



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월03일

(11) 등록번호 10-2405492

(24) 등록일자 2022년05월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7033409
- (22) 출원일자(국제) 2015년04월30일
심사청구일자 2020년04월10일
- (85) 번역문제출일자 2016년11월29일
- (65) 공개번호 10-2017-0062419
- (43) 공개일자 2017년06월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/059562
- (87) 국제공개번호 WO 2015/166073
국제공개일자 2015년11월05일
- (30) 우선권주장
14166729.5 2014년04월30일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
Felix Oden, Generation of an antibody targeting B cell maturation antigen for the treatment of multiple myeloma and autoimmune diseases(2014.04.01.)*
W02012163805 A1
JP2012520308 A
W02012143498 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
막스-델부릭-센트럼 쾰러 몰레쿨라레 메디친 인 데어 헬 림홀츠-게마인사프트
독일 데-13125 베를린 로베르트-외쉴-스트라쎄 10
- (72) 발명자
오덴, 펠릭스
독일, 10827 베를린, 카른테네르 스트라쎄 28
마리노, 스티븐
독일, 10965 베를린, 카츠바흐스트라쎄 3
다움케, 올리버
독일, 10435 베를린, 스투츠키스트라쎄 19
- (74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 C D269에 대한 인간화 항체

(57) 요약

본 발명은 CD269(BCMA)와 결합하여 CD269와 그의 천연 리간드(BAFF 및 APRIL) 사이의 상호 작용을 방해하는 인간화 항체 또는 항체 단편, 및 다발성 골수종 및 자가 면역 질환과 같은 형질 세포-매개 질환의 치료를 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2299/00 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/54 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항체 또는 항체 단편으로서, 하기를 포함하는 VH 도메인을 포함하고:

- CDR1 서열 RYWIS (서열번호 18) 또는 RYWFS (서열번호 19);
- CDR2 서열 EINPNSSTINYAPSLKDK (서열번호 20) 또는 EINPSSSTINYAPSLKDK (서열번호 21); 및
- CDR3 서열 SLYYDYGDYDYW (서열번호 22),

및 하기를 포함하는 VL 도메인을 포함하며:

- CDR1 서열 KASQSVESNVA;
- CDR2 서열 SASLRFS (서열번호 24); 및
- CDR3 서열 QQYNNYPLTFG (서열번호 25),

상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 번호 14의 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, 서열 번호 14의 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하고, 서열 번호 14의 서열과 80% 이상의 서열 동일성을 갖는 포함하는 VL 도메인을 포함하며, 상기 CDR 서열은 제1항에 인용된 것인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하고, 서열 번호 14의 서열과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 포함하는 VL 도메인을 포함하며, 상기 CDR 서열은 제1항에 인용된 것인, 항체 또는 항체 단편.

청구항 7

제1항에 있어서, VH 도메인을 포함하며, 상기 VH 도메인은 서열 X1VQLX2X3SGGGLVQPGGSLX4LSCAASGX5X6FX7X8YWZ1SWVRX9APGKGLX20WX10GEINPZ2SSTINYAPSLKX11X12FX13ISRDNKNTLYL QMX14X15X16RX17EDTAX18YYCASLYDYGDAZ3DYWGQGTX19VTVSS을 포함하고,

상기 X1은 Q 또는 E; X2X3은 QQ, VQ 또는 VE; X4는 K 또는 R; X5X6은 ID 또는 FT; X7은 S 또는 D; X8은 R; X9는 R 또는 Q; X10은 I 또는 V; X11은 D; X12는 K; X13은 I 또는 T; X14X15X16은 SKV 또는 NSL; X17은 S 또는 A; X18은 L 또는 V; X19는 S 또는 L; X20은 E 또는 V이고; 및 상기 적어도 하나의 Z₁은 I 또는 F; Z₂는 S 또는 N 및 Z₃는 Y이며;

상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, VL 도메인을 포함하며, 상기 VL 도메인은 서열 X₂₁IVMTQX₁X₂X₃X₄X₅X₆SX₂₂GX₂₃X₇X₂₄X₈X₉X₂₅CKASQSVESNVAWYQQKPX₁₀QX₁₁PX₂₆X₁₂LIX₁₃SX₁₄X₁₅LRFSGX₂₇PARFX₁₆GSGSGTX₂₈FTLTISX₁LQSEDX₁₈AX₁₉YX₂₀CQQYNNYPLTFGAGTKLELKR을 포함하고,

상기 X1은 Q 또는 P; X2는 R 또는 A; X3은 F 또는 T; X4는 M 또는 L; X5는 T 또는 S; X6은 T 또는 V; X7은 R 또는 E; X8은 S 또는 T; X9는 V 또는 L; X10은 R 또는 G; X11은 S 또는 A; X12는 A; X13은 F 또는 Y; X14는 A; X15는 S; X16은 T 또는 S; X17은 N 또는 S; X18은 L 또는 F; X19는 E 또는 V; X20은 F 또는 Y; X21은 D 또는 E; X22는 P 또는 V; X23은 D 또는 E; X24는 V 또는 A; X25는 S 또는 T; X26은 R 또는 K; X27은 I 또는 V; X28은 E 또는 D이고,

상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 CD269의 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 또는 32로 이루어진 에피토프에 결합하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 10

제1항에 있어서, CD269(BCMA)에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 BAFF-CD269 또는 APRIL-CD269 상호 작용을 방해하는 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체는 글리코실화된 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 글리코실화는 중쇄의 Asn297에서 N-연결 올리고사카라이드 쉘(N-linked oligosaccharide chain)인 것인 항체 또는 항체 단편.

청구항 13

치료제에 컨쥬게이트된, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항체-약물

접합체(ADC, antibody-drug conjugate).

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항체 단편을 생산하거나, 상기 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 세포는 박테리아 세포 또는 포유류 세포인, 숙주 세포.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 세포는 하이브리도마 세포 또는 세포주인, 숙주 세포.

청구항 18

형질 세포의 암, B 림프구의 암, 또는 자가 반응성 형질 세포 또는 자가 반응성 기억 B 세포와 관련된 자가 면역 질환으로부터 선택된 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료를 위한 의약으로서의 약학적 조성물로서,

상기 조성물은 (a) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항체 단편, 상기 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산 분자, 상기 항체 또는 항체 단편을 포함하는 ADC, 또는 상기 항체, 항체 단편, 또는 핵산을 포함하는 숙주 세포; 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 자가 면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 또는 류마티스성 관절염으로부터 선택되는 염증성 자가 면역 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 형질 세포의 암은 다발성 골수종, 형질세포종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증 또는 형질 세포 백혈병이고, 또는 상기 B 림프구의 암은 호지킨 병인, 약학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 CD269(BCMA)에 결합하여 CD269 및 이의 천연 리간드(BAFF 및 APRIL)간의 상호 작용을 방해하는 인간화된 항체 또는 항체 단편, 및 다발성 골수종 및 자가 면역 질환과 같은 혈장 세포-매개 질환의 치료에 대한 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] BCMA(B cell maturation antigen)는 TNFRSF(the tumor necrosis factor receptor superfamily)의 17 번째 멤버이다. 이의 천연 리간드(native ligands)는 체액성 면역, B 세포 발달 및 항상성과 같은 다양한 측면의 조절(추가 리간드와의 상호 작용을 통해)에 관련된 B 세포 활성화 인자(BAFF; BLyS 또는 TALL-1, TNFSF13B로도 지칭) 및 증식-유도 리간드(APRIL, TNFSF13, CD256)이다.
- [0003] BCMA는 예를 들어 골수의 B 세포 비-호지킨 림프종인 다발성 골수종(MM, multiple myeloma)과, MM보다 공격적이며 형질 세포 질병의 약 4 %를 차지하는 PCL(plasma cell leukemia)과 같은 악성 형질 세포에서 높게 발현된다. MM 및 PCL외에도, BCMA는 호지킨 림프종(Chiu et al. (2007) Blood 109:729-739)으로 고통받는 환자의 호지킨(Hodgkin)과 리드-스테른베르크(Reed-Sternberg) 세포에서도 검출되었다. 형질 세포에 대한 그 기능과 유사하게, BCMA에 결합하는 리간드는 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포의 성장 및 생존을 조절하는 것으로 나타났다(Novak et al. (2004) Blood 103:689-694). BCMA를 통한 BAFF 및 APRIL의 시그널링은 악성 형질 세포의 전구-생존 요인으로 간주된다. 따라서, BCMA-양성 종양 세포의 고갈 및/또는 리간드-수용체 상호 작용의 방해는 다발성 골수종 및 자가항체-의존성 자가면역 질환에 대한 치료 결과를 개선시킬 것이다.
- [0004] 현재 다발성 골수종의 치료에 이용할 수 있는 다양한 접근법이 있다(Raab et al. (2009) Lancet 374:324-339). 화학요법이 대부분의 대상에서 부분적으로 다발성 골수종을 조절하지만, 화학요법은 극히 드물게만 완전 차도를 유도한다. 따라서, 종종 텍사메타손 또는 프레드니손과 같은 코르티코스테로이드의 추가 투여를 수반하는 병용 접근법이 종종 적용된다. 그러나 코르티코스테로이드는 골밀도 감소와 같은 부작용이 있다. 또한, 자가(autoologous) 줄기 세포를 사용하거나 밀접한 관련성이 있거나 관련이 없는 기증자(동종 이형)의 세포를 사용하는 줄기세포 이식이 제안되었다. 다발성 골수종에서, 실시된 대부분의 이식편은 자가이다. 이러한 이식편은 치료제는 아니나, 선택된 환자의 삶을 연장시키는 것으로 나타났다(Suzuki (2013) Jpn J Clin Oncol 43:116-124). 대안적으로, 탈리도마이드 및 이의 유도체가 최근 치료에 적용되었지만 차선허 성공률 및 고비용과 연관되어 있다. 보다 최근에, PS-341(proteasome inhibitor bortezomib)이 재발성 및 난치성 MM 치료에 대한 승인을 받았으며, 많은 임상 시험에서 단독으로 또는 확립된 약물과 함께 이용되어 고무적인 임상 시험 결과를 얻었다(Richardson et al. (2003) New Engl J Med 348:2609-2617; Kapoor et al. (2012) Semin Hematol 49:228-242). 복합 치료 비용은 상대적으로 높으며 성공률은 여전히 개선의 여지가 있다. 또한, 여러 약물을 동시에 사용하는 경우 부작용이 축적되어 치료 선택의 조합이 이상적이지 않다. 형질 세포 질환, 특히 다발성 골수종의 치료를 위한 새로운 접근법이 필요하다.
- [0005] 또한, 타겟 형질 세포를 특이적으로 표적화하는 능력은 자가 면역 질환의 치료에 큰 도움이 된다. 가벼운 자가면역 질환은 대개 비스테로이드성 항-염증제(NSAID) 또는 질환-조절용 항-류마티스제(DMARD)로 치료된다. 활동성 질환으로 인한 장기 기능 장애를 포함한 전신성 홍반성 루푸스(SLE)의 보다 심각한 형태는 보통 세포주기의 세포를 표적으로 하는 세포 독성 물질인 시클로포스파미드(cyclophosphamide)와 같은 강력한 면역 억제제와 스테로이드로 투여된다. 자가면역 질환 환자의 혈청에서 증가되는 것으로 확인된 사이토카인(cytokine) BAFF를 표적으로 하는 항체인 벨리무맙(Belimumab)만이 최근 SLE에서의 사용에 대하여 FDA (Food and Drug Administration)의 승인을 받았다. 그러나, 새로 형성된 B 세포만이 인간에서 생존을 위해 BAFF에 의존하는 반면, 기억 B 세포 및 형질 세포는 선택적 BAFF 억제에 덜 민감하다(Jacobi et al. (2010) Arthritis Rheum

62:201-210). 류마티스 관절염(RA)의 경우, TNF 저해제는 최초의 허가된 생물학적 제제였고, 그 다음으로 아바타셉트, 리툽시맙 및 토실리주맙 등이 있었다. 이것들은 관절의 염증 및 파괴에 관여하는 주요 염증 경로를 억제하나, 상대적인 면역 억제로 인해 감염 위험성이 높아지는 결과를 가져왔다(Chan et al. (2010) Nat Rev Immunol 10 : 301-316, Keyser (2011) Curr Rheumatol Rev 7:77-87). 이러한 생물학적 물질의 승인에도 불구하고, RA 및 SLE로 고통받는 환자는 종종 자가 면역 마커의 지속성을 나타내며, 이는 예컨대, 리툽시맙 및 고용량 글루코코르티코이드 및 시클로 포스파미드 요법에 의한 CD20-매개 제거에 저항적인 골수에서 수명이 긴 고착성 형질 세포의 존재와 관련이 있을 가능성이 가장 높다.

[0006] CD269(BCMA)에 결합하는 항체 및 다양한 B-세포 관련 의학적 장애의 치료에서 이들의 용도는 당업계에 기재되어 있다. Ryan 등(Molecular Cancer Therapeutics, 2007 6(11), 3009)은 BCMA 단백질의 아미노산 5 내지 54의 펩타이드를 사용하여 랫트에서 백신 접종을 통해 수득된 항-BCMA 항체를 기술한다. WO 2012/163805는 키메라 및 인간화 항체와 같은 BCMA 결합 단백질, BAFF 및/또는 APRIL과 BCMA의 상호 작용을 차단하기 위한 이들의 용도 및 다발성 골수종과 같은 형질 세포 악성 종양의 치료에 대한 이들의 잠재적인 용도를 기술한다. 본 명세서에 개시된 항체는 BCMA 단백질의 아미노산 4 내지 53의 재조합 펩타이드를 사용하여 마우스에서 백신 접종을 통해 수득하였다. 또한, WO 2010/104949는 바람직하게는 BCMA의 세포외 도메인에 결합하는 다양한 항체 및 B 세포 매개 의학적 상태 및 장애를 치료하기 위한 이들의 용도를 개시한다. WO 2002/066516 및 WO 2012/066058은 BCMA 및 추가 표적 모두에 결합하는 2가 항체 및 B 세포 관련 의학적 장애의 치료에 대한 이들의 잠재적인 용도를 개시한다. 2가 항체의 결합 특성 및 특이 에피토프에 관한 세부 사항은 어느 공개 문헌에도 기재되어 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이러한 선행 기술의 문제점의 관점에서, 본 발명은 다발성 골수종 및 자가 면역 질환과 같은 병원성 형질 세포와 관련된 인간 질환을 치료하기에 적합한 제제를 제공하는 것이다. 이러한 문제는 독립항의 특징에 의해 해결된다. 본 발명의 바람직한 구현에는 종속항에 의해 제공된다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 CD269 (BCMA), 특히 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 결합하는 인간화 항체 또는 항체 단편을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 명세서에 개시된 항체는 키메라 항체 J22.9-xi와 관련하여 기술된 바와 같은 적절한 리간드 친화도를 유지하는 인간화된 서열, 특히 바람직하게는 VL 및 VH 결합 영역을 포함한다.

[0010] 본 발명의 다양한 구현예에서, 상기 인간화 서열을 수득하기 위한 아미노산 서열 변형은 오리지널 키메라 항체 J22.9-xi의 CDR 영역에서 또는 프레임 워크 영역에서 발생할 수 있으며, 상기 프레임 워크 영역은 면역글로불린 슈퍼패밀리 (immunoglobulin superfamily)에 속하며 CDR보다 덜 "가변적"인 단백질의 가변 도메인 내 영역인 것으로 이해된다.

[0011] 본 명세서에 제공된 특정 인간화 서열, 바람직하게는 결합에 관여하는 VL 및 VH 영역의 CDR 영역이 실험 실시예에서 입증된 바와 같이 특이적이며 강한 결합을 나타내며 원하는 치료 효과를 유지할 수 있는 정도까지 오리지널 키메라 항체 J22.9-xi의 결합 특성을 유지한다는 것은 놀랍다.

[0012] 본 발명은 하기 CDR 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다:

[0013] - RYWX₁S (H-CDR1; 서열 번호 15), 상기 X₁은 I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T이며;

[0014] - EINPX₂X₃STINYAPSLKDK (H-CDR2; 서열 번호 16), 상기 X₂X₃은 SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE이고; 및/또는

[0015] - SLYX₄DYGDAX₅DYW (H-CDR3; 서열 번호 17), 상기 X₄는 Y, L, A, V, F, I, W, 및/또는 X₅는 Y, L, F, I, V, A, C이며,

[0016] 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0017] 오리지널 키메라 항체와 비교하여 서열 변화, 특히, 상기 키메라 항체의 CDR에서의 서열 변화를 나타내는, 본 명세서에 기술된 인간화 항체가 치료 효능에 대한 그의 표적에 대해 충분한 결합 특성을 유지한다는 것은 특히

놀라운 일이다.

- [0018] 당업자는 인간화 변이체의 결합 특성이 오리지널 키메라 또는 마우스 항체와 유사할 것으로 예상하지 못했다. 가변 도메인, 특히 CDR에서의 서열 변화를 고려하면, 본 명세서에서 입증된 인간화 서열의 유리한 결합 특성은 놀라운 기술적 효과로 간주된다. 또한, 부분적으로 및 완전히 인간화된 항체 간의 결합 특성의 비교는 완전히 인간화된 서열의 개선을 보여준다. 이는 전혀 예상치 못한 결과를 나타낸다. 키메라에 대한 초기 변형(부분적으로 인간화)은 결합 친화성에서 약간의 손실을 가져왔다. 그러나, 추가 인간화의 도입은 연속적으로 결합이 강화 되도록 하여, "완전히 인간화"된 서열이 오리지널 키메라와 비교하여 유사한 결합 특성을 나타내며, 이에 의해 결합 친화성의 심각한 손실없이 이러한 중요한 서열 변형 후의 놀라운 기술적 효과가 나타난다.
- [0019] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 상기 VH 도메인이 CDR 서열 RYWIS(서열번호 18) 또는 RYWFS(서열 번호 19)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 상기 VH 도메인이 CDR 서열 EINPNSSTINYAPSLKDK(서열 번호 20) 또는 EINPSSSTINYAPSLKDK(서열 번호 21)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예에서, VH 도메인의 아미노산 54는 임의의 주어진 아미노산 또는 변형된 아미노산과 관련될 수 있다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 이 잔기에서의 N 아미노산의 잠재적인 글리코실화는 표적 에피토프에 대한 항체의 특이적이고 강한 결합을 유의하게 방해하지 않는다. 이러한 정보의 관점에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 CDR2 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것으로, 상기 임의의 주어진 아미노산 또는 변형된 아미노산은 CDR2 서열의 VH 도메인의 아미노산 54에 존재할 수 있다.
- [0022] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 상기 VH 도메인이 CDR 서열 SLYYDYGDYDYW(서열 번호 22)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명은 추가적으로 하기 CDR 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다:
- [0024] - KASQSVX₁X₂NVA(L-CDR1; 서열 번호 23), 상기 X₁X₂는 ES, SS, TS, QS, HS, DH이며;
- [0025] - SASLRFS(L-CDR2; 서열 번호 24); 및/또는
- [0026] - QQYNNYPLTFG(L-CDR3; 서열 번호 25),
- [0027] 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0028] 또한, LC 서열과 관련하여, CDR3 서열의 변형된 서열이 BCMA 표적에 대한 결합에 대해 유의한 해로운 영향을 미치지 않는 것은 놀랍다.
- [0029] 또한, 본 발명의 항체는 오리지널 키메라 항체에 실시된 서열 변화로부터 기대되지 않았던, 분리 또는 정제된 모든 경우 용액내에서 또는 시험관내 및 생체 내에서 투여 후, 예상치 못한 유리한 안정성 특성을 보여준다.
- [0030] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 상기 VL 도메인이 CDR 서열 KASQSVDSNVA(서열번호 26)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁SWVRQAPGKGLVWVGEINPX₂X₃STINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYX₄DYGDAX₅DYWGQGLTVTVSS(서열 번호 4)을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, 상기 X₁는 I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T이고; 상기 X₂X₃는 SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게는 SS이며; X₄는 Y, L, A, V, F, I, W이고; X₅는 Y, L, F, I, V, A, C이다.
- [0032] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVX₁X₂NAVYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGLPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR(서열 번호 12)을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 상기 X₁X₂는 ES, SS, TS, QS, HS, DH이다.
- [0034] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 14의 서열을 포함하는 VL 도메

인을 포함한다.

[0035] 본 명세서의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 항체 단편은 서열 번호 6, 서열 번호 7, 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함하고 서열 번호 14의 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0036] 본 발명은 추가적으로 서열 X₁VQLX₂X₃SGGGLVQPGSLX₄LSCAASGX₅X₆FX₇X₈YWZ₁SWVRX₉APGKGLEWX₁₀GEINPZ₂SSTINYAPSLKX₁₁X₁₂FX₁₃ISRDNKNTLYLQMX₁₄X₁₅X₁₆RX₁₇EDTAX₁₈YYCASLYDYGDAZ₃DYWGQGTGX₁₉VTVSS (서열 번호 41)을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, 상기 X₁은 Q, E; X₂는 Q, V; X₃은 Q, E; X₄는 K, R; X₅는 I, F; X₆은 D, T; X₇은 S, D; X₈은 R, D; X₉는 R, Q; X₁₀은 I, V; X₁₁은 D, G; X₁₂는 K, R; X₁₃은 I, T; X₁₄는 S, N; X₁₅는 K, S; X₁₆은 V, L; X₁₇은 S, A; X₁₈은 L, V; X₁₉는 S, L; 및 상기 Z₁은 I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T 중 최소 하나, 바람직하게는 I 또는 F; Z₂는 S, N, T, G, K, R, D, 바람직하게는 S 및/또는 Z₃는 Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y이며; 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포의 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다.

[0037] 이 구현예는 다양한 인간화 항체, 특히 이의 VH 서열, 본 명세서에 기재된 바와 같이 CDR에 실시된 유리한 인간화에 의해 정의된 모든 변이체를 포함한다.

[0038] 본 발명은 추가적으로 서열 DIVMTQXS₁X₂X₃X₄X₅X₆SVGD₇VX₈X₉TCKASQSVESNVAWYQKPKX₁₀QX₁₁PKX₁₂LIX₁₃SX₁₄X₁₅LRFSGVPARFX₁₆SGSGTDFTLTISX₁₇LQSED₁₈AX₁₉YX₂₀CQYNNYPLTFGAGTKLELKR (서열 번호 42)을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 상기 X₁은 Q, P; X₂는 R, A; X₃은 F, T; X₄는 M, L; X₅는 T, S; X₆은 T, V; X₇은 R, E; X₈은 S, T; X₉는 V, L; X₁₀은 R, G; X₁₁은 S, A; X₁₂는 A, L; X₁₃은 F, Y; X₁₄는 A, D; X₁₅는 S, D; X₁₆은 T, S; X₁₇은 N, S; X₁₈은 L, F; X₁₉는 E, V; X₂₀은 F, Y이며; 상기 항체 또는 이의 단편은 CD269(BCMA)의 세포의 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다. 이 구현예는 다양한 인간화 항체, 특히 이의 VL 서열, 본 명세서에 기술된 바와 같이 CDR에 실시된 유리한 인간화에 의해 정의된 모든 변이체를 포함한다.

[0039] 인간화 항체 변이체에 관한 바람직한 구현예

[0040] 본 명세서에서 상세하게 개시된 바와 같이, J22.9-xi에 따른 본 발명의 바람직한 구현예의 서열은 인간 대상체에 투여하기에 보다 양립 가능한 시약을 제공하기 위해 인간화되었다. J22.9-xi의 다양한 인간화 서열 변이체를 제작하여 인간 및 사이노물구스 CD269 (BCMA) 모두에 대한 이들의 결합 친화성 및 특이성을 시험하였다. 결합 분석으로부터의 결과는 인간화 서열이 키메라 시약 J22.9-xi의 원하는 결합 특성을 유지함을 입증한다. 하기 서열에서 밑줄 친 영역은 CDR 또는 추정 CDR을 나타낸다.

[0041] 인간화 VH 변이체에 관한 바람직한 구현예

[0042] 본 발명의 인간화 항체 서열에 대한 추가 정보는 하기에 제공된다.

[0043] 키메라 서열:

[0044] HC 마우스(서열 번호 1):

[0045] QVQLQSGGGLVQPGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYD YGDAMDYWGQGTSTVTVSS

[0046] HC 마우스 서열은 키메라 항체 J22.9-xi에 대해 본래 개발된 중쇄(VH)의 가변 영역을 나타내며, 이는 CD269(BCMA)의 세포의 도메인의 에피토프에 결합할 수 있는 마우스 항체로부터 수득된 VL 및 VH 도메인을 포함하고, VL 및 VH 도메인은 각각 인간 CL 및 CH 도메인에 융합된다.

[0047] 부분적 인간화 서열:

[0048] 부분적으로 인간화된 HC(서열 번호 2) :

[0049] EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYWMSSWVRQAPGKLEWVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD YGDAMDYWGQGTSTVTVSS

[0050] HC 부분적 인간화 서열은 본 명세서에 개시된 키메라 항체와 비교하여 (아미노산 치환을 통해) 변형된 아미노산

서열을 나타내며, 이에 따라 VL 및 VH 결합 영역은 그의 서열에 대하여 변형되어 인간에게 투여하기에 보다 적합하게 제작한다.

[0051] 인간화 VH 서열:

[0052] hHC01 (서열 번호 3)

[0053] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGEINPDSSTINYAPSLKDKFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD
YGDAMDYWGQGLTVTVSS

[0054] 번역 후 변형 모티프를 제거한 인간화 VH 서열:

[0055] hHC02 (서열 번호 4)

[0056] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁SWVRQAPGKGLVWVGEINPX₂X₃STINYAPSLKDKFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY
X₄DYGDX₅DYWGQGLTVTVSS

[0057] 상기에서:

[0058] X₁는 I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게는 I 또는 F;

[0059] X₂X₃는 SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게는 SS;

[0060] X₄는 Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게는 Y; 및/또는

[0061] X₅는 Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y임;

[0062] "hHC01" 및 "hHC02" 인간화 서열은 본 명세서에 기술된 오리지널 키메라 서열 및 부분적 인간화 서열 모두와 비교한 서열 변화를 포함하는 신규한 아미노산 서열을 나타낸다.

[0063] PTM 돌연변이는 유익한 결합 특성을 유지하면서 상기 단백질로부터 잠재적으로 유해한 번역 후 변형 모티프를 제거하기 위한 것이다. hHC01 및 hHC02의 위치 1, 5, 6, 19, 27, 28, 34, 39, 46, 48, 54, 69, 84, 85, 86, 88, 93, 107 및/또는 115를 오리지널 키메라 서열과 비교하여 바람직하게 돌연변이화(치환)시켰다. 치환의 중요성은 유래되는 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 주로 관련이 있다. 따라서, 변화는 또한 오리지널 키메라 아미노산 또는 부분적 인간화 서열과 같은 다른 변이체에 상응하는 아미노산으로부터 실시될 수 있다.

[0064] 하기 치환은 키메라(서열 번호 1) 서열과 비교하여 신규하다:

[0065] - HC (VH) 서열의 아미노산 M34는 임의의 아미노산, 바람직하게는 I, L, F, V, Y, C, G, A, S, T로 치환되며;

[0066] - HC (VH) 서열의 아미노산 E46이 V로 치환되고;

[0067] - HC (VH) 서열의 아미노산 D54 및 S55는 임의의 아미노산 조합, 바람직하게는 SS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE로 치환되며;

[0068] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y101은 임의의 아미노산, 바람직하게는 L, A, V, F, I, W로 치환되고; 및/또는

[0069] - HC (VH) 서열의 아미노산 M107은 임의의 아미노산, 바람직하게는 L, Y, F, I, V, A, C로 치환된다.

[0070] BCMA와의 직접 상호 작용에 필요한 잔기에서 변형될 수 있는 서열:

[0071] BCMA와의 상호 작용에 관여하는 hHC03-변형 아미노산(서열 번호 5):

[0072] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYX₁MX₂WVRQAPGKGLVX₃VGX₄INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASX₅
X₆X₇DYGDX₈MDYWGQGLTVTVSS

[0073] 상기 바람직한 아미노산은 다음과 같다:

[0074] X₁은 W, F, Y, 바람직하게는 W이며;

[0075] X₂는 S, T, N, Q, D, E, 바람직하게는 S이고;

[0076] X₃은 W, F, Y, 바람직하게는 W이며;

- [0077] X₄는 E, Q, 바람직하게는 E이고;
- [0078] X₅는 L, I, V, G, A, 바람직하게는 L이며;
- [0079] X₆은 Y, X, 바람직하게는 Y이고;
- [0080] X₇은 Y, F, L, I, V, M, 바람직하게는 Y이며; 및/또는
- [0081] X₈은 A, G, V, 바람직하게는 A이다.
- [0082] "hHC03" 인간화 서열은 오리지널 키메라 서열 및 부분적 인간화 서열 모두와 비교한 아미노산 서열 변화를 포함하는 신규한 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 서열 변화는 유리한 결합 특성을 유지하면서 치환될 수 있는 BCMA 표적에 결합하는 아미노산의 잠재적인 변화를 반영하기 위한 것이다. 치환의 중요성은 유래되는 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 주로 관련이 있다. 따라서, 변화는 또한 오리지널 키메라 아미노산 또는 부분적 인간화 서열과 같은 다른 변이체에 상응하는 아미노산으로부터 실시될 수 있다.
- [0083] 예를 들어:
- [0084] - HC (VH) 서열의 아미노산 W33은 W, F, Y이고;
- [0085] - HC (VH) 서열의 아미노산 S35는 S, T, N, Q, D, E이며;
- [0086] - HC (VH) 서열의 아미노산 W47은 W, F, Y이고;
- [0087] - HC (VH) 서열의 아미노산 E50은 E, Q이며;
- [0088] - HC (VH) 서열의 아미노산 L99는 L, I, V, G, A이고;
- [0089] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y100은 Y, X이며;
- [0090] - HC (VH) 서열의 아미노산 Y101은 Y, F, L, I, V, M이고; 및/또는
- [0091] - HC (VH) 서열의 아미노산 A106은 A, G, V이다.
- [0092] 일반적으로, 인간화 중에 만들어진 CDR 영역에 대한 임의의 변화는 전체적으로 프레임워크 서열과는 독립적으로 고려될 때 CDR 서열의 특징으로 간주될 수 있다. 이러한 변형된 CDR 서열은 본 명세서에 기술된 전체 프레임워크 영역에서 그의 컨텍스트 내에서 또는 그의 컨텍스트와 독립적으로 본 발명의 특징을 정의하는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, hHC01 내지 hHC03에서 밑줄로 표시한 CDR 서열은 주변 프레임워크 서열과는 독립적으로 본 발명의 정의된 특징으로 간주될 수 있다.
- [0093] 인간화된 HC (VH) 서열의 특정 예로는 다음과 같다:
- [0094] hHC04 (서열 번호 6):
- [0095] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD
YGDAYDYWGQGTLLTVSS
- [0096] hHC05 (서열 번호 7):
- [0097] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD
YGDAYDYWGQGTLLTVSS
- [0098] hHC06 (서열 번호 8):
- [0099] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD
YGDAYDYWGQGTLLTVSS
- [0100] hHC07 (서열 번호 9):
- [0101] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYD
YGDAYDYWGQGTLLTVSS
- [0102] 정렬:

- [0103] HC 서열 내의 다양한 치환 위치의 CLUSTAL W (1.83) 다중 서열 정렬은 도 8에서 적절한 서열 비교를 제공한다. "일반 서열(General sequence)"은 HC 서열을 나타내고, 여기서 각각의 X는 임의의 주어진 아미노산에 대한 잠재적인 아미노산 변화를 나타낸다. 바람직한 아미노산 치환은 잠재적으로 돌연변이된 위치 각각에 대해 상술한 바와 같이 기재된 것이다.
- [0104] 인간화 VL 변이체에 관한 바람직한 구현예
- [0105] 키메라 서열:
- [0106] LC 마우스 (서열 번호 43):
- [0107] DIVMTQSQRFMTTSVGDVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFSASLRFSGVGPARTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
- [0108] LC 마우스 서열은 키메라 항체 J22.9-xi에 대해 본래 개발된 경쇄 (VL)의 가변 영역을 나타내며, 이는 CD269(BCMA)의 세포외 도메인의 에피토프에 결합할 수 있는 마우스 항체로부터 수득된 VL 및 VH 도메인을 포함하고, 상기 VL 및 VH 도메인은 각각 인간 CL 및 CH 도메인에 융합된다.
- [0109] 부분적 인간화 서열:
- [0110] 부분적 인간화 LC (서열 번호 10):
- [0111] DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIYSDDLRFSGVGPARTGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
- [0112] LC 부분적 인간화 서열은 본 명세서에 개시된 키메라 항체와 비교하여 (아미노산 치환을 통해) 변형된 아미노산 서열을 나타내며, 이에 따라 VL 및 VH 결합 영역은 그의 서열에 대하여 변형되어 인간에게 투여하기에 보다 적합하게 제작된다.
- [0113] 인간화 VL 서열:
- [0114] hLC01 (서열 번호 11):
- [0115] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
- [0116] 번역 후 변형 모티프를 제거한 인간화된 VL 서열:
- [0117] hLC02 (서열 번호 12):
- [0118] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVX₁X₂NVWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
- [0119] 상기에서:
- [0120] X₁X₂는 ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게는 ES이다.
- [0121] "hLC01"및 "hLC02" 인간화 서열은 본 명세서에 기술된 오리지널 키메라 서열 및 부분적 인간화 서열 모두와 비교한 아미노산 서열 변화를 포함하는 신규한 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0122] PTM 돌연변이는 유익한 결합 특성을 유지하면서 상기 단백질로부터 잠재적으로 유해한 번역 후 변형 모티프를 제거하기 위한 것이다. hLC01 및 hLC02의 위치 1, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 30, 41, 43, 45, 49, 58, 63, 70, 77, 83, 85 및/또는 87를 오리지널 키메라 서열과 비교하여 바람직하게 돌연변이화(치환)시켰다. 치환의 중요성은 유래되는 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 주로 관련이 있다. 따라서, 변화는 또한 오리지널 키메라 아미노산 또는 부분적 인간화 서열과 같은 다른 변이체에 상응하는 아미노산으로부터 실시될 수 있다.
- [0123] 하기 치환은 키메라 및 부분적 인간화 서열과 비교하여 신규하다:
- [0124] - LC (VL) 서열의 아미노산 D1이 E로 치환되고;
- [0125] - LC (VL) 서열의 아미노산 V15는 P로 치환되며;

- [0126] - LC (VL) 서열의 아미노산 D17이 E로 치환되고;
- [0127] - LC (VL) 서열의 아미노산 V19가 A로 치환되며;
- [0128] - LC (VL) 서열의 아미노산 T22는 S로 치환되고;
- [0129] - LC (VL) 서열의 아미노산 D30 및 S31은 임의의 아미노산 조합, 바람직하게는 ES, SS, TS, QS, HS, DH로 치환되며;
- [0130] - LC (VL) 서열의 아미노산 V58은 I로 치환되고; 및/또는
- [0131] - LC (VL) 서열의 아미노산 D70이 E로 치환된다.
- [0132] BCMA와의 상호 작용에 필요한 잔기에서 CDR 결합 영역을 변형시킬 수 있는 서열:
- [0133] BCMA와의 상호 작용에 관여하는 hLC03-변형 아미노산(서열 번호 13):
- [0134] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDX₁VX₂WX₃QQKPGQAPRALIX₅AX₆RX₇SGIPARFSGSX₁₀X₁₁GTEFTLTISLQSEDFAVYYCX₁₂QX₁₃
NNX₁₄PX₁₅TFGAGTKLELKR
- [0135] 상기 바람직한 아미노산은 다음과 같다:
- [0136] X₁은 S, H, T, N, D, Q이며;
- [0137] X₂는 N, E, Q이고;
- [0138] X₃은 A, G, V, S, T, L, I이며;
- [0139] X₄는 Y, F, L, I, V, A, G이고;
- [0140] X₅는 Y, F, L이며;
- [0141] X₆은 S, T이고;
- [0142] X₇은 S, T, D, N, H, E, Q이며;
- [0143] X₈은 L, V, I, M이고;
- [0144] X₉는 F, L, I, V, Y, M이며;
- [0145] X₁₀은 G, X이고;
- [0146] X₁₁은 S, X이며;
- [0147] X₁₂는 Q, V, L, I, M이고;
- [0148] X₁₃은 Y, F, L, I, Q이며;
- [0149] X₁₄는 Y, F, R, Q, K이고; 및/또는
- [0150] X₁₅는 L, I, V, F이다.
- [0151] "hLC03 인간화 서열"은 오리지널 키메라 서열 및 부분적 인간화 서열 모두와 비교한 아미노산 서열 변화를 포함하는 신규한 아미노산 서열을 나타낸다. 이러한 서열 변화는 유리한 결합 특성을 유지하면서 치환될 수 있는 BCMA 표적에 결합하는 아미노산의 잠재적인 변화를 반영하기 위한 것이다. 치환의 중요성은 유래되는 아미노산이 아니라 결과물인 아미노산과 주로 관련이 있다. 따라서, 변화는 또한 오리지널 키메라 아미노산 또는 부분적 인간화 서열과 같은 다른 변이체에 상응하는 아미노산으로부터 실시될 수 있다.
- [0152] 예를 들어:
- [0153] - LC (VL) 서열의 아미노산 S31은 S, H, T, N, D, Q이고;

- [0154] - LC (VL) 서열의 아미노산 N32는 N, E, Q이며;
- [0155] - LC (VL) 서열의 아미노산 A34는 A, G, V, S, T, L, I이고;
- [0156] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y36은 Y, F, L, I, V, A, G이며;
- [0157] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y49는 Y, F, L이고;
- [0158] - LC (VL) 서열의 아미노산 S50은 S, T이며;
- [0159] - LC (VL) 서열의 아미노산 S52는 S, T, D, N, H, E, Q이고;
- [0160] - LC (VL) 서열의 아미노산 L53은 L, V, I, M이며;
- [0161] - LC (VL) 서열의 아미노산 F55는 F, L, I, V, Y, M이고;
- [0162] - LC (VL) 서열의 아미노산 G66은 G, X이며;
- [0163] - LC (VL) 서열의 아미노산 S67은 S, X이고;
- [0164] - LC (VL) 서열의 아미노산 Q89는 Q, V, L, I, M이며;
- [0165] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y91은 Y, F, L, I, Q이고;
- [0166] - LC (VL) 서열의 아미노산 Y94는 Y, F, R, Q, K이며; 및/또는
- [0167] - LC (VL) 서열의 아미노산 L96은 L, I, V, F이다.
- [0168] 일반적으로, CDR 영역에 대한 임의의 변화는 전체적으로 프레임워크 서열과는 독립적으로 고려될 때 CDR 서열의 특징으로 간주될 수 있다. 이러한 변형된 CDR 서열은 본 명세서에 기술된 전체 프레임워크 영역에서 그의 컨텍스트 내에서 또는 그의 컨텍스트와 독립적으로 본 발명의 특징을 정의하는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, hLC01 내지 hLC03에서 밑줄로 표시한 CDR 서열은 그의 변형되지 않은 또는 치환된 형태로 주변 프레임워크 서열과는 독립적으로 본 발명의 정의된 특징으로 간주될 수 있다.
- [0169] 인간화된 LC 서열의 특정 예로는 다음과 같다:
- [0170] hLC04 (서열 번호 14):
- [0171] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
- [0172] 정렬:
- [0173] LC 서열 내의 다양한 잠재적으로 수정된 부위의 CLUSTAL W (1.83) 다중 서열 정렬은 도 9에서 적절한 서열 비교를 제공한다. "일반 서열(General sequence)"은 LC 서열을 나타내고, 여기서 각각의 X는 임의의 주어진 아미노산에 대한 잠재적인 아미노산 변화를 나타낸다. 바람직한 아미노산 치환은 잠재적으로 돌연변이된 위치 각각에 대해 상술한 바와 같이 기재된 것이다.
- [0174] 따라서, 본 발명은 hHC01, hHC02, hHC03, hHC04, hHC05, hHC06, hHC07, hLC01, hLC02, hLC03 및/또는 hLC04, 또는 이들의 임의의 조합에 따른 인간화 서열에 관한 것이다.
- [0175] 본 명세서에 제시된 잠재적 변이체 잔기("일반" 서열에서 X로 식별됨)에 대한 잠재적 변형의 가능한 모든 조합이 본 발명에 포함된다. 이러한 다양한 치환 중 하나 이상을 조합함으로써, 본래 개발되고 본 명세서에서 증명된 키메라 항체의 목적하는 결합 특성을 나타내는 인간화된 변이체가 제작될 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체 또는 그의 부분은 또한 명시적으로 개시되거나 서열 공식을 통해 개시된 인간화 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 90%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0176] 항체 에피토프에 관한 바람직한 구현예
- [0177] 따라서, 본 발명은 CD269 (BCMA)에 결합하는 단리된 항체 또는 항체 단편에 관한 것으로, 상기 항체는 CD269 (BCMA)의 잔기 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 결합한다.
- [0178] CD269의 잔기 13 내지 32의 아미노산 서열은 서열 번호 40에 나타내었다. CD269의 N-말단 서열은 서열 번호 39에 제공된다. CD269의 세포외 도메인은 서열 번호 38에 제공된다.

- [0179] 서열 번호 38에 따른 CD269의 세포외 도메인을 포함하는 항원을 본 명세서에 기재된 마우스 및 키메라 항체의 결합 특이성을 생성시키기 위한 예방 접종에 사용 하였다. 항체 생성 동안 항원으로서 막-결합 도메인 또는 세포내 도메인을 포함하는 전체 CD269 단백질, 또는 이의 단편의 사용은 CD269의 은닉 또는 세포내 도메인에 결합하는 항체를 생성할 수 있으며, 이에 의해 상기 제제는 치료적 적용에 적합하지 않거나 불리해 질 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 CD269의 세포외 부분과의 결합에 의해 정의된다. 세포외 도메인 내의 특정 에피토프는 또한 본 발명의 바람직한 신규하고 예기치 못한 특징을 나타낸다.
- [0180] 마우스 또는 키메라 항체로부터 제조된 Fab 단편을 정제된 BCMA 세포외 도메인과 복합체로 결정화시키고, 복합체 구조를 설명하였다. 구조 분석은 본 발명의 항체의 에피토프 및 그의 생물학적 관련성에 대한 상세한 정보를 나타내었다. 이 영역은 CD269의 두 가지 천연 리간드인 BAFF 및 APRIL의 결합 부위와의 중요한 중첩을 나타내므로, 본 발명의 항체에 의한 세포외 도메인의 CD269(BCMA)의 잔기 13 내지 32의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프의 결합은 유리한 특성이다. 현재까지 당업계에 기술된 항-CD269 항체는 BAFF 및 APRIL 결합 부위와의 포괄적인 중첩을 나타내지 않았다.
- [0181] 일 구현예에서, 본 발명의 단리된 항체 또는 항체 단편은 항체가 CD269 (BCMA)의 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 또는 32 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 단리된 항체 또는 항체 단편은 상기 항체가 CD269 (BCMA)의 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 및 32로 이루어진 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 한다. 이러한 잔기는 본 명세서에서 제공된 결정 구조 데이터에 의해 확인된 바와 같이, 본 발명의 항체와 직접 상호 작용하는 아미노산을 나타낸다. 이들 잔기의 번호는 CD269의 N-말단 서열을 제공하는 서열 번호 39와 관련하여 수행되었다.
- [0182] 본 발명의 일 구현예에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 CD269 (BCMA)에 결합하는 항체가 BAFF-CD269 및/또는 APRIL-CD269 상호 작용을 방해한다는 것을 특징으로 한다.
- [0183] 본 발명의 항체와 CD269의 세포외 도메인의 결합은 BAFF-CD269 상호 작용을 방해한다. APRIL 및 BAFF의 결합 부위가 항체 에피토프와 유사한 부위에 위치하므로, 항체와 CD269의 결합은 또한 APRIL-CD269 상호 작용을 차단할 것이다.
- [0184] 결정 구조가 설명되고 이들 상호 작용 부위가 매핑된, 본 발명의 항체의 특이 에피토프와 APRIL 및 BAFF의 결합 위치와의 비교는 본 명세서에 기재된 바와 같이 천연 리간드 및 항체의 결합 부위에서의 포괄적인 중첩을 나타낸다. 이는 본 발명의 유익하고 예기치 않은 측면을 나타내며, BAFF-CD269 및/또는 APRIL-CD269 상호 작용의 신뢰성 있고 효과적인 차단을 가능하게 한다.
- [0185] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 단리된 항체 또는 항체 단편에 관한 것으로, 상기 항체는 CD269 (BCMA)의 잔기 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 중 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프, 특히, 아미노산 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32으로 이루어진 에피토프에 결합함으로써 APRIL-CD269 상호 작용을 방해한다. 이들 아미노산은 CD269 상의 APRIL, 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 항체 및 APRIL 모두에 각각 결합하는 CD269의 중첩 잔기의 결합 부위에 해당한다.
- [0186] 따라서, 본 발명은 다른 구현예에서, 본 명세서에 기술된 단리된 항체 또는 항체 단편에 관한 것이며, 상기 항체는 CD269 (BCMA)의 잔기 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35 중 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프, 특히, 아미노산 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32으로 이루어진 에피토프에 결합함으로써 BAFF-CD269 상호 작용을 방해한다. 이들 아미노산은 CD269 상의 BAFF, 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 항체 및 BAFF 모두에 각각 결합하는 CD269의 중첩 잔기의 결합 부위에 해당한다.
- [0187] CD269에 결합하는 항체가 CD269와의 APRIL- 또는 BAFF- 상호 작용을 잠재적으로 방해하는 것이 당업계에 개시되어 있으나, 이러한 항체의 특정 에피토프와 관련된 개시는 제공되지 않는다. 또한, 앞서 기술된 항체가 본 발명의 항체와 같이 포괄적인 중첩을 갖는 에피토프와 결합한다고 가정할 수 없다. CD269와의 APRIL- 또는 BAFF- 상호 작용이 방해된 것으로 밝혀지더라도, 이는 상당히 상이한 에피토프와 결합하여 APRIL 또는 BAFF 도킹의 입체적 장애에 의해 발생할 수 있다. 공지된 항체에 의해 발생된 CD269와의 APRIL 또는 BAFF 상호 작용의 방해 정도는 이전에 보고되지 않았다.
- [0188] 본 발명의 항체는 효과적이고 신뢰성있는 방해물 가능하게 하였으며, 이는 당업계에 기재된 항체와 비교하여 개선된 기술적 효과를 잠재적으로 나타낸다. 시험관내 차단 분석을 수행하여 BAFF 및/또는 APRIL 방해, 예를 들어, 인간 BCMA의 세포외 도메인 및 재조합 BAFF 또는 APRIL을 측정 및 비교할 수 있다.

- [0189] 바람직한 구현예에서, 에피토프 특이성은, 본 명세서에 기술된 항체에 의해 나타난 고친화성과 함께, 신규하고 예기치 않은 기술적 효과를 나타낸다. 본질적으로, J22.9 항체 및 그의 인간화된 변이체의 예외적으로 높은 친화성은 천연 리간드의 결합의 "방해" 또는 "차단"뿐만 아니라, 오히려 본 발명의 항체의 초-고도 친화성은 본래의 리간드가 항체가 존재할 때 본질적으로 이들의 BCMA 표적과의 결합으로부터 완전히 또는 거의 완전히 배제된다는 것을 보장한다.
- [0190] 하기 실시예에 개시된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 인간화 항체의 친화성은 놀랍게도 높고 종래 기술에서 시도된 유사한 접근법보다 우수하다. pM 범위의 Kd(하기 참조)는 일반적인 관행에서 예상되지 않는 탁월한 친화성으로 일반적으로 받아들여진다.
- [0191] 다른 양태에서, 본 발명의 인간화 항체 또는 항체 단편은 예를 들어 Biacore와 같은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때, 높은 친화성으로 CD269에 결합하고, 상기 항체는 100nM, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30nM 이하, 또는 20nM 이하의 친화성, 또는 15nM 이하의 친화성, 또는 5nM 이하의 친화성, 또는 1000pM 이하의 친화성, 또는 500pM 이하의 친화성, 또는 친화성 100pM 이하, 또는 80pM 이하의 친화성, 또는 예를 들어 약 50pM의 친화성으로 인간 CD269에 결합한다.
- [0192] 추가의 구현예에서, 약 1 pM 및 약 100 nM 사이, 또는 약 100 pM 및 약 50 nM 사이, 또는 약 200 pM 및 약 20 nM 사이로 Biacore와 같은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 때 항체는 인간 CD269에 결합한다
- [0193] 본 발명의 더욱 바람직한 구현예
- [0194] 일 구현예에서, 본 발명은 CD269 표적과 직접 상호 작용하는 하나 이상의 아미노산 및/또는 물(water) 상호 작용을 통해 상호 작용하는 하나 이상의 아미노산에 의해 정의된 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다(표 1 내지 6 참조). 본 명세서에 기재된 항체와 에피토프의 결합에 관련된 다수의 물 상호 작용은 특이하고 놀라운 결합 양상을 나타낸다. 특히, 항체와 에피토프 간의 결합 표면에 관련된 다수의 물 상호 작용과 조합하여, 본 명세서에 기재된 특정 에피토프에 대한 직접적인 항체의 고친화성은 본 발명의 놀랍고 기대하지 않았던 측면을 나타낸다.
- [0195] 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것으로서, 상기 서열은 표 5에 따른 수교(water bridge)를 통해 표적 에피토프와의 상호 작용 표면에 관여하는 특정 아미노산 잔기의 존재를 특징으로 하고, 본 명세서에 개시된 키메라와 관련되거나, 본 명세서에 개시된 인간화 서열 변이체의 해당 잔기에 관련된 경쇄의 Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 및/또는 Tyr94, 및/또는 중쇄의 Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 및/또는 Tyr101를 포함하는 그룹으로부터 선택된다.
- [0196] 항체의 수교 형성(water bridge formation)에 관한 실시예는 J22.9-xi 키메라로 실시되었으나, 본 발명자는 시험된 오리진널 키메라 항체와 비교하여 인간화 변이체에서의 결합 특성 유지로 인해 본 발명의 인간화 변이체에서 이러한 기술적 효과가 유지된다는 것을 주장한다. 중쇄에서, 유일한 돌연변이된 수교 잔기는 Y101이지만, 그의 물 상호 작용은 주쇄(즉, 백본) 원자를 포함하고, 따라서 측쇄를 돌연변이시키므로써 변하지 않는 것으로 합리적으로 가정할 수 있다; 경쇄에서 수교와 관련된 잔기의 돌연변이는 없다.
- [0197] 본 발명의 항체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체와의 수교를 통한 상호 작용에 관련된 에피토프의 아미노산 잔기에 의해 추가적으로 특징화될 수 있다. 관련된 특징은 표 5에 제공된다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어 일 구현예에서 경쇄의 잔기 Ser31이 물 분자를 통해 CD269의 Thr32와 상호 작용하는 것으로 특징된다. 본 발명의 항체의 결합 특성에 대한 이러한 설명은 표 5에 제공된 바와 같은 각각의 상호 작용을 위한 것이다.
- [0198] 또한, 본 명세서에 기술된 항체의 서열 변이체는 본 발명에 포함되며, "수교(water bridging)" 상호 작용에 관련된 하나 이상의 잔기는 수"교"의 비용으로 직접 측쇄 상호 작용을 서열로 "치환"하기 위해 변형된다. 예를 들어, 상호 작용 인터페이스로부터 물을 대체하지만, 상호 작용의 친화성에 실질적으로 영향을 주지 않는 아미노산 서열에서의 돌연변이 또는 변화가 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 항체 단편에 관한 것으로, 상기 서열은 표 5에 따른 수교를 통해 표적 에피토프와의 상호 작용 표면에 관련된 아미노산 잔기의 서열 변화에 의해 특성화되며, 본 명세서에 개시된 키메라와 관련되거나, 본 명세서에 개시된 인간화 서열 변이체의 해당 잔기에 관련된 경쇄의 Ser31, Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 및/또는 Tyr94, 및/또는 중쇄의 Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 및/또는 Tyr101로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 명세서에 기술된 인간화 항체의 해당 위치에서의 변이는 임의의 주어진 아미노산 치환, 바람직하게는 상호 작용으로부터 물을 효과적으로 대체하나 에피토프 친화성 및 특

이성과 관련하여 유사한 결합 특성을 유지하는 아미노산 치환과 관련될 수 있다.

- [0199] 본 발명의 한 구현예에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 항체가 바람직하게는 N-연결 올리고사카라이드 쇠(N-linked oligosaccharide chain), 바람직하게는 중쇄의 Asn297에서 글리코실화되는 것을 특징으로 한다.
- [0200] 항체의 글리코실화는 항체에 대한 카보하이드레이트 또는 글리칸의 부착을 의미한다. N-연결 글리칸은 아스파라긴 또는 아르기닌 측쇄의 질소에 부착된다. 표적 단백질에 부착된 카보하이드레이트 쇠는 다양한 기능을 한다. 예를 들어, 일부 단백질은 먼저 글리코실화되지 않으면 정확하게 폴딩되지 않는다. 또한, 단백질 내의 아스파라긴의 아미드 질소에 연결된 폴리사카라이드는 일부 분비된 당단백질에 안정성을 부여할 수 있다. 이 경우 글리코실화는 적절한 폴딩을 위한 엄격한 요구 사항은 아니나, 글리코실화되지 않은 단백질은 더 빨리 분해될 수 있다.
- [0201] 본 발명의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 명세서에 기재된 항체의 탈글리코실화는 항체의 글리코실화된 형태와 비교하여 치료 효과를 감소시킨다. 글리코실화가 항체의 활성을 유지하는데 중요한 역할을 한다는 것은 놀랍다. 따라서, 글리코실화는 예상치 못한 기술적 이점과 관련된 본 발명의 바람직한 구현예를 나타낸다.
- [0202] 본 명세서의 실시예에서 입증된 바와 같이, J22.9-xi-N-글리칸(탈글리코실화)으로 처리된 동물의 전체 종양 크기는 아이소타입 대조군 항체를 투여한 동물과 유의한 차이가 없었으나, 이들 마우스의 수명은 isoAb-치료군과 비교하여 실질적으로 증가하였다. J22.9-xi-N-글리칸은 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 없기 때문에, 이러한 결과는 J22.9-xi가 BCMA에 결합함으로써 종양 성장을 방해한다는 것을 나타낸다. 이것은 수용체와 이의 천연 리간드(APRIL 및 BAFF) 사이의 상호 작용의 차단에 의한 것으로 합리적으로 간주될 수 있다. 본 발명의 본 양태 및 본 명세서에 기술된 항체는 선행 기술의 항체로부터 유래될 수 없었던 놀라운 기술적 효과를 나타낸다. J22.9-xi-N-글리칸(탈글리코실화)은 ADCC 또는 CDC의 다운스트림 효과 없이 표적에피토프에 항체가 결합하게 하는 기술된 실험에서 대조군 시료로 간주될 수 있으며, 잠재적인 치료 효과에 대해 평가된다. 따라서, 바람직하게는 글리코실화된 본 발명의 항체는 세포 독성을 유발하는 천연 리간드에 의한 결합을 방지(또는 현저한 방해)시킬 수 있는 효과적인 에피토프 결합을 나타낸다. 본 명세서에 기술된 항체의 이러한 특성은 당업계에 기재된 유사한 항체에서는 기재되어 있지 않다.
- [0203] 항체의 글리코실화에 관한 실시예는 J22.9-xi 키메라로 실시되었으나, 본 발명자는 시험된 오리지널 키메라 항체와 비교하여 인간화 변이체에서의 결합 특성 유지로 인해 본 발명의 인간화 변이체에서 이러한 기술적 효과가 유지된다는 것을 주장한다. 글리코실화의 바람직한 위치(중쇄의 Asn297)는 임의의 돌연변이된 잔기에 직접 연결되어 있지 않고, 완전 IgG의 인간 불변 영역에 놓여있다. 따라서, 이 위치에서 글리코실화 패턴의 차이는 키메라 항체와 비교하여 임의의 J22.9 변이체 에도 존재하지 않는다고 가정하는 것이 타당하다.
- [0204] 본 발명의 이용 및 기능적 양태
- [0205] 본 발명의 항체는 본 명세서에 기술된 에피토프에 결합하여 이 에피토프의 천연 리간드의 상호 작용을 차단하고 CDC 및 ADCC를 유도할 수 있다.
- [0206] ADCC(Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity)은 원하는 치료 효과를 생성하는 본 발명의 항체에 의해 유도된 하나의 인자이다. ADCC는 세포-매개 면역 방어의 메커니즘으로, 면역계의 이펙터 세포가 표적 세포를 능동적으로 분해하며, 그 막-표면 항원은 특정 항체에 결합되어있다. 본 발명의 항체에 의한 CD269-발현 세포의 결합 후, ADCC가 유도될 수 있다. 고전적 ADCC는 자연 살해 세포(NK 세포)에 의해 매개된다. 대식세포, 호중구 및 호산구도 ADCC를 매개할 수 있다. ADCC는 이전의 항체 반응에 대한 의존성 때문에 적응성 면역 반응의 일부이다. 마우스에서의 실험은 ADCC가 본 명세서에 기술된 치료용 항체의 중요한 작용 메커니즘임을 나타낼 수 있다.
- [0207] 본 발명의 바람직한 구현예는 병원성 B 세포의 존재와 관련된 의학적 장애의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 단리된 항체 또는 항체 단편에 관한 것이다.
- [0208] 본 발명의 일 구현예에서, 의학적 장애는 CD269-관련 장애, 바람직하게는 병원성 B 세포와 관련된 장애이며, 이는 형질 세포 및/또는 기억 B 세포의 질환이다.
- [0209] 형질 세포의 질환은 형질 세포의 암, 예를 들어 다발성 골수종, 형질세포종, 발덴스트럼 거대글로불린혈증 또는 형질 세포 백혈병일 수 있다. 형질 세포의 질환은 호지킨 병과 같은 B 림프구의 암일 수 있다.
- [0210] 본 발명의 일 구현예에서, 의학적 장애는 자가 반응성 형질 세포 및/또는 자가 반응성 기억 B 세포와 관련된 자가 면역 질환, 예를 들어 염증성 자가 면역 질환, 예를 들어, 전신성 홍반성 루푸스(SLE) 또는 류마티스성 관절

염이다.

- [0211] 따라서, 본 발명은 또한 바람직하게는 치료를 필요로 하는 대상에게 치료학적 유효량의 항체를 투여하는 단계를 포함하여, 본 명세서에 개시된 바와 같은 의학적 장애를 치료하는 방법을 포함한다.
- [0212] 본 발명의 추가 양태는 본 명세서에 기재된 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항체-약물 접합체(ADC, antibody-drug conjugate)에 관한 것이다. 항-CD269 항체-약물 컨주게이트 "항-CD269 ADC"는 치료제에 컨주게이트된 항-CD269 항체 또는 그의 단편으로 기술될 수 있다. 특정 실시예에서, ADC는 항-CD269 항체(예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 J22.9-x1의 인간화된 변이체)를 포함한다.
- [0213] 본 명세서에 기재된 ADC 또는 ADC 유도체는 암 또는 자가 면역 장애와 같은 CD269를 발현하는 의학적 증상을 갖는 대상에게 투여될 때 CD269-발현 세포에 임상 적으로 유의한 효과가 나타난다. 일 구현예에서, 항-CD269 항체 또는 그의 유도체는 세포 독성제에 컨주게이션되어, 결과물인 ADC 또는 ADC 유도체가 CD269-발현 암세포에 세포 독성 효과, 바람직하게는 세포에 흡수되거나 내부화될 때 발휘하도록 한다.
- [0214] ADC 또는 ADC 유도체가 치료 효과(예: 세포 독성 효과)를 발휘하는 경우 항-CD269 ADC 또는 ADC 유도체는 바람직하게는 내부화되어 CD269-발현 세포 내에 축적된다. 항체 또는 항체 유도체에 접합시키는 데 특히 적합한 잔기는 화학 요법제, 전구 약물 전환 효소, 방사성 동위 원소 또는 화합물, 또는 독소이다. 예를 들어, 항-CD269 항체 또는 그의 유도체는 화학 요법제 또는 독소(예를 들어, 세포 분열 억제제 또는 세포 파괴제)와 같은 세포 독성제와 접합될 수 있다.
- [0215] 본 발명의 다른 양태는 바람직하게는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 단리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0216] a) 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자
- [0217] - 상기 항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 항체 단편을 암호화하고,
- [0218] - 서열 번호 1 내지 31 및 41 내지 42에 따른 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 코딩하며,
- [0219] - 서열 번호 32 내지 36의 서열 또는 서열 단편을 포함함,
- [0220] b) a)에 따른 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 핵산 분자;
- [0221] c) a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 기능적으로 충분히 유사/동등한 서열 동일성(identity)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자로서, 바람직하게는 a) 또는 b)에 따른 뉴클레오타이드 서열과 최소 80%, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 서열 동일성을 포함함;
- [0222] d) 유전자 코드의 결과로서 a) 내지 c)에 따른 뉴클레오타이드 서열로 변성되는 핵산 분자; 및
- [0223] e) a) 내지 d)의 뉴클레오타이드 서열에 따른 핵산분자로서, 이는 결실, 부가, 치환, 전좌, 역전 및/또는 삽입에 의해 변형되고 a) 내지 d)에 따른 뉴클레오타이드 서열에 기능적으로 유사/동등한 것인 핵산 분자.
- [0224] 본 발명의 다른 양태는 본 명세서에 기재된 항체 또는 항체 단편을 생산할 수 있고 및/또는 핵산 분자를 포함할 수 있는 박테리아 세포 또는 포유류 세포, 바람직하게는 하이브리도마 세포 또는 세포주와 같은 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0225] 본 발명의 다른 양태는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께, 본 명세서에 기재된 단리된 항체 또는 항체 단편, 핵산 분자 또는 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0226] 본 발명의 부가적이고 놀라운 측면은 본 명세서에 개시된 바와 같은 항체의 개선된 안정성이다. 항체는 어떠한 결합 친화성의 손실 없이 적절한 조건 하에서 장시간 동안 용이하게 저장될 수 있다. -80℃ 또는 4℃에서 보관 후 활성의 유지에 관해서 적절한 시험을 수행하였고, 이는 예상치 않게 양호한 항체 안정성 및 상기 두 온도 모두에서의 저장 후 활성 유지를 입증한다(도 3c). 이러한 개선된 안정성은 키메라 항체에 대해 명백하고, 놀랍게도 이의 인간화된 변이체에 대해서도 명백하다. 예기치 않게 인간화된 변이체의 안정성은 장기 보관 하에서 키메라보다 향상된다.
- [0227] 본 명세서에 기재된 항체의 또 다른 이점은 실시예에서 입증된 골수종 세포의 효과적인 전신(systemic) 고갈이다. 선행 기술에 이전에 개시된 항체는 전신 방식으로 원하는 항-혈장 세포 효과를 나타내지 못했다. 선행 기술의 항체에 대해 실시된 연구는 골수종 세포를 이용한 피부 피하 주사 및 단리된 세포피의 후속 처리만을 개시한다. 본 발명은 실시예에서 확인된 바와 같이, 이들의 i.v. 주입 후 암세포 다발성 골수종 세포를 전신적으로 고갈시킬 수 있는 항체를 제공한다. 표적화 된 세포의 효과적인 고갈은 본 발명의 항체의 유의한 특성 외에도 선

행 기술에서 이전에 입증되지 않은 기술적 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0228]

본 발명은 본 명세서에 개시된 실시예 및 도면에 의해 실시예로서 설명된다. 본 명세서에 제공된 도면은 본 발명의 특정 실시예를 나타내며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 도면들은 하나 이상의 비 한정적인 실시예들의 기술적인 지지를 향상시키는 가능한 및 잠재적으로 가능한 실시예들의 추가 설명을 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

도면에 대한 간단한 설명:

도 1: J22.9-xi의 시험관내 특성.

도 2: CD269(BCMA) 및 J22.9-xi Fab:CD269 복합체의 구조

도 3: J22.9-xi의 시험관내 세포 독성.

도 4: 이종 이식 NSG 마우스에서 J22.9-xi의 효능.

도 5: 확립한 종양의 치료.

도 6: 질환의 초기 단계에 있는 종양 치료.

도 7: 하이브리도마 J22.9의 불안정성.

도 8: J22.9-xi와 비교한 HC의 인간화 서열의 서열.

도 9: J22.9-xi와 비교한 LC의 인간화 서열의 서열.

도 10: J22.9-xi의 서열 최적화된 변이체는 ELISA에서 유사한 결합을 나타낸다.

도 11: J22.9-xi의 서열 최적화된 변이체는 유동세포 계측법에서 유사한 결합을 나타낸다.

도 12: SPR 로우 데이터.

도 13: 항체 변이체의 겔 전기 영동

도면의 상세한 설명:

도 1: J22.9-xi의 시험관내 특성. CD269 양성 MM.1S 세포를 이용한 (a) ELISA 및 (b) 유동 세포 계측법에서의 J22.9-xi의 BCMA에 대한 농도 의존성 결합. (c) BCMA에 대한 J22.9-xi의 결합 친화성은 지시된 농도의 BCMA로 표면 플라즈몬 공명 측정으로부터 결정되었다. (d) J22.9-xi는 마이크로타이터 플레이트 상에 흡착된 BAFF와 BCMA 사이의 상호 작용을 차단한다.

도 2: (a) CD269 (BCMA) 인식 표면. BAFF/APRIL 및 J22.9-xi에 대한 결합 에피토프 잔기를 보여주는 CD269 (BCMA)의 세포의 도메인의 세 가지 모습. 상단에서, CD269(BCMA)의 결합면에 대한 직접적인 모습: 밝은 회색 음영은 BAFF 및 APRIL의 결합 에피토프를 포함하는 모든 잔기가 그들의 결정 구조로부터 확인되는 것을 나타내며, 흑색 잔기(구형으로 나타냄)는 BAFF, APRIL 또는 J22.9-xi와 접촉하지 않는다; J22.9-xi 결합에 관여하는 에피토프 잔기의 서브세트가 표면 표시(representation)로 나타난다; 구형으로 표시된 나머지 밝은 회색 잔기는 BAFF 및 APRIL 에피토프의 일부이지만 J22.9-xi와는 직접 접촉하지 않는다. 중간 및 하단 패널은 상단 패널과 동일한 표시를 나타내나 각각 관찰자 쪽으로 90° 방향으로 회전한다. (b) J22.9-xi Fab: CD269 복합체의 두 가지 모습. J22.9-xi는 밝은 회색의 중쇄 및 진한 회색의 경쇄가 표면 표시(representation)로 나타난다. CD269(BCMA)는 J22.9-xi 항원 포켓에 결합된 리본 표시(representation)로 나타난다. 왼쪽에는 Fab:CD269 복합체의 전체 모습; 오른쪽에는 뷰어쪽으로 기울어져서 결합 포켓을 보여주는 복합체.

도 3: J22.9-xi의 시험관내 세포 독성. (a) CD269-양성 MM.1S-Luc 세포를 표적 비율 20:1의 이펙터에서 인간 PBMC와 혼합한 다음, 지시된 농도의 J22.9-xi와 4 시간 동안 배양하였다. 열린 기호는 기증자 1과 2의 PBMC를 처리했을 때 -N-글리 칸이 없는 J22.9-xi의 세포 독성 활성을 나타낸다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. (b) 탈글 리코실화는 MM.1S 세포에 대한 J22.9-xi 결합에는 영향을 미치지 않는다. (c) 4°C 또는 -80°C에서 3 주간 J22.9-xi의 저장은 세포 독성에 영향을 미치지 않는다.

도 4: 이종 이식 NSG 마우스에서 J22.9-xi의 효능. (a) 200 μ g의 J22.9-xi 또는 대조군 항체를 매주 두 번 투여한 후 시간 경과에 따른 종양 발달 및 치료되지 않은 대조군 마우스. (b) 6 일에서 41 일 사이의 총 종양 크

기((a)의 AUC(Area under the curve)). SEM으로 평균값을 나타내었다(**P < 0.01, ***P < 0.001, t-test). (c) J22.9-xi 및 아이소타입 대조군 마우스의 전반적인 생존. P 값은 로그-순위(Mantel-Cox) 검정을 사용하여 계산되었다. (d-1) 치료용 항체의 투여 없이 표시된 그룹에서 MM.1S-Luc 세포의 검출. 가장 오른쪽 이미지 아래 숫자(41, 41, 44, 40)는 특정 마우스가 사망한 날로 종양 세포 주입 후 날짜를 나타낸다. (d-2) 21 일과 28 일 에 표시된 그룹에서 MM.1S-Luc 세포의 검출. 전면(Dorsal view). (e) J22.9-xi 농도 및 종양 발생 사이의 연관 성. (f) 6 일과 42 일 사이의 총 종양 크기((e)의 AUC). SEM으로 평균값을 나타내었다(**P < 0.01, ***P < 0.001, t-test). (g) 실험 시간표 개요.

도 5: 확립된 종양의 치료. (a) 200 μ g의 J22.9-xi 또는 대조군 항체를 매주 두 번 투여한 후 시간 경과에 따른 종양 발달 및 치료되지 않은 대조군 마우스. (b) 8 일과 48 일 사이의 총 종양 크기((a)의 AUC). SEM으로 평균 값을 나타내었다 (*P < 0.05, **P < 0.01, t-test). (c) J22.9-xi 및 아이소타입 대조군 마우스의 전반적인 생존. P 값은 로그-순위(Mantel-Cox) 검정을 사용하여 계산되었다. 실험 시간표에 대한 개요는 도 5d에 제공된다.

도 6: 질환의 초기 단계에 있는 종양 치료. (a) 2 μ g, 20 μ g 또는 200 μ g의 J22.9-xi 또는 200 μ g의 아이소타입 대조군 항체 또는 -N-글리칸이 없는 J22.9-xi을 처리 및 종양 없는 그룹에서 종양 성장 과정. (b) 9 일에서 44 일 사이의 총 종양 크기((a)의 AUC). SEM으로 평균값을 나타내었다(*P < 0.05, **P < 0.01, t-test). (c) 항체 -처리 및 대조군 이중 이식 SCID-베이지 마우스의 생존. P 값은 로그-순위(Mantel-Cox) 검정을 사용하여 계산되었다. 실험 시간표에 대한 개요는 도 6d에 제공된다.

도 7: 하이브리도마 J22.9의 불안정성. 하이브리도마 J22.9의 상등액을 BCMA-코팅 마이크로타이터 플레이트상에 서 1 일째에 ELISA로 BCMA에 대한 결합에 대한 양성을 시험하였다. 표시된 시점에서 나중에 분석한 결과, 상등 액의 결합 능력이 감소되었다. 배지는 7, 14 및 21 일에 교환되었다.

도 8: J22.9-xi와 비교한 인간화 항체의 서열의 요약. 서열 비교는 표준 정렬 소프트웨어를 사용하여 수행되었 다.

도 9: J22.9-xi와 비교한 인간화 항체의 서열의 요약. 서열 비교는 표준 정렬 소프트웨어를 사용하여 수행되었 다.

도 10: 키메라 J22.9-xi 및 인간화 변이체의 결합을 인간 BCMA(hBCMA) 또는 시노몰구스 BCMA(cyBCMA)로 코팅된 마이크로타이터 플레이트를 사용하여 ELISA를 통해 시험하였다(J22.9-H는 인간화 서열 번호 27에 해당하고; J22.9-FSY는 인간화 및 PTM 변형된 서열 번호 28에 해당하며; J22.9-ISY는 인간화 및 PTM 변형된 서열 번호 29 에 해당한다).

도 11: 키메라 J22.9-xi 및 인간화 변이체의 결합을 인간 MM 세포주 RPMI-8226을 사용하여 유동 세포 계측법을 통해 시험하였다(J22.9-FSY는 인간화 및 PTM 변형된 서열 번호 28에 해당하며; J22.9-ISY는 인간화 및 PTM 변형 된 서열 번호 29에 해당한다).

도 12: SPR 로우 데이터: 키메라 J22.9-xi 및 인간화 변이체의 인간(도 12a) 및 시노몰구스(도 12b) BCMA에 대 한 결합 친화성은 표면 플라스몬 공명 (SPR) 분광법에 의해 측정되었다. IgG는 아민 화학을 통해 Proteon GLH 센서 칩에 고정화시키고 결합은 BCMA로 이동상에서 측정하였다. 그래프의 로우 데이터 추적 순서는 도면의 범례 에 나열된 샘플 순서와 일치한다.

도 13: 항체 변이체의 겔 전기 영동. 항체 변이체는 비-환원성 SDS-PAGE에서 수행하고 단백질 이동을 나타내기 위해 염색되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0229]

본 명세서에 사용된 "항체"는 일반적으로 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자의 단편에 의해 실질적 으로 코딩되는 하나 이상의 폴리펩타이드로 구성된 단백질을 지칭한다. 용어 "항체"가 사용되는 경우, 용어 "항 체 단편"은 또한 언급된 것으로 간주 될 수 있다. 인지된 면역글로불린 유전자는 무수한 면역글로불린 가변 영 역 유전자뿐만 아니라 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론 및 뮤 불변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론으로 분류되며, 차례로 면역글로불린 클래스인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 각각 정의한다. 기본적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량 체 또는 이량체를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각각의 사량체는 두 개의 동일한 폴리펩티드 쇄 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나 의 "경"(L)(약 25 kD) 및 "중"(H) 쇄 (약 50-70 kD)을 갖는다. 각 쇄의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110 개 이상의 아미노산의 가변 영역으로 정의된다. 용어 "가변 경쇄" 및 "가변 중쇄"는 각각 경쇄

및 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 선택적으로, 항체 또는 항체의 면역학적 부분은 다른 단백질과 화학적으로 컨주게이션되거나 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

[0230] 본 발명의 항체는 포유 동물, 특히 인간 단백질 표적에 대해 결합하도록 의도된다. 단백질 이름의 사용은 마우스 또는 인간 버전의 단백질에 해당할 수 있다.

[0231] "특이적 결합"은 당업자를 통해 이해되며, 이에 의해 숙련자는 결합 및 결합 특이성을 시험하는데 사용될 수 있는 다양한 실험 절차를 명확하게 알 수 있다. 일부 교차-반응 또는 백그라운드 결합은 많은 단백질-단백질 상호작용에서 불가피할 수 있다. 이것은 항체와 에피토프 사이의 결합의 "특이성"을 떨어뜨리는 것이 아니다. 또한, 용어 "에 대해 직접(directed against)"은 항체와 에피토프 간의 상호작용 이해에 있어 "특이성"이라는 용어를 고려할 때 적용 가능하다.

[0232] 본 발명의 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 이중특이적, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일 가변 단편(ssFv), 단일 도메인 항체(예컨대, 나노 바디로부터의 VHh 단편), 단일 쇠 단편(scFv), Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-이디오타입 항체 및 에피토프-결합 단편 또는 상기 임의의 것의 조합을 포함하나, 이들이 본래의 결합 특성을 보유하는 한, 이에 제한되지 않는다. 또한, 미니-항체 및 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 4가 항체 및 펩타마디와 같은 다가 항체가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 부류(즉, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 또는 서브클래스일 수 있다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 용어 항체는 전체 항체의 변형에 의해 생성되거나 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새롭게 합성된 항체 및 항체 단편을 포함한다.

[0233] 본 발명의 항체의 하나 이상의 CDR 또는 상기 항체로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 인간화 항체는 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 4 개의 일반적인 단계를 사용하여 모노클로날 항체를 인간화할 수 있다. 이들은 다음과 같다: (1) 시작 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예측된 아미노산 서열을 결정하는 단계 (2) 인간화 항체를 디자인하는 단계, 즉, 인간화 과정 중에 어느 항체 프레임워크 영역을 사용할 것인가를 결정하는 단계 (3) 방법론/기술을 실제 인간화하는 단계 및 (4) 인간화 항체의 형질감염 및 발현. 예를 들어, 미국 특허 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; 6,180,370; 5,225,539; 6,548,640를 참조한다.

[0234] 용어 인간화 항체는 면역글로불린의 프레임워크 영역의 적어도 일부 및 선택적으로 CDR 영역의 일부 또는 결합에 관여하는 다른 영역이 인간 면역글로불린 서열로부터 유도되거나 조절됨을 의미한다. 마우스 모노클로날 항체의 인간화된, 키메라화 또는 부분적으로 인간화된 버전은 예를 들어, H 및 L 쇠를 코딩하는 마우스 및/또는 인간 게놈 DNA 서열 또는 H 및 L 쇠를 코딩하는 cDNA 클론으로부터 출발하는 재조합 DNA 기술에 의해 제작될 수 있다. 마우스 항체의 인간화된 형태는 재조합 DNA 기술(Queen et al., 1989; WO 90/07861)에 의해 비-인간 항체의 CDR 영역을 인간 불변 영역에 연결시킴으로써 생성될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 방법에 사용되는 모노클로날 항체는 인간 모노클로날 항체일 수 있다. 인간 항체는 예를 들어, 파지-디스플레이 방법(WO 91/17271; WO 92/01047)을 사용하여 수득할 수 있다.

[0235] 또한, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 특정 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 쇠 또는 그의 단편(예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 부분 서열)인 비-인간(예를 들어, 쥐, 낙타, 라마, 상어) 항체의 형태를 의미한다.

[0236] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 인간 또는 인간화 항체는 인간에 의해 생성된 항체 및/또는 당업계에 공지되거나 본 명세서에 개시된 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체는 경쟁적 결합 실험 또는 다른 방법으로 특정 마우스 항체와 동일한 에피토프 특이성을 가지도록 선택될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는 놀랍게도 마우스 항체의 유용한 기능적 특성을 크게 공유한다. 또한 인간 폴리클로날 항체는 면역원성 제제로 면역화된 인간으로부터의 혈청 형태로 제공될 수 있다. 임의로, 이러한 폴리클로날 항체는 친화성 시약으로서 아밀로이드 섬유소 및/또는 비-섬유소 폴리펩티드 또는 그의 단편을 사용하는 친화성 정제에 의해 농축될 수 있다. 모노클로날 항체는 WO 99/60846에 기재된 기술에 따라 혈청으로부터 수득할 수 있다.

[0237] 또한, 본 발명은 예를 들어 가변 영역, 표적에 대한 선택적 결합에 적합한 인식 분자 또는 친화성 시약에서, 본 명세서에 기술된 항체 또는 그의 단편의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 친화성 시약, 항체 또는 그의 단편은 PEG화될 수 있으며, 이에 따라 PEG화는 본 발명의 항체에 대한 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 중합체 쇠의 공유 부착을 지칭한다. PEG화는 PEG의 반응성 유도체를 표적 분자와 함께 배양함으로써 일상적으로 달성될 수 있다.

항체에 대한 PEG화는 잠재적으로 숙주의 면역계로부터 제제를 은폐할 수 있고 이는 면역원성 및 항원성의 감소로 이어지거나 신장 청정(renal clearance)을 감소시킴으로써 순환 시간을 연장시킬 수 있는 제제의 유체 역학 크기를 증가시킨다.

[0238] 항체의 가변 영역은 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 단독으로 또는 조합하여 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 각각 초가변(hypervariable) 영역으로 알려진 3 개의 상보성 결정 영역(CDRs, complementarity determining regions)에 의해 연결된 4 개의 프레임워크 영역(FR, framework regions)으로 구성된다. 각 쇠 내의 CDR은 FR에 의해 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇠로부터의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 적어도 두 가지 기법이 있다: (1) 중간 서열 다양성에 기초한 접근법 (즉, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani *et al.* (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948). 본 명세서에 사용된 바와 같이, CDR은 접근법 중 하나 또는 두 접근법의 조합에 의해 정의된 CDR을 지칭할 수 있다.

[0239] 일부 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 CDR, 적어도 2 개, 적어도 3 개 또는 그 이상의 CDR을 포함하는 항체를 제공하며, 상기 CDR은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR, 적어도 2 개, 적어도 3 개 또는 그 이상의 CDR과 실질적으로 동일하다. 다른 구현예는 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체로부터 유래된 적어도 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 CDR(들)과 실질적으로 동일한 적어도 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 CDR(들)을 갖는 항체들을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 CDR(들)은 본 발명의 항체의 적어도 1 개, 2 개 또는 3 개 CDR과 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 본 발명의 목적상, 결합 특이성 및/또는 전체 활성은 일반적으로 유지되나, 활성의 정도는 상기 항체와 비교하여 다를 수 있음이 이해된다(크거나 작을 수 있음).

[0240] 항체의 반감기 및 세포 독성 잠재력은 주로 Fc-도메인과 상이한 Fc-감마-수용체의 상호 작용에 의존한다. 항체 반감기의 경우 FcRn(neonatal Fc receptor)가 중요한 역할을 한다. 이 수용체는 혈청 단백질을 재순환하는 엔도솜(endosomes)으로 흡수할 수 있는 단핵 세포 및 혈관 내피 세포와 같은 여러 세포 유형 및 조직에서 발견된다. 엔도솜에서, pH는 약 6으로 감소되고, 이러한 조건 하에서 항체는 FcRn에 결합 할 수 있다. 이 상호 작용은 생리학적 pH가 수용체에 대한 결합을 방해하는 경우 혈액으로 다시 재방출될 때까지 항체를 분해로부터 보호한다(Roopenian and Akillesh (2007) Nat Rev Immunol 7 : 715-725). pH 6에서 FcRn에 대한 항체의 친화성이 높을수록, 항체의 반감기가 커진다. 이 상호 작용을 안정화시키는 것으로 알려진 Fc-단편 돌연변이는 Presta(2008, Curr Opin Immunol 20 : 460-470)에 요약되어있다.

[0241] 치료 항체는 이들의 표적과의 결합에 따라 여러 메커니즘을 통해 작용할 수 있다. 결합 자체는 프로그램된 세포 사멸로 이어질 수 있는 신호 전환을 유발할 수 있다(Chavez-Galan *et al.* (2009) Cell Mol Immunol 6 : 15-25). 또한, 수용체 또는 리간드에 결합함으로써 수용체와 그의 리간드와의 상호 작용을 차단할 수 있다. 생존에 중요한 신호가 영향을 받을 경우 이러한 방해는 세포 사멸을 일으킬 수 있다(Chiu *et al.* (2007) Blood 109 : 729-739). 세포-고갈과 관련하여 두 가지 주요 이펙터 메커니즘이 알려져 있다. 첫 번째는 표적 세포에 대한 보체 의존성 세포 독성 (CDC)이다. 여기에는 3 가지 경로가 알려져 있다. 그러나, 항체의 경우 CDC의 중요한 경로는 C1q가 IgG 또는 IgM의 불변 영역에 결합함으로써 시작되는 고전적인 경로이다(Wang and Weiner (2008) Expert Opin Biol Ther 8 : 759-768).

[0242] 두 번째 메커니즘은 항체 의존성 세포 독성(ADCC)이라고 한다. 이 이펙터 기능은 항체의 각각의 아이소 타입에 대해 Fc-수용체를 발현하는 면역 세포의 동원에 특징이 있다. ADCC는 IgG 분자에 단독으로 또는 면역 복합체로서 결합할 수 있는 Fc-감마 수용체(Fc γ R)를 활성화시킴으로써 주로 매개된다. 마우스는 3 개(Fc γ RI, Fc γ RIII 및 Fc γ RIV) 및 인간은 5 개(Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA 및 Fc γ RIIIB)의 활성화된 Fc γ -수용체를 나타낸다. 이러한 수용체는 과립구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 자연 살상 세포와 같은 선천성 면역 세포에서 발견되므로 적응성 면역계와 선천성을 연결한다. 세포 유형에 따라, 항체-표식 표적 세포의 인식시 Fc γ R-보유 세포의 여러 작용 형태가 있다. 과립구는 일반적으로 혈관 활성 및 세포 독성 물질 또는 화학유인 물질을 방출하나 또한 식균 작용을 일으킬 수 있다. 단핵구와 대식세포는 식균 작용, 산화적 파괴, 세포 독성 또는 전-염증성 사이토카인의 방출과 반응하는 반면, 자연 살해 세포는 그랜자임과 퍼포린을 방출하고 표적 세포와 이의 Fas 리간드상의 FAS와의 상호 작용을 통해 세포 사멸을 유발할 수 있다(Nimmerjahn and Ravetch (2008) Nat Rev Immunol 8:34-47; Wang and Weiner (2008) Expert Opin Biol Ther 8:759-768; Chavez-Galan *et al.* (2009) Cell Mol Immunol 6:15-25).

- [0243] 또한, 항체 의존성 세포 독성(ADCC)은 활성화 Fc-감마 수용체 (Fc γ R)에 대한 Fc-도메인의 결합을 강화시킴으로써 개선될 수 있다. 이는 Presta (2008, Curr Opin Immunol 20:460-470)에 요약된 바와 같이 Fc-감마 도메인의 돌연변이를 통해서도 달성될 수 있다.
- [0244] ADCC를 변경하는 또 다른 방법은 Asn297에서 각 IgG에 존재하는 당 모이어티를 조작하는 것이다. 데푸코릴레이션(Defucosylation) 및 당 분자의 말단으로부터의 시알산 제거는 항체의 세포 독성 가능성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Anthony and Ravetch (2010) J Clin Immunol 30 Suppl 1:S9-14).
- [0245] 또한, 예를 들어, 청구된 % 서열 동일성으로 정의되는, 본 발명의 상기 특성을 유지하는 청구된 핵산, 단백질 및 항체의 서열 변이체는 본 발명의 범위에 포함된다. 제공된 특정 서열로서 대안적인 서열을 나타내나, 표적 특이성과 같은 본질적으로 상기 동일한 결합 특성을 유지하는 상기 변이체는 기능적 유사체로서 또는 기능적으로 유사하다고 알려져 있다. 서열 동일성은 서열 정렬을 수행할 때 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 백분율과 관련된다.
- [0246] 유전자 암호의 축퇴성의 결과로서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 폴리펩타이드를 코딩하는 다수의 뉴클레오타이드 서열이 존재한다는 것은 당업자에게 이해 될 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 최소의 상동성 또는 서열 동일성을 갖는다. 그럼에도 불구하고, 코돈 사용의 차이로 인해 달라지는 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 의해 구체적으로 고려된다. 또한, 기술된 서열 동일성의 영향을 받는 서열의 결실, 치환 및 다른 변화는 본 발명에 포함된다.
- [0247] 또한, 치환을 통해 발생할 수 있는 단백질 서열 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 명세서에 정의된 바와 같은 치환은 단백질의 아미노산 서열에 대해 행해지는 변형으로, 하나 이상의 아미노산이 동일한 수의 (상이한) 아미노산으로 치환되어, 일차 단백질과 상이한 아미노산 서열을 함유하는 단백질을 생성하고, 바람직하게는 단백질의 기능을 현저히 변화시키지 않는 것이다. 추가와 마찬가지로 치환은 자연적이거나 인공적일 수 있다. 아미노산 치환이 단백질의 기능을 현저하게 변화시키지 않고 이루어질 수 있다는 것은 당업계에 공지되어있다. 이는 변형이 하나의 아미노산을 유사한 기능의 다른 아미노산으로 치환하는 "보존적인(conservative)" 아미노산 치환과 관련이 있는 경우 특히 그렇다. 이러한 "보존된" 아미노산은 크기, 전하, 극성 및 형태가 단백질의 구조 및 기능에 큰 영향을 미치지 않으면서 치환될 수 있는 천연 또는 합성 아미노산일 수 있다. 종종, 많은 아미노산은 단백질의 기능에 해로운 영향을 끼치지 않으면서 보존적 아미노산으로 치환될 수 있다.
- [0248] 일반적으로, 비-극성 아미노산 Gly, Ala, Val, Ile 및 Leu; 비-극성 방향족 아미노산 Phe, Trp 및 Tyr; 중성 극성 아미노산 Ser, Thr, Cys, Gln, Asn 및 Met; 양전하를 띤 아미노산 Lys, Arg 및 His; 음전하를 띤 아미노산 Asp 및 Glu는 보존 적 아미노산의 그룹을 나타낸다. 이 목록은 완전한 것이 아니다. 예를 들어, Ala, Gly, Ser 및 때때로 Cys는 상이한 그룹에 속하더라도 서로를 대체할 수 있다는 것이 잘 알려져 있다.
- [0249] 치환 변이체는 항체 분자에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 및 그 자리에 삽입된 상이한 잔기를 갖는다. 치환 돌연변이 유발에 대한 가장 큰 목적 부위는 초가변 영역을 포함하나, FR 변형 또한 고려된다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 가져오는 경우, 바로 아래의 표에서 "예시적인 치환"으로 명명되거나, 아미노산 부류와 관련하여 하기에서 추가적으로 기술되는 바와 같이 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝할 수 있다.
- [0250] 잠재적인 아미노산 치환:

표 7

본래 잔기	바람직한 보존성 치환	예시적인 치환의 예
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Asp (D)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn, Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe

Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

- [0252] 항체의 생물학적 성질에 대한 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선형 형태 (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 다른 치환을 선택함으로써 달성된다.
- [0253] 보존적 아미노산 치환은 천연 아미노산에 한정되지 않고 합성 아미노산도 포함한다. 일반적으로 사용되는 합성 아미노산은 다양한 측쇄 길이의 오메가 아미노산과 중성 비-극성 유사체인 시클로헥실 알라닌; 중성 비-극성 유사체(analog)인 시트룰린 및 메티오닌 술폭시드, 방향족 중성 유사체인 페닐글리신; 음전하를 띤 유사체인 시스테인 산 및 양전하를 띤 아미노산 유사체인 오르니틴이다. 자연적으로 발생하는 아미노산과 마찬가지로, 이 목록은 포괄적인 것이 아니라, 당업계에 공지된 치환의 예시일 뿐이다.
- [0254] 본 발명의 항체는 본 발명의 항체에 대한 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질 감염시킴으로써 제조될 수 있다. 발현 벡터 또는 재조합 플라스미드는 숙주 세포에서의 복제 및 발현 및/또는 분비를 조절할 수 있는 통상적인 조절 제어 서열과 함께 작동적으로 항체에 대한 이러한 코딩 서열을 배치함으로써 제조된다. 조절 서열은 프로모터 서열, 예를 들어 CMV 프로모터 및 다른 공지된 항체로부터 유래될 수 있는 시그널 서열을 포함한다. 유사하게, 상보적 항체 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 DNA 서열을 갖는 제2 발현 벡터를 생산할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 제2 발현 벡터는 코딩 서열 및 선별 마커가 관련된 것을 제외하고는 제1 발현 벡터와 동일하므로 가능한 한 각 폴리펩타이드 측쇄가 기능적으로 발현되도록 보장한다. 대안적으로, 항체에 대한 중쇄 및 경쇄 코딩 서열은 단일 벡터 상에 존재할 수 있다.
- [0255] 선택된 숙주 세포는 재조합 또는 합성 경쇄 및 중쇄 모두를 포함하는 본 발명의 형질전환된 숙주 세포를 생성하기 위해 통상적인 기술에 의해 제1 및 제2 벡터 모두(또는 단일 벡터로 간단하게 형질전환)로 동시-형질전환된다. 이어서, 형질 전환된 세포를 통상적인 기술에 의해 배양하여 본 발명의 조작된 항체를 생산한다. 재조합 중쇄 및/또는 경쇄 모두의 결합을 포함하는 항체는 ELISA 또는 RIA와 같은 적절한 분석에 의해 배양물로부터 스크리닝된다. 유사한 통상적인 기술을 이용하여 다른 항체를 구축할 수 있다.
- [0256] 본 발명의 조성물의 방법 및 구축에 사용되는 클로닝 및 서브클로닝 단계에 적합한 벡터는 당업자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 클로닝 벡터의 통상적인 pUC 시리즈가 사용될 수 있다. 하나의 벡터, pUC19는 상업적으로 이용가능하다. 이러한 벡터의 구성, 예를 들면 레플리콘, 선별 유전자, 엔헨서, 프로모터, 시그널 서열 등은 상업적 또는 천연의 공급원으로부터 획득되거나 선택된 숙주에서 재조합 DNA의 생성물의 발현 및/또는 분비를 지시하는데 사용하기 위한 공지된 절차에 의해 합성될 수 있다. 또한, 포유 동물, 박테리아, 곤충, 효모 및 곰팡이 발현에 대해 당 업계에서 다수의 유형이 공지된 다른 적절한 발현 벡터를 이러한 목적을 위해 선택할 수 있다.
- [0257] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체의 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 세포주를 포함한다. 또한, 이들 클로닝 벡터의 클로닝 및 다른 조작에 유용한 숙주 세포는 통상적이다.
- [0258] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 숙주 세포 또는 세포주는 NS0, Sp2/0, CHO (예: DG44), COS, HEK, 섬유아세포 세포(예: 3T3) 및 골수종 세포와 같은 포유류 세포를 포함한다. 예를 들어 CHO 또는 골수종 세포에서 발현될 수 있다. 인간 세포가 사용될 수 있으며, 분자가 인간 글리코실화 패턴으로 변형될 수 있다. 대안적으로, 다른 원핵 세포 또는 진핵 세포주가 사용될 수 있다. 적합한 포유 동물 숙주 세포의 선택 및 형질 전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 생성물 생산 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0259] 본 발명에 따르면, 인간 CD269에 결합하여 중성화시키는 본 발명의 항 -CD269 항체의 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은 항체의 중쇄를 코딩하는 제1 벡터를 제공하는 단계; 항체의 경쇄를 코딩하는 제2 벡터를 제공하는 단계; 포유 동물 숙주 세포(예: CHO)를 상기 제1 및 제2 벡터로 형질전환시키는 단계; 상기 숙주 세포로부터 상기

배양 배지 내로 항체의 분비를 유도하는 조건 하에서 단계 (c)의 숙주 세포를 배양하는 단계; 단계 (d)의 분비된 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 일단 발현되면, 항체는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 목적하는 결합 특성에 대해 평가될 수 있다.

[0260] 본 발명은 본 명세서에 기술된 본 발명에 따른 항체를 포함하는 면역접합체(immunoconjugates)(상호 교환 가능하게 "항체-약물 접합체"또는 "ADC"로 지칭됨)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 화학치료제, 약물, 성장억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 세균, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위 원소(즉, 방사성 콘주게이트)와 같은 하나 이상의 세포 독성제에 접합된 항체를 포함한다. 치료제를 단백질, 특히 본 발명의 항-CD269 항체-약물 콘주게이트와 같은 항체에 접합시키는 기술은 잘 알려져 있다(예컨대, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld *et al.* eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (Robinson *et al.* eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera *et al.* eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin *et al.* eds., Academic Press, 1995); 및 Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58, PCT publication WO 89/12624 참고).

[0261] 전형적으로, ADC 또는 ADC 유도체는 치료제와 항-CD269 항체 또는 이의 유도체 사이의 링커 영역을 포함한다. 상술한 바와 같이, 전형적인 구현예에서, 링커는 세포 내 조건 하에서 절단 가능하여, 링커의 절단은 세포 내 환경에서 항체로부터 치료제를 방출한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 링커는 세포 내 환경(예를 들어, 리소좀 또는 엔도솜 또는 카베올라)에 존재하는 절단제에 의해 절단 가능하다. 링커는 예를 들어 세포 내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있으며, 리소좀 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다른 구현예에서, 절단 가능한 링커는 pH 민감성, 즉 특정 pH 값에서 가수 분해에 민감하다. 전형적으로, pH-민감성 링커는 산성 조건 하에서 가수 분해 가능하다. 또 다른 구현예에서, 링커는 환원 조건(예를 들어, 디설파이드 링커) 하에서 절단 가능하다. 다양한 디설파이드 링커가 당업계에 공지되어있다(예를 들어 Wawrzynczak *et al.*, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987., 미국 특허 4,880,935. 참조)).

[0262] 전형적으로, 링커는 세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않다. 상호 배타적이지 않은 다른 구현예에서, 링커는 세포 내재화를 촉진시킨다. 특정 구현예에서, 링커는 치료제에 접합될 때(즉, 본 명세서에 기재된 바와 같은 ADC 또는 ADC 유도체의 링커-치료제 모이어티의 환경에서) 세포 내재화를 촉진시킨다. 또 다른 구현예에서, 링커는 치료제 및 항-CD269 항체 또는 이의 유도체(즉, 본 명세서에 기재된 바와 같은 ADC 또는 ADC 유도체의 환경)에 접합될 때 세포 내재화를 촉진시킨다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있는 다양한 링커는 2003년 7월 31일자로 출원된 "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease"라는 명칭의 WO 2004010957 및 2002년 7월 31일자로 출원된 "Drug Conjugates and their use for treating cancer, an autoimmune disease or an infectious disease"라는 명칭의 미국 특허 가출원 제60/400,403호(이의 개시 내용은 본 명세서에 참고로 인용)에 개시되어 있다.

[0263] 특정 구현예에서, 면역 접합체는 본 명세서에 기재된 항체를 포함하며, 항체 및 화학 요법제 또는 다른 독소를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 사용 가능한 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (*Pseudomonas aeruginosa* 유래), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르킨, 알레우리테스 포르디(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 차란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 커신(curcin), 크로틴(crotonin), 사파오나리아 오피시나리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌(gelonin), 미토겔린(mitogellin), 레스트리톡신(restrictocin), 페노미신(phenomycin), 에노미신(enomycin) 및 트리코테센(tricothecenes)을 포함한다. 방사성콘주게이션된 항체를 생산하기 위해 다양한 방사성 핵종이 사용될 수 있다.

[0264] 또한, 본 발명의 항체 또는 그의 단편은 하나 이상의 독소에 접합될 수 있으며, 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 오로스타틴, 트리코테센 및 CC1065 및, 독소 활성을 갖는 이러한 독소들의 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 세포 독성제는 MMAF(dovaline-valine-dolaisoleunine-dolaproine-phenylalanine) 및 MMAE(monomethyl auristatin E) 뿐만 아니라 MMAE의 에스테르 형태를 포함하는 아우리스타틴(auristatin),

DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 마이너 그루브 알킬레이팅제, 렉시트로신, 듀오카르미신, 파클리탁셀 및 도세탁셀을 포함하는 탁산, 푸로마이신, 돌라스타틴, 메이탄시노이드 및 빈카 알칼로이드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 세포 독성제는 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 돌라스타틴-10, 에키노미신, 콤브레타스타틴, 칼리케아미신, 메이탄신, DM-1, DM-4, 네트롭신을 포함한다. 다른 적합한 세포 독성제는 아우리스타틴, 빈카 알칼로이드, 포도필록톡신, 탁산, 바카틴 유도체, 크립토익신, 메이탄시노이드, 콤브레타스타틴 또는 돌라스타틴과 같은 항-튜불린제를 포함한다. 항튜불린(Antitubulin)제는 AFP(dimethylvaline-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine-p-phenylenediamine), MMAF, MMAE, 아우리스타틴 E, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈, VP-16, 캄토테신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에포틸론 A, 에포틸론 B, 노코다졸, 콜키친, 콜시미드, 에스트라무스틴, 세마도틴, 디스코더몰리드, 메이탄신, DM-1, DM-4 또는 엘루테로박을 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, 면역 접합체는 돌라스타틴 또는 돌로스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴 (미국 특허 5,635,483; 5,780,588)에 접합된 항체를 포함한다. 돌라스타틴과 아우리스타틴은 미세소관 동역학, GTP 가수 분해 및 핵 및 세포 분열을 방해하고(Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) 항암(미국 특허 5,663,149) 및 항진균 활성(Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)을 갖는 것으로 나타났다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴(돌라스타틴의 펜타펩티드 유도체) 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N(아미노) 말단 또는 C(카복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다(WO 02/088172). 예시적인 아우리스타틴의 구현예는 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," 미국 출원 제7,498,298호에 개시된 N-말단 연결 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 약어 "MMAE"는 모노메틸 아우리스타틴 E를 나타낸다. 본 명세서에서 사용된 약어 "MMAF"는 도발린-발린-돌라이소류인-돌라프로인-페닐알라닌을 나타낸다.

[0266] 전형적으로, 펩티드-기반 약물 모이어티는 2 개 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편 사이에 펩타이드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩타이드 결합은 예를 들면, 펩타이드 화학 분야에 잘 알려진 액상 합성법(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press 참조)에 따라 제조될 수 있다.

[0267] 메이탄시노이드는 본 발명에 따른 항체 또는 그의 단편에 결합된 활성제로서 사용될 수 있다. 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사 분열 억제제이다. 메이탄신은 동 아프리카 관목인 메이테너스 세라타(Maytenus serrata)로부터 처음으로 분리되었다(미국 특허 3,896,111). 이어서, 또한, 특정 미생물이 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르와 같은 메이탄시노이드를 생성한다는 것이 밝혀졌다(미국 특허 4,151,042). 고도의 세포 독성 메이탄시노이드 약물은 액티노신네마와 같은 미생물의 발효에 의해 생산된 안사미토신 전구체로부터 제조될 수 있다. 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 현저하게 감소시키지 않고 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 결합시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,208,020 호를 참고한다. 평균 항체 분자 당 3-4 개의 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 표적 세포의 세포 독성을 증가시키는 효능을 나타내지만 독소/항체의 한 분자조차도 네이키드 항체의 사용보다 세포 독성을 증가시키는 것으로 기대된다. 메이탄시노이드는 당업계에서 잘 공지되어 있으며, 공지된 기술에 의해 합성되거나 천연 원료로부터 분리될 수 있다.

[0268] 칼리케아미신 계열의 항생제의 선택된 예는 본 발명에 따른 항체 또는 그의 단편에 결합된 활성제로서 사용될 수 있다. 칼리케아미신 계열의 항생제는 피코몰(picomolar) 이하의 농도에서 이중-가닥 DNA 절단을 일으킬 수 있다. 칼리케아미신 계열의 콘주게이트의 제조에 대해서는, 미국 출원 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296을 참고한다. 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항염산제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA 모두는 세포 내 작용 부위를 가지고 있으며 세포막을 쉽게 가로지르지 않는다. 따라서, 항체 매개 내재화를 통한 이들 약제의 세포 내 흡수는 세포 독성 효과를 크게 향상시킨다.

[0269] 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조이신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실을 포함하며, 제제의 계열은 중합적으로 미국 특허 제 5,053,394 호, 제 5,770,710 호에 개시된 LL-E33288 복합체뿐만 아니라 에스페라미신(미국 특허 제 5,877,296 호)으로 알려져 있다. 본 발명은 핵산 분해 활성을 갖는 항체 및 화합물(예: 리보뉴클레아제 또는 디옥시리보뉴클레아제; DNase와 같은 DNA 엔도뉴클레아제) 사이에 형성된 면역 접합체를 추가로 고려한다. 종양의 선택적 파괴를 위해, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다.

[0270] 본 발명의 의미에서 약학적으로 허용가능한 담체는 본 발명의 항체의 생물학적 활성의 유효성에 유해한 의미로

유의하게 간섭하지 않는 임의의 비-독성 물질 일 수 있다. 분명하게, 담체의 특성은 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 이러한 조성물은 활성 물질 및 담체 이외에, 당업계에 잘 공지된 희석제, 충전제, 염, 완충액, 안정화제, 가용화제 및 다른 물질을 함유할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제 및 담체 용액의 제형은 당업계의 숙련가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 경구, 비경구, 정맥 내, 비강 내 및 근육 내 투여 및 제형이 포함된다.

[0271] 활성 성분(항체 또는 항체 단편)을 함유하는, 약학적 조성물로도 공지된 약제는 경구용에 적합한 형태, 예를 들어 정제, 트로키제, 로젠지제, 수성 또는 유성 현탁제, 분산성 분말 또는 과립제, 유제, 경질 또는 연질 캡슐 또는 시럽 또는 엘릭서일 수 있다. 경구용 조성물은 약학 조성물의 제조를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있으며, 이러한 조성물은 감미제, 향료, 착색제 및 보존제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 제제를 함유하여 약학적으로 풍미있고 맛이 좋은 제제를 제공할 수 있다. 정제는 활성 성분을 정제의 제조에 적합한 약제학적으로 허용가능한 무독성 부형제와의 혼합물 형태로 함유한다. 이러한 부형제는 예를 들어, 탄산 칼슘, 탄산나트륨, 락토오스, 인산 칼슘 또는 인산 나트륨과 같은 불활성 희석제; 과립화제 및 봉해제, 예를 들어 옥수수 전분 또는 알긴산; 전분, 젤라틴 또는 아카시아와 같은 결합제 및 예를 들어 마그네슘 스테아레이트, 스테아르 산 또는 탈크와 같은 윤활제일 수 있다. 정제는 코팅되지 않거나 위장관에서의 봉해 및 흡수를 지연시켜 장기간에 걸쳐 지속적인 작용을 제공하는 공지된 기술로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스 테아레이트와 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다. 또한, 이들은 코팅될 수 있다. 또한, 본 발명은 국소 투여, 경구 섭취, 흡입 또는 피부, 피하 또는 정맥 내 주사를 위한 약학적 조성물에 관한 것이다. 당업자는 특정 적용 형태에 요구되는 담체 및 첨가제에 대해 알고 있다.

[0272] 본 발명의 활성 물질(항체 또는 항체 단편)의 치료학적 유효량이 정맥 내, 피부 또는 피하 주사에 의해 투여되는 경우, 활성 물질은 발열원이 없는 비경구적으로 허용가능한 수용액의 형태일 수 있다.

[0273] 또한, 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 의학적 장애가 있는 대상의 치료에서 본 명세서에 기재된 항체의 치료학적으로 관련된 양의 투여에 관한 것이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료학적 유효량"은 의미있는 환자 이점을 나타내기에 충분한 약학적 조성물 또는 방법의 각 활성 성분의 총량을 의미한다. 본 발명의 약학적 조성물 중의 활성 물질의 양은 치료되는 상태의 성질 및 중증도 및 환자가 겪은 선행 치료의 성질에 좌우될 것이다. 최적의 치료 효과가 환자에게 얻어질 때까지 더 많은 투여량을 투여할 수 있으며, 그 시점에서 투여량은 더 이상 증가하지 않는다.

[0274] pH, 등장성, 안정성 등과 관련하여 이러한 비경구적으로 허용가능한 용액의 제조는 당업계의 기술 범위 내에 있다. 정맥 내, 피부 또는 피하 주사를 위한 바람직한 약학적 조성물은 활성 물질 이외에 염화나트륨 주사, 링거 주사, 텍스트로스 주사, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사, 락테이트 링거 주사 또는 당업계에 공지된 다른 비히클과 같은 등장성 비히클을 함유해야 한다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 안정화제, 방부제, 완충제, 항산화제 또는 당업자에게 공지된 다른 첨가제를 함유할 수 있다.

[0275] 투여된 항체의 투여량은 항체의 화학적 성질 및 약학적 제형, 및 환자의 체중, 신체 표면, 연령 및 성별뿐만 아니라 투여 시간 및 경로와 같은 당업계에 잘 알려진 많은 요인들에 따라 명백하게 달라진다. 성인의 경우, 투여량은 전형적으로 1 일당 0.001 μg 내지 1 g, 바람직하게는 1 일당 0.1 μg 내지 100 mg, 보다 바람직하게는 1 일당 1 μg 내지 100 mg, 보다 더욱 바람직하게는 1 일당 5 μg 내지 10 mg일 수 있다. 연속 주입에서, 투여량은 전형적으로 0.01 μg 내지 100 mg, 바람직하게는 분당 체중 kg당 1 μg 내지 10 mg일 수 있다.

[0276] 본 발명의 또 다른 양태에서, 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 비-분비성 다발성 골수종, 불투수 다발성 골수종, 불명확한 단일 클론성 간질병증 (MGUS), 고형 세포질 종양 (Bone, Extramedullar), 림프성 전흉성 림프종 (LPL), 발덴스트룀 거대글로불린혈증, 형질세포 백혈병, 원발아밀로이드증(AL), 중쇄 질환, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), POEMS 증후군/골경화성 골수종, I 형 및 II 형 저온글로불린혈증, 경쇄 증식성 질환, 굿파스처 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반병(ITP), 급성 사구체 신염, 천포창 및 유천포창 질환 및 수포성 표피박리증; 또는 임의의 비호지킨 림프종 B-세포 백혈병 또는 BCMA가 발현되는 비호지킨 림프종(HL) 또는 환자가 재조합 단백질 대체 요법에 대한 중화 항체를 발생시키는 임의의 질환으로부터 선택된 B 세포 매개 또는 혈장 세포 매개 질환 또는 항체 매개 질환 또는 장애의 치료를 위한 용도로 본 명세서에 개시된 본 발명에 따른 항체를 제공하며, 상기 방법은 상기 환자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0277] B 세포 장애는 B-세포 발달/면역글로불린 생산(면역 결핍) 및 과도한/통제되지 않는 증식(림프종, 백혈병)으로 나눌 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, B-세포 장애는 두 유형의 질환을 모두 지칭하며, B-세포 장애를

항체로 치료하는 방법이 제공된다.

[0278]

본 발명의 일 양태에서 상기 질환은 다발성 골수종이다.

[0279]

또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 질환 및 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서 본 명세서에 기재된 항체의 용도가 제공된다.

[0280]

예를 들어, 본 발명의 일 양태에서, BCMA 및 리간드 BAFF 및 APRIL 사이의 상호 작용의 조절(예를 들어, 억제 또는 차단)에 반응하는 질환 및 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 항체의 용도가 제공된다.

[0281]

본 발명의 한 구현예에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 호지킨 림프종과 같은 B 림프구 암의 치료에 사용하기 위한 것이다.

[0282]

본 발명의 한 구현예에서, 단리된 항체 또는 항체 단편은 자가 면역 질환, 예컨대 염증과 관련된 의학적 장애, 바람직하게는 염증 성분과 함께 자가 면역 질환의 치료에 사용하기 위한 것이며, 이에 따라 자가 면역 질환은 다카야스 동맥염, 거대 세포 동맥염, 가족 지중해 열, 카와사키 병, 결절성 다발 동맥염, 결절성 다발 동맥염, 간염 관련 동맥염, 베체트 증후군, 베케너 육아 종증, ANCA- 혈관염, 척 슈트라우스 증후군, 미세 다발성 혈관염, 결합 조직 질환 혈관염, 헤노흐-췌라인 자반병, 저온글로불린 혈관염, 피부 백혈구 파괴 혈관염, 열대성 대 동맥염, 유육종증, 코간 증후군, 비스코트-올드리치 증후군, 나종성 동맥염, CNS의 일차 맥관염, 폐색전 혈전혈관염, 방종양성 동맥염, 두드러기, Dego 질병, 골수이형성 증후군, 류마티스 관절염, 죽상 동맥 경화증, 아밀로이드증, 모르부스 크론, 궤양성 직장염, 자가 면역 근염, 당뇨병, 다발성 경화증, 길랑-바레 증후군, 조직구 증후군, 골관절염, 골관절염, 골관절염, 폐색성 섬유증, 사구체 신염, 위 실독증, 스틸 병, 결절 홍반, 이염, 저온글로불린 혈증, 쇼그렌 증후군, 루푸스 홍반, 재생 불량성 빈혈, 골수 섬유성 섬유증, 만성 염증성 탈수 초성 다발성 신경 병증, 만성 염증성 탈수 초성 다발성 신경 병증, 만성 육아 종성 질환, 특발성 무수경증, 블레오마이신 유발 폐 염증, 시타라빈 유발 폐 염증, 자가 면역 혈소판 감소증, 자가 면역 혈소판 감소증, 자가 면역 적혈구 감소증, 자가 면역 적혈구 감소증, 샤가스 병, 만성 자가 면역 질환, 자가 면역성 간염, 하시모토 갑상선염, 낙진 갑상선염, 그레이브스 병, 자가 면역 증후군, 자가 면역성 에디슨 증후군, 심상성 천포창, 낙엽성 천포창, 포진 피부염, 자가 면역 탈모증, 백반, 항인지질 증후군, 중증 근무력증, 강직인간 증후군, 굿파스처 증후군, 교감성 안염, 모세 혈관염, 샤프 증후군 및/또는 에반스 증후군, 특히 건초열, 치주염, 죽상 동맥 경화증, 류마티스성 관절염, 바람직하게는 류마티스성 관절염 또는 다발성 경화증으로부터 선택된다.

[0283]

서열

[0284]

본 발명의 바람직한 항체 서열:

표 8

[0285]

서열 번호	서열	설명
서열 번호 1	<u>QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRAPGKGLEWIGEINPD</u> <u>SSTINYAPSLKDKFIISRDNKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYDYGDAMD</u> <u>YWGQGTSTVTVSS</u>	HC (VH) 마우스
서열 번호 2	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYWMWVRQAPGKLEWVGEINPD</u> <u>SSTINYAPSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMD</u> <u>YWGQGTSTVTVSS</u>	HC 부분 인간화
서열 번호 3	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGEINPD</u> <u>SSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMD</u> <u>YWGQGTSTVTVSS</u>	hHC01
서열 번호 4	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW</u> <u>X₁</u> <u>SWVRQAPGKGLVWVGEINP</u> <u>X₂X₃STINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u> <u>X₄DYGD</u> <u>AX₅DYWGQGTSTVTVSS</u> 상기에서 X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게는 I 또는 F; X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게는 SS; X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게는 Y; 및/또는 X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y	hHC02

서열 번호 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYX ₁ MX ₂ WVRQAPGKGLVX ₃ VGX ₄ I NPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASX ₅ X ₆ X ₇ DY GD X₈ MDYWGQGTLLTVSS 상기에서 X ₁ : W, F, Y, 바람직하게는 W; X ₂ : S, T, N, Q, D, E, 바람직하게는 S; X ₃ : W, F, Y, 바람직하게는 W; X ₄ : E, Q, 바람직하게는 E; X ₅ : L, I, V, G, A, 바람직하게는 L; X ₆ : Y, X, 바람직하게는 Y; X ₇ : Y, F, L, I, V, M, 바람직하게는 Y; 및/또는 X ₈ : A, G, V, 바람직하게는 A	hHC03
서열 번호 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPN SSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYD YWGQGTLLTVSS	hHC04
서열 번호 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPN SSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYD YWGQGTLLTVSS	hHC05
서열 번호 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYD YWGQGTLLTVSS	hHC06
서열 번호 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAYD YWGQGTLLTVSS	hHC07
서열 번호 43	DIVMTQSQRFTTSVGDVRVSTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFSASLR FSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	LC (VL) 마우스
서열 번호 10	DIVMTQSPATLSVSGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIYSDDLRL FSGVPARFSGSGSGTDFTLTISNLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	LC 부분 인간화
서열 번호 11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLR FSGIPARFSGSGSGTEFTLTISNLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hLC01
서열 번호 12	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVX ₁ X ₂ NVWYQQKPGQAPRALIYSASL RFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISNLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR R 상기에서: X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게는 ES.	hLC02

서열 번호 13	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVDA X₁ X₂ VX₃ W X₄ QKPGQAPRALI X₅ X₆ A X₇ X₈ RX₉ SGIPARFSGS X₁₀ X₁₁ GTEFTLTISLQSEDFAVYYCA X₁₂ QX₁₃ NNX₁₄ PX₁₅ TFGAGTKLELKR 상기에서: X ₁ : S, H, T, N, D, Q; X ₂ : N, E, Q; X ₃ : A, G, V, S, T, L, I; X ₄ : Y, F, L, I, V, A, G; X ₅ : Y, F, L; X ₆ : S, T; X ₇ : S, T, D, N, H, E, Q; X ₈ : L, V, I, M; X ₉ : F, L, I, V, Y, M; X ₁₀ : G, X; X ₁₁ : S, X; X ₁₂ : Q, V, L, I, M; X ₁₃ : Y, F, L, I, Q; X ₁₄ : Y, F, R, Q, K; 및/또는 X ₁₅ : L, I, V, F	hLC03
서열 번호 14	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLR FSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNYPLTFGAGTKLELKR	hLC04
서열 번호 15	RYW X₁ S 상기에서: X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, 바람직하게는 I 또는 F	H-CDR1 PTM
서열 번호 16	EINP X₂ X₃ STINYAPSLKDK 상기에서: X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, 바람직하게는 SS	H-CDR2 PTM
서열 번호 17	SLY X₄ DYGD X₅ DYW 상기에서: X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, 바람직하게는 Y; 및/또는 X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, 바람직하게는 Y	H-CDR3 PTM
서열 번호 18	RYWIS	H-CDR1 PTM a
서열 번호 19	RYW F S	H-CDR1 PTM b
서열 번호 20	EINPNSSTINYAPSLKDK	H-CDR2 PTM a
서열 번호 21	EINP S SSTINYAPSLKDK	H-CDR2 PTM b
서열 번호 22	SLYDYGD A YDYW	H-CDR3 PTM a
서열 번호 23	KASQSV X₁ X₂ NVA 상기에서: X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, 바람직하게는 ES	L-CDR1 PTM
서열 번호 24	SASLRFS	L-CDR2 PTM
서열 번호 25	QYNNYPLTFG	L-CDR3 PTM
서열 번호 26	KASQSVDSNVA	L-CDR1 PTM a
서열 번호 27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWGEINPD SSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDAMD YWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNYHQKSLSPGK	전장 인간화(Full length humanized) HC

서열 번호 28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDYD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSPGK	PTM 돌연변이 1 (FSY)이 있는 전장 인간화(Full length humanized) HC
서열 번호 29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPS SSTINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYDYGDYD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSPGK	PTM 돌연변이 2 (ISY)가 있는 전장 인간화(Full length humanized) HC
서열 번호 30	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCAKSQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLR FSGIPARFSGSGSGTEFTLTITSSSLQSEDFAVYYCQYNNYPLTFGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	전장 인간화(Full length humanized) LC
서열 번호 31	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCAKSQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLR FSGIPARFSGSGSGTEFTLTITSSSLQSEDFAVYYCQYNNYPLTFGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	PTM 돌연변이가 있는 전 장 인간화(Full length humanized) LC

[0286] 바람직한 뉴클레오티드 서열

표 9

[0287]

서열 번호 32	AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGAGAGAGCAATGGGCAGCCGAGA ACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCCTCCCGGTAATGAGTGCGACGCGCGGGCGGCGGCGGCGGATCC	전장 인간화(Full length humanized) HC
서열 번호 33	AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGAGAGAGCAATGGGCAGCCGAGA ACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCCTCCCGGTAATGAGTGCGACGCGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGATCC	PTM 돌연변이 1이 있는 전장 인간화(Full length humanized) HC
서열 번호 34	AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGAGAGAGCAATGGGCAGCCGAGA ACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT ATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCCTCCCGGTAATGAGTGCGACGCGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGATCC	PTM 돌연변이 2가 있는 전장 인간화(Full length humanized) HC

서열 번호 35	GAATTCCACCATGGGATGGtATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC CGGTGTACACTCCGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACCCTGAGCGTTTC TCCCGGTGAAAGGGCCACACTCAGCTGCAAAGCCTCTCAAAGCGTGACAGCAA TGTCGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAAGCTCCGAGAGCACTGATCTATTC CGCGTCATTGCGCTTTTCCGGCATACCAGCACGGTTTGTAGTGGCTCAGGAGTGG GACTGAGTTCACTCTGACGATTAGTCCCTTCAGTCAGAGGATTTCGCCGTGTA CTACTGTGACAGTACAACAATATCCCTCACATTCCGAGCTGGAACCAAGCT GGAAGTGAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTAGGGATCC	전장 인간화(Full length humanized) LC
서열 번호 36	GAATTCCACCATGGGATGGtATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC CGGTGTACACTCCGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTACCCTGAGCGTTTC TCCCGGTGAAAGGGCCACACTCAGCTGCAAAGCCTCTCAAAGCGTGAGAGCAA TGTCGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAAGCTCCGAGAGCACTGATCTATTC CGCGTCATTGCGCTTTTCCGGCATACCAGCACGGTTTGTAGTGGCTCAGGAGTGG GACTGAGTTCACTCTGACGATTAGTCCCTTCAGTCAGAGGATTTCGCCGTGTA CTACTGTGACAGTACAACAATATCCCTCACATTCCGAGCTGGAACCAAGCT GGAAGTGAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTAGGGATCC	PTM 돌연변이가 있는 전장 인간화(Full length humanized) LC

[0288] CD269(BCMA)에 관한 본 발명의 바람직한 서열:

표 10

서열 번호	서열	설명
서열 번호 37	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLRDEGDKWRNKKFELGLEFPN LPYYIDGVKLQSMALIRYIADKHNMLGGCPKERAELSMLEGAVALDIRYGVS IAYSKDFETLKVDFLSKLPMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVV LYMDPMCLDAFPLKLCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHP PKSDLVPRGSMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASVTN SVKGTNALEHHHHHHH	GST-BCMA-His
서열 번호 38	MAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALE	BCMA 세포외 도메인 (extracellular domain)
서열 번호 39	MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTNPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALE	BCMA N-말단(terminus) 서열
서열 번호 40	YFDSLHACIPCQLRCSST	BCMA 항체 에피토프 (epitope) - BCMA의 아미노산 13 내지 32

[0290] 인간화 서열 변형을 포함하는 바람직한 일반화된 아미노산 서열:

표 11

서열 번호	서열	설명
서열 번호 41	X ₁ VQLX ₂ X ₃ SGGGLVQPGGSLX ₄ LSCAASGX ₅ X ₆ FX ₇ X ₈ YWZ ₁ SWVRX ₉ APGKGLEW X ₁₀ GEINPZ ₂ SSTINYAPSLKX ₁₁ X ₁₂ FX ₁₃ ISRDNKNTLYLQMX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ RX ₁₇ EDT AX ₁₈ YYCASLYYDYGDZ ₃ DYWGQGTGX ₁₉ VTVSS 상기에서 X ₁ : Q, E; X ₂ : Q, V; X ₃ : Q, E; X ₄ : K, R; X ₅ : I, F; X ₆ : D, T; X ₇ : S, D; X ₈ : R, D; X ₉ : R, Q; X ₁₀ : I, V; X ₁₁ : D, G; X ₁₂ : K, R; X ₁₃ : I, T; X ₁₄ : S, N; X ₁₅ : K, S; X ₁₆ : V, L; X ₁₇ : S, A; X ₁₈ : L, V; X ₁₉ : S, L; and 상기에서 at least one of Z ₁ : I 또는 F; Z ₂ : S 및/또는 Z ₃ : Y.	PTM 결실 변형을 포함하는 인간화 HC에 대한 일반적 서열(General sequence)

서열 번호 42	DIVMTQSSX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ SVGD ₇ VX ₈ X ₉ TCKASQSVESNVAWYQQKPX ₁₀ QX ₁₁ PKX ₁₂ LIX ₁₃ SX ₁₄ X ₁₅ LRFSGVPARFX ₁₆ GSGSGTDFTLTISX ₁₇ LQSED ₁₈ AX ₁₉ YX ₂₀ CQ QYNNYPLTFGAGTKLELKR 상기에서 X1: Q, P; X2: R, A; X3: F, T; X4: M, L; X5: T, S; X6: T, V; X7: R, E; X8: S, T; X9: V, L; X10: R, G; X11: S, A; X12: A, L; X13: F, Y; X14: A, D; X15: S, D; X16: T, S; X17: N, S; X18: L, F; X19: E, V; X20: F, Y	PTM 결실 변형을 포함하는 인간화 LC에 대한 일반적인 서열(General sequence)
----------	--	--

[0292]

실시예

[0293]

본 발명은 본 명세서에 개시된 실시예에 의해 입증된다. 본 명세서에 제공된 실시예는 본 발명의 특정 실시 양태만을 나타내며 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다. 실시예는 하나 이상의 비-한정적인 구현예의 기술적인 지지를 향상시킬 수 있는 바람직한 구현예의 추가 설명을 제공하는 것으로 고려되어야 한다.

[0294]

항체-에피토프 복합체의 결정화 및 시험관내 및 생체내 항-종양 효과에 관한 실시예는 오리지널 키메라 항체 J22.9-xi를 사용하여 실시하였으나, 본 발명자들은 시험된 오리지널 키메라 항체와 비교하여 인간화된 변이체에서의 결합 특성의 유지로 인해, 이러한 기술적 효과가 본 발명의 인간화 변이체에서 유지된다고 주장한다. 따라서, 키메라 항체로부터 제공되는 데이터는 참조 물질로서 제공되고 청구된 인간 변이체의 산업적 이용가능성 및 유용성을 나타낸다. 예비 생물학적 데이터는 J22.9-xi와 인간화된 변이체 간의 유사한 효과를 나타낸다.

[0295]

J22.9-xi 및 BCMA 상호 작용의 결합 및 차단 특성

[0296]

새로운 키메라 항체(J22.9-xi)는 인간 CD269(BCMA, TNFRSF17)의 세포외 도메인에 결합한다. 이는 처음에 인간 다발성 골수종 세포주 MM.1S에서 ELISA 및 유동 세포 계측법으로 확인되었다(도 1a, b). BCMA에 대한 J22.9-xi의 친화성은 SPR(surface plasmon resonance)을 사용하여 결정되었다. 도 1c에 나타난 바와 같이, 평균 Kd는 54 pM이다.

[0297]

BCMA는 이의 리간드 BAFF 및/또는 APRIL과의 상호 작용을 통해 생체 내 다발성 골수종 및 형질 세포의 생존에 중요한 신호를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Mackay F et al. (2003) Annu Rev Immunol 21:231-264). 따라서, 시험관내 차단 분석은 인간 BCMA의 세포외 도메인 및 재조합 BAFF로 실시되었다. J22.9-xi와 BCMA의 결합은 수용체와 이의 리간드 BAFF 사이의 상호 작용을 분명하게 차단한다. J22.9-xi 대신 아이소타입(isotype) 대조군 항체를 사용하는 경우, BCMA에 결합하는 재조합 BAFF는 영향을 받지 않는다(도 1d).

[0298]

J22.9-xi-Fab-BCMA-복합체의 결정 구조는 BCMA와의 광범위한 결합 인터페이스를 나타낸다

[0299]

J22.9-xi로부터 제조된 Fab 단편은 정제된 46 아미노산 잔기 BCMA 세포외 도메인과 복합체로 결정화되고 복합체 구조는 1.9 옹스트롬 분해능(angstrom resolution)으로 설명되었다. 고품질의 전자 밀도(High quality electron density)는 BCMA의 잔기 6에서 41까지 관찰가능하며 주로 항체의 경쇄와 함께 J22.9-xi와의 광범위한 상호 작용을 보여준다(도 2B). 740.4 스퀘어(square) 옹스트롬을 포함하고 BCMA 잔기 중 3 분의 1을 포함하는 이러한 인터페이스는, 보존된 DxL 모티프를 포함하여 APRIL 및 sTALL1(BAFF라고도 함)과 BCMA 복합체의 결정 구조에서 관찰된 동일한 에피토프 16개 중 12 개를 포함하고(Gordon N C, et al. (2003), BAFF/BlysS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. Biochemistry 42(20): 5977-83, and Patel D R, et al. (2004), Engineering an APRIL-specific B Cell Maturation Antigen. JBC 279(16): 16727-35), BAFF로 시험관내 분석에서 보인 차단 효과의 명확한 합리화를 제공한다(도 2A). J22.9-xi와의 상호 작용은 BCMA에서 Ala20 및 Pro23과의 직접 측쇄 접촉, BAFF 및 APRIL에 의해 덮인 결합 에피토프의 일부가 아닌 잔기 및 몇몇 수-매개 수소 결합을 추가로 포함한다. 3 가지 구조 모두에 있어서 BCMA의 전체 형태는 J22.9-xi 및 APRIL 복합체 사이에서 1.4 옹스트롬의 C-알파(alpha) rmsd이고 J22.9-xi 및 sTALL1 복합체 사이에서 1.5 옹스트롬의 C-알파(alpha) rmsd으로 매우 유사하다. J22.9-xi BCMA 결합 에피토프(잔기 13-30)에 대한 각각의 C-알파 rmsd는 0.98 및 0.88 옹스트롬이다. 그것의 코어에 DxL 모티프를 갖는 동일한 BCMA 에피토프를 인식하지만, J22.9-xi의 결합 부위는 sTALL1 및 APRIL의 결합 부위와 매우 다르며, 인터페이스를 포함하는 상호 작용의 획득도 마찬가지다.

[0300]

도 2B 및 표 1 및 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, J22.9-xi로부터 19 개 아미노산(중쇄로부터 6 개(표 1), 경쇄로부터 13 개(표 2))이 CD269의 세포외 도메인으로부터 12 개 잔기에 직접 결합한다.

[0301]

표 1: J22.9-xi 중쇄 및 BCMA 간의 아미노산 상호 작용 목록. 이러한 상호 작용 목록은 소프트웨어 PDBsum을 사

용하여 제작하였다(Laskowski R A (2009)).

표 1

[0302]

중쇄(Heavy chain)		CD269
Trp33	>	His19
Glu50	>	His19
Leu99	>	Leu17
	>	Leu18
Tyr100		Leu18
Tyr101	>	Ala20
	>	Ile22
	>	Pro23
Ala106	>	Leu18

[0303]

표 2: J22.9-xi 경쇄 및 BCMA 간의 아미노산 상호 작용 목록. 이러한 상호 작용 목록은 소프트웨어 PDBsum을 사용하여 제작하였다(Laskowski R A (2009)).

표 2

[0304]

경쇄(Light chain)		CD269
Ser31	>	Arg27
		Thr32
Ala34	>	Leu17
Tyr36	>	Leu17
Phe49	>	Leu18
		Asp15
Ser50	>	Tyr13
		Asp15
		Arg27
Ser52	>	Arg27
Ser67	>	Thr32
Leu53	>	Tyr13
		Leu26
		Arg27
Phe55	>	Leu18
Gln89	>	Leu17
Tyr91	>	Asp15
		Ser16
		Leu17
Tyr94	>	His19
Leu96	>	Leu17

[0305]

표 3: CD269:APRIL 및 CD269:BAFF 결합에 관련된 잔기의 상호 작용 목록 (J22.9에 직접 접촉하지 않은 잔기는 밑줄로 표시한다). 이러한 상호 작용 목록은 소프트웨어 PDBsum을 사용하여 제작하였다(Laskowski R A (2009)).

표 3

[0306]

APRIL	CD269
Asp121	<u>Leu35</u>
Asp123	<u>Pro33</u>
	<u>Pro34</u>

	Leu35
Asp164	Asn31
Thr166	Arg27
	Ser30
Phe167	Tyr13
	Leu18
	Ile22
	Leu26
	Arg27
	Asn31
Thr168	Leu18
	Leu26
Met169	Leu17
Gly170	Leu17
	His19
Gln171	Leu17
Arg186	Leu17
	Leu18
	His19
Cys187	Leu17
Ile188	Asp15
	Leu17
	Leu18
Asp196	Leu26
Arg197	Leu26
Tyr199	Leu18
Pro221	Leu17
	His19
Arg222	Asp15
	Leu17
	Arg27
Asn224	Thr32
Lys226	Asn31
His232	His19
<u>BAFF</u>	<u>CD269</u>
Tyr22	Ser16
Asp62	Asn31
Lys63	Ser30
	Asn31
Thr64	Arg27
	Ser30
	Asn31
Tyr65	Tyr13
	Asp15
	Leu18
	Ile22
Ala66	Leu17
Met67	Leu17
Gly68	Leu17
Arg90	Leu17
	His19
Cys91	Leu17
Ile92	Leu17
	Leu18
Glu97	Ser29

	Ser30
	Asn31
Leu99	Ile22
	Leu26
Asn101	Leu18
Pro123	Ser16
	Leu17
Arg124	Tyr13
	Asp15
	Leu17
	Arg27
Glu125	Arg27
	Thr25
	Pro34
	Leu35
Asn126	Thr32
Asp132	His19

[0307] 표 4: J22.9, APRIL 및/또는 BAFF의 직접 접촉에 의해 결합된 CD269 표적의 잔기. J22.9에 의해서만 직접 접촉된 CD269 표적의 잔기는 밑줄로 표시한다(20, 23). J22.9에 의해서 직접 접촉되지 않는 CD269 표적의 잔기는 굵은 글씨체이다(APRIL은 30, 31, 33, 34, 35; BAFF는 25, 29, 30, 31, 34, 35).

표 4

J22.9: 13, 15, 16, 17, 18, 19, <u>20</u> , 22, <u>23</u> , 26, 27, 32
APRIL: 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30 , 31 , 32, 33 , 34 , 35
BAFF: 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30 , 31 , 32, 34 , 35

[0308]

[0309] 표 5: J22.9 물(water) 상호 작용(J22.9-xi:H2O:CD269). 표 5의 데이터는 소프트웨어 LigPlot(Wallace and Laskowski, European Bioinformatics Institute)을 사용하여 제작하였다(sc = side chain H-bond; mc = main chain H-bond).

표 5

[0310]

경쇄(Light Chain)	H.O#	CD269
Ser31 (sc)	285	Thr32 (sc, mc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Ser31 (mc)	283, 284	Arg27 (sc)
Asn32 (sc)	105	Asp15 (sc)
	105, 284	Arg27 (sc)
	56	Ser16 (sc)
Tyr36	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Ser50 (sc)	105	Asp15 (sc)
Ser52 (sc)	286	Ser30 (sc)
	286	Arg27 (sc)
	286, 285	Thr32 (sc, mc)
Gly66 (mc)	287	Thr32 (sc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Gln89 (sc)	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Tyr91 (mc)	282	Ser16 (sc)
	282, 281	Ser16 (mc)

Tyr94 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281, 282	Ser16 (sc)
중쇄(Heavy Chain)	H.O#	CD269
Trp33 (mc)	42, 280	Leu17 (mc)
	183, 279, 26	Leu18 (mc)
Ser35 (sc)	42, 66, 93, 280, 450	Leu17 (mc)
Trp47 (sc)	93, 450	Leu17 (mc)
Glu50 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281, 282	Ser16 (sc)
	450	Leu17 (mc)
	450, 280	Leu17 (mc)
Leu99 (mc)	280	Leu17 (mc)
Tyr101 (mc)	26	Leu18 (mc)

- [0311] J22.9-xi의 강력한 세포 독성 효능은 탈글리코실화(deglycosylation) 후에 강하게 감소한다
- [0312] 루시페라제-기반 세포 독성 분석은 루시페라제가 형질도입된 MM.1S-Luc 세포주를 사용하여 확립되었다. 이 분석에서 죽은 세포에 의해 방출된 루시페라제는 배지에서 ATP의 부족으로 인해 기능을 할 수 없기 때문에, 생체발광은 살아있는 세포에서만 검출된다. 건강한 공여자의 PBMC를 분리하고 MM.1S-Luc 세포와 20 대 1의 비율로 혼합하였다. 4 시간 후 생체발광을 측정하였다.
- [0313] 4 개의 자극받지 않은 공여자 PBMC 결과물을 선택하여 J22.9-xi의 시험관내 세포 독성을 측정하였다. 세포 독성 잠재력은 다른 기증자로부터 유래한 PBMC에 따라 약간 다르다. 배양 4 시간 이내에, 세포 용해는 125 ng/ml J22.9-xi의 농도에서 18 내지 35%에 도달하였다. J22.9-xi 농도를 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면 세포 용해가 56%까지 증가하였다(도 3a).
- [0314] PNGase F로 J22.9-xi(J22.9-xi-N-글리칸)를 탈글리코실화시킨 후, 세포 독성 활성은 8% 이하로 떨어진 반면, BCMA-양성 MM.1S 세포에 대한 J22.9-xi-N-글리칸(J22.9-xi-N-glycan)의 결합은 그대로 유지되었다(도 3a,b).
- [0315] J22.9-xi는 이종 이식 마우스의 종양 크기를 감소시키고 생존을 연장시킨다
- [0316] 본 발명자들은 기능성 B, T 및 NK 세포 집단이 결여된 NOD scid 공통 감마 체인 녹아웃(NSG) 마우스를 사용하였다. 이들 마우스의 정맥 내로 1×10^7 MM.1S-Luc 세포를 주입하여 6 주 이내에 뒷다리 마비를 발생시켰다(도 4d-1). 첫 번째 증상이 나타나는 날에 희생시켰다.
- [0317] 꼬리 정맥에 1×10^7 MM.1S-Luc을 주입한 후, 마우스를 무작위로 3 그룹으로 나누었다. 두 번째 그룹($n = 5$)과 세 번째 그룹($n = 6$)은 아이소타입 대조군 또는 J22.9-xi 항체를 200 μg 씩 각각 주 2 회 주입한 반면, 첫 번째 그룹($n = 2$)은 실험이 끝날 때까지 어떠한 치료도 받지 않았다. 항체를 종양 세포 주사일부터 시작하여 6 주 동안 복강 내(i.p.)투여하였다. 종양 성장은 IVIS 스펙트럼을 사용하여 일주일에 한 번씩 모니터링하였다. 루시페린의 i.p.주입 3 분 후에 생체발광을 측정하였다.
- [0318] J22.9-xi을 처리한 그룹은 6 일째 첫 번째 측정 지점에서 이미 시작된 종양의 크기가 유의하게 작은 반면, 처리하지 않은 그룹과 대조군 항체를 투여받은 그룹 모두는 비슷한 종양 진행 과정을 나타냈다(도 4a). 또한, 이 그룹은 전체 모니터링 기간 동안 전체 종양 크기가 더 작음을 보여준다(도 4b). 아이소타입 대조군 처리 된 동물은 세포 주입 후 평균 46 일 동안 생존하였다. J22.9-xi를 처리한 마우스는 평균 26 일 동안 더 오래 살았다. 이것은 대조군 항체를 투여받은 마우스와 비교하여 55% 연장된 생존율에 해당한다(도 4c). 척추 및 서혜부 림프 절로의 종양 세포의 대량 침투는 비-처리 마우스 및 아이소타입 대조군 항체를 투여받은 마우스에서 세포 주입 후 28 일째까지 나타났다(도 4d-2).
- [0319] 마우스에게 항체 200 μg 을 투여하는 것은 약 10 mg/kg 체중에 해당한다. 저용량일때의 J22.9-xi의 효능을 테스트하기 위해 MM.1S-Luc-이종 이식 마우스를 4 그룹으로 나누었다. 첫 번째 그룹($n = 7$)은 주 2 회 대조군 항체 200 μg 을 투여 하였고, 2, 3번째 그룹(각각 $n = 3$)과 4번째 그룹($n = 9$)은 2 μg , 20 μg 또는 200 μg 을 주 2 회 주입하였다. 주입 및 모니터링은 상술한 바와 같이 실시하였다.
- [0320] 예상한 바와 같이, 대조군 마우스에서는 종양이 발생하였으나, J22.9-xi 20 μg 또는 200 μg 을 투여한 그룹에서

극적으로 제한된 종양 성장이 관찰되었다(도 4e, f). 실험 시간표의 개요는 도 4g에 제공된다.

[0321] **5 주 동안의 J22.9-xi 치료는 확립된 종양의 성장을 억제한다**

[0322] 치료학적 투여는 종양 세포 주사 후 5 일까지 항체 치료의 시작을 지연시킴으로써 모방되었다. 이중 이식 마우스를 두 그룹(n = 6)으로 나누었다. 동물들은 아이소타입 대조군 또는 J22.9-xi 항체를 주입 당 200 μ g씩 일주일에 두 번 받았다. 첫 번째 측정은 세포 주입 후 8 일째에 실시하였다. J22.9-xi(n = 5) 투여군에서 35 일째 측정 가능한 종양-유래 생체발광은 없으나, 아이소타입 대조군 항체(n = 6)를 투여한 동물에서는 종양 크기의 꾸준한 증가가 나타났다(도 5a, b). 아이소타입 대조군의 마우스는 세포 주입 후 평균 56 일간 생존하는 반면, J22.9-xi를 투여한 모든 마우스는 77 일까지도 여전히 살아있다(도 5c). 실험 시간표의 개요는 도 5d에 제공된다.

[0323] **7 주간 J22.9-x를 이용한 집중 초기 치료로 종양 성장을 예방한다**

[0324] 종양 성장에 대한 치료 시기의 효과를 추가로 평가하기 위해, 종양 세포 주입일부터 5 일 연속으로 상이한 항체들을 투여하였다. i.v. 세포 주입에 이어서, 동물을 5 그룹으로 무작위로 나누었다. 그룹 1(n=5)은 200 μ g 아이소타입 대조군 항체를 주입(i.p.)하여 처리한 반면, 그룹 2(n=6)는 200 μ g/J22.9-xi-N-글리칸 항체를 투여하였다. 그룹 3(n=4), 그룹 4(n=5) 및 그룹 5(n=5)의 마우스는 각각 J22.9-xi 항체를 200 μ g, 20 μ g 및 2 μ g를 주입하였다. 생체발광 측정은 세포 주입 9 일 후부터 시작되었다. 44 일까지, 순수한 J22.9-xi 항체를 투여한 그룹에서는 종양-유래 생체발광은 관찰되지 않았다. J22.9-xi-N-글리칸을 처리한 동물의 종양 성장은 감소되었으나, 전체 종양 크기는 아이소타입 대조군 항체를 투여한 동물과 유의하는 차이가 없었다(도 6a, b). J22.9-xi-N-글리칸(탈글리코실화된)으로 처리된 동물의 전체 종양 크기는 유의한 차이가 없었으나(도 6b), 이들 마우스의 수명은 isoAb-처리 그룹과 비교하여 실질적으로 증가하였다(도 6c). J22.9-xi-N-글리칸은 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 없기 때문에, 이러한 결과는 J22.9-xi가 BCMA에 결합함으로써 종양 성장을 방해한다는 것을 나타낸다. 이것은 합리적으로 수용체와 그의 고유 리간드(APRIL 및 BAFF) 사이의 상호 작용의 차단에 의한 것으로 간주될 수 있다. 실험 시간표의 개요는 도 6d에 제공된다.

[0325] **J22.9-xi의 인간화**

[0326] J22.9-xi 항체는 서열 정렬 및 결정 구조로부터 얻어진 데이터에 기초하여 인간화시켰다. IgBLAST(NCBI) 또는 Clustal(EBI)를 사용하여 가변 영역의 서열을 이들 각각의 인간 상동체에 정렬시켰다. 각 제시된 돌연변이는 변형 전의 구조를 육안으로 검사하여 평가하였다.

[0327] **BCMA 표적에 대한 인간화 변이체(humanized variants)의 결합**

[0328] BCMA에 대한 돌연변이체(mutants)의 결합은 유동 세포 계측법, ELISA 및 SPR을 사용하여 실험하였다. 인간화 항체의 친화성을 표면 플라즈몬 공명(ProteinTM XPR36; Bio-Rad)을 사용하여 측정하였다. 상기 결합 데이터는 J22.9-xi 결합에 대해 실험된 것과 동일한 에피토프에 대한 인간화 항체 변이체의 특이성 및 친화도와 관련하여 놀라운 결과를 나타낸다. 하기 표에 나타난 바와 같이, 본 명세서에 기술된 인간화 항체가 오리지널 키메라 항체와 유사한 결합 특성을 나타냈다는 것은 전적으로 놀랍다. SPR 데이터는 인간화된 변이체의 친화성이 키메라의 것과 유사하며 오리지널 키메라 항체에 대해 본 명세서에서 제공된 데이터에 비추어 이들의 임상 적 관련성을 추정하기에 충분함을 나타낸다. 당업자는 키메라의 인간화 동안 CDR의 변형을 통해 결합 특성이 그러한 정도까지 유지될 것으로 예상하지 못했다.

[0329] BCMA-코팅 마이크로타이터 플레이트(1 μ g/ml)를 사용하여 본 명세서에 기재된 바와 같이 ELISA를 실시하였다. 도 10에서 관찰되는 바와 같이, 인간 및 시노물구스(cynomolgus) BCMA 모두를 이용하였을 때 J22.9-xi와 비교하여 모든 인간화 변이체에 대한 결합은 비슷하다.

[0330] 유동 세포 계측법은 또한 본 명세서에 기술된 인간화 변이체를 사용하여 실시하였고, 시험된 모든 인간화 변이체는 인간 및 시노물구스(cynomolgus) BCMA 모두에 대한 동등한 결합을 나타내었다(도 11 참조).

[0331] 또한, SPR 분석을 실시하여 인간화 항체 변이체에 대한 친화도를 측정하였다. 하기 표(표 6)에서 인간화 변이체의 친화성을 관찰할 수 있다(J22.9-H는 인간화된 서열인 서열번호 27에 해당하고, J22.9-FSY는 인간화 및 PTM 변형된 서열인 서열번호 28에 해당하며; J22.9-ISY는 인간화 및 PTM 변형된 서열인 서열번호 29에 해당한다).

[0332] 표 6. SPR 데이터

표 6

이름	ELISA (human)	ELISA (cynomolgous)	유동세포 계 측법(Flow cytometry)	멜팅 온도(Melting temperatures)	친화성(Affinity) (SPR)(human) (n=3)	친화성(Affinity) (SPR)(cynomolgous) (n=2)
J22.9-xi	+++	+++	+++	86 / 94℃	$2.8 \pm 0.7 \times 10^{-10} \text{ M}$	$2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$
J22.9-H	++	+	nd	86 / 94℃	$1.5 \pm 0.3 \times 10^{-8} \text{ M}$	$2.0 \times 10^{-7} \text{ M}$
J22.9-FSY	+++	+++	+++	87 / 94℃	$2.2 \pm 0.3 \times 10^{-9} \text{ M}$	$2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$
J22.9-ISY	+++	+++	+++	86 / 94℃	$2.0 \pm 0.2 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.7 \times 10^{-8} \text{ M}$

J22.9 중쇄의 CDR2의 아미노산 54:

인간화된 J22.9에서 잠재적인 번역 후 변형 부위를 제거하기 위해, 중쇄 CDR2의 잔기 D54를 아스파라긴(N)으로 돌연변이시켜, 우연히 N- 연결된 글리코실화를 위한 새로운 잠재적 변형 부위를 만들었다. N54를 함유하는 돌연변이화된 중쇄는 SDS 겔에서 더욱 천천히 이동하고(도 13), 이는 더 큰 크기를 나타내며 CDR은 글리코실화되었음을 나타낸다.

그럼에도 불구하고, 해당 IgG, J22.9-FNY는 FACS 및 ELISA에서 BCMA와 결합하고, BCMA와 복합체로 결정화되었다. 완전히 정제되지는 않았으나, 2.7 옴스트롬분해능 구조는 잔기의 당 변형과 일치하는 N54 측쇄에서 연장된 명확한 전자 밀도를 보여준다. 이러한 측쇄의 큰 확장이 BCMA에 대한 결합을 방해하지 않을 것이라는 것이 놀라우며, 이 위치에서 다수의 다양한 아미노산 치환이 허용될 수 있고, 또한, 당 이외의 유도체화(derivatizations)도 잠재적으로 가능하다는 것이 이러한 관찰로부터 기대될 수 있다.

방법

세포주 및 배양

인간 다발성 골수종 세포주 MM.1S(Greenstein et al. (2003) Exp Hematol 31:271-282)는 B. Dorken 교수(MDC, Berlin, Germany)로부터 얻었다. 종양 세포 성장의 생체 내 모니터링을 위해, 루시페라제 및 GFP를 렌티바이러스 벡터시스템인 ViraPower(Invitrogen)의 pFU 벡터 내로 클로닝하였다. 형질도입된 세포의 GFP 발현을 통해, 단클론 세포주를 형광-활성 단일 세포 분류를 사용하여 분리하였다. 세포주를 10 % 태아 송아지 혈청, 100 units/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(모두 PAA)을 함유하는 페놀 레드가 없는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다.

캐나다 국립 연구위원회(National Research Council of Canada)에서 구입한 HEK293-6E 세포를 7.5 mM L-글루타민(PAA), 0.1 % Pluronic F-68(Invitrogen) 및 25 µg/ml G418(Invitrogen)로 보충된 Freestyle F17 배지(Invitrogen)에서 배양시켰다. 세포를 Erlenmeyer flasks(Corning)에서 110 rpm으로 37℃에서 5% CO₂ 대기에서 성장시켰다.

항체 생산 및 정제

BCMA-결합 항체를 얻기 위해, 표준 하이브리도마 기술이 사용되었다. 4 마리의 BL/6 야생형 마우스를 불완전 프로인트 애즈버트 및 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)에 C-말단이 융합된 인간 BCMA의 세포외 도메인 30 µg으로 6 회 면역화시켰다. 세포 융합 후 스크리닝 기간을 거친 J22.9 하이브리도마는 항-BCMA 항체를 분비하는 것으로 나타났다.

하이브리도마의 불안정성으로 인해 하이브리도마 J22.9의 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 인간 카파 또는 IgG1 불변 도메인 유전자의 업스트림에서 각각 증폭 및 클로닝하였다. 경쇄 및 중쇄를 각각 코딩하는 1:2 DNA 플라스미드 혼합물로 293-6E 세포를 일시적으로 동시 트랜스펙션하여 키메라 J22.9-xi 항체를 제작하였다. 요약하면: 293-6E 세포를 무-혈청 Freestyle F17 배지에서 1.7×10^6 세포/ml로 제현탁하고 1 µg/ml 배양물의 최종 농도에서 폴리에틸렌이민을 사용하여 형질감염시켰다. 형질 감염 2 일 후, 세포에 1% 트립톤 N1(Organo Technie)을 함유하는 Freestyle F17 배지를 형질전환부피 100%로 공급하였다. 7 일째 세포를 원심 분리에 의해 수확하고, 여과

된(0.45 μ m) 배양 배지를 3.5 ml 단백질 A 세파로즈컬럼(Bio-Rad)에 통과시켰다. 칼럼을 10 ml 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 항체를 20 mM 아세트산 나트륨, 150 mM NaCl, pH 3.5를 첨가하여 용출시켰다. 중화를 위해 1 M HEPES, pH 7.5 100 μ l를 함유하는 튜브에 2 ml의 분획을 직접 수집하였다. 전장 IgG의 최종 수율은 약 40 mg/l 배양액이었다.

[0344] 하이브리도마 J22.9가 항-BCMA 항체를 생산/분비하는 능력을 상실했기 때문에(도 8), 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 PCR을 사용하여 증폭시킨 후 인간 불변 IgG1 및 K 경쇄 유전자의 5'말단에서 각각 클로닝하였다. 이 두 플라스미드로 293-6E 세포를 공동-형질감염(co-transfection)시킴으로써 키메라 J22.9-xi 항체가 생산되었다. 따라서, 본 발명의 항체의 생산은 본질적으로 어려우며, 쉬운 통상적인 방법으로는 달성할 수 없었다.

[0345] J22.9-xi 중쇄 및 무작위 키메라 카파 경쇄로 구성된 아이소타입 대조군 항체는 J22.9-xi 항체와 병행하여 생산되었다. 이 항체는 ELISA 및 유동 세포 계측법에 의해 BCMA에 결합할 수 없는 것으로 나타났다.

[0346] J22.9-xi의 중쇄의 Asn297에 있는 N-연결 올리고사카라이드 쇄를 N-글리코시다제 F(PNGase F)(NEB)를 사용하여 효소적으로 제거하였다. J22.9-xi 10 mg을 37 °C에서 36 시간 동안 500 μ l PBS (pH 7.4)에서 15,000 단위 PNGase F와 함께 항은 배양한 후 무균 PBS로 완충액을 교환하였다.

[0347] **ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)에 의한 J22.9-xi의 결합 및 차단능 결정**

[0348] 마이크로타이터 플레이트를 인간 BCMA의 세포의 도메인 10 μ g/ml로 코팅하였다. 코팅된 BCMA는 1 내지 1000 ng 범위의 J22.9-xi 및 아이소타입 대조군의 연속 희석으로 검출되었다. 코팅된 BCMA에 대한 J22.9-xi 또는 아이소타입 대조군 항체의 결합은 HRP(horseradish peroxidase)-컨쥬게이트 고트 항-인간 이차 항체(Jackson ImmunoResearch, 109-035-098, 희석 1:5,000)로 검출되었다.

[0349] 마이크로타이터 플레이트를 인간 또는 시노물구스(cynomolgous) BCMA(각각 hBCMA 또는 cyBCMA)의 세포의 도메인 1 μ g/ml로 코팅하였다. 코팅된 BCMA는 0.26 pM 내지 500 nM 범위의 J22.9-xi, J22.9-H, J22.9-ISY 및 J22.9-FSY의 연속 희석으로 검출되었다. 코팅된 BCMA에 대한 항체들의 결합은 HRP(horseradish peroxidase)-컨쥬게이트 고트 항-인간 이차 항체(Jackson ImmunoResearch, 109-035-098, 희석 1:5,000)로 검출되었다.

[0350] 차단 실험을 위해, 세척 후에 His-태그(Biomol)에 융합된 인간 재조합 BAFF 1 mg/ml를 항체에 적용하고 마우스 항-His 태그(AbD Serotec, AD1.1.10, 희석 1:5,000, HRP-컨쥬게이트) 항체를 사용하여 검출하였다. 모든 ELISA는 BD OptEIA 시약 A 및 B(BD Bioscience)를 사용하여 현상하였으며 450 nm 및 570 nm에서 마이크로플레이트 분광 광도계(BioTek)로 측정하였다.

[0351] **유동세포 계측법**

[0352] 세포 표면 항원 검출 실험을 위해, 자생 항체(J22.9-xi, J22.9-H, J22.9-ISY, J22.9-FSY 및 아이소타입 대조군) 및 상업적으로 이용가능한 마우스 항-His 태그(AbD Serotec, AD1.1.10, 희석 1:100, Alexa Fluor 488-컨쥬게이트) 및 고트 항-인간 IgG1 (Jackson ImmunoResearch, 109-116-098, 희석 1:400, PE-컨쥬게이트) 항체 및 His 태그가 융합된 인간 재조합 BAFF를 사용하였다. 실험은 FACSCalibur 또는 FACSCanto II 유동 세포 계측기(BD Bioscience)에서 실시하였다. 데이터는 Flowjo 소프트웨어 버전 7.6(TreeStar Inc.)으로 분석되었다.

[0353] **Fab 및 Fab:BCMA 복합체의 생성**

[0354] (Fab)₂ 단편은 펩신과의 인큐베이션에 의해 전장 J22.9-xi IgG로부터 생성되었다. J22.9-xi를 PD-10 완충액 교환 칼럼을 통해 50mM 아세트산 나트륨, pH 3.5에 통과시키고 펩신을 J22.9-xi mg당 30 μ g로 첨가하였다. 2.5 시간 동안 37°C에서 배양은 단편의 결정화 가능(Fc) 영역을 완전히 절단하기에 충분하였고, PD-10 컬럼을 통해 PBS(pH 7.2)로 교환함으로써 펩신을 불활성화시켰다. 개별 Fab에 대한 (Fab)₂ 단편의 환원은 5 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)의 존재하에 2-머캅토에틸아민(50 mM)을 첨가하여 PBS에서 실시하였다. 37°C에서 90 분 동안 배양한 후, 감소된 시스테인은 30 분 동안 500 μ M 요오드아세트아미드(iodoacetamide)로 알킬화함으로써 차단시킨 후 새로운 PBS로 완충액을 교환하였다. Fab 단편을 1.5 몰 당량의 정제된 BCMA와 혼합하고, 복합체를 Superdex 75 16/60 컬럼상의 크기 배제 크로마토그래피로 분리하였다. 분획물을 4-12% SDS 폴리 아크릴아미드 겔에서 분석하고, Fab 및 BCMA를 함유하는 분획물을 모아서 결정화 시험을 위해 농축시켰다.

[0355] **Fab:BCMA 복합체의 결정화**

[0356] 농축된 복합체에 0.5 몰 당량의 순수한 BCMA를 보충하여 포화시키고 결정화 스크리닝을 실시하였다. 초기 Fab:BCMA 결정화 조건은 Gryphon pipetting 로봇 (200nl 방울)을 사용하여 96-웰 시팅 드롭(sitting drop) 형

식 플레이트에서 상업용 스크린 (Qiagen)으로 확인하고 현적(hanging drops)(2 ~ 3 μl)의 24 웰 플레이트에서 최적화되었다. 복합체를 8 mg/ml로 농축하고 20°C에서 21% PEG 3350, 0.1M BisTris pH 6.5 및 5 mM CuCl₂에서 결정화시켰다. 결정은 3 일 후에 얇은 판의 클러스터로 나타나 대략 7 일 이내에 최종 크기(0.2 - 0.3 mm)를 나타냈다. 클러스터를 분리하고 개별 플레이트를 동결 방지제로서 글리세롤 20%의 모액에서 액체 질소로 급속 동결시켰다. 완전한 회절 데이터는 Helmholtz Zentrum Berlin의 BESSY 싱크로트론에서 단결정으로부터 수집되었다. 검색 모델로 Efalizumab(3E09)의 구조로부터 실험 단계를 사용하여 분자 교체에 의해 구조가 1.9 옹스트롬의 분해능으로 설명되었다. 데이터 처리는 ccp4 프로그램 세트로 수행되었으며 구조 최적화는 Phenix(Adams P D, *et al.* (2010), Acta Cryst. D66 : 213-221) 및 Coot를 사용한 모델 구축 및 평가를 사용하여 수행되었다(Emsley *et al.*, Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography, 2010, 66:486-501). PyMOL(The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrodinger, LLC)을 사용하여 이미지를 만들었다.

[0357] **시험관내 세포 독성 분석**

[0358] 이 분석에서, J22.9-xi의 세포 독성 효과는 생체발광 판독기에서 나머지 살아있는 세포의 발광을 측정함으로써 결정되었다. 즉, 새로 얻은 인간 필터 버퍼 코트(FBC)를 160 ml 용리 완충액(5 mM Na₂-EDTA 및 2.5[w/v] 수크로스를 함유한 PBS(pH 7.4))으로 중력에 의해 역세척시켰다. Ficoll 구배 원심 분리에 의해 단핵 세포를 용출된 세포로부터 분리하였다. 간기(interphases)로부터의 단핵 세포를 취하여 용리 완충액에서 2 회 세척하였다. 적혈구 용해 후, PBMC를 다시 세척하고, 계수한 후 페놀 레드가 포함되지 않은 RPMI/10% FCS로 희석하여 1×10^7 세포/ml로 조정하였다. 50 μl RPMI에 있는 5×10^4 MM.1S-Luc 세포를 마이크로타이터 플레이트에 플레이팅하였다. 100 μl PBMCs를 첨가하기 10 분 전에, MM.1S-Luc 세포를 J22.9-xi 또는 아이소타입 대조군 항체의 200 μl 샘플 부피의 연속 희석액으로 배양하였다. 표적 세포, 항체 및 이펙터 세포를 첨가한 후, 마이크로타이터 플레이트를 실온(RT)에서 2 분간 원심 분리(300 x g)한 후 5% CO₂로 37°C에서 저장하였다. 대조군 웰은 완전한 용해를 위해 항체 대신에 1% 트리톤 X로 처리하였다. 배양 4 시간 후, 각각의 웰에 루시페린(250 ng/ml)을 함유한 PBS 25 μl 를 첨가하고, 살아있는 세포의 생체 발광을 생체발광 판독기(Tecan)로 측정하였다. 특정 세포 독성은 다음 공식에 따라 계산되었다:

[0359] $100 - [\text{값}(J22.9-xi) - \text{값}(\text{충 용해})] / [\text{값}(\text{아이소타입 대조군}) - \text{값}(\text{충 용해})] \times 100.$

[0360] **생체내 연구**

[0361] Jackson Laboratory로부터의 NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CSF2)2Ygy Tg(IL3)1Ygy Tg(KITLG)3YgyJGckRolyJ 마우스 (NSG) 및 Charles River Deutschland (Sulzfeld, Germany)로부터의 CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Cr1 마우스를 사용하였다. 실험은 8-14 주 사이의 마우스로 실시하였다. 모든 동물 연구는 특정 병원균이 없는 조건 하에서 제도 및 주 지침에 따라 수행되었다. 질환의 초기 단계에서 종양 치료 및 확립된 종양 치료에 관한 실시예에서, CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Cr1 마우스를 사용하였다. 본 명세서에 언급된 2 마리의 마우스주의 표현형은 매우 유사하다. 상기 동물들은 기능적 B 세포, T 세포 및 NK 세포가 없다. CB17.Cg 마우스에서 약간 더 느린 종양 성장이 관찰되었으며, 이는 본 발명의 치료용 항체의 보다 유망한 효과를 나타낸다.

[0362] 다발성 골수종의 이중 이식 모델은 0 일째에 꼬리 정맥에 1×10^7 MM.1S-Luc 세포를 정맥 주사함으로써 유도되었다. 이 모델에서 치료되지 않은 동물은 6 주 이내에 뒷다리 마비가 발생한다. 이 증상이 발생하면 실험의 종료 시점을 나타낸다.

[0363] 유효성 연구를 위해, 항체를 일주일에 두 번 또는 0 일에서 시작하여 5 일 연속으로 복강 내 투여(i.p.)하였다. J22.9-xi 항체는 주사 1 회당 2 μg , 20 μg 또는 200 μg 으로 투여되었고; 아이소타입 대조군 항체의 경우, 200 μg /주사가 사용되었다. MM.1S-Luc 세포의 생체발광은 150 μg 의 루시페린을 i.p. 주입 후 IVIS 스펙트럼(Caliper Life Sciences)을 사용하여 측정하였다. 측정은 매주 수행되었다. 각 시점에서, 3 마리의 치료되지 않은 대조군 마우스에도 루시페린을 투여하였다. 이 동물의 총 플럭스 값은 각 측정 값에서 빼거나 그래프에 표시된다.

[0364] 확립된 종양을 치료하기 위해, MM.1S-Luc 세포 주입 5 일 후 항체 치료를 시작하였다. J22.9-xi 또는 아이소타입 대조군 항체 200 μg 을 6 주 동안 주 2 회 투여하였다.

[0365] **J22.9-xi의 인간화**

[0366] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열(마우스)은 해당 중쇄 및 경쇄 서브 타입 인간 서열로부터의 것들과 정렬되어 어떤

잔기 변경이 완전 인간화 서열 변이체를 생성시키는 데 필요한지를 결정하였다. J22.9-xi:hBCMA 복합체의 결정 구조를 사용하여, 각 변형을 *in silico*로 먼저 평가하여 BCMA에 대한 항체의 결합을 잠재적으로 방해할 수 있는 돌연변이를 확인하였다. 각 쇄를 위한 두 개의 완전한 J22.9 가변 영역 유전자를 합성하였다. 하나는 원래의 마우스 서열이고, 다른 하나는 유전자를 각 3 개의 카세트로 나누기 위해 2 개의 추가된 제한 효소 부위를 갖는 완전히 인간화된 서열(즉, 필요한 모든 인간화 돌연변이를 포함)이다. 잠재적으로 문제가 되는 돌연변이를 표시한 후, 원래의 마우스와 완전히 인간화된 유전자 카세트의 다양한 조합을 제작하였고, 이들의 해당 IgG를 발현, 정제 및 BCMA 양성 세포로 FACS 분석하여 결합을 평가하였다. 표시된 문제가 있는 잔기를 PCR을 사용하여 개별적으로 돌연변이시켜 BCMA와의 친화성에 대한 효과를 확인하고 SPR을 통해 인간과 시노몰구스(*cynomolgus*) BCMA 모두에 대한 결합에 대해 최종 최적화된 컨스트럭트를 정량적으로 평가하였다.

[0367] SPR

[0368] SPR은 0.005% Tween-20이 보충된 인산 완충 식염수(PBST)를 사용하여 ProteonXPR36에서 수행되었다. 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 전체 IgG를 제조자의 지시에 따라 표준 아민 화학을 사용하여 Proteon GLH 센서 칩에 고정화시켰다. 결합 실험을 위해, PBST에 인간 또는 시노몰구스 BCMA가 이동 상으로 사용되었다. 결합 친화도(k_d)는 단일-부위 결합 모델을 가정한 BCMA의 다중 농도(hBCMA의 경우 0.4 내지 800 nM, cynoBCMA의 경우 2.7 nM 내지 1 mM 범위)에서 병렬로 결정된 결합(k_{on}) 및 해리(k_{off}) 상수로부터 계산하였다.

[0369] 또한, 추가의 실험은 본 발명의 바람직한 구현예들이 놀랍고 예기치 않은 효과를 제공하고 이에 의해 불분명한 방식으로 본 발명의 문제점을 해결한다는 것을 보여준다.

[0370] 선행문헌

[0371] Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., *et al.* (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.

[0372] Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273, 927-948.

[0373] Anthony, R.M., and Ravetch, J.V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1, S9-14.

[0374] Chan *et al.* (2010) *Nat Rev Immunol* 10:301-316

[0375] Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6, 15-25.

[0376] Chiu, A., Xu, W., He, B., Dillon, S.R., Gross, J.A., Sievers, E., Qiao, X., Santini, P., Hyjek, E., Lee, J.W., *et al.* (2007). Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood* 109, 729-739.

[0377] Gordon, N.C., Pan, B., Hymowitz, S.G., Yin, J., Kelley, R.F., Cochran, A.G., Yan, M., Dixit, V.M., Fairbrother, W.J., and Starovasnik, M.A. (2003). BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 42, 5977-5983.

[0378] Greenstein, S., Krett, N.L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K.C., and Rosen, S.T. (2003). Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol* 31, 271-282.

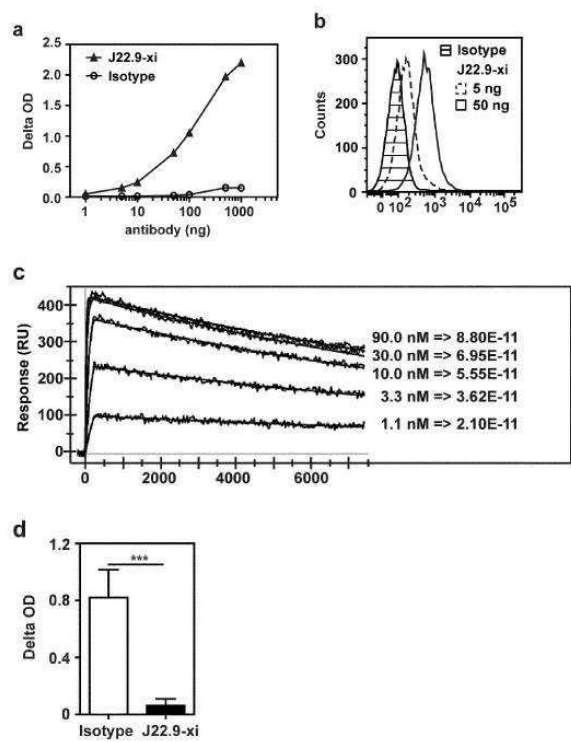
[0379] Jacobi, A.M., Huang, W., Wang, T., Freimuth, W., Sanz, I., Furie, R., Mackay, M., Aranow, C., Diamond, B., and Davidson, A. (2010). Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* 62, 201-210.

[0380] Kapoor, P., Ramakrishnan, V., and Rajkumar, S.V. (2012). Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin Hematol* 49, 228-242.

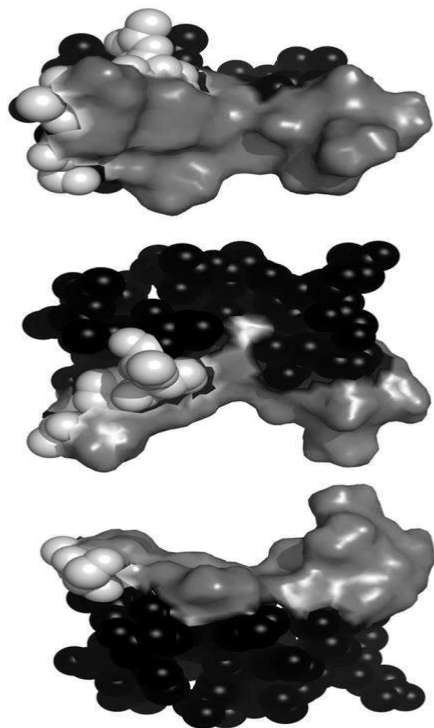
- [0381] Keyser, F.D. (2011). Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr Rheumatol Rev* 7, 77-87.
- [0382] Laskowski, R.A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res* 37, D355-359.
- [0383] Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P., and Browning, J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-264.
- [0384] Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 34-47.
- [0385] Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J.A., Greipp, P.R., and Jelinek, D.F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103, 689-694.
- [0386] Queen et al., 1989; WO 90/07861
- [0387] Patel, D.R., Wallweber, H.J., Yin, J., Shriver, S.K., Marsters, S.A., Gordon, N.C., Starovasnik, M.A., and Kelley, R.F. (2004). Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *J Biol Chem* 279, 16727-16735.
- [0388] Presta, L.G. (2008). Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 20, 460-470.
- [0389] Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet* 374, 324-339.
- [0390] Richardson *et al.* (2003) *New Engl J Med* 348:2609-2617.
- [0391] Ryan et al (Molecular Cancer Therapeutics, 2007 6(11), 3009)
- [0392] Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- [0393] Suzuki, K. (2013). Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Jpn J Clin Oncol* 43, 116-124.
- [0394] Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58
- [0395] Wang, S.Y., and Weiner, G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 8, 759-768.
- [0396] Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584

도면

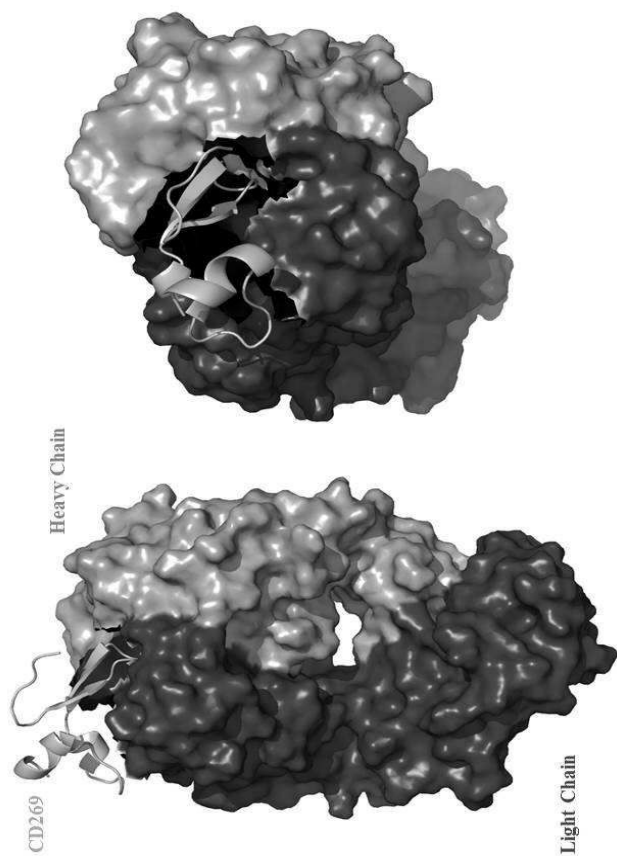
도면1



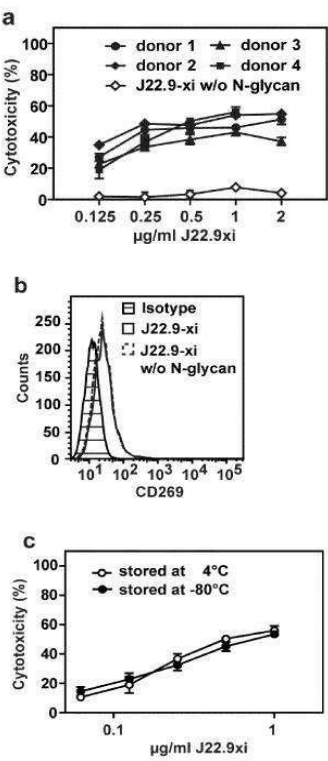
도면2a



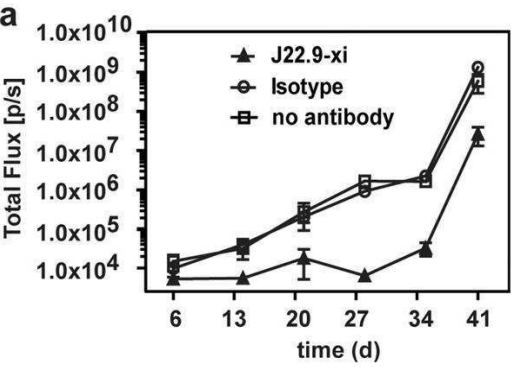
도면2b



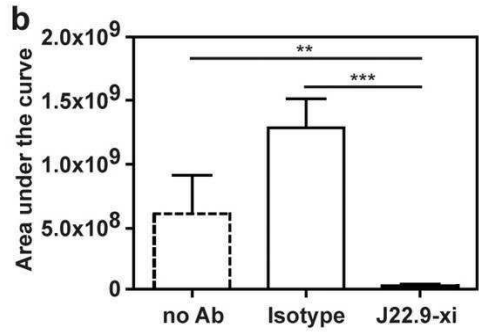
도면3



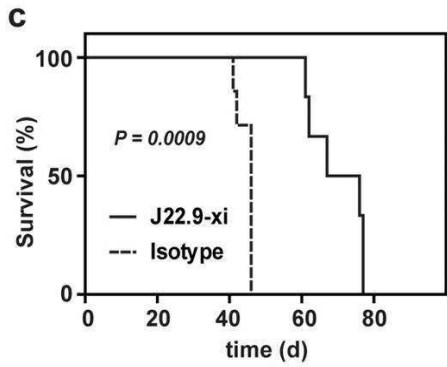
도면4a



도면4b

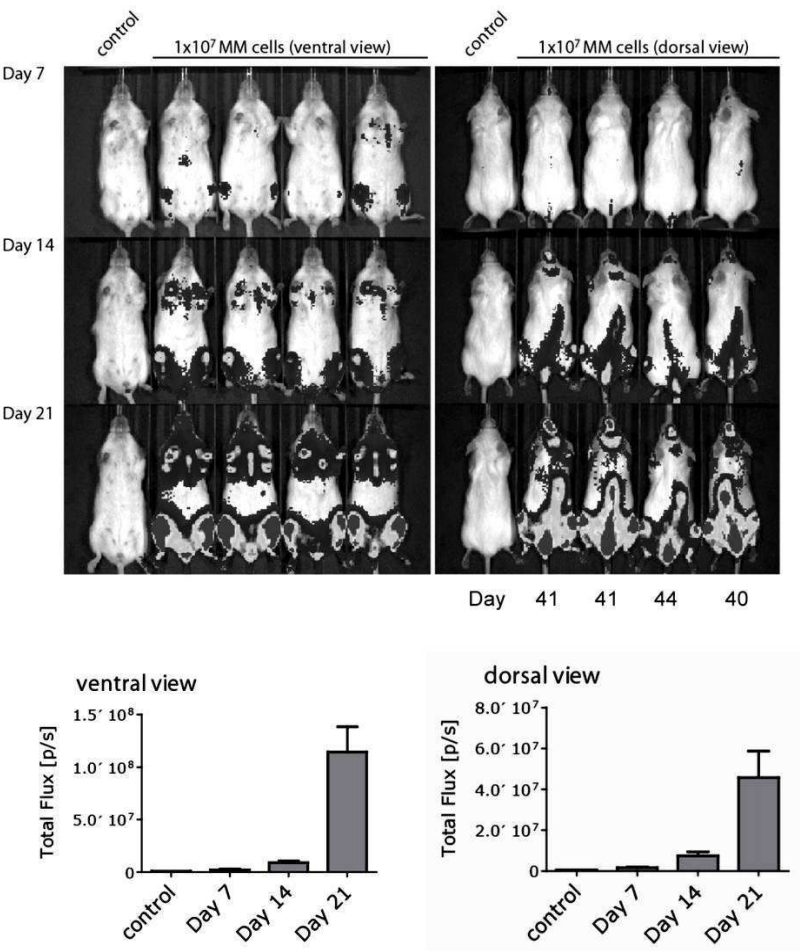


도면4c

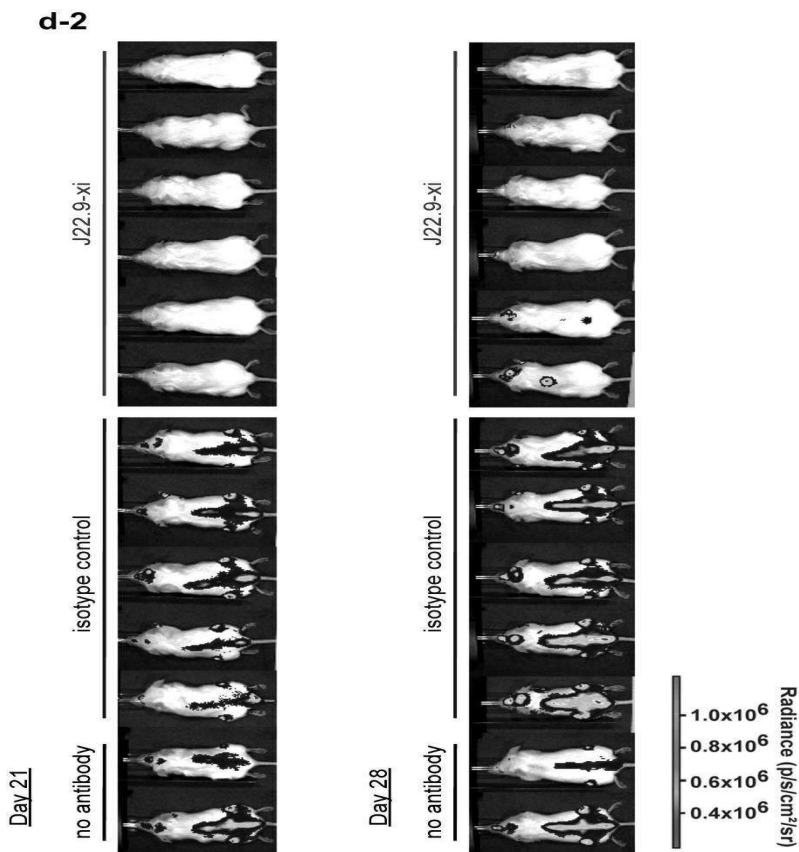


도면4da

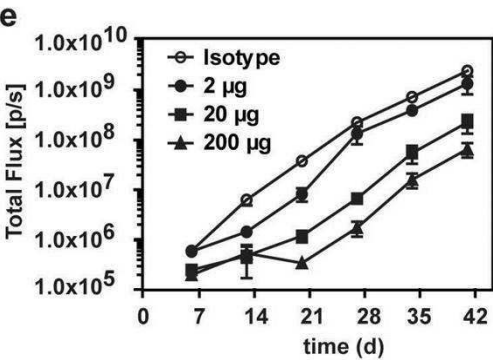
d-1



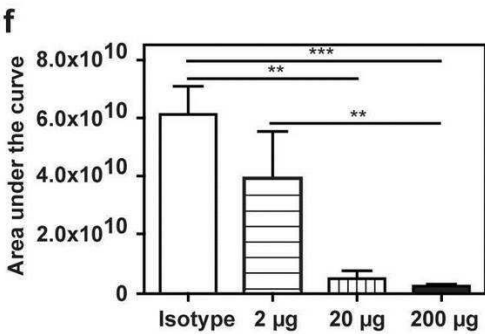
도면4db



도면4e



도면4f



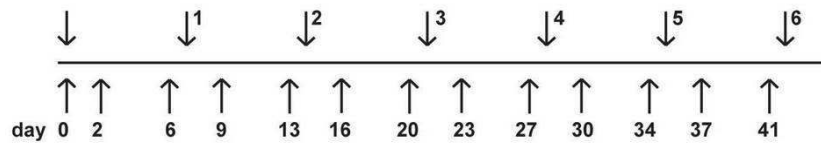
도면4g

g

실험 시간표

종양 세포 주입(i.v)
1*10⁷ 세포/마우스

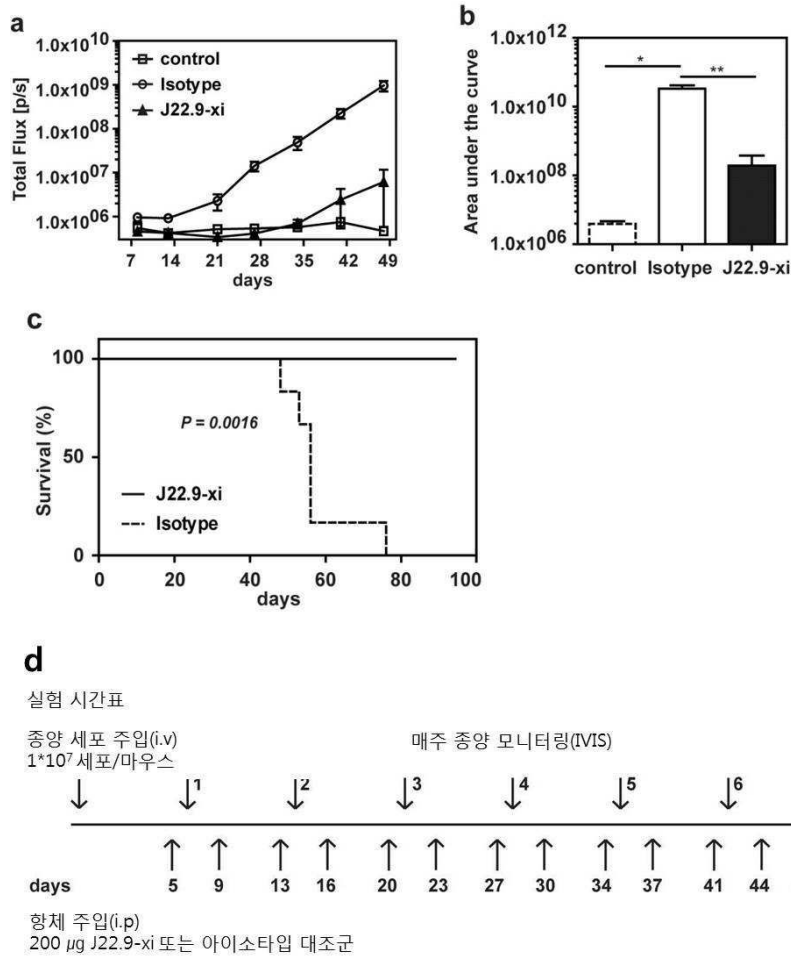
매주 종양 모니터링(IVIS)



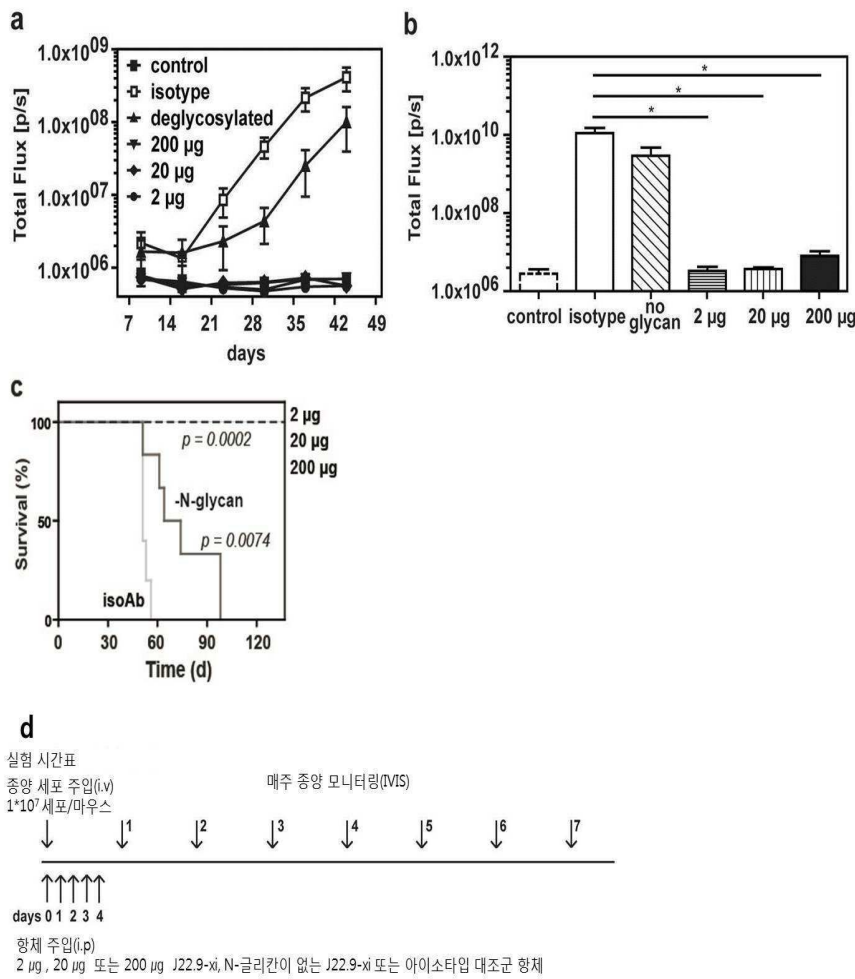
항체 주입(i.p)

200 μg J22.9-xi 또는 아이소타입 대조군

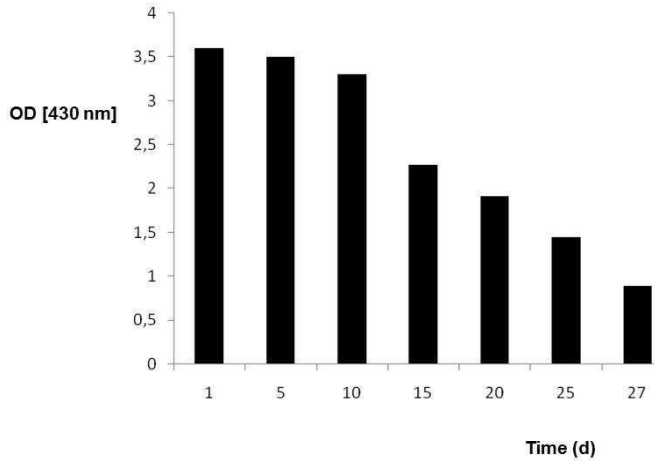
도면5



도면6



도면7



도면8

HC	1	10	20	30	40	50
HCg	<u>XVQLXXSGGGLVQPGGSLXLSCAASGXFFXXYXXWVRXAPGKGLXXXGX</u>					
HCm	<u>QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGE</u>					
HCpH	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLEWVGE</u>					
hHC01	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC02	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWXS WVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC03	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYXMXWVRQAPGKGLVXVGX</u>					
hHC04	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC05	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC06	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC07	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
	51	60	70	80	90	100
HCg	<u>INPXXSTINYAPSLKXXFXISRDNAKNTLYLQMXXRSEDTAXYYCASXX</u>					
HCm	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFIIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLY</u>					
HCpH	<u>INPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC01	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC02	<u>INPXXSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC03	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCASXX</u>					
hHC04	<u>INPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC05	<u>INPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC06	<u>INPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC07	<u>INPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
	101	110				
HCg	<u>XDYGDXDYWGQGTXTVTVSS</u>					
HCm	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
HCpH	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC01	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC02	<u>XDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC03	<u>XDYGDXMDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC04	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC05	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC06	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					
hHC07	<u>YDYGDAYDYWGQGTXTVTVSS</u>					

X: 인간화 서열에 따른 가변 아미노산
 HCg: 일반 중쇄 가변 서열
 HCm: 마우스 중쇄 가변 서열
 HCpH: 부분 인간화 중쇄 가변 서열
 CDRs은 일반 및 마우스 서열에 밑줄로 표시한다.

도면9

LC

	1	10	20	30	40	50
LCg	XIVMTQSXXXXXXXXSXGXVSVXXCKASQSVXXXVXWXQQKPKXQXPKXLIXX					
LCm	DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFS					
LCpH	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIYS					
hLC01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
hLC02	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVXXNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
hLC03	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDXVXWXQQKPGQAPRALIIX					
hLC04	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
	51	60	70	80	90	100
LCg	XXRXSGXPARFXSGXXGTFTLTISXLQSEDXAXYXCXQXNNXPXTFGA					
LCm	ASLRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGA					
LCpH	DDLRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC01	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC02	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC03	AXRXSGIPARFSGSGXXGTEFTLTISLQSEDFAVYYCXQXNNXPXTFGA					
hLC04	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
	101					
LCg	GTKLELKR					
LCm	GTKLELKR					
LCpH	GTKLELKR					
hLC01	GTKLELKR					
hLC02	GTKLELKR					
hLC03	GTKLELKR					
hLC04	GTKLELKR					

X: 마우스 또는 인간화 서열에 따른 가변 영역

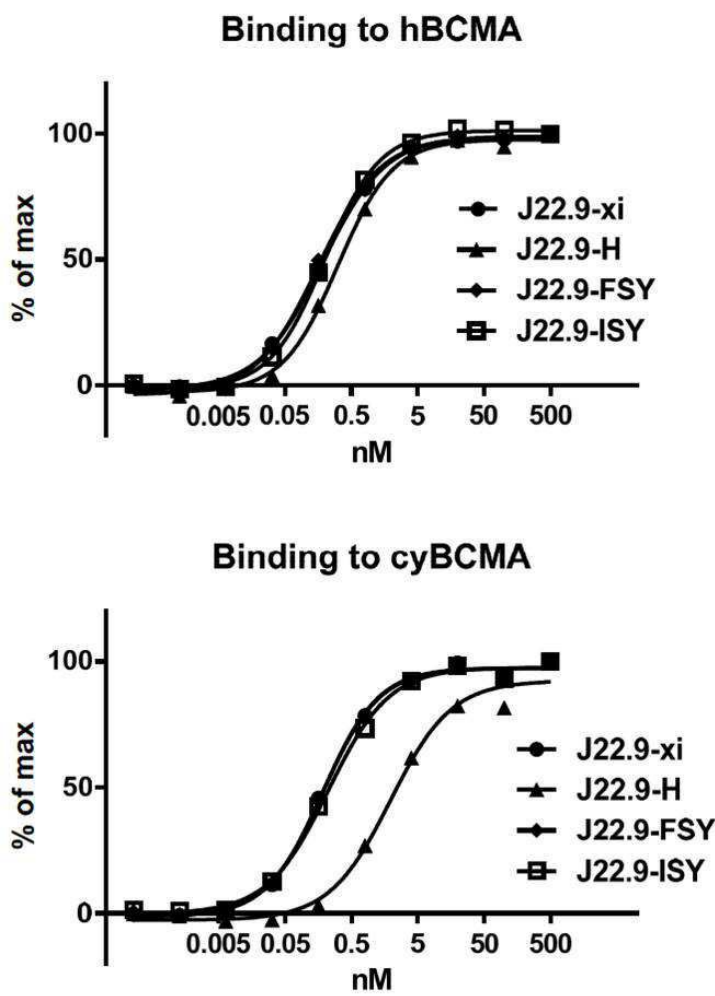
LCg: 일반 중쇄 가변 서열

LCm: 마우스 일반 중쇄 가변 서열

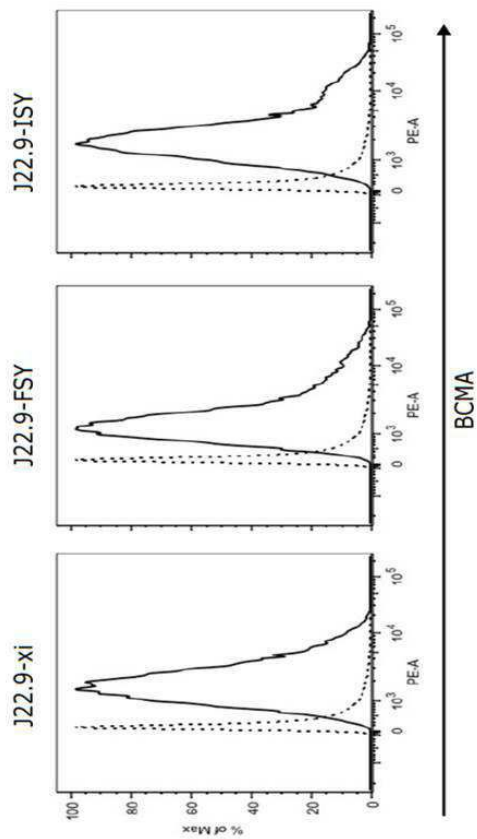
LCpH: 부분 인간화 일반 중쇄 가변 서열

CDRs은 일반 및 마우스 서열에 밑줄로 표시한다.

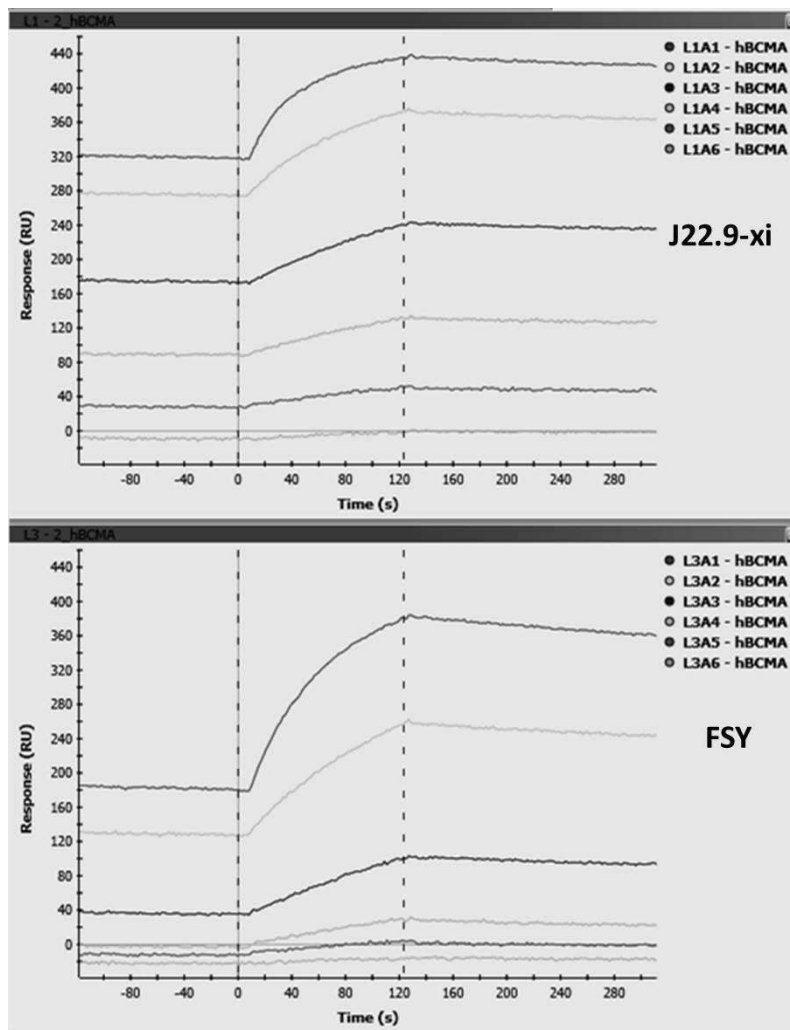
도면10



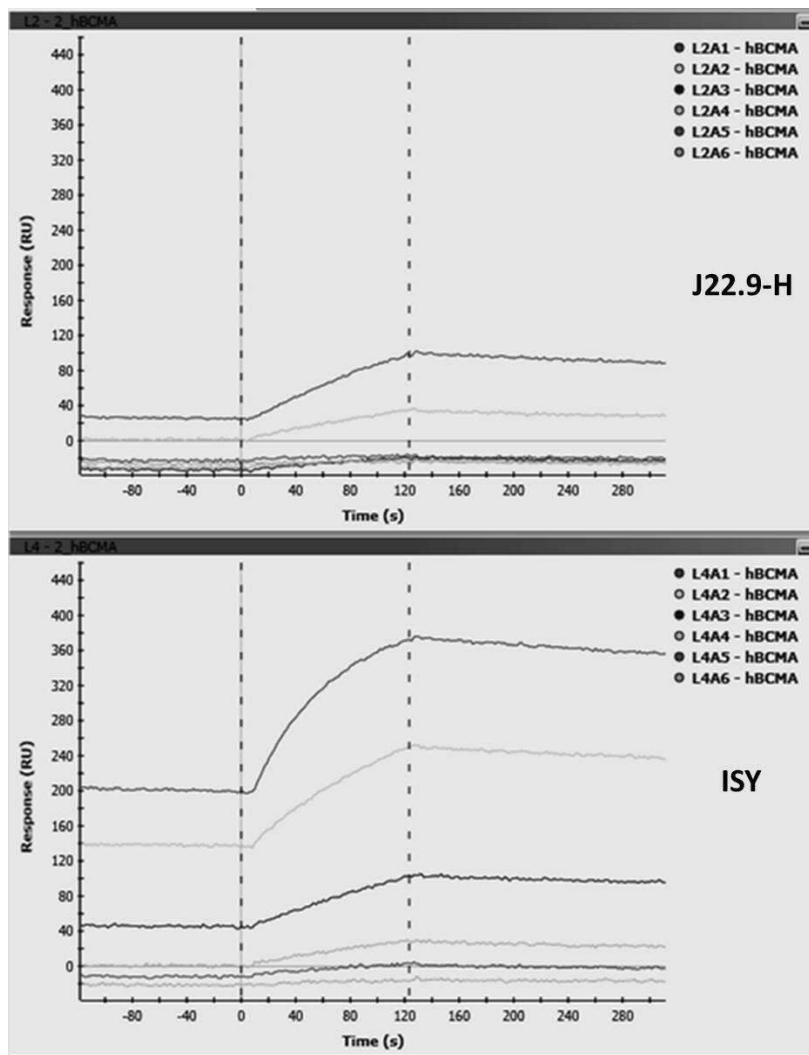
도면11



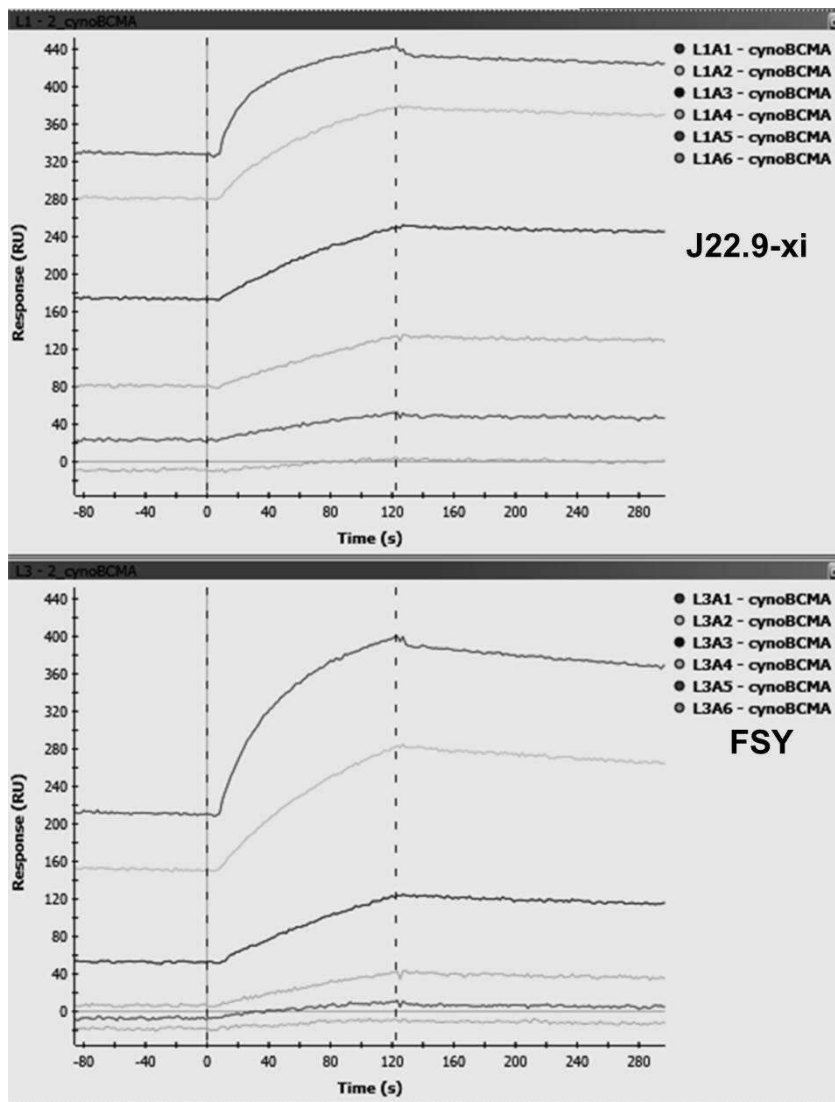
도면12aa



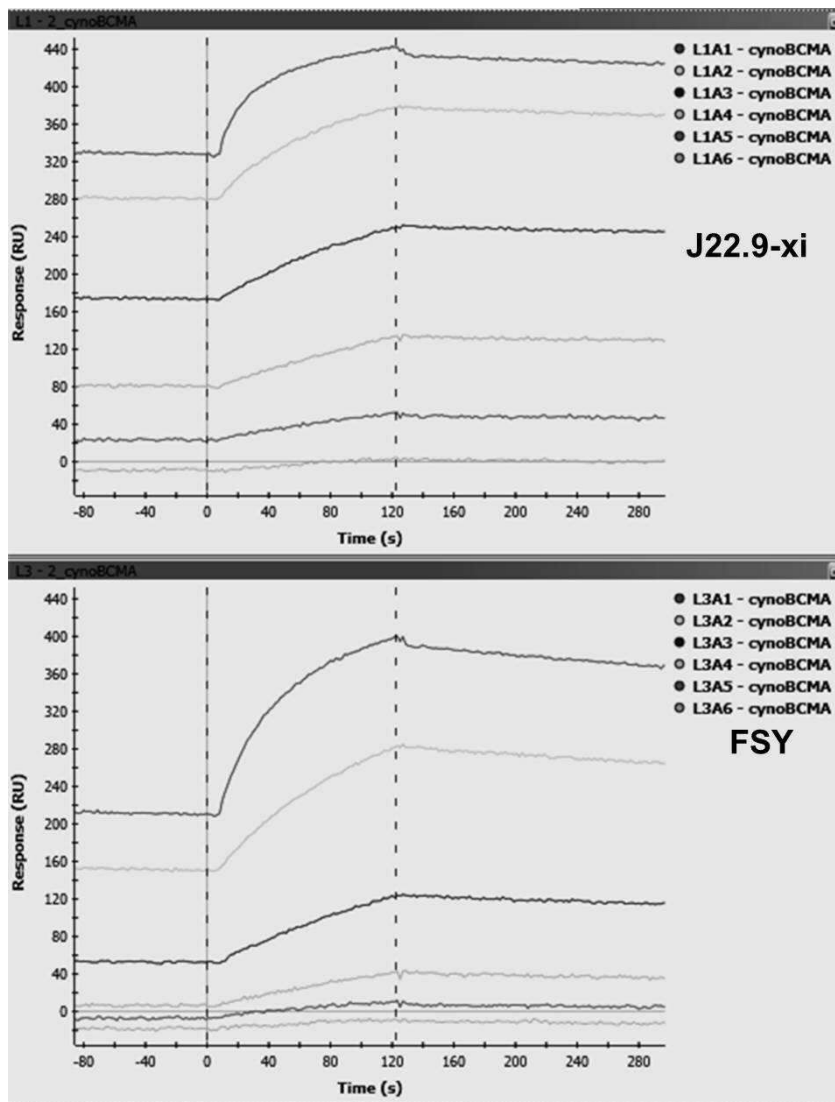
도면12ab



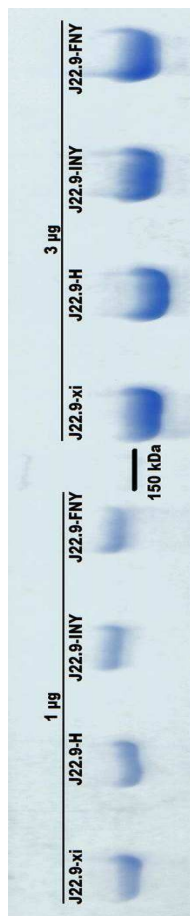
도면12ba



도면12bb



도면 13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MAX-DELBR?K-CENTRUM

<120> HUMANIZED ANTIBODIES AGAINST CD269 (BCMA)

<130> XII 2136/14W0

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Ab $\langle 400 \rangle$ 1

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

1
5
10
15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (54)..(55)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (101)..(101)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (107)..(107)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Xaa Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<220><221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (47)..(47)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (99)..(101)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (106)..(106)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Xaa Val

35 40 45

Gly Xaa Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50 55 60

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 6

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

20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 7

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

 20 25 30
 Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 8

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

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

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 9

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35

40

45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50

55

60

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

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 10

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

1 5 10 15

Asp Glu Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ser Asp Asp Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<220><221> misc_feature

<222> (30)..(31)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<220><221> misc_feature
 <222> (31)..(32)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

 <222> (49)..(50)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (55)..(55)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (66)..(67)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222>
 > (91)..(91)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (96)..(96)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Xaa Xaa
20 25 30

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

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Xaa Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Xaa Asn Asn Xaa Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 14

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn
20 25 30

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

35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ab
<220><221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 15

Arg Tyr Trp Xaa Ser
1 5
<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ab
<220><221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 16

Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15
Asp Lys

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Ab
<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 17

Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 18

Arg Tyr Trp Ile Ser

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 19

Arg Tyr Trp Phe Ser

1 5

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 20

Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp Lys

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 21

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp Lys

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 22

Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Ab

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn Val Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 24

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser

1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 25

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

50	55	60	
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	290	295	300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys

450

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Gly Lys

450

<210> 29

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 29

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

35	40	45
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
50	55	60
Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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 Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
240		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

Gly Lys

450

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 30

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 31

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

1 5 10 15

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

 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 32
 <211> 1450
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Ab coding

<400> 32

gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt 60
ccacagttaa gtgcagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct 120
taggctctct tgtgcagcct ctggctttac ctcttcacgg tattggatga gctgggtgag 180
acaggtctca gggaaaggtc tgggtgtgggt aggggagata aaccccgata gcagcacgat 240
caactatgct ccgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac 300

tctctacttg cagatgaatt ccttcgagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag 360
tctgtactac gactatgggg acgcaatgga ctattgggga caaggcacac tgggtactgt 420
tagctccgcg tcgaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac 480
ctctgggggc acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac 540
ggtctcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca 600
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac 660
ccagacctac atctgaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagagagt 720

tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct 780
ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg 840
gacctctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt 900
caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca 960
gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 1020
tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac 1080
catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg 1140

ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag 1200
cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc 1260
tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag 1320
caggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca 1380
ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaatga gtgcgacggc cgggcggcgg 1440
cggcggatcc 1450

<210> 33

<211> 1450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab coding

<400> 33

```
gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt      60
ccacagttaa gtgcagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct      120
taggtctctt tgtgcagcct ctggctttac cttctcacgg tattggttca gctgggtgag      180
acaggtctcca gggaaaggtc tgggtgtgggt aggggagata aaccccagca gcagcacgat      240
caactatgct ccgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac      300
tctctacttg catatgaatt ccttcagagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag      360
tctgtactac gactatgggg acgcatacga ctattgggga caaggcacac tgggtactgt      420
```

```
tagctccgcg tcgaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac      480
ctctgggggc acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac      540
ggtctcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca      600
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac      660
ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagagagt      720
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atccccaccg tgcccagcac ctgaactcct      780
gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg      840
```

```
gacctctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt      900
caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca      960
gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa      1020
tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac      1080
catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg      1140
ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag      1200
cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc      1260
```

```
tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag      1320
caggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca      1380
ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaatga gtgcgacggc cgggcggcgg      1440
cggcggatcc                                     1450
```

<210> 34

<211> 1450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab coding

<400> 34

gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt	60
ccacagtga gtcagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct	120
taggtctctt tgtgcagcct ctggctttac ctctcacgg tatggatca gctgggtgag	180
acaggctcca gggaaaggtc tgggtgtgggt aggggagata aacccagca gcagcacgat	240
caactatgct cgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac	300
tctctacttg cagatgaatt cccttcgagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag	360
tctgtactac gactatgggg acgcatacga ctattgggga caaggcacac tgggtactgt	420
tagtccgcg tcgaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac	480
ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac	540
ggtctcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctccccg ctgtcctaca	600
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac	660
ccagacctac atctgaacg tgaatcaca gccccagca accaagggtg acaagagagt	720
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct	780
ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg	840
gacctctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt	900
caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca	960
gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa	1020
tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac	1080
catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg	1140
ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag	1200
cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc	1260
tcccgctgtg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag	1320
caggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca	1380
ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaatga gtgcgacggc cgggcggcgg	1440
cggcggtacc	1450

<210> 35

<211> 718

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<400> 35

gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt	60
acactccgag atcgtgatga cccagtctcc tgctaccctg agcgttttctc ccggtgaaag	120
ggccacactc agctgcaaag cctctcaaag cgtggacagc aatgtgcctt ggtatcagca	180
gaaacctggc caagctccga gagcactgat ctattccgcg tcattgcgct tttccggcat	240
accagcacgg tttagtggct cagggagtgg gactgagttc actctgacga ttagtcacct	300
tcagtccagag gatttcgccc tgtactactg tcagcagtac aacaactatc ccctcacatt	360
cggagctgga accaagctgg aactgaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcattctt	420
cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa	480
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa	540
ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac	600
cctgacgctg agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca	660

tcagggcctg agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agggatcc	718
---	-----

<210> 36

<211> 718

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AB

<400> 36

gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt	60
acactccgag atcgtgatga cccagtctcc tgctaccctg agcgttttctc ccggtgaaag	120
ggccacactc agctgcaaag cctctcaaag cgtggagagc aatgtgcctt ggtatcagca	180
gaaacctggc caagctccga gagcactgat ctattccgcg tcattgcgct tttccggcat	240
accagcacgg tttagtggct cagggagtgg gactgagttc actctgacga ttagtcacct	300
tcagtccagag gatttcgccc tgtactactg tcagcagtac aacaactatc ccctcacatt	360
cggagctgga accaagctgg aactgaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcattctt	420
cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa	480
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa	540
ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac	600
cctgacgctg agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca	660
tcagggcctg agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agggatcc	718

<210> 37

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HIS TAG

<400> 37

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

1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys

50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn

65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu

85 90 95

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

100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu

115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn

130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp

145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu

165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
210 215 220

Gly Ser Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu
225 230 235 240

Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro

245 250 255
Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val
260 265 270

Lys Gly Thr Asn Ala Leu Glu His His His His His His
275 280 285

<210> 38

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> extra cell domain

<400> 38

Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His
1 5 10 15

Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu
20 25 30

Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly
35 40 45

Thr Asn Ala Leu Glu
50

<210> 39

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Leu Glu

50 55

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys

1 5 10 15

Ser Ser Asn Thr

20

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(28)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (30)..(31)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (39)..(39)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (66)..(67)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>
 ><221> misc_feature
 <222> (84)..(86)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (88)..(88)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (93)..(93)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (115)..(115)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 41
 Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr
 20 25 30
 Trp Glx Ser Trp Val Arg Xaa Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Glx Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu

Lys Xaa Xaa Phe Xaa Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Glx Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Ab

<220><221> misc_feature

$\langle 222 \rangle$ (8).. $\langle 13 \rangle$

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

 $\langle 222 \rangle$ (20).. $\langle 21 \rangle$

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

$$\langle 222 \rangle \quad (41) \dots (41)$$

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

$\langle 222 \rangle$ (46).. (46)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220


```

><221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (51)..(52)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (77)..(77)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221>
> misc_feature
<222> (85)..(85)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<220><221> misc_feature
<222> (87)..(87)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 42
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Xaa Val Xaa Xaa Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn
          20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Xaa Gln Xaa Pro Lys Xaa Leu Ile

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

```

	85	90	95
Thr	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg		
	100	105	
<210>	43		
<211>	108		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Ab		
<400>	43		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Thr Thr Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn			
	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile			
	35	40	45
Phe Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg			
	100	105	