개 항체의 V_H CDR들의 다양한 조합을 포함하도록 고안될 수 있다. 특수한 예로서, 가능한 다양한 조합을 설명하기 위해, 그러한 항체는 그 V_L 사슬에, MAb 5의 CDR 1 및 2 (각각 V_L CDR1.5 및 V_L CDR2.5)과 MAb 6의 CDR3 (V_L CDR3.6), 및 그 V_H 사슬에, MAb 6의 CDR1 (V_H CDR1.6) 및 MAb 5의 CDR 2 및 3 (각각 V_H CDR2.5 및 V_H CDR3.5)을 포함할 수 있었다.

[0029] hPG에 대해 높은 특이성 및 친화성을 지니고 시험관내 검정에서 양호한 항종양 활성을 나타내는 여러 항-hPG 모노클로날 항체가 확인되었고, 일부 예에서, 인간화 버전에 대한 이들의 CDR의 서열, 이들의 V_H 및 V_L 사슬의 서열, 및/또는 제안된 V_H 및 V_L 사슬의 서열이 결정되었다. 또한 여러 하이브리도마가 기탁되었다. 이러한 예시적인 항-hPG 모노클로날 항체 모두 뿐만 아니라, 본원에 기재된 다양한 키트 및 방법에 유용한 항-hPG 모노클로날 항체의 그 밖의 특수한 구체예, 예를 들어 PG와의 결합에 대해 참조 항체와 경쟁하는 모노클로날 항체가 상세한 설명 섹션에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0030] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG와의 결합에 대해 참조 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 항체를 포함한다. 참조 항-hPG 모노클로날 항체는 본원에 기재된 항-hPG 모노클로날 항체 중 어느 것일 수 있다. 비제한적인 예는 본원에 기재된 세 개의 V_L CDR과 세 개의 V_H CDR을 포함하는 항체; 본원에 개시된 아미노산 서열을 지니는 V_H 사슬 및 V_L 사슬을 포함하는 항체; 본원에 개시된 인간화 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체; 본원에 기재된 하이브리도마 중 어느 하나에 의해 생산된 항체; 본원에 기재된 hPG 내에 있는 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0031] 본원에 기재된 항-PG 모노클로날 항체는 전장 항체, 다중 사슬 또는 단일 사슬 항체, PG에 선택적으로 결합하는 그러한 항체의 단편 (Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, 및 scFv를 포함하는 이로 제한되지 않음), 서로바디 (surrobody) (대리(surrogate) 경쇄 작제물 포함), 단일 도메인 항체, 인간화 항체, 카멜화(camelized) 항체 등의 형태일 수 있다. 이들은 또한, 예를 들어, IgA (예컨대, IgA1 또는 IgA2), IgD, IgE, IgG (예컨대,

IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), 또는 IgM을 포함하는 임의의 아이소형(isotype)일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-PG 항체는 IgG (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)이다.

[0032] 항-PG 모노클로날 항체는 인간 또는 비-인간 기원일 수 있다. 비-인간 기원의 항-PG 항체의 예는 포유동물 기원 (예컨대, 유인원, 설치류, 염소, 및 토끼)의 것들을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 인간에서의 치료 용도를 위한 항-PG 모노클로날 항체는 인간화되는 것이 바람직하다.

[0033] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-PG 모노클로날 항체를 생산하는데 이용될 수 있는 핵산을 제공한다. 본원에 기재된 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 엔코딩하는 핵산, 및 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 추가로, 상기 벡터로 형질전환된 원핵 및 진핵 숙주 세포가 본원에 제공될 뿐만 아니라, 항-hPG 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄 폴리펩티드를 발현하도록 공학처리된 진핵, 예컨대 포유동물, 숙주 세포가 제공된다. 또한, 경쇄 및 중쇄 둘 모두를 발현시킬 수 있고 본원에 기재된 모노클로날 항체를 숙주 세포가 배양되는 배지로 분비할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 일부 구체예에서, 숙주 세포는 하이브리도마이다. 숙주 세포를 배양함에 의해 항-hPG 모노클로날 항체를 생산하는 방법이 또한 제공된다.

[0034] 중화성 항-PG 모노클로날 항체, 예컨대 항-hPG 모노클로날 항체는 PG에 결합하고 PG-의존적 신호전달을 차단하여, CRC 종양 세포에서 PG-유도된 반응을 억제시킨다. 따라서, 세포 분화의 억제, 세포 사멸의 억제, 및/또는 세포 증식의 자극을 포함하는, CRC 세포의 PG-유도된 반응을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 일반적으로, 상기 방법은 CRC 세포를, CRC 세포의 하나 이상의 PG-유도된 반응을 억제하기에 효과적인 양의 중화성 항-PG 모노클로날 항체와 접촉시키거나, 세포 집단을 이러한 항체에 노출시키는 것을 포함한다. 상기 방법은 중화성 항-hPG 모노클로날 항체를, 세포 배양액이거나 종양일 수 있는, CRC 세포를 함유하는 환경에 투여함에 의해, 시험관내 또는 생체내에서 수행될 수 있다.

[0035] 본원에 기재된 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 CRC 종양 세포의 PG-의존적 증식을 억제하는데, 이러한 억제 능으로 인해 상기 항체는 결장직장암의 치료에 유용한 치료제이다. 따라서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체를 포함하는 약학적 조성물 및 CRC를 치료하기 위해 중화성 항-PG 모노클로날 항체 및/또는 약학적 조성물을 이용하는 방법이 또한 제공된다. 약학적 조성물은, 예컨대, 비경구, 피하 또는 정맥내 주입을 포함하는 어떠한 편리한 경로의 투여를 위해 제형화될 수 있고, 전형적으로 중화성 항-hPG 모노클로날 항체, 및 요망되는 투여 방식에 적합한 하나 이상의 허용되는 담체, 부형제, 및/또는 희석제를 포함하며, 상세한 설명 섹션에 추가로 기재되는 바와 같은 그 밖의 임의의 성분들을 포함할 수 있다. 치료 용도를 위해, 조성물은 사용 용이성을 위해 유닛 용량 형태로 패키징될 수 있다.

[0036] 치료 방법은 일반적으로, 치료가 필요한 피검체에게, 예를 들어 CRC로 진단된 피검체에게 치료적 이익을 제공하기에 효과적인 양의 중화성 항-PG 모노클로날 항체 및/또는 이의 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 하기에 보다 상세하게 설명되는 치료 이익은 CRC의 어떠한 개선, 예를 들어 CRC 진행의 지연 또는 정지, CRC 중증도의 감소, CRC 종양의 성장 또는 CRC 세포의 증식 억제, CRC 종양의 크기 감소, 및/또는 CRC 환자에서 PG 혈청 수준의 감소를 포함한다. 피검체는 사육 동물 (예컨대, 고양이, 개, 소, 돼지, 말) 또는 비-사육 동물을 포함하는 비-인간 또는 인간일 수 있다. 바람직하게는, 항-PG 모노클로날 항체는 치료하려는 종의 PG에 특이적이다. 예를 들어, 항-hPG 항체를 인간 환자에게 투여하고, 항-개 PG 항체를 개 환자에게 투여하는 등이다. 항-hPG 모노클로날 항체 요법이 유용한 피검체는 어떠한 질환 진행 단계에 있는 환자 (예컨대, CRC 단계 0, I, II, III, 또는 IV), CRC 치료를 받았던 환자 (예컨대, 화학요법, 방사선 치료, 수술적 절제) 또는 CRC에 대한 다른 치료를 받고 있는 환자일 수 있다.

[0037] 본원에 기재된 항-PG 모노클로날 항체를 이용한 치료는 그 밖의 요법과 함께 또는 보조적으로 수행될 수 있다. CRC에 대한 그 밖의 요법의 비제한적인 예는 본원에 기재된 대로, 화학요법 치료, 방사선 치료, 수술적 절제, 및 항체 요법을 포함한다. 특수한 예에서, 항-hPG 모노클로날 항체를 화학요법제와 함께 투여한다. 또 다른 특수한 예에서, 항-hPG 모노클로날 항체를 수술적 절제에 보조하여 투여한다. 또한 항-PG 모노클로날 항체는 또 다른 치료와 함께 이용될 수 있다.

[0038] CRC 종양을 지니는 개체는 종종 상승된 수준의 순환 PG (예컨대, 혈청 또는 혈장 중)를 지닌다. 따라서, 항-hPG 모노클로날 항체를 이용하여 CRC를 진단할 목적으로 PG 수준을 검출할 수 있다. 추가로, 이미 CRC로 진단된 환자에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 항-PG 치료를 받기에 적합한 피검체를 선택하거나, 치료 효능을 모니터링하는데 이용될 수 있다. 본원에서 기재된 대로, 피검체의 결장직장암을 진단하는 방법은, 피검체의 샘플, 예를 들어 혈액 샘플 또는 혈청 샘플 중 프로가스트린의 양이, 본 발명에 따른 항-hPG 모노클로날 항체

를 이용하여 측정하는 경우, 역치 수준 이상인지를 측정하는 것을 포함한다. 특수한 구체예에서, 역치 수준은 50 pM이다. 일부 구체예에서, 두 개의 항-PG 항체를 이용하는데, 하나는 PG의 C-말단 영역을 인지하고 다른 하나는 PG의 N-말단 영역을 인지한다. 이러한 구체예에서, N-말단 또는 C-말단 항체 중 하나 또는 둘 모두는 본원에 기재된 항-PG 모노클로날 항체이다. 바람직하게는, N-말단 및 C-말단 항-PG 모노클로날 항체를 이용한다. 항체는 중화성일 수 있으나, 중화성일 필요는 없다.

[0039] 치료 효능을 모니터링할 목적으로, 상이한 시점에 취해진 샘플 중 PG의 양을 비교함에 의해, CRC에 대해 치료되었거나 치료 중인 피검체로부터의 샘플에서 프로가스트린의 수준이 시간 경과에 따라 감소하는지를 측정하기 위해 항-PG 모노클로날 항체를 이용할 수 있다. 전문한 문단에 기재된 항-PG 항체의 특수한 구체예가 또한 이러한 검정에 이용될 수 있다.

[0040] 또한 본원에 기재된 다양한 진단, 모니터링 및 그 밖의 방법을 수행하는데 적합한 키트가 제공된다. 상기 키트는 전형적으로 본원에 기재된 항-PG 모노클로날 항체 및 임의로 추가의 항-PG 항체 및/또는 특수한 검정을 수행하기에 적합한 시약을 포함할 것이다. 일부 구체예에서, 키트에 포함된 하나 이상의 항-PG 항체는 검출 가능한 표지, 예를 들어 플루오로포어로 표지될 수 있다. 특수한 구체예에서, 키트는 PG의 N-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항-PG 항체, PG의 C-말단 영역에 특이적으로 결합하는 항-PG 항체 및 임의로 진단 검정을 수행하기에 적합한 시약을 포함하고, 여기서 N-말단 특이적 항체는 본원에 기재된 N-말단 항-PG 모노클로날 항체이고/거나 C-말단 특이적 항체는 본원에 기재된 C-말단 항-PG 모노클로날 항체이다.

[0041] 본원에 기재된 다양한 발명의 특징 및 이점이 하기 예시적인 구체예의 상세한 설명으로부터 더욱 자명해질 것이다.

[0042] 8. 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 프리-프로가스트린, 프로가스트린 및 G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, 및 C-말단 플랭킹 펩티드, CTFP를 포함하는 프로가스트린 가공 생성물의 아미노산 서열을 제공한다.

[0044] 도 2는 예시적인 무린 항-hPG 모노클로날 항체의 폴리펩티드, 및 상응하는 폴리뉴클레오티드, V_H 및 V_L 사슬의 서열을 제공하며: 항-hPG MAb 3 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 16, 12, 17 및 13) (도 2a, 2b), 항-hPG MAb 4 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 18, 14, 19 및 15) (도 2c, 2d), 항-hPG MAb 8 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 67, 59, 71 및 63) (도 2e, 2f), 항-hPG MAb 13 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 68, 60, 72 및 64) (도 2g, 2h), 항-hPG MAb 16 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 69, 61, 73 및 65) (도 2i, 2j), 및 항-hPG MAb 19 (기재된 순서로, 각각 SEQ ID NO 70, 62, 74 및 66) (도 2k, 2l), 여기서 각각의 사슬의 세 개의 CDR을 밑줄로 표시한다.

[0045] 도 3a-c는 예시적인 무린 항-hPG 모노클로날 항체, MAb 1-4 (도 3a); MAb 5-14 및 20-23 (도 3b); 및 MAb 3 및 15-19 (도 3c)의 증가된 항체 농도에서 (μg/mL)상대 결합 친화성 (492 nm에서의 흡광도로서 측정됨)을 설명하는 그래프를 제공한다.

[0046] 도 4는 소 혈청 알부민 (임의 유닛)의 대조군 샘플에 비해 네 개의 상이한 예시적인 무린 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 280 nm 및 330 nm에서의 흡광도의 비 (광학 밀도)를 설명하는 그래프를 제공한다.

[0047] 도 5a-c는 완충제 단독 (네거티브 대조군), 250 ng KLH (네거티브 대조군), 및 지시된 가스트린 유전자 유래 펩티드 (50 및 250 ng의 CTFP, G17, 또는 G17-Gly (도면에서 "G-Gly"로서 지칭됨))에 비해 23개의 상이한 예시적인 무린 항-hPG 모노클로날 항체의 25 또는 50 ng의 hPG에 대한 결합을 설명하는 그래프를 제공한다. 도 5a는 항-hPG MAb 1-4의 결합을 도시하고, 도 5b는 항-hPG MAb 5-14 및 21-23의 결합을 도시하며, 도 5c는 항-hPG MAb 3 및 15-20의 결합을 도시한다.

[0048] 도 6은 증가된 농도의 항-hPG MAb3에서 폴리클로날 N-말단 항-hPG 항체의 hPG에 대한 결합을 설명하는 그래프를 제공한다.

[0049] 도 7은 하기와 같은 항-hPG 모노클로날 항체로 처리된 대표적인 CRC 세포주의 증식을 설명하는 그래프를 제공한다: 지시된 대로, 예시적인 항-hPG 모노클로날 항체 MAb 3 및 MAb 4로 처리되거나 (처리 끝에 항체를 이용한 처리 시작 시에 (T₀) 비해 살아 있는 세포 수의 변화를 나타내는 각각 도 7a, 7b, 7c), 항-hPG 폴리클로날 항체로 처리된 SW480, HCT-116, LS174T (처리 끝에 항체를 이용한 처리 시작 시에 (T₀) 비해 살아 있는 세포 수의 변화를 나타내는 각각 도 7d, 7e, 7f); 항-hPG MAb 5 내지 MAb 23으로 처리된 CRC 세포주 SW620의 증식 (처리 끝에 처리 시작 시에 (T₀) 비해 대조군 항체-처리된 세포 수의 백분율로서 살아 있는 항-hPG-처리된 세

포를 나타내는 도 7g); 항-hPG MAb 8, 13, 14, 16, 및 19로 처리된 LS174T 세포의 증식 (처리 끝에 처리 시작 시에 (T0) 비해 대조군 항체-처리된 세포 수의 백분율로서 살아 있는 항-hPG-처리된 세포를 나타내는 도 7h); 및 항-hPG 모노클로날 항체 MAb 8, 13, 14, 16, 19로 처리된 HCT-116 세포의 증식 (처리 끝에 처리 시작 시에 (T0) 비해 대조군 항체-처리된 세포 수의 백분율로서 살아 있는 항-hPG-처리된 세포를 나타내는 도 7i).

[0050] 도 8은 대조군 모노클로날 항체, 항-hPG MAb 8 (5 μ g/mL), hPG와 미리-인큐베이션된 항-hPG MAb 8, hPG와 미리-인큐베이션된 대조군 항체, 또는 hPG 단독으로 4번 처리한 지 48시간 후에 살아 있는 LS174T 세포 수를 설명하는 그래프를 제공한다.

[0051] 도 9는 대조군 폴리클로날 항체에 비해 항-hPG 항체로 처리한 마우스에서 마우스 당 종양의 수 (도 9a) 및 평균 종양 길이 및 높이 (도 9b)를 설명하는 그래프를 제공한다.

[0052] 9. 예시적인 구체예의 상세한 설명

[0053] 9.1. 상세한 설명

[0054] 프로가스트린 (PG)은 위산 분비를 자극하는 창자 펩티드 호르몬인 가스트린에 대한 전구체로서 처음 확인되었다. 가스트린은 프로가스트린에서 유래된 다수의 상이한 분자 형태로 존재한다 (G17, G34, 글리신-연장된 G17, 글리신-연장된 G34). 도 1을 참조한다. 가스트린 유전자는 101개-아미노산 생성물인 프리프로가스트린을 인코딩한다. 첫 번째 절단은 21개-아미노산 잔기 신호 펩티드 (도 1에서 밑줄로 표시됨)를 제거하여 80개 아미노산 잔기인 PG를 생성한다. 이해되고 알려진 인간 PG (hPG)의 폴리펩티드 서열이 SEQ ID NO:20에 제공된다. 도 1에 설명된 대로, hPG의 아미노산 잔기는 1 내지 80으로 번호 매겨져 있는데, 가장 아미노 측에 있는 잔기가 1번이다. 프로가스트린의 처음 40개 아미노산 이내의 서열을 "N-말단"이라고 하는 한편, 잔기 41 내지 88 내에 있는 서열을 "C-말단"이라고 한다.

[0055] 최근의 연구로부터, 프로가스트린 수준이 CRC를 지닌 환자에서 상승되는 것으로 나타났다. 정상적인 생리적 조건하에, 프로가스트린은 인간의 분비된 총 펩티드의 10% 미만을 차지한다. 결장직장암에서, 프로가스트린 수준은, 아마도 유전자 생성물의 불완전한 가공과 결합된 가스트린 유전자의 증가된 발현 결과로서, 혈장과 종양 조직 둘 모두에서 현저하게 상승한다. 한 연구로부터, CRC 환자에서 대조군 환자에 비해 현저히 높은 혈청 프로가스트린 수준이 밝혀졌으나 보다 가공된 형태의 가스트린에 대해서는 그러한 차이가 없었다 (Siddheshwar *et al.*, 2001, *Gut* 48:47-52). 시험된 CRC 종양 샘플에서, 종양의 80-100%가 증가된 PG 수준을 나타내었다. 예컨대, 문헌[Ciccotosto *et al.*, 1995, *Gastroenterology* 109:1142-1153; Baldwin *et al.*, 1998, *Gut* 42:581-584; Van Solinge, 1993, *Gastroenterology* 104:1099-1107] 참조. CRC에서 PG의 역할은, 발암성 아족시메탄으로 처리된 재조합 인간 PG를 발현시키는 마우스가 야생형 마우스 또는 아미드화된 가스트린을 발현시키는 마우스에 비해 결장에 상당히 많은 수의 비정상적인 잠재 병소, 샘종 및 샘암종을 지녔음을 나타내는 실험에 의해 추가로 입증되었다 (Singh *et al.* 2000, *Gastroenterology* 119:162-171).

[0056] 최근에, 문헌[Hollande *et al.*]은 프로가스트린이 베타-카테닌/Tcf4 신호전달의 네거티브 조절자인 ICAT를 억제함에 의해 베타-카테닌/Tcf4 경로를 자극하고, 프로가스트린을 차단함으로써 ICAT가 새로이 발현된다는 것을 입증하였다. WO 2007/135542호 참조. 어떠한 작동 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 프로가스트린 신호전달의 차단은 증가된 ICAT 발현의 결과로서 베타-카테닌/Tcf4-유도된 증식을 억제시키는 것으로 여겨진다. 지속적인 PG-의존적 신호전달의 부재하에, 세포 증식이 억제되고, 세포 분화 및/또는 세포 사멸 (아포토시스 포함)이 촉발된다.

[0057] CRC의 치료 및 진단에 대한 새로운 임상적 접근법의 시급한 요구, PG가 CRC 종양 세포의 증식을 자극한다는 증거, 및 암의 치료에서 모노클로날 항체 요법에 대한 증가된 관심에도 불구하고, 지금까지, PG-의존적 종양 세포 증식, 또는 심지어 PG와의 결합을 차단할 수 있는 어떠한 모노클로날 항체를 입증하는 보고서는 없었다. 본원에서 최초로 제시된 그러한 항체는 개발이 어려운 것이 입증되었다. 첫 번째 과제로서, 본 출원인은 폴리클로날 항-hPG 항체를 생성하는데 이용될 수 있는 재조합 인간 프로가스트린이 시험 마우스에서 모노클로날 면역원성 반응을 유도하지 못하였음을 발견하였다. 따라서, 프로가스트린에 특이적이거나 그 밖의 가스트린 유전자 생성물에는 특이적이지 않은 항체를 생성하기 위해 단지 PG의 펩티드 단편을 이용하여 면역원을 고안할 필요가 있었다. 마침 하이브리도마 클론이 항원성 펩티드에 결합된 항체를 생성시킨 이래로, 펩티드에 대한 결합이 PG와 결합하는 능력을 예보하는 것이, 명확하게 또는 전혀, 아님이 밝혀졌다. 하기 실시예에서 보다 상세하게 제시된 대로, 다수의 하이브리도마가 면역원에서 사용된 PG 항원 펩티드에 결합되나 PG와는 결합하지 못하는 항체를 생성하였다. 본 발명은 항체를 생성시킨 펩티드 항원에 결합할 뿐만 아니라 hPG에도 특이적으로 결합하는 항-hPG 모노클로날 항체를 제공한다. 매우 놀랍게도, 가공 생성물 (예컨대, G34, G34-

Gly, G17, G17-Gly, CTFP)에 비해 hPG에 고도로 특이적인 모노클로날 항체가, 일부 경우에 hPG에 유일하지 않지만 프로가스트린 가공 생성물 중 하나 이상에 공통인 아미노산 서열의 영역을 포함하는 항원을 이용하여 수득되었다. 더욱이, 놀랍게도, hPG의 비교적 작은 크기에도 불구하고 (80개 아미노산), 모든 항-hPG 모노클로날 항체는 아니지만, 심지어 hPG에 고도의 친화성 및 특이성을 나타내는 항체들이 이의 생물학적 활성을 중화시키는 것이 발견되었다.

[0058] **항-hPG 모노클로날 항체**

[0059] 본 출원인은 항-hPG 모노클로날 항체를 생성하는데 유용한 펩티드 항원을 발견하였다. 본 발명의 항-hPG 항체를 생성하는데 유용한 펩티드는 더욱 가공된 형태의 폴리펩티드, 예컨대 글리신-연장되거나 아미드화된 가스트린 또는 CTFP에서는 발견되지 않는 프로가스트린-특이적 서열을 포함하며, 또한 hPG의 가공된 형태에서 발견된 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 N-말단 영역에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 펩티드 항원에 대해 생성되며 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체로 지칭된다. N-말단 항-PG 모노클로날 항체를 수득하는데 유용한 면역원을 작제하는데 이용될 수 있는 특수한 예시적인 항원성 영역은 링커 서열에 커플링된 hPG의 잔기 1 내지 14에 일치한다 (SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25)). 다른 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 C-말단 영역에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 펩티드 항원에 대해 생성되며 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체로 지칭된다. C-말단 항-PG 모노클로날 항체를 수득하는데 유용한 면역원을 작제하는데 이용될 수 있는 특수한 예시적인 항원성 영역은 링커 서열에 커플링된 hPG의 잔기 55 내지 80에 일치한다 (SEQ ID NO:27). 표 1 참조.

[0060] 본 발명의 항-PG 모노클로날 항체는 PG에 결합하고 복잡한 혼합물로부터 PG를 검출 및 분리하는데 유용하다. 추가로, 본 발명의 항-PG 모노클로날 항체는 결장직장암의 치료 및/또는 진단 적용에 매우 적합하다. 다양한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 (1) 다른 유전자 생성물에 비해 PG에 특이적으로 결합하고, (2) hPG에 대해 높은 친화성을 지니며, (3) 시험관내 및 생체내에서 결장직장암 세포 증식을 억제하고, (4) 생체내에서 종양 크기 및 수를 감소시키며, (5) 그 밖의 가스트린-유전자 유래 펩티드를 함유하는 복잡한 혼합물에서 PG를 검출한다.

[0061] 가스트린 유전자는 발현되고 광범하게 가공되어 정상의 항상성에서 임무를 완수하는 여러 단백질 생성물을 산출한다. 반면, 프로가스트린은 전형적으로 건강한 피검체의 순환에서 검출될 수 없다. 본 발명의 모노클로날 항체는 프로가스트린을 표적으로 하며 가스트린 유전자로부터 유래된 다른 펩티드를 표적화하지 않는다. 따라서, 항-hPG 모노클로날 항체는 인간 및 다른 동물로부터의 프로가스트린에는 특이적으로 결합하지만, 다른 가스트린 유전자 생성물, 예컨대 이로 제한되는 것은 아니지만 글리신-연장되거나 아미드화된 가스트린, 또는 C-말단 플랭킹 펩티드 (CTFP)에는 결합하지 않는다.

[0062] 항-hPG 모노클로날 항체의 특이성은 하기와 같이 ELISA를 이용하여 측정될 수 있다. 포스페이트-완충된 염수 (PBS) 중 적합한 농도(들)의 시험 폴리펩티드 (예컨대, 25 및 50 ng 재조합 인간 PG, 및 50 및 250 ng CTFP 또는 그 밖의 가스트린-유전자 유전자 생성물)를 지니는 96웰 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 웰을 세척 용액 (PBS 및 0.1% Tween-20)으로 3회 세척한 다음, 2시간 동안 22°C에서 웰 당 100 μL의 차단 용액 (PBS, 0.1% Tween-20, 0.1% 소 혈청 알부민 또는 카세인 가수분해물)과 함께 인큐베이션하였다. 차단 후에, 웰을 3회 세척하고 검정하려는 항체 (시험 항체)를 첨가하였다. PBS 및 0.1% Tween-20 중 100 μL의 시험 항체 (0.3 내지 1 ng/mL)를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 2시간 동안 22°C에서 인큐베이션한 다음, 시험 항체 용액을 폐기하고, 세척 단계 (3X 100 μL 세척 용액, 상기 기재됨) 후에 호스레디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 염소 항-마우스 IgG (Fc) 항체인 이차 항체를 함유하는 차단 용액으로 교체하였다. 이차 항체와 1시간 인큐베이션 후에, 100 μL의 기질 용액 (예컨대, Fast OPD, 또는 O-페닐렌디아민 디히드로클로라이드, Sigma-Aldrich Co.로부터 시판됨, 제조자의 지시에 따라 제조됨)을 각각의 웰에 첨가하고 암실에서 20분간 22°C에서 인큐베이션하였다. 50 μL의 4N 황산을 첨가하여 반응을 중지시키고 촉매화된 기질의 양을 492 nm에서 광학 밀도 (O.D.)를 측정함에 의해 결정하였다. 기질 전환은 항원에 결합된 일차 (시험) 항체의 양에 비례한다. 실험은 두 번 진행되었고, OD 측정치를 항원 농도의 함수로서 플롯팅하였다. 측정된 O.D.가 hPG에 대해 0.2 내지 1.5이고 CTFP 또는 그 밖의 어떠한 가스트린-유전자 유래 펩티드로 인한 백그라운드 이상의 통계적으로 유의한 신호가 없을 때 시험 항체는 PG에 특이적으로 것으로 기록되며, 여기서 백그라운드는 PBS만을 함유하는 대조군 웰로부터의 평균 신호이다.

[0063] 본 발명의 여러 항-hPG 모노클로날 항체는 고도로 특이적인 것으로 밝혀졌다. 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 다른 가스트린 유전자 생성물에 비해 프로가스트린에 대해 100배 초과 특이성을 나타낸다. 그러한 구체예에서, 100배 초과 항원 (예컨대, 글리신-연장되거나 아미드화된 가스트린)은 항원이 프로가스트

린일 때 관찰되는 동일한 결합을 생성하는데 요구된다.

- [0064] 결합을 측정하는 다른 방법은 면역형광 방법, 효소-결합된 면역흡수 검정(ELISA), 방사성 물질 표지된 면역검정(RIA), 샌드위치 ELISA (Monoclonal Antibody Experiment Manual (published by Kodansha Scientific, 1987), Second Series Biochemical Experiment Course, Vol. 5, Immunobiochemistry Research Method, published by Tokyo Kagaku Dojin (1986))를 포함하나 이로 제한되지 않는다
- [0065] PG에 대해 높은 친화성을 갖는 항-hPG 모노클로날 항체는 치료 및 진단 용도 둘 모두에 바람직하다. 치료 용도와 같은 특정 용도를 위해, 적어도 약 100 nM의 친화성이 바람직하나, 더 큰 친화성, 예를 들어 적어도 약 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM, 10 pM, 1 pM, 또는 심지어 그 초과 친화성을 갖는 항체가 바람직할 수 있다. 일부 구체예에서, 모노클로날 항체는 약 1 pM 내지 약 100 nM 범위의 친화성, 또는 임의의 상기 값들 사이의 친화성으로 hPG에 특이적으로 결합한다.
- [0066] hPG에 대한 항-hPG 모노클로날 항체의 친화성은, 예를 들어 제한하려는 것은 아니나 ELISA, 등은 적정 열량측정법(ITC), BIAcore, Proteon, 또는 형광 분극 검정과 같은 당 분야에 널리 공지되거나 본원에 기재된 기술을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0067] hPG의 N- 또는 C-말단 영역으로부터의 항원을 이용하여, hPG의 상이한 에피토프를 인지하는 항체를 생성할 수 있다. 모노클로날 항체에 의해 인지된 에피토프는 항체를 생성하는데 사용된 특정 항원에 의존적일 것이며 알려진 스캐닝 및 SPOT 분석과 같은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 맵핑될 수 있다 (하기 실시예 섹션 참조). 예를 들어, 에피토프 맵핑은, 항-hPG MAb 2 및 MAb 4가 동일한 에피토프에 결합하고; 항-hPG MAb 1 및 MAb 3이 대략 동일한 에피토프에 결합하며; MAb 17, MAb 18, MAb 19, 및 MAb 20이 대략 동일한 에피토프에 결합하고; MAb 15 및 MAb 16이 대략 동일한 에피토프에 결합하고; 항-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9, 및 MAb 12가 동일한 에피토프에 결합하고 항-hPG MAb 10과 대략 동일한 에피토프에 결합하며; 항-hPG MAb 11 및 MAb 14가 대략 동일한 에피토프에 결합함을 나타낸다.
- [0068] 항-hPG 모노클로날 항체가 특정 에피토프를 인지하는지 여부는 참조 항체에 의해 결합된 에피토프가 알려져 있는 본원에 기재된 경쟁 검정을 이용하여 측정될 수 있다. 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 N-말단 영역에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 에피토프에 결합하는 참조 항체와 경쟁한다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 잔기 10 내지 14 (SEQ ID NO:28), hPG의 잔기 9 내지 14 (SEQ ID NO:29), hPG의 잔기 4 내지 10 (SEQ ID NO:30), hPG의 잔기 2 내지 10 (SEQ ID NO:31), 또는 hPG의 잔기 2 내지 14 (SEQ ID NO:32)를 포함하는 에피토프에 결합하는 참조 항체와 경쟁한다. 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 C-말단 영역에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 에피토프에 결합하는 참조 항체와 경쟁한다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 hPG의 잔기 71 내지 74 (SEQ ID NO:33), hPG의 잔기 69 내지 73 (SEQ ID NO:34), hPG의 잔기 76 내지 80 (SEQ ID NO:35), 또는 hPG의 잔기 67 내지 74 (SEQ ID NO:36)를 포함하는 에피토프에 결합하는 참조 항체와 경쟁한다.
- [0069] 항-PG 모노클로날 항체는 중화성일 수 있다. 어떠한 작동 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, PG와의 결합을 통해, 중화성 항-hPG 모노클로날 항체는 이의 신호전달 파트너(들)와 상호작용하는 능력을 차단하거나 억제하는 것으로 여겨진다. 이것은, 다시, 그렇지 않으면 증식, 감소된 세포 분화 및 세포 사멸을 초래할 결합장 종양 세포의 신호 전달 경로를 억제한다. 일부 구체예에서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 hPG의 N-말단 영역에 결합한다. 특수한 구체예에서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 PG와의 결합에 대해 항-hPG MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb 16, MAb 17, MAb 18, MAb 19, 또는 MAb 20과 경쟁한다. 다른 구체예에서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 hPG의 C-말단 영역에 결합한다. 특수한 구체예에서, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 PG와의 결합에 대해 항-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb21, MAb 22, 또는 MAb23과 경쟁한다.
- [0070] 항-PG 모노클로날 항체가 중화성인지에 대한 구체적인 시험은 하기와 같이 수행될 수 있다. CRC LS174T 세포를, 하기 실시예 7에 기재된 대로, 웰 당 약 50,000개 세포로 6웰 플레이트에 시딩하였다. 그 후, 세포를, 실시예 7에 기재된 대로, 12시간 간격으로 48시간 동안 약 5 µg/mL의 항체 농도의 시험 항-PG 모노클로날 항체 또는 대조군 모노클로날 항체로 처리하였다. 투-테일드 Mann-Whitney 시험 (p<0.05인 경우 유의적인 차이로 고려됨)을 이용하여, 시험 항체로 처리된 CRC 암세포의 수가 대조군 비특이적 항체로 처리된 세포의 수에 비해 살아 있는 세포의 수에 있어서 10% 이상의 통계적으로 유의한 감소를 나타내는 경우, 시험 항체는 검정에 중화성인 것으로 정의된다. 총 세포 수는 T0으로서 지칭된, 치료 기간의 시작시에 세포의 수에 대해 고정

된다.

- [0071] 본원에서 사용된 항체 (Ab)는 특정 항원에 특이적으로 결합하거나 이와 면역학적으로 반응성인 면역글로불린 분자를 지칭하며, 폴리클로날, 모노클로날, 유전학적으로 공학처리된 형태 및 달리 변형된 형태의 항체를 포함하고, 이로 제한되는 것은 아니나 키메라 항체, 인간화 항체, 및 예컨대, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, 및 scFv 단편을 포함하는 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 다양한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 항체의 불변 영역의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구체예에서, 불변 영역은 IgA (예컨대, IgA1 or IgA2), IgD, IgE, IgG (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4), 및 IgM으로부터 선택된 아이소형이다.
- [0072] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체로 제한되지 않는다. 모노클로날 항체는 당 분야에서 이용가능하거나 알려져 있는 어떠한 수단에 의해 임의의 진핵세포, 원핵세포, 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된다. 본 발명에서 유용한 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술의 이용, 또는 이들의 조합을 포함하는 당 분야에 공지된 광범한 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 인간에서 항-hPG 모노클로날 항체의 생체내 이용 및 시험관내 검출 검정을 포함하는 본 발명의 수많은 용도에서, 키메라, 영장류화, 인간화, 또는 인간 항체를 적합하게 이용할 수 있다.
- [0073] 용어 "scFv"는 단일 사슬 Fv 항체를 지칭하는데, 이 때 전통적인 항체로부터의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인들이 결합되어 하나의 사슬을 형성한다.
- [0074] "V_H"라 함은 Fv, scFv, 또는 Fab의 중쇄를 포함하는, 항체의 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. "V_L"이라 함은 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 경쇄를 포함하는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다. 항체 (Ab) 및 면역글로불린 (Ig)은 동일한 구조적 특징을 지니는 당단백질이다. 항체는 특이적 표적에 대한 결합 특이성을 나타내는 한편, 면역글로불린은 표적 특이성이 결여된 항체 및 그 밖의 항체-유사 분자 둘 모두를 포함한다. 천연(native) 항체 및 면역글로불린은 일반적으로 두 개의 동일한 경쇄 (L) 및 두 개의 동일한 중쇄 (H)를 포함하는, 약 150,000 돌턴의 헤테로테트라머 당단백질이다. 각각의 중쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_H)에 이어 다수의 불변 도메인을 지닌다. 각각의 경쇄는 한 말단에 가변 도메인 (V_L)과 다른 말단에 불변 도메인을 지닌다.
- [0075] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함한다. CDR은 또한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 모두에서 과가변 영역으로서 알려져 있다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분을 프레임워크 (FR)라고 한다. 당 분야에 공지된 대로, 항체의 과가변 영역을 묘사하는 아미노산 부분/경계는 문맥에 따라 그리고 당 분야에 공지된 다양한 정의에 따라 다양할 수 있다. 가변 도메인 내의 일부 부분들은, 이러한 부분들이 한 세트의 기준하에 과가변 영역 내에 있는 것으로 간주될 수 있는 한편 상이한 세트의 기준하에서는 과가변 영역의 밖에 있는 것으로 간주될 수 있다는 점에서 하이브리드 과가변 위치로서 판단될 수 있다. 이러한 위치들 중 하나 이상은 또한 연장된 과가변 영역에서 발견될 수 있다. 본 발명은 이러한 하이브리드 과가변 위치에서 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 각각은 대개, 루프 커빙을 형성하고, 일부 경우에 β-시트 구조의 일부를 형성하는, 세 개의 CDR에 의해 연결된 β-시트 배치를 채용함에 의해, 네 개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 사슬에서 CDR은 FR 영역에 근접하게 함께 유지되며, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께, 항체의 표적 결합 부위의 형성에 기여한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987) 참조).
- [0076] hPG에 대한 높은 특이성과 친화성 및 양호한 항종양 활성을 지니는 수 개의 항-hPG 모노클로날 항체가 확인되었고, 이들의 CDR 및 가변 중쇄 및 경쇄가 서열화되었다. 무린 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 본원에서 mV_H 및 mV_L로서 언급하며, 이어서 상응하는 모노클로날 항체의 수가 기재되는데, 예를 들어 항-hPG MAb3의 경우 mV_H.3 및 mV_L.3이다. 항-hPG 모노클로날 항체는 V_H CDR1, 2, 또는 3, 및 V_L CDR1, 2, 또는 3으로 각각 지칭되는 세 개의 가변 경쇄 CDR 및 세 개의 가변 중쇄 CDR을 지니며, 이어서 예시적인 항-hPG 모노클로날 항체의 수가 기재된다. 예를 들어, MAb3의 V_L CDR1은 V_L CDR1.3으로 기재되고, MAb3의 V_H CDR1은 V_H CDR1.3으로 기재된다. 유사하게, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 본원에서 hV_H 및 hV_L에 이어서 상응하는 모노클로날 항체의 수로 지칭된다.
- [0077] 일부 구체예에서, hPG의 N-말단 부분에 대해 생성된 항-hPG 모노클로날 항체는 세 개의 가변 경쇄 CDR 및 세 개의 가변 중쇄 CDR을 지니고, 여기서 V_L CDR1은 QSIVHSGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEQ ID NO:4), QSLVHSSGVTY ("V_L

CDR 1.4"; SEQ ID NO:10), QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEQ ID NO:50), 및 SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEQ ID NO:51)로부터 선택되고; V_L CDR2는 KVS ("V_L CDR 2.3") 및 ("V_L CDR 2.4"; SEQ ID NO:5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEQ ID NO:53), 및 VKKDGS ("V_L CDR 2.19"; SEQ ID NO:54)로부터 선택되고; V_L CDR3은 FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEQ ID NO:6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEQ ID NO:11), WQGTSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEQ ID NO:57), 및 GVGDAIKQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEQ ID NO:58)로부터 선택되며; V_H CDR1은 GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEQ ID NO:1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEQ ID NO:7), GYTFTSY ("V_H CDR 1.16"; SEQ ID NO:39), 및 GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEQ ID NO:40)로부터 선택되고; V_H CDR2는 FYPGNDS ("V_H CDR 2.3"; SEQ ID NO:2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEQ ID NO:8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEQ ID NO:43), 및 ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEQ ID NO:44)로부터 선택되며; V_H CDR3은 TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEQ ID NO:3), ATDGNVDWFAY ("V_H CDR 3.4"; SEQ ID NO:9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEQ ID NO:47), 및 AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEQ ID NO:48)로부터 선택된다. 표 1A 참조.

[0078]

일부 구체예에서, hPG의 C-말단 부분에 대해 생성된 항-hPG 모노클로날 항체는 세 개의 가변 경쇄 CDR 및 세 개의 가변 중쇄 CDR을 지니고, 여기서 V_L CDR1은 KSLRHTKGITF ("V_L CDR 1.8"; SEQ ID NO:49) 및 QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEQ ID NO:50)로부터 선택되고; V_L CDR2는 QMS ("V_L CDR 2.8"; SEQ ID NO:52) 및 LVS ("V_L CDR 2.13"; SEQ ID NO:53)로부터 선택되며; V_L CDR3은 AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEQ ID NO:55) 및 WQGTSPYT ("V_L CDR 3.13"; SEQ ID NO:56)로부터 선택되고; V_H CDR1은 GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEQ ID NO:37) 및 GFIFSSYG ("V_H CDR 1.13"; SEQ ID NO:38)로부터 선택되며; V_H CDR2는 ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEQ ID NO:41) 및 INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEQ ID NO:42)로부터 선택되고; V_H CDR3은 ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEQ ID NO:45) 및 ARGGTGY ("V_H CDR 3.13"; SEQ ID NO:46)로부터 선택된다. 표 1B 참조.

표 1A

N-말단 항-hPG 모노클로날 항체					
면역원	하이브리도마 (기탁 #)	MAB	무관 CDR 서열	무관 V _H 및 V _L 서열	인간화 V _H 및 V _L 서열(실계열)
N1	43B9G11	MAb1			
N1	WE5H2G7	MAb2			
N2	6B5B11C10	MAb3	V _H CDR 1.3 V _H CDR 2.3 V _H CDR 3.3 V _L CDR 1.3 V _L CDR 2.3 V _L CDR 3.3	mV _H 3 (SEQ ID NO:12) mV _L 3 (SEQ ID NO:13)	hV _H 3 (SEQ ID NO:21) hV _L 3 (SEQ ID NO:22)
N2	20D2C3G2	MAb4	V _H CDR 1.4 V _H CDR 2.4 V _H CDR 3.4 V _L CDR 1.4 V _L CDR 2.4 V _L CDR 3.4	mV _H 4 (SEQ ID NO:14) mV _L 4 (SEQ ID NO:15)	hV _H 4 (SEQ ID NO:23) hV _L 4 (SEQ ID NO:24)
N2	1E9A4A4 (1-4376)	MAb15			
N2	1E9D9B6	MAb16	V _H CDR 1.16 V _H CDR 2.16 V _H CDR 3.16 V _L CDR 1.16 V _L CDR 2.16 V _L CDR 3.16	mV _H 16 (SEQ ID NO:61) mV _L 16 (SEQ ID NO:65)	hV _H 16a (SEQ ID NO:84) hV _H 16b (SEQ ID NO:86) hV _H 16c (SEQ ID NO:88) hV _L 16a (SEQ ID NO:85) hV _L 16b (SEQ ID NO:87) hV _L 16c (SEQ ID NO:89)
N2	1C8D10F5	MAb17			
N2	1A7C3F11	MAb18			

표 1A

N-말단 항-HPG 모노클로날 항체

면역원	하이브리도마 (기탁 #)	MAb	무관 CDR 서열	무관 V _H 및 V _L 서열	인간화 V _H 및 V _L 서열(실제형)	
N2	1B3B4F11	MAb19	V _H CDR 1.19	GYSTITSDYA	(SEQ ID NO:40)	hV _H 19a (SEQ ID NO:90)
			V _H CDR 2.19	ISFSGYT	(SEQ ID NO:44)	hV _H 19b (SEQ ID NO:92)
			V _H CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEQ ID NO:48)	hV _H 19c (SEQ ID NO:94)
			V _L CDR 1.19	SQHRITYT	(SEQ ID NO:51)	hV _L 19a (SEQ ID NO:91)
			V _L CDR 2.19	VKKDGS	(SEQ ID NO:54)	hV _L 19b (SEQ ID NO:93)
			V _L CDR 3.19	GVGDAIKGQSYFV	(SEQ ID NO:58)	hV _L 19c (SEQ ID NO:95)
N2	IC11F3E8	MAb20				

면역원 N1 = SWKPRSQQPDAPLIG Ahx Cys BSA, 또한 (SEQ ID NO:25) Ahx Cys BSA 로서 표시됨
 면역원 N2 = SWKPRSQQPDAPLIG Ahx Cys KLH, 또한 (SEQ ID NO:25) Ahx Cys KLH 로서 표시됨

표 1A에서, 모든 아미노산 서열은 통상적인 N→C 배향을 이용하여 표시된다. 각각의 면역원에 대해, 포로가스트린 펩티드를 하나의 아미노핵산산(Ahx) 잔기의 링커에 이어 시스테인을 이용하여 합성하였고, 그 후, 이것을 소 혈청("BSA") 또는 키홀 림펩트 해모시아닌("KLH") 담체에 컨주게이션시켰다.

표 1B

C-말단 항-hPG 모노클로날 항체

면역원	하이브리도마 (기탁#)	MAB	유연 CDR 서열	유연 V _H 및 V _L 서열	인간화 V _H 및 V _L 서열(상계열)
C1	IB4A11D11 (I-4371)	MAB5			
C1	IB6A11F2 (I-4372)	MAB6			
C1	IB11E4B11 (I-4373)	MAB7			
C1	IC10D3B9	MAB8	V _H CDR 1.8 GFTITTYA (SEQ ID NO:37) V _H CDR 2.8 ISSGGTYT (SEQ ID NO:41) V _H CDR 3.8 ATQGNYSLDF (SEQ ID NO:45) V _L CDR 1.8 KSLRHITKGTTF (SEQ ID NO:49) V _L CDR 2.8 QMS (SEQ ID NO:52) V _L CDR 3.8 AQNLELPLT (SEQ ID NO:55)	mV _H 8 (SEQ ID NO:59) mV _L 8 (SEQ ID NO:63)	hV _H 8a (SEQ ID NO:75) hV _H 8b (SEQ ID NO:77) hV _H 8c (SEQ ID NO:79) hV _L 8a (SEQ ID NO:76) hV _L 8b (SEQ ID NO:78) hV _L 8c (SEQ ID NO:76)
C1	ID8F5B3	MAB9			
C1	IE1C7B4	MAB10			
C1	IB4C8C8 (I-4374)	MAB11			
C1	IB11E6G4 (I-4375)	MAB12			
C1	IC6G3C7	MAB13	V _H CDR 1.13 GFIFSSYG (SEQ ID NO:38) V _H CDR 2.13 INTFGDRT (SEQ ID NO:42) V _H CDR 3.13 ARGGTGY (SEQ ID NO:46) V _L CDR 1.13 QSLDSDGKTY (SEQ ID NO:50) V _L CDR 2.13 LVS (SEQ ID NO:53) V _L CDR 3.13 WQGTHTPQT (SEQ ID NO:56)	mV _H 1.13 (SEQ ID NO:60) mV _L 1.13 (SEQ ID NO:64)	hV _H 1.13a (SEQ ID NO:80) hV _H 1.13b (SEQ ID NO:82) hV _L 1.13a (SEQ ID NO:81) hV _L 1.13b (SEQ ID NO:83)
C1	ZH9F4B7	MAB14			

표 1B

C-말단 항-hPG 모노클로날 항체					
변역원	하이브리도마 (기탁 #)	MAb	유인 CDR 서열	유인 V _H 및 V _L 서열	인간화 V _H 및 V _L 서열(실계림)
C2	IF1H5E10	MAb21			
C2	IF1H5G9	MAb22			
C2	IA1H2C9	MAb23			

변역원 C1 = KLH Cys Abx Abx QGPWLEBEEBAYGWMDFGRSSAEDEN, 또한 KLH Cys Abx Abx (SEQ ID NO:27)로서 표시됨
 변역원 C2 = DT Cys Abx Abx QGPWLEBEEBAYGWMDFGRSSAEDEN, 또한 DT Cys Abx Abx (SEQ ID NO:27)로서 표시됨

표 1B에서, 모든 아미노산 서열은 통상적인 N→C 배향을 이용하여 표시된다. 각각의 변역원에 대해, 프로가스트린 펩티드를 두 개의 아미노핵산산(AHX) 잔기의 링커에 이어 시스테인을 이용하여 합성하였고, 그 후, 이것을 키홀립펩테 헤모시아닌 (“KLH”) 또는 디프테리아 독소 (“DT”) 담체에 컨주게이션시켰다.

[0082]

[0083]

일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_HCDR1.3, V_HCDR2.3 및 V_HCDR3.3이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 mV_H.3에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:12). 도 2a 참조.

[0084]

일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬의 CDR은 V_LCDR1.3, V_LCDR2.3 및 V_LCDR3.3이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 mV_L.3에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:13). 도 2b 참조.

[0085]

일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_HCDR1.4, V_HCDR2.4 및 V_HCDR3.4이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 mV_H.4에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:14). 도 2c 참조.

[0086]

일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 V_L 사슬의 CDR은 V_LCDR1.4, V_LCDR2.4 및 V_LCDR3.4이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 mV_L.4에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:15).

도 2d 참조.

- [0087] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 및 V_H CDR3.8이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.8$ 에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:59). 도 2e 참조.
- [0088] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 및 V_L CDR3.8이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 $mV_L.8$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:63). 도 2f 참조.
- [0089] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.13, V_H CDR2.13 및 V_H CDR3.13이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.13$ 에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:60). 도 2g 참조.
- [0090] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 및 V_L CDR3.13이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 $mV_L.13$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:64). 도 2h 참조.
- [0091] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.16, V_H CDR2.16 및 V_H CDR3.16이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.16$ 에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:61). 도 2i 참조.
- [0092] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.16, V_L CDR2.16 및 V_L CDR3.16이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 $mV_L.16$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:65). 도 2j 참조.
- [0093] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.19, V_H CDR2.19 및 V_H CDR3.19이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.19$ 에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:62). 도 2k 참조.
- [0094] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.19, V_L CDR2.19 및 V_L CDR3.19이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_L 사슬은 $mV_L.19$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:66). 도 2l 참조.
- [0095] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.3, V_H CDR2.3 및 V_H CDR3.3이고 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.3, V_L CDR2.3 및 V_L CDR3.3이다. 특수한 구체예에서, 항-PG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.3$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지니고 (SEQ ID NO: 12) V_L 사슬은 $mV_L.3$ 에 상응하는 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:13).
- [0096] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.4, V_H CDR2.4 및 V_H CDR3.4이고 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.4, V_L CDR2.4 및 V_L CDR3.4이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬은 $mV_H.4$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지니고 (SEQ ID NO:14) V_L 사슬은 $mV_L.4$ 에 상응하는 아미노산 서열을 지닌다 (SEQ ID NO:15).
- [0097] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 및 V_H CDR3.8이고 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 및 V_L CDR3.8이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 본원에 기재된 항-hPG MAb 8이고 $mV_H.8$ 에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:59)과 $mV_L.8$ 에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:63)을 포함한다.
- [0098] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_H CDR1.3, V_H CDR2.13 및 V_H CDR3.13이고 V_L 사슬의 CDR은 V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 및 V_L CDR3.13이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 본원에 기재된

항-hPG MAb 13이고 mV_H.13에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:60)과 mV_L.13에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:64)을 포함한다.

[0099] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_HCDR1.16, V_HCDR2.16 및 V_HCDR3.16이고 V_L 사슬의 CDR은 V_LCDR1.16, V_LCDR2.16 및 V_LCDR3.16이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 본원에 기재된 항-hPG MAb 16이고 mV_H.16에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:61)과 mV_L.16에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:65)을 포함한다.

[0100] 일부 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체의 V_H 사슬의 CDR은 V_HCDR1.19, V_HCDR2.19 및 V_HCDR3.19이고 V_L 사슬의 CDR은 V_LCDR1.19, V_LCDR2.19 및 V_LCDR3.19이다. 특수한 구체예에서, 항-hPG 모노클로날 항체는 본원에 기재된 항-hPG MAb 19이고 mV_H.19에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:62)과 mV_L.19에 상응하는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:66)을 포함한다.

[0101] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 완전한 분자, 및 hPG에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 단편 (예컨대, 예를 들어 Fab 및 F(ab')₂ 단편) 둘 모두를 포함한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편에는 완전한 항체의 Fc 단편이 없고, 동물 또는 식물의 순환으로부터 보다 신속하게 청소되며, 완전한 항체보다 덜 비특이적 조직 결합성을 지닐 수 있다 (Wahl *et al.*, 1983, J. Nucl. Med. 24:316). 따라서, 항체 단편은 다른 적용 중에서도 치료 용도로 유용하다.

[0102] 용어 "항체 단편"은 전장 항체의 부분, 일반적으로 표적 결합부분 또는 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편을 포함한다. "Fv" 단편은 완전한 표적 인지 및 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 빈틈없는 비공유 회합(association)으로 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이합체 (V_H-V_L 이합체)로 구성된다. 이것은 V_H-V_L 이합체의 표면 상의 표적 결합 부위를 정의하기 위해 각각의 가변 도메인의 세 개의 CDR이 상호작용하는 배치로 존재한다. 종종, 6개의 CDR이 항체에 표적 결합 특이성을 제공한다. 그러나, 일부 경우에, 단일 가변 도메인조차도 (또는 표적에 특이적인 세 개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반), 비록 전체 결합 부위보다 낮은 친화성이긴 해도, 표적을 인지하고 여기에 결합하는 능력을 지닐 수 있다. "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 이러한 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하여 scFv가 표적 결합을 위해 요망되는 구조를 형성할 수 있게 한다. "단일 도메인 항체"는 hPG에 대해 충분한 친화성을 나타내는 단일 V_H 또는 V_L 도메인을 포함한다. 특수한 구체예에서, 단일 도메인 항체는 카멜화된 항체이다 (예컨대, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-8 참조).

[0103] Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 첫 번째 불변 도메인 (CH₁)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH₁ 도메인의 카르복실 말단에서 소수 개의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이해진다. F(ab')₂ 단편은 F(ab')₂ 펩신 분해 생성물의 힌지 시스테인에서 디설파이드 결합의 절단에 의해 생산된다. 항체 단편의 추가의 화학적 커플링은 당업자에게 공지되어 있다.

[0104] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 키메라 항체일 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "키메라" 항체는 래트 또는 마우스 항체와 같은 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 가변 서열과, 전형적으로 인간 면역글로불린 주형으로부터 선택된 인간 면역글로불린 불변 영역을 지니는 항체를 지칭한다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies *et al.*, 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 4,816,397, 이들은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다] 참조.

[0105] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 인간화될 수 있다. 비-인간 (예컨대, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 그 밖의 표적-결합 서브서열)이다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 및 전형적으로 두 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것인데, 여기서 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린에 일치하고, FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 컨센서스(consensus) 서열의 것들이며, 상기 인간화 항체는 "CDR-그래프트된

(grafted)"으로서 지칭될 수 있다. 인간화 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 일부를 포함할 수 있다. 인간화 항체를 고안하는 방법을 포함하는 항체 인간화 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-7; U.S. Patent Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; and 6,180,370 to Queen et al.; EP239400; PCT publication WO 91/09967; U.S. Patent No. 5,225,539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; and U.S. Patent No. 5,565,332, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다] 참조.

[0106] 인간화 항-hPG 모노클로날 항체에 대한 서열은 하기 실시예에 기재된 대로 본 발명의 무인 항-hPG 모노클로날 항체로부터 설계될 수 있다. 인간화 항체의 특수한 구체에는 (1) 본원에 기재된 어떠한 세 개의 VL CDR 및 어떠한 세 개의 VH CDR; (2) SEQ ID NO:21에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:22에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (3) SEQ ID NO:23에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:24에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (4) SEQ ID NO:75, 77, 및 79로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:76 및 78로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (5) SEQ ID NO:80 및 82로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:81 및 83으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (6) SEQ ID NO:84, 86, 및 88로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:85, 87, 및 89로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; (7) SEQ ID NO:90, 92, 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:91, 93, 및 95로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체를 포함한다.

[0107] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 영장류화될 수 있다. 용어 "영장류화" 항체는 원숭이 가변 영역과 인간 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 영장류화 항체를 생산하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[U.S. Patent Nos. 5,658,570; 5,681,722; and 5,693,780, 이들은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다] 참조.

[0108] 항-hPG 모노클로날 항체 내에는 참조 항체와 경쟁하는 항체, 예컨대, 예를 들어 폴리클로날 항-hPG 항체, 또는 본원에 기재된 어떠한 항-hPG 모노클로날 항체가 포함된다. 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 항체는 다양한 진단 및 치료 적용에서 유용하다. 적합한 참조 항-hPG 모노클로날 항체의 특수한 구체에는 본원에 기재된 항체, 예를 들어 제한하는 것은 아니지만 본원에 기재된 어떠한 세 개의 VL CDR 및 어떠한 세 개의 VH CDR을 포함하는 항체; VH 사슬이 SEQ ID NO:12 (mVH.3)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:13 (mVL.3)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체; 및 VH 사슬이 SEQ ID NO:14 (mVH.4)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:15 (mVL.4)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체; VH 사슬이 SEQ ID NO:59 (mVH.8)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:63 (mVL.8)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체; VH 사슬이 SEQ ID NO:60 (mVH.13)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:64 (mVL.13)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체; VH 사슬이 SEQ ID NO:61 (mVH.16)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:65 (mVL.16)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체; VH 사슬이 SEQ ID NO:62 (mVH.19)에 상응하는 아미노산 서열을 지니고, VL 사슬이 SEQ ID NO:66 (mVL.19)에 상응하는 아미노산 서열을 지니는 항체 또는 본원에 기재된 VH 및 VL 사슬의 어떠한 조합을 포함한다.

[0109] 적합한 참조 항체는 또한 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 및 1A11F2C9로 구성된 군으로부터 선택된 하이브리도마에 의해 생산된 항체; hPG의 잔기 10 내지 14 (SEQ ID NO:28), hPG의 잔기 9 내지 14 (SEQ ID NO:29), hPG의 잔기 4 내지 10 (SEQ ID NO:30), hPG의 잔기 2 내지 10 (SEQ ID NO:31), 또는 hPG의 잔기 2 내지 14 (SEQ ID NO:32)를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체; 및 hPG의 잔기 71 내지 74 (SEQ ID NO:33), hPG의 잔기 69 내지 73 (SEQ ID NO:34), hPG의 잔기 76 내지 80 (SEQ ID NO:35), 또는 hPG의 잔기 67 내지 74 (SEQ ID NO:36)를 포함하는 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0110] PG, 예를 들어 hPG와의 결합에 대해 본 발명의 모노클로날 항체와 경쟁하는 능력은 하기와 같은 경쟁 검정을

이용하여 시험될 수 있다. 96웰 플레이트를 1-10 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위 내에서 선택된 농도의 포획 항체 (참조 모노클로날 항체에 의해 인지된 에피토프와 상이한 프로가스트린의 N- 또는 C-말단 영역을 인지하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체)로 밤새 4°C (0.1 내지 1 $\mu\text{g/}$ 웰)에서 코팅하였다. PBS 중 0.1% Tween-20/0.1% BSA (차단 완충제)로 2시간 동안 22°C에서 차단시킨 후에, 재조합 인간 프로가스트린을 10pM 내지 1nM (10 내지 1000 pg/웰)의 농도로 첨가하고 2시간 동안 22°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 비오틴화된 참조 항-hPG 모노클로날 항체 또는 참조 모노클로날 항체를 함유하는 혼합물을 증가된 농도의 표지되지 않은 시험 항체와 함께 첨가하고 1시간 동안 22°C에서 인큐베이션하였다. 세척 후에, 호스래디쉬 퍼옥시다제에 대한 형광성 기질과 함께 1시간 동안 22°C에서 인큐베이션시킨 후에 광도계에서 상대 광 유닛 (RLU)을 정량함에 의해 검출을 수행하였다. 검정을 2회 수행하였다. 본 발명의 참조 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 항체는 hPG에 대한 참조 항체의 결합을 억제한다. 대조군 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 결합에 대해 효과적으로 경쟁할 수 있을 것이므로 결합된 표지의 감소에 의해 입증된 바와 같이, 참조 항체 결합을 현저하게 감소시킬 것이다 (예를 들어, 적어도 50% 만큼). 완전히 무관한 항체의 부재하에 (표지된) 참조 항체의 반응성은 높은 대조군 값이었을 것이다. 낮은 대조군 값은, 표지되지 않은 시험 항체를 프로가스트린을 발현시키는 세포와 인큐베이션한 후에 세포/항체 혼합물을 정확하게 동일한 유형의 표지된 대조군 항체와 함께 인큐베이션함에 의해 경쟁이 일어나서 표지된 항체의 결합을 감소시킬 때 획득되었을 것이다. 시험 검정에서, 시험 항체의 존재하에 표지된 항체 반응성의 현저한 감소는 시험 항체가 실질적으로 동일한 에피토프를 인지함을 나타낸다.

[0111] 결합 억제는 하기 식에 따라 계산된 억제 상수, 또는 Ki로서 표시될 수 있다:

[0112] $K_i = IC_{50} / (1 + [\text{참조 Ab 농도}] / K_d)$

[0113] 상기에서 시험 항체의 IC50은 참조 항체 결합의 50% 감소를 야기하는 시험 항체의 농도이고, Kd는 프로가스트린에 대한 참조 항체의 친화성의 측정치인, 참조 항체의 분리 상수이다. 본원에 기재된 항-hPG 모노클로날 항체와 경쟁하는 항체는 본원에 기재된 검정 조건하에 10 pM 내지 10 nM의 Ki를 지닐 수 있다.

[0114] 다양한 구체예에서, 본 발명의 표지되지 않은 항-hPG 모노클로날 항체는, 항-hPG 모노클로날 항체가 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.08 $\mu\text{g/ml}$, 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 또는 상기 임의의 값들 사이의 농도 범위로 사용될 때 (예컨대, 2 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 농도), 표지된 참조 항체의 결합을 적어도 40% 만큼, 적어도 50% 만큼, 적어도 60% 만큼, 적어도 70% 만큼, 적어도 80% 만큼, 적어도 90% 만큼, 100% 만큼, 또는 상기 임의의 값들 사이의 백분율 범위만큼 (예컨대, 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 표지된 참조 항체의 결합을 50% 내지 70% 만큼 감소시킨다) 감소시킨다.

[0115] 참조 항체와 임의의 시험 항체 (종 또는 아이소형과 무관) 사이의 항체 경쟁 연구를 수행함에 있어서, 당업자는 먼저 참조를 검출가능한 표지, 예컨대 비오틴 또는 효소적 (또는 심지어 방사성) 표지로 표지시켜 후속하는 확인을 가능하게 할 수 있다. 이러한 경우에, 표지된 참조 항체 (고정 농도 또는 증가된 농도)를 공지된 양의 프로가스트린과 함께 인큐베이션한다. 그 후, 표지되지 않은 시험 항체를 프로가스트린과 표지된 항체의 미리-결합된 복합체에 첨가한다. 결합된 표지의 세기를 측정한다. 시험 항체가 중복된 에피토프의 결합에 의해 표지된 항체와 경쟁하는 경우, 세기는 시험 항체의 부재하에 표지된 대조군 항체의 결합에 비해 감소될 것이다.

[0116] 경쟁 검정은 공지되어 있고 상기 기재된 검정에 필적하는 결과를 내도록 구성될 수 있다. 검정은 항체 경쟁에 기반한 다양한 면역학적 검정 중 어느 하나일 수 있고, 참조 항체는, 비오틴화된 항체의 경우 스트렙타비딘을 이용하거나 효소적 표지에 관해 색소 기질을 이용하는 것과 같이 (예컨대 퍼옥시다제 효소의 경우 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질) 이들의 표지를 검출함에 의해서나 단순히 방사성 표지 또는 형광 표지를 검출함에 의해 검출될 것이다.

[0117] 또한 진단 및 치료 적용에 이용하기 위해 유도체화되거나, 공유적으로 변형되거나, 다른 분자에 컨쥬게이션된 항-hPG 모노클로날 항체가 본원에 포함된다. 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 유도체화된 항체는, 예컨대, 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 포스포릴화, 아마이드화, 공지된 보호/차단기에 의해 유도체화, 단백질질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질로의 결합 등에 의해 변형된 항체를 포함한다. 비제한적으로 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하는 공지된 기술에 의해 수많은 어떠한 화학적 변형이 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비-표준적인 아미노산을 함유할 수 있다.

[0118] 또 다른 예에서, 본 발명의 항체는 폴리(에틸렌글리콜) (PEG) 모이어티(moiety)에 부착될 수 있다. 특수한 구체예에서, 항체는 항체 단편이고, PEG 모이어티는 항체 단편에 위치한 임의의 이용가능한 아미노산 측쇄 또

는 말단 아미노산 작용기, 예를 들어 어떠한 유리 아미노, 이미노, 티올, 히드록실 또는 카르복실기를 통해 부착된다. 그러한 아미노산은 항체 단편에서 자연적으로 발생할 수 있거나 재조합 DNA 방법을 이용하여 단편 내로 공학처리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[U.S. Patent No. 5,219,996] 참조. 두 개 이상의 PEG 분자를 부착시키기 위해 다수의 부위를 이용할 수 있다. PEG 모이어티는 항체 단편에 위치한 하나 이상의 시스테인 잔기의 티올기를 통해 공유적으로 결합될 수 있다. 티올기가 부착점으로서 이용된 경우, 적절하게 활성화된 이펙터 모이어티, 예를 들어 말레이미드 및 시스테인 유도체와 같은 티올 선택적인 유도체가 이용될 수 있다.

[0119] 특수한 예에서, 항-hPG 모노클로날 항체 컨주게이트는 폐결핵, 즉, 예컨대 EP0948544호에 기재된 방법에 따라 여기에 공유적으로 부착된 PEG (폴리(에틸렌글리콜))을 지니는 변형된 Fab' 단편이다. 또한, 문헌 [Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.)), Plenum Press, New York, 1992]; Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); and Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); and Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545] 참조. PEG는 흔히 영역에서 시스테인에 부착될 수 있다. 일례에서, PEG-변형된 Fab' 단편은 변형된 흔히 영역에서 단일 티올기에 공유적으로 결합된 말레이미드기를 지닌다. 리신 잔기가 말레이미드기에 공유적으로 결합될 수 있고 리신 잔기 상의 아민기 각각에 분자량이 약 20,000 Da인 메톡시폴리(에틸렌글리콜)폴리머가 부착될 수 있다. Fab' 단편에 부착된 PEG의 총 분자량은 따라서 약 40,000 Da일 수 있다.

[0120] 항-hPG 모노클로날 항체는 진단 적용에 유용한 표지된 항체를 포함한다. 항체는, 예를 들어 특수한 세포, 조직, 또는 혈청에서 대상 표적의 발현을 검출하거나; 예컨대 주어진 치료 계획의 효능을 결정하기 위해 임상적 시험 절차의 일부로서 면역학적 반응의 발생 또는 진행을 모니터링하기 위해 진단적으로 이용될 수 있다. 검출은 검출가능한 물질 또는 "표지"에 대한 항체의 커플링에 의해 촉진될 수 있다. 표지는 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체에 직접 또는 간접적으로 컨주게이션될 수 있다. 표지 자체가 검출가능하거나 (예컨대, 방사성동위원소 표지, 동위원소 표지, 또는 형광 표지), 효소적 표지의 경우, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉매화할 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보조군(prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 방사성 물질, 다양한 양전자 방출 토모그래피를 이용한 양전자 방출 급속, 및 비방사성 상자성(paramagnetic) 금속 이온을 포함한다. 검출가능한 물질은 항체 (또는 이의 단편)에 직접적으로 또는 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 중간체 (예컨대, 예를 들어 당 분야에 공지된 링커)를 통해 간접적으로 커플링되거나 컨주게이션될 수 있다. 효소적 표지의 예는 루시페라제 (예컨대, 개똥벌레 루시페라제 및 박테리아 루시페라제; U.S. Patent No. 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 데하이드로게나제, 우레아제, 피옥시다제, 예컨대 호스래디쉬 피옥시다제 (HRPO), 알칼린 포스파타제, β -갈락토시다제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코아미라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 (예컨대, 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제 (예컨대, 우리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토피옥시다제, 마이크로피옥시다제 등을 포함한다. 적합한 보조군 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 발광 물질의 예는 움벨리페론 (umbelliferone), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 또는 피코에리트린 등을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하며; 생물발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린 및 아에쿠오린을 포함하고; 적합한 동위원소 물질의 예는 ^{13}C , ^{15}N , 및 중수소를 포함하며; 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In 또는 ^{99}Tc 를 포함한다.

[0121] 모든 기원의 종의 항-hPG 모노클로날 항체가 본 발명에 포함된다. 비제한적인 예시적인 천연 항체는 인간, 유인원, 닭, 염소, 토끼 및 설치류 (예컨대, 래트, 마우스 및 햄스터)로부터 유래된 항체를 포함한다 (예컨대, 문헌[Lonberg *et al.*, W093/12227; U.S. Pat. No. 5,545,806; and Kucherlapati, *et al.*, W091/10741; U.S. Pat. No. 6,150,584] 참조, 이들은 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다). 천연 항체는 항원, 예를 들어 폴리펩티드로 면역된 후에 숙주 동물에 의해 생산된 항체이다.

[0122] **핵산 및 발현 시스템**

[0123] 본 발명은 항-hPG 모노클로날 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자를 엔코딩하는 핵산 분자, 그러한 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포를 포함한다.

[0124] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 숙주 세포에서 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 유전자의 재조합 발현에 의해

제조될 수 있다. 재조합에 의해 항체를 발현시키기 위해, 숙주 세포를 항체의 면역글로불린 경쇄 및 중쇄를 엔코딩하는 DNA 단편을 지니는 하나 이상의 재조합 발현 벡터로 트랜스펙션시킴으로써 경쇄 및 중쇄가 숙주 세포에서 발현되고, 임의로 숙주 세포가 배양되는 배지로 분비되며, 배지로부터 항체를 회수할 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄 유전자를 획득하고, 이러한 유전자를 재조합 발현 벡터에 혼입시키며 벡터를 숙주 세포에 도입하기 위해 표준 재조합 DNA 방법, 예컨대 문헌[Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Greene Publishing Associates, 1989) and in U.S. Patent No. 4,816,397]에 기재된 방법을 이용한다.

[0125] 상기 항-hPG 모노클로날 항체를 엔코딩하는 핵산을 생성하기 위해, 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 DNA 단편을 먼저 획득한다. 이러한 DNA는, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여, 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 엔코딩하는 생식세포계열 DNA 또는 cDNA의 증폭 및 변형에 의해 획득될 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식세포계열 DNA 서열은 당 분야에 공지되어 있다 (예컨대, 문헌[Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; the "VBASE" human germline sequence database; *see also* Kabat, E. A. *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198; and Cox *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836] 참조; 각각의 내용이 본원에 참조로서 포함된다).

[0126] 항-hPG 모노클로날 항체-관련 V_H 및 V_L 세그먼트를 엔코딩하는 DNA 단편을 일단 획득하면, 이러한 DNA 단편을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작하여, 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시킬 수 있다. 이러한 조작에서, V_L - 또는 V_H -엔코딩 DNA 단편은 또 다른 단백질을 엔코딩하는 또 다른 DNA 단편, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커에 작동적으로 연결된다. 본 문맥에서 사용된 용어 "작동적으로 연결된"은 두 개의 DNA 단편이 결합하여 두 개의 DNA 단편에 의해 엔코딩된 아미노산 서열이 인-프레임(in-frame) 유지됨을 의미한다.

[0127] V_H 영역을 엔코딩하는 분리된 DNA는 V_H -엔코딩 DNA를 중쇄 불변 영역을 엔코딩하는 또 다른 DNA 분자 (CH_1 , CH_2 , CH_3 및, 임의로, CH_4)에 작동적으로 연결시킴에 의해 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당 분야에 알려져 있고 (예컨대, 문헌[Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조) 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 획득될 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있으나, 특정 구체예에서 IgG₁ 또는 IgG₄ 불변 영역이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, V_H -엔코딩 DNA는 중쇄 CH_1 불변 영역만을 엔코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0128] V_L 영역을 엔코딩하는 분리된 DNA는 V_L -엔코딩 DNA를 경쇄 불변 영역, CL을 엔코딩하는 또 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴에 의해 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당 분야에 공지되어 있고 (예컨대, 문헌[Kabat, E. A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)] 참조) 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편은 표준 PCR 증폭에 의해 획득될 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있으나, 특정 구체예에서, 카파 불변 영역이다. scFv 유전자를 생성하기 위해, V_H - 및 V_L -엔코딩 DNA 단편을, 예컨대 아미노산 서열 (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 99)을 엔코딩하는, 가요성 링커를 엔코딩하는 또 다른 단편에 작동적으로 연결시켜, V_H 및 V_L 서열이, 가요성 링커에 의해 결합된 V_L 및 V_H 영역을 지니는, 연속적인 단일 사슬 단백질로서 발현될 수 있게 한다 (예컨대, 문헌[Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554] 참조).

[0129] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체를 발현시키기 위해서, 상기 기재된 대로 획득된 부분 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 엔코딩하는 DNA를 발현 벡터에 삽입하여 유전자가 전사 및 번역 조절 서열에 작동적으로 연결되게 한다. 이에 관해, 용어 "작동적으로 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 번

역을 조절하는 이들의 의도된 기능을 발휘하도록 항체 유전자가 벡터내로 라이게이션된 것을 의미한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 이용된 발현 숙주 세포에 적합하게 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 분리된 벡터에 삽입될 수 있거나, 보다 전형적으로, 둘 모두의 유전자가 동일한 발현 벡터에 삽입된다.

[0130] 항체 유전자는 표준 방법에 의해 발현 벡터에 삽입된다 (예컨대, 항체 유전자 단편 및 벡터 상에서 상보적 제한 부위의 라이게이션, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 블런트(blunt) 말단 라이게이션). 항-hPG 모노클로날 항체-관련 경쇄 또는 중쇄 서열을 삽입하기 전에, 발현 벡터는 이미 항체 불변 영역 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 항-hPG 모노클로날 항체-관련 V_H 및 V_L 서열을 전장 항체 유전자로 전환시키는 한 가지 접근법은, 이들을 이미 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 각각 엔코딩하는 발현 벡터에 삽입하여 V_H 세그먼트가 벡터 내에서 CH 세그먼트(들)에 작동적으로 결합되게 하고 V_L 세그먼트가 벡터 내에서 CL 세그먼트에 작동적으로 결합되게 하는 것이다. 추가로 또는 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터 항체 사슬의 분비를 촉진하는 신호 펩티드를 엔코딩할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 벡터내로 클로닝될 수 있어서, 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 인-프레임 연결된다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드일 수 있다 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드).

[0131] 항체 사슬 유전자 외에, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 지닌다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 그 밖의 발현 조절 엘리먼트 (예컨대, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다. 그러한 조절 서열은, 예를 들어 문헌[Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990)]에 기재되어 있다. 당업자는 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 설계가 형질전환되는 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자들에 의존적일 수 있음을 이해할 것이다. 포유동물 숙주 세포 발현에 적합한 조절 서열은 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 유도하는 바이러스 엘리먼트, 예컨대 시토메갈로바이러스 (CMV) (예컨대 CMV 프로모터/인핸서), 원숭이 바이러스 40 (SV40) (예컨대 SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)) 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서를 포함한다. 바이러스 조절 엘리먼트 및 이의 서열의 추가의 설명을 위해서는, 예컨대 문헌[U.S. Patent No. 5,168,062 by Stinski, U.S. Patent No. 4,510,245 by Bell *et al.*, and U.S. Patent No. 4,968,615 by Schaffner *et al.*]을 참조한다.

[0132] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열 외에, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예컨대, 복제 기점) 및 선택가능한 마커 유전자와 같은 추가의 서열을 지닐 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 촉진시킨다 (예컨대, 문헌[U.S. Patents Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*] 참조). 예를 들어, 전형적으로 선택가능한 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에 G418, 하이그로마이신 또는 메토티렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여한다. 적합한 선택가능한 마커 유전자는 디하이드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 유전자 (메토티렉세이트 선택/증폭된 DHFR^r 숙주 세포에 이용하기 위해) 및 neo 유전자 (G418 선택을 위해)를 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 엔코딩하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의해 숙주 세포로 트랜스펙션한다. 다양한 형태의 용어 "트랜스펙션"은 외인성 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 도입하는데 일반적으로 이용되는 광범한 기술, 예컨대 일렉트로포레이션, 리포펙션, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 등을 포함한다.

[0133] 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시킬 수 있다. 특정 구체예에서, 항체의 발현은 적절하게 폴딩되고 면역학적으로 활성인 항체의 최적의 분비의 진핵 세포, 예컨대 포유동물 숙주 세포에서 수행된다. 본 발명의 재조합 항체를 발현시키는 예시적인 포유동물 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO 세포) (예컨대 문헌[Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621]에 기재된 DHFR 선택가능한 마커를 지니도록 이용된 문헌[Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재된 DHFR^r CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 엔코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포에 도입되는 경우, 숙주 세포를, 숙주 세포에서 항체의 발현 또는 숙주 세포가 성장하는 배양 배지로 항체의 분비를 허용하기에 충분한 기간 동안 배양함에 의해 항체가 생산된다. 표준 단백질 정제 방법을 이용하여 항체를 배양 배지로부터 회수할 수 있다. 또한 숙주 세포를 이용하여 완전한 항체의 부분, 예컨대 Fab 단편 또는 scFv 분자를 생성할 수 있다. 상기 절차에 대한 변형이 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 숙주 세포를 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체의 경쇄 또는 중쇄 중

어느 쪽 (그러나 둘 모두는 아님)을 엔코딩하는 DNA로 트랜스펙션하는 것이 바람직할 수 있다.

- [0134] 재조합 DNA 기술은 또한 hPG에 결합하는데 불필요한 경쇄 및 중쇄 중 어느 쪽 또는 둘 모두를 엔코딩하는 DNA의 일부 또는 전부를 제거하는데 이용될 수 있다. 그러한 트렁케이션된 DNA 분자로부터 발현된 분자가 또한 본 발명의 항체에 포함된다.
- [0135] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체의 재조합 발현을 위해, 숙주 세포는 본 발명의 두 개의 발현 벡터로 공-트랜스펙션될 수 있는데, 첫 번째 벡터는 중쇄 유래 폴리펩티드를 엔코딩하고 두 번째 벡터는 경쇄 유래 폴리펩티드를 엔코딩한다. 두 개의 벡터는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있거나, 이들은 분리된 선택가능한 마커를 각각 함유할 수 있다. 대안적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 모두를 엔코딩하는 단일 벡터를 이용할 수 있다.
- [0136] 일단 항-hPG 모노클로날 항체의 하나 이상의 부분을 엔코딩하는 핵산이 수득되면, 예를 들어 상이한 CDR 서열을 지니는 항체, Fc 수용체에 감소된 친화성을 갖는 항체 또는 상이한 서브부류의 항체를 엔코딩하는 핵산을 생성하기 위해, 코딩 서열내로 추가의 변형 또는 돌연변이를 도입시킬 수 있다.
- [0137] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 또한 화학적 합성에 의해 생산될 수 있다 (예컨대, 문헌[Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.]에 기재된 방법에 의해). 무-세포 플랫폼(cell-free platform)을 이용하여 변이 항체가 또한 생성될 수 있다 (예컨대, 문헌[Chu *et al.*, Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)] 참조).
- [0138] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체가 재조합 발현에 의해 생산되면, 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해, 예를 들어, 크로마토그래피 (예컨대, 이온 교환, 친화성, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해성, 또는 단백질의 정제를 위한 어떠한 다른 표준 기술에 의해, 이것을 정제할 수 있다. 추가로, 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체 또는 이의 단편은 정제를 촉진하기 위해 본원에 기재되거나 당 분야에 달리 공지된 이종성 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.
- [0139] 일단 분리되면, 항-hPG 모노클로날 항체를 요망에 따라, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피 (예컨대, 문헌[Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology] 참조 (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)), 또는 Superdex™ 75 컬럼 상에서의 겔 여과 크로마토그래피 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)에 의해 추가로 정제할 수 있다.
- [0140] 본 발명은 항-hPG 모노클로날 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 중쇄 및 경쇄 유전자를 엔코딩하는 유전자를 발현시키도록 재조합 DNA 기술을 이용하여 공학처리된 세포 또는 적합한 유기체로부터 유래되고 요망되는 항체를 생산하는 능력에 대해 선택된 하이브리도마일 수 있다.
- [0141] 항-PG 모노클로날 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포는 하이브리도마일 수 있다. 하이브리도마를 생성하는 방법은 당 분야에 공지되어 있고 (예컨대, 문헌[Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495] 참조) 예가 하기에 제공된다. 일반적으로, 마우스와 같은 숙주 동물을 대상 펩티드와 같은 면역원으로 면역시켜 면역원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 생산하는 림프구, 예를 들어 비장 세포의 발생을 유도한다. 대안적으로, 비장 세포, 림프절 세포, 또는 말초혈 림프구를 포함하는 분리된 림프구를 시험관내에서 면역시킬 수 있다. 그 후, 림프구를 골수종 세포주와 같은 무한증식 세포주와 적합한 융합제 (예컨대, 폴리에틸렌 글리콜)를 이용하여 융합시켜 하이브리도마 세포주를 형성한다. 적합한 무한증식 세포주는 무린, 소 또는 인간과 같은 포유동물 기원의 것일 수 있다. 그 후, 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 무한증식 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 임의의 적합한 배지에서 배양한다. 예를 들어, 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 부모 세포를 이용하는 경우, 융합체는 융합되지 않은 부모 세포의 성장을 억제하는 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 함유하는 배지("HAT" 배지)에서 성장할 수 있다.
- [0142] 일부 구체예에서, N-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 하이브리도마 43B9G11 (항-hPG MAb 1 생산), WE5H2G7 (항-hPG MAb 2 생산), 6B5B11C10 (항-hPG MAb 3 생산), 20D2C3G2 (항-hPG MAb 4 생산), 1E9A4A4 (항-hPG MAb 15 생산), 1E9D9B6 (항-hPG MAb 16 생산), 1C8D10F5 (항-hPG MAb 17 생산), 1A7C3F11 (항-hPG MAb 18 생산), 1B3B4F11 (항-hPG MAb 19 생산), 및 1C11F5E8 (항-hPG MAb 20 생산)로부터 수득될 수 있는 모노클로날 항체의 V_L에 일치하는 가변 경쇄 (V_L) CDR을 지닌다.
- [0143] 일부 구체예에서, N-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 상기 하이브리도마로부터 수득될 수 있는 모노클로날 항

체의 V_L 및 V_H CDR에 일치하는 V_L 및 V_H CDR을 지닌다.

- [0144] 일부 구체예에서, C-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 하이브리도마 1B4A11D11 (항-hPG MAb 5 생산), 1B6A11F2 (항-hPG MAb 6 생산), 1B11E4B11 (항-hPG MAb 7 생산), 1C10D3B9 (항-hPG MAb 8 생산), 1D8F5B3 (항-hPG MAb 9 생산), 1E1C7B4 (항-hPG MAb 10 생산), 2B4C8C8 (항-hPG MAb 11 생산), 2B11E6G4 (항-hPG MAb 12 생산), 2C6C3C7 (항-hPG MAb 13 생산), 2H9F4B7 (항-hPG MAb 14 생산), 1F11F5E10 (항-hPG MAb 21 생산), 1F11F5G9 (항-hPG MAb 22 생산), 및 1A11F2C9 (항-hPG MAb 23 생산)로부터 취득될 수 있는 모노클로날 항체의 V_L 에 일치하는 V_L CDR을 지닌다.
- [0145] 일부 구체예에서, C-말단 항-hPG 모노클로날 항체는 상기 하이브리도마로부터 취득될 수 있는 모노클로날 항체의 V_L 및 V_H CDR에 일치하는 V_L 및 V_H CDR을 지닌다.
- [0146] 구체예에서, SEQ ID NO:12를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:13을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 구체예에서, SEQ ID NO:14를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:15을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 구체예에서, SEQ ID NO:59를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:63을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 구체예에서, SEQ ID NO:60을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:64를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 구체예에서, SEQ ID NO:61을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:65를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다. 구체예에서, SEQ ID NO:62를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:66을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-hPG 항체를 생산할 수 있는 숙주 세포가 제공된다.
- [0147] 일부 구체예에서, 본 발명의 숙주 세포는 SEQ ID NO:12, 14, 59, 60, 61, 및 62의 중쇄 가변 영역 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 핵산; 및 SEQ ID NO:13, 15, 63, 64, 65, 및 66의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열로부터 선택된 핵산을 포함한다. 일부 구체예에서, 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:16, 18, 67, 68, 69 및 70으로부터 선택된 핵산 서열에 의해 엔코딩된다. 일부 구체예에서, 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:17, 19, 71, 72, 73, 및 74로부터 선택된 핵산 서열에 의해 엔코딩된다.
- [0148] 일부 구체예에서, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 중쇄 가변 영역을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다. 특수한 구체예는 SEQ ID NO:21, 23, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 및 94로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 경쇄 가변 영역을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다. 특수한 구체예는 SEQ ID NO:22, 24, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 및 95로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 지니는 폴리펩티드를 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0149] **항-hPG 모노클로날 항체의 생물학적 활성**
- [0150] PG는 CRC 종양 세포 생존 및/또는 증식과 관련이 있었다. 어떠한 작동 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 중화성 항-PG 모노클로날 항체는 PG와의 결합을 통해 신호전달 파트너(들)와 상호작용하는 PG의 능력을 차단하거나 억제하는 것으로 여겨진다. 이것은, 다시, 세포 증식, 감소된 세포 분화 및/또는 감소된 세포 사멸, 및/또는 종양 성장과 같은, 프로가스트린에 대한 세포 반응을 차단하거나 억제한다. 이러한 활성의 결과로서, 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날 항체는 PG와 결합하고 PG-의존적 신호전달을 차단하기 위해 다양한 시험관내, 생체내 및 생체의 환경에서 이용될 수 있다.
- [0151] 따라서, 본 발명은 CRC 세포에서 PG-의존적 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 상기 방법은 CRC 세포를 CRC 세포의 하나 이상의 PG-유도된 반응, 예컨대 CRC 세포의 증식 및/또는 생존을 억제하기에 효과적인 양의 중화성 항-PG 모노클로날 항체와 접촉시키거나, 세포 집단을 이러한 항체에 노출시키는 것을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 증식, 또는 이의 억제는 경시적인 세포 수, 종양 수, 또는 종양 크기의 증가를 측정하는 검정에 따라 측정될 수 있다. 세포 및 종양의 증식 억제에 대한 검정은 당 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0152] PG-의존적 신호전달을 차단하는 것은 세포 사멸을 증가시킴에 의해 CRC 세포의 생존을 억제할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 CRC 세포 생존의 억제는 시간에 따른 (예컨대, 24 또는 48시간) 살아 있는 암 세포 수의 감소를 측정함에 의해 측정될 수 있다. 세포 사멸에 대한 검정은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 추가로, 세

포 생존 검정의 예가 본원에 제공되어 있다.

[0153] 연구들은 CRC 종양 세포에서 PG-의존적 신호전달을 억제하는 것이 프로그래밍된 세포 사멸, 또는 아폽토시스의 계기가 되어 CRC 세포의 생존을 억제할 수 있다고 추가로 제안한다. 아폽토시스의 유도는 프로- 또는 항-아폽토틱 활성을 지니는 유전자의 발현에서의 변화를 측정하는 것을 포함하나 이로 제한되지 않는 당 분야에 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, Bax와 같은 프로-아폽토틱 유전자의 발현에 있어서 시간에 따른 (예컨대, 48시간) 증가는 아폽토시스의 증가를 나타낸다. 유사하게, 예를 들어, 비제한적으로 Bcl-2와 같은 항-아폽토틱 유전자의 발현에 있어서 시간에 따른 (예컨대, 72시간 또는 96시간) 감소는 아폽토시스의 증가를 나타낸다. 실시간 정량적 PCR과 같이 유전자 발현의 변화를 측정하는 기술이 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[Hollande *et al.*, WO 2007/135542] 참조.

[0154] 프로가스트린-의존적 신호전달의 억제는 또한 세포 분화를 자극한다. 따라서, CRC 세포의 증식 및/또는 생존을 억제하는 방법은 시험관내 또는 생체내에서 CRC 세포의 분화를 유도하기에 효과적인 양의 중화성 항-PG 모노클로날 항체를 투여하는 것을 포함한다. CRC 세포의 분화는, 예를 들어, 비제한적으로 Muc-2와 같은 세포 분화에 대한 유전적 마커 또는 분화된 장 세포 (예컨대, 술잔 세포)에 대한 그 밖의 마커의 발현에 있어서 시간에 따른 (예컨대, 24 또는 48시간) 증가를 측정함에 의해 측정될 수 있다. 유전자 발현에서의 변화는 당 분야에 공지된 어떠한 수단에 의해 측정될 수 있다. 예컨대, 문헌[Hollande *et al.*, WO 2007/135542] 참조. 발현 또는 억제가 PG 의존적인 그 밖의 유전자, 예컨대 ICAT이 또한 표준 방법을 이용하여 검정될 수 있다. 전문 문헌 참조.

[0155] **약학적 조성물**

[0156] 항-PG 모노클로날 항체는 조성물로 제형화될 수 있다. 임의로, 조성물은 하나 이상의 추가의 치료제를 포함할 수 있고, 예컨대 하기 기재된 두 번째 치료제가 본원에서 제공된다. 조성물은 일반적으로 약학적으로 허용되는 담체를 관례대로 포함할 살균 약학적 조성물의 일부로서 제공될 것이다. 이러한 조성물은 (이것을 환자에게 투여하는 요망되는 방법에 따라) 임의의 적합한 형태일 수 있다.

[0157] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체는 경구, 경피, 피하, 비내, 정맥내, 근내, 안내, 국소, 수막내 및 뇌실내와 같은 다양한 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 어떠한 주어진 경우에 투여에 가장 적합한 경로는 특정 항체, 피검체, 및 질환의 특성과 중증도 및 환자의 건강 상태에 의존적일 것이다. 항체는 수용액으로서 제형화되고 피하 주입에 의해 투여될 수 있다.

[0158] 약학적 조성물은 용량 당 소정량의 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체를 함유하는 유닛 용량 형태로 편리하게 제공될 수 있다. 그러한 유닛은, 예를 들어 비제한적으로 5 mg 내지 5 g, 예를 들어 10 mg 내지 1 g, 또는 20 내지 50 mg을 함유할 수 있다. 본 발명에 사용되는 약학적으로 허용되는 담체는, 예컨대 치료되는 질환 또는 투여 경로에 따라 광범한 형태를 취할 수 있다.

[0159] 본 발명의 약학적 조성물은 요망되는 순도를 지니는 항체를 당 분야에서 전형적으로 이용되는 임의의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (이들 모두는 본원에서 "담체"로서 언급된다), 즉 완충제, 안정화제, 보존제, 등장화제, 비이온성 세척제, 항산화제, 및 그 밖의 다양한 첨가제와 혼합시킴에 의해 냉동건조된 제형 또는 수용액으로서 저장을 위해 제조될 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980)] 참조. 그러한 첨가제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용체에게 무독성이어야 한다.

[0160] 완충제는 생리적 조건에 가까운 범위로 pH를 유지하는 것을 돕는다. 이들은 약 2 mM 내지 약 50 mM의 범위의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 완충제는 유기산 및 무기산 둘 모두와 이들의 염, 예컨대 시트레이트 완충제 (예컨대, 모노소듐 시트레이트-디소듐 시트레이트 혼합물, 시트르산-트리소듐 시트레이트 혼합물, 시트르산-모노소듐 시트레이트 혼합물 등), 숙시네이트 완충제 (예컨대, 숙신산-모노소듐 숙시네이트 혼합물, 숙신산-소듐 히드록사이드 혼합물, 숙신산-디소듐 숙시네이트 혼합물 등), 타르트레이트 완충제 (예컨대, 타르타르산-소듐 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-포타슘 타르트레이트 혼합물, 타르타르산-소듐 히드록사이드 혼합물 등), 푸마레이트 완충제 (예컨대, 푸마르산-모노소듐 푸마레이트 혼합물, 푸마르산-디소듐 푸마레이트 혼합물, 모노소듐 푸마레이트-디소듐 푸마레이트 혼합물 등), 글루코네이트 완충제 (예컨대, 글루콘산-소듐 글리코네이트 혼합물, 글루콘산-소듐 히드록사이드 혼합물, 글루콘산-포타슘 글리코네이트 혼합물 등), 옥살레이트 완충제 (예컨대, 옥살산-소듐 옥살레이트 혼합물, 옥살산-소듐 히드록사이드 혼합물, 옥살산-포타슘 옥살레이트 혼합물 등), 락테이트 완충제 (예컨대, 락트산-소듐 락테이트 혼합물, 락트산-소듐 히드록사이드 혼합물, 락트산-포타슘 락테이트 혼합물 등) 및 아세테이트 완충제 (예컨대, 아세트산-소듐 아

세데이트 혼합물, 아세트산-소듐 히드록사이드 혼합물 등)를 포함한다. 추가로, 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제 및 트리메틸아민 염, 예컨대 Tris를 이용할 수 있다.

[0161] 미생물 성장을 저지하기 위해, 보존제가 첨가될 수 있고, 0.2%-1% (w/v)의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레솔, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸 벤질 암모늄 클로라이드, 벤즈알코늄 할라이드 (예컨대, 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드), 헥사메토늄 클로라이드, 및 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥사놀, 및 3-펜탄올을 포함한다. 때로 "안정화제"로서 공지된 등장화제를 첨가하여 본 발명의 액체 조성물의 등장성을 확보할 수 있고 다가 당 알코올, 예를 들어 삼가 또는 고가 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다. 안정화제는 벌크제(bulking agent)로부터 치료제를 용해시키거나 변성 또는 용기 벽으로의 부착을 방지하는데 도움이 되는 첨가제까지 기능에 있어서 다양할 수 있는 광범한 범주의 부형제를 지칭한다. 전형적인 안정화제는 다가 당 알코올 (상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 아르기닌, 리신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌, 등, 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 락토스, 트레할로스, 스타치오스, 만니톨, 소르비톨, 크실리톨, 리비톨, 마이오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등, 시클리톨, 예컨대 이노시톨 포함; 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 폴리머; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타치온, 티옥산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 소듐 티오 설페이트; 저 분자량 폴리펩티드 (예컨대, 10개 또는 그 미만 잔기의 펩티드); 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈 모노사카라이드, 예컨대 크실로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스; 디사카라이드, 예컨대 락토스, 말토스, 수크로스 및 트리사카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트란일 수 있다. 안정화제는 활성 단백질의 중량 부 당 0.1 내지 10,000 중량으로 존재할 수 있다.

[0162] 비이온성 계면활성제 또는 세척제 ("습윤제"로도 알려짐)는 교반-유도 응집에 대해 치료 단백질을 보호할 뿐만 아니라 치료제를 용해시키는 것을 돕기 위해 첨가될 수 있고, 이것은 또한 제형이 단백질 변성을 야기하지 않으며 응력이 가해진 전단 표면에 노출되게 한다. 적합한 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉 폴리올, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (TWEEN®-20, TWEEN®-80 등)를 포함한다. 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 예를 들어 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재할 수 있다.

[0163] 추가의 여러 부형제는 벌크제 (예컨대, 전분), 킬레이팅제 (예컨대, EDTA), 항산화제 (예컨대, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 및 공용매를 포함한다.

[0164] 항-PG 모노클로날 항체는 단독으로, 하나 이상의 항-PG 모노클로날 항체의 혼합물로서, CRC를 치료하는데 유용한 다른 작용제와 혼합하거나 조합하여, 또는 CRC를 위한 다른 요법에 보조하여 투여될 수 있다. 적합한 조합 및 보조 요법이 하기에 제공된다.

[0165] 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날 항체 (항체 컨주게이트 포함)를 함유하는 약학적 키트가 본 발명에 포함된다. 약학적 키트는 중화성 항-hPG 모노클로날 항체 (예컨대, 냉동건조된 형태 또는 수용액으로서) 및 하기 중 하나 이상을 포함하는 패키지이다:

[0166] ? 제 2 치료제, 예를 들어 하기 기재된 바와 같음;

[0167] ? 항-hPG 모노클로날 항체를 투여하기 위한 장치, 예를 들어 펜, 바늘 및/또는 주사기; 및

[0168] ? 항체가 냉동건조된 형태일 경우, 항체를 재현탁하기 위한 약학적 등급의 물 또는 완충제.

[0169] 항-hPG 모노클로날 항체의 각각의 유닛 용량은 별도로 패키징될 수 있고, 키트는 하나 이상의 유닛 용량을 함유할 수 있다 (예컨대, 두 개의 유닛 용량, 세 개의 유닛 용량, 네 개의 유닛 용량, 다섯 개의 유닛 용량, 여덟 개의 유닛 용량, 열 개의 유닛 용량, 또는 그 초과). 특수한 구체예에서, 하나 이상의 유닛 용량은 주사기 또는 펜에 각각 하우징된다.

[0170] **유효한 투여량**

[0171] 중화성 항-PG 모노클로날 항체 또는 이의 조성물은 일반적으로 의도된 결과를 달성하기에 효과적인 양, 예를 들어 CRC의 치료가 필요한 피검체에서 CRC를 치료하기에 효과적인 양으로 이용될 것이다. 중화성 항-PG 모노클로날 항체를 포함하는 약학적 조성물은 환자 (예컨대, 인간 피검체)에게 치료적으로 유효한 투여량으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 대로, "치료적으로 유효한" 투여량은 치료적 이익을 제공하는 양이다. CRC

요법에 관해, 치료적 이익은 CRC 진행(예컨대, 결장직장암의 한 단계로부터 다음 단계로)의 지연 또는 정지, CRC의 증상 또는 징후의 악화(aggravation) 또는 악화(deterioration)의 지연 또는 정지, CRC 중증도의 감소, CRC의 완화 유도, CRC 종양 세포 증식, CRC 종양 크기 또는 CRC 종양 수의 억제 또는 PG 혈청 수준의 감소 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함하는 CRC의 어떠한 개선을 의미한다.

- [0172] 투여되는 중화성 항-PG 모노클로날 항체의 양은 치료되는 CRC의 특성 및 단계, 투여 형태, 경로 및 부위, 치료 계획 (예컨대, 제 2 치료제가 사용되는지 여부), 치료되는 특정 피검체의 연령 및 상태, 항-PG 모노클로날 항체로 치료되는 환자의 민감성을 포함하는 다양한 인자에 의존적일 것이다. 적절한 투여량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 궁극적으로, 의사가 사용되는 적절한 투여량을 결정할 것이다. 이러한 투여량은 적절하다면 종종 반복될 수 있다. 부작용이 발생하면, 투여량 및/또는 투여 빈도를 전형적인 임상적 관례에 따라 변경하거나 감소시킬 수 있다. 적절한 투여량 및 치료 계획은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 요법의 경과를 모니터링함에 의해 확립될 수 있다.
- [0173] 유효한 투여량은 시험관내 검정으로부터 초기에 산정될 수 있다. 예를 들어, 동물에 사용되는 초기 용량은 시험관내에서 측정된 프로가스트린에 대한 항체의 결합 친화성에서의 또는 그 초과와 항-PG 모노클로날 항체의 순환 혈중 또는 혈청 농도를 달성하도록 제형화될 수 있다. 특정 항체의 생체이용성을 고려하여 그러한 순환 혈중 또는 혈청 농도를 달성하는 투여량을 계산하는 것은 충분히 당업자의 역량 내에 있다. 지침용으로, 독자는 문헌[Fingl & Woodbury, "General Principles" in *Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, Chapter 1, latest edition, Pagamonon Press], 및 본원에 인용된 참조문헌을 참조한다.
- [0174] 초기 투여량은 동물 모델과 같은 생체내 데이터로부터 확립될 수 있다. CRC를 치료하기 위한 화합물의 효능을 검사하는데 유용한 동물 모델은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 추가로, CRC의 동물 모델은 하기 실시예에 기재되어 있다. 당업자는 이러한 정보를 관례대로 적용시켜 인간 투여에 적합한 투여량을 결정할 수 있다.
- [0175] 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날 항체의 유효한 용량은 치료되는 질환, 투여 경로 및 피검체의 연령, 체중 및 상태에 따라 단일 (예컨대, 볼루스(bolus)) 투여, 다중투여 또는 연속 투여 당 약 0.001 내지 약 75 mg/kg 또는 단일 (예컨대, 볼루스) 투여, 다중투여 또는 연속 투여 당 0.01-5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈청 농도를 달성하는 범위, 또는 그 안에 있는 임의의 유효한 범위 또는 값일 수 있다. 특정 구체예에서, 각각의 용량은 체중 1 킬로그램 당 약 0.5 μg 내지 약 50 μg , 예를 들어 체중 1 킬로그램 당 약 3 μg 내지 약 30 μg 일 수 있다.
- [0176] 투여량, 빈도 및 지속기간은 환자의 연령, 체중 및 질환 상태와 같은 다양한 인자에 의존적일 것이다. 투여를 위한 치료 계획은 2주 내지 무기한, 2주 내지 6개월, 3개월 내지 5년, 6개월 내지 1 또는 2년, 8개월 내지 18개월 등의 기간 동안 계속될 수 있다. 임의로, 치료 계획은, 예컨대 하루 한 번, 하루 두 번, 2일, 3일, 5일, 1주일, 2주일 또는 1개월 마다 반복 투여를 제공한다. 반복 투여는 동일한 용량이거나 상이한 용량일 수 있다. 투여는 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 또는 그 이상 반복될 수 있다. 항-hPG 모노클로날 항체의 치료적 유효량은 단일 용량으로서 투여되거나, 치료 계획의 진행 동안에, 예컨대 1주, 2주, 3주, 1개월, 3개월, 6개월, 1년 또는 더 긴 기간 동안 투여될 수 있다.
- [0177] **치료 방법**
- [0178] 세포 증식을 포함하는 PG-의존적 반응을 차단하는 능력으로 인해 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날의 능력은 결장직장암을 치료하는데 유용하다. 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 CRC의 치료가 필요한 환자에서 CRC를 치료하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 상기 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0179] 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체가 투여되는 "피검체" 또는 "환자"는 비-영장류 (예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 또는 영장류 (예컨대, 원숭이 또는 인간)와 같은 포유동물인 것이 바람직하다. 피검체 또는 환자는 성인 환자 또는 소아 환자와 같은 인간일 수 있다.
- [0180] 항-hPG 모노클로날 항체 요법에 적합한 환자는 CRC로 진단된 환자이다. CRC는 임의의 유형 및 임의의 임상적 단계 또는 증세일 수 있다. 적합한 피검체는 CRC 종양 (수술가능 또는 수술불가능)을 지니는 환자, 종양이 수술적으로 제거하거나 절제한 환자, 예를 들어 RAS 또는 APC와 같은 종양유전자에 돌연변이를 지니는 세포를 포함하는 CRC 종양을 지니는 환자, 항-hPG 모노클로날 항체 요법과 함께 또는 이에 보조하여 CRC에 대한 다른 치료를 받았거나 받고 있는 환자를 포함한다. CRC에 대한 그 밖의 치료는, 이로 제한되는 것은 아니나,

하기 기재된 화학요법 치료, 방사선 치료, 수술적 절제, 및 하나 이상의 다른 치료용 항체를 이용한 치료를 포함한다.

- [0181] 항-hPG 항체 요법은 하나 이상의 다른 치료와 조합되거나 이를 보조할 수 있다. 다른 치료는 비제한적으로 하기 기재된 화학요법 치료, 방사선 치료, 수술적 절제, 및 항체 요법을 포함한다.
- [0182] 항-hPG 모노클로날 항체 요법은 수술적 절제를 포함하는 다른 치료를 보조할 수 있다.
- [0183] 본원에서 제공된 조합 치료는 환자에게 두 개 이상의 작용제를 투여하는 것을 포함하는데, 그 중 첫 번째는 본 발명의 중화성 항-hPG 모노클로날 항체이고, 두 번째는 제 2 치료제이다. 중화성 항-hPG 모노클로날 항체 및 제 2 치료제는 동시에, 연속하여 또는 별도로 투여될 수 있다.
- [0184] 본원에서 사용된 중화성 항-hPG 모노클로날 항체 및 제 2 치료제는, 이들이, 예를 들어 동일한 환자 방문시에 같은 날에 환자에게 투여되는 경우 연속하여 투여된다고 언급된다. 연속 투여는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 시간 만큼 떨어져서 일어날 수 있다. 대조적으로, 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체 및 제 2 치료제는, 이들이 다른 날에 환자에게 투여되는 경우, 별도로 투여된다고 언급되는데, 예를 들어, 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체 및 제 2 치료제는 1일, 2일 또는 3일, 1주일, 2주일 또는 매달 간격으로 투여될 수 있다. 본 발명의 방법에서, 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체의 투여는 제 2 치료제보다 먼저 투여되거나 나중에 투여될 수 있다.
- [0185] 비제한적인 예로서, 중화성 항-hPG 모노클로날 항체 및 제 2 치료제는 소정의 기간 동안 동시에 투여되고, 이어서 두 번째 기간에는 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체와 제 2 치료제가 교대로 투여될 수 있다.
- [0186] 본 발명의 조합 치료는 부가하는 것보다 크거나 상승적인 효과를 초래할 수 있어서, 중화성 항-hPG 모노클로날 항체나 제 2 치료제가 치료적 유효량으로 단독으로 투여된 경우에 제공할 수 없는 치료적 이익을 제공한다. 따라서, 상기 작용제들은 더 낮은 양으로 투여될 수 있어 부작용의 가능성 및/또는 심각성을 감소시킬 수 있다.
- [0187] 제 2 치료제는 화학요법제일 수 있다. 화학요법제는 비제한적으로 방사성 분자, 세포의 생존력에 해로운 임의의 작용제를 포함하는, 세포독소 또는 세포독성제로도 지칭되는 독소, 작용제, 및 화학요법 화합물을 함유하는 리포솜 또는 그 밖의 소포를 포함한다. 적합한 화학요법제의 예는 비제한적으로 1-테하이드로테스토스테론, 5-플루오로우라실 테카르바진, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 악티노마이신 D, 아드리아마이신, 알데스류킨(aldesleukin), 알킬화제, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민(altretamine), 아미포스틴(amifostine), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라마이신(anthracycline (AMC)), 항-유사분열제, 시스-디클로로디아민 플라티늄(II) (DDP) 시스플라틴), 디아미노 디클로로 플라티늄, 안트라사이클린, 항생제, 항대사산물, 아스파라기나제, BCG 라이브(live) (방광내), 베타메타손(betamethasone) 소듐 포스페이트 및 베타메타손 아세테이트, 바이칼루타미드(bicalutamide), 블레오마이신 설페이트, 부술피판(busulfan), 칼슘 류코우오린(calcium leucovorin), 칼리케아미신(calicheamicin), 카페시타빈(capecitabine), 카르보플라틴(carboplatin), 로무스틴(lomustine (CCNU)), 카르무스틴(carmustine (BSNU)), 클로르암부실(Chlorambucil), 시스플라틴(Cisplatin), 클라드리빈(Cladribine), 콜치킨(Colchicin), 퀴주게이션된 에스트로젠, 시클로포스파미드, 시클로토스파미드(Cyclophosphamide), 시타라빈(Cytarabine), 시토칼라신(cytochalasin) B, 시톡산(Cytoxan), 다카르바진(Dacarbazine), 닥티노마이신(Dactinomycin), 닥티노마이신(dactinomycin (이전에는 악티노마이신(actinomycin))), 다우니루비신(daunorubicin) HCL, 다우노루비신 시트레이트, 데니류킨 디프티톡스(denileukin diftitox), 텍스라족산(Dexrazoxane), 디브로모만니톨(Dibromomannitol), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 도세탁셀(Docetaxel), 돌라세트론 메실레이트(dolasetron mesylate), 독소루비신(doxorubicin) HCL, 드로나비놀(dronabinol), 이. 콜라이(*E. coli*) L-아스파라기나제, 에메틴(emetine), 에포에틴(epoetin)- α . 에르위니아(Erwinia) L-아스파라기나제, 에스테르화된 에스트로젠, 에스트라디올(estradiol), 에스트라무스틴 포스페이트 소듐(estramustine phosphate sodium), 에티뎀 브로마이드(ethidium bromide), 에티닐 에스트라디올(ethinyl estradiol), 에티드로네이트(etidronate), 에토포시드 시트로로륨(etoposide citrororum) 인자, 에토포시드 포스페이트, 필그라스티움(filgrastim), 플록수리딘(floxuridine), 플루코나졸(fluconazole), 플루다라빈 포스페이트(fludarabine phosphate), 플루오로우라실(fluorouracil), 플루타미드(flutamide), 폴린산(folinic acid), 겐시타빈(gemcitabine) HCL, 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 고세렐린 아세테이트(goserelin acetate), 그라미시딘(gramicidin) D, 그라니세트론(granisetrone) HCL, 하이드록시우레아, 이다루비신 HCL, 이포스파미드(ifosfamide), 인터페론 α -2b, 이리노테칸 HCL, 레트로졸, 류코보린 칼슘(leucovorin calcium), 류프롤리드 아세테이트(leuprolide acetate), 레바

미솔(levamisole) HCL, 일도카인(lidocaine), 로무스틴(lomustine), 마이탄시노이드(maytansinoid), 메클로르에타민(mechlorethamine) HCL, 메드록시프로게스테론 아세테이트(medroxyprogesterone acetate), 메게스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 멜팔란(melphalan) HCL, 메르캡티퓨린(mercaptopurine), 메스나(mesna), 메토티렉세이트(methotrexate), 메틸테스토스테론(methyltestosterone), 미트라마이신(mithramycin), 미토마이신(mitomycin) C, 미토탄(mitotane), 미토크산트론(mitoxantrone), 닐루타미드(nilutamide), 옥트레오티드 아세테이트(octreotide acetate), 온단세트론(ondansetron) HCL, 옥살리플라틴(oxaliplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 파미드로네이트(pamidronate) 디소듐, 펜토스타틴(pentostatin), 필로카르핀(pilocarpine) HCL, 플리마이신(plimycin), 카르무스틴 임플란트를 지나는 폴리페프로산(polifeprosan) 20, 포르피머(porfimer) 소듐, 프로카인, 프로카르바진(procarbazine) HCL, 프로프라놀롤(propranolol), 리툽시맙(rituximab), 사르그라모스팀(sargramostim), 스트렙토조토신(streptozotocin), 타모시펜(tamoxifen), 탁솔(taxol), 테가퍼(tegafur), 테니포시드(teniposide), 테노포시드(tenoposide), 테스톨락톤(testolactone), 테트라카인(tetracaine), 티오에파 클로르암부실(thioepa chlorambucil), 티오구아닌 티오테파(thioguanine, thiotepa), 토포테칸(topotecan) HCL, 토레미펜 시트레이트(toremifene citrate), 트라스투주맙(trastuzumab), 트레티노인(tretinoin), 발루비신(valrubicin), 빈블라스틴 설페이트(vinblastine sulfate), 빈크리스틴 설페이트(vincristine sulfate), 및 비노렐빈(vinorelbine) 타르트레이트를 포함한다.

[0188] 본원에 기재된 중화성 항-hPG 모노클로날 항체는 화학요법제의 조합물을 투여받은 결장직장암에 대한 치료에 필요한 환자에게 투여될 수 있다. 화학요법제의 예시적인 조합물은 류코보린 (폴린산 또는 LV)과 함께 5-플루오로우라실 (5FU); 우라실 (UFT) 및 류코보린과 함께 카페시타빈; 우라실 (UFT) 및 류코보린과 함께 테가퍼; 5FU와 함께, 또는 카페시타빈과 함께 옥살리플라틴; 카페시타빈과 함께 이리노테칸, 5FU, 이리노테칸 또는 카페시타빈과 함께 미토마이신 C를 포함한다. 본원에 기재된 화학요법제의 다른 조합물의 이용이 또한 가능하다.

[0189] 관련 분야에서 공지된 대로, 상이한 화학요법제의 조합물을 이용한 결장직장암을 위한 화학요법 계획이 임상 시험에서 표준화되었다. 그러한 계획은 종종 약어로 공지되어 있고 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, FOLFIRI, IFL, XELOX, CAPOX, XELIRI, CAPIRI, FOLFOXIRI을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Chau, I., *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 100:1704-19 and Field, K., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol. 13:3806-15] 참조, 두 문헌 모두는 참조로서 포함된다.

[0190] 중화성 항-hPG 모노클로날 항체는 또한 그 밖의 치료용 항체와 조합될 수 있다. 따라서, 항-hPG 모노클로날 항체 요법은, 예를 들어 비제한적으로 항-EGFR (EGF 수용체) 모노클로날 항체 또는 항-VEGF 모노클로날 항체와 같은 상이한 모노클로날 항체와 조합되거나, 이에 보조하여 투여될 수 있다. 항-EGFR 항체의 특수한 예는 세툽시맙 및 파니투무맙(panitumumab)을 포함한다. 항-VEGF 항체의 특수한 예는 베바시주맙(bevacizumab)이다.

[0191] **항-hPG 항체를 이용한 프로가스트린의 검출**

[0192] 중화성이든 아니든 간에, 항-PG 모노클로날 항체는 또한 CRC를 진단하거나 피검체의 CRC에 대한 치료 효과를 모니터링하는 것과 같은 PG 검출에 좌우되는 적용에 유용하다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항-hPG 모노클로날 항체를 이용하여 환자로부터의 샘플 중 프로가스트린의 양을 측정하는 것을 포함하는, 환자의 결장직장암을 진단하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 환자의 결장직장암을 진단하는 방법은 본 발명의 항-hPG 모노클로날 항체를 이용하여 환자로부터 획득된 샘플 중 프로가스트린을 측정하는 것을 포함하고, 샘플 중 프로가스트린의 20 pM 내지 400 pM의 측정치가 결장직장암의 표시이다. 프로가스트린은, 예컨대 혈액, 혈청, 혈장, 조직, 및/또는 세포의 샘플에서 측정될 수 있다. hPG 검출은 당 분야에 공지된 및/또는 본원에 기재된 검정, 예컨대 ELISA, 샌드위치 ELISA, 면역블롯팅 (Western 블롯팅), 면역침전, BIACORE 기술 등을 이용하여 수행될 수 있다.

[0193] 본원에서 언급된 대로, 프로가스트린은 가스트린 유전자 생성물의 번역후 가공에서 비롯된 다수의 상이한 폴리펩티드들 중 단지 하나이다. 본원에 기재된 진단, 모니터링 및 그 밖의 방법은 분해 생성물을 포함하는 다른 가스트린 유전자 생성물에 대비하여 hPG를 특수하게 검출한다. 따라서, 특수한 구체예에서, hPG는 본원에 기재된 ELISA를 이용하여 검출되며, hPG의 N-말단 및 C-말단을 각각 표적화하는 hPG에 대한 두 개의 항체가 이용된다. 일부 구체예에서, 검출에 사용된 두 개의 항체 중 하나는 본원에 기재된 항-hPG 모노클로날 항체이다. 20 pM 내지 400 pM의 hPG 수준은 결장직장암의 표시이다.

[0194] 일반적으로, 항-hPG 모노클로날 항체를 이용하여 hPG 수준을 결정하는 절차는 다음과 같다. 96웰 플레이트의

웰과 같은 표면을 제조하는데, 여기에는 hPG에 대한 공지된 양의 제 1 "포획" 항체가 결합되어 있다. 포획 항체는, 예를 들어 hPG의 C- 또는 N-말단에 결합된 항-hPG 항체일 수 있다. 차단 후에, 시험 샘플을 표면에 적용한 다음 인큐베이션 기간을 거친다. 그 후, 표면을 세척하여 결합되지 않은 항원을 제거하고 hPG에 대한 제 2 "검출" 항체를 함유하는 용액을 적용하였다. 검출 항체는, 검출 항체가 포획 항체와 상이한 에피토프에 결합하는 한, 본원에 기재된 어떠한 항-hPG 모노클로날 항체일 수 있다. 예를 들어, 포획 항체가 hPG의 C-말단 영역에 결합하는 경우, 적합한 검출 항체는 hPG의 N-말단 펩티드에 결합하는 항체일 것이다. 그 후, 프로가스트린 수준을 직접 (예를 들어, 검출 항체가 검출가능한 표지에 컨쥬게이션된 경우) 또는 간접적으로 (검출 항-hPG 항체에 결합하는 표지된 이차 항체를 통해) 검출할 수 있다.

[0195] 특수한 구체예에서, hPG 수준은 시험 샘플로부터 다음과 같이 측정된다. 96-웰 미세역가 플레이트를 0.5 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 토끼 C-말단 항-hPG 폴리클로날 항체로 코팅하고 밤새 인큐베이션하였다. 그 후, 플레이트를 PBS-Tween (0.05%)으로 3회 세척하고 PBS-Tween (0.05%) 중 2% (w/v) 탈지분유로 차단시켰다. 별도로, 시험 샘플, 대조군 샘플 (블랭크 또는 PG-네거티브 혈장 또는 혈청 샘플), 및 약 5 pM (0.5×10^{-11} M) 내지 약 0.1 nM (1×10^{-10} M)의 hPG 참조 표준 (PG-네거티브 혈장 또는 혈청에서 희석된 냉동건조된 hPG)을 적합한 희석제 (예컨대, PBS-Tween 0.05%)에서 제조하였다. 샘플을 2 내지 4시간 동안 37°C에서 코팅된 플레이트 상에서 인큐베이션하거나, 대안적으로 12 내지 16시간 동안 21°C에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 플레이트를 PBS-Tween (0.05%)으로 3회 세척하고, 호스레디쉬 퍼옥시다제 (HRP)(Nakane *et al.*, 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12): 1084-1091)에 커플링된, 본원에 기재된 0.001 내지 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체와 30분간 21°C에서 인큐베이션하였다. 그 후 플레이트를 PBS-Tween (0.05%)에서 3회 세척하고, HRP 기질을 15분간 21°C에서 첨가하였다. 100 μL 의 0.5M 황산을 첨가함에 의해 반응을 중지시키고 405 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 시험 샘플 hPG 수준을 hPG 참조 표준으로부터 유래된 측정치로부터 그려진 표준 곡선과의 비교에 의해 결정하였다.

[0196] 전형적으로, 환자는 대장내시경검사와 같은 다른 침습성 절차 뿐만 아니라 생검 조직의 조직학적 평가와 같은 침습적 절차에 기반하여 진단된다. CRC는 단계 0 (결장 또는 직장의 가장 안쪽 라이닝에 국한된 암), 단계 1 (결장 또는 직장의 내벽의 암), 단계 2 (결장의 벽을 통해 연장되거나 림프절 부근에서는 발견되지 않는 암), 단계 3 (림프절 및 결장 또는 직장을 둘러싼 조직에서 발견되는 암), 및 단계 4 (신체의 다른 부분까지 퍼진 암)로 배치된 5 단계로 나뉜다. 조직학적 견지에서, 결장직장 종양은 양성 성장에서 침습성 암의 범위인, 광범한 스펙트럼의 신생물을 제공하며, 주로 상피-유래 종양이다 (즉, 샘종 또는 샘암종). 병변은 비신생물 폴립, 신생물 폴립 (샘종성 폴립, 샘종), 및 암의 세 그룹으로 분류될 수 있다. 샘종성 폴립은 악성 형질전환을 진행할 수 있는 양성 종양이고, 증가된 악성 잠재성을 지니는 세 개의 조직학적 유형: 관, 관용모성, 및 용모성으로 분류되었다. 샘암종이 또한 이들의 조직학에 따라 점액 (콜로이드) 샘암종; 반지 세포 샘암종; 경질성 종양; 및 신경내분비로 분류되었다.

[0197] CRC를 진단하는 현행 수단과 대조적으로, 본 발명은 어떠한 조직학적 분석 또는 질환 단계화의 부재하에, 혈액 샘플로부터 측정될 수 있는 hPG 수준의 측정치에 기반하여, CRC를 지닌 피검체를 진단하는 방법을 제공한다. 더욱이, 본 발명의 방법은 환자가 어떻게 진단되었는지와 상관없이 항-hPG 모노클로날 요법에 적합한 CRC 환자를 선택하는데 유용하다.

[0198] 혈청 PG 수준은 또한 CRC 치료의 효능을 평가하는데 유용하다. 따라서, 본 발명은 CRC에 대해 치료되는 환자에서 PG 수준을 결정하는 것을 포함하는, 결장직장암 요법의 유효성을 모니터링하는 방법을 제공한다. 결장직장암 요법의 유효성을 모니터링하는 방법은, 결장직장암에 대한 치료를 받고 있는 결장직장암 환자에서 본 발명의 항-PG 모노클로날 항체를 이용하여 hPG 수준을 반복적으로 결정하는 것을 포함하고, 이 때 치료 사이에 걸친 환자의 순환 hPG 수준의 감소는 치료 효능을 나타낸다. 예를 들어, 환자의 순환 hPG 수준의 첫 번째 측정을 한 다음에 환자가 결장직장암에 대한 치료를 받는 동안 또는 그 이후에 두 번째 측정을 할 수 있다. 그 후, 두 번째 측정치를 비교하며, hPG 수준에서의 감소는 치료 이익을 나타낸다.

[0199] 일 양태에서, 본 발명은 항-hPG 모노클로날 항체 (항체 컨쥬게이트 포함)를 함유하는 진단 키트를 제공한다. 진단 키트는 본 발명의 하나 이상의 항-hPG 모노클로날 항체 (예컨대, 냉동건조된 형태 또는 수용액으로) 및 진단 검정을 수행하는데 유용한 하나 이상의 시약 (예컨대, 희석제, 항-hPG 모노클로날 항체에 결합하는 표지된 항체, 표지된 항체에 대한 적합한 기질, 포지티브 대조군 및 참조 표준으로서 사용하기 적절한 형태의 hPG, 네거티브 대조군)을 포함하는 패키지이다. 특수한 구체예에서, 키트는 두 개의 항-hPG 항체를 포함하고, 이 때 항체 중 적어도 하나는 항-hPG 모노클로날 항체이다. 임의로, 두 번째 항체는 폴리클로날

항-hPG 항체이다. 일부 구체예에서, 본 발명의 키트는 본원에 기재된 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체를 포함한다.

[0200] 항-hPG 항체는 상기 기재된 대로 표시될 수 있다. 대안적으로, 키트는 항-hPG 모노클로날 항체에 결합하고 효소에 컨주게이션된 표시된 항체를 포함한다. 항-hPG 모노클로날 항체 또는 그 밖의 항체가 검출을 위해 효소에 컨주게이션될 때, 키트는 효소에 필요한 기질 및 공인자를 포함할 수 있다 (예컨대, 검출가능한 크로모포어 또는 플루오로포어를 제공하는 기질 전구체). 또한, 안정화제, 완충제 (예컨대, 차단 완충제 또는 용해 완충제) 등과 같은 그 밖의 첨가제가 포함될 수 있다. 진단 키트에 포함된 항-hPG 모노클로날 항체는 고정 표면에 고정될 수 있거나, 대안적으로 항체가 고정될 수 있는 고정 표면 (예컨대, 슬라이드)가 키트에 포함된다. 다양한 시약들의 상대적인 양은 검정의 민감성을 실질적으로 최적화하는 시약들의 용액 중 농도를 제공하기 위해 광범하게 변화될 수 있다. 항체 및 그 밖의 시약은, 용해시에 적절한 농도를 지니는 시약 용액을 제공할 부형제를 포함하는 건조 분말로서, 일반적으로 냉동건조된 형태로 제공될 수 있다 (개별적으로 또는 합쳐서).

[0201] 키트는 진단 방법의 실시를 위한 지시서 (예컨대, 프로토콜)를 함유하는 지시용 재료를 포함할 수 있다. 지시용 재료는 전형적으로 서면이거나 인쇄된 재료를 포함하지만, 그것으로 제한되지 않는다. 그러한 지시서를 저장할 수 있고 최종 사용자에게 전달할 수 있는 매체가 본 발명에서 고려된다. 그러한 매체는 비제한적으로 전자 저장용 매체 (예컨대, 마그네틱 디스크, 테이프, 카트리지, 칩), 광학 매체 (예컨대, CD ROM) 등을 포함한다. 상기 매체는 그러한 지시용 재료를 제공하는 인터넷 사이트 주소를 포함할 수 있다.

[0202] 10. 실시예

[0203] 하기 실시예는 설명이며 제한하려는 것이 아니다.

[0204] **실시예 1: 프로가스트린에 대한 모노클로날 항체의 생성**

[0205] **인간 프로가스트린에 대한 면역원**

[0206] 인간 프로가스트린에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 개발하기 위해 여러 면역원을 생성하였다. 전장 인간 프로가스트린 및 hPG의 잔기 70 내지 80에 기반한 면역원과 같이, 폴리클로날 항체를 생성하기 위해 이전에 사용된 항원들은 모노클로날 면역 반응을 일으키지 못하거나 PG-특이적인 모노클로날 항체를 생성하지 못했다. 하기에 보다 상세히 기술되는 대로, 단백질의 N-말단 및 C-말단 끝에서 hPG에 유일한 서열을 포함하는 14개 및 그 초과인 아미노산 항원이 동물에서 적당한 면역 반응을 유도할 수 있었고 이러한 항원을 이용하여 hPG에 대해 20개 이상의 상이한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하였다. 놀랍게도, 잔기들 중 일부가 다른 가스트린 유전자-유래 펩티드에서도 발견되는 hPG의 잔기 55 내지 80을 포함하는 여러 면역원을 hPG에 특이적인 모노클로날 항체를 생성하는데 성공적으로 이용하였다. 하기 표는 시험된 면역원을 요약한 것이다.

실험	면역원	포지티브 클론의 수
1	인간 프로가스트린 (SEQ ID NO:20)	0*
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	2
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	8
1	BSA-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
2	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:97)	0
3	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	10
	DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEQ ID NO:96)	3

* 면역된 마우스가 어떠한 면역 반응도 나타내지 않았다.

[0207]

[0208] 표 2에 나열된 면역원은 펩티드 서열 및 링커의 화학적 합성을 이용하여, 그 후에 적절한 가교제 (예컨대, MBS (m-말레이미도벤조일-N-히드로숙신이미드 에스테르), 글루타르알데히드 또는 설포-SMCC (설포숙신이미드

4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트)를 이용하여 소 혈청 알부민 (BSA), 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 또는 디프테리아 독소 (DT) 담체에 가교시킴에 의해 당 분야에 공지된 기술에 따라 제조되었다. (Coligan JE et al., Current protocols in Immunology, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons; 1996, p 9.0.1-9.0.15; Harlow DL. 항체: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998, p72-87). 사용된 링커는 시스테인 잔기에 커플링된 하나 또는 두 개의 아미노헥산산 (Ahx) 잔기였다.

[0209] 세 번의 실험 각각에서, Balb/c 마우스에게 N-말단 면역원의 경우 4 내지 5회, 그리고 C-말단 면역원의 경우 2 내지 4회를 주입하였다. 각각의 주입에서 리비(Ribi), 알룬(Alun) 또는 프로인트 보조제와 함께 10 µg의 면역원을 투여하였다.

[0210] **세포 융합 및 하이브리도마 스크리닝**

[0211] 각각의 마우스로부터의 혈청을 가장 강한 면역 반응을 갖는 마우스로부터 회수된 비장세포 및 면역원에 대해 ELISA에 의해 검사하였다. 비장세포를 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 Sp2 골수종 세포와 융합시켰고, 96웰 플레이트에 웰 당 15,000 내지 35,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 융합된 세포를 하이포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘을 함유하는 배지 (HAT 배지)를 이용하여 이에 대해 선택하였다.

[0212] 하이브리도마의 상청액을 면역원 및 전장 프로가스트린에 결합하는 능력에 대해 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 3라운드의 스크리닝을 수행하여 전장 hPG 및 면역원을 인지하는 항체를 안정하게 생산하는 하이브리도마만이 확실히 선택되게 하였다.

[0213] 상이한 PG 펩티드에 대한 결합을 결정하기 위한 모노클로날 항체 및 하이브리도마의 스크리닝을 하기 기재된 ELISA 기술을 이용하여 수행하였다. 이러한 프로토콜을 융합된 비장세포, 첫 번째 및 두 번째 라운드 서브클론의 PG 결합을 스크리닝하는데 이용하였을 뿐 아니라 다른 가스트린 유전자 유래 펩티드에 비해, PG에 대한 항체의 특이성을 입증하는데 이용하였다.

[0214] 간단히 말해, 96웰 플레이트를 포스페이스트-완충된 염수(PBS) 중 적절한 농도(들)의 시험 펩티드와 함께 밤새 4°C에서 인큐베이션 한 후에, 웰을 세척 용액 (PBS 및 0.1% Tween-20)으로 3회 세척하고, 웰 당 100 µL의 차단 용액 (PBS, 0.1% Tween-20, 0.1% 소 혈청 알부민 또는 카세인 가수분해물)과 함께 2시간 동안 22°C에서 인큐베이션하였다. 차단 후에, 웰을 3회 세척하고 일차 항체 -검정하려는 항체-를 첨가하였다. 융합된 비장세포의 초기 스크리닝을 위해, 검정되는 각각의 배양액으로부터의 50 µL의 배양 상청액을 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 모노클로날 항체 상에서 수행된 검정에서, PBS 및 0.1% Tween-20 중 100 µL의 시험 항체를 각각의 웰에 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 2시간 동안 22°C에서 인큐베이션 한 다음, 일차 항체 용액을 폐기하고, 세척 단계 (3X 100 µL 세척 용액, 상기 기재됨) 후에, 일차 항체에 결합하고 효소에 커플링되는 이차 항체를 함유하는 차단 용액으로 교체하였다. 이차 항체는 호스레디쉬 퍼옥시다제에 커플링된 염소 항-마우스 IgG (Fc) 항체였다. 이차 항체와 1시간 인큐베이션 후에, 100 µL의 기질 용액 (예컨대, 제조자의 지시에 따라 제조된, Sigma-Aldrich Co.로부터 이용가능한 Fast OPD, 또는 O-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드)을 각각의 웰에 첨가하고 암실에서 20분간 22°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 50 µL의 4N 황산을 첨가시켜 반응을 중지하고 492 nm에서 광학 밀도(O.D.)를 측정함에 의해 측정화된 기질의 양을 측정하였다. 기질 전환은 항원에 결합된 일차 (시험) 항체의 양에 비례한다. 실험은 두 번 진행되었고, 실험의 목적에 따라 OD 측정치를 항원 또는 항체 농도의 함수로서 플롯팅하였다. 측정된 O.D.가 0.2 내지 1.5인 경우 샘플은 항-PG 항체에 대해 포지티브로서 기록되었다. 동일한 O.D. 부류를 이용하여 시험 동물을 접종하기 위해 사용된 면역원성 펩티드에 결합된 항체를 확인하였다.

[0215] 본 검정에 사용된 예시적인 물질 및 시약은 하기와 같다:

품목	공급원	참조번호
Greiner Microlon 96 웰 플레이트	Dutscher	# 655092
10X DPBS	Dutscher	# P04-53500
Tween-20	Sigma	# 63158
BSA (차단용)	Euromedex	# 04-100-810-C
가수분해된 카세인 (BSA 대신 이용되는 경우)	Sigma	22090
하이브리도마 상청액 또는 N-말단 또는 C-말단 모노클로날 항체	BioRéalités	본원에 기재됨
염소 항-마우스 IgG (Fc), 퍼옥시다제-커플링됨	Thermo	# 31439
Fast OPD	Sigma	# P9187
95-97% 황산	Sigma	# 30743

[0216]

[0217] 하이브리도마 및 모노클로날 항체의 스크리닝에 이용된 예시적인 펩티드는 다음과 같았다:

스크리닝 펩티드	공급원	참조번호
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
재조합 인간 프로가스트린	BioRéalités	McQueen et al., 2002, J. Protein Chem., 21(7):465-471.
인간 가스트린 I (G-17)	Sigma	# 53673
글리신-연장된 가스트린 17 (G-Gly)	Auspep	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
C-말단 플랭킹 펩티드 (CTFP)	Auspep	# R41345

[0218]

[0219]

재조합 인간 프로가스트린은 약간의 변형을 가하여 문헌[McQueen et al, 2002, J. Protein Chem. 21: 465-471]에 기재된 대로 생산되었다. 간단히 말해, BL21 DE3 Star 박테리아 세포 (Invitrogen)를 PGEX-GST-TEV 백본에 전장 인간 프로가스트린 서열을 함유하는 벡터로 형질전환시켰다 (GE Healthcare). 박테리아를 0.5 mM IPTG를 함유하는 LB 배지에서 3시간 동안 37°C에서 성장시켰다. 박테리아 펠렛을 프렌치 프레스(French Press)를 이용하여 분쇄하였고, 가용성 뿐 아니라 불용성 분획을 원심분리에 의해 분리하였다. 그 후, GST-태깅된 hPG를 글루타치온 친화성 컬럼을 이용하여 분리하고 PG를 Tobacco Etch Virus N1a (TEV) 프로테아제로 GST로부터 절단하였다. 마지막으로, PG를 최종 완충제 (10mM HEPES, 0.5% BSA, pH 7.4)에 대해 투석시켰다.

[0220]

하이브리도마를 먼저 클로닝한 다음, 서브클로닝하고 증폭시켰다. 포지티브 하이브리도마를 하기 기준에 기반하여 선택하였다: (1) PG 및 면역원 특이성, (2) 항체의 상대 친화성, (3) 하이브리도마 세포 성장, (4) 항체 분비, 및 (5) 하이브리도마의 모노클론성. 검정 및 선택 기준은 다음과 같았다.

[0221]

특이성의 경우, 시험 하이브리도마의 상청액을 상기 기재된 ELISA에 의해 검정하였다 (검정 배지 PBS 내로 상청액의 2 회석 중 50 µL의 하나). O.D. 측정치가 시험 마우스를 접종하기 위해 사용된 면역원 또는 hPG를 이용한 검정에서 0.2 내지 1.5인 경우 하이브리도마를 포지티브로서 기록하였다. 특이성에 대한 추가의 기준으로서, 다른 가스트린 유전자 유래 펩티드에 대한 결합의 결여에 기반하여 클론을 선택하였다. 결합의 결여는 시험 웰로부터의 신호와 PBS만을 함유하는 대조군 웰로부터의 평균 신호간에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로서 측정되었다.

[0222]

친화성 규명을 위해, 항체의 연속 희석액을 상기 기재된 대로 hPG와의 결합에 대해 ELISA에 의해 검정하였다. N-말단 항체의 검정에 사용된 표준 희석액은 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml이었다. C-말단 항체의 검정에 사용된 표준 희석액은 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 ng/ml이었다.

[0223]

다수 라운드의 연속 배양을 통한 하이브리도마 세포 성장은 시딩한 지 이틀 후에 현미경 관찰에 의해 평가하였다. 세포는 시딩한 후 48시간까지 증식하고 웰을 채울 것으로 예상된다. 연속 희석 (전경적으로 첫 번째 희석 1:5에 이어 2회 이상의 추가 희석 1:10)을 수행한 다음 48시간 후에 현미경 관찰하여 충분한 성장을 확인하였다. 이러한 기준을 충족한 하이브리도마로부터의 세포를 희석하였고 다시 시딩하였으며, 48시간 후에 현미경 아래에서 관찰하였다. 상기 라운드의 "희석-시딩-관찰"을 3회 반복한 다음 하이브리도마가 "성장" 기준을 충족한 것으로 기록하였다.

[0224]

무-세포 상청액의 연속 희석액 (1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) 상에서 상기 기재된 대로 hPG를 이용한 ELISA를 수행함에 의해 항체 분비를 검사하였다.

[0225]

클론 또는 하이브리도마를 96웰 플레이트에 0.6 세포/웰의 밀도로 시딩하고 2주간 인큐베이션함에 의해 모노클론성을 측정하였다. 2주에, 상청액을 hPG 결합에 대해 ELISA에 의해 검정하고 살아 있는 세포 함유 웰의 적어도 90%에 걸쳐서 일관된 OD 값을 지니는 지에 기반하여 집단의 클론 특성을 측정하였다.

[0226]

전장 프로가스트린에 대한 모노클로날 항체

[0227]

세 마리의 마우스를 각각 재조합 인간 프로가스트린 (상기 기재됨)으로 접종하였다. 면역원은 마우스에서 어떠한 검출가능한 면역 반응을 유도하지 못하였다: 상기 기재된 ELISA를 이용하여 PG에 대한 어떠한 결합도 검출될 수 없었다. 융합은 수행되지 않았다.

[0228]

프로가스트린에 대한 N-말단 모노클로날 항체

[0229]

상기 기재된 대로, 14개 잔기 항원의 C-말단 끝 상에서 Ahx-Cys 링커에 의해 (SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys (SEQ ID NO:26)) 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 중 어느 한 쪽에 결합된 hPG의 잔기 1 내지 14를 함유하는 항원에 대해 N-말단 모노클로날 항체를 생성하였다.

[0230] 첫 번째 실험에서, 세 마리의 마우스를 BSA-결합된 N-말단 펩티드로 접종하였다. 세 마리의 마우스 중 두 마리로부터의 비장세포로 수행된 세 번의 융합으로부터, 한 번의 융합은 PG 또는 면역원에 대한 결합을 나타내는 클론을 생성하지 않았다. 96웰 플레이트에 시딩된 두 번의 다른 융합 중에서, 한 번은 4개의 PG-결합 및 PG-특이적 하이브리도마를 생성하였고, 그로부터 단일의 안정한 IgG 생산 서브클론을 회수하였다. 두 번째 융합이 또한 단일의 안정한 IgG1-생산, PG-결합 및 PG-특이적 하이브리도마 서브클론을 생성하였다. 전체적으로, 세 마리의 마우스로부터, 17개의 제 1 라운드 하이브리도마, 또는 스크리닝된 하이브리도마의 0.74%가 PG- 및 면역원-결합에 포지티브였고, 그로부터 9개의 포지티브 세포주를 서브클로닝하였으며, 이 중 두 개가 포지티브 IgG-생산 세포주였다. 따라서, 첫 번째 실험은 2라운드의 서브클로닝 후에 면역원 및 hPG에 대해 강력한 포지티브 신호를 보유하고 ("PG-결합"에 대해 포지티브) 그 밖의 가스트린 유전자 유래 펩티드에 결합하지 않는 ("PG-특이적"에 대해 포지티브) 두 개의 클론을 생성하였고, 각각 항-hPG MAb1 및 항-hPG MAb 2를 생산하는 하이브리도마 43B9G11 및 WE5H2G7이다.

[0231] 두 번째 실험에서, 마우스를 KLH-결합된 N-말단 펩티드로 접종하였다. Sp2 골수종 세포로 두 번의 융합을 수행하였다. 물론, 단 한번의 융합만이 PG-특이적이기도 한 PG- 및 면역원-포지티브 클론을 생성하였다. 그로부터, 1920개 하이브리도마를 시딩하였다. 다수의 하이브리도마가 면역화 펩티드에 포지티브로 검사되었으나 프로가스트린에는 그렇지 않거나, PG-특이적이지 않았다. 구체적으로, 297개 하이브리도마가 면역화 펩티드에 강한 포지티브 신호를 나타내었고 (1920개 중 약 15.5%), 그 중 124개가 또한 프로가스트린 결합에 포지티브였다 (6.5%). 프로가스트린에 대해 포지티브이지만 사용된 면역원에 대해서는 그렇지 않은 36개 하이브리도마, 또는 1.8%가 존재하였다. 시딩된 1920개 중 단지 12개 하이브리도마가 프로가스트린에는 특이적으로 결합하지만 다른 가스트린 유전자 생성물에는 그렇지 않은 항체를 생성하였다 (총 하이브리도마의 0.6%, 첫 번째 스크리닝시에 펩티드 및/또는 프로가스트린에 포지티브인 클론의 3.6%). 선택된 12개 클론 중에서, 단지 2개가 영구적인 클론으로서 확립하고 장기간 저장을 위해 동결시키기에 충분히 안정하였다. 따라서, 이러한 두 번째 실험에서, 시딩된 거의 2000개 하이브리도마 중에서, hPG 및 면역화 펩티드에 결합할 수 있고, 다른 가스트린 유전자 생성물에 비해 프로가스트린에 특이성을 지니고 hPG에 높은 친화성을 지니는 모노클로날 항체를 발현시키는 단지 2개의 클론, 즉 항-hPG MAb3 및 MAb4를 각각 생산하는 6B5B11C10 (항-hPG MAb 3 생산) 및 20D2C3G2 (항-hPG MAb4 생산)를 회수하였다. 예시적인 두 항체 모두는 IgG1 아이소형을 지닌다.

[0232] 세 번째 실험에서, 마우스를 두 번째 실험과 동일한 면역원으로 접종하였다. 가장 강한 면역 반응을 갖는 두 마리의 마우스로부터의 비장세포를 이용하여 Sp2 골수종 세포와의 융합을 수행하였다. 융합체로부터 하이브리도마를 시딩하고 (마우스 당 각각 하나의 융합체로부터 3840개 하이브리도마) PG- 및 면역원-결합 뿐만 아니라 PG-특이성에 대해 상청액을 검사하였다. 각각의 융합체로부터, 6개의 하이브리도마가 PG-특이성을 나타내었고, 그로부터 성장, 모노클로닝, 항체 분비, 상대 친화성을 위한 추가 선택을 충족하는 3개의 서브클론을 선택하였다. 따라서, 전체에서, 시딩 후 검사된 하이브리도마의 2.9% (220/7680)가 PG 및 면역원-포지티브였고, 그 중 0.15%가 포지티브 클론이었으며 (12/7680), 원래 하이브리도마의 0.15%를 구성하는 회수된 최종 서브클론을 시딩하였다 (6/7680). 이러한 실험으로부터 하이브리도마 1E9A4A4 (항-hPG MAb 15 생산), 1E9D9B6 (항-hPG MAb 16 생산), 1C8D10F5 (항-hPG MAb 17 생산), 1A7C3F11 (항-hPG MAb 18 생산), 1B3B4F11 (항-hPG MAb 19 생산), 및 1C11F5E8 (항-hPG MAb 20 생산)가 생성되었다.

[0233] 하기 표는 각각의 실험을 위해 시딩된 클론의 수, 이용된 면역원, 및 면역원과 전장 프로가스트린 둘 모두를 인지하는 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 수 및 백분율을 나타낸다.

표 3					
실험	면역원	시딩된 클론	PG ⁺ 하이브리도마 상청액	PG 특이적 클론	PG 특이적, IgG 생산 서브클론
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0.74%)	9 (0.39%)	2 (0.087%)
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6.5%)	12 (0.6%)	2 (0.1%)
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2.9%)	12 (0.15%)	6 (0.1%)

[0234]

[0235] 프로가스트린에 대한 C-말단 모노클로날 항체

[0236] 26개 잔기 항원의 N-말단 상에 Cys-Ahx-Ahx 링커에 의해 (Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO:96)) KLH 또는 DT 중 어느 하나에 결합된 hPG의 잔기 55 내지 80을 함유하는 항원에 대해 C-말단 모노클로날 항체를 생성하였다. BSA 또는 KLH에 컨주게이션된 Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN (SEQ ID NO:97), hPG의 잔기 70 내지 80만을 함유하는 더 작은 항원으로 하이브리도마를 생성하려는 시도는 어떠한 클론도 생성하지 못하였다.

[0237] 세 번의 실험을 수행하였다. 처음 두 번의 실험에서, 더 짧은 펩티드를 이용하였고, 0개의 서브클론을 회수하였다. 구체적으로, 첫 번째 실험에서, 4 마리의 마우스에게 BSA에 결합된 SEQ ID NO:97에 상응하는 C-말단 펩티드를 주입하였다. 어떠한 융합체도 IgG-생산 하이브리도마를 생성하지 않았다. 두 번째 실험에서, 6 마리의 마우스에게 N-말단 끝에서 KLH에 결합된 SEQ ID NO:97에 상응하는 펩티드, 또는 C-말단 끝에서 KLH에 결합된 SEQ ID NO:97에 상응하는 펩티드를 주입하였는데, 각기 3마리씩이었다. 첫 번째 면역원의 경우, 융합을 수행하고 하이브리도마를 회수하였으나, PG-결합 및 PG-특이성에 포지티브인 서브클론은 분리되지 않았다. 두 번째 면역원의 경우, 어떠한 마우스도 면역 반응을 일으키지 않았고 융합은 수행되지 않았다.

[0238] 세 번째 실험에서, hPG에 유일하지 않은 C-말단 서열을 포함하는 26개 아미노산 펩티드를 이용하였다. KLH 또는 DT에 결합된 SEQ ID NO:96에 상응하는 펩티드를 포함하는 면역원을 마우스에게 주입하였다. 가장 강한 반응을 갖는 두 마리의 마우스로부터의 비장세포를 이용하여 Sp2 골수종 세포에 대한 융합을 수행하였다. 3840개 하이브리도마를 마우스 당 하나의 융합체로부터 시딩하였다. 전체적으로, 스크리닝된 7680개 하이브리도마로부터, 382개 (5%)가 PG-포지티브 및 PG-특이적이었고, 13개 (0.17%)의 안정하고 포지티브인 서브클론을 회수하였다: 1B4A11D11 (항-hPG MAb 5 생산), 1B6A11F2 (항-hPG MAb 6 생산), 1B11E4B11 (항-hPG MAb 7 생산), 1C10D3B9 (항-hPG MAb 8 생산), D8F5B3 (항-hPG MAb 9 생산), 1E1C7B4 (항-hPG MAb 10 생산), 2B4C8C8 (항-hPG MAb 11 생산), 2B11E6G4 (항-hPG MAb 12 생산), 2C6C3C7 (항-hPG MAb 13 생산), 2H9F4B7 (항-hPG MAb 14 생산), 1F11F5E10 (항-hPG MAb 21 생산), 1F11F5G9 (항-hPG MAb 22 생산), 및 1A11F2C9 (항-hPG MAb 23 생산).

[0239] 하기 표는 각각의 실험을 위해 시딩된 클론의 수, 이용된 면역원, 스크리닝된 하이브리도마의 수, 및 3라운드 이후의 서브클로닝 후에 선택 기준 (성장, 모노클론성, 상대 친화성 등)을 충족하고 PG-특이적인, PG- 및 면역원-결합성 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 수 및 백분율을 제시한다.

실험	면역원	시딩된 클론	PG ⁺ 하이브리도마 상정액	PG 특이적 클론	PG-특이적, IgG-생산 서브클론
1	BSA-링커-(SEQ ID NO:97)	3072	10 (0.32%)	9 (0.29%)	0
2	KLH-링커-(SEQ ID NO:97)	1920	27 (0.47%)	4 (0.07%)	0
	(SEQ ID NO:97)-링커-KLH		0	0	0
3	KLH-링커-(SEQ ID NO:96)	3840	192 (5%)	17 (0.44%)	10 (0.26%)
	DT-링커-(SEQ ID NO:96)	3840	190 (4.95%)	13 (0.34%)	3 (0.08%)

[0240]

[0241] 모노클로날 항체, 및 그로부터 생산된 안정한 하이브리도마가 하기 표에 상세히 기재된다:

표 5		
모노클로날 항체	하이브리도마	마우스 Ig
MAb 1	43B9G11	IgG1
MAb 2	WE5H2G7	IgG1
MAb 3	6B5B11C10	IgG1
MAb 4	20D2C3G2	IgG1
MAb 5	1B4A11D11	IgG1
MAb 6	1B6A11F2	IgG1
MAb 7	1B11E4B11	IgG1
MAb 8	1C10D3B9	IgG1
MAb 9	1D8F5B3	IgG1
MAb 10	1E1C7B4	IgG1
MAb 11	2B4C8C8	IgG1
MAb 12	2B11E6G4	IgG1
MAb 13	2C6C3C7	IgG1
MAb 14	2H9F4B7	IgG1
MAb 15	1E9A4A4	IgG1
MAb 16	1E9D9B6	IgG1
MAb 17	1C8D10F5	N.D.
MAb 18	1A7C3F11	IgG2
MAb 19	1B3B4F11	IgG2
MAb 20	1C11F5E8	IgG2
MAb 21	1F11F5E10	IgG2
MAb 22	1F11F5G9	IgG2
MAb 23	1A11F2C9	IgG2

[0242]

[0243] 하이브리도마 세포주 1B4A11D11 (MAb 5, 등록 번호 CNCM I-4371), 1B6A11F2 (MAb 6, 등록 번호 CNCM I-4372), 1B11E4B11 (MAb 7, 등록 번호 CNCM I-4373), 2B4C8C8 (MAb 11, 등록 번호 CNCM I-4374), 2B11E6G4 (MAb 12, 등록 번호 CNCM I-4375), 및 1E9A4A4 (MAb 15, 등록 번호 CNCM I-4376)를 부다페스트 조약에 따라 기탁하고 2010년 10월 6일에 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)(Institut Pasteur, Paris, France)에 의해 수령하였다.

[0244] 항-hPG 모노클로날 항체의 클로닝 및 서열화

[0245] 하이브리도마에 의해 생산된 모노클로날 항체를 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 클로닝하고 서열화할 수 있다. 상기 표 5에 나열된 하이브리도마로부터의 모노클로날 항체를 하기 기재된 대로 서열화하였다.

[0246] 하이브리도마 6B5B11C10 및 20D2C3G2에 의해 생산된 모노클로날 항체를 엔코딩하는 서열을 표준 기술을 이용하여 클로닝하고 서열화하였다. 간단히 말해, 총 RNA를 제조자의 지시에 따라 이용된 RNABee 시약, AMSBio 카탈로그 번호 CS-104B를 이용하여 동결된 세포 펠렛으로부터 분리하였다. V-영역에 대한 cDNA를 역전사효소 증합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)을 이용하여 mRNA로부터 제조한 다음, cDNA 말단의 5'측 급속 증폭을 수행하였다 (RACE). 불변-영역-특이적 프라이머를 이용하여 cDNA 합성을 수행하였고, 그 후 첫 번째 가닥 생성물을 정제하고, 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제를 이용하여 호모폴리머 테일을 cDNA의 3 말단에 부가시켰다. "테일드" cDNA 서열을 그 후 프라이머 쌍을 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰는데, 각각 호모폴리머 테일 및 V_H 또는 V_L 영역 중 어느 하나에 대해 각기 하나의 프라이머이다. 그 후, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 PCR 생성물을 "TA" 클로닝 벡터 (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360)로 클로닝하고 표준 절차를 이용하여 서열화하였다. 도 2a-b (MAb 3), 도 2c-d (MAb 4) 참조.

[0247] 하이브리도마 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1B3B4F1, 및 1E9D9B6에 의해 생산된 모노클로날 항체를 엔코딩하는 서열을 다음과 같이 결정하였다. 총 RNA를 제조자의 지시에 따라 이용된 RNAqueous[®]-4PCR 키트 (Ambion cat. No. AM1914)를 이용하여 동결된 세포 펠렛으로부터 분리하였다. 중쇄 V-영역 mRNA를 6개 퇴화 프라이머 풀을 (HA 내지 HF)의 세트를 이용하여 증폭시켰고 경쇄 V-영역 mRNA를 κ 클러스터에 대해 7개 (KA 내지 KG) 및 λ 클러스터에 대해 하나 (LA)로 된 8개 퇴화 프라이머 풀의 세트를 이용하여 증폭시켰다. 가변 영역에 대한 cDNA를 RT-PCR을 이용하여 mRNA로부터 제조하였다. 불변-영역-특이적 프라이머를 이용하여 cDNA 합성을 수행한 다음, 5'측 뮤린 신호 서열에 대한 퇴화 프라이머 및 IgκVH, IgκVL 및 IgλVL 각각에 대한 3'측 불변 영역에 대한 프라이머의 풀을 이용하여 PCR을 수행하였다 (Jones et al., 1991, *Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions*, Bio/Technology 9:88-89). 그 후, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 PCR 생성물을 "TA" 클로닝 벡터로 클로닝하고 (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360) 표준 기술을 이용하여

서열화하였다. 도 2e-f (Mab 8), 2g-h (Mab 13), 2i-j (Mab 16), 및 2k-l (Mab 19) 참조.

[0248] 실시예 2: 항-hPG 항체에 대한 결합 친화성

[0249] A. 상대 친화성

[0250] 예시적인 모노클로날 항체의 상대 친화성을, 웰을 50ng 프로가스트린을 함유하는 펩티드 용액으로 코팅한 다음 하기와 같이 증가된 농도의 각각의 모노클로날 항체의 존재하에 인큐베이션하는, 상기 기재된 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

모노클로날 항체	시험된 농도 범위
N-말단 항-hPG 모노클로날 항체 Mab 1-4	0.001-1 µg/mL
N-말단 항-hPG 모노클로날 항체 Mab 3, 15-20	0.1-100 ng/mL
C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 Mab 5-14, 21-23	0.03-30 ng/mL

[0251] 도 3a는 1 ng/mL 내지 1 µg/mL의 농도로 시험된 네 개의 항-hPG 모노클로날 항체, Mab 1-4의 상대 친화성을 도시한다. 도 3b는 0.1-100 ng/mL의 항체 농도로 시험된 N-말단 항-hPG 모노클로날 항체 Mab 3 및 15-20의 상대 친화성을 도시한다. 도 3c는 0.03-30 ng/mL의 항체 농도로 시험된 C-말단 항-hPG 모노클로날 항체 Mab 5-14 및 21-23의 상대 친화성을 도시한다.

[0253] B. 친화성 상수 측정

[0254] 모노클로날 항체에 대한 친화성의 보다 확실한 정량을 제공하기 위해, 본원에 그 전문이 참조로서 포함된 문헌[Nahshol *et al.*, 2008, Analytical Biochemistry 383:52-60]에 따른 Proteon Technique (BioRad)을 이용하여 친화성 상수를 측정하였다. 간단히 말해, 항-마우스 IgG 항체 (50 µg/ml)를 먼저 센서 칩 상에 코팅시켜, 항체 주입 후 칩에 의해 검출된 신호가 10,000 내지 11,500 RU (반응 유닛) 사이에 있음을 확인한다. 그 후, 시험되는 무린 모노클로날 항체를 주입하였다 (전형적인 농도: 30 µg/ml). 검사되는 항체의 충분한 결합을 센서 칩 상에서 적어도 500 RU의 추가 신호에 기반하여 측정하였다. 그 후, 모노클로날 항-프로가스트린 항체와 프로가스트린간 상호작용의 시간-추이를, 다양한 농도, 예를 들어 200, 100, 50, 25, 및 12.5 nM의 프로가스트린을 주입함에 의해 측정하고, 회합 수준을 검출하였다. 전형적으로, 단일 실험에서 다수의 항체를 동시에 시험하기 위한 여러 채널이 이용가능하며, 이러한 채널에 의해 다양한 농도의 PG에서 시험 항체의 결합을 동시에 검정할 수 있다. 전형적으로, 하나의 채널은 비특이적 결합에 대한 대조군으로서, PG에 특이적이지 않은 무린 모노클로날 항체용으로 제한되고, 또 다른 채널은 백그라운드 신호에 대한 기준선으로서 희석 완충제 단독으로 주입된다. 일반적으로, 비특이적 무린 항체가 주입되지 않은 채널에서는 어떠한 결합도 검출될 수 없다. 이러한 설정에서 프로가스트린에 의해 트랩핑된 모노클로날 항체의 포화를 초래할 수 있는 높은 수준의 회합을 나타내는 항체를 더욱 정밀한 측정이 가능하도록 더 낮은 프로가스트린 농도 (50, 25, 12.5, 6.25 및 3.125 nM)에 대해 검사할 수 있다.

[0255] 분리 상수 (kd) 및 회합 상수 (ka)의 비율로서 친화성 상수 (KD)를 계산하였다. 결합 측정치에 기반한 실험 곡선과 이론적 프로필 사이의 통계적으로 관련된 유사성을 분석함에 의해 실험 값을 확인하였다. 실험 곡선이 이론적 모델에 맞는지를 선택하는 Proteon 실험에 이용된 수리적 모델은 프로가스트린 분자와 항-프로가스트린 모노클로날 항체간 1:1 상호작용에 기반한 Langmuir 모델이었다.

표 6

모노클로날 항체	친화성 상수 측정된 K _D (M)
항-hPG MAb 1	2.5 μM (2.5 x10 ⁻⁶ M)
항-hPG MAb 2	185 nM (1.85 x10 ⁻⁷ M)
항-hPG MAb 3	6.4 nM (6.4 x10 ⁻⁸ M)
항-hPG MAb 4	3.5 nM (3.5 x10 ⁻⁸ M)
항-hPG MAb 5	13 pM (1.30 x10 ⁻¹¹ M)
항-hPG MAb 6	0.6 nM (6.38 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 7	58 pM (5.84 x10 ⁻¹¹ M)
항-hPG MAb 8	0.1 nM (1.08 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 10	3.6 nM (3.62 x10 ⁻⁹ M)
항-hPG MAb 11	0.3 nM (3.12 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 12	0.4 nM (4.43 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 13	0.6 nM (6.12 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 14	6.8 pM (6.86 x10 ⁻¹² M)
항-hPG MAb 15	0.2 nM (2.11 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 16	0.2 nM (2.78 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 17	8.3 nM (8.29 x10 ⁻⁹ M)
항-hPG MAb 18	1.2 nM (1.24 x10 ⁻⁹ M)
항-hPG MAb 19	0.7 nM (7.79 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 20	0.2 nM (2.47 x10 ⁻¹⁰ M)
항-hPG MAb 21	3.9 nM (3.90 x10 ⁻⁹ M)
항-hPG MAb 22	5 nM (4.94 x10 ⁻⁹ M)
항-hPG MAb 23	0.4 μM (3.99 x10 ⁻⁷ M)

[0256]

[0257]

[0258]

실시예 3: 항-hPG 항체의 응집

항체의 응집은 표적 단백질에 결합하는데 이용가능한 항체의 양을 감소시킴에 의해 치료 효능을 감소시킬 수 있다. 매우 낮은 응집 수준을 갖는 항체가 치료 적용에 바람직하다. 각각의 배치의 항체는 동일한 모노클로날 항체의 다른 배치에 비해 다양할 것이다. 일반적으로 낮은 응집을 갖는 배치를 이용하는 것이 바람직하다. 항체 응집을 정량하기 위해, 항체 용액을 분광형광계 (Photon Technology International)에 넣고, 280nm에서 조사하였다. 방향족 아미노산 (대부분 트립토판)으로 인한 방출을 330nm에서 측정하면서, 확산을 280nm에서 측정하였다. 그 후, 문헌[Nomine et al., 2003, Biochemistry 42: 4909-4917]에 기재된 대로 280nm 대 330nm에서 OD 측정 값들 사이의 비율을 계산함에 의해 응집 수준을 정량하였다. 보다 높은 280/330nm 비율은 더 많은 양의 응집을 나타낸다. 시험관내 측정에 사용된 5 내지 15회 이상에 사용된 항체의 농도는 15 μg/ml이었다.

[0259]

결과를 하기 표 7 및 도 4에 도시한다.

표 7

샘플	280/330 nm 비율
소 혈청 알부민 (n=1)	6.4
항-hPG MAb 1 (n=1)	15.42
항-hPG MAb 2 (n=2)	9.81
항-hPG MAb 3 (n=2)	3.08
항-hPG MAb 4 (n=2)	1.94

[0260]

[0261]

[0262]

실시예 4: 항-hPG 모노클로날 항체의 결합 특이성

PG는 단지 가스트린 유전자의 펩티드 생성물 중 하나이다. 그 밖의 가스트린 유전자 생성물은 정상의 항상성

에서 임무를 완수하지만, CRC에서의 PG의 임무는 이것을 치료 및 진단 목적을 위한 유용한 표적으로 만든다. 본원에 기재된 모노클로날 항체는 가스트린 유전자의 발현 및 가공으로부터 비롯된 그 밖의 모든 펩티드, 예컨대 글리신-연장된 (G17-gly), 아미드화된 (Gastrin17) 가스트린, 및 C-말단 플랭킹 펩티드 (CTFP)에 비해 전장 프로가스트린에 특이적이다. 이러한 펩티드는 혈행(circulation)에 존재한다. 항-hPG 모노클로날 항체의 결합 특이성은, 실시예 1에서 상기 기재된 ELISA 검정을 이용하여, 인간 프로가스트린 및 그 밖의 가스트린 유전자 유래 펩티드에 대해 항체를 검정함에 의해 측정되었다.

[0263] 구체적으로, 웰을 지시된 양의 하기 펩티드 중 하나를 함유하는 용액으로 코팅하였다: 프로가스트린, 키홀 림프 헤모시아닌 (KLH), 아미드화된 가스트린-17 (G17), 글리신-연장된 가스트린 17 (Ggly), 또는 C-말단 플랭킹 펩티드 (CTFP):

스크리닝 펩티드	시험 양
재조합 프로가스트린	50 ng (실험 1) 25 ng (실험 2)
인간 아미드화된 가스트린 I (G-17)	50 및 250 ng
글리신-연장된 가스트린 17 (G17-Gly)	50 및 250 ng
KLH	50 및 250 ng
C-말단 플랭킹 펩티드 (CTFP)	50 및 250 ng

[0264] 첫 번째 실험에서, 3 ng/ml (0.3 ng)의 항-hPG MAb 3 및 1 µg/ml (0.1 µg)의 각각의 항-hPG MAb 1, 2, 및 4를 이용하였다. 도 5a 참조. 두 번째 실험에서, 항-hPG MAb 5 내지 14 및 21-23의 결합 특이성을 0.3 ng/mL에서 검사하였고 (도 5b 참조), 항-hPG MAb 3, 15-20의 결합 특이성을 1 ng/mL에서 검사하였다 (도 5c 참조).

[0266] 항체는 상기 실시예 1에서 마우스를 면역시키기 위한 면역원의 일부에 사용된 항원성 펩티드에 커플링된 높은 양의 KLH에 대해 약한 반응을 나타내었다. 담체로서 BSA를 포함하는 면역원에 대해 생성된 것들을 포함하여, 어떠한 항체의 PG 결합에 대해서도 BSA의 검출가능한 효과는 없었다.

[0267] 모든 항체는 아미드화된 가스트린-17, 글리신 연장된 가스트린 17, 및 C-말단 플랭킹 펩티드, 가스트린을 형성하기 위한 폴리펩티드의 정상적인 가공 동안에 프로가스트린으로부터 절단된 5개 아미노산 펩티드와 같은 그 밖의 가스트린-유전자 유래 펩티드에 비해 전장 hPG (50 ng에 이어 25 ng에서 검사됨)와의 결합에 대해 높은 특이성을 나타내었다. 예시적인 항체는 hPG 이외의 어떠한 가스트린-유전자 유래 펩티드에 대해 검출가능한 결합을 나타내지 않았다 ("PBS 단독" 백그라운드 이상의 신호).

[0268] **실시예 5: 경쟁 검정**

[0269] 프로가스트린과의 결합에 대해 항-hPG 폴리클로날 항체와 경쟁하는 항-hPG 모노클로날 항체의 능력은 "포획" 항-hPG 항체 및 "검출" 항-hPG 항체를 구비한 ELISA를 이용하여 측정되었다. 항-hPG MAb 3을 다음과 같이 검정하였다: 96웰 플레이트를 hPG의 잔기 71 내지 80으로 구성된 펩티드에 대해 생성된 C-말단 프로가스트린 폴리클로날 항체로 예비-코팅시켰다. 그 후, 플레이트를 100pM 프로가스트린과 인큐베이션한 다음, SEQ ID NO:25의 아미노산 서열로 구성된 펩티드에 대해 생성된 10µg/ml의 비오틴화된 N-말단 항-hPG 폴리클로날 항체 및 증가된 농도의 항-hPG MAb 3 모노클로날 항체를 첨가하였다. 플레이트를 표준 프로토콜에 따라 스트렙타비딘-HRP에 이어 OPD와 인큐베이션함에 의해 비오틴화된 N-말단 항-hPG 폴리클로날 항체의 결합을 검출하였다. 발광을 정량함에 의해 결합을 측정하였다.

[0270] 결과는 증가된 농도 (µg/ml)의 항-hPG MAb 3이 프로가스트린에 결합하는 폴리클로날 항-hPG 항체의 능력을 감소시킴을 나타내는데, 이것은 모노클로날 항체가 폴리클로날 항체와 경쟁함을 나타낸다. 도 6 참조.

[0271] **실시예 6: 에피토프 맵핑**

[0272] 예시적인 모노클로날 항체에 의해 결합된 특이적 에피토프를 문헌[Laune, D., et al., 2002, *J. Immunol. Methods* 267:53-70 and Laune, D., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:30937-30944]에 각각 기재된 대로 SPOT 기술 및 알라닌 스캐닝을 이용하여 맵핑하였다. SPOT 기술에서, 추정상의 에피토프에 걸쳐 있는 15개 아미노산 펩티드 서열을 생성하고 니트로셀룰로스 막 상에 스폿팅한 다음 항체에 의해 인지된 최소 에피토프 서열을 결정하기 위해 시험 항체로 탐색하였다(probed). 알라닌 스캐닝을 이용하여 항체 결합에 결정적인 에피토프 내의 잔기를 결정하였다: 추정상의 에피토프 내에 있는 각각의 잔기는 하나씩 알라닌으로 돌연변이되고, 그 후 알라닌-함유 펩티드를 시험 항체로 탐색한다.

[0273] 에피토프의 패밀리를 본 발명의 예시적인 항체에 대해 확인하였다. hPG Mab 1-4 및 15-20에 대한 N-말단 모노클로날 항체의 경우, 에피토프는 하기 표 8에 제시된 하기 서열을 적어도 포함한다: DAPLG (SEQ ID NO:28), PDAPLG (SEQ ID NO:29), PRSQQPD (SEQ ID NO:30), WKPRSQQPD (SEQ ID NO:31), 또는 WKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO:32).

표 8		
MAb	PG 펩티드 항원: SWKPRSQQPDAPLG	SEQ ID NO
MAb 2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 1	PDAPLG	29
MAb 3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb 18	WKPRSQQPD	31
MAb 19	WKPRSQQPD	31
MAb 20	WKPRSQQPD	31
MAb 15	PRSQQPD	30
MAb 16	PRSQQPD	30

[0274]

[0275] hPG Mab 5-7, 9-12, 14 및 21-23에 대한 C-말단 모노클로날 항체의 경우, 에피토프는 하기 표 9에 제시된 하기 서열을 적어도 포함한다: FGRR (SEQ ID NO:33), MDFGR (SEQ ID NO:34), AEDEN (SEQ ID NO:35), 및 GWMDFGRR (SEQ ID NO:36).

표 9		
MAB	PG 펩티드 항원: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEQ ID NO
MAb 14	GWMDFGRR	36
MAb 11	MDFGR	34
MAb 5	FGRR	33
MAb 6	FGRR	33
MAb 7	FGRR	33
MAb 9	FGRR	33
MAb 10	FGRR..E	33
MAb 12	FGRR	33
MAb 23	AEDEN	35

[0276]

[0277] 실시예 7: 암 세포주에 대한 항-hPG 항체의 증화 활성

[0278] (A) 항-hPG 모노클로날 항체의 증화 활성

[0279] 항-hPG 모노클로날 항체는 대표적인 결장직장암 세포주의 세포 생존을 감소시킨다. 적합한 결장직장암 세포주는 당 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, HCT116, LS174T, SW480, 및 SW620이 프로가스트린을 생산하고 분비하는, 결장암을 연구하는데 일반적으로 이용되는 세포주이다. PG에 대한 모노클로날 항체를 이러한 상이한 세포주의 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 각각의 HCT116, LST174T, SW480, 및 SW620으로부터의 세포의 생존을 상이한 항-hPG 모노클로날 항체를 이용하여 시험하였다.

[0280] 각각의 실험을 위해, 50,000개 세포를 우태아혈청을 함유하는 배지에서 6웰 플레이트내로 시딩하고 8시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 밤새 혈청-차단시키고, 시딩한 지 24시간 후에 시작하여 (시간 "T0"), 세포를 매 12시간마다 48시간 동안, 우태아혈청의 부재하에, 1 µg/ml의 모노클로날 대조군 항체 (마우스 항-인간 IgG1, Calbiochem, Ref #411451)(CT mAb), 또는 지시된 대로 1 µg/ml의 항-hPG Mab 1-4로 이중으로 처리하였다. 모노클로날 항체의 추가 정량시에, 항체는 약 3 내지 5 µg/ml로 이용되었던 것으로 측정되었다. T0에서의 세포의 수를 각각의 실험에 대해 대조군 웰에서 계수하였다. HCT116 세포의 경우, 0.5% 우태아혈청의 존재하에 실험을 수행하였다. 처리를 시작한 지 48시간 후에, 각각의 웰에서 생존한 세포의 수를 맹검 실험으로 3회 계수하였다. 생존한 항-hPG MAb-처리된 세포를 대조군 MAb-처리된 세포의 백분율로서 계산함에 의해 CRC 세포 증식 또는 생존의 감소를 측정하였다. 치료 시작시에 (T0) 세포 수를 48시간에 측정된 시험 세포 및 대조군 세포 수로부터 감하였다. 구체적으로, 대조군 및 항-hPG Mab 처리된 웰 둘 모두의 살아 있는 세포의 수를 48시간에 계수한 다음, 각각의 세포 수와 T0에 측정된 세포 수 사이의 차이를 계산하였다. 그 후 항

-hPG MAb-처리된 세포의 생성된 수를 대조군 MAb-처리된 세포의 수의 백분율로서 표시하였다.

[0281]

도 7a-c는 대표적인 실험으로부터 SW480 세포, LS174T 세포, 및 HCT116 세포의 생존에 대한 항-hPG MAb 3 및 항-hPG MAb 4의 효과를 도시한다. 결과는 두 개의 독립적인 실험에서 나온 4개 웰로부터의 평균 +/- S.E.이다. 항-hPG 모노클로날 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리에 비해 세포 수를 현저하게 감소시켰다. Student's T-test를 이용하여 통계적인 유의성을 측정하였다: * = p<0.05, ** = p<0.01, 및 *** = p<0.001. 각각의 세포주에서, 항-hPG 항체는 세포 생존을 감소시켰다. 하나의 세포주, LS174T에서, 항-hPG 항체로 처리한 48시간이 끝나는 시점의 세포 수는 실험 시작시의 세포 수보다 낮았는데, 이는 세포 증식이 억제된 것에 추가하여, 항체가 세포를 사멸시켰음을 시사한다.

[0282]

표 10은 대조군 모노클로날 항체 (마우스 항-인간 IgG1, Calbiochem, Ref #411451)(CT mAb)에 비해 네 개의 모노클로날 항-hPG 항체 각각으로 처리된 SW480 결장직장암 세포의 생존 %를 나타낸다.

표 10			
SW480 (T0 = 26 667)	세포 수 - T0	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
대조군 mAb	36050 +/- 3228		
항-hPG MAb 1	30425 +/- 3098	84.4	0.3556
항-hPG MAb 2	28925 +/- 2757	80.2	0.0476
항-hPG MAb 3	6050 +/- 1788	16.8	<0.0001
항-hPG MAb 4	17560 +/- 3439	48.7	0.0002

[0283]

대조군에 비해, 항-hPG 모노클로날 항체로의 처리는 83.2% (항-hPG MAb 3), 51.3% (항-hPG MAb 4), 19.8% (항-hPG MAb 2), 및 15.6% (항-hPG MAb 1) 만큼 암 세포의 생존을 감소시켰다.

[0284]

[0285]

하기 표는 대조군 모노클로날 항체에 비해 항-hPG MAb 3 및 4로 처리된 LS174T 및 HCT-116 세포의 생존 %를 나타낸다. 데이터는 도 7의 상응하는 패널에서 그래프에 의해 표시된다.

표 11			
HCT-116 (T0 = 42 750)	세포 수 -T0	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
대조군 MAb	151 250 +/- 9071		
MAb3	62 750 +/- 9194	41.5 %	<0.0001
MAb4	82 250 +/- 7435	54.4 %	<0.0001

[0286]

표 12			
LS 174T (T0 = 51 666)	세포 수 - T0	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
대조군 MAb	85 334 +/- 7520		
MAb3	-6666 +/- 5000	- 8 %	0.0084
MAb4	+8334 +/- 2500	7 %	0.0085

[0287]

시험관내 검정 조건하에, 세포 정상의 완전한 억제는 예상되지 않는다. 세포 배양에서, 프로가스트린은 암 세포에 의해 연속적으로 분비되고 세포 배양 배지에 축적된다. 프로가스트린 수준은 신체에서의 순환에서 발생하는 것보다 시간에 따라 더욱 증가하여, 항체에 대한 표적 단백질의 비를 증가시키고 항체의 중화 효과를 감소시킬 것으로 예상된다. 따라서, 시험관내에서 항체를 이용하여 관찰된 중화 효과는, 종양 세포에 의해 분비된 프로가스트린이 혈류로 흡수되거나 동일반응계내 (*in situ*)에서 이의 축적이 적어지는 생체내에서 더 강할 것으로 예상된다.

[0288]

[0289]

항-hPG MAb 5 내지 23에 의한 세포 증식의 억제는 CRC 세포주 SW620, HCT116, 및 LS47T 중 하나 이상에서 결정되었다. 상기 기재된 대로 5 µg/ml의 대조군 또는 시험 (항-hPG) 모노클로날 항체를 이용하여 6웰 플레이트에서 검정을 수행하였다. HCT116 및 LS174T의 경우 웰 당 50,000개 세포를 시딩하고, SW620 세포의 경우 100,000개를 시딩하였다. 하기 표는 대표적인 실험으로부터 대조군 처리에 비해 처리된 세포의 생존 %를 제공한다. 평균 결과를 세포주 SW620, LS174T, 및 HCT-116에 대해 각각 도 7g-i에 그래프로 표시한다.

표 13

	세포 수 -T0	대조군 %	p (치리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
실험 1			
SW 620 (T0 = 103 067)			
대조군 MAb	82 100 +/- 15489	-	
MAb 5	54 511 +/- 8292	66 %	< 0.0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0.0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0.0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0.0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0.1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0.0618
실험 2			
SW 620 (T0 = 118 553)			
대조군 MAb	81 347 +/- 6062		
MAb 11	46 974 +/- 7422	58 %	0.0003
MAb 12	52 980 +/- 10529	65 %	0.0002
MAb 13	38 933 +/- 5284	48 %	0.0003
MAb 14	83 767 +/- 9484	103 %	0.21
MAb 21	59 497 +/- 2828	73 %	0.0002
MAb 22	64 227 +/- 7123	79 %	0.0013
MAb 23	83 914 +/- 5629	103 %	0.82
실험 3			
SW 620 (T0 = 116 283)			
대조군 MAb	101 333 +/- 17 626	-	
MAb 15	66 052 +/- 7739	65 %	< 0.0001
MAb 16	58 883 +/- 9950	58 %	< 0.0001
MAb 17	76 688 +/- 5578	75.5 %	0.0014
MAb 18	75 874 +/- 10129	75 %	0.0005
MAb 19	70 242 +/- 10 851	69 %	< 0.0001
MAb 20	66 470 +/- 7557	66 %	< 0.0001

[0290]

표 14

	세포 수 -T0	대조군 %	p (치리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
실험 1			
LS 174T (T0 = 60 944)			
대조군 MAb	107 956 +/- 5859		
MAb 13	62 341 +/- 10 683	58 %	0.0003
MAb 16	65 389 +/- 8185	61 %	0.0002
실험 2			
LS 174T (T0 = 86 389)			
대조군 Mab	241 711 +/- 11 620		
MAb 14	246 444 +/- 19563	102 %	ns
MAb 19	204 433 +/- 8946	84.5 %	0.0005
실험 3			
LS 174T (T0 = 79 667)			
대조군 MAb	135 800 +/- 18 338		
MAb 8	57 333 +/- 12657	42 %	< 0.001

[0291]

표 15			
	세포 수 -T0	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 두-테일드
실험 1			
HCT-116 (T0 = 49 286)			
대조군 MAb	78 214 +/- 6230		
MAb 13	28 805 +/- 3477	36 %	< 0.0001
MAb 16	56 484 +/- 8333	72 %	< 0.0001
MAb 19	68 945 +/- 8795	88 %	0.0302
실험 2			
HCT-116 (T0 = 60 944)			
대조군 MAb	122 456 +/- 1697		
MAb 8	75 867 +/- 15627	62 %	< 0.0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	< 0.0001

[0292]

[0293]

[0294]

[0295]

(B) 항-hPG 폴리클로날 항체의 중화 활성

검정을 하기와 같이 변형하여 상기 기재된 대로 수행하였다. 실시예 5에 기재된 N-말단 항-hPG 폴리클로날 항체를 이용하였다. 대조군으로서, 3 µg/ml의 폴리클로날 (폴리클로날 토끼 항-인간 IgG, Affinity BioReagents, Ref #SA1-600)(CT pAb)를 이용하였다. 항-PG 처리를 위해, 3 µg/ml의 항-hPG 폴리클로날 항체를 모든 세포주에 대해 이용하였다. SW480 및 LS174T를 FCS가 없는 DMEM에서 24 내지 48시간 동안 대조군 또는 N-말단 항-hPG 폴리클로날 항체로 처리하는 한편, HCT116을 0.5% FCS를 지니는 DMEM에서 48시간 동안 항-hPG 폴리클로날 항체로 처리하였다. 그 후, 생존 세포를 트립신으로 처리하고, 동등한 농도의 대조군 (항-인간 IgG) 폴리클로날 항체로 처리된 세포와 비교하여, 계수하였다.

대표적인 실험 결과를 하기 표 및 도 7d-f에 제시한다. 항-hPG 폴리클로날 항체로의 처리는 대조군 항체로의 처리에 비해 세포 수를 현저하게 감소시켰다. Student's T-test을 이용하여 통계적인 유의성을 측정하였다: * = p<0.05, ** = p<0.01, 및 *** = p<0.001. 세포 수를 실험 시작시에 (T0) 배양액 중 세포의 수에 관해 표시하였다. 각각의 실험을 위해, 4개 웰 각각의 세포를 3회 계수하였다. 항-hPG 모노클로날 항체의 경우와 같이, 결장직장암 세포 증식은 항-hPG 폴리클로날 항체에 의해 억제되며, 이는 프로가스트린에 대한 폴리클로날 항체에서 보여진 항-중양 효과로부터 암 세포에 대한 프로가스트린의 효과를 차단함에 있어서 모노클로날 항체의 활성이 합리적으로 예측됨을 입증한다.

표 16			
	세포 수 -T0	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 두-테일드
실험 1			
SW 480 (T0 = 26 667)			
대조군 PAb	37 580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0.0001
실험 2			
HCT-116 (T0 = 58 750)			
대조군 PAb	105 350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	< 0.05
실험 3			
LS174T (T0 = 112 500)			
대조군 PAb	207 500 +/- 10 000		
PG PAb	102 500 +/- 5000	49.5 %	< 0.01

[0296]

[0297]

[0298]

실시예 8: 항-hPG 모노클로날 항체의 중화 효과는, 항체가 정제된 hPG와 함께 미리-인큐베이션될 때, 제거된다.

항-hPG 모노클로날 항체의 중화 효과가 hPG와의 결합에 의해 매개됨을 입증하기 위해, LS174T 세포를 hPG와 함께 및 hPG 없이 미리-인큐베이션된 예시적인 항체 -항-hPG MAb 8-의 존재하에 배양하였다. 포지티브 및 네거티브 대조군으로서, 세포를 hPG 단독, 대조군 항체 단독, 및 hPG와 함께 미리-인큐베이션된 대조군 항체와

함께 배양하였다.

[0299] 구체적으로, 33.3 nM (5µg/mL)의 항-hPG MAb 8을 20배 물 과량의 제조합 hPG, 또는 667 nM (6.67 µg/mL)과 함께 실온에서 1시간 동안 미리-인큐베이션하였다. 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 제조합 인간 프로가스트린을 이용하였다. 동시에, 33.3 nM (5µg/mL)의 무린 항-인간 IgG1 (General BioScience, reference no. AB23420)을 유사하게 hPG와 함께 및 hPG 없이 미리-인큐베이션하였다.

[0300] 5000개 LS174T 세포를 10% 우태아혈청을 함유하는 배지에서 96웰 플레이트의 각각의 웰내로 시딩하고 8시간 동안 인큐베이션한 다음, 세포를 무-혈청 배지로 바꾸고 추가로 12시간 동안 성장시켰다. 무-혈청 배지에서 12시간 동안 성장시킨 후에, 세포를 매 12시간마다 하기 중 하나로 처리하였다: 대조군 항체, hPG와 미리-인큐베이션된 대조군 항체, 항-hPG MAb 8 단독, hPG와 미리-인큐베이션된 항-hPG MAb 8, 및 hPG 단독. 첫 번째 처리한 지 48시간 후에, 남아 있는 생육가능한 세포를, 플레이트를 Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution과 인큐베이션하고 490nm에서 흡광도를 기록함에 의해 정량하였다. 대조군 모노클로날 항체 ("대조군 MAb")로 처리된 세포에 대해 측정된 흡광도를 100%로 하였고, 그 밖의 모든 실험 조건을 대조군 MAb로 처리된 세포의 흡광도에 대해 결정하였다. 결과를 하기 표 및 도 8에 도시한다.

표 17			
	흡광도	대조군 %	p (처리 vs 대조군) Mann Whitney, 투-테일드
PG 치료 단독	0.244 +/- 0.088	132.5%	0.099 (n.s.)
대조군 MAb	0.184 +/- 0.084	100%	N.A.
항-hPG MAb 8	0.057 +/- 0.06	31%	0.001
대조군 MAb +hPG	0.321 +/- 0.079	174.5%	0.002
항-hPG MAb8 + hPG	0.271 +/- 0.076	147.6%	0.0229

[0301]

[0302] hPG의 첨가 또는 항체와 hPG의 인큐베이션은 배양액 중 살아 있는 세포의 수를 증가시킨다. 대조적으로, 항-hPG MAb 8 단독으로 세포를 처리하는 것은 생육가능한 세포의 수를 현저하게 감소시킨다. 따라서, PG 활성을 중화시키는 항-hPG 모노클로날 항체의 능력이 hPG의 첨가에 의해 파괴되는데, hPG가 항체와 결합하여 항체를 포화시키는 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 항-hPG 모노클로날 항체의 중화 활성의 특이성을 확인시켜 준다.

[0303] 실시예 9: 항-hPG 항체의 생체내 항-종양 활성

[0304] 결장직장암의 연구를 위해 다수의 실험적 생체내 모델을 개발하였다. 인간 암 세포주로부터의 종양 조직 또는 세포를 면역결핍 (소위 "누드") 마우스에 이식시킨 마우스 이종이식 연구가 개발되었다. 문헌[Pocard M., et al., *In vivo* (1996) 10(5): 463-469]. 여러 유전자이식 마우스 모델이 또한 개발되었다. 무린 모델은 *Apc^{Min}*, *Apc1638N*, *Apc716*, 또는 *ApcΔ14*와 같이, 샘종 결장 폴립증(APC) 유전자에 이종접합 돌연변이를 포함한다. APC 종양 억제 유전자는, 무손상인 경우, 분해를 위해 프로테아좀에 β-카테닌을 표적화하는 다중-단백질 복합체내 세포질액에서 β-카테닌에 결합하여 격리시킴으로써 β-카테닌이 핵의 전사 인자 Tcf-4를 활성화시키는 것을 방지하는 세포질 단백질, APC를 엔코딩한다. 문헌[Heyer et al., *Oncogene* 18:5325-5333 (1999)]. APCΔ14 마우스는 샘종 결장 폴립증 (APC) 유전자 내에서 엑손 14의 이형접합 결실을 지닌다. 산발성 결장직장암 환자의 70%를 초과하는 환자에서 발생하는 것과 유사하게, 두 번째 *Apc* 대립유전자에서 이형접합성의 신체 손실 (LOH)이 장 세포에서 발생하여, β-카테닌/Tcf-4 전사 복합체의 항시적 활성화, 및 이러한 동물에서 장 종양의 자발적인 발생을 초래한다. 마우스 이종이식 모델에 비해 인간 종양에 훨씬 큰 유사성을 지니는 종양 형태학 (혈관화, 염증 반응 및 면역 세포의 존재 포함) 뿐만 아니라 이러한 샘종 및 암종의 분자 기원으로 인해, APCΔ14는 인간 결장직장암 치료 연구를 위해 매우 적절한 모델이다. 문헌[Colnot et al., 2004, *Lab. Invest.* 84:1619-1630]. 그 밖의 유전자이식 마우스 모델은 MSH2, MSH6, CDX2, K-RAS와 같은 유전자에서의 돌연변이 뿐만 아니라 다른 종양유전자에 돌연변이를 지니는 APC에서 돌연변이를 겸비한 주에 기반한다. 문헌[Heyer et al., 1999, *Oncogene* 18:5325-5333, Janssen KP et al., 2002, *Gastroenterology* 123: 492-504]. 이러한 모델은 결장직장암을 연구하고 결장직장암의 치료와 관련된 가설을 시험하는데 광범하게 이용된다.

[0305] 샘종 결장 폴립증 유전자 (APCΔ14)를 지니는 엑손 14의 이형접합 결실을 갖는 유전자이식 마우스는 인간 결장암에서 발견된 것들과 유사한 종양을 발생시키는 결장직장암용 모델로서 활용된다. 첫 번째 실험에서, APC

Δ14 마우스를 문헌[Hollande et al., WO 07/135542]에 기재된 대로 (1) SEQ ID NO:25에 상응하는 펩티드 및 (2) C-말단 펩티드에 대해 생성된 당량의 항-hPG 폴리클로날 항체를 함유하는 제조물로 처리하였다. 3.5개월령 마우스를 대조군 폴리클로날 항체 또는 항-hPG 폴리클로날 항체 (처리 당 두 마리의 마우스) 중 어느 쪽으로 5주간 처리하였다. 항체를 10 mg/kg (150 μL 주입 부피)의 용량으로 매주 2회 복강내 주입에 의해 투여하였다. 처리 끝에, 마우스를 희생시키고, 장을 PBS로 세척하고, 디지털 이미지화를 위해 해부하고, 면역조직화학 분석을 위해 4% 파라-포름알데히드에 고정시켰다. 결장직장 조직의 종양 수 및 이미지를 기록하였다.

[0306] 장 조직의 형태 평가로부터, 항-hPG 항체는 건강한 뮤린 장 상피의 재생에 영향을 미치지 않았다. 처리군 및 대조군에서 종양을 계수하였다. 대조군 항체로 처리된 마우스의 경우 종양의 총 수는 27개였고, 이에 비해 항-hPG 항체로 처리된 마우스에서는 4개였다. 따라서, 항-hPG 항체는 마우스 장의 건강한 상피의 재생에 영향을 주지 않으면서, 대조군 항체에 비해 종양 수를 6.5배 넘게 감소시킨다.

[0307] 두 번째 실험에서, APCΔ14 마우스 및 정상 (대조군) 마우스 (C57BL6J)에서 항-hPG 항체의 효과를 조사하였다. 4개월령 마우스를 9 mg/kg (150 μL 주입 부피)의 용량으로 매주 2회 복강내 주입에 의해 대조군 폴리클로날 항체 -토끼 항-인간 IgG 항혈청 (Jackson ImmunoResearch (reference no. 309-005-0089)- 또는 항-hPG 폴리클로날 항체로 6주간 매주 2회씩 처리하였다. 6주 처리 후에, 희생시키기 2시간 전에, 마우스에게 브로모-데옥시-우리딘 (BrdU)(마우스 당 2 mg, 복강내 주입)을 주입하였다. 6마리의 APCΔ14 마우스를 항-hPG 폴리클로날로 처리하고 4마리를 대조군 폴리클로날 항체로 처리하였다. 대조군 및 항-hPG 항체를 6마리의 정상 (C57BL6J) 마우스에게 각각 투여하였다. 어느 쪽 그룹의 마우스에서도 장 이상은 검출되지 않았는데, 이는 정상 장 조직에 대한 항-hPG 항체의 안전성 및 부작용이 없음을 추가로 입증한다.

[0308] APCΔ14 마우스의 처리군 대 대조군에서 종양 수 및 크기 (높이 및 길이)를 조사하였다. 하기와 같이 제조된, 각각의 동물의 장으로부터 수득된 이미지 측정에 의해 종양 크기를 결정하였다. 장을 상기 기재된 대로 세정하고, 세로로 해부하고, 파라핀에 묻고, "스위스 롤(Swiss roll)" 기술을 이용하여 면역조직화학을 위해 가공하였다. 종양 길이 및 높이의 측정을 Image J 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0309] 결과를 표 18 및 도 8a 및 8b에 도시한다. 종양 크기에 대한 결과는 대조-처리군 및 항-hPG-처리군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다. 통계적 유의성은 Mann Whitney 시험을 이용하여 결정하였다: * = p<0.05, ** = p<0.01, 및 *** = p<0.001. 대조군 항체로 처리된 마우스는 총 125개의 종양을 나타내었고, 마우스 당 평균 31.25개 종양이었다. 항-hPG 처리된 마우스는 46개의 종양 또는 마우스 당 평균 7.6개 종양을 나타내었다. 이러한 차이는 항-hPG 항체가 생체내 결장직장암 종양의 수를 현저하게 감소시킴을 나타내는 통계적 의미 (Mann-Whitney 시험, P= 0.0095)가 있다.

표 18						
처리 (마우스 no.)	마우스 당 종양의 수					
	대조군 PAb (4)	23	48	28		26
항-hPG PAb (6)	2	16	15	9	2	2

[0310]

[0311] 항-hPG 항체는 정상 결장직장 상피에 어떠한 명백한 부작용을 지니지 않으며, 결장직장암의 뮤린 모델에서 종양 수 및 종양 크기 둘 모두에서의 감소에 의해 측정된 바와 같이 결장직장암 종양을 현저하게 감소시킨다. 따라서, 항-hPG를 이용한 결장직장암 종양의 처리는 생체내에서 치료적 이익을 제공한다.

[0312] **실시예 10: 인간화 항-hPG 항체의 설계**

[0313] 인간화 항체는 뮤린 항-hPG 모노클로날 항체 MAb 3, 4, 8, 13, 16, 및 19로부터 "in silico" 설계된다. 인간화 항체의 설계는 문헌[Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111]에 기재된 방법에 따라 수행되었다. 각각의 뮤린 모노클로날 항체에 대해, 뮤린 서열의 CDR 및 프레임워크 영역을 IMGT-ONTOLOGY 데이터베이스 (Duroux et al., 2008, Biochimie, 90:570-583; Giudicelli and Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15: 1047-1054) 및 IMGT® 데이터베이스 및 툴 (Ehrenmann et al., 2010, Nucl.Acids. Res., 38: D301-307; Brochet et al., 2008, Nucl.Acids. Res., 36: W503-508)을 이용하여 확인한 다음 IMGT/GENE-DB (Giudicelli

et al., 2005, Nucl.Acids. Res., 33: D256-261)에서 가장 근접한 인간 프레임워크 영역 서열 중 아미노산 서열을 확인하고, 인간 프레임워크 영역 상에 뮤린 CDR 서열을 그래프팅함에 의해 상응하는 인간화 V_H 및 V_L 캄티드 서열을 결정하였다. 더욱 구체적으로, 뮤린 V_H 및 V_L 도메인의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 IMGT/V-QUEST 및 IMGT/ DomainGapAlign을 이용하여 분석하여 뮤린 CDR 및 프레임워크 영역의 범위를 정하고, CDR 길이를 규정하고, 앵커(anchor) 아미노산을 확인하였다. 앵커 아미노산은 CDR1-IMGT, CDR2-IMGT, CDR3-IMGT를 지지하는 IMGT "Collier de Perles"의 위치 26, 39, 55, 66, 104 및 118에 있는 잔기이다 (Kaas and Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2: 21-30; Kaas et al., Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6: 253-264). 뮤린 서열에 가장 근접한 인간 V (가변) 및 J (연결) 유전자를 확인하고 가장 적합한 유전자를 선택하였다. 뮤린 프레임워크 영역의 개별적인 아미노산이, 두 개의 층들에 대한 IMGT Collier de Perles 이용시 공지된 3D 구조와의 비교에 의해 (Kaas et al., 2004, Nucl. Acids. Res. 32: 208-210) 아마도 항체의 특이성에 기여하는 것으로 고려되는 경우, 상기 아미노산을 유지시켰다.

[0314] MAb 3에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 8, 8 및 8개 아미노산 길이로 측정되었다. 뮤린 MAb 3 V_H의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV1-5*01은 10개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 3개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다 (CDR1 중 I29, CDR2 중 F56 및 S65). 또한, V39, G55, 및 R66은 특이성을 보존하는데 잠재적으로 중요하게 고려되며 설계에 유지되었다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGHV1-3*01이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 63.3% 동일함). 뮤린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 27개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 트레오닌-123 및 류신-124가 류신-123 및 발린-124으로 바뀌어 인간 IGHJ1*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 3에 대한 인간화 V_H는 IGHV1-46*03에 대한 가변 영역과 87.8% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역의 91개 아미노산 중 88개가 동일하였다.

[0315] MAb 3에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 11, 3 및 9개 아미노산 길이로 측정되었다. 뮤린 MAb 3 V_L의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGKV1-117*01는 단일 잔기에서 상이하였고 프레임워크 영역으로 맵핑하였다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGKV2-30*02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 81% 동일함). 뮤린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 14개의 서열 차이가 발견되었다. 잔기 E40 및 F68이 계획된 인간화 서열에서 유지되었다. 프레임워크 영역 4에서, 류신-124가 발린-124로 바뀌어 인간 IGKJ4*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 3에 대한 인간화 V_K 서열은 IGKV2D-29*02와 93% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역의 89개 아미노산 중 87개가 동일하였다.

[0316] 계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 19		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 사슬
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSKFQGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSPQYWGQGLTVTVSS	hV _H 3
22	DVVMTQSPFLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQ QRFPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIK	hV _K 3

[0317]

[0318] MAb 4에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 8, 8 및 11개 아미노산 길이로 측정되었다. 뮤린 MAb 4 V_H의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV1-9*01는 11개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 4개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다 (CDR1 중 S35, S36, 및 S37, CDR2 중 F56). 또한, D66은 특이성을 보존하는데 잠재적으로 중요하게 고려되며 설계에 유지되었다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGHV1-46*03이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 64.9% 동일함). 뮤린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 27개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 알라닌-128이 세린-128로 바뀌어 인간 IGHJ5*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 4에 대한 인간화 V_H는 IGHV1-46*03에 대한 가변 영역과 91.8% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역의 91개 아미노산 중 90개가 동일하였다.

[0319] MAb 4에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 11, 3 및 9개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 4 V_L 의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGKV1-110*01은 3개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 2개를 CDR1으로 맵핑하였으며 (세린-34 및 발린-36), 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGKV2D-29*02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 81% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 11개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 세린-120이 글루타민-120으로 바뀌어 인간 IGKJ2*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 4에 대한 인간화 V_K 서열은 IGKV2D-29*02와 92% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0320] 계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 20		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 사슬
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFSSSWMHWRQAPG QGLEWMGIFLPGSGSTDYAKFKQGRVTMTRDTSTSTVYME LS SLRSEDTAVYYCATDGNVDWFAYWGQGLVTVSS	hV_H4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLTKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	hV_K4

[0321]

[0322] MAb 8에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 8, 8 및 10개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 8 V_H 의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV5-9-3*01은 5개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 4개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGHV3-21*01 및 *02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 80.4% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 12개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 세린-123 및 류신-124가 트레오닌-123 및 발린-124로 바뀌어 인간 IGHJ6*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 8에 대한 인간화 V_H 는 IGHV3-21*01 및 *02에 대한 가변 영역과 92.8% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다. MAb8에 대한 무린 V_H CDR3에 잠재적인 N-글리코실화 부위가 존재한다.

[0323] MAb 8에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 11, 3 및 9개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 8 V_L 의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGKV2-109*01은 6개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 4개를 CDR1으로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGKV2-28*01 및 IGKV2D-28*01이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 75% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 12개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 알라닌-120, 류신-124 및 류신 126이 각각 글리신-120, 발린-124 및 이소류신-126으로 바뀌어 인간 IGKJ4*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 8에 대한 인간화 V_K 서열은 IGKV2-28*01 및 IGKV2D-28*01과 87% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0324] 계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 21		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 사슬
75	EVQLVESGGGLVKGKGLRSLRSCAASGFT FTTYAMNWRQAPGKGLEWVSSISSGGT YTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT TVVSS	hV _H 8a
76	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPD RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK	hV _K 8a
77	EVQLVESGGGLVKGKGLRSLRSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISSGGTYTYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQGTTVVSS	hV _H 8b
78	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPA RSSKSLRHTKGITFLYWLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVPD RFGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK	hV _K 8b
79	EVQLVESGGGLVKGKGLRSLRSCAASG FTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYTYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNLSRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT TVVSS	hV _H 8b

[0325]

[0326]

Mab 13에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 8, 8 및 7개 아미노산 길이로 측정되었다. 유린 Mab 13 V_H의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV5-6-3*01은 10개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 5 개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포 계열 유전자는 IGHV3-7*01 및 *02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 78.6% 동일함). 유린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 13개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 트레오닌-123 및 류신-124가 각각 류신-123 및 발린-124로 바뀌어 인간 IGHJ4*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, Mab 13에 대한 인간화 V_H는 IGHV3-7*01 및 *02에 대한 가변 영역과 91.8% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0327]

Mab 13에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 11, 3 및 9개 아미노산 길이로 측정되었다. 유린 Mab 13 V_L의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGKV1-135*01은 프레임워크 영역에 위치한 단일 잔기에서 상이하였다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGKV2-30*01 및 *02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 81% 동일함). 유린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 13개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 류신-124가 발린-124로 바뀌어 인간 IGKJ4*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, Mab 13에 대한 인간화 V_K 서열은 IGKV2-30*01 및 *02와 94% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0328]

계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 22		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 사슬
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLRSCAASGFIFSSYGMWVRQAP GKGLEWVANINTEFGDRYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTWQGTTLTVVSS	hV _H 13a
81	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQ QRPQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGTTFPQTFGGGKVEIK	hV _K 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLRSCAASGFIFSSYGMWVRQ APGKGLEWVANINTEFGDRYYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNLSRAEDTAVYYCARGTGTWQGTTLTVVSS	hV _H 13b
83	DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQ RQRPQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCWQGTTFPQTFGGGKVEIK	hV _K 13b

[0329]

[0330] MAb 16에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 8, 8 및 10개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 16 V_H의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV1-53*01은 7개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 2개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGHV1-46*01 및 *03이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 71.4% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 25개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 류신-124가 발린-124로 바뀌어 인간 IGHJ6*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 16에 대한 인간화 V_H는 IGHV1-46*01 및 *03에 대한 가변 영역과 96.9% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0331] MAb 16에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 11, 3 및 9개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 16 V_L의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGKV1-135*01은 프레임워크 영역에 위치한 4개의 잔기에서 상이하였다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 CDR1에서 하나의 아미노산만큼 상이한 IGKV2-30*01 및 *02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 79% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 15개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 글리신-120이 글루타민-120으로 바뀌어 인간 IGKJ2*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 16에 대한 인간화 V_K 서열은 IGKV2-30*01 및 *02와 94% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0332] 계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 23		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 사슬
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTSYMHVWRQAPG QGLEWMMGIINPSNGGTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTFTVTVSS	hV _H 16a
85	DVVTQSPSLPVLTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNVFQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAE DVGYYCQWQTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTSYMYVWRQAPG LWMMGIINPSNGGTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTFTVTVSS	hV _H 16b
87	DVVTQSPSLPVLTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAE DVGYYCQWQTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTSYMYVWRQAPG LWMMGIINPSNGGTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTFTVTVSS	hV _H 16c
89	DVVTQSPSLPVLTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQ RPGQSPRRLLYLVSNRDSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAE DVGYYCQWQTHSPYTFGQGTKLEIK	hV _K 16c

[0333]

[0334] MAb 19에 대한 V_H CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 9, 7 및 14개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 19 V_H의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGHV3-2*01은 5개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 2개를 CDR로 맵핑하였으며, 인간화 항-hPG 모노클로날 항체의 설계에 유지시켰다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGHV4-30-4*01이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 72.4% 동일함). 그러나, 이러한 유전자가 다형성이므로, IGHV4-31*02 및 *03 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 71.4% 동일함)이 선택되었다. 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 21개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 이소류신-123이 류신-123으로 바뀌어 인간 IGHJ4*01 유전자에 매칭되었다. 전반적으로, MAb 19에 대한 인간화 V_H는 IGHV4-31*02 및 *03에 대한 가변 영역과 91.9% 동일하였고 네 개의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0335] MAb 19에 대한 V_L CDR은 CDR 1, 2, 및 3에 대해 각각 7, 7 및 13개 아미노산 길이로 측정되었다. 무린 MAb 19 V_L의 서열에 가장 근접한 생식세포계열 마우스 유전자, IGLV3*01은 8개의 잔기에서 상이하였고, 그 중 5개는 CDR에 위치하였다. 가장 근접한 인간 생식세포계열 유전자는 IGLV4-69*01 및 *02이었다 (IGMT/DomainGapAlign에 기반하여 아미노산 수준에서 69.9% 동일함). 무린 및 인간 생식세포계열 유전자간에 프레임워크 영역 1 내지 3에서 23개의 서열 차이가 발견되었다. 프레임워크 영역 4에서, 발린-124가 류신-124로 바뀌어 인간 IGLJ3*01 유전자에 매칭되었다. 대안적으로, IGJK4*01 유전자를 프레임워크 4 영역에 이용할 수 있다. 전반적으로, MAb 19에 대한 인간화 V_K 서열은 IGLV4-69*01 및 *02와 92.4% 동일하였고 네 개

의 프레임워크 영역에 대해 100% 동일하였다.

[0336]

계획된 V_H 및 V_K 서열을 하기 표에 제공한다.

표 24		
SEQ ID NO:	아미노산 서열	V 서술
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLTVTVSS	V_H19a
91	QLVLTQSPASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIAWHQQPEK GPRYLMKVKDGSKSGDGI PDRFSGSSGAERYLTISLQSE DEADYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V_K19a
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNIRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKSS VTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLTVTVSS	V_H19b
93	QLVLTQSPASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQPEKG PRYLMKVKDGSKSGDGI PDRFSGSSGAERYLTISLQSE EADYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V_K19b
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNIRQHPGK GLEWIGYISFSGYTYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLKSSVTA ADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLTVTVSS	V_H19c
95	QLVLTQSPASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQPEKGP RYLMEVKKDGSKSGDGI PDRFSGSSGAERYLTISLQSE ADYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V_K19c

[0337]

[0338]

본 출원에 인용된 모든 공개문헌, 특허, 특허 출원 및 그 밖의 문서는, 각각의 개별적인 공개문헌, 특허, 특허 출원 및 그 밖의 문서가 모든 목적을 위해 참조로서 포함된다고 개별적으로 지시된 바와 같이 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다. 다양한 특수한 구체예가 예시되고 기재되었으나, 발명(들)의 본질 및 범위를 벗어나지 않으며 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

수탁번호

[0339]

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4371

수탁일자 : 20101006

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4372

수탁일자 : 20101006

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4373

수탁일자 : 20101006

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4374

수탁일자 : 20101006

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4375

수탁일자 : 20101006

기탁기관명 : Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

수탁번호 : CNCMI-4376

수탁일자 : 20101006

도면

도면1

포리포르가스트린 : M ÖRLCVYVLLIE ALALAAFSEA SWKPRRSQÖPD APLIGTGANRD LELPWLEÖÖG
 -21 -11 -1 1 11 21
 PASHHRRÖLG PÖGPPHLYAD PSKKÖGFWLE EEEBAYGWMD FGRRSÄEDEN
 31 41 51 61 71
 포리포르가스트린 : PASHHRRÖLG PÖGPPHLYAD PSKKÖGFWLE EEEBAYGWMD FGRRSÄEDEN
 31 41 51 61 71
 SWKPRRSQÖPD APLIGTGANRD LELPWLEÖÖG
 1 11 21
 PASHHRRÖLG PÖGPPHLYAD PSKKÖGFWLE EEEBAYGWMD FGRRSÄEDEN
 31 41 51 61 71
 ÖLG PÖGPPHLYAD PSKKÖGFWLE EEEBAYGWMD F-NH₂
 41 51 61 71
 ÖLG PÖGPPHLYAD PSKKÖGFWLE EEEBAYGWMD FG
 41 51 61 71
 EGPWLE EEEBAYGWMD F-NH₂
 61 71
 EGPWLE EEEBAYGWMD FG
 61 71
 SAEDEN
 75

도면2a

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGGCCAAAGGCTTCCGATGATGCTGCAAGGCTTCTGACATCTTTACCACTACTGGG
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y I F T S Y W
110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
TACACTGGGTTAAACAGAGGCTTGGACAGGGCTTACGAAATGATGATGATGATTTTATTCCTGGAAATAGTGAATCTAGTACACCAAGAAATTCAGGGCAA
V H W V K Q R P G Q G L E W I G G F Y P G N S D S R Y N Q K F K G K
120      220      230      240      250      260      270      280      290     300
GGCCACACTGACTGACAGTCCAGTCCGCACTGCTTACATGAGAGCTTCCAGCCTTACCAATGAGGACTCTGGGCTTATTTCTGTACGAAGAAGAT
A T L T A V T S A S T A Y M D L S S L T N E D S A V Y F C T R R D
130      320      330      340
AGTCCCACTACTGAGGAGCCAGGACCACTCTCACAGTCTCTCA
S P Q Y W G Q G T T L T V S S
mVHCDR 3.3
mVHCDR 1.3
mVHCDR 2.3
mVHCDR 3.3

```

도면2b

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGAATGACCCAAACTCCACTCTCCCTCCCTGAGTCTTGAGATCAAGCTCCACTCTTGCAAGATCTAGTCAGAGCATTTGACATGATATG
D V L M T I Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N
mVLCDR 1.3

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTGAAATGGTACTGCGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTTCGATCTACAAAGTTCCAAACCGAATTTCTCTGGGGTCCACAGCAGGTT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F
mVLCDR 1.3
mVLCDR 2.3
mVLCDR 3.3

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTGGCAGTGGATCAAGGACAGATTTTCACCTCAAGATCAAGCAAGCACTGGAGGCTGAGAGATCTGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCAACATGTTCCG
S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P
mVLCDR 3.3

310     320     330
TTACAGTTGGAGGGGGGAGACCAAGCTGGAAATATAAA
F T F G G G T K L E I K
mVLCDR 3.3
    
```

도면2c

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CAGGTTCAGTTGCACGACAGTCTGGAGCTGATGATGMAAGCCAGGGGCTCTAGTAAAGATATCTGCACAGGCTATGCTTACACATTTCAGTAGCTCTGGA
Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S S W
                                     mVHCDR 1.4
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TAGAGTGGTTAAAGACAGAGGGCTGGACATGGGCTTGGATGGAGATTGGAAGATTTTACTGGGAATGGSTAGTACAGACTACACAAATGAGAGATTCCAGGGCAA
I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K
                                     mVHCDR 2.4
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACTTTCAGTGCAGACGATCTCCGACACAGCTTACATGACTACTCAGCAGCCTGACATCTGAGAGACTGCGCTCTATTTACTGTGCAACTGATGATGGT
A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y Y C A T D G
                                     mVHCDR 3.4
310     320     330     340     350
AATTATGACTGGTTTACTTACTGGGCGCAAGGACTCTGTGTTACTGTCTCTGCA
N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A
                                     mVHCDR 3.4

```

도면2d

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATCTTGTATGATCCCAAAGTCCACTCTCTCCCTGCTCAGTCTTGAGATCAAGCCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTACACAGTAGTG
D L V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S S
                                     mVLCDR 1.4
110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
GAGTCACCTAATTTACATTGTGTACTGCAAGACCAGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTTACAAAGTTTCCAAAGCGAATTTCTGGGGTCCGAGACAGGTT
G V T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F
                                     mVLCDR 1.4
210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
CAGTGGCAGTGGATCAAGATTTCACACTCAAGTCAAGAGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTAAATTTCTGCTCAAAAGTACACATGTTCCCT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P
                                     mVLCDR 2.4
310      320      330
CCACAGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATPAAA
P T F G S G T K L E I K
                                     mVLCDR 3.4
mVLCDR 3.4

```

도면2e

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAATGCAAGCTGTGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTAGTGAAGGCTTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTGTGCGAGGCTTGGATTTCACITTCCTACTACTACTAATGCCA
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T T Y A
                                     mVHCDR 1.8
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCTTGGGTTGCCAGACTCCGGAGAGAGGCTGAGTGGTCCGAACTTAGTAGTAGTGGTGTACTTACACTTATTCGAGACAGTGTGAAAGGTCG
M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y T Y Y P D S V K G R
                                     mVHCDR 2.8
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTACCATCTCCAGAGACAAATGCAATGCAAGCCCTTATACCTGCAAAATGAGCAAGTGTGAGGTCGTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCACACAGAGGGG
F T I S R D N A K N A L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A T Q G
                                     mVHCDR 3.8
310     320     330     340
AATTACTCTTTGGACTTCTGGGGCAAGGCACTCTCTCAAGATCTCCCTCA
N Y S L D F W G Q G T S L T V S S
                                     mVHCDR 3.8
    
```

도면2f

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GACHTTGTATGACGAGGCTGCATCCCTCTAATCGACTCTTGGAAACATCCGTCATCCCTCGAGGTCTAAGATCTCCGACATACATAAG
D I V M T Q A A S S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K
mVLCDR 1.8

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GCATCATTTTTTGTATTGATCTGCAGAAAGCCAGGCGCCGTCCTCCATGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGAGATCCCGACAGGTT
G I T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F
mVLCDR 1.8

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTAGCAGTGGGTGAGAACTGATTTTCACACTGAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAAATCTAAGAACTTCCG
S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y C A Q N L E L P
mVLCDR 2.8

310     320     330
CTCAAGTTCCGTCCTGGAGCCAGACTGGAGCTGAA
L T F G A G T K L E L K
mVLCDR 3.8
    
```

도면2g

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTGACAGCTGTGTGAGATCTGGGGGAGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGCTCCGAAACTCTCTGTGCAACCTCTGGATTTTCAGTACGCTATGGCA
E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G
                                     mVHCDR 1.13
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTCITGGGTTGGCCAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAATTAATCTTTGGTGAIVAGAACCTATTAATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R
                                     mVHCDR 1.13
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTCCCATCTCCAGAGCAATGSCAAGAACACCCCTGTACCTGCAATGACACAGTCTGAAAGTCTGAGGACACAGCCATTTAATTAATCTGTGCAAGAGGGACC
F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y Y C A R G T
                                     mVHCDR 1.13
310     320     330     340
GGAACCTTACTGGGGCCAGGCAACCACTCTCAAGTCTCTCA
G T Y W G Q G T T L T V S S
                                     mVHCDR 3.13

```

도면2h

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATGTTGCTGACCCAGACTCCACTCTTGTGGTTAACATTGGAGACAACAGCCCTCCATCTCTGGAGTCAAGGTCAAGCCCTTTAGATAGTATG
D V V L L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D
mY,CDR 1.13

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GAAAGCAATATTGAATTGTTTACAGAGGCCAGGCCACTCCAAAGCCCTAAATCTATCTGTGTCTTAAACTGAGACTGAGAGTCCCTGACRAGTT
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F
mY,CDR 1.13
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
CACTGACAGTGAATCAAGGACAGATTTCACACTGAAAATCAAGCAAGTGAAGGCTGAGAGTTTGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P
mY,CDR 2.13
310 320 330
CAGAGCTTCGGTGGAGGACACCAAGCTGGAATCAAA
Q T F G G T K L E I K
mY,CDR 3.13

```

도면2i

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTCCAACTGCGAGAGTCTGGGGCTGAACTGATGTAAGCGGCTTCAATGAAAGTGTGCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTGACCACTACTATA
Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y
                                     mVHCDR 1.16
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTACTGGGTGAAAGCAAGGCGTGGACAAAGGCGCTTGAATGATTTGGAGATTAATCTTAGCAATGATGTAATCACTCAATGAGAAATTCAGAGCAA
M Y W V V K Q R P G Q G L E W I G E I N P S N G G T N F N E K F K S K
                                     mVHCDR 2.16
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACACTGATGTAGACAATAATCCCTCCAGCACAGCAATGCAACTCAGAGCCTGAGACCTGAGACCTGCGGATCTAATTACTGTACAGAGAGGGGT
A T L T V D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R G G
                                     mVHCDR 3.16
310     320     330     340     350
TACTACCCCTTTTGACTACTGAGGGGCAAGGCAACCACTCTCAGAGTCTCTCA
Y Y P F D Y W G Q G T L T V S S
                                     mVHCDR 3.16

```

도면2j

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGTATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGGTTACCATTTGGGGGCCCCAGCCTCCATCTCTTGCAGATCAAGTCAAGAGCCCTTGTAGACAGTGAATG
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D
                                     mVLCDR 1.16
110      120      130      140      150      160      170      180      190     200
GAAAGACATATTTTGTATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCCACTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGTGTGAGCTGAGACTGTGAGTCCCTGACAGGAT
G K T Y L Y W L L Q R P G S P K R L I Y L V S E L D S G V P D R I
                                     mVLCDR 2.16
mVLCDR 1.16      210      220      230      240      250      260      270      280      290     300
CACTGCGAGTGGGTCGGGACAGATTTTCACACTGAAATTCAGCAGAGTGGAGAGGCTGAGGATTTGGGAGGTTTATTTATTTGCTGCAAGGAAACACACTTCTCCG
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H S P
                                     mVLCDR 3.16
310      320      330
TACAGTTTCGGAGGGGGACCAAGACTGGAAATPAAA
Y T F G G I K L E I K
                                     mVLCDR 3.16

```

도면2k

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTGAGACTTCAAGGAGTGGGACCTGGCCGAGTGAACGCTTCTCAAGTCTCTGTCCTCCACATGACATGTGACATGGCTACTCAATGACCCAGTGAATATG
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y
                                     mVHCDR 1.19
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CCTGGAATTTGGANCCGAGATTCCAGGAAACAAACTGAGTGGATGGGCTACTAGCTTCACTGATGTTACACTGATGTTACACCACCTCTCTCAAAAAGTCG
A W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I S F S G Y T S Y N P S L K S R
                                     mVHCDR 1.19
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AATCTGTGACTCTGGGAGCACATCCAGGAACTCAATTTCTTCTCTCCAGTTGACTTGTGTGACTGAGGACACACGACCATTTACTGTGCAAGAGAGGTC
I S V T R D T S R N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y C A R E V
                                     mVHCDR 2.19
310     320     330     340     350     360
AACTATGGGACTCCTTACCACTTTTGCAGTACTGAGGGCCAGGACCCATTTGTCTACAGTCTCTCA
N Y G D S Y H F D Y W G Q G T I V T V S S
                                     mVHCDR 3.19
mVHCDR 3.19
    
```

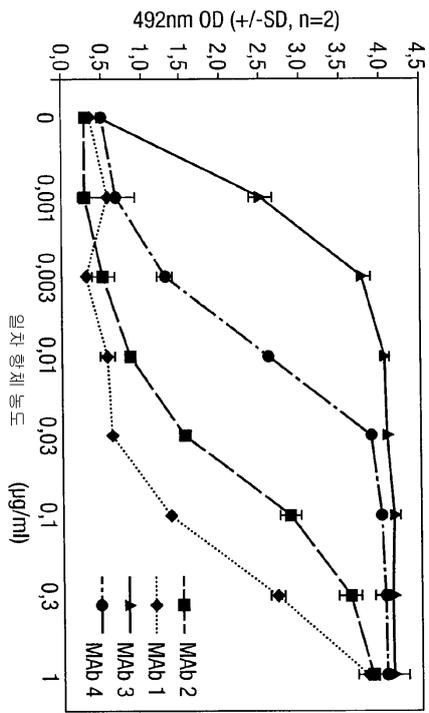
도면21

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAACTTGGCTCACTCAATTCATTCAGCTTCTTCTCCCTGGAGCCCTCAGCAGAACTAAGCTTGCACCTTTGATGATGACACAGAAAGTACACCTTGG
Q L A L T Q S S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I
                                     mVLCDR 1.19
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AATGGATCAGCAAGATCCTCAAGCCTCCTTAGTATGATGATGAGAGGTTAAGAAAGATGGAGAGCCACAGCAGCAGAGTGTGGGATTCCTGATTCGCTTCTC
E W Y Q Q Q S L K P P K Y V M E V K K D G S H S T G H G I P D R F S
                                     mVLCDR 2.19
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGATCCAGTTCGTGATGATGCTACCTCAGCATTTCCAAATCCAGCCCTGAGAGATGAAAGCAATATACATCTGTGGTGTGGGATGATGCAATTAAGGGA
G S S S G A D R Y L S I S N I Q P E D E A I Y I C G V G D A I K G
                                     mVLCDR 3.19
310     320     330     340
CAATCTGTGTTTGGGGGGGGTGGCAGCAGAGGTACACTGTCTCTA
Q S V F V F G G G T K V T V L
mVLCDR 3.19

```

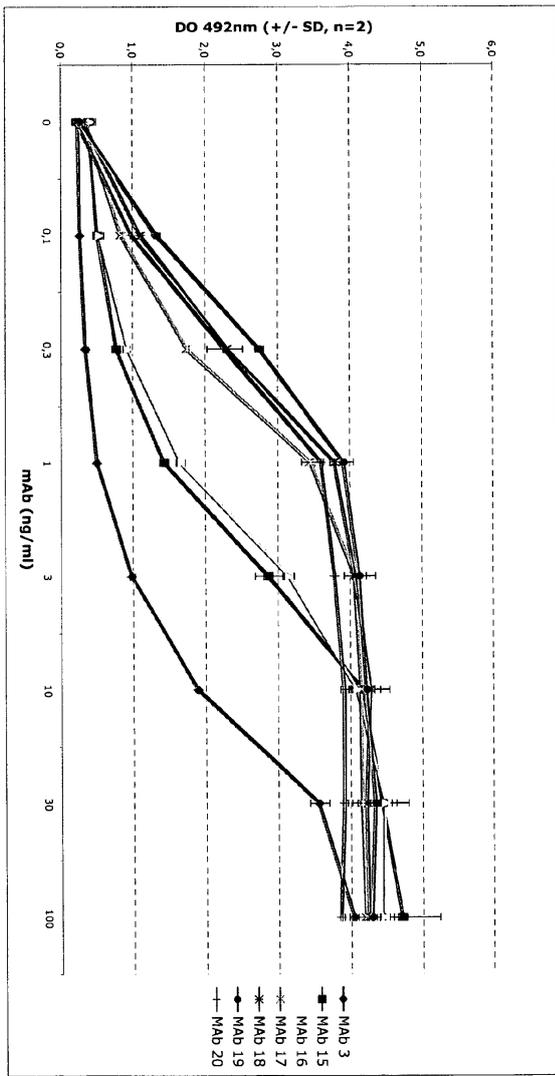
도면3a



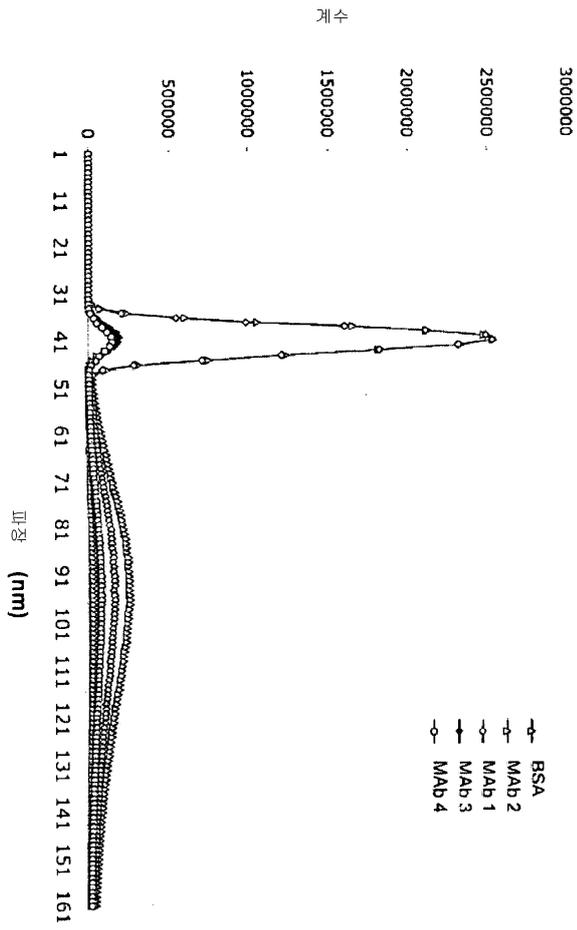
도면3b



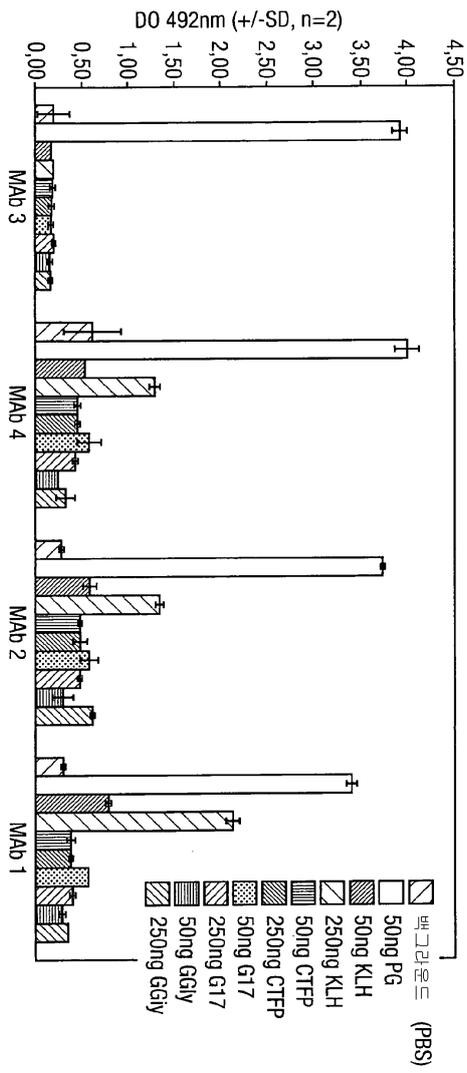
도면3c



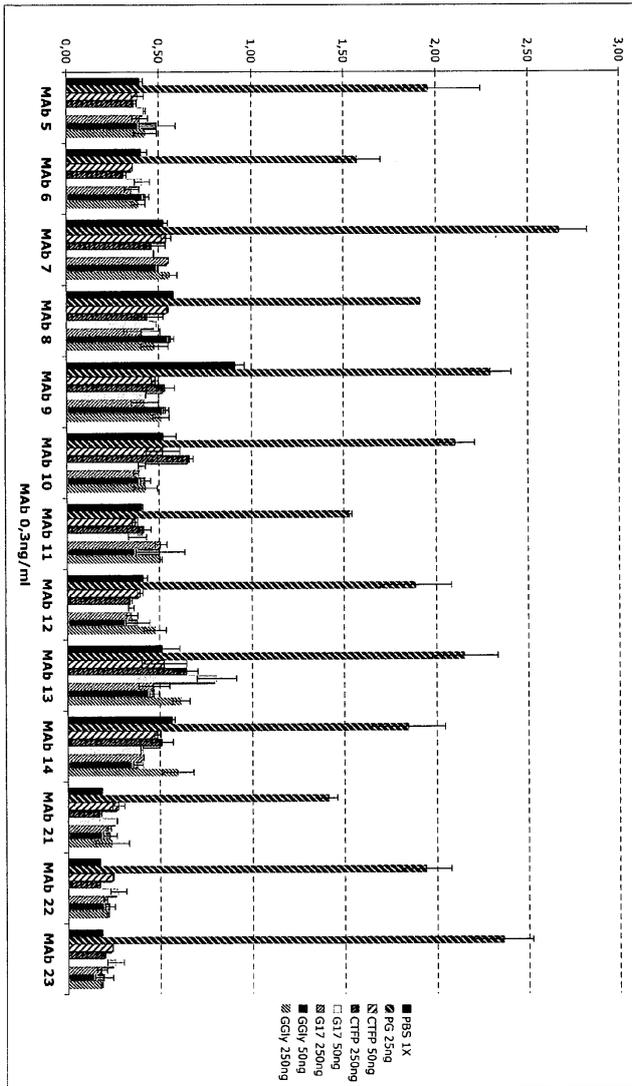
도면4



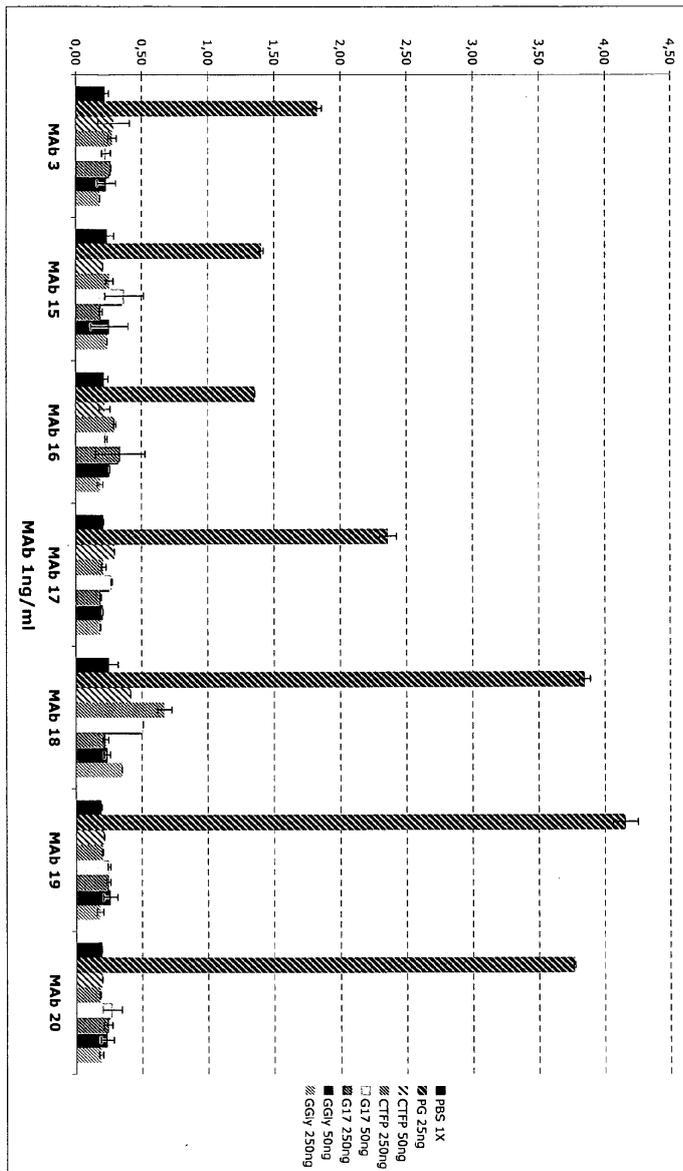
도면5a



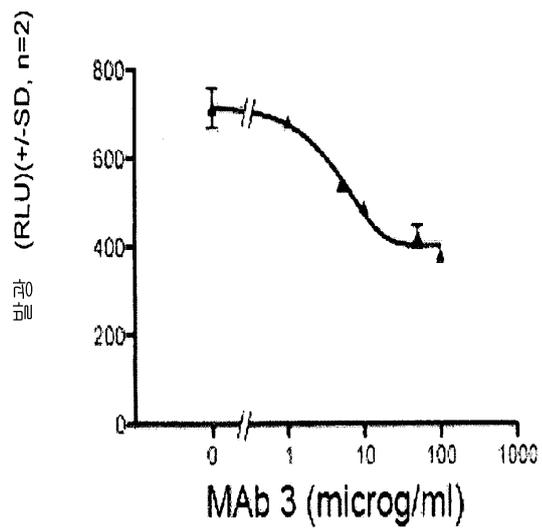
도면5b



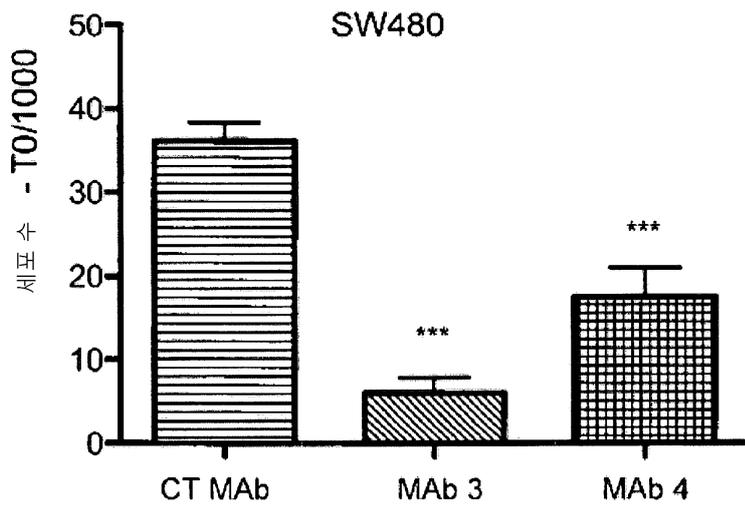
도면5c



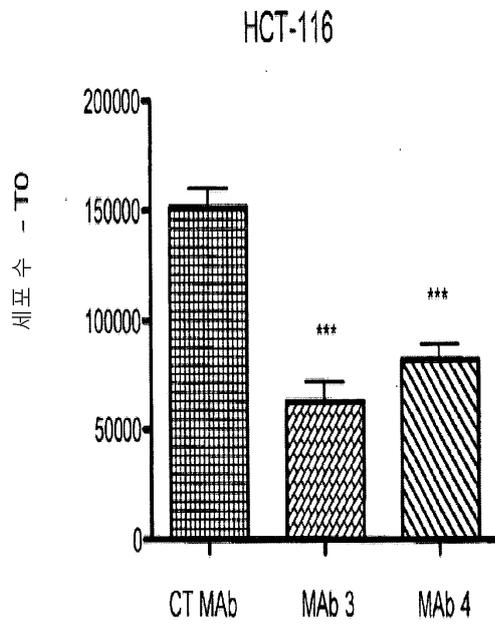
도면6



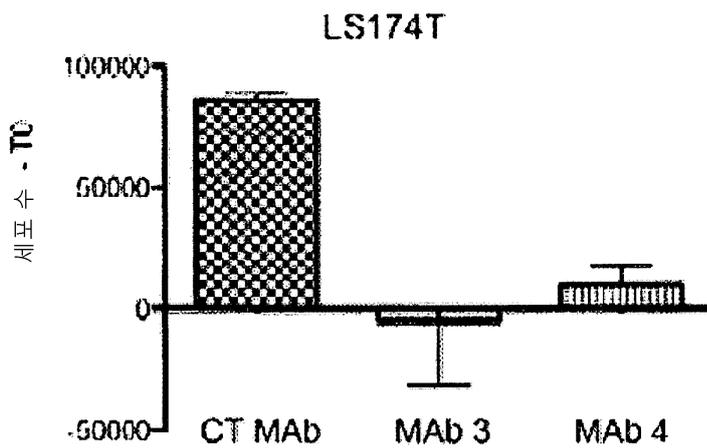
도면7a



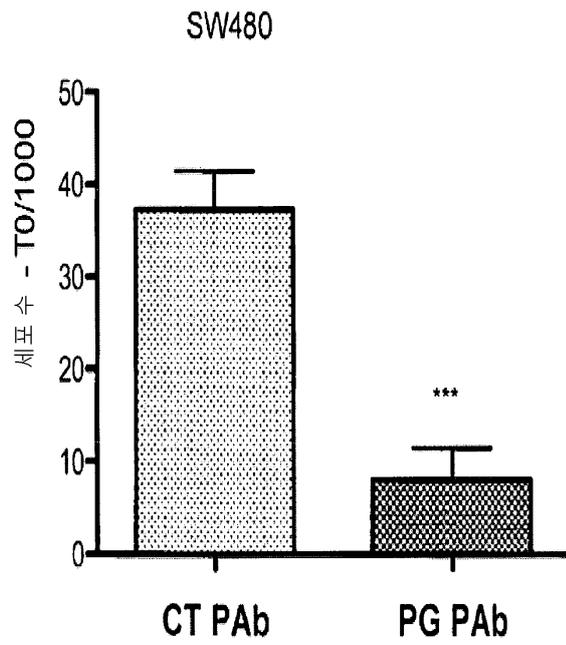
도면7b



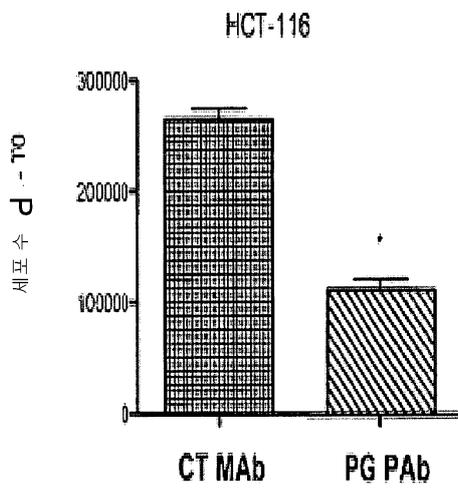
도면7c



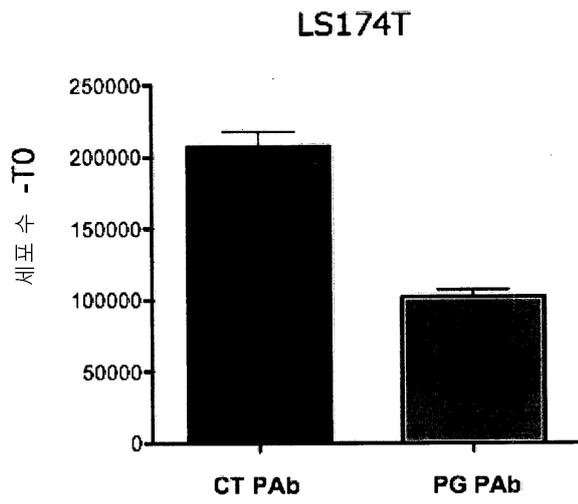
도면7d



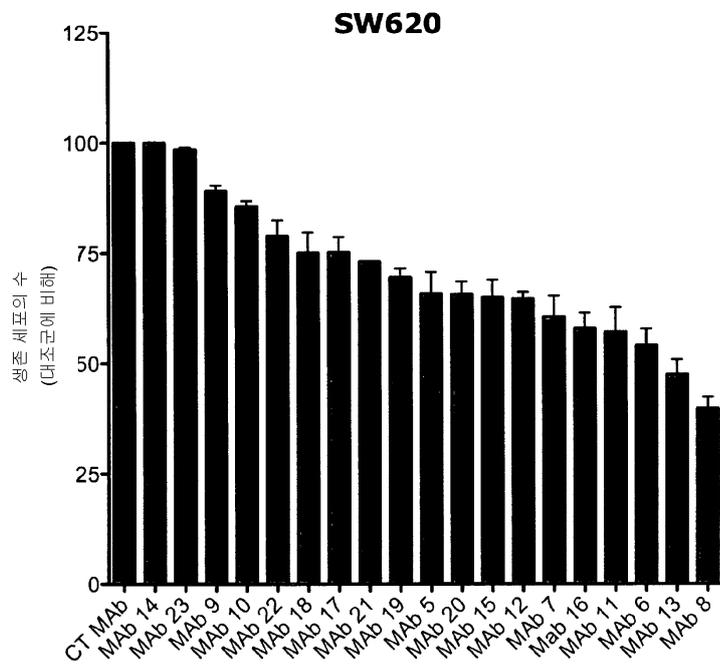
도면7e



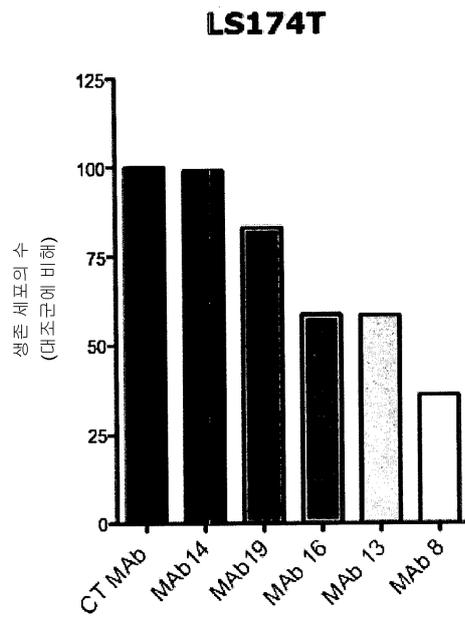
도면7f



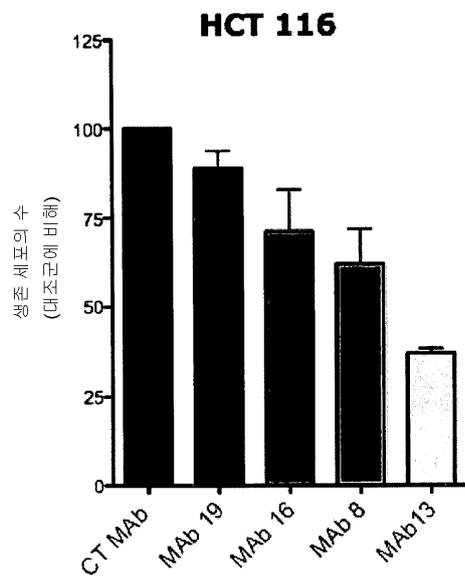
도면7g



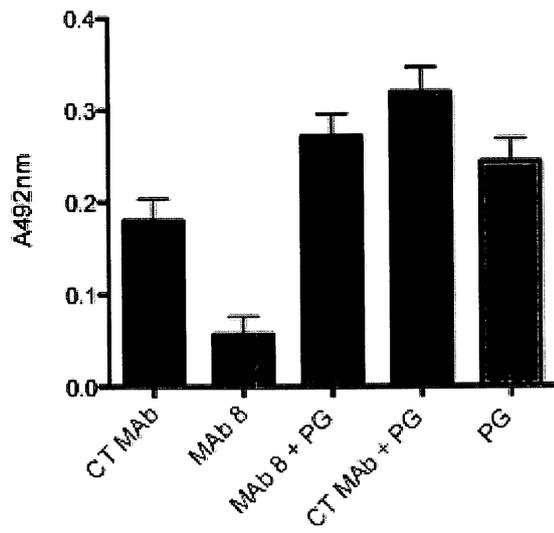
도면7h



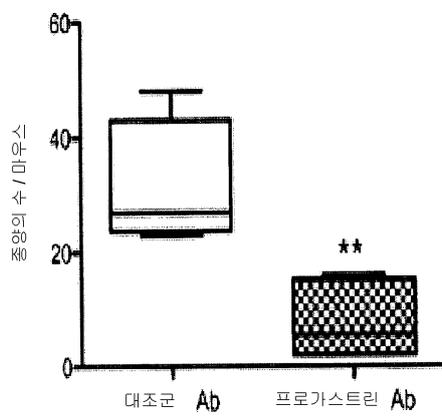
도면7i



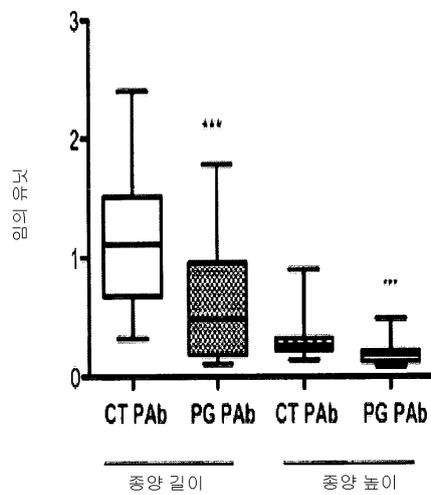
도면8



도면9a



도면9b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE (INSERM)

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGASTRIN AND THEIR USES

<130> 382657-001W0

<140><141><150> 61/252,625

<151> 2009-10-16

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 2

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 3

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 5

Lys Val Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
<400> 8
Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
<400> 9
Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

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

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50

55

60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

 115

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

 20 25 30

Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 16

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 16

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct 48

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

1 5 10 15

tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac 96

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

20 25 30

tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att 144

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

35 40 45

ggg ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc 192

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

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
 agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca cat gtt ccg ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 18

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 18

cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc 48

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

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc 96
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att 144
 Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc 192
 Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt 288
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 ctg gtc act gtc tct gca 354

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 19

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 19

gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
 Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15
 gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

 20 25 30
 agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144

Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt 288

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

aca cat gtt cct ccc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly

1 5 10 15
 Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala
 20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val
 35 40 45

Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 65 70 75 80

<210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 21

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

 20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 23

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <220><221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Ahx
 <400> 26
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Xaa Cys
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
 1 5 10 15
 Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 20 25
 <210> 28
 <211>
 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5
 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp

1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Gly Arg Arg

1

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Asp Phe Gly Arg

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Glu Asp Glu Asn

1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala

1 5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 38

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 39
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 40
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 41
Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

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

<400> 42

Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 43

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 44

Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr

1 5

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 46

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 48

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide"

<400> 49

Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe

1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide"

<400> 50

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide"

<400> 51

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr

1 5

<210> 52

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide"

<400> 52

Gln Met Ser

1

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 53

Leu Val Ser

1

<210> 54

<211> 7

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 54

Val Lys Lys Asp Gly Ser His

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 56

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 57

Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 58

Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val

1 5 10

<210> 59

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

115

<210> 62

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

 20 25 30

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

 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 63

<211> 112

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 63

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

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

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 64

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

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

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

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 65

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

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

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

<210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 66

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

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

Thr Val Leu
 115

<210> 67

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 67

gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

48

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat 96

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

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc 144

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192

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

aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac gcc cta tac 240

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

ctg caa atg agc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca aca cag ggg aat tac tct ttg gac ttc tgg ggc caa ggc acc tct 336

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 68

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 68

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc 336
 Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 tcc tca 342
 Ser Ser

<210> 69

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 69

cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48

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

1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96

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

20 25 30

tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att 144

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

35 40 45

gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc 192

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac 240

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

65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288

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

85 90 95

aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act 336

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351

Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 70

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(363)

<

400> 70

gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 48

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

1 5 10 15

tct ctg tcc ctc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 96

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

tat gcc tgg aat tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg 144

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

35 40 45

atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct ctc 192

Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

aaa agt cga atc tct gtc act cgg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc 240

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

65 70 75 80

ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 288

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

85 90 95

gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363

Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 71

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 71

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga 48

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

1 5 10 15
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act 96

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr

20 25 30
aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct 144

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

35 40 45
cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca 192

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

50 55 60
gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc 240

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

65 70 75 80
agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat 288

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 336

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 72

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 72

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt acc att gga 48

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

1 5 10 15

caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt 96

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

20 25 30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144

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

35 40 45

cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct 192

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

50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240

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

65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt 288

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 336

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

100 105 110

<210> 73

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 73

gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt acc att ggg 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

1 5 10 15
 cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt 96
 Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30
 gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45
 cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60
 gac agg atc act ggc agt ggg tgc ggg aca gat ttc aca ctg aag atc 240
 Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
 agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa gga 288

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336

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

<210> 74

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 74

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc 48

Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc 96

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr

20 25 30

att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg 144

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat 192

Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp

50 55 60

cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc 240

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser

65 70 75 80

aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt gat 288

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc 336

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

100 105 110

act gtc cta 345

Thr Val Leu

115

<210> 75

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 75

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr

 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr

 100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 76

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

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

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

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 77

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

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

<400> 78

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

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

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 79

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210

> 80

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 80

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 Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 81

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

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

35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 82

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 82

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 Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu 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 Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 84

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 87

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

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

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

<210> 88

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 88

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 89
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 89
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 90
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 90
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

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

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

<210> 91
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 91
 Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

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

Glu Ile Lys
 115

<210> 92

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

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

<400> 92

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 93
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 93
 Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45

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

Glu Ile Lys
 115

<210> 94
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 94
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 95

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 95

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val

100 105 110

Glu Ile Lys

115

<210> 96

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Ahx

<400> 96

Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly

1 5 10 15

Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

20 25

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Ahx

<400> 97

Cys Xaa Xaa Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn

1 5 10

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(12)

<223> Ahx

<400> 98

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn Xaa Xaa Cys

1 5 10

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 99

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15