



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월19일

(11) 등록번호 10-2046435

(24) 등록일자 2019년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7032890

(22) 출원일자(국제) 2013년04월27일

심사청구일자 2018년04월26일

(85) 번역문제출일자 2014년11월24일

(65) 공개번호 10-2015-0004882

(43) 공개일자 2015년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/038542

(87) 국제공개번호 WO 2013/163633

국제공개일자 2013년10월31일

(30) 우선권주장

61/639,376 2012년04월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011050242 A1*

Journal of Biological Chemistry. Vol. 274,

No. 44, pp. 31272-31278 (1999)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

밀레니엄 파머슈티컬스 인코퍼레이티드

미합중국 메사추세츠 02139 캠프리지 랜즈다운 스트리트 40

(72) 발명자

프랭크, 헬렌, 알리슨

미국 02067 메사추세츠 샤론 퀸즈 씨클 7

맥도날드, 엘리스, 에이.

미국 01907 메사추세츠 스왈스컷 스왈스컷 애비뉴 25

오'케페, 테레사, 엘.

미국 02453 메사추세츠 월섬 리치그레인 애비뉴 20

(74) 대리인

특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 42 항

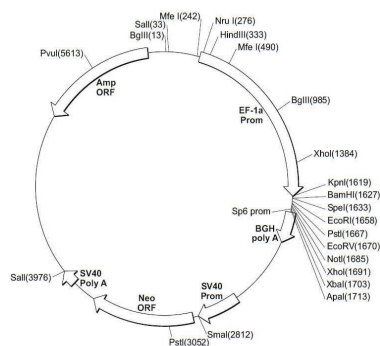
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 항-GCC 항체 분자 및 GCC-표적화 치료법에 대한 감수성을 평가하기 위한 그 용도

(57) 요약

GCC에 결합하는 항체 및 항체의 항원-결합 단편이 개시된다. 본 발명은 또한 본원에 제공된 항-GCC 항체를 이용하는 GCC-표적화 치료법을 받아야 하는 환자를 확인하기 위한 진단 방법을 제공한다. 항-GCC 항체 분자는 네이 키드 항체 분자로서 및 면역곤주게이트의 성분으로서 유용하다. 따라서 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 치료제 또는 표지를 포함하는 면역곤주게이트를 특징으로 한다. 본 발명은 또한, 예로 GCC 및 GCC를 발현하는 세포 또는 조직의 검출을 위한 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 면역곤주게이트의 이용 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 특히 GCC-매개 질환의 진단, 예후, 조영 또는 단계결정에 유용하다. 따라서 일부 측면에서, 본 발명은 GCC-표적화 치료법, 예로 항-GCC 항체 치료법, 예로 치료제와 곤주게이트된 항-GCC 항체를 포함하는 면역곤주게이트를 이용한 치료를 위한 대상체의 확인 방법을 특징으로 한다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

각각 서열 번호 21, 22, 및 23의 아미노산 서열을 포함하는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역들 (HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 각각 서열 번호 27, 28, 및 29의 아미노산 서열을 포함하는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역들 (LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는 단리된 항-구아닐릴 사이클라아제 C (GCC) 항체 분자 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편이 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 항-GCC 항체분자는 모노클로날 항체, 토끼 항체, 토끼 모노클로날 항체, 및 인간화 토끼 모노클로날 항체 중 하나 이상인, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 항-GCC 항체 분자는 IgG 항체인, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 항-GCC 항체 분자는 항원 결합 단편인, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항에 있어서, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편은 검출 가능한 표지에 콘주게이트된, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, 검출 가능한 표지는 홀스래디쉬 페록시다아제(HRP); 알칼린 포스파타아제; 갈락토시다아제; 글루코아밀라아제; 라이소자임; 당류 옥시다아제; 헤테로시클릭 옥시다아제; 락토펜록시다아제; 마이크로페록시다아제; 바이오틴; 애비딘; 회전 표지; 박테리오파지 표지; 안정한 자유 라디칼; 선택적으로 플루오레신, 로다민, 단실, 움벨리페론, 루시페라아제, 루시페린, 및 2,3-디히드로프탈라진디온으로부터 선택되는 형광단; 및 선택적으로 ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{188}Rh , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, ^{99}Tc , ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb , ^{206}Bi , 및 ^{213}Bi 로부터 선택되는 방사활성 제제로부터 선택되는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편을 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 9

제8항의 단리된 핵산을 포함하는 단리된 세포.

청구항 10

항체 분자 또는 항원 결합 단편의 제조를 허용하는 조건 하에 제9항의 세포를 배양하여 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편을 제조하는 단계를 포함하는, 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 11

제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편의 경쇄 및 중쇄 가변 영역들 중 하나 또는 둘 모두를 인코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 단리된 벡터.

청구항 12

생물학적 표본을 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계 및 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편이 생물학적 표본 내의 GCC 분자에 결합하는지를 결정하는 단계를 포함하는, 생물학적 표본 내의 GCC 분자의 시험관 내 검출 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, GCC 분자를 검출하는 것은 면역조직화학 분석을 포함하는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 생물학적 표본은 GCC-발현 암으로부터 유래된 종양 생검 표본이고, 암은 선택적으로 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암, 연조직 육종, 신경외배엽 종양 및 신경내분비 종양으로부터 선택되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

- (a) 폐암이 편평상피세포 암종 또는 선암종이거나;
- (b) 연조직 육종이 평활근육종 또는 횡문근육종이거나;
- (c) 신경내분비 종양이 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양인, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 생물학적 표본 중 첨단 GCC 발현을 정량하는 단계, 생물학적 표본 중 세포질 GCC 발현을 정량하는 단계, 또는 둘 다를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 정량하는 것은 H-스코어 접근을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편, 및 생물학적 표본에서 GCC 분자를 검출하는 데에 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편을 사용하기 위한 지침을 포함하는, 생물학적 표본 내의 GCC 분자를 검출하기 위한 키트.

청구항 19

제1항에 있어서,

- i) 표본을 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편과 접촉시킴으로써 환자로부터 수득한 암 세포의 표본에서 GCC 발현을 검출하는 단계; 및
- ii) 암 세포가 GCC를 발현하는 경우, GCC-표적화 치료법을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 GCC-발현 암을 치료하는 데에 사용하기 위한, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 20

제19항에 있어서, GCC-발현 암은 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암, 연조직 육종, 신경외배엽 종양 및 신경내분비 종양으로부터 선택되는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 21

제20항에 있어서,

- (a) 폐암이 편평상피세포 암종 또는 선암종이거나;
 - (b) 연조직 육종이 평활근육종 또는 횡문근육종이거나;
 - (c) 신경내분비 종양이 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양인,
- 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 22

제19항에 있어서, GCC-표적화 치료법이 치료 항-GCC 항체 분자를 포함하는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 치료 항-GCC 항체 분자는 각각 서열 번호 67, 68, 및 69의 아미노산 서열을 포함하는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역들 (HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3) 및 각각 서열 번호 70, 71, 및 72의 아미노산 서열을 포함하는 3개의 경쇄 상보성 결정 영역들 (LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함하는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 24

제22항에 있어서, 치료 항-GCC 항체 분자는 서열 번호 79의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 80의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 치료 항-GCC 항체 분자는 세포독성제에 콘주게이션되는, 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편.

청구항 26

생물학적 표본 및 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편을 포함하는 반응 혼합물로서, 상기 생물학적 표본은 하나 이상의 세포들을 포함하거나, 상기 생물학적 표본은 조직 표본을 포함하는, 반응 혼합물.

청구항 27

제26항에 있어서, 생물학적 표본은 일차 또는 전이성 종양 생검 표본인, 반응 혼합물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 종양 생검 표본은 결직장 종양, 위 종양, 소장 종양, 식도 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 연조직 육종, 신경외배엽 종양 및 신경내분비 종양 표본으로부터 선택되는, 반응 혼합물.

청구항 29

제28항에 있어서,

- (a) 폐 종양이 편평상피세포 암종 또는 선암종이거나;
 - (b) 연조직 육종이 평활근육종 또는 횡문근육종이거나;
 - (c) 신경내분비 종양이 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양인,
- 반응 혼합물.

청구항 30

제26항에 있어서, 생물학적 표본 내 GCC 단백질 및 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편 간 복합체 형성을 검

출하기 적합한 시약을 추가로 포함하는, 반응 혼합물.

청구항 31

i) 하나 이상의 암 세포들을 포함하는 생물학적 표본을 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; 및

ii) 생물학적 표본 내의 GCC 단백질 및 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편 간 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하고, 복합체 형성이 암 세포가 GCC-표적화 치료법에 민감성임을 나타내는,

하나 이상의 암 세포의 GCC-표적화 치료법에 대한 민감성을 결정하기 위한 시험관 내 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 복합체의 형성을 검출하는 단계는 면역조직화학 분석을 포함하는, 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 복합체의 형성을 검출하는 단계는 생물학적 표본 내에 GCC 단백질의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 생물학적 표본 내에 GCC 단백질의 존재는 암 세포가 GCC-표적화 치료법에 반응성임을 나타내는, 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 암 세포는 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암, 연조직 육종, 신경외배엽 종양 및 신경내분비 종양 세포로부터 선택되는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,

(a) 폐암이 편평상피세포 암종 또는 선암종이거나;

(b) 연조직 육종이 평활근육종 또는 횡문근육종이거나;

(c) 신경내분비 종양이 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양인,

방법.

청구항 37

i) GCC-발현 암으로부터 유래된 하나 이상의 암 세포들을 포함하는 생물학적 표본을 제1항의 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;

ii) 생물학적 표본 내의 GCC 단백질 및 항-GCC 항체 분자 또는 항원 결합 단편 간 복합체 형성을 검출하는 단계;

iii) 검출된 복합체로부터 생물학적 표본 내의 GCC 발현을 정량하는 단계;

iv) 생물학적 표본 내의 결정된 GCC 발현 수준을 정상 GCC 발현 수준의 데이터베이스에 대해 비교하는 단계; 및

v) GCC-표적화 치료법 및, 선택적으로, 생물학적 표본 내의 결정된 GCC 발현 수준에 근거한 투여 요법을 선택하는 단계

를 포함하는, 개인별 암 치료 보고서를 생성하기 위한 시험관 내 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 복합체의 형성을 검출하는 단계는 면역조직화학 분석을 포함하는, 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, GCC 발현을 정량하는 단계는 생물학적 표본 중 침단 GCC 발현을 정량하는 단계, 생물학적 표본 중 세포질 GCC 발현을 정량하는 단계, 또는 둘 다를 포함하는, 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, GCC 발현을 정량하는 단계는 H-스코어 접근을 포함하는, 방법.

청구항 41

제37항에 있어서, GCC-발현 암은 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암, 연조직 육종, 신경외배엽 종양 및 신경내분비 종양으로부터 선택되는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서,

- (a) 폐암이 편평상피세포 암종 또는 선암종이거나;
 - (b) 연조직 육종이 평활근육종 또는 횡문근육종이거나;
 - (c) 신경내분비 종양이 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양인,
- 방법.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2012. 4. 27에 출원한 U.S. 가출원 일련 번호 61/639,376의 이익 및 이에 대한 우선권을 청구한다. U.S. 가출원 일련 번호 61/639,376의 전체 내용은 본원에 참조로 도입된다.

[0003] 발명 분야

[0004] 본 발명은 GCC에 결합하는 항체 분자, 및 GCC-표적화 치료법, 예컨대 치료제와 같은 제제에 콘주게이트된 항-GCC 항체 분자, 또는 이들의 단편을 함유하는 면역콘주게이트를 이용한 치료에 대해 환자를 선택하기 위한 그 이용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 구아닐릴 사이클라아제 C("GCC")는 장액, 전해질 항상성 및 세포 증식의 유지에 작용하는 막통과 세포 표면 수용체이며, 예로 [Carrithers 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020(2003)]을 참고하라. GCC는 소장, 대장 및 직장 내층의 점막 세포에서 발현된다(Carrithers 등, Dis Colon Rectum 39: 171-181(1996)). GCC 발현은 장 상피 세포의 신생물 전환 시 유지되며 모든 일차 및 전이성 결직장 종양에서 발현된다(Carrithers 등, Dis Colon Rectum 39: 171-181(1996); Buc 등, Eur J Cancer 41: 1618-1627(2005); Carrithers 등, Gastroenterology 107: 1653-1661(1994)).

발명의 내용

[0006] 요약

[0007] 본 개시는 적어도 부분적으로 신규한 항-GCC 항체의 발견에 근거한다. 따라서 하나의 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 항-GCC 항체 분자를 특징으로 한다. 항-GCC 항체 분자는 네이키드 항체 분자로서 그리고 면역콘주게이트의 성분으로서 유용하다. 따라서 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 치료제 또는 표지를 포함하는 면역콘주게이트를 특징으로 한다. 본 발명은 또한, 예로 GCC를 발현하는 세포 또는 조직 및 GCC의 검출을 위한, 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 면역콘주게이트의 이용 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 특히, GCC-매개 질환의 진단, 예후, 조영, 또는 단계결정에 유용하다. 따라서 일부 측면에서, 본 발명은 GCC-표적화 치료법, 예로 항-GCC 항체 치료법, 예로 치료제와 콘주게이트된 항-GCC 항체를 포함하는 면역콘주게이트를 이용한 치료를 위한 대상체의 확인 방법을 특징으로 한다. 본 발명은 또한 암을 갖는 대상체가 GCC-표적화 치료법, 예로 본원에 기재된 GCC-표적화 치료법에 대한 잠재 후보인지에 대한 시험관 내 또는 생체 내 결정 방법을 특징으로 한다.

[0008] 항-GCC 항체, 예로 본원에 기재된 항-GCC 항체는 또한 GCC 단백질의 활성 또는 기능의 조절; 및 본원에 기재된

바와 같은 GCC-매개 질환의 치료에 유용하다. 일부 측면에서, 치료에는 GCC 발현 수준을 결정하기 위한 지식의 획득 및/또는 표본 또는 대상체의 평가, 그리고 대상체가 GCC를 발현하는 경우 GCC-표적화 치료법, 예로 본원에 기재된 GCC 표적화 치료법의 투여가 포함된다. 다른 측면에서, 상기 방법은 대상체에서 표본을 수득하고, 예로 본원에 기재된 항-GCC 항체를 이용하여 본원에 기재된 검출 방법에 의해 GCC 발현 수준을 결정하고, 상기 결정에 근거하여 대상체에 대한 표적화 치료 보고서를 선택함으로써, 개인별 치료 보고서, 예로 GCC 표적화 치료 보고서를 생성하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 항-GCC 항체 분자 아미노산 서열을 인코딩하는 단리된 및/또는 재조합 핵산 뿐만 아니라 이러한 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 그리고 항-GCC 항체 분자의 제조 방법을 특징으로 한다. 또한 본원에서는 항-GCC 항체를 포함하는 반응 혼합물 및 키트, 예로 본원에 기재된 면역콘주게이트뿐만 아니라, 예로 본원에 기재된 항-GCC 항체를 포함하는, GCC 발현을 검출하기 위한 시험관 내 분석을 특징으로 한다.

[0010] 본원에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 이들의 전문이 참조로 도입된다.

[0011] 본원에 개시된 본 발명(들)의 다른 특징, 목적 및 장점은 설명 및 도면 그리고 특허청구범위로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 인간 GCC(hGCC) 세포외 도메인(ECD) 마우스 Fc(mFc) 융합 단백질(hGCC-ECD-mFc)을 생성하는데 이용된 단백질 발현 벡터의 원형 지도이다.

도 2a-2d는 GCC-표적화 면역콘주게이트의 I상 임상 시험인 C26001 연구에 등록을 위해 스크리닝된 암 환자에서 종양 유형에 걸쳐 GCC 발현의 조합/집합(침단 및 세포질) H 스코어 분포를 요약하는 막대 그래프를 나타낸다. 도 2a는 스크리닝된 결직장암 환자에 걸쳐 조합된 집합 H 스코어 분포를 나타내며; 도 2b는 스크리닝된 위암 환자에 걸쳐 조합된 집합 H 스코어 분포를 나타내며; 도 2c는 스크리닝된 췌장암 환자에 걸쳐 조합된 집합 H 스코어 분포를 나타내며; 도 2d는 스크리닝된 식도암 환자에 걸쳐 조합된 집합 H 스코어 분포를 나타낸다.

도 3a-3c는 스크리닝된 다양한 종양 특이적 마이크로어레이에 걸쳐 GCC 발현의 조합/집합(침단 및 세포질) H 스코어 분포를 요약하는 막대 그래프를 나타낸다. 도 3a는 GCC 발현에 대해 스크리닝된 다양한 결직장 종양 마이크로어레이 상에서 표본에 걸친 조합/집합 H 스코어 분포를 나타내며; 도 3b는 GCC 발현에 대해 스크리닝된 위 종양 마이크로어레이 상에서 표본에 걸친 조합/집합 H 스코어 분포를 나타내며; 도 3c는 GCC 발현에 대해 스크리닝된 다양한 췌장 종양 마이크로어레이 상에서 표본에 걸친 조합/집합 H 스코어 분포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 상세한 설명

[0014] 구아닐릴 사이클라아제 C(GCC)(STAR, ST 수용체, GUC2C, 및 GUCY2C로도 알려져 있음)는 장액, 전해질 항상성 및 세포 증식의 유지에 작용하는 막통과 세포 표면 수용체이다(각각 그 전문이 본원에 참조로 도입된 Carrithers 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3018-3020(2003); Mann 등, *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466(1997); Pitari 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2695-2699(2003)); GenBank 접근 번호 NM_004963). 상기 기능은 구아닐린의 결합을 통해 매개된다(Wiegand 등, *FEBS Lett.* 311:150-154(1992)). GCC는 또한 *E. coli*뿐만 아니라 다른 감염성 개체에 의해 생성되는 펩티딘 열저항 장독소(ST, 예로 서열 목록 번호 1의 아미노산 서열 NTFYCCCLCCNPACAGCY를 가짐)에 대한 수용체이다(Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93(1985); Knoop F. C. and Owens, M. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72(1992)). ST의 GCC로의 결합은 장 질환, 예로 설사를 일으키는 신호 캐스케이드를 활성화한다.

[0015] 인간 GCC에 대한 뉴클레오타이드 서열(GenBank 접근 번호 NM_004963; 서열 목록 번호 2):

```

1 gaccagagag aagcgtgggg aagagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg
61 gattccctgc ctccctagga gcccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt
121 ctaacgtgat tggggtcatg aagacgttgc tgttgactt ggctttgtgg tcaactgctc
181 tccagcccggt gtggctgtcc tttagtcccc aggtgagtca gaactgccac aatggcagct
241 atgaaatcag cgtcctgatg atgggcaact cagcctttgc agagccctg aaaaacttgg
301 aagatgcggt gaatgagggg ctggaatag tgagaggacg tctgcaaat gctggcctaa
361 atgtgactgt gaacgtactt ttcatgtatt cggatgggtc gattcataac tcaggcgact
421 gccggagtag cacctgtgaa ggcctcgacc tactcaggaa aatttcaaat gcacaacgga
481 tgggctgtgt cctcataggg ccctcatgta catactccac ctccagatg taccttgaca
541 cagaattgag ctaccccatg atctcagctg gaagttttgg attgtcatgt gactataaag
601 aaaccttaac caggctgatg tctccagcta gaaagtgtat gtacttcttg gtttaacttt
661 ggaaaaccaa cgatctgccc ttcaaaactt attcctggag cacttcgtat gtttacaaga
721 atggtacaga aactgaggac tgtttctggt accttaatgc tctggaggct agcgtttcct
781 atttctccca cgaactcgcc tttaaggtgg tgtaagaca agataaggag tttcaggata
841 tcttaatgga ccacaacagg aaaagcaatg tgattattat gtgtggtggt ccagagttcc

```

[0016]

```

901 tctacaagct gaaggggtgac cgagcagtgg ctgaagacat tgtcattatt ctagtggatc
961 ttttcaatga ccagtacttt gaggacaatg tcacagcccc tgactatatg aaaaatgtcc
1021 ttgttctgac gctgtctcct ggaattccc ttctaaatag ctctttctcc aggaatctat
1081 caccaacaaa acgagacttt gctcttgctt attgaatgg aatcctgtct tttggacata
1141 tgctgaagat atttcttgaa aatggagaaa atattaccac ccccaattt gctcatgctt
1201 tcaggaatct cacttttgaa gggatgacg gtccagtac cttggatgac tggggggatg
1261 ttgacagtac catggtgctt ctgtatacct ctgtggacac caagaaatc aaggttcttt
1321 tgacctatga taccacgta aataagacct atcctgtgga tatgagcccc acattcactt
1381 ggaagaactc taaacttcct aatgatatta caggccgggg ccctcagatc ctgatgattg
1441 cagtcttcac cctcactgga gctgtggtgc tgctcctgct cgctcgtctc ctgatgctca
1501 gaaaatatag aaaagattat gaacttcgtc agaaaaaatg gtccacatt cctcctgaaa
1561 atatctttcc tctggagacc aatgagacca atcatgttag cctcaagatc gatgatgaca
1621 aaagacgaga tacaatccag agactacgac agtgcaata cgacaaaag cgagtgatcc
1681 tcaaagatct caagcacaat gatgtaatt tcaactgaaa acagaagata gaattgaaca
1741 agttgcttca gattgactat tacaacctga ccaagttcta cggcacagtg aaacttgata
1801 ccatgatctt cggggtgata gaatactgtg agagaggatc cctccgggaa gttttaaatg
1861 acacaatttc ctaccctgat ggcacattca tggattggga gtttaagatc tctgtcttgt
1921 atgacattgc taagggaatg tcatatctgc actccagtaa gacagaagtc catggtcgtc
1981 tgaaatctac caactgcgta gtggacagta gaatggtggt gaagatcact gattttggct
2041 gcaattccat tttacctcca aaaaaggacc tgtggacagc tccagagcac ctccccaag
2101 ccaacatctc tcagaaagga gatgtgtaca gctatgggat catcgcacag gagatcatcc
2161 tgcggaagaa aaccttctac actttgagct gtcgggaccg gaatgagaag attttcagag
2221 tggaaaatcc caatggaatg aaacccttcc gccagatgtt attcttgaa acagcagagg
2281 aaaaagagct agaagtgtac ctacttgtaa aaaactgttg ggaggaagat ccagaaaaga
2341 gaccagattt caaaaaaatt gagactacac ttgccagat atttgactt tttcatgacc
2401 aaaaaaatga aagctatatg gataccttga tccgacgtct acagctatat tctcgaaacc
2461 tgggaacatct ggtagaggaa aggacacagc tgtacaaggc agagagggac agggctgaca
2521 gacttaactt tatgttgctt ccaaggctag tggtaaagtc tctgaaggag aaaggctttg
2581 tggagccgga actatatgag gaagttacaa tctacttcag tgacattgta ggtttcacta
2641 ctatctgcaa atacagcacc cccatggaag tggaggacat gcttaatgac atctataaga
2701 gttttgacca cattgttgat catcatgatg tctacaaggt ggaaccatc ggtgatgcgt
2761 acatggtggc tagtggtttg cctaagagaa atggcaatcg gcatgcaata gacattgcca
2821 agatggcctt gaaaatctc agcttcattg ggaccttga gctggagcat cttcctggcc
2881 tcccaatatg gattcgcat ggagttcact ctggtccctg tgctgctgga gttgtgggaa
2941 tcaagatgcc tcgttattgt ctatttgag atacggtaac cacagcctct aggatggaat

```

[0017]

3001 ccaactggcct ccctttgaga attcacgtga gtggctccac catagccatc ctgaagagaa
3061 ctgagtgcc gttcctttat gaagtgaag gagaaacata cttaaaggga agaggaaatg
3121 agactaccta ctggctgact gggatgaagg accagaaatt caacctgcc acccctccta
3181 ctgtggagaa tcaacacgct ttgcaagcag aattttcaga catgattgcc aactctttac
3241 agaaaagaca ggcagcaggg ataagaagcc aaaaaccag acgggtagcc agctataaaa
3301 aaggcactct ggaatacttg cagctgaata ccacagacaa ggagagcacc tattttttaa

[0018]

[0019]

인간 GCC에 대한 아미노산 서열(GenPept 접근 번호 NP_004954; 서열 목록 번호 3):

1 mktllldlal wslfqpgwl sfssqvsqnc hngsyseisvl mmgnsafaep lknledavne
61 gleivrglrq naglnvtvna tfmysdglh nsdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli
121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktncl
181 pfktywstws yyvkngtete dcfwylnale asvsyfshef gfkvvlrqdk efqdlmdhn
241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvltlts
301 pgnsllnssf srnlspkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnrltf
361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvms ptftwknskl
421 pnditgrgqp ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckydk krvilkdldk ndgnfteqk ielnkllqid
541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
601 msylhsskte vhgrlksnc vdsrmvki tdfgcnsilp pkddlwtape hlrqanisqk
661 gdvysygiia qeillrketf ytlscdrne kifrvnsng mkpfrpdlfl etaeekelev
721 yllvknwcee dpekrpdkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve
781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvksk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkrrngnrha idiakmalei
901 lsfmgtfele hlpplpiwir igvhsqpcap gvgikmpy clfgdvtnta srmetglpl
961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetyk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqg
1021 rlqaeafsdmi anslqkrqaa girsqkprv asykggtley lqlnttdkes tyf

[0020]

[0021]

GCC 단백질은 그 각각이 GCC 분자에 대해 구분가능한 기능에 기여하는 일부 일반적으로 허용되는 도메인을 갖는다. 일부 GCC에는 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 1 내지 약 잔기 23, 또는 잔기 1 내지 약 잔기 21의 신호 서열(단백질을 세포 표면으로 보내기 위한 것)(성숙을 위해 절단되어 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 약 22 또는 24 내지 1073의 기능적 성숙 단백질을 생성함), 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 약 24 내지 잔기 약 420, 또는 잔기 약 54 내지 잔기 약 384의, 리간드, 예로 구아닐린 또는 ST 결합을 위한 세포외 도메인, 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 약 431 내지 잔기 약 454, 또는 잔기 약 436 내지 잔기 약 452의 막통과 도메인, 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 약 489 내지 잔기 약 749, 또는 잔기 약 508 내지 잔기 약 745의 티로신 키나아제 활성을 갖는 것으로 예측되는 키나아제 상동성 도메인, 및 서열 목록 번호 3의 잔기 약 750 내지 잔기 약 1007, 또는 잔기 약 816 내지 잔기 약 1002의 구아닐릴 사이클라아제 촉매 도메인이 포함된다.

[0022]

정상 인간 조직에서, GCC는 점막 세포, 예로 침단 술가장자리 막, 소장, 대장 및 직장의 내층에서 발견된다(Carrithers 등, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181(1996)). GCC 발현은 장 상피 세포의 신생물 전환 시 유지되며 모든 일차 및 전이성 결직장 종양에서 발견된다(Carrithers 등, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181(1996); Buc 등, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627(2005); Carrithers 등, *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994)). 위, 식도 및 위식도 접합부의 신생물 세포도 GCC를 발현한다(예로, U.S. 특허 번호 6,767,704; Debruyne 등, *Gastroenterology* 130:1191-1206(2006) 참고). 조직-특이적 발현 및 암, 예로 위장관 유래 암(예로, 결직장암, 위암, 식도암 또는 소장암)과의 연관이 상기 질환에 대한 진단 마커로서의 GCC 용도에 대해 탐색될 수 있다(Carrithers 등, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181(1996); Buc 등, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627(2005)). 또한 본원에서 실시예에 나타난 바와 같이, 비제한적으로 췌장암, 폐암, 연조직 육종(예로, 평활근육종 및 횡문근육종), 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양, 및 신경외배엽 종양을 포함하는 위장관에서 유래되지 않은 몇몇 상이한 유형의 암이 GCC를 발현하는 것으로 나타났다.

[0023]

세포 표면 단백질로서, GCC는 또한 수용체 결합 단백질, 예컨대 항체 또는 리간드에 대한 진단 또는 치료 표적으로 작용할 수 있다. 정상 장 조직에서, GCC는 내강 내 환경 및 혈관 구획 간 불투과 장벽을 형성하는 상피 세포 치밀 접합부의 침단쪽에서 발견된다(Almenoff 등, *Mol Microbiol* 8: 865-873; Guarino 등, *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026(1987)). 이와 같이, GCC-결합 단백질 치료제의 전신 정맥내 투여는 장 GCC 수용체에 최소의 효과를 가질 것인 반면, 침습성 또는 전이성 결장암 세포, 장의 또는 전이성 결장 종양, 식도 종양 또는 위 종양,

위식도 접합부에서의 선암종을 포함하는 위장관계의 신생물 세포에 접근할 수 있다. 또한, GCC는 리간드 결합 시 수용체 매개 세포내 섭취를 통해 내면화된다(Buc 등, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627(2005); Urbanski 등, *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36(1995)).

[0024] GCC의 세포의 도메인에 대해 생성된 폴리클로날 항체(Nandi 등, *Protein Expr. Purif.* 8:151-159(1996))는 인간 및 래트 GCC에 대한 ST 펩티드 결합을 저해하고 인간 GCC에 의한 ST 매개 cGMP 생성을 저해할 수 있었다.

[0025] GCC는 결합암을 포함하는 암에 관여되는 단백질로 분석되었다. 또한 [Carrithers 등, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181(1996); Buc 등, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627(2005); Carrithers 등, *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994); Urbanski 등, *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36(1995)]를 참고하라. 따라서 GCC에 대해 생성된 항체 분자는 GCC-발현 암성 세포를 저해하기 위해 콘주게이트되지 않은 형태로 단독 이용될 수 있다. 또한, GCC에 대해 생성된 항체 분자는 GCC-발현 암성 세포를 검출하기 위해 네이키드 또는 표지된 형태로 이용될 수 있다. 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 인간 GCC에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC에 대한 리간드, 예로 구아닐린 또는 열저항 장독소의 결합을 저해할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC에 대한 리간드, 예로 구아닐린 또는 열저항 장독소의 결합을 저해하지 않는다.

[0026] GCC에 특이적인 모노클로날 항체에는 GCC:B10(Nandi 등, *J. Cell. Biochem.* 66:500-511(1997)), GCC:4D7(Vijayachandra 등, *Biochemistry* 39:16075-16083(2000)) 및 GCC:C8(Bakre 등, *Eur. J. Biochem.* 267:179-187(2000))이 포함된다. GCC:B10은 카파 경쇄 및 IgG2a 이소형을 가지며, 래트, 돼지 및 원숭이 GCC와 교차 반응한다. GCC:B10은 GCC의 세포내 도메인의 최초 63 아미노산에, 특히 서열 목록 번호 3의 잔기 470-480에 결합한다(Nandi 등, *Protein Sci.* 7:2175-2183(1998)). GCC:4D7은 GCC의 잔기 491-568 내에서 키나아제 상동성 도메인에 결합한다(Bhandari 등, *Biochemistry* 40:9196-9206(2001)). GCC:C8은 GCC의 세포질 부분에서 단백질 키나아제-유사 도메인에 결합한다.

[0027] 정의

[0028] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에 연관되어 이용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 일반적으로 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성화에 연관된 및 그 기법에서 이용되는 명명법은 당분야에 공지된 것이다. GenBank 또는 GenPept 접근 번호 그리고 유용한 핵산 및 펩티드 서열은 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnological Information, Bethesda Md)에서 유지되는 웹사이트에서 찾아볼 수 있다. 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양과 형질전환 및 전달감염(예로, 전기천공, 지질감염)을 위한 표준 기법이 이용된다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조업체의 명세에 따라 또는 당분야에서 일반적으로 수행되는 대로 또는 본원에 기재된 대로 수행된다. 상기 기법 및 절차는 일반적으로 당분야에 공지된 방법에 따라, 예로 다양한 일반 참고문헌 및 본 명세서에 걸쳐 언급되고 논의되는 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 대로 수행된다. 예로 [Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2000))]을 참고하거나 일반적으로 [Harlow, E. and Lane, D.(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]를 참고하라. 본원에 기재된 것에 연관되어, 그리고 그 실험실 절차 및 기법에 이용되는 명명법은 당분야에 공지되어 있다. 또한 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어에는 복수가 포함되며, 복수 용어에는 단수가 포함된다.

[0029] 본원에서 이용되는 용어 "항체 분자"는 항체, 항체 펩티드(들) 또는 면역글로불린, 또는 임의의 상기의, 예로 항체의 항원 결합 단편을 나타낸다. 항체 분자에는 단일쇄 항체 분자, 예로 scFv(예로, Bird 등(1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참고), 및 단일 도메인 항체 분자(예로 W09404678 참고)가 포함된다. 용어 "항체 분자" 내는 아니지만, 본 발명에는 또한 특이적 항원 결합을 제공하기 위해 CDR을 이용하는 "항체 유사체(들)", 다른 비항체 분자 단백질-기반 골격, 예로 융합 단백질 및/또는 면역콘주게이트가 포함된다.

[0030] "항-GCC 항체 분자"는, 예로 GCC, 예로 인간 GCC와 상호작용하거나 이를 인식하는, 예로 이에 결합하는(예로 특이적으로 결합하는) 항체 분자(즉, 항체, 항체의 항원-결합 단편 또는 항체 유사체)를 나타낸다. 예시적인 항-GCC 항체 분자는, 예컨대 표 1 및 2에 요약된 것이다.

[0031] 본원에서 이용되는 용어 "항체", "항체 펩티드(들)" 또는 "면역글로불린"은 단일쇄, 2쇄, 및 다중쇄 단백질 및 당단백질을 나타낸다. 용어 항체에는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, CDR-이식 및 인간 또는 인간화 항체가

포함되며, 그 모두는 본원에서 다른 곳에서 보다 상세히 논의된다. 또한 용어 내에는 카멜리드 항체(예로, US2005/0037421 참고), 및 나노바디(예로, IgNAR(상어 항체), 예로, W003/014161 참고)가 포함된다. 용어 "항체"에는 또한 합성 및 유전적으로 조작된 변이체가 포함된다.

[0032] 본원에서 이용되는 용어 "항체 단편" 또는 항체의 "항원 결합 단편"은, 예로 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 단일쇄 항체, 기능적 중쇄 항체(나노바디)뿐만 아니라 특이적 결합에 대해 온전한 항체와 경쟁하는 적어도 하나의 원하는 에피토프에 대해 특이성을 갖는 항체의 임의의 부분(예로, 에피토프에 특이적으로 결합하기 충분한 CDR 서열을 갖고 충분한 틀 서열을 갖는 단편)을 나타낸다. 예로, 항원 결합 단편은 단편이 유래하는 항체에 결합하는 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있다. 본 문맥 및 유사 문맥에서 이용되는 유래는 유래의 임의의 특정 방법 또는 공정을 시사하는 것이 아니며, 단순히 서열 유사성을 나타낼 수 있다. 항원 결합 단편은 재조합 기법, 또는 온전한 항체의 효소 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 용어 항원 결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체의 단일쇄, 예로 중쇄와 함께 이용되는 경우, 사슬의 단편이 다른 사슬, 예로 경쇄의 전체 가변 영역과 페어를 이루기 충분함을 의미하며, 이는 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 나타나는 것의 적어도 25, 50, 75, 85 또는 90% 결합을 허용할 것이다.

[0033] 본원에서 이용되는 용어 "CDR의 항원 결합 배열" 또는 "결합을 허용하기 충분한 수의 CDR"(및 유사 언어)은 틀에 배치되고 다른 사슬의 전체 가변 영역 또는 유사한 길이 및 동일한 수의 CDR을 갖는 다른 사슬, 예로 경쇄의 가변 영역의 일부와 페어를 이룬 경우, 전체 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 나타나는 것의 적어도 25, 50, 75, 85 또는 90% 결합을 허용할 사슬, 예로 중쇄의 충분한 CDR을 나타낸다.

[0034] 본원에서 이용되는 용어 "인간화 항체"는 부모 항체의 항원 결합 특성을 보유하거나 실질적으로 보유하지만 인간에서 면역원성이 더 적은 비인간 항체, 예로 토끼, 설치류(예로, 쥐과), 양 또는 염소 유래의 항체를 나타낸다. 본원에서 이용되는 인간화는 탈면역화 항체를 포함하려는 것이다. 전형적으로, 인간화 항체에는 비인간 CDR 및 인간 또는 인간 유래 틀 및 불변 영역이 포함된다.

[0035] 본원에서 이용되는 용어 "개질" 항체는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체, 예컨대 숙주 세포 내로 전달감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합 조합 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입된 비인간 동물(예로, 토끼, 마우스, 래트, 양 또는 염소)에서 단리된 항체, 또는 다른 DNA 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱이 관여되는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 나타낸다. 이러한 개질 항체에는 인간화, CDR 이식(예로, 제1 항체의 CDR 및 상이한 원천, 예로 제2 항체의 틀 영역 또는 공통 틀을 갖는 항체), 키메라, 시험관 내 생성(예로, 파지 디스플레이에 의한) 항체가 포함되며, 선택적으로 인간 생식계열 면역글로불린 서열 또는 인간 면역글로불린 유전자에서 유래된 가변 또는 불변 영역 또는 대안적 면역글로불린 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱이 관여되는 임의의 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체가 포함될 수 있다. 구현예에서, 개질 항체 분자에는 참조 항체에서 서열 변화를 갖는 항체 분자가 포함된다.

[0036] 용어 "1특이적 항체"는 특정 에피토프에 대해 하나의 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 항체 또는 항체 조제물을 나타낸다. 상이 용어에는 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조제물"이 포함된다.

[0037] 용어 "2특이적 항체" 또는 "2기능적 항체"는 두 에피토프에 대해 이중 결합 특이성을 나타내며, 각각의 결합 부위가 상이하고 상이한 에피토프를 인식하는 항체를 나타낸다.

[0038] 용어 "콘주게이트되지 않은 항체" 및 "네이키드 항체"는 상호 교환적으로 이용되어 비항체 부분, 예로 제제 또는 표지에 콘주게이트되지 않은 항체 분자를 나타낸다.

[0039] 각각의 용어 "면역콘주게이트", "항체-약물 콘주게이트" 및 "항체 콘주게이트"는 상호 교환적으로 이용되며, 비항체 부분, 예로 제제 또는 표지에 콘주게이트된 항체를 나타낸다. 본원에서 이용되는 용어 "제제"는 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질에서 제조된 추출물을 표시한다. 용어 "치료제"는 생물학적 활성을 갖는 제제를 나타낸다. 예시적인 치료제는 화학치료제이다.

[0040] 본원에서 이용되는 용어 "항암제" 또는 "화학치료제"는 인간에서 신생물, 특히 악성(암성) 병소, 예컨대 암종, 육종, 림프종, 또는 백혈병의 발생 또는 진행 저해의 기능적 특성을 갖는 제제를 나타낸다. 전이 또는 혈관신생의 저해는 종종 항암제 또는 화학치료제의 특성이다. 화학치료제는 세포독성 또는 세포증식억제 제제일 수 있다. 용어 "세포증식억제 제제"는 세포 성장 및/또는 세포 증식을 저해 또는 억제하는 제제를 나타낸다.

[0041] "세포독성제"는 비제한적으로 알킬화 제제, 종양 괴사 인자 저해제, 중격제, 미세관 저해제, 키나아제 저해제,

프로테아좀 저해제 및 토포이소머라아제 저해제를 포함하는, 주로 세포 기능을 직접 방해하여 세포 사멸을 유도하는 화합물을 나타낸다. 본원에서 이용되는 "독성 페이로드"는 세포에 전달되는 경우, 세포 사멸을 일으키는 충분한 양의 세포독성제를 나타낸다. 독성 페이로드의 전달은 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편 및 세포독성제를 포함하는 충분한 양의 면역콘주게이트의 투여에 의해 달성될 수 있다. 독성 페이로드의 전달은 또한 세포독성제를 포함하는 충분한 양의 면역콘주게이트의 투여에 의해 달성될 수 있고, 여기서 면역콘주게이트는 본 발명의 항체 또는 항원 결합 단편을 인식하고 결합하는 이차 항체 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0042] 본원에서 이용되는 문구인 "에서 유래한" 또는 "지정된 서열에 특이적인" 서열은 지정된 서열의 인접 영역에 대응하는, 즉 동일하거나 상보적인 대략 적어도 6 뉴클레오타이드 또는 적어도 2 아미노산, 적어도 약 9 뉴클레오타이드 또는 적어도 3 아미노산, 적어도 약 10-12 뉴클레오타이드 또는 4 아미노산, 또는 적어도 약 15-21 뉴클레오타이드 또는 5-7 아미노산의 인접 서열을 포함하는 서열을 나타낸다. 특정 구현예에서, 서열은 지정된 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 모두 포함한다. 서열은 당분야에 공지된 기법에 의해 결정되는 특정 서열에 독특한 서열 영역에 상보적이거나(폴리뉴클레오타이드 서열의 경우) 또는 동일할 수 있다. 서열이 유래될 수 있는 영역에는 비제한적으로 특정 에피토프를 인코딩하는 영역, CDR을 인코딩하는 영역, 틀 서열을 인코딩하는 영역, 불변 도메인을 인코딩하는 영역, 가변 도메인 영역을 인코딩하는 영역뿐만 아니라 미변역 및/또는 미전사 영역이 포함된다. 유래 서열은 반드시 연구 중인 관심 서열에서 물리적으로 유래되지 않고, 비제한적으로 폴리뉴클레오타이드가 유래되는 영역(들)에서 염기 서열에 의해 제공되는 정보에 기반하여 화학적 합성, 복제, 역전사 또는 전사를 포함하는 임의 방식으로 생성될 수 있다. 이와 같이, 원래 폴리뉴클레오타이드의 센스 또는 안티센스 배향을 나타낼 수 있다. 또한, 지정된 서열에 대응하는 영역의 조합은 목적 용도와 일치하도록 당분야에 공지된 방식으로 개질 또는 조합될 수 있다. 예를 들어, 서열은 각각 지정된 서열의 일부를 포함하고 지정된 서열과 동일하지 않은 영역으로 단속되지만 지정된 서열에서 유래하는 서열을 나타내기 위한 것인 둘 이상의 인접 서열을 포함할 수 있다. 항체 분자에 있어서, "에서 유래된"에는 비교 항체에 기능적으로 또는 구조적으로 관련된 항체 분자가 포함된다, 예로 "에서 유래된"에는 유사하거나 실질적으로 동일한 서열 또는 구조를 갖는, 예로 동일하거나 유사한 CDR, 틀 또는 가변 영역을 갖는 항체 분자가 포함된다. 또한 항체에 있어서 "에서 유래된"에는 인접하거나 인접하지 않을 수 있지만, 변호지정 방식, 일반적 항체 구조 또는 3차원 인접성에 대한 상동성에 따라 정의되거나 확인되는, 즉 비교 서열의 CDR 또는 틀 영역 내인 잔기, 예로 하나 이상의, 예로, 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 초과 잔기가 포함된다. 용어 "에서 유래된"은 유래된 곳을 물리적으로 제한하지는 않지만, 임의 방식으로, 예로 또 다른 항체를 설계하기 위해 비교 항체로부터의 서열 정보를 이용하는 생성이 포함된다.

[0043] 본원에서 이용되는 문구 "에 의해 인코딩된"은 폴리펩티드 서열을 코딩하는 핵산 서열을 나타내며, 여기서 폴리펩티드 서열 또는 이들의 일부는 상기 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 적어도 3 내지 5 아미노산, 적어도 8 내지 10 아미노산, 또는 적어도 15 내지 20 아미노산의 아미노산 서열을 함유한다.

[0044] 또한 일반적으로 결장암 또는 대장암으로 알려져 있는 본원에서 이용되는 용어 "결직장암"은 결장 또는 직장(대장의 일부) 또는 충수에서 조절되지 않는 세포 성장으로 인한 암을 나타낸다.

[0045] 용어 "위 암" 및 "위암"은 본원에서 상호 교환적으로 이용된다.

[0046] 두 서열 간 "상동성"의 계산은 하기와 같이 수행될 수 있다. 서열은 최적 비교 목적을 위해 정렬된다(예로, 최적 정렬을 위해 제 1 및 제 2 아미노산 또는 핵산 서열의 하나 또는 둘 다에 갭이 도입될 수 있고, 비상동성 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 비교 목적을 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열 길이의 적어도 30%, 40%, 또는 50%, 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 이어서 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 비교된다. 제 1 서열에서의 위치가 제 2 서열에서 대응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드로 점유된 경우, 분자는 해당 위치에서 동일하다(본원에서 이용되는 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등함). 두 서열 간 동일성 백분율은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 갭의 수 및 각 갭의 길이를 고려하여, 서열에서 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0047] 서열 비교 및 두 서열 간 상동성 백분율의 결정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다. 두 아미노산 서열 간 상동성 백분율은 당분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, [Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453(1970)]의 알고리즘은 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 이용하여 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램 내로 도입되었다. 두 뉴클레오타이드 서열 간의 상동성 백분율은 또한 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70, 또는 80 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 이용하여 GCG 소프

트웨어 패키지(Accelrys, Inc. San Diego, Calif.)에서 GAP 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 상동성 결정을 위한 예시적인 파라미터 세트는 겹 패널티 12, 겹 연장 패널티 4 및 틀 이동 겹 패널티 5를 이용한 Blossum 62 스코어링 매트릭스이다.

[0048] 본원에서 이용되는 용어 "엄격한 조건 하에 혼성화하는"은 혼성화 및 세척 조건을 설명한다. 혼성화 반응의 수행을 위한 지침은 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6]에서 찾아볼 수 있다. 상기 참고문헌에 수성 및 비수성 방법이 기재되며, 어느 것이든 이용될 수 있다. 본원에서 나타내는 구체적 혼성화 조건은 다음과 같다: 1) 낮은 엄격성 혼성화 조건은 약 45℃에서 6X 나트륨 클로라이드/나트륨 시트레이트(SSC)에 이어 적어도 50℃(낮은 엄격성 조건에 있어서 세척 온도는 55℃까지 증가될 수 있음)에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중에 2회 세척; 2) 중간 엄격성 혼성화 조건은 약 45℃에서 6X SSC에 이어 60℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중에 1회 이상 세척; 3) 높은 엄격성 혼성화 조건은 약 45℃에서 6X SSC에 이어 65℃에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중에 1회 이상 세척; 및 4) 매우 높은 엄격성 혼성화 조건은 65℃에서 0.5M 나트륨 포스페이트, 7% SDS에 이어 65℃에서 0.2X SSC, 1% SDS에서 1회 이상 세척. 매우 높은 엄격성 조건(4)이 종종 바람직한 조건이며, 달리 명시되지 않는 한 이용되어야 하는 것이다.

[0049] 본 발명의 항체 및 이들의 항원 결합 단편은 폴리펩티드 기능에 실질적인 효과를 갖지 않는 추가적인 보존적 또는 비필수 아미노산 치환을 가질 수 있음이 이해된다. 특정 치환이 관용될 것인지 아닌지, 즉 원하는 생물학적 특성, 예컨대 결합 활성에 부정적으로 영향을 미칠지 아닌지는 [Bowie, J U 등, *Science* 247:1306-1310(1990) 또는 Padlan 등, *FASEB J.* 9:133-139(1995)]에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 당분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리에는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분기형 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(예로, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다.

[0050] "비필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 없애지 않고 또는 실질적으로 변형시키지 않고 결합체, 예로 항체의 야생형 서열에서 변형될 수 있는 잔기인 반면, "필수" 아미노산 잔기는 그러한 변화를 일으킨다. 항체에서, 필수 아미노산 잔기는 특이성 결정 잔기(SDR)일 수 있다.

[0051] 본원에서 이용되는 용어 "단리된"은 그 원래 환경(예로, 천연 생성된 경우 자연 환경)에서 제거된 물질을 나타낸다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 천연 생성 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 단리된 것이 아니지만, 자연계의 공존 물질의 일부 또는 전부에서 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 DNA 또는 폴리펩티드는 단리된 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드는 조성물, 예로 혼합물, 용액 또는 현탁액의 일부이거나 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 포함하는 단리된 세포 또는 배양된 세포를 포함할 수 있고, 여전히 벡터 또는 조성물이 그 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 단리된 것이다.

[0052] 본원에서 이용되는 용어 "복제단위"는 세포 내에서 폴리뉴클레오타이드 복제의 자동 단위로 거동하는 임의의 유전 성분, 예컨대 플라스미드, 염색체 또는 바이러스를 나타낸다.

[0053] 본원에서 이용되는 용어 "작동가능하게 연결된"은 기재된 성분이 이들이 목적 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 놓인 상황을 나타낸다. 따라서 예를 들어, 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과의 호환 조건 하에 달성되도록 하는 방식으로 결합된다.

[0054] 본원에서 이용되는 용어 "벡터"는 또 다른 폴리뉴클레오타이드 분절이, 예컨대 부착된 분절의 복제 및/또는 발현을 가져오도록 부착된 복제단위를 나타낸다.

[0055] 본원에서 이용되는 용어 "조절 서열"은 이것이 결합된 코딩 서열의 발현을 수행하는데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 개체에 따라 다르다. 원핵생물에서, 이러한 조절 서열에는 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 종료자, 그리고 일부 경우에서 인핸서가 포함된다. 따라서 용어 "조절 서열"은 최소한 그 존재가 발현을 위해 필요한 모든 성분을 포함하려는 것이며, 또한 그 존재가 유리한 추가적 성분, 예를 들어 리더 서열이 포함될 수 있다.

[0056] 본원에서 이용되는 용어 "정제 산물"은 산물이 정상적으로 연관되고/연관되거나 관심 표본에 존재할 수 있는 다

른 유형의 세포의 세포 성분으로부터 분리된 산물의 조제물을 나타낸다.

[0057] 본원에서 이용되는 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정기를 나타낸다. 에피토프 결정기는 일반적으로 분자의 화학적 활성 표면기, 예컨대 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되며, 일반적으로 특정 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특정한 전하 특징을 갖는다. 일부 에피토프는 선형 에피토프인 반면 다른 것들은 입체형태 에피토프이다. 선형 에피토프는 인접 아미노산 일차 서열이 인식되는 에피토프를 포함하는 에피토프이다. 선형 에피토프에는 전형적으로 적어도 3, 보다 일반적으로 적어도 5, 예를 들어 약 8 내지 약 10 인접 아미노산이 포함된다. 입체형태 에피토프는 예컨대 적어도 두 상황에서 일어날 수 있다: a) 예로, 리간드 결합에 따라 또는 신호전달 분자에 의한 개질(예로 인산화)에 따라 특정 단백질 입체형태에서만 항체 결합에 대해 노출되는 선형 서열; 또는 b) 2 이상의 서브유닛으로부터 다중서브유닛 단백질에서 또는 단백질의 2 이상의 부분에서의 구조 특징의 조합(여기서 특징은 결합에 참여하기 위해 3차원 공간에서 충분히 가까이 근접함).

[0058] 본원에서 이용되는 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 인코딩되는 항체 클래스(예로, IgM, IgA, IgE 또는 IgG)를 나타낸다.

[0059] 본원에서 이용되는 용어 "검출가능한 체제", "표지" 또는 "표지된"은 폴리펩티드 또는 당단백질 상의 검출가능한 마커의 도입을 나타내기 위해 이용된다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법이 당분야에 공지되어 있고 이용될 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예에는 비제한적으로 하기가 포함된다: 방사선 동위원소 또는 방사선 핵종(예로, 인듐(^{111}In), 요오드(^{131}I 또는 ^{125}I), 이트륨(^{90}Y), 루테튬(^{177}Lu), 액티늄(^{225}Ac), 비스무스(^{212}Bi 또는 ^{213}Bi), 황(^{35}S), 탄소(^{14}C), 삼중수소(^3H), 로듐(^{188}Rh), 테크네튬($^{99\text{m}}\text{Tc}$), 프라세오디뮴, 또는 인(^{32}P) 또는 양전자-방출 방사선 핵종, 예로, 탄소-11(^{11}C), 칼륨-40(^{40}K), 질소-13(^{13}N), 산소-15(^{15}O), 불소-18(^{18}F), 갈륨-68(^{68}Ga), 및 요오드-121(^{121}I)), 형광 표지(예로, FITC, 로다민, 란탄계 인광체), 효소 표지(예로, 홀스래디쉬 페록시다아제, 베타-갈락토시다아제, 루시페라아제, 알칼린 포스파타아제), 화학발광, 바이오터닐기(표지된 애비딘, 예로 스트렙타비딘 부분 및 광학 또는 비색 방법에 의해 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 분자에 의해 검출될 수 있음), 및 2차 리포터(예로 류신 지퍼 페어 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그)에 의해 인식되는 소정 폴리펩티드 에피토프. 일부 구현예에서, 표지는 잠재적인 입체 장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암에 의해 부착된다.

[0060] 본원에서 이용되는 "특이적 결합", "특이적으로 결합하는" 또는 "결합 특이성"은 항-GCC 항체 분자에 있어서, 항체 분자가 비-GCC 단백질, 예로 BSA에 대한 것보다 더 큰 친화도로 GCC, 예로 인간 GCC 단백질에 결합함을 의미한다. 전형적으로 항-GCC 분자는 GCC, 예로 인간 GCC 단백질에 대한 그 K_d 의 2배 초과, 10배 초과, 100배 초과, 1000배 초과, 10^4 배 초과, 10^5 배 초과, 또는 10^6 배 초과인 비-GCC 단백질, 예로 BSA에 대한 K_d 를 가질 것이다. K_d 의 결정에 있어서, GCC 및 비-GCC 단백질, 예로 BSA에 대한 K_d 는 동일한 조건 하에 수행되어야 한다.

[0061] 용어 "친화도" 또는 "결합 친화도"는 겉보기 연합 상수 또는 K_a 를 나타낸다. K_a 는 해리 상수(K_d)의 역수이다. 항체는, 예를 들어 특정한 표적 분자에 대해 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 및 10^{11}M^{-1} 의 결합 친화도를 가질 수 있다. 제2 표적 대비 제1 표적에 대한 항체의 더 높은 친화도의 결합은 제2 표적 결합을 위한 K_A (또는 수치값 K_D)에 비해 제1 표적 결합을 위해 더 높은 K_A (또는 수치값 K_D)로 나타낼 수 있다. 이러한 경우, 항체는 제2 표적(제2 입체형태의 동일한 단백질 또는 이들의 모사체; 또는 제2 단백질)에 비해 제1 표적(예로 제1 입체형태의 단백질 또는 이들의 모사체)에 대해 특이성을 갖는다. 결합 친화도(예로, 특이성 또는 다른 비교)의 차이는 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 또는 10^5 배일 수 있다.

[0062] 결합 친화도는 평형 투석, 평형 결합, 겔 여과, ELISA, 표면 19 작용 cc 공명, 또는 분광측정(예로, 형광 분석 이용)을 포함하는 다양한 방법으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 항-GCC 항체 분자의 상대 친화도는 GCC 발현 세포를 이용한 FACS 측정에 의해 GCC 단백질(예로, 항-GCC 항체 분자를 생성하기 위해 이용된 변역원)에 대한 ELISA 측정에서 측정될 수 있다.

[0063] 결합 친화도를 평가하기 위한 예시적인 조건은 TRIS-완충액(50mM TRIS, 150mM NaCl, 5mM CaCl_2 , pH7.5) 중이다. 이들 기법은 결합 단백질(또는 표적) 농도의 함수로서 결합 및 자유 결합 단백질의 농도를 측정하는데 이용될 수 있다. 결합된 결합 단백질의 농도([결합])는 자유 결합 단백질의 농도([자유]) 및 표적 상 결합 단백질에

대한 결합 부위의 농도(N)에 관련되며, 여기서 (N)은 하기 공식에 의한 표적 분자 당 결합 부위의 수이다:

$$[\text{결합}] = N \cdot [\text{자유}] / ((1/K_A) + [\text{자유}]).$$

정확한 K_A 결정을 수행하는 것이 항상 필요하지만 않지만, 때때로 ELISA 또는 FACS 분석과 같은 방법을 이용하여 결정된 친화도의 정량적 측정을 수득하는 것으로 충분하고 K_A 에 비례하기 때문에, 비교를 위해, 예컨대 더 높은, 예로 2배 더 높은 친화도가 친화도의 정량적 측정을 수득하는지 또는, 예로 시험관 내 또는 생체 내 분석과 같은 기능적 분석에서의 활성에 의해 친화도 참조를 수득하게 하는지를 결정하기 위해 이용될 수 있다. 항-GCC 항체 분자의 친화도는 또한 기술, 예컨대 실시간 생체분자 상호작용 분석(Biomolecular Interaction Analysis, BIA)을 이용하여 측정될 수 있다(예로, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 및 Szabo 등, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 참고). 본원에서 이용되는 "BIA" 또는 "표면 플라스몬 공명"은 임의 상호작용물의 표지화 없이 실시간으로 생체특이적 상호작용을 연구하기 위한 기술(예로, BIACORE™)이다. 결합 표면에서의 질량 변화(결합 사건의 지표)는 표면 근처의 광 굴절을 변경을 가져와서(표면 플라스몬 공명(SPR) 광학 현상) 생물학적 분자 간 실시간 반응의 지표로 이용될 수 있는 검출가능한 신호를 생성한다.

BIACORE™ T100 시스템(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)을 이용한 항-GCC 항체 분자의 친화도 측정은 그 본문이 참조로 도입된 U.S. 특허 출원 공개 번호 US2011/0110936의 실시예 1에 기재되어 있다. 간략하게, 항-GCC 항체(Prep A)가 10mM 나트륨 아세테이트, pH 4.0 중에 적절한 농도(예로, 20 μ g/mL)로 희석되고 참조/대조군 항체(Prep B)가 10mM 나트륨 아세테이트, pH 4.0 중 적절한 농도(예로, 10 μ g/mL)로 희석된다. 각각의 항체는 표준 아민 커플링을 이용하여 몇몇 CM4 BIACORE 칩에 공유 고정된다. 제조된 각각의 CM4 칩에 있어서, Prep A 항체를 약 75-100RU에서 2개의 플로우 셀에 걸쳐 고정하는 반면, Prep B 항체는 약 70-80RU에서 하나의 플로우 셀로 고정한다. 각 CM4 칩의 나머지 네 번째 플로우 셀을 참조 플로우 셀로 이용한다. GCC 단백질 농도는 [Pace 등, Protein Science, 4:2411(1995), 및 Pace and Grimsley, Current Protocols in Protein Science 3.1.1-3.1.9(2003)]에 상세히 기재된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 각각의 제조된 CM4 칩에 있어서, GCC 단백질을 202nM-1.6nM의 농도 범위에서 2분 동안 주입한 뒤(2회 연속 희석) 7분 해리시킨다. 표본을 이중 참조를 위해 분산된 몇몇 완충액 주입 사이클로 3개씩 무작위 주입한다. 보다 유의미한 오프율 감쇠 데이터를 수득하기 위해, 3개의 추가적인 101nM GCC 단백질 주입 및 3개의 추가적 완충액 주입을 2분 주입 및 4시간 해리 시간으로 수행한다. 모든 실험에 있어서 100 μ l/분의 유속을 이용하고 모든 표면을 10mM 글리신-HCl(pH 2.0)의 20초 펄스로 재생시킨다. 모든 표본을 100 μ g/mL BSA가 첨가된 수행 완충액(예로 Hepes-완충 식염수, 0.005% 폴리소르베이트 20, pH 7.4(HBS-P)) 중에 제조한다. 모든 센소그램(표면 플라스몬 공명 대 시간의 그래프) 데이터를 Scrubber 2.0 소프트웨어(BioLogic 소프트웨어, Campbell, Australia)로 가공하고 CLAMP™ 소프트웨어를 이용한 질량 전달 상수 k_m 에 대한 용어를 포함하는 1:1 상호작용 모델에 전반적으로 피팅할 수 있다(Myszka and Morton Trends Biochem. Sci. 23:149-150(1998)).

본원에서 이용되는 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 대상체, 예로 환자에 대한 항-GCC 항체 분자의 투여로서, 또는 예로 대상체로 복구되는 대상체로부터의 단리된 조직 또는 세포로의 적용에 의한 투여로서 정의된다. 항-GCC 항체 분자는 단독으로 또는 제2 제제와의 조합으로 투여될 수 있다. 치료는 장애, 장애의 증상 또는 장애, 예로 암에 대한 소인을 해결, 치유, 해소, 완화, 변경, 구제, 개량, 경감, 개선 또는 영향을 미치기 위한 것일 수 있다. 이론에 구애받고자 하지 않고, 치료는 시험관 내 또는 생체 내에서 세포의 저해, 절제 또는 사멸을 야기하거나 또는 다르게는 세포, 예로 비정상 세포의 장애, 예로 본원에 기재된 바와 같은 장애(예로 암)를 매개하는 능력을 감소시키기 위한 것으로 여겨진다.

본원에서 이용되는 용어 "대상체"는 포유류, 영장류, 인간 및 비-인간 동물을 포함하려는 것이다. 예를 들어, 대상체는 적어도 일부 세포가 GCC를 발현하는 암, 예컨대 위장관 유래의 암(예로, 결직장암, 위암, 소장암, 또는 식도암), 췌장암, 폐암(예로, 편평상피세포 암종, 선형평상피 암종, 선암종), 연조직 육종(예로, 평활근육종 또는 횡문근육종), 신경내분비 종양(예로, 위장관 또는 기관지폐), 또는 신경외배엽 종양; 이러한 GCC 발현 암의 증상; 또는 이러한 GCC-발현 암에 대한 소인을 갖는 환자(예로, 인간 환자 또는 수의과 환자)일 수 있다. 또 다른 예로서, 대상체는 위장관계의 적어도 일부 세포가 GCC를 발현하는, 예컨대 염증성 장 증후군, 크론병 및 변비에서와 같은 위장관 장애를 갖는 환자일 수 있다. 또 다른 예로서, 대상체는 환자의 중추 신경계 내에서 적어도 일부 뉴런이 GCC를 발현하는 신경학적 장애, 예컨대 파킨슨병을 갖는 환자일 수 있다. 본 발명의 용어 "비-인간 동물"에는, 달리 주지되지 않는 한, 모든 비-인간 척추동물, 예로 비-인간 포유류 및 비-포유류, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류, 마우스, 래트, 토끼 또는 염소 등이 포함된다. 하나

의 구현예에서, "대상체"는 마우스, 래트, 토끼 또는 염소 중 하나 이상 또는 전부를 배제한다.

[0069] 본원에서 이용되는 장애를 치료하기 "유효한" 또는 "충분한" 항-GCC 항체 분자의 양 또는 "치료 유효량" 또는 "치료 충분량"은 대상체에 단위 또는 다회 용량 투여 시, 세포, 예로 암 세포(예로, GCC-발현 종양 세포)의 치료 또는 이러한 치료 부재 시 예상되는 것을 넘어서는 본원에 기재된 바와 같은 장애를 갖는 대상체의 연장된 해결, 해소, 완화 또는 개선에 유효한 항체 분자의 양을 나타낸다. 본원에서 이용되는 종양 또는 암의 "성장 저해"는 그 성장 및/또는 전이의 완화, 방해, 휴지 또는 정지를 나타내며, 종양 성장의 전체 제거를 나타내야 하는 것은 아니다.

[0070] 본원에서 이용되는 "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" 또는 "ST 수용체" 단백질로도 알려져 있는 "GCC"는 포유류 GCC, 바람직하게는 인간 GCC 단백질을 나타낸다. 인간 GCC는 서열 목록 번호 3에 나타난 단백질 및 이들의 천연 생성 대립유전자 단백질 변이체를 나타낸다. 서열 목록 번호 3의 대립유전자는 서열 목록 번호 2에 나타난 GCC의 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다. 다른 변이체는 당분야에 공지되어 있다. 예로, 잔기 281에 류신을 갖는 European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute, Ensembl 데이터베이스의 접근 번호 Ensp0000261170; 공개된 US 특허 출원 번호 20060035852의 서열 목록 번호 14; 또는 GenBank 접근 번호 AAB 19934를 참고하라. 전형적으로, 천연 생성 대립유전자 변이체는 서열 목록 번호 3의 GCC 서열과 적어도 95%, 97% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 전사체는 1073 아미노산의 단백질 산물을 인코딩하며 GenBank 접근 번호: NM_004963에 기재되어 있다. GCC 단백질은 막통과 세포 표면 수용체 단백질로 분석되며, 장액, 전해질 항상성 및 세포 증식의 유지에 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다.

[0071] **항-GCC 항체**

[0072] 특허 GCC 발현을 검출하는데 유용한 항-GCC 항체 분자가 본원에 기재된다. 예로, GCC 검출에 유용한 항-GCC 항체 분자에는 GCC에 특이적으로, 예로 GCC에 대해 적어도 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 및 $10^{11} M^{-1}$ 의 결합 친화도로 결합하는 비-인간 항-GCC 항체 분자(예로, 비-인간 및 비-쥐과 항체 분자)가 포함될 수 있다. 항-GCC 항체 분자는 비-인간, 비-쥐과 및 비-래트 항체 분자, 예로 본원에 기재된 바와 같은 토끼 항-GCC 항체 분자일 수 있다.

[0073] 특정 측면에서, 본 발명은 특징, 예컨대 표 1 및 2에 요약된 것들을 포함하는 항-GCC 항체 분자에 관한 것이다. 다른 측면에서, 본 발명은, 특징, 예컨대 표 3, 4, 5 및/또는 6에 요약된 것들을 포함하는 항-GCC 항체 분자에 관한 것이다.

[0074] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 토끼 하이브리도마 항체이며 항체 MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4 중 하나이다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 항체 MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4에서 유래된다.

[0075] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는, 예로 직접 결합 또는 경쟁 결합 분석에 의해 측정되는 GCC에 대한 친화도를 가질 것이다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 $1 \times 10^{-6} M$ 미만, $1 \times 10^{-7} M$ 미만, $1 \times 10^{-8} M$ 미만, $1 \times 10^{-9} M$ 미만, $1 \times 10^{-10} M$ 미만, $1 \times 10^{-11} M$ 미만, $1 \times 10^{-12} M$ 미만, 또는 $1 \times 10^{-13} M$ 미만의 K_d 를 갖는다. 하나의 구현예에서, 항체 분자는 IgG, 또는 이들의 항원-결합 단편이고, $1 \times 10^{-6} M$ 미만, $1 \times 10^{-7} M$ 미만, $1 \times 10^{-8} M$ 미만, 또는 $1 \times 10^{-9} M$ 미만의 K_d 를 갖는다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자, 예로 MIL-44-148-2 항체 또는 이들에서 유래된 항체는 약 80 내지 약 200pM, 바람직하게는 약 100 내지 약 150pM 또는 약 120pM의 K_d 를 갖는다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자, 예로 MIL-44-148-2 항체 또는 이들에서 유래된 항체는 약 0.9 내지 약 $1.25 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, 바람직하게는 약 $1.1 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 의 k_a 를 갖는다. 하나의 구현예에서, 항체 분자는 ScFv이고 $1 \times 10^{-6} M$ 미만, $1 \times 10^{-7} M$ 미만, $1 \times 10^{-8} M$ 미만, $1 \times 10^{-9} M$ 미만, $1 \times 10^{-10} M$ 미만, $1 \times 10^{-11} M$ 미만, $1 \times 10^{-12} M$ 미만, 또는 $1 \times 10^{-13} M$ 미만의 K_d 를 갖는다.

[0076] 구현예에서, 항체 분자는 면역곤주게이트가 아니며, 즉 "네이키드"이며, 구현예에서 GCC로의 결합 시 세포 반응을 유도한다. 관련 구현예에서, 세포 반응은 항체가 결합하는 GCC-발현 세포에 의해 수행된다. 이러한 세포 반응은, 예로 항체 분자가 GCC의 작용제인 경우 GCC에 의해 매개되는 신호 전달일 수 있다(예로, US 특허 출원 공개 번호 US20040258687 참고). 다른 구현예에서, 세포 반응은 제1 세포 상에서 GCC에 결합된 항체 분자를 인식하는 제2 세포, 예로 면역 효과기 세포(예로, 자연 살해 세포)에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 감시 분자, 예로 보체 분자가 세포 반응 전에 GCC-결합 항체 분자와 접촉한다. 이들 구현예에서, 세포 반응은 GCC-발

현 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

- [0077] 추가 구현예에서, 면역곤주게이트인 항체 분자는 GCC에 대한 결합 시 세포 반응을 유도하고 또한 이것이 결합하는 GCC-발현 세포에 제제를 전달하기 위해 내면화할 수 있다.
- [0078] 일부 구현예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC로의 리간드 결합을 차단할 수 있다.
- [0079] 하나의 구현예에서, 항체 분자는 GCC:B10, GCC:4D7 또는 GCC:C8이 아니다. 또 다른 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 455 내지 1073 근처의 GCC의 세포내 도메인에 결합하지 않는다. 예를 들어 상기 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC의 키나아제 상동성 도메인 또는 구아닐릴 사이클라아제 도메인에 결합하지 않는다.
- [0080] 천연 생성 포유류 항체 구조 단위는 사량체로 분류된다. 각각의 사량체는 2쌍의 폴리펩티드쇄로 이루어지며, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50-70kDa)를 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단부에는 주로 항원 인식에 관여하는 약 100 내지 110 또는 그 초과 아미노산의 가변 영역이 포함된다. 각 사슬의 카르복시-말단부는 주로 효과기 기능에 관여하는 불변 영역을 정의한다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류될 수 있다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파 또는 엡실론으로 분류될 수 있고, 항체의 이소형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 정의할 수 있다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12 또는 그 초과 아미노산의 "J" 영역에 의해 연결되며, 중쇄에는 또한 약 10 초과 아미노산의 "D" 영역이 포함된다. 일반적으로 [Fundamental Immunology Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.(1989))]를 참고하라. 각 경쇄/중쇄 페어의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. 항-GCC 항체 분자에 대해 바람직한 이소형은 IgG 면역글로불린이며, 이는 상이한 감마 중쇄를 갖는 4개의 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 분류될 수 있다. 대부분의 치료 항체는 IgG1 이소형의 인간, 키메라, 또는 인간화 항체이다. 특정한 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 토끼 IgG 항체이다.
- [0081] 각각의 중쇄 및 경쇄 페어의 가변 영역은 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서 온전한 IgG 항체는 동일한 2개의 결합 부위를 갖는다. 그러나 2기능적 또는 2특이적 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 페어를 가져서 2개의 상이한 결합 부위를 생성하는 인공 하이브리드 구축물이다.
- [0082] 사슬은 모두 상보성 결정 영역 또는 CDR로도 불리는 3개의 고가변 영역에 의해 연결된 상대적으로 보존된 틀 영역(FR)의 동일한 일반 구조를 나타낸다. 각 페어의 2개 사슬로부터의 CDR은 틀 영역에 의해 정렬되어 특이적 에피토프에 대한 결합이 가능해진다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄는 모두 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각 도메인으로서의 아미노산 정렬은 면역학적 관심 단백질의 Kabat 서열의 정의에 따른다[National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987 및 1991), 또는 Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987); Chothia 등, *Nature* 342:878-883(1989)]. 본원에서 이용되는 CDR은 각각의 중쇄(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 경쇄(LCDR1, LCDR2, LCDR3)를 나타낸다.
- [0083] 항-GCC 항체 분자는 상기 언급된 토끼 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 CDR의 전체 또는 항원 결합 서브세트를 포함할 수 있다. 가변 영역 및 CDR을 포함하는 토끼 하이브리도마 항체의 아미노산 서열은 표 3 및 표 5에서 확인할 수 있다.
- [0084] 따라서 하나의 구현예에서, 항체 분자에는 하기 중 하나 또는 둘 다가 포함된다:
- [0085] (a) 상기 나타난 토끼 하이브리도마 항체 중 하나의 1, 2, 3 또는 항원 결합 개수의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3). 구현예에서, CDR(들)은 하기와 같은 LCDR1-3의 하나 이상 또는 전부의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: LCDR1, 또는 개질 LCDR1(여기서 1 내지 7 아미노산은 보존적으로 치환된다), LCDR2, 또는 개질 LCDR2(여기서 1 또는 2 아미노산은 보존적으로 치환된다); 또는 LCDR3, 또는 개질 LCDR3(여기서 1 또는 2 아미노산은 보존적으로 치환된다); 및
- [0086] (b) 상기 나타난 토끼 하이브리도마 항체 중 하나의 1, 2, 3 또는 항원 결합 개수의 중쇄 CDR(HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3). 구현예에서, CDR(들)은 하기와 같은 HCDR1-3의 하나 이상 또는 전부의 아미노산 서열을 포함할 수 있다: HCDR1, 또는 개질 HCDR1(여기서 1 또는 2 아미노산은 보존적으로 치환된다), HCDR2, 또는 개질 HCDR2(여기서 1 내지 4 아미노산은 보존적으로 치환된다); 또는 HCDR3, 또는 개질 HCDR3(여기서 1 또는 2 아미노산은 보존적으로 치환된다).
- [0087] 항-GCC 항체 분자의 생성에 유용한 면역원에는 GCC, 예로 인간 GCC-발현 세포(예로, 종양 세포주, 예로 T84 세포, 또는 신선 또는 냉동 결장 종양 세포, GCC를 발현하는 제조합 세포); GCC-발현 세포(예로, 결장 종양 세포

주, 예로 T84 세포), 또는 신선 또는 냉동 결장 종양 세포의 막 분획; GCC를 발현하는 재조합 세포; 단리 또는 정제 GCC, 예로 인간 GCC 단백질(예로, 생화학적으로 단리된 GCC, 예로 GCC 또는 이들의 변이체를 발현하는 위 장관 종양 세포 또는 재조합 세포에서 단리된 GCC), 또는 이들의 일부(예로, GCC의 세포외 도메인, GCC의 키나아제 상동성 도메인 또는 GCC의 구아닐릴 사이클라아제 촉매 도메인 또는 예로 서열 목록 번호 3의 적어도 약 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 또는 32 아미노산 잔기를 포함하는, 이들의 일부에 대응하는 펩티드); 또는 서열 목록 번호 46을 포함하거나 신호 서열 없이(즉, 서열 목록 번호 46의 아미노산 잔기 1 내지 약 21 또는 23 없이) 이들의 성숙부를 포함하는 면역원, 예로 성숙 hGCC(ECD)-mIgG2a FcR r-mutII(또한 본원에서 "pLKTOK108" 단백질로 나타냄), 서열 목록 번호 48이 포함된다.

[0088] 면역원은 생화학적 조작, 정제, 면역화 또는 항체 역가 측정을 보조하기 위해 이중성 서열에 융합될 수 있다. 이러한 면역원은 GCC 부분, 예로 세포외 도메인, 및 비-GCC 폴리펩티드를 포함하는 부분을 포함할 수 있다. 고체 지지체, 예로 친화도 컬럼 또는 마이크로타이터 플레이트 또는 다른 적합한 분석 기재/칩 상으로의 고정화 또는 정제의 용이성을 위해 융합 단백질 구축을 위한 여러 옵션이 존재한다. 예를 들어, 융합 부분은 도메인, 예로 글루타치온에 결합할 수 있는 글루타치온-S-트랜스퍼라아제/키나아제(GST); 단백질 A 또는 단백질 G에 결합할 수 있는 면역글로불린의 Fc 영역; 아미노산 잔기, 예로 친화도 컬럼 상에서 니켈 또는 코발트에 결합할 수 있는 2, 3, 4, 5, 바람직하게는 6 히스티딘 잔기; 에피토프 태그, 예로 태그-특이적 항체에 결합할 수 있는 c-myc 종양유전자의 일부(myc-태그), FLAG 태그(U.S. 특허 번호 4,703,004), 헤마글루티닌(HA) 태그, T7 유전자 10 태그, V5 태그, HSV 태그, 또는 VSV-G 태그; 또는 보조인자, 예로 스트렙타비딘에 결합할 수 있는 바이오틴을 추가할 수 있다.

[0089] 면역글로불린의 Fc 부분을 포함하는 면역원은 효율적인 항체 생성을 위해 숙주 면역 감시 성분에 의한 GCC 에피토프의 구조적 접근을 허용하는 배치로 용액 중이나 세포에 부착되어 GCC를 보유할 수 있다. Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄는 사슬 간 디설피드 결합을 통해 이량체로 연합하므로, Fc 영역의 융합으로 생성되는 면역원은 이량체이다. 융합 단백질의 가수는 Fc 영역에 기여하는 면역글로불린의 유형을 반영할 수 있다. 예를 들어, IgG 단백질과의 융합은 이량체일 수 있고, IgA 융합은 사량체성 면역원을 만들 수 있으며, IgM 융합은 12량체 면역원을 만들 수 있고, 후자의 두 경우는 J 사슬의 공-전달감염에 의해 촉진된다. Fc 융합 단백질에 대해 예시적인 면역글로불린은 IgG1이다. 이용되는 부분은 전형적으로 단일 엑손에 의해 인코딩되는 IgG1 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 갖는다. 상기 엑손이 또한 경쇄 시스테인과의 디설피드 결합에 대해 배향된 시스테인을 갖는 CH1 영역 부분을 가지므로, 유용한 개질은 CH1 시스테인을, 예로 세린으로 돌연변이시켜 융합 단백질에서 페어링한 시스테인이 없도록 하는 것이다. 이러한 돌연변이는 또한 힌지의 가요성을 증가시킨다.

[0090] 숙주 종, 예로 마우스, 래트, 토끼, 염소에서 면역화를 위한 면역원에 융합하기 위한 비숙주 종에서 유래된 Fc 부분, 예로 인간 Ig Fc 영역이 보강제로 작용한다. 상기 보강제 기능은 Fc 및 GCC 에피토프 모두에 대해 특이적 항체를 유발할 수 있다. Fc-반응성 항체는 스크리닝 동안 확인되고 폐기될 수 있다. Fc 부분은 야생형 서열 또는 효과기 기능을 개질하기 위해 돌연변이된 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 돌연변이된 불변 영역(변이체)이 융합 단백질 내로 도입되어 Fc 수용체로의 결합 및/또는 보체를 고정하는 능력을 최소화할 수 있다(예로, Winter 등, GB 2,209,757 B; Morrison 등, WO 89/07142; Morgan 등, WO 94/29351 참고). 바람직한 예에서, Fc 영역 기준에 따라 번호가 지정된 라이신 235 및 글리신 237은, 예로 알라닌으로 돌연변이된다. Fc-돌연변이된 IgG를 갖는 면역원/융합 단백질은 숙주에서 Fc 수용체와 감소된 상호작용을 가질 수 있다. 바람직한 가용성 면역원 융합 단백질(신호 펩티드를 절단하기 위한 성숙 및 분비 후)은 돌연변이된 마우스 IgG2a 면역글로불린 Fc(서열 목록 번호 48로 총칭함)에 융합된 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 24 내지 430으로 구성된 hGCC(ECD)-mIgG2a FcR r-mutII(pLKTOK108)이다.

[0091] 세포-발현 면역원을 제조하기 위해, 면역글로불린 부분은 B 세포 수용체의 면역글로불린 부분을 모방하도록 구조화될 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역은 면역 수용체, 예컨대 Fcγ 수용체, Fcα 수용체, Fcα/μ 수용체 또는 Fcε 수용체의 막통과 영역을 포함하는 폴리펩티드에 추가 융합될 수 있다. 세포 표면 상에 적절한 노출을 갖는 이러한 Fc 수용체 세포-결합 면역원의 적절한 배향은 면역원 융합 단백질을 발현하는 세포가 항원 수용체 복합체의 추가 성분, 예로 B 세포 IgM 수용체 또는 IgD 수용체를 추가로 포함하는 경우 개선될 수 있다. 복합체의 적합한 성분에는 면역글로불린(Ig) 싸개 단백질, 예컨대 이중이량체를 형성하는 MB-1 및 B29(IgM 수용체에 대해 CD79A 및 CD79B; Hombach 등, Eur. J. Immunol. 20:2795-2799(1990))가 포함된다. Ig 싸개 단백질은, B 세포 림프종 세포주의 전달감염; 또는 예로 별개의 벡터에서 또는 동일한 벡터에서 싸개 단백질을 이용한 면역원의 공전달감염에 의해 전달감염된 세포에 의해 내인성으로 제공될 수 있다.

[0092] GCC 분자로부터 항-GCC 항체 분자, 예로 본원에 기재된 바와 같은 토끼 모노클로날 항체, 또는 이들의 인간화

버전이 결합할 수 있는 유용한 에피토프, 예로 참조 에피토프는 GCC의 세포의 부분 상에서 찾을 수 있다. 이러한 GCC 에피토프는 세포 표면 상, 예로 세포 외부 상에서 항체 분자에 결합할 수 있다.

- [0093] 예를 들어, 항-GCC 항체 분자에 대한 에피토프는 서열 목록 번호 3의 잔기 1-50 또는 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 결합하는 이들의 단편, 예로, 이들의 MIL-44-148-2-결합 단편으로부터의 잔기 내에 있거나 이를 포함할 수 있다. 이러한 단편은 서열 목록 번호 3의 잔기 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 또는 33-50을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-GCC 항체 분자, 예로 MIL-44-148-2 항체에 대한 에피토프는 잔기 50 밖의 GCC 아미노산 서열, 즉 서열 목록 번호 3의 잔기 약 50 내지 1073에서 선택되는 하나 이상의 추가적 아미노산 잔기를 추가로 포함하는 입체형태 에피토프이다.
- [0094] 이러한 에피토프 또는 세포의 도메인, 예로 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 24 내지 420으로부터의 잔기 내에 있거나 이를 포함하는 에피토프 또는 이들의 참조 부분, 예로 GCC의 잔기 24 내지 75, 75 내지 150, 150 내지 225, 225 내지 300, 300 내지 375 또는 375 내지 420 또는 이들에서 유래된 항체 분자에 대해 생성된 항체는 본원에 기재된 바와 같은 치료 또는 진단 항체로서 유용할 수 있다.
- [0095] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 특성 중 하나 이상을 갖는다:
- [0096] a) 표 1 및 2에 요약된 상기 나타난 항-GCC 항체 분자 중 하나, 예로 토끼 하이브리도마 항체(예로, MIL-44-148-2)와 결합, 예로 세포 표면 GCC 또는 정제 GCC로의 결합에 대해 경쟁한다;
- [0097] b) 표 1 및 2에 요약된 상기 나타난 상기 항-GCC 항체 분자 중 하나, 예로 토끼 하이브리도마 항체(예로, MIL-44-148-2)와 GCC 상에서 동일하거나 실질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 하나의 구현예에서, 항체는 하나 이상의 펩티드 어레이 분석에 의해 또는, 예로 본원에 기재된 분석에서와 같이 세포 표면 또는 막 조제물 상에 발현된 절단 돌연변이체, 키메라 또는 점 돌연변이체에 대한 결합에 의해 결정되는 바와 같이 동일한 에피토프에 결합한다;
- [0098] c) 표 1 및 2에 요약된 상기 나타난 상기 항-GCC 항체 분자 중 하나, 예로 토끼 하이브리도마 항체(예로, MIL-44-148-2)의 에피토프와 공통인 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 또는 20 인접 아미노산 잔기를 갖는 에피토프에 결합한다;
- [0099] d) 본 발명의 항-GCC 항체에 의해 결합되는 인간 GCC의 영역에 결합하며, 여기서 영역, 예로 세포의 또는 세포 질 영역은 길이가 10-15, 10-20, 20-30, 또는 20-40 잔기이고, 결합은, 예로 절단 돌연변이체에 대한 결합에 의해 결정된다; 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 인간 GCC의 세포의 영역에 결합한다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 24 내지 420에 의해 정의되는 세포의 도메인의 인간 GCC 부분에 결합할 수 있다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 서열 목록 번호 3의 아미노산 잔기 931 내지 954에서 구아닐레이트 사이클라아제 특징 부위에 결합할 수 있다; 또는
- [0100] e) 본원에 기재된 참조 에피토프에 결합한다.
- [0101] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC 서열 ILVDFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTL(서열 목록 번호 8)에 결합한다.
- [0102] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 GCC 서열 FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV(서열 목록 번호 9)에 결합한다.
- [0103] 하나의 구현예에서, 항체 분자는 입체형태 에피토프에 결합한다. 다른 구현예에서, 항체 분자는 선형 에피토프에 결합한다.
- [0104] 항-GCC 항체 분자는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 1특이적 항체, 키메라 항체(U.S. 특허 번호 6,020,153 참고) 또는 인간화 항체 또는 이들의 항체 단편 또는 유도체일 수 있다. 상기 중 임의의 합성 및 유전 조작 변이체(U.S. 특허 번호 6,331,415 참고)가 또한 본 발명에 의해 고려된다. 모노클로날 항체는 통상적인 쥐과 모노클로날 항체 방법론(예로, [Kohler and Milstein, Nature 256: 495(1975)]의 표준 체세포 혼성화 기법; 일반적으로, Harlow, E. and Lane, D.(1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y 참고), 및 각각 본원에 이들의 전문이 참조로 도입된 U.S. 특허 7,402,409, 7,429,487, 7,462,697, 7,575,896, 7,732,168, 및 8,062,867에 기재된 Epitomics의 전용 융합 파트너 세포주와 면역화된 토끼로부터 단리된 B 세포를 융합시켜 생성되는 토끼-토끼 하이브리도마를 이용해서 통상적 토끼 모노클로날 항체(RabMab[®])를 생성하는 Epitomics(Burlingame, CA)에서 제공하는 토끼 모노클로날 항체 기술 및 서비스를 포함하는 다양한 기법에 의해 생성될 수 있다.

- [0105] 단백질, 예로 GCC 또는 가용성 부분, 또는 GCC의 일부를 포함하는 융합 단백질(예로, hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII(pLKTOK108)), 또는 이들로부터의 세포 또는 막 분획, 예로 표면 노출된 GCC 또는 이들의 일부(예로, pLKTOK4 산물)를 발현하는 세포를 이용한 면역화는 예로 보강제, 예로 완전 프로인트 보강제를 이용하여 반응을 유도하는 방식으로 주입을 위해 제조된 면역원과 함께 수행될 수 있다. 다른 적합한 보강제에는 Titermax Gold[®] 보강제(CYTRX Corporation, Los Angeles, Calif.) 및 알BUM이 포함된다. 소 캡티드 면역원은 더 큰 분자, 예컨대 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌에 연결될 수 있다. 마우스 또는 토끼는 여러 부위에서, 예로 복강내(i.p.), 꼬리 기부, 또는 발바닥, 또는 조합 부위, 예로 iP 및 꼬리 기부(BIP)에서 여러 방식으로, 예로 피하, 정맥내 또는 근육내 주입될 수 있다. 추가점종 주입에는 동일하거나 상이한 면역원이 포함될 수 있고, 추가적으로 보강제, 예로 불완전 프로인트 보강제가 포함될 수 있다. DNA, 예로 GCC 또는 이들의 일부 또는 GCC 또는 이들의 일부를 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는(예로 hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII를 인코딩하는) DNA를 이용한 면역화는 유전자 총 기술을 이용하여 주입될 수 있다. 예를 들어, DNA는 현미경 금 입자 상에 로딩되고 짧은 기간에 걸쳐 빈번한 간격으로 마우스 또는 토끼에 주입된다.
- [0106] 일반적으로 모노클로날 항체를 원하는 경우, 하이브리도마는 불멸 세포주(예로, 골수종 세포주, 예컨대 SP2/0, P3X63Ag8.653 또는 이중골수종)로부터의 적합한 세포를 항체-생성 세포와 융합시켜 생성된다. 항체 생성 세포는 관심 항원으로 면역화된 인간, 인간-항체 유전자도입 동물 또는 다른 적합한 동물(예로 토끼)의 말초혈, 또는 바람직하게는 비장 또는 림프절에서 수득될 수 있다. 인간 유래 항체(예로 인간 항체)를 생성하는 세포는 적합한 방법, 예를 들어 인간 항체 생성 세포 및 이중골수종 또는 트리오마의 융합, 또는 엡스타인 바 바이러스를 이용한 감염을 통해 활성화된 인간 B 세포의 불멸화(예로, U.S. 특허 번호 6,197,582(Trakht); Niedbala 등, Hybridoma, 17:299-304(1998); Zanella 등, J Immunol Methods, 156:205-215(1992); Gustafsson 등, Hum Antibodies Hybridomas, 2:26-32(1991) 참고)를 이용하여 생성될 수 있다. 융합 또는 불멸화 항체 생성 세포(하이브리도마)는 선택적 배양 조건을 이용하여 단리되고 제한 희석에 의해 클로닝될 수 있다. 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 세포는 적합한 분석을 이용하여(예로, ELISA(예로, 마이크로타이터 웰 상에 고정된 면역원, 예로 hGCC(ECD)-mIgG2a FcRbr-mutII를 이용하여) 또는 GCC 또는 이들의 일부를 발현하는 세포, 예로 pLKTOK4 산물을 발현하는 세포 상 FACS에 의해) 확인될 수 있다. 예를 들어, GCC-면역원이 친화도 시약인 융합 부분을 포함하는 경우, 상기 부분은 GCC 또는 이들의 일부를 포함하는 융합 단백질이 매트릭스, 예로 단백질 G-코팅, 스트렙타비딘-코팅, 글루타치온-유도체화 또는 항체-코팅 마이크로타이터 플레이트 또는 분석 칩에 결합하도록 할 수 있고, 이어서 하이브리도마 또는 항체 발현 재조합 세포로부터의 컨디셔닝 배지 또는 면역 혈청과 조합되고, 혼합물이 복합체 형성에 도움이 되는 조건 하에(예로, 염 및 pH에 대해 생리학적 조건 하에) 인큐베이션된다. 인큐베이션 후, 마이크로타이터 플레이트 웰 또는 칩 셀이 세척되어 임의의 미결합 성분이 제거되고 항-GCC 항체에 의한 결합이 측정된다.
- [0107] 구현예에서, 치료 적용을 위해, 본 발명의 항체는 인간화 항체이다. 인간화 항체의 장점은 이들이 잠재적으로 숙주 수신자에서 항체의 면역원성을 잠재적으로 감소시키거나 제거하여 생체이용률 증가 및 해로운 면역 반응의 가능성 감소를 허용함으로써 잠재적으로 다회 항체 투여를 가능케 한다는 것이다.
- [0108] 개질 항체에는 인간화, 키메라 또는 CDR-이식 항체가 포함된다. 인간 항-마우스 항체(HAMA) 반응은 키메라 또는 다른 인간화 항체의 개발로 이어졌다. 키메라 항체는 인간 불변 영역 및 비-인간 가변 영역을 갖지만, 특히 항체의 만성 또는 다회 용량 이용에서 특정한 인간 항-키메라 항체(HACA) 반응이 관찰될 것으로 예상된다. 이러한 비-인간(예로, 쥐과, 래트, 토끼, 양 또는 염소) 유래 단백질의 존재는 항체의 신속한 제거로 이어질 수 있거나 환자에 의해 항체에 대한 면역 반응의 생성으로 이어질 수 있다. 비-인간 유래 항체의 이용을 회피하기 위해, 항체 서열에 도입된 서열이 인간 항체 서열에 더 가깝게 만들어진 인간화 항체 또는 비인간 종이 완전 인간 서열을 갖는 항체를 생성하도록 비인간 종, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 양 또는 염소 내로 인간 항체 기능의 도입에 의해 생성된 완전 인간 항체가 개발되었다. 인간 항체는 토끼, 설치류, 양 또는 염소 가변 및/또는 불변 영역을 보유하는 항체와 연관된 특정 문제를 회피한다.
- [0109] **인간화 및 디스플레이 기술 및 항체에 대한 개질**
- [0110] 인간화 항체 분자는 비-인간 또는 비-인간-유도된 mAb에 내재적인 면역원성 및 알러지성 반응을 최소화하여 투여된 항체의 유효성 및 안전성을 증가시킬 수 있다. 인간화 항체 분자의 이용은 반복되는 항체 투여를 필요로 하는 만성 및 재발성 인간 질환, 예컨대 염증, 자가면역, 및 암의 치료에서 실질적인 장점을 제공할 수 있다.
- [0111] 감소된 면역원성을 갖는 인간화 항체의 생성은 적절한 라이브러리를 이용하여 인간화 기법 및 디스플레이 기법에 연관되어 달성될 수 있다. 비-인간 종, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 양, 염소 등으로부터의 항체는 당분야

에 공지된 기법을 이용하여 인간화 또는 영장류화될 수 있음이 이해될 것이다. 예로, [Winter and Harris, *Immunol Today* 14:43-46(1993) 및 Wright 등, *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168(1992)]를 참고하라. 관심 항체는 CH1, CH2, CH3, 힌지 도메인, 및/또는 틀 도메인을 대응하는 인간 서열로 치환하기 위해 재조합 DNA 기법에 의해 조작될 수 있다(WO 92/02190 및 U.S. 특허 번호 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350, 및 5,777,085 참고). 또한 키메라 면역글로불린 유전자의 구축을 위한 Ig cDNA의 이용은 당분야에 공지되어 있다(Liu 등, *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3439(1987) 및 J. *Immunol.* 139:3521(1987)). mRNA는 하이브리도마 또는 다른 항체 생성 세포에서 단리되며 cDNA를 생성하는데 이용된다. 관심 cDNA는 특이적 프라이머를 이용하여 폴리머라아제 연쇄 반응에 의해 증폭될 수 있다(U.S. 특허 번호 4,683,195 및 4,683,202).

[0112] 대안적으로, 파지 디스플레이 기술(예로, McCafferty 등, *Nature*, 348:552-553(1990) 참고)을 이용하여 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자에서, 예로 비면역화된 공여자로부터의 레퍼토리에서 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 항체뿐만 아니라 항체 단편을 시험관 내에서 생성할 수 있다. 상기 기법에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 필라멘트성 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주 또는 부 피막 단백질 유전자 내로 인프레임으로 클로닝되고 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이된다. 필라멘트성 입자는 파지 계통의 단일쇄 DNA 사본을 함유하므로, 항체의 기능적 특성에 근거한 선택은 또한 이들 특성을 나타내는 항체를 인코딩하는 유전자의 선택을 야기한다. 따라서 파지는 B 세포의 일부 특성을 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 이들의 리뷰로는, 예로 [Johnson and Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571(1993)]을 참고하라. V-유전자 분절의 몇몇 원천을 파지 디스플레이에 이용할 수 있다. [Clackson 등, *Nature*, 352:624-628(1991)]은 면역화된 마우스의 비장 유래 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고 다양한 어레이의 항원(자가 항원 포함)에 대한 항체가 본질적으로 [Marks 등, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991), 또는 Griffith 등, *EMBO J.*, 12:725-734(1993)]에 기재된 기법에 따라 단리될 수 있다. 또한, U.S. 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905를 참고하라. 디스플레이 라이브러리는 인공 아미노산 서열을 함유하는 항체의 항원-결합 단편 또는 항체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 라이브러리는 인공 CDR(예로, 무작위 아미노산 서열) 및 인간 틀 영역을 함유하는 Fab 단편을 함유할 수 있다(예를 들어, U.S. 특허 번호 6,300,064(Knappik 등) 참고).

[0113] 인간 불변 영역 유전자의 서열은 [Kabat 등(1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H. 공보 번호 91-3242]에서 확인할 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 공지된 클론에서 쉽게 이용가능하다. 이소형의 선택은 원하는 효과기 기능, 예컨대 보체 고정 또는 항체 의존적 세포성 세포독성에서의 활성에 의해 안내될 것이다. 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4일 수 있다. 특정한 구현예에서, 본 발명의 항체 분자는 IgG1 및 IgG2이다. 인간 경쇄 불변 영역 카파 또는 람다가 이용될 수 있다. 이어서 키메라성 인간화 항체는 통상적 방법에 의해 발현된다.

[0114] 일부 구현예에서, 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 GCC 발현 세포, 예로 종양 세포에 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC)을 유도할 수 있다. IgG1 및 IgG3 이소형의 항체는 Fc 수용체에 결합하는 이들의 능력으로 인해, 항체 의존적 세포독성 능력에서 효과기 기능을 야기하는데 유용하다. IgG2 및 IgG4 이소형을 갖는 항체는 이들의 낮은 Fc 수용체 결합 능력으로 인해 ADCC 반응을 최소화하는데 유용하다. 관련 구현예에서, 항체의 Fc 영역에서의 치환 또는, 예로 개질된 진핵생물 세포주에서의 성장에 의한 당화 조성 변화가 수행되어 항-GCC 항체가 결합하는 세포의 세포독성을 인식, 결합 및/또는 매개하는 Fc 수용체의 능력을 증강시킬 수 있다(예로, U.S. 특허 번호 7,317,091, 5,624,821 및 WO 00/42072를 포함하는 공보, Shields 등, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604(2001), Lazar 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010(2006), Satoh 등, *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173(2006) 참고). 특정 구현예에서, 항체 또는 항원-결합 단편(예로, 인간 유래 항체, 인간 항체)에는 기능(예로, 효과기 기능)을 변형시키거나 맞춤화하는 아미노산 치환 또는 대체가 포함될 수 있다. 예를 들어, 인간 유래 불변 영역(예로, $\gamma 1$ 불변 영역, $\gamma 2$ 불변 영역)은 보체 활성화 및/또는 Fc 수용체 결합을 감소시키도록 설계될 수 있다(예를 들어, 그 전체 교시가 본원에 참조로 도입되는 U.S. 특허 번호 5,648,260(Winter 등), 5,624,821(Winter 등) 및 5,834,597(Tso 등) 참고). 바람직하게는, 이러한 아미노산 치환 또는 대체를 함유하는 인간 유래 불변 영역의 아미노산 서열은 인간 유래 미변형 불변 영역의 아미노산 서열에 대해 전장에 걸쳐 적어도 약 95% 동일하고, 보다 바람직하게는 인간 유래 미변형 불변 영역의 아미노산 서열에 대해 전장에 걸쳐 적어도 약 99% 동일하다.

[0115] 또 다른 구현예에서, 효과기 기능은 또한 항체의 당화 패턴 조절에 의해 변형될 수 있다. 변형이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분의 결실 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 당화 부위의 부가를 의

미한다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코오스가 없는 성숙 탄수화물 구조를 갖는 증강된 ADCC 활성의 항체가 U.S. 특허 출원 공개 번호 2003/0157108(Presta)에 기재된다. 또한 U.S. 특허 출원 공개 번호 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)을 참고하라. Glycofi에서는 또한 특정 당형태의 항체를 생성할 수 있는 효모 세포주를 개발하였다.

[0116] 부가적으로 또는 대안적으로, 변형된 유형의 당화를 갖는 항체, 예컨대 감소된 양의 푸코실 잔기를 갖는 저푸코실화 항체 또는 증가된 이분성 GlcNac 구조를 갖는 항체가 생성될 수 있다. 이러한 변형된 당화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 탄수화물 개질은, 예를 들어 변형된 당화 기전을 갖는 숙주 세포 중에서 항체를 발현하여 달성될 수 있다. 변형된 당화 기전을 갖는 세포는 당분야에 기재되었으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현하도록 조작되어 변형된 당화를 갖는 항체를 생성하는 숙주 세포로 이용될 수 있다. 예를 들어, EP 1,176,195(Hang 등)에서는 푸코실 트랜스퍼라아제를 인코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 손상된 세포주가 기재되며, 이러한 세포주에서 발현된 항체는 저푸코실화를 나타낸다. PCT 공보 WO 03/035835(Presta)에서는 Asn(297)-연결 탄수화물에 푸코오스를 부착하는 능력이 감소되어 해당 숙주 세포에서 발현되는 항체의 저푸코실화를 일으키는 변이체 CHO 세포주인 Lec13 세포가 기재된다(또한 Shields, R. L. 등, 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참고). PCT 공보 WO 99/54342(Umana 등)에서는 당단백질 개질 글리코실 프랜스퍼라아제(예로, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III(GnTIII))를 발현하도록 조작되어, 조작된 세포주에서 발현된 항체가 항체의 증가된 ADCC 활성을 야기하는 증가된 이분성 GlcNac 구조를 나타내도록 하는 세포주를 기재한다(또한 Umana 등, 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180 참고).

[0117] 인간화 항체는 또한 CDR-이식 접근을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 인간화 항체의 생성 기법은 당분야에 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 GCC에 결합하는 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 획득하고, 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열에서 상보성 결정 영역 또는 "CDR"을 확인하고, CDR 핵산 서열을 인간 틀 핵산 서열 상에 이식하여 생성된다(예를 들어, U.S. 특허 번호 4,816,567 및 5,225,539 참고). CDR 및 틀 잔기의 위치가 결정될 수 있다(Kabat, E. A. 등(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 공보 번호 91-3242, 및 Chothia, C. 등, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987) 참고). 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자는 표 5 및 6에 기재된 CDR 아미노산 서열 및 CDR을 인코딩하는 핵산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 표 5 및 6의 서열은 본원에 기재된 치료 또는 진단 방법에서 이용하기 위해 GCC를 인식하는 분자 내로 도입될 수 있다. 선택되는 인간 틀은 생체 내 투여에 적합한 것이다, 즉 이들은 면역원성을 나타내지 않는다. 예를 들어, 이러한 결정은 상기 항체의 생체 내 이용 및 아미노산 유사성 연구에 대한 이전 경험에 의해 수행될 수 있다. 적합한 틀 영역은 공여자 항체, 예로 항-GCC 항체 분자(예로, 3G1)의 동등 부분(예로, 틀 영역)의 아미노산 서열 내에서 틀 영역의 길이에 걸쳐 적어도 약 65% 아미노산 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 아미노산 서열 동일성을 갖는 인간 유래 항체에서 선택될 수 있다. 아미노산 서열 동일성은 적합한 아미노산 서열 정렬 알고리즘, 예컨대 CLUSTAL W를 이용하여 다폴트 파라미터를 이용해서 결정될 수 있다(Thompson J. D. 등, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680(1994)).

[0118] 인간화될 클로닝된 항체의 CDR 및 FR이 확인되면, CDR을 인코딩하는 아미노산 서열이 확인되고 대응하는 핵산 서열이 선택된 인간 FR 상에 이식된다. 이는 공지된 프라이머 및 링커를 이용해서 수행될 수 있으며, 그 선택은 당분야에 공지되어 있다. 특정한 인간 항체의 모든 CDR이 비인간 CDR의 적어도 일부로 대체될 수 있거나, 또는 일부 CDR만이 비-인간 CDR로 대체될 수 있다. 소정 항원에 대한 인간화 항체의 결합에 필요한 수의 CDR을 대체하는 것만이 필요하다. 선택된 인간 FR 상에 CDR이 이식된 후, 생성 "인간화" 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열이 발현되어 GCC에 결합하는 인간화 Fv 또는 인간화 항체를 생성한다. 바람직하게는 CDR-이식(예로, 인간화) 항체는 공여자 항체와 유사한, 실질적으로 동일한, 또는 더 우수한 친화도로 GCC 단백질에 결합한다. 전형적으로, 인간화 가변 중쇄 및 경쇄 서열은 인간 불변 도메인 서열과의 융합 단백질로 발현되어 GCC에 결합하는 온전한 항체가 획득된다. 그러나 불변 서열을 함유하지 않는 인간화 Fv 항체가 생성될 수 있다.

[0119] 특정 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 인간화 항체도 본 발명의 범위 내에 있다. 특히, 인간화 항체는, 예컨대 항원에 대한 결합을 개선하기 위해 틀 영역에 아미노산 치환을 가질 수 있다. 예를 들어, 인간화 면역글로불린 사슬의 선택된 소수의 수용기 틀 잔기가 대응하는 공여자 아미노산으로 대체될 수 있다. 치환 위치에는 CDR에 인접하거나 CDR과 상호작용할 수 있는 아미노산 잔기가 포함된다(예로, U.S. 특허 번호 5,585,089 또는 5,859,205 참고). 수용기 틀은 성숙 인간 항체 틀 서열 또는 공통 서열일 수 있다. 본원에서 이용되는 용어 "공통 서열"은 관련 패밀리 구성원 간에 영역 내 서열의 각 위치에서 가장 일반적인 잔기에서 고안되거나 가장 빈번하게 확인되는 서열을 나타낸다. 상이한 서브그룹의 인간 가변 영역의 공통 서열을 포함하는 여러 인간 항

체 공통 서열이 이용가능하다(Kabat, E. A. 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office(1991) 참고). Kabat 데이터베이스 및 그 적용은 온라인에서, 예로 국립 생체기술 정보 센터(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.)의 IgBLAST를 통해 자유롭게 이용가능하다(또한 Johnson, G. and Wu, T. T., Nucleic Acids Research 29:205-206(2001) 참고).

[0120] 항체 인간화를 위한 다른 기법은 1992. 12. 23.에 공개된 Padlan 등의 EP 519596 A1에 기재된다.

[0121] 항-GCC 항체 분자에는 그 내용이 본원에 참조로 도입된 PCT 공보 번호 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 개시된 방법에 의한 "탈면역화" 또는 인간 T 세포 에피토프의 특이적 결실에 의해 또한 개질될 수 있는 다른 인간화 항체가 포함된다. 간략하게, 토끼, 또는 다른 비-인간 종의 항-GCC 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 MHC 클래스 II에 결합하는 펩티드에 대해 분석될 수 있다; 이들 펩티드는 잠재 T-세포 에피토프를 나타낸다. 잠재 T-세포 에피토프의 검출을 위해, "펩티드 스크리닝"으로 명명된 컴퓨터 모델링 접근이 적용될 수 있고, 또한 인간 MHC 클래스 II 결합 펩티드의 데이터베이스가 PCT 공보 번호 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 기재된 바와 같이 토끼 VH 및 VL 서열에 존재하는 모티프에 대해 검색될 수 있다. 이들 모티프는 임의의 18개 주 MHC 클래스 II DR 동종이형에 결합하며, 이에 따라 잠재 T 세포 에피토프를 이룬다. 검출된 잠재 T-세포 에피토프는 가변 영역에서 소수의 아미노산 잔기의 치환에 의해, 또는 바람직하게는 단일 아미노산 치환에 의해 제거될 수 있다. 가능한 한, 종종 배타적이지 않은 보존적 치환이 수행되며, 인간 생식계열 항체 서열에서 상기 위치에 일반적인 아미노산이 이용될 수 있다. 인간 생식계열 서열은 [Tomlinson, I. A. 등, *J. Mol. Biol.* 227:776-798(1992); Cook, G. P. 등, *Immunol. Today* Vol. 16(5): 237-242(1995); Chothia, D. 등, *J. Mol. Bio.* 227:799-817(1992)]에 개시된다. V BASE 디렉토리는 인간 면역글로불린 가변 영역 서열의 통합 디렉토리를 제공한다(Tomlinson에 의해 컴파일됨, I. A. 등, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). 토끼 VH 및 VL 유전자의 돌연변이화에 의해 항-GCC 항체의 탈면역화된 VH 및 VL이 구축된 후, 돌연변이화된 가변 서열은 선택적으로 인간 불변 영역, 예로 인간 IgG1 또는 K(카파) 불변 영역에 융합될 수 있다.

[0122] 다른 구현예에서, CDR-이식 항체에 의한 면역원성 반응의 감소는 변화, 예로 CDR에서의 아미노산 잔기의 결실, 치환에 의해 달성될 수 있다(Kashmiri 등, *Methods* 36:25-34(2005), U.S. 특허 번호 6,818,749, Tan 등, *J. Immunol.* 169:1119-1125(2006)). 예를 들어, 항원과의 접촉에 관여되는 위치에서의 잔기는 바람직하게는 변하지 않을 것이다. 전형적으로, 이러한 잔기 특이성 결정 잔기(SDR)는 항체 중에서 높은 수준의 가변성을 디스플레이하는 위치에 있다. 항-GCC 항체 분자, 예로 본원에 기재된 항체로부터, 예로 Clustal 방법(Higgins D. G. 등, *Meth. Enzymol.* 266:383-402(1996))에 의해 유래되는 공통 서열은 SDR 확인을 돕는다. 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자에서, SDR은 하기의 적어도 첫 번째 잔기이거나, 또는 일부 구현예에서 중쇄 CDR1의 첫 번째 4개 잔기; 중쇄 CDR2의 적어도 N-말단부, 예로 첫 번째 7, 10 또는 13개 잔기; 중쇄 CDR3의 거의 모든 잔기; 경쇄 CDR1의 C-말단부, 예로 잔기 6, 8 또는 9개 이후; 경쇄 CDR2의 첫 번째, 중간 및/또는 마지막 잔기 근처; 및 경쇄 CDR3의 대부분 또는 잔기 2 또는 3개 이후이다. 따라서 항-GCC 항체 분자의 인간화 또는 개질 후 GCC 단백질에 대한 결합을 유지하기 위해, 항-GCC 항체 분자의 CDR에서 이러한 SDR 잔기는 CDR 또는 틀 영역의 다른 잔기에 비해 변화, 예로 토끼 잔기에서 인간 공통 잔기로의 변화에 덜 순응한다. 반대로, 비인간, 예로 토끼 CDR의 잔기를 인간 CDR, 예로 본원에 그 전문이 참조로 도입된 US 공개 특허 출원 번호 20110110936에 기재된 항-GCC 항체 분자의 CDR에 공통으로 확인된 잔기로 변화시키는 것이 유익할 수 있다.

[0123] 온전한 항체가 아닌 항-GCC 항체도 본 발명에서 유용하다. 이러한 항체는 상술된 임의의 항체에서 유래될 수 있다. 상기 유형의 유용한 항체 분자에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward 등, *Nature* 341:544-546(1989)); (vii) VHH 도메인으로 구성된 단일 도메인의 기능적 중쇄 항체(나노바디로 알려져 있음)(예로, Cortez-Retamozo 등, *Cancer Res.* 64: 2853-2857(2004), 및 내부에서 언급된 참고문헌 참고); 및 (vii) 단리된 CDR, 예로 항원 결합 단편을 제공하기 충분한 틀과 함께 하나 이상의 단리된 CDR이 포함된다. 또한 Fv 단편의 두 도메인 VL 및 VH가 별개 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 VL 및 VH 영역이 페어링하여 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬(단일쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음; 예로 Bird 등, *Science* 242:423-426(1988); 및 Huston 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988) 참고)로서 제조될 수 있도록 하는 합성 링커에 의해, 재조합 방법을 이용하여 연결될 수 있다. 이러한 단일쇄 항체도 항체의 용어 "항원-결합 단편" 내에 포괄되는 것이다. 이들 항체 단편은 당분야 숙련자에게 공지된 통상적 기법을 이용하여 수득되며, 단편은 온전한 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다. 항체 단편, 예컨

대 Fv, F(ab')₂ 및 Fab는 온전한 단백질의 절단에 의해, 예로 프로테아제 또는 화학적 절단에 의해 제조될 수 있다.

- [0124] 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 CDR 서열의 일부 또는 전부는 또 다른 항체 분자에서, 예로 CDR-이식, 인간화, 또는 키메라 항체 분자에서 이용될 수 있다.
- [0125] 구현예에는 충분한 CDR, 예로 세포 표면 GCC로의 결합을 허용하기 위해 본원에 기재된 토끼 하이브리도마 항체 중 하나로부터의 모든 6개 CDR을 포함하는 항체 분자가 포함된다.
- [0126] 하나의 구현예에서, CDR, 예로, HCDR의 전부, 또는 LCDR의 전부, 또는 전체 6개는 인간 또는 인간 유래 틀 영역(들)에 임베딩된다. 인간 틀 영역의 예에는 인간 생식계열 틀 서열, 친화도 성숙된(생체 내 또는 시험관 내에서) 인간 생식계열 서열, 또는 합성 인간 서열, 예로 공통 서열이 포함된다. 하나의 구현예에서, 중쇄 틀은 IgG1 또는 IgG2 틀이다. 하나의 구현예에서, 경쇄 틀은 카파 틀이다.
- [0127] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자, 예로 CDR-이식 또는 인간화 항체 분자는 충분한 CDR, 예로 본원에 기재된 항체 중 하나, 예로 GCC에 결합을 허용하기 위해 표 5에 기재된 서열의 모든 6개 CDR을 포함한다(표 5에 기재된 CDR 아미노산 서열을 인코딩할 수 있는 예시적인 핵산 서열이 본원에서 표 6에 제공된다). 특정한 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4로부터의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0128] 생체 내 치료 또는 진단 용도를 위한 항체 단편은 이들의 혈청 반감기를 개선하는 개질에서 이익을 얻을 수 있다. 항체의 생체 내 혈청 반감기를 증가시키기 위해 적합한 유기 부분에는 친수성 중합체(예로, 선형 또는 분기형 중합체(예로, 폴리알칸 글리콜, 에컨대 폴리에틸렌 글리콜, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 등), 탄수화물(예로, 텍스트란, 셀룰로오스, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체(예로, 폴리라이신, 폴리아스파르테이트 등), 폴리알칸 산화물 및 폴리비닐 피롤리돈), 지방산(예로, 모노-카르복실산 또는 디-카르복실산), 지방산 에스테르기, 지질(예로, 디아실글리세롤, 스펅고지질(예로, 세라미딜)) 또는 인지질(예로, 포스파티딜 에탄올아민)에서 선택된 1, 2 또는 그 초과 선형 또는 분기형 부분이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 소정 부위로 유기 부분이 결합된다(유기 부분은 콘주게이트되지 않은 항체 부분에 비해 생성 면역콘주게이트의 기능을 손상시키지 않는다(예로, 항원 결합 친화도의 감소)). 유기 부분은 약 500Da 내지 약 50,000Da, 바람직하게는 약 2000, 5000, 10,000 또는 20,000Da의 분자량을 가질 수 있다. 유기 부분을 이용한 폴리펩티드, 예로 항체의 개질을 위한 예 및 방법은, 예를 들어 U.S. 특허 번호 4,179,337 및 5,612,460, PCT 공보 번호 WO 95/06058 및 WO 00/26256, 및 U.S. 특허 출원 공개 번호 20030026805에서 확인할 수 있다.
- [0129] 항-GCC 항체 분자는 상기 나타난 토끼 하이브리도마 항체 중 하나의 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 가변 영역의 전부 또는 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0130] 하나의 구현예에서, (a)의 경쇄 아미노산 서열은 (a)(i-ii)에서 나타난 참조 아미노산 서열(들) 중 하나와 1, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 15 잔기만큼 다를 수 있다. 구현예에서, 차이는 보존적 치환이다. 구현예에서, 차이는 틀 영역에 있다. 하나의 구현예에서, (b)의 중쇄 아미노산 서열은 (b)(i-ii)에서 나타난 참조 아미노산 서열(들) 중 하나와 1, 2, 3, 4, 5, 10, 또는 15 잔기만큼 다를 수 있다. 구현예에서, 차이는 보존적 치환이다. 구현예에서, 차이는 틀 영역에 있다.
- [0131] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함한다:
- [0132] (a) (i) 표 3의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열, 예로 서열 목록 번호 13, 또는 (ii) 표 4의 뉴클레오티드 서열, 예로 서열 목록 번호 12에 의해 인코딩된 경쇄 가변 영역 아미노산의 전부 또는 항원 결합 단편의 경쇄 아미노산 서열; 및
- [0133] (b) (i) 표 3의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 예로 서열 목록 번호 11, 또는 (ii) 표 4의 뉴클레오티드 서열, 예로 서열 목록 번호 10에 의해 인코딩된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 전부 또는 항원 결합 단편의 중쇄 아미노산 서열.
- [0134] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함한다:
- [0135] a) 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 경쇄 가변 영역과 적어도 85, 90, 95, 97 또는 99% 상동성을 갖는 경쇄 가변 영역, 또는 이들의 항원 결합 단편; 및
- [0136] (b) 본 발명의 항-GCC 항체 분자의 중쇄 가변 영역과 적어도 85, 90, 95, 97 또는 99% 상동성을 갖는 중쇄 가변 영역, 또는 이들의 항원 결합 단편.

- [0137] 본 발명의 항-GCC 항체의 가변 영역의 아미노산 서열은 표 3에서 찾아볼 수 있다.
- [0138] 하나의 접근에서, 중쇄 및 경쇄 J 영역을 인코딩하는 공통 서열은 인간 C 영역 분절에 대한 V 영역 분절의 후속 연결을 위해 J 영역 내로 유용한 제한효소 부위를 도입하기 위한 프라이머로서 이용하기 위한 올리고뉴클레오타이드를 설계하는데 이용될 수 있다. C 영역 cDNA는 인간 서열의 유사한 위치에서 제한효소 부위를 배치하도록 부위 지정 돌연변이화에 의해 개질될 수 있다.
- [0139] 발현 벡터에는 플라스미드, 레트로바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피솜 등이 포함된다. 편리한 벡터는 기능적으로 완전한 인간 CH 또는 CL 면역글로불린 서열을 인코딩하는 것으로, 임의의 VH 또는 VL 서열이 쉽게 삽입 및 발현될 수 있도록 적절한 제한효소 부위가 조작된다. 이러한 벡터에서, 스플라이싱은 일반적으로 삽입된 J 영역 내의 스플라이스 공여자 부위 및 인간 C 영역을 선행하는 스플라이스 수용기 부위 사이에서, 그리고 또한 인간 CH 엑손 내에서 일어나는 스플라이스 영역에서 일어난다. 적합한 발현 벡터는 여러 성분, 예를 들어 복제 기원, 선택가능 마커 유전자, 하나 이상의 발현 조절 요소, 예컨대 전사 조절 요소(예로, 프로모터, 인핸서, 종료자) 및/또는 하나 이상의 번역 신호, 신호 서열 또는 리더 서열 등을 함유할 수 있다. 폴리아데닐화 및 전사 종료는 코딩 영역 하류의 천연 염색체 부위에서 일어난다. 생성 키메라 항체는 임의의 강력한 프로모터에 연결될 수 있다. 이용될 수 있는 적합한 벡터의 예에는 포유류 숙주에 적합하고 바이러스 복제 시스템에 기반한 것들, 예컨대 시미안 바이러스 40(SV40), 라우스 육종 바이러스(RSV), 아데노바이러스 2, 소 유두종 바이러스(BPV), 파포마바이러스 BK 돌연변이체(BKV), 또는 마우스 및 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 및 몰로니 쥐과 백혈병 바이러스(MMLV), 천연 Ig 프로모터 등이 포함된다. 단일 카피 또는 다중 카피로 유지되는, 또는 예로 LTR을 통해 또는 다중 통합 부위를 갖도록 조작된 인공 염색체를 통해 숙주 세포 염색체 내로 통합되는 벡터를 포함하는 다양한 적합한 벡터가 당분야에 공지되어 있다(Lindenbaum 등, *Nucleic Acids Res.* 32:e172(2004), Kennard 등, *Biotechnol. Bioeng. Online* May 20, 2009). 적합한 벡터의 추가적 예는 이후 섹션에 기재된다.
- [0140] 따라서 본 발명은 GCC 단백질에 결합하는 항체, 항체의 항원-결합 단편(예로, 인간화, 키메라 항체 또는 임의의 상기 물질의 항원-결합 단편), 항체 사슬(예로, 중쇄, 경쇄) 또는 항체 사슬의 항원-결합 부분을 인코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0141] 진핵생물 숙주 세포에서의 발현은 이러한 세포가 원핵생물 세포에 비해 적절히 폴딩되고 면역학적으로 활성이 있는 항체를 조립하고 분비할 가능성이 더 높으므로 유용하다. 그러나 부적절한 폴딩으로 인해 활성이 없이 생성되는 임의 항체는 공지된 방법에 따라 재생가능할 수 있다(Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89(1982)). 숙주 세포가 온전한 항체의 일부, 예컨대 경쇄 이량체 또는 중쇄 이량체를 생성하고, 이것이 또한 본 발명에 따른 항체 동족체인 것도 가능하다.
- [0142] 또한 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 항체 또는 인간 또는 비-인간 종으로부터의 항체는 당분야에 널리 공지된 기법을 이용하여 비제한적으로 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 다른 기법을 포함하는 디스플레이형 기술을 통해 생성될 수 있고, 생성 분자는 추가적인 성숙, 예컨대 친화도 성숙을 거칠 수 있고, 이러한 기법은 당분야에 공지되어 있다[Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46(1993) 및 Wright 등, *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168(1992), Hanes and Plutchau *PNAS USA* 94:4937-4942(1997)(리보솜 디스플레이), Parmley and Smith, *Gene* 73:305-318(1988)(파지 디스플레이), Scott, *TIBS* 17:241-245(1992), Cwirla 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382(1990), Russel 등, *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085(1993), Hoganboom 등, *Immunol. Reviews* 130:43-68(1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10:80-84(1992), 및 U.S. 특허 번호 5,733,743]. 디스플레이 기술이 인간이 아닌 항체를 생성하는데 이용되는 경우, 이러한 항체는 상술된 바와 같이 인간화될 수 있다.
- [0143] 생성되는 항체가 처음에 원하는 특정 이소형을 보유할 필요는 없고, 오히려 생성되는 항체가 임의의 이소형을 보유할 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, MIL-44-148-2 토끼 하이브리도마에 의해 생성되는 항체는 IgG 이소형을 갖는다. 항체의 이소형은 당분야에 공지된 통상적 기법을 이용하여 이후에, 예로 항체가 세포 상에서 GCC에 결합하는 경우 ADCC 반응을 야기하도록 IgG2, 또는 IgG3으로 전환될 수 있다. 이러한 기법에는 다른 것들 중에서 직접적 재조합 기법(예로, U.S. 특허 번호 4,816,397 참고), 세포-세포 융합 기법(예로, U.S. 특허 번호 5,916,771 참고)의 이용이 포함된다. 세포-세포 융합 기법에서, 임의의 원하는 이소형을 갖는 중쇄를 보유하는 골수종 또는 다른 세포주가 제조되고, 경쇄를 보유하는 또 다른 골수종 또는 다른 세포주가 제조된다. 이러한 세포가, 이후에 융합될 수 있고, 온전한 항체를 발현하는 세포주가 단리될 수 있다.

- [0144] 특정 구현예에서, GCC 항체 분자는 토끼 항-GCC IgG1 항체이다. 이러한 항체는 GCC 분자에 대해 원하는 결합을 보유하므로, 임의의 하나의 상기 항체는 여전히 동일한 가변 영역(어느 정도까지 항체의 특이성 및 친화도를 정의함)을 보유하면서 또 다른 이소형을 생성하도록 쉽게 이소형이 전환될 수 있다. 따라서 상기 논의된 원하는 "구조" 속성에 부합하는 항체 후보가 생성되므로, 이들에는 일반적으로 이소형 전환을 통해 요구되는 적어도 특정한 추가적 "기능적" 속성이 제공될 수 있다.
- [0145] 하나의 구현예에서, 가변 영역 또는 이들의 항원 결합 단편은 이것이 생성된 불변 영역 이외의 불변 영역(또는 이들의 단편), 예로 또 다른 항체로부터의 불변 영역(또는 이들의 단편)에 또는 합성 불변 영역(또는 이들의 단편)에 커플링될 수 있다. 구현예에서, 불변 영역은 IgG1 또는 IgG2 불변 영역(또는 이들의 단편)이다. 항체 분자의 효과기 활성을 개질하기 위해 가변 또는 불변 영역에서 서열 변화가 수행될 수 있다.
- [0146] **다른 치료제의 설계 및 생성**
- [0147] 다른 항체, 다른 길항제 또는 항체 이외의 화학적 부분을 포함하는 다른 치료 방식의 설계를 촉진하기 위해 GCC에 대해 본원에서 생성되고 분석되는 항체가 제공된다. 이러한 방식에는 비제한적으로 유사한 결합 활성 또는 기능성을 갖는 항체, 개선된 항체 치료제, 예컨대 2특이적 항체, 면역곤주게이트, 및 방사표지 치료제, 펩티드 치료제의 생성, 특히 인트라바디 및 소분자가 포함된다. 또한 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체의 효과기 기능은 다양한 치료 용도를 위해 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE, 또는 IgM으로의 이소형 전환에 의해 변화될 수 있다.
- [0148] 2특이적 항체에 있어서, (i) GCC에 대한 특이성을 갖는 하나 그리고 함께 곤주게이트된 제2 분자에 대한 특이성을 갖는 또 다른 하나의 2개 항체, (ii) GCC에 특이적인 1개 사슬 및 제2 분자에 특이적인 제2 사슬을 갖는 단일 항체, 또는 (iii) GCC 및 다른 분자에 대한 특이성을 갖는 단일쇄 항체를 포함하는 2특이적 항체가 생성될 수 있다. 이러한 2특이적 항체는 공지된 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 2특이적 항체는 2개 이상의 항체(동일한 유형 또는 상이한 유형)를 가교하여 생성될 수 있다. 적합한 가교제에는 적절한 스페이서(예로, m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르)에 의해 분리된 2개의 구별되는 반응기를 갖는 이중2기능성인 것들 또는 동중2기능성인 것들(예로 디숙신이미딜 수베레이트)이 포함된다. 이러한 링커는 Pierce Chemical Company, Rockford, Ill에서 입수가 가능하다. 또한, 예로 [Fanger 등, *Immunomethods* 4:72-81(1994) 및 Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46(1993) 및 Wright 등, *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168(1992)]를 그리고 (iii)에 관해서는, 예로 [Traunecker 등, *Int. J. Cancer*(Suppl.) 7:51-52(1992), Songsivilai & Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321(1990), Kostelny 등, *J. Immunol.* 148:1547-1553(1992)]를 참고하라.
- [0149] 또한, "카파바디"(Ill. 등, "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57(1997)), "미니바디"(Martin 등, *EMBO J.* 13:5303-9(1994), U.S. 특허 번호 5,837,821), "디아바디"(Holliger 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448(1993)), 또는 "야누신"(Traunecker 등, *EMBO J.* 10:3655-3659(1991) 및 Traunecker 등, *Int J Cancer Suppl* 7:51-52(1992))도 생성될 수 있다.
- [0150] **핵산 및 폴리펩티드**
- [0151] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체 분자를 인코딩하거나 나타내는 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열에 관한 것이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 각각의 중쇄 및 경쇄의 가변 및 불변 영역 모두를 인코딩하지만, 본원에 기재된 조성물에 따라 다른 조합도 본 발명에서 고려된다. 본 발명은 또한 개시된 폴리뉴클레오티드 및 이들 폴리뉴클레오티드에 상보적인 핵산 서열에서 유래된 올리고뉴클레오티드 단편을 고려한다.
- [0152] 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. DNA, cDNA, 게놈 DNA, 핵산 유사체 및 합성 DNA의 형태인 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 범위 내에 속한다. DNA는 이중쇄 또는 단일쇄일 수 있고, 단일쇄인 경우 코딩(센스) 가닥 또는 비-코딩(항-센스) 가닥일 수 있다. 폴리펩티드를 인코딩하는 코딩 서열은 본원에서 제공된 코딩 서열과 동일할 수 있고 또는 코딩 서열이 유전 코드의 중복성 또는 축퇴성 결과 본원에 제공된 DNA와 동일한 폴리펩티드를 인코딩하는 상이한 코딩 서열일 수도 있다.
- [0153] 제공되는 구현예에서 폴리뉴클레오티드는, 예로 표 4에 요약된 바와 같은 본 발명의 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 인코딩한다.
- [0154] 본 발명에는 또한 개질, 예컨대 폴리뉴클레오티드 결실, 치환 또는 부가를 함유하는 변이체 폴리뉴클레오티드,

및 변이체 폴리뉴클레오타이드 서열에서 생성되는 임의의 폴리펩티드 개질이 포함된다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 또한 본원에 제공된 코딩 서열의 변이체인 코딩 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 변이체 폴리뉴클레오타이드는 표 4에 기재된 폴리뉴클레오타이드와 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일성을 가질 수 있다. 구현예에서, 변이체 폴리뉴클레오타이드는 항-GCC 항체 분자를 인코딩한다.

[0155] 본 발명은 추가로 본 발명의 항체를 나타내는 폴리펩티드뿐만 아니라 이러한 폴리펩티드의 단편, 유사체 및 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드, 천연 생성 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드의 단편, 유도체 또는 유사체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존 또는 비보존 아미노산 잔기(바람직하게는 보존 아미노산 잔기)로 치환된 것일 수 있고, 이러한 치환 아미노산 잔기가 유전 코드에 의해 인코딩될 수도 있고 인코딩되지 않을 수도 있거나; 또는 하나 이상의 아미노산 잔기에 치환기를 포함하는 것일 수 있거나; 또는 폴리펩티드가 또 다른 화합물, 예컨대 폴리펩티드의 반감기를 증가시키기 위한 화합물(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)에 융합된 것일 수 있거나; 또는 추가적인 아미노산, 예컨대 리더 또는 분비 서열 또는 폴리펩티드 또는 프로단백질 서열의 정제를 위해 채용되는 서열이 폴리펩티드에 융합된 것일 수 있다. 이러한 단편, 유도체 및 유사체는 본 발명의 범위 내이다. 다양한 측면에서, 본 발명의 폴리펩티드는 부분 정제, 또는 정제 산물일 수 있다.

[0156] 본 발명의 폴리펩티드는 본원에 기재된, 예로 표 2 또는 3에 요약된 항체와 동일한 또는 하나 이상의 아미노산 치환으로 인한 소소한 변화에 의해 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 변이는 전형적으로 약 1 내지 5 아미노산 범위인 "보존적 변화"일 수 있고, 여기서 치환 아미노산은 유사한 구조 또는 화학적 특성을 갖는다, 예로 류신의 이소류신으로의 또는 트레오닌의 세린으로의 대체; 라이신의 아르기닌 또는 히스티딘으로의 대체이다. 대조적으로 변이에는 비보존적 변화, 예로 글리신의 트립토판으로의 대체가 포함될 수 있다. 유사한 소소한 변이에는 또한 아미노산 결실 또는 삽입 또는 둘 다가 포함될 수 있다. 어느 아미노산 잔기가 그리고 얼마나 많은 아미노산 잔기가 생물학적 또는 면역학적 활성을 변화시키지 않고 치환, 삽입 또는 결실될 수 있는지의 결정에 대한 지침은 당분야에 공지된 컴퓨터 프로그램, 예를 들어 DNASTAR 소프트웨어(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.)에서 확인될 수 있다.

[0157] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-GCC 항체 분자를 인코딩하는 단리 및/또는 재조합 핵산을 특징으로 한다. 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 항체 분자의 하나 이상의 항체 분자, 중쇄, 경쇄, 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 중쇄 및 경쇄의 일부(예로 전장 중쇄 가변 영역과 페어링되는 경우 항원 결합성인 경쇄 가변 영역 단편, 또는 전장 경쇄 가변 영역과 페어링되는 경우 항원 결합성인 중쇄 가변 영역 단편) 및 CDR을 인코딩한다. 구현예에는 벡터, 예로 발현 벡터에 배치된 이러한 핵산이 포함된다. 또한, 본 발명은, 예로 상기 플라스미드에 의해 인코딩되는 항체 분자를 발현하는 숙주 세포에 의해 생성되는 항체 분자를 포괄한다.

[0158] 하나의 구현예에서, 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 벡터, 예로 발현 벡터가 제공된다:

[0159] 경쇄 가변 영역, 예로 표 3에 기재된 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열, 예로 표 4에 기재된 서열, 이들의 항원 결합 단편, 또는 본원에 기재된 경쇄의 1, 2 또는 3개의 CDR(및 선택적으로 틀 영역), 예로 표 5에 기재된 CDR, 예로 표 6의 CDR 인코딩 서열; 및

[0160] 중쇄 가변 영역, 예로 표 3에 기재된 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 서열, 예로 표 4에 기재된 서열, 이들의 항원 결합 단편, 또는 본원에 기재된 중쇄의 1, 2 또는 3개의 CDR(및 선택적으로 틀 영역), 예로 표 5에 기재된 CDR, 예로 표 6의 CDR 인코딩 서열.

[0161] 제공되는 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 항체의 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 또는 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 인코딩한다. 제공되는 구현예에서, 폴리펩티드는 본 발명의 항체의 적어도 하나의 중쇄 가변 영역 및 적어도 하나의 경쇄 가변 영역을 인코딩할 수 있다.

[0162] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 하기 중 하나 또는 둘 다를 포함한다:

[0163] (a) (i) 본원에, 예로 표 4에 기재된 항-GCC 항체 분자-인코딩-핵산 서열의 상보체, 또는 (ii) 본 발명의 항-GCC 항체 분자, 예로 표 1 및 2에 요약된 상기 나타난 토끼 항체 중 하나의 경쇄를 인코딩하는 임의의 핵산 서열과, 선택된 엄격성 조건 하에서 혼성화하는 핵산에 의해 인코딩되는 경쇄 가변 영역, 또는 이들의 항원 결합 단편; 및

[0164] (b) (i) 본원에, 예로 표 4에 기재된 항-GCC 항체 분자-인코딩-핵산 서열의 상보체, 또는 (ii) 본 발명의 항-GCC 항체 분자, 예로 표 1 및 2에 요약된 상기 나타난 토끼 항체 중 하나의 중쇄를 인코딩하는 임의의 핵산 서열과, 선택된 엄격성 조건 하에서 혼성화하는 핵산에 의해 인코딩되는 중쇄 가변 영역, 또는 이들의 항원 결합

단편.

- [0165] 하나의 구현예에서, 선택된 엄격성 조건은, 예로 본원에 기재된 조건들과 같은 높은 엄격성 또는 매우 높은 엄격성 조건이다.
- [0166] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 본 발명의 벡터로 유전 조작된 숙주 세포, 및 조합 기법에 의한 본 발명의 항체 생성을 제공한다.
- [0167] 적절한 DNA 서열은 다양한 절차에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당분야에 공지된 절차에 의해 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위 내로 삽입된다. 발현 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열은 mRNA 합성을 지시하도록 적절한 발현 조절 서열(즉 프로모터)에 작동가능하게 연결된다. 이러한 프로모터의 예에는 비제한적으로 라우스 육종 바이러스 LTR 또는 초기 또는 후기 SV40 프로모터, *E. coli* lac 또는 trp, 파지 람다 P_L 프로모터 및 원핵생물(예로, *E. coli*에 대한 tac, T3, T7 프로모터) 또는 진핵생물(예로, 사이토메갈로바이러스 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, EF-1a 프로모터) 세포 또는 이들의 바이러스에서 유전자 발현을 조절하는 것으로 공지되어 있는 다른 프로모터가 포함된다. 발현 벡터는 또한 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위 및 전사 종료자를 함유한다. 벡터에는 또한 발현을 증폭시키기 위한 적절한 서열이 포함될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 인헨서를 함유할 수 있으며, 이는 바이러스 기원, 예컨대 시미안 바이러스, 예컨대 SV40, 폴리오마 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 소 유두종 바이러스 또는 몰로니 육종 바이러스에서 유래된 것들, 또는 게놈 기원의 전사 자극 DNA 서열이다. 벡터는 바람직하게는 복제 기원도 함유한다. 벡터는 외인성 복제 기원을 함유하도록 구축될 수 있거나, 또는 이러한 복제 기원이 SV40 또는 또 다른 바이러스원에서 유래되거나 또는 숙주 세포 염색체 복제 기전에 의할 수 있다.
- [0168] 또한, 벡터는 선택적으로 전달감염된 숙주 세포의 선택을 위한 마커 유전자, 예컨대 다양한 숙주에서 메토틱릭 사이트를 이용한 선택을 허용하는 디히드로폴레이트 환원효소 마커 유전자, 또는 항생제, 예컨대 베타-락타마아제 유전자(엠포실린 내성), 원핵생물 세포에서 이용되는 Tet 유전자(테트라사이클린 내성) 또는 네오마이신, GA418(제네티신, 네오마이신-유도체), gpt(미코페놀산), 엠포실린, 또는 하이그로마이신 내성 유전자, 또는 숙주 세포의 유전 병소에 상보적인 유전자, 예컨대 티미딘 키나아제, 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라아제, 디히드로폴레이트 환원효소 등의 부재를 함유한다. 숙주의 영양요구 마커의 유전 산물을 인코딩하는 유전자(예로, LEU2, URA3, HIS3)가 종종 효모에서의 선택가능 마커로 이용된다.
- [0169] 본 발명의 항체를 수득하기 위해, 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역 및 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열은 벡터 내로 도입되어야 한다. 본 발명의 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 하나 또는 다중 벡터 내로 도입된 후 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0170] 포유류 세포에서의 발현에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 pCDM8, pcDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1(Stratagene, La Jolla, Calif.), pCDEF3(Goldman, L. A. 등, *Biotechniques*, 21:1013-1015(1996)), pSVSPORT(GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.), pEF-Bos(Mizushima, S. 등, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322(1990)), 2시스트론성 GPEX[®] 레트로벡터(Gala Biotech, Middleton, Wis.) 등이 포함된다. 다양한 발현 숙주, 예컨대 원핵생물 세포(*E. coli*), 곤충 세포(*Drosophila* Schnieder S2 세포, Sf9) 및 효모(*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*)에서의 이용에 적합한 발현 벡터도 이용가능하다. 예시적인 벡터는 pLK TOK58(야생형 IgG1 Fc 서열) 및 pLK TOK59(돌연변이된 IgG1 Fc 서열)이다(U.S. 특허 출원 공개 번호 20060147445 참고).
- [0171] 이해될 바와 같이, 본 발명에 따른 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. 특정한 항체에 대한 cDNA 또는 게놈 클론을 인코딩하는 서열은 적합한 포유류 또는 비포유류 숙주 세포를 위해 이용될 수 있다. 형질전환은 숙주 세포 내로 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 임의의 공지된 방법, 예를 들어 폴리뉴클레오티드를 바이러스에(또는 바이러스 벡터 내로) 패키징화하고 숙주 세포를 바이러스(또는 벡터)로 형질도입하여, 또는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포 내로 도입하기 위해 당분야에 공지된 전달감염 절차, 예로 텍스트란-매개 전달감염, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 전달감염, 원형질 융합, 전기천공, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜 내로의 캡슐화 및 DNA 분자의 직접적 미세주입에 의할 수 있다. 이용되는 형질전환 절차는 형질전환될 숙주에 의존한다. 포유류 세포 내로의 이중성 폴리뉴클레오티드의 도입 방법은 당분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 텍스트란-매개 전달감염, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 전달감염, 원형질 융합, 전기천공, 입자 폭탄, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜 내로의 캡슐화, 펩티드 콘주게이트, 덴드리머 및 DNA의 핵

내로의 직접적 미세주입이 포함된다.

[0172] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 특징으로 한다. 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 항체 분자, 또는 이들의 성분을 발현한다. 또 다른 구현예는 숙주 세포를 발현에 적절한 조건 하에 유지하여 면역글로불린 사슬(들)이 발현되고 항체 분자가 생성되는 것을 포함하는, 항체 분자, 예로 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자, 예로 토끼 항체 분자, 또는 이들의 인간화 버전의 제조 방법을 제공한다. 추가적인 구현예는 중쇄 및 경쇄 항체 서열을 인코딩하는 임의 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 진핵생물 세포, 예로 포유류 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 또는 원핵생물 세포, 예로 *E. coli*일 수 있다. 예를 들어, 포유류 세포는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다. 예시적인 포유류 세포에는 림프구 세포주(예로, NSO), 중국 햄스터 난소 세포(CHO), COS 세포가 포함된다. 특정한 구현예에서, 배양 숙주 세포는 MIL-44-148-2 항체 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 CHO 세포이다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 하이브리도마 MIL-44-148-2(PTA-8132)이다. 부가적으로 세포에는 난모 세포, 및 유전자도입 동물의 세포, 예로 유선 상피 세포가 포함된다. 예를 들어, 본원에 기재된 항체 분자를 인코딩하는 핵산은 유전자도입 비인간 동물에서 발현될 수 있다.

[0173] 발현을 위한 숙주로 이용가능한 포유류 세포주는 당분야에 공지되어 있고, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, NSO 세포, HeLa 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포암종 세포(예로, Hep G2), 및 여러 다른 세포주를 비제한적으로 포함하는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 입수가능한 여러 불멸화 세포주가 포함된다. 비제한적으로 박테리아, 효모, 곤충 및 식물을 포함하는 비-포유류 세포가 또한 재조합 항체의 발현에 이용될 수 있다. 당화를 제거하기 위한 항체 CH2 도메인의 부위 지정 돌연변이화는 비인간 당화로 생성되는 면역원성, 약동학 및/또는 효과기 기능의 변화를 방지하기 위해 바람직할 수 있다. 발현 방법은 어느 시스템이 항상적인 GCC 결합 특성을 갖는 항체를 생성하고 가장 높은 발현 수준을 생성하는지를 결정하여 선택된다.

[0174] 추가 구현예는 본원에 기재된 핵산, 예로 표 4 또는 6에 기재된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포를 면역글로불린의 발현에 적절한 조건 하에 유지하여 면역글로불린 사슬이 발현되고 GCC에 결합하는 항체 분자, 예로 토끼 항체 분자, 또는 이들의 인간화 버전, 또는 이들의 단편 또는 변이체가 생성되는 것을 포함하는, 항-GCC 항체 분자, 예로 토끼 항체 분자 또는 이들의 인간화 버전의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 항체 분자의 발현 방법에는 숙주 세포의 이용이 포함되며, 여기서 항체 분자, 예로 토끼 항체 경쇄 또는 이들의 인간화 버전을 인코딩하는 제1 재조합 핵산 분자 및 항체 분자, 예로 토끼 항체 중쇄 또는 이들의 인간화 버전을 인코딩하는 제2 재조합 핵산 분자는 단일 발현 벡터에 포함된다. 다른 구현예에서, 이들은 별도의 벡터에 존재한다. 상기 방법은 원하는 경우, 항체, 항체의 항원-결합 단편, 항체 사슬 또는 항체 사슬의 항원-결합 단편의 단리 또는 회수 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0175] 예를 들어, GCC 단백질에 결합하는 토끼(또는 인간화) 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산 분자(즉, 하나 이상의 핵산 분자), 또는 이러한 핵산 분자(들)를 포함하는 발현 구축물(즉, 하나 이상의 구축물)은 핵산 분자(들)가 하나 이상의 발현 조절 요소(예로, 벡터 내, 세포에서의 절차에 의해 생성되는 구축물 내, 숙주 세포 게놈에 통합되어)에 작동가능하게 연결되도록 선택된 숙주세포에 적절한 임의 방법(예로, 형질전환, 전달감염, 전기천공, 감염)을 이용하여 재조합 숙주 세포를 생성하기 위해 적합한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 생성 재조합 숙주 세포는 발현에 적합한 조건(예로, 유도제의 존재 하, 적합한 비-인간 동물에서, 적절한 염, 성장 인자, 항생제, 영양 보충제 등이 보장된 적합한 배양 배지에서) 하에 유지되어 인코딩된 폴리펩티드(들)가 생성될 수 있다. 원하는 경우, 인코딩된 단백질은 단리 또는 회수될 수 있다(예로, 동물, 숙주 세포, 배지, 모유에서). 상기 절차는 유전자도입 비-인간 동물 또는 식물의 숙주 세포에서의 발현을 포괄한다(예로, WO 92/03918, GenPharm International 참고).

[0176] 또한, 생성 세포주로부터의 본 발명의 항체(또는 이들로부터의 다른 부분)의 발현은 여러 공지된 기법을 이용하여 증강될 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 및 DHFR 유전자 발현 시스템은 특정 조건 하에 발현을 증강시키기 위한 일반적 접근이다. 고발현 세포 클론은 통상적 기법, 예컨대 제한 희석 클로닝, 마이크로드랍 기술 또는 당분야에 공지된 임의의 다른 방법을 이용하여 확인될 수 있다. GS 시스템은 유럽 특허 번호 0 216 846, 0 256 055, 및 0 323 997 그리고 유럽 특허 출원 번호 89303964.4에 관해 전체적으로 또는 부분적으로 논의된다.

[0177] 본 발명의 개질 항체, 또는 이들의 항원-결합 부분의 재조합 발현을 위한 예시적인 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄를 모두 인코딩하는 재조합 발현 벡터가 칼슘 포스페이트 매개 전달감염에 의해 dhfr-CHO 세포 내로

도입된다. 재조합 발현 벡터 내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 각각 유전자의 고수준 전사를 유도하기 위해 인핸서/프로모터 조절 요소(예로, SV40, CMV, 아데노바이러스 등에서 유래된 것들, 예컨대 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소 또는 SV40 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 요소)에 작동가능하게 연결된다. 재조합 발현 벡터는 또한 DHFR 유전자를 수반하며, 이는 메토타렉세이트 선택/증폭을 이용하여 벡터로 전달감염된 CHO 세포의 선택을 허용한다. 선택된 형질전환체 숙주 세포는 항체 중쇄 및 경쇄의 발현을 허용하도록 배양되며, 온전한 항체가 배양 배지에서 회수된다. 표준 분자생물학 기법이 재조합 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 전달감염시키고, 형질전환체를 선택하고, 숙주 세포를 선택하고, 배양 배지에서 항체를 회수하기 위해 이용된다.

[0178] 본 발명의 항체는 또한 관심 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 유전자도입된 포유류 또는 식물의 생성 및 이로부터 회수가능한 형태로의 항체 생성을 통해 유전자도입에 의해 생성될 수 있다. 포유류에서의 유전자도입 생성에 있어서, 항체는 염소, 소 또는 다른 포유류의 모유에서 생성되고 회수될 수 있다. 예로, U.S. 특허 번호 5,827,690, 5,756,687, 5,750,172, 및 5,741,957을 참고하라.

[0179] 본원에 기재된 항체, 이들의 항원-결합 단편, 항체 사슬 및 항원-결합 부분도 화학적 합성에 의해 또는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 적합한 시험관 내 발현 시스템에서 생성될 수 있다.

[0180] 융합 단백질 및 면역콘주게이트

[0181] 본원에 기재된 항-GCC 항체는 하나 이상의 비-항체 분자 물질에 임의의 적합한 방법(예로, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 연합 또는 다른 방법)에 의해 기능적으로 연결될 수 있다.

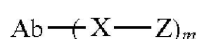
[0182] 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자 및 비항체 부분이 단일 연속 폴리펩티드 사슬의 성분인 융합 단백질이 생성될 수 있다. 비-항체 부분은 항체 부분에 대해 N-말단에, C-말단에 또는 내부에 위치할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현에는 적합한 발현 벡터, 예컨대 pET 벡터(예로, pET-15b, Novagen), 파지 벡터(예로, pCNATAB 5 E, Pharmacia), 또는 다른 벡터, 예로 pRIT2T 단백질 A 융합 벡터, Pharmacia) 내로 면역글로불린 서열을 인코딩하는 핵산의 삽입에 의해 생성될 수 있다. 생성 구조물은 비-항체 부분(예로, 히스티딘 태그, E 태그, 또는 단백질 A IgG 결합 도메인)을 포함하는 항체 사슬을 생성하도록 발현될 수 있다. 융합 단백질은 임의의 적합한 기법, 예컨대 적합한 친화도 매트릭스를 이용하는 크로마토그래피를 이용하여 분리 또는 회수될 수 있다(예로, *Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel, F. M 등, eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8(1991) 참고).

[0183] 본 발명은 세포로 보내지고, 구현예에서 세포 내로 내면화되는 항-GCC 항체 분자를 제공한다. 이들은 GCC를 발현하는 세포로 또는 세포 내로 치료제 또는 검출가능한 제제를 전달할 수 있지만, 표적이 발현되지 않는 세포로 나 세포 내로는 전달하지 않는다. 따라서 본 발명은 또한 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자를 포함하는 항-GCC 면역콘주게이트를 제공하며, 이는 치료제 또는 검출가능한 제제에 콘주게이트된다. 구현예에서, 항-GCC 면역콘주게이트의 GCC에 대한 친화도는 콘주게이트되지 않은 항체의 적어도 10, 25, 50, 75, 80, 90, 또는 95%이다. 이는 세포 표면 GCC 또는 분리된 GCC를 이용하여 결정될 수 있다. 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자, 예로 면역콘주게이트는 본원에 기재된 바와 같은 분석에 의해 결정되는 1,000, 500, 250, 100, 또는 50pM 미만의 LD50을 갖는다.

[0184] 항-GCC 항체 분자는 당분야에 공지된 기법을 이용하여 면역콘주게이트로 작용하도록 개질될 수 있다. 예로, [*Vitetta Immunol Today* 14:252(1993)]을 참고하라. 또한 U.S. 특허 번호 5,194,594를 참고하라. 방사표지 항체의 조제물도 당분야에 공지된 기법을 이용하여 쉽게 제조될 수 있다. 예로 [Junghans 등, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686(2d edition), Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven(1996)]을 참고하라. 또한 U.S. 특허 번호 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990(U.S. 재특허 번호 35,500), 5,648,471, 및 5,697,902를 참고하라.

[0185] 일부 구현예에서, 항체 분자 및 비-항체 부분은 링커에 의해 연결된다. 이러한 구현예에서, 면역콘주게이트는 화학식 I로 나타낸다:

[0186] [화학식 I]



[0187]

[0188] 식 중,

- [0189] Ab는 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자이며;
- [0190] X는 Ab 및 Z를 연결하는 부분, 예로 Ab 및 Z 중 하나 또는 둘 다에 대한 공유 결합 후 본원에 기재된 링커의 잔기이고;
- [0191] Z는 치료제 또는 표지이고;
- [0192] m은 약 1 내지 약 15 범위이다.
- [0193] 변수 m은 화학식 I의 면역콘주게이트에서 항체 분자 당 --X--Z 부분의 수를 나타낸다. 다양한 구현예에서, m은 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2 범위이다. 일부 구현예에서, m은 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4 또는 2 내지 3 범위이다. 다른 구현예에서, m은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 화학식 I의 복수의 면역콘주게이트를 포함하는 조성물에서, m은 평균 약물 부하로도 불리며, Ab 당 --X--Z 부분의 평균 수이다. 평균 약물 부하는 Ab 당 1 내지 약 15-X--Z 부분의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, m이 평균 약물 부하를 나타내는 경우, m은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 또는 약 8이다. 예시적인 구현예에서, m은 약 2 내지 약 8이다. 하나의 구현예에서, m은 약 8이다. 또 다른 구현예에서, m은 약 4이다. 또 다른 구현예에서, m은 약 2이다.
- [0194] Ab 당 --X--Z 부분의 평균 수는 통상적 수단, 예컨대 질량 분광측정, ELISA 분석, 및 HPLC에 의해 분석될 수 있다. m의 측면에서 면역콘주게이트의 정량적 분포도 결정될 수 있다. 일부 경우에서, m이 다른 약물 부하를 갖는 면역콘주게이트와 구별되는 특정 값인 동중성 면역콘주게이트의 분리, 정제, 및 분석은 역상 HPLC 또는 전기영동과 같은 수단에 의해 달성될 수 있다.
- [0195] 화학식 I의 면역콘주게이트는 혼합물로 존재할 수 있고, 여기서 혼합물의 각 성분은 상이한 m 값을 갖는다. 예를 들어, 화학식 I의 면역콘주게이트는 2개의 별도의 면역콘주게이트 성분: 하나는 m이 7인 면역콘주게이트 성분이고 다른 하나는 m이 8인 면역콘주게이트 성분인 혼합물로 존재할 수 있다.
- [0196] 하나의 구현예에서, 화학식 I의 면역콘주게이트는 3개의 별도의 면역콘주게이트의 혼합물로 존재하며, 여기서 3개의 별도의 면역콘주게이트의 m은 각각 1, 2, 및 3이거나; 각각 3, 4, 및 5이거나; 각각 5, 6, 및 7이거나; 각각 7, 8, 및 9이거나; 각각 9, 10, 및 11이거나; 각각 11, 12, 및 13이거나; 또는 각각 13, 14, 및 15이다.
- [0197] 면역콘주게이트의 제조를 위한 다양한 적합한 링커(예로, 항체 분자를 치료제 또는 표지로 연결하기 위한 이중2 기능성 시약) 및 방법은 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, Chari 등, Cancer Research 52:127-131(1992) 참고). 링커는, 예로 링커의 절단이 세포내 환경에서 약물(즉, 치료제 또는 표지)을 방출하도록 하는 생리학적 조건 하에, 예로 세포내 조건 하에 절단가능할 수 있다. 다른 구현예에서, 링커는 절단가능하지 않고, 약물은, 예를 들어 항체 분해에 의해 방출된다.
- [0198] 링커는 항체 부분 상의 화학적 반응기, 예로 자유 아미노, 이미노, 히드록실, 티올 또는 카르복실기에(예로, N- 또는 C-말단에, 하나 이상의 라이신 잔기의 엡실론 아미노기에, 하나 이상의 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기의 자유 카르복실산기에, 또는 하나 이상의 시스테인 잔기의 설프하이드릴기에) 결합될 수 있다. 링커가 결합되는 부위는 항체 부분의 아미노산 서열의 천연 잔기일 수 있거나, 예로 DNA 재조합 기술에 의해(예로, 아미노산 서열에 시스테인 또는 프로테아제 절단 부위를 도입하여) 또는 단백질 생화학(예로, 환원, pH 조정 또는 단백분해)에 의해 항체 부분 내로 도입될 수 있다.
- [0199] 공유 부착의 가장 일반적으로 이용되는 비-특이적 방법 중 하나는 화합물의 카르복시(또는 아미노)기를 항체 분자의 아미노(또는 카르복시)기에 연결하는 카르보디이미드 반응이다. 부가적으로, 2기능성 제제, 예컨대 디알데히드 또는 이미도에스테르가 화합물의 아미노기를 항체 분자의 아미노기에 연결하는데 이용되었다. 또한 항체 분자로 약물(즉, 치료제 또는 표지)을 부착하기 위해 Schiff 염기 반응이 이용가능하다. 상기 방법에는 글리콜 또는 히드록시기를 함유하는 약물의 과요오드산염 산화로 알데히드를 형성한 뒤 항체 분자와 반응시키는 것이 관여된다. 부착은 항체 분자의 아미노기와 Schiff 염기 형성을 통해 일어난다. 이소티오시아네이트도 항체 분자에 약물을 공유 부착하기 위한 커플링 제제로 이용될 수 있다. 다른 기법은 당분야 숙련자에게 공지되어 있고 본 발명의 범위 내이다.
- [0200] 특정 구현예에서, 링커 (X)의 전구체인 중간체를 적절한 조건 하에 약물 (Z)과 반응시킨다. 특정 구현예에서, 반응기는 약물 및/또는 중간체 상에서 이용된다. 이어서 약물(즉, 치료제 또는 표지) 및 중간체, 또는 유도체화된 약물 간 반응 산물을 적절한 조건 하에 항체 분자와 반응시킨다.

- [0201] 면역콘주게이트는 당분야 숙련자에게 널리 공지된 방법론, 예로 컬럼 크로마토그래피(예로, 친화도 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 상호작용 크로마토그래피), 투석, 여과작용 또는 침전을 채용하여 반응물로부터 정제될 수 있다. 면역콘주게이트는 당분야 숙련자에게 널리 공지된 방법론, 예로 SDS-PAGE, 질량 분광측정, 또는 모세관 전기영동을 채용하여 평가될 수 있다.
- [0202] 일부 구현예에서, 링커는 세포내 환경(예로, 리소솜 또는 엔도솜 또는 소포 내)에 존재하는 절단 제제에 의해 절단가능하다. 링커는, 예로 비제한적으로 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하는, 세포내 펩티다아제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티딜 링커는 적어도 2 아미노산 길이 또는 적어도 3 아미노산 길이이다. 절단 제제에는 모두 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여 표적 세포 내에서 활성 약물(즉, 치료제 또는 표지)의 방출을 일으키는 것으로 알려져 있는 카텝신 B 및 D 그리고 플라스민이 포함될 수 있다(예로, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123 참고). 가장 전형적인 것은 GCC-발현 세포에 존재하는 효소에 의해 절단가능한 펩티딜 링커이다. 예를 들어, 암성 조직에서 고도 발현되는 티올 의존적 프로테아제 카텝신-B에 의해 절단가능한 펩티딜 링커(예로, Phe-Leu 또는 Gly-Phe-Leu-Gly 링커(서열 목록 번호 319))가 이용될 수 있다. 이러한 링커의 다른 예는, 예로 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 도입된 U.S. 특허 번호 6,214,345에 기재된다. 특정 구현예에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit 링커 또는 Phe-Lys 링커이다(예로 val-cit 링커를 이용한 독소루비신의 합성을 기재하는 U.S. 특허 번호 6,214,345 참고). 약물(즉, 치료제 또는 표지)의 세포내 단백질 분해 방출을 이용하는 하나의 장점은 약물이 콘주게이트된 경우 전형적으로 약독화되고 콘주게이트의 혈청 안정성이 전형적으로 높다는 것이다.
- [0203] 다른 구현예에서, 절단가능 링커는 pH-감수성이다, 즉 특정 pH 값에서의 가수분해에 민감하다. 전형적으로 pH-민감 링커는 산성 조건 하에 가수분해가능하다. 예를 들어, 리소솜에서 가수분해가능한 산-불안정 링커(예로 히드라존, 세미카르바존, 티오세미카르바존, 시스-아코니트산 아마이드, 오르소에스테르, 아세탈, 케탈 등)가 이용될 수 있다(예로, U.S. 특허 번호 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville 등, 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661 참고). 이러한 링커는 중성 pH 조건 하에, 예컨대 혈액 중에서 상대적으로 안정하지만 리소솜의 pH 근처인 pH 5.5 또는 5.0 미만에서는 불안정하다. 특정 구현예에서, 가수분해가능 링커는 티오에테르 링커(예로 아실히드라존 결합(예로 U.S. 특허 번호 5,622,929 참고)을 통해 치료제에 부착된 티오에테르)이다.
- [0204] 다른 구현예에서, 링커(예로, 디설피드 링커)는 환원 조건 하에 절단가능하다. 예를 들어 SATA(N-숙신이미딜-5-아세틸티오아세테이트), SPDP(N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티오)프로피오네이트), SPDB(N-숙신이미딜-3-(2-피리디디티오)부티레이트) 및 SMPT(N-숙신이미딜-옥시카르보닐-알파-메틸-알파-(2-피리디-디티오)톨루엔)-, SPDB 및 SMPT를 이용하여 형성될 수 있는 것들을 포함하는 다양한 디설피드 링커가 당분야에 공지되어 있다(예로, Thorpe 등, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak 등, Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer(C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987) 참고. 또한 U.S. 특허 번호 4,880,935 참고).
- [0205] 다른 측정 구현예에서, 링커는 말로네이트 링커(Johnson 등, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), 말레이미도 벤조일 링커(Lau 등, 1995, Bioorg Med. Chem. 3(10):1299-1304), 또는 3'-N-아미드 유사체(Lau 등, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)이다.
- [0206] 다른 구현예에서, 링커 단위는 절단가능하지 않으며, 약물(즉, 치료제 또는 표지)은 항체 분해에 의해 방출된다(예를 들어 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 도입된 U.S. 공개 번호 20050238649 참고).
- [0207] 전형적으로, 링커는 세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않다. 본원에서 이용되는 링커의 맥락에서 "세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않은"은 면역콘주게이트가 세포외 환경에(예로, 혈장 중에) 존재하는 경우, 면역콘주게이트의 표본 중 약 20% 이하, 전형적으로 약 15% 이하, 보다 전형적으로 약 10% 이하, 더욱 전형적으로 약 5% 이하, 약 3% 이하, 또는 약 1% 이하의 링커가 절단된다는 것을 의미한다. 링커가 세포외 환경에 실질적으로 민감하지 않은지 여부는, 예를 들어 혈장과 면역콘주게이트를 소정 시기(예로, 2, 4, 8, 16, 또는 24시간) 동안 인큐베이션한 뒤 혈장 중에 존재하는 자유 약물의 양을 정량하여 결정될 수 있다.
- [0208] 상호 배타적이 아닌 다른 구현예에서, 링커는 세포성 내면화를 촉진한다. 특정 구현예에서, 링커는 치료제 또는 표지(Z)에 콘주게이트되는 경우 세포성 내면화를 촉진한다. 다른 구현예에서, 링커는 Z 부분 및 항-GCC 항체 분자 모두에 콘주게이트되는 경우 세포성 내면화를 촉진한다.

- [0209] 본 발명의 조성물 및 방법과 함께 이용될 수 있는 다양한 예시적인 링커는 WO 2004-010957, U.S. 공개 번호 20060074008, U.S. 공개 번호 20050238649, 및 U.S. 공개 번호 20060024317(각각은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 도입됨)에 기재되어 있다.
- [0210] 항체 분자를 치료제 또는 표지에 커플링하는데 이용될 수 있는 링커의 예에는, 예를 들어 말레이미도카프로일(mc); 말레이미도카프로일-p-아미노벤질카르바메이트; 말레이미도카프로일-펩티드-아미노벤질카르바메이트 링커, 예로 말레이미도카프로일-L-페닐알라닌-L-라이신-p-아미노벤질카르바메이트 및 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-p-아미노벤질카르바메이트(vc); N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(또한 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 또는 SPP로 알려져 있음); 4-숙신이미딜-옥시카르보닐-2-메틸-2-(2-피리딜디티오)-톨루엔(SMPT); N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB); 2-이미노티올란; S-아세틸숙신산 무수물; 디설피드 벤질 카르바메이트; 카르보네이트; 히드라존 링커; N-(α -말레이미도아세톡시)숙신이미드 에스테르; N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(AMAS); N-[베타-말레이미도프로필옥시]숙신이미드 에스테르(BMPS); [N- ϵ -말레이미도카프로일옥시]숙신이미드 에스테르(EMCS); N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스테르(GMBS); 숙신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복시-[6-아미도카프로에이트](LC-SMCC); 숙신이미딜 6-(3-[2-피리딜디티오]-프로피온아미도)헥사노에이트(LC-SPDP); m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS); N-숙신이미딜[4-요오도아세틸]아미노벤조에이트(SIAB); 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC); N-숙신이미딜 3-[2-피리딜디티오]-프로피온아미도(SPDP); [N- ϵ -말레이미도카프로일옥시]설포숙신이미드 에스테르(설포-EMCS); N-[γ -말레이미도부틸옥시]설포숙신이미드 에스테르(설포-GMBS); 4-설포숙신이미딜-6-메틸- α -(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트(설포-LC-SMPT); 설포숙신이미딜 6-(3'-[2-피리딜디티오]-프로피온아미도)헥사노에이트(설포-LC-SPDP); m-말레이미도벤조일-N-히드록시설포숙신이미드 에스테르(설포-MBS); N-설포숙신이미딜[4-요오도아세틸]아미노벤조에이트(설포-SIAB); 설포숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트(설포-SMCC); 설포숙신이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트(설포-SMPB); 에틸렌 글리콜-비스(숙신산 N-히드록시숙신이미드 에스테르)(EGS); 디숙신이미딜 타르트레이트(DST); 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA); 디에틸렌트리아민-펜타아세트산(DTPA); 및 티오우레아 링커가 포함된다.
- [0211] 일부 구현예에서, 치료제는 세포증식억제 또는 세포독성제이다. 예에는 비제한적으로 항대사물질(예로, 아자티오프린, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 플루다라빈, 펜토스타틴, 클라드리빈, 5-플루오로우라실(5FU), 플록스유리딘(FUDR), 시토신 아라비노시드(시타라빈), 메토트렉세이트, 트리메토프림, 피리메타민, 페메트렉시드); 알킬화 제제(예로, 시클로포스파미드, 메클로르에타민, 유라무스틴, 멜팔란, 클로람부실, 티오테파/클로람부실, 이포스파미드, 카르무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신, 부셀판, 디브로모만니톨, 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 트리플라틴 테트라니트레이트, 프로카르바진, 알트레타민, 다카르바진, 미토줄로미드, 테모줄로미드); 안트라사이클린(예로 다우로루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 발루비신); 항생제(예로 닥티노마이신, 블레오마이신, 미트라마이신, 안트라마이신, 스트렙토조신, 그라미시딘 D, 미토마이신(예로, 미토마이신 C), 듀오카르마이신(예로, CC-1065), 칼리케아미신); 항유사분열제(예로, 메이탄시노이드, 오리스타틴, 돌라스타틴, 크립토피신, 빈카 알칼로이드(예로, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 비노렐빈), 탁산(예로 파클리탁셀, 도세탁셀, 또는 신규 탁산(예로, 국제 특허 공보 번호 WO 01/38318, 2001.05.31. 공개 참고)), 및 콜키친; 토포이소머라아제 저해제(예로, 이리노테칸, 포토테칸, 암사크린, 에토포시드, 테니포시드, 미톡산트론); 및 프로테아좀 저해제(예로, 펩티딜 붕산)가 포함된다.
- [0212] 일부 구현예에서, 치료제는 메이탄시노이드이다. 메이탄시노이드 화합물 및 항체에 대한 이들의 콘주게이션 방법은, 예를 들어 [Chari 등, *Cancer Res.*, 52: 127-131(1992); Widdison 등, *J. Med. Chem.* 49: 4392-4408(2006); 및 U.S. 특허 번호 5,208,020 및 6,333,410]에 기재되어 있다. 메이탄시노이드의 예에는 개질 방향족 고리(예로, C-19-테클로로, C-20-데메톡시, C-20-아실옥시)를 갖는 메이탄신 유사체 및 다른 위치에 개질(예로, C-9-CH₃, C-14-알콕시메틸, C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸, C-15-히드록시/아실옥시, C-15-메톡시, C-18-N-데메틸, 4,5-데옥시)을 갖는 것들이 포함된다. 특정 구현예에서, 메이탄시노이드는 N.sup.2'-데아세틸-N.sup.2'-(4-메르캅토-1-옥소헨틸)메이탄신(DM3), N.sup.2'-데아세틸-N.sup.2'-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-메이탄신(DM1), 또는 N.sup.2'-데아세틸-N.sup.2'-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소헨틸)메이탄신(DM4)이다.
- [0213] 설포히드릴기를 포함하는 메이탄시노이드 화합물은 티오에테르 또는 디설피드 결합에 의해 메이탄시노이드 화합물에 연결되는 이중기능성 링커를 이용해서 항체에 커플링될 수 있다. 이러한 일부 구현예에서, 링커는 항체

의 아미노기(예로, 말단 아미노기 또는 라이신 잔기의 엡실론 아미노기)에 커플링된다. 일부 구현예에서, 메이탄시노이드 화합물을 항체에 커플링하는데 이용되는 이중기능성 링커는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(또한 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트, 또는 SPP로 알려져 있음), 4-숙신이미딜-옥시카르보닐-2-메틸-2-(2-피리딜디티오)-톨루엔(SMPT), N-숙신이미딜 4[N-말레이미도메틸]시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC), N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP); N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부티레이트(SPDB), 2-이미노티올란, 또는 S-아세틸숙신산 무수물이다.

[0214] 일부 다른 구현예에서, 치료제는 돌라스타틴이다. 일부 구현예에서, 치료제는 오리스타틴, 예컨대 오리스타틴 E(또한 당분야에 돌라스타틴-10의 유도체로 공지되어 있음) 또는 이들의 유도체이다. 오리스타틴 화합물 및 항체에 대한 이들의 콘주게이션 방법은, 예를 들어 각각 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 도입된 [Doronina 등, *Nature Biotech.*, 21: 778-784(2003); Hamblett 등, *Clin. Cancer Res.*, 10: 7063-7070(2004); Carter and Senter, *Cancer J.*, 14 154-169(2008); U.S. 특허 번호 7,498,298, 7,091,186, 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; 및 4,486,414; U.S. 특허 공개 번호 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649, 및 20030083236; 및 국제 특허 공개 번호 WO 04/010957 및 WO 02/088172]에 기재된다.

[0215] 오리스타틴은, 예를 들어 오리스타틴 E 및 케토산 간에 형성된 에스테르일 수 있다. 예를 들어, 오리스타틴 E는 파라아세틸 벤조산 또는 벤조일발레르산과 반응하여 각각 AEB 및 AEVB를 생성할 수 있다. 다른 전형적인 오리스타틴에는 오리스타틴 페닐알라닌 페닐렌디아민(AFP), 모노메틸 오리스타틴 E(MMAE), 및 모노메틸 오리스타틴 F(MMAF)가 포함된다.

[0216] 일부 구현예에서, 치료제는 방사선 핵종이다. 방사선 치료법에서 독소로 유용한 방사선 핵종의 예에는 ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁹Pd, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Pb 및 ²¹²B가 포함된다. 당업자가 이용한 다른 방사선 핵종에는 모두 베타 음성 및/또는 오거 방출체인 ³²P 및 ³³P, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ¹⁹³MpT, ¹⁹⁷Hg가 포함된다. 일부 바람직한 방사선 핵종에는 ⁹⁰Y, ¹³¹I, ²¹¹At 및 ²¹²Pb/²¹²Bi가 포함된다.

[0217] 당업자는 널리 공지된 기법을 이용하여 항-GCC 항체 분자를 방사선 핵종에 콘주게이트할 수 있다. 예를 들어, 각각 본원에 참조로 도입된 [Magerstadt, M.(1991) *Antibody Conjugates and Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; 및 Barchel, S. W. and Rhodes, B. H.,(1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, N.Y.]은 항체의 아미노산에 대한 다양한 치료 및 진단 방사선 핵종의 콘주게이션을 교시한다. 이러한 반응은 적절한 킬레이트제 및/또는 링커를 이용하여 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 방사선 핵종을 콘주게이트하는데 적용될 수 있다.

[0218] 항-GCC 항체 서열

[0219] 토끼 모노클로날 항-GCC 항체가 실시예에 보다 상세히 논의된 바와 같은 몇몇 방법에 의해 생성되었다. 간략하게, 토끼 모노클로날 항체 MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4가 토끼에서 전통적 면역화 기술에 의해 생성되었다. 실제 토끼-토끼 하이브리도마는 면역화된 토끼로부터 단리된 B-세포를 Epitomic의 전용 융합 파트너 세포주(U.S. 특허 7,402,409; 7,429,487; 7,462,697; 7,575,896; 7,732,168; 및 8,062,867 참고)와 융합시켜 Epitomics(Burlingame, CA)에서 생성하였다. GCC에 대한 항체의 특이성은 ELISA 및 유세포 측정(FCM)으로 평가되었다.

[0220] 아래 표 1은 hGCC(ECD)/mIgG2a FcR-mutII 면역원을 이용하여 생성된 본 발명의 토끼 모노클로날 항-GCC 항체를 요약한다.

[0221] 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열이 결정되었다. 아래 표 2는 몇몇 항체의 가변 영역에 대한 서열 목록 번호의 요약이다. 토끼 항-GCC 항체에 대한 각각의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역에 대한 아미노산 및 핵산 서열을 표 3 및 4에 각각 나타낸다.

[0222] 항-GCC 항체에 대한 중쇄 및 경쇄의 각각의 CDR의 아미노산 및 핵산 서열을 표 5 및 6에 각각 나타낸다.

[0223] CDR의 서열분석은 독소 콘주게이션 부위로 작용할 수 있는 잔기의 과다성 결정을 허용하였다. 예를 들어 항원 결합 영역에서 페어링하지 않은 자유 시스테인은 오리스타틴 콘주게이션을 위한 부위일 수 있고 라이신은 메이

탄신 콘주게이션을 위한 부위일 수 있다. CDR의 아미노산에 대한 독소 콘주게이션은 GCC에 대한 항체의 결합 친화도 변형에 대한 우려를 야기할 것이다. 따라서 구현예에서, CDR에는 치료제에 콘주게이트될 수 있는 아미노산이 없다.

[0224] [표 1]

[0225] 항-GCC 토끼 mAb의 중쇄 및 경쇄에 대한 서열 목록 번호의 요약

mAb	IgG 사슬	핵산 서열 목록 번호	아미노산 서열 목록 번호
MIL-44-148-2 H2	중쇄	4	42
MIL-44-148-2 L5	경쇄	5	43
MIL-44-67-4 H2	중쇄	6	44
MIL-44-67-4 L4	경쇄	7	45

[0226]

[0227] MIL-44-148-2 H2 핵산(서열 목록 번호 4)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGCTCAGTGAAGGAGTCCGG
GGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAA
TGAAGTGGGTCGCCAGACTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACATACTAC
GCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCT
GACAGCCGCGGACACGGCCACTTATTCTGTGCCAGAGAGGATAGTATGGGGTATTATTTGACTTGTGGGGCCCAG
GCACCTTGGTCACCATCTCCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCTGGG
CTGCCTGGTCAAAGGTTACCTCCCGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGGACCCCTACCAATGGGGTACGCA
CCTTCCCGTCCGTCGCGCAGTCTCTCAGGCCTTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCC
GTCACCTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACCAAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCC
CACGTGCCCCACCCCTGAACTCTGGGGGACCGTCTGTCTTCACTTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGA
TCTCACGCAACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGACGTTACATGGTAC
ATAAACACAGCAGGTGCGCACCCGCGCGCCGCTACGGGAGCAGCAGTTCACAGCAGATCCGCGTGGTACAG
CACCTCCCCATCGCGCACCAAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGG
CCCCATCGAGAAAACCTCTCCAAGCCAGAGGGGACGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGG
GAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCCTCCGACATCTCGTGGAGTG
GGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACACAGACCACGCCGGCGGTGCTGGACAGCGAGGCTCCTACTTCTCT
ACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTG
CACAAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

[0228]

[0229] MIL-44-148-2 H2 아미노산(서열 목록 번호 42)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSHRMNWVRQTPGKLEWIAIITHNSITYY
ASWAKSRSTITRNTSENTVTILKMTSLTAADATATYFCAREDSMGYYFDLWGPGLVTTISSGQPKAPSVFPLAPCCGDT
PSSVTILGLVLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVHPATNTKVDKTV
APSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDDDPEVQFTWYINNEQVTRARPLREQQF
NSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY
PSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

[0230]

[0231] MIL-44-148-2 L5 핵산(서열 목록 번호 5)

ATGGACACGAGGGGCCCCCACTCAGCTGTGGGGCTCCTGTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATAT
GACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATT
GTAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCA
TCTGGGGTCTCATCGCGTTACAGAGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAGTGCGGTGGAGTGTGC

[0232]

CGATGCTGCCACTTACTACTGTGACGAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGTITCGGCGGAGGACCGAGG
TGGTGGTCAAA
GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCACCAGCTGTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGT
GTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTACCGGTACCTGGGAGGTGGATGGACACCCAAACAAGTGGCATCG
AGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAACACAG
TACAACAGCCACAAGAGTACACCTGCAGGGTGACCCAGGGCAGCACTCAGTCGTCAGAGCTTCAATAGGGGTGA
CTGTTAG

[0233]

[0234]

MIL-44-148-2 L5 아미노산(서열 목록 번호 43)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSI SNWLAWYQQKPGQSPKPLIYRASTLA
SGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADAAATYYCQQTYYNNHLDNFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGT
VTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCRVTQGTTSVVQSF
NRGDC

[0235]

[0236]

MIL-44-67-4 H2 핵산(서열 목록 번호 6)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGCTGAGTCGGTGGAGGAGTCCGG
GGGTCGCCTGGTACGCGCTGGGACACCCCTGACACTACCTGCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACATATGCAA
TATCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTAC
GCGAGCTGGGCGCAAAGGCCGGTTCGCCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGGAAATCACCAGTCCGAC
AACCGAGGACACGCCACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCAGGCA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCCTGGG
CTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAATCGGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCA
CCTTCCCGTCCGTCGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCC
GTCACTGCAACGTGGCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGACAAAGACCGTTCGCCCCTCGACATGCAGCAAGCC
CAGTGCCCCCCCCCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGA
TCTCACGACCCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGAGCTGAGCCAGGATGACCCGAGGTGCAGTTCACATGGTAC
ATAAACACGAGCAGGTGCGCACCCGCCCGCGCTACGGGAGCAGCAGTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAG
CACCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAGGGCAGCCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGG
GAGGAGCTGAGCAGCAGGTGCGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAGTG
GGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACATAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCTCCTACTTCCTCT
ACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGCGAGCGGGCGACGTCTTACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTG
CACACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

[0237]

[0238]

MIL-44-67-4 H2 아미노산(서열 목록 번호 44)

METGLRWLLLVAVLKGVCQCSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAPGKLEFIGYISYGKSIYY
ASWAKGRFAISKTSSTTVDLTITSPTTEDATYFCAREDSATYSPNLWGPGLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDP
SSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTV
PSTCKPTCPPELPGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFN
STIRVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYP
SDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSLKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

[0239]

[0240]

MIL-44-67-4 L4 핵산(서열 목록 번호 7)

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATAT
GACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTA
ACACCTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACGAGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCA
TCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGC
CGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGG
TGGTGGTCACA
GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGT
GTGTGTGGCGAATAAACTTTCCCGATGTACCGTCACTGGGAGGTGGATGGCACCAACCAAACTGGCATCG
AGAACAGTAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAG
TACAACAGCCACAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGA
CTGTTAG

[0241]

[0242]

MIL-44-67-4 L4 아미노산(서열 목록 번호 45)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSINTYLAWYQQKPGQRPKLLIYRASTLA
SGVSSRFKSGSGTEFTLTISGVECADAAATYYCQGYSYNNLDRAFGGGTEVVVTGDPVAPTVLIFPPAADQVATGT
VTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYN SHKEYTCKVTQGTTSVVQSF
NRGDC

[0243]

[0244] [표 2]

[0245] 항-GCC 토끼 mAb의 가변 영역에 대한 서열 목록 번호의 요약

mAb	IgG 사슬	핵산 서열 목록 번호	아미노산 서열 목록 번호
MIL-44-148-2 H2	중쇄	10	11
MIL-44-148-2 L5	경쇄	12	13
MIL-44-67-4 H2	중쇄	14	15
MIL-44-67-4 L4	경쇄	16	17

[0246]

[0247] [표 3]

[0248] 항-GCC 토끼 mAb의 mAb 가변 영역의 아미노산 서열

mAb	IgG 사슬	서열 목록 번호	아미노산 서열
MIL-44-148-2	중쇄	11	QSVKESGGGLFKPTDITLTCTVSGFSLSSHRMNVVRQTPGKLEWIAIITH NSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDSMGYYF DLWGPGLVTISS
MIL-44-148-2	경쇄	13	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQISNWLAWYQQKPGQSPKPLIYRAS TLASGVSSRFRGSGSGTQFTLTISGVECADEAATYYCQQTYYNNHLDNGFGGG TEVVVK
MIL-44-67-4	중쇄	15	QSVESGGRLVTPGTPLTCTASGSDISNYAISWVRQAPGKLEFIGYISY GKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVLEITSPTTEDTATYFCAREDSATYSPN LWGPGLVTYSS
MIL-44-67-4	경쇄	17	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQISNTYLAWYQQKPGQRPKLLIYRAS TLASGVSSRFRGSGSGTEFTLTISGVECADEAATYYCQGGYSNNLDRAFGGG TEVVVT

[0249]

[0250] [표 4]

[0251] 항-GCC 토끼 mAb의 mAb 가변 영역의 핵산 서열

mAb	IgG 사슬	서열 목록 번호	핵산 서열
MIL-44-148-2	중쇄	10	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCTGAC ACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTCATAGAATGAACTGGG TCCGCCAGACTCCAGGGAAGGGCTGGAATGGATCGCAATCATTACTATAAT AGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAA CACCAGCGAGAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACA CGGCCACTTATTCTGTGCCAGAGGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTG TGGGCCCCAGGCACCCCTGGTCACCATCTCTCA
MIL-44-148-2	경쇄	12	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGAGGCAC AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAACTGGTTAGCCTGGT ATCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCCAAGCCCTGATCTACAGGGCATCCACT CTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTT CACTCTCACCATCAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTC AGCAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGTTTGGCGGAGGGACCGAG GTGGTGGTCAAA
MIL-44-67-4	중쇄	14	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCTGGGACACCCCTGAC ACTCACCTGCACAGCCTCTGGATCCGACATCAGTAACTATGCAATATCCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAATTCATCGGATATATTAGTTATGGT AAAAGTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGCCGTTCCGCATCTCCAAAAC CTGTCGACCAACGGTGGATCTGGAATCACCAGTCCGACACCGAGGACACGG CCACCTATTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCTTAACCTTGTGG GGCCAGGCACCCCTGGTCACCGTCTCTCA
MIL-44-67-4	경쇄	16	GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGAGGCAC AGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCCTGGT ATCAGCAGAAACAGGGCAGCGTCCCAAGCTCTGATCTACAGGGCATCCACT CTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTT CACTCTCACCATCAGCGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTC AACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGTCTTCCGCGGAGGGACCGAG GTGGTGGTCAAA

[0252]

[0253] [표 5]

[0254] 항-GCC 토끼 mAb의 CDR의 아미노산 서열

mAb	IgG	서열 목록 번호	아미노산 서열
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	21	SHRMN
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	22	IITHNSITYYASWAKS
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	23	EDSMGYFFDL
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	27	QASQSIWNLA
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	28	RASTLAS
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	29	QQTYTNHLDNG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	33	NYAIS
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	34	YISYGKSIYYASWAKG
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	35	EDSATYSPNL
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	39	QASQSINTYLA
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	40	RASTLAS
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	41	QQGYSYNNLDRA

[0255]

[0256] [표 6]

[0257] 항-GCC 토끼 mAb의 CDR의 핵산 서열

mAb	IgG	서열 목록 번호	핵산 서열
MIL-44-148-2-H2	VH CDR1	18	AGTCATAGAATGAAC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR2	19	ATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGC
MIL-44-148-2-H2	VH CDR3	20	GAGGATAGTATGGGGTATTATTTTGACTTG
MIL-44-148-2-L5	VK CDR1	24	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAAGTGGTTAGCC
MIL-44-148-2-L5	VK CDR2	25	AGGGCATCCACTCTGGCATCT
MIL-44-148-2-L5	VK CDR3	26	CAGCAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGT
MIL-44-67-4 H2	VH CDR1	30	AACTATGCAATATCC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR2	31	TATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGC
MIL-44-67-4 H2	VH CDR3	32	AGTCCTAACTTG
MIL-44-67-4 L4	VK CDR1	36	CAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCC
MIL-44-67-4 L4	VK CDR2	37	AGGGCATCCACTCTGGCATCT
MIL-44-67-4 L4	VK CDR3	38	CAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCT

[0258]

[0259] 치료적 용도

[0260] 본원에 기재된 토끼 모노클로날 항-GCC 항체 분자는 시험관 내 및 생체 내 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이들 항체 분자는, 다양한 장애를 치료하고/하거나 예방하기 위해, 예로 시험관 내 또는 생체 외 배양에서 세포로 투여되거나 또는 예로 생체 내에서 대상체에 투여될 수 있다. 본 발명의 치료적 적용의 특정 구현예에서, 본 발명의 토끼 모노클로날 항-GCC 항체 분자는 본원에서 기술된 하나 이상의 기법을 이용하여 인간화된다.

[0261] 본원에 기재된 항체 분자, 면역콘주게이트, 및 융합 단백질은 GCC 단백질의 활성 또는 기능, 예컨대 리간드 결합(예로, ST 또는 구아닐린의 결합), GCC-매개 신호 전달, 장애, 전해질 항상성 유지, 세포내 칼슘 방출(칼슘 플럭스), 세포 분화, 세포 증식, 또는 세포 활성화를 조절하는데 이용될 수 있다.

[0262] 하나의 측면에서, 본 발명은 GCC-발현 세포를 사멸, 성장의 저해 또는 조절, 또는 대사의 방해 방법을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 GCC-매개 세포 신호전달의 저해 방법 또는 세포의 사멸 방법을 제공한다. 상기 방법은 GCC를 발현하는 임의의 세포 또는 조직, 예컨대 암성 세포와 함께 이용될 수 있다. GCC를 발현하는 암성 세포의 예에는 비제한적으로 위장관 유래의 암(예로, 결직장암, 위암, 소장암, 또는 식도암), 췌장암, 폐암(예로, 편평상피세포 암종, 선형평상피 암종, 선암종), 연조직 육종, 예컨대 평활근육종 또는 횡문근육종, 위장관 또는 기관지폐 신경내분비 종양, 또는 신경외배엽 종양, 또는 이들의 임의의 전이성 병소로부터의 세포가 포함된다. GCC-발현 세포의 비제한적 예에는 T84 인간 결장 선암종 세포, 신선 또는 냉동 결장 종양 세포, 및 GCC 또는 이들의 일부를 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 세포가 포함된다.

[0263] 본 발명의 방법에는 본원에 기재된 바와 같이, 유효한, 즉 GCC-매개 세포 신호전달을 저해하기 충분한 양 또는 세포를 사멸시키기 충분한 양으로, 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역콘주게이트와 세포를 접촉시키는 단계가 포함된다. 상기 방법은 배양에서, 예로 시험관 내, 생체 내, 생체 외, 또는 원 위치에서 세포 상에 이용될 수 있다. 예를 들어, GCC를 발현하는 세포(예로, 종양 또는 전이성 병소의 생검에 의해 수집된 세포; 확립된 암 세포주로부터의 세포; 또는 재조합 세포)는 배양 배지 중에서 시험관 내 배양될 수 있고, 접촉 단계는 항-GCC 항체 분자 또는 면역콘주게이트를 배양 배지에 첨가하여 시행될 수 있다. 세포의 사멸 방법에서, 상기 방법은 네이키드 항-GCC 항체 분자, 또는 항-GCC 항체 분자 및 세포독성제를 포함하는 면역콘주게이트의 이용을 포함한

다. 방법은 GCC를 발현하는 특정 종양 세포(예로, 결장 종양 세포)를 포함하는 GCC 발현 세포의 사멸을 일으킬 것이다.

[0264] 본 발명의 토끼 모노클로날 항체, 또는 이들의 인간화 버전은 당분야 숙련자에게 널리 공지된 면역형광 현미경 기법을 이용하여 GCC로의 결합 후 세포 내면화에 대해 평가될 수 있다. 내면화하는 것으로 확인되는 항체는 치료 목적으로 세포독성 부분에 또는 세포 조영을 위한 부분에 연결되는 경우 유용할 것이다. 내면화하지 않는 항체도 여전히 항체-의존적 세포-매개 세포독성 반응을 야기하도록 설계된 네이키드 항체를 이용하여 치료 방법을 위해 또는 진단 목적을 위해, 또는 아마도 리포좀 전달 방법을 위해 이용될 수 있다.

[0265] 본 발명의 항-GCC 항체 분자는 항원을 발현하는 세포에서 GCC의 세포외 도메인 또는 이들의 일부에 결합한다. 그 결과, 본 발명의 방법을 암성 세포의 사멸, 억제 또는 검출을 위해 수행하는 경우, 항체 또는 항원 결합 단편은 고정된 세포뿐만 아니라 세포내 항원성 도메인이 다른 방식으로 세포외 환경에 노출되는 세포에도 결합한다. 결과적으로, 항체 또는 항원 결합 단편의 결합은 세포가 고정되건 고정되지 않건, 생활성이건 괴사성이건 무관하게, GCC를 발현하는 세포가 있는 영역에서 농축된다. 부가적으로 또는 대안적으로, 항-GCC 항체 분자는 항원을 발현하는 세포에 결합 시 GCC에 결합하고 이를 내면화한다.

[0266] 상기 방법은 또한 생체 내 프로토콜의 일환으로, 대상체에 존재하는 세포 상에서 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다. 대안적으로, 대상체는 본원에 개시된 항-GCC 항체 분자가 교차 반응하는 GCC 항원을 발현하는 포유류일 수 있다. 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역공주게이트는 치료 목적을 위해 인간 대상체에 투여될 수 있다. 항-GCC 항체 분자 또는 면역공주게이트는 또한 항체가 인간 질환의 동물 모델로서 또는 수의학적 목적으로 교차 반응하는 GCC-유사 항원을 발현하는 비-인간 포유류(예로 영장류, 돼지 또는 마우스)에 투여될 수 있다. 동물 모델은 본 발명의 항체의 치료 유효성 평가(예로 투여량 및 투여의 시간 경과 평가)에 유용할 수 있다. 생체 내 구현예에 있어서, 접촉 단계는 대상체에서 시행되며, 세포 상에서 발현되는 GCC의 세포외 도메인에 대한 항체 분자의 결합 및 세포의 치료를 모두 허용하는데 효과적인 조건 하에 대상체에 대한 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역공주게이트의 투여가 포함된다.

[0267] 하나의 구현예에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 환자에게 항-GCC 항체 분자 또는 항-GCC 항체 분자 및 세포 독성제를 포함하는 면역공주게이트를 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 GCC 항원을 발현하는 적어도 일부 세포를 포함하는 임의의 암성 장애의 치료에 이용될 수 있다. 본원에서 이용되는 용어 "암"은 조직학적 유형 또는 침습 단계와 무관하게, 모든 유형의 암성 성장 또는 종양발생 절차, 전이성 조직 또는 악성으로 형질전환된 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것을 의미한다. 용어 "암" 및 "종양"은 상호교환적으로 이용될 수 있다(예로, 치료 방법의 맥락에서 이용되는 경우, "암의 치료" 및 "종양의 치료"는 동일한 의미를 갖는다).

[0268] 구현예에서, 치료는 대상체의 종양 성장을 감소시키거나 저해하기, 전이성 병소의 수 또는 크기를 감소시키기에, 종양 부하를 감소시키기에, 일차 종양 부하를 감소시키기에, 침습성을 감소시키기에, 생존 시간을 연장하기에, 또는 삶의 질을 유지하거나 개선하기에 충분하다.

[0269] 암성 장애의 예에는 비제한적으로 고형 종양, 연조직 종양, 및 전이성 병소가 포함된다. 고형 종양의 예에는 다양한 조직계, 예로 결장에 영향을 미치는 계의 악성물, 예로 육종, 선암종, 및 암종이 포함된다. 선암종에는 악성물, 예컨대 폐의 비-소세포 암종이 포함된다. 상기 언급된 암의 전이성 병소도 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 치료되거나 예방될 수 있다.

[0270] 일부 구현예에서, 치료될 GCC-발현 암은 위장관 유래의 일차 또는 전이성 암, 예컨대 결직장암, 위암, 소장암, 또는 식도암이다. 일부 구현예에서, 치료될 GCC-발현 암은 일차 또는 전이성 췌장암이다. 일부 구현예에서, 치료될 GCC-발현 암은 일차 또는 전이성 폐암, 예컨대 편평상피세포 암종, 선편평상피 암종, 또는 선암종이다. 일부 구현예에서, 치료될 GCC-발현 암은 육종, 예컨대 평활근육종 또는 횡문근육종이다. 일부 구현예에서, 치료될 GCC-발현 암은 일차 또는 전이된 신경외배엽 종양, 예컨대 부신혈관종 또는 부신신경절종이다. 일부 구현예에서, GCC-발현 암은 일차 또는 전이된 기관지폐 또는 위장관 신경내분비 종양이다.

[0271] 상기 방법은 임의 단계 또는 하위분류에서 관련 장애의 치료에 유용할 수 있다. 예를 들어, 방법은 초기 또는 후기 단계 결장암, 또는 임의의 단계 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, 및 IV의 결장암의 치료에 이용될 수 있다.

[0272] 일부 구현예에서, GCC-발현 암(예로, 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암, 평활근육종, 횡문근육종, 신경내분비 종양, 신경외배엽 종양 등)의 치료 방법은 본원에 기재된 네이키드 항-GCC 항체 분자의 치료를 필요

로 하는 환자에 대한 투여를 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자 및 세포독성제, 예컨대 메탄탄사노이드 또는 오리스타틴, 또는 이들의 유도체를 포함하는 면역곤주게이트의 투여를 포함한다. 항체 분자 및 면역곤주게이트의 투여 방법은 전술되어 있다. 사용되는 분자의 적합한 투여량은 대상체의 연령 및 체중, 그리고 사용되는 특정 화합물에 의존할 것이다.

[0273] 일부 구현예에서, 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트는 치료 사이클에 투여된다. "치료 사이클"은 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트가 전술된 바와 같이 투여되는 치료 기간에 이어 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트가 투여되지 않는 휴지 기간으로 구성된다. 치료 사이클은 원하는 효과를 달성하기 위해 필요에 따라 반복될 수 있다.

[0274] 본원에 기재된 항-GCC 항체(예로, 네이키드 항-GCC 항체 분자 또는 항-GCC 항체 분자 및 치료제를 포함하는 면역곤주게이트)는 다른 치료법과의 조합으로 이용될 수 있다. 예를 들어, 조합 치료법에는 하나 이상의 추가적 치료제, 예로 하나 이상의 항암제, 예로 세포독성제 또는 세포증식억제제, 호르몬 치료, 백신, 및/또는 다른 면역치료법과 함께 제형화되고/되거나 함께 투여되는 본 발명의 조성물이 포함될 수 있다. 다른 구현예에서, 항-GCC 항체는 수술, 방사선, 저온수술 및/또는 온열치료법을 포함하는 다른 치료적 처치 방식과 조합으로 투여된다. 이러한 조합 치료법은 유리하게는 더 낮은 투여량의 투여 치료제를 이용하여 다양한 단일치료법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 배제할 수 있다.

[0275] 본원에서 이용되는 "조합으로" 투여된 이란 2(또는 그 초과) 상이한 치료가 장애를 앓는 대상체의 경과 동안 대상체에 전달된다는 것을, 예로 대상체가 장애로 진단받은 뒤 장애가 해결되거나 제거되기 전에 2 또는 그 초과 치료의 치료가 전달된다는 것을 의미한다. 일부 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 두 번째 전달이 시작될 때 여전히 수행되고 있어서 겹침이 있다. 이는 본원에서 때때로 "동시에" 또는 "공동 전달"로 나타낸다. 다른 구현예에서, 하나의 치료의 전달은 다른 치료의 전달이 시작되기 전에 종료된다. 어느 한 경우의 일부 구현예에서, 치료는 조합된 투여로 인해 더 효과적이다. 예를 들어, 두 번째 치료가 더 효과적거나, 예로 더 적은 두 번째 치료로 동등한 효과가 나타나거나, 또는 두 번째 치료는 두 번째 치료가 첫 번째 치료의 부재 하에 투여된 경우 나타났을 것에 비해 더 큰 정도로 증상을 감소시키거나, 또는 첫 번째 치료와 유사한 상황이 나타난다. 일부 구현예에서, 전달은 증상 또는 장애에 관련된 다른 파라미터의 감소가 다른 것의 부재 하에 전달되는 하나의 치료로 관찰될 것에 비해 더 큰 것이다. 두 치료의 효과는 부분적으로 부가적이거나 전체적으로 부가적이거나 부가적인 것보다 클 수 있다. 전달은 전달되는 첫 번째 치료의 효과가 두 번째 전달 시에도 여전히 검출가능한 것일 수 있다.

[0276] 일부 구현예에서, 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역곤주게이트는 화학치료제와 조합 사용된다. DNA 손상 화학치료제의 비제한적 예에는 토포이소머라아제 I 저해제(예로, 이리노테칸, 토포테칸, 캄프토테신 및 이들의 유사체 또는 대사체 및 독소루비신); 토포이소머라아제 II 저해제(예로, 에토포시드, 테니포시드 및 다우노루비신); 알킬화 제제(예로, 멜팔란, 클로람부실, 부셀판, 티오테파, 이포스파미드, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조신, 데카르바진, 메토평렉세이트, 미토마이신 C, 및 시클로포스파미드); DNA 충격제(예로, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴); DNA 충격제 및 자유 라디칼 생성제, 예컨대 블레오마이신; 및 뉴클레오시드 모사체(예로, 5-플루오로우라실, 카페시틴, 젬시타빈, 플루다라빈, 시타라빈, 메르캅토평린, 티오구아닌, 펜토스타틴, 및 히드록시우레아)가 포함된다.

[0277] 세포 복제를 손상시키는 화학치료제에는 파클리탁셀, 도세탁셀 및 관련 유사체; 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 관련 유사체; 탈리도미드, 레날리도미드, 및 관련 유사체(예로, CC-5013 및 CC-4047); 단백질 티로신 키나아제 저해제(예로, 이마티닙 메실레이트 및 게피티닙); 프로테아좀 저해제(예로, 브로테조밋); NF- κ B 저해제, 예컨대 I κ B 키나아제 저해제; 암에서 과발현되는 단백질에 결합하여 세포 복제를 하향조절하는 항체(예로, 트라스투주맵, 리툽시맵, 세툽시맵 및 베바시주맵); 및 암에서 상향조절되거나 과발현되거나 활성화되어 그 저해가 세포 복제를 하향조절하는 것으로 알려져 있는 단백질 또는 효소의 다른 저해제가 포함된다.

[0278] 본 발명의 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트와 조합된 치료제(들) 또는 치료 방식의 선택은 치료될 장애에 의존할 것이다. 추가적인 제제(들) 또는 치료 방식에는, 예를 들어 치료받는 적응증에 대한 표준 승인 치료법이 포함될 수 있다. 예를 들어, 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역곤주게이트가 결장암을 치료하기 위해 이용되는 경우, 이는 또한, 예로 수술; 방사선 치료법; 5-플루오로우라실(5-FU), 카페시틴, 류코보린, 이리노테칸, 옥살리플라틴, 베바시주맵, 세툽시맵, 패니투몐, 또는 이들의 조합(예로, 옥살리플라틴/카페시틴(XELOX), 5-플루오로우라실/류코보린/-옥살리플라틴(FOLFOX), 5-플루오로우라실/류코보린/이리노테칸(FOLFIRI), FOLFOX + 베바시주맵, 또는 FOLFIRI + 베바시주맵)과의 조합으로 이용될 수 있다.

[0279] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제의 제조에서 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자 또는 면역콘주게이트의 용도를 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 약제는 암, 예로 위장관 암을 치료하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 약제는 표 1-6에 요약된 특징을 갖는 항-GCC 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제는 MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4 항체 분자, 또는 이들의 인간화 버전을 포함한다.

[0280] **항체 표지 및 검출**

[0281] 본원에 기재된 방법, 예로 시험관 내 및 생체 내 검출, 예로 진단, 단계결정, 또는 조영 방법에서 이용되는 항-GCC 항체 분자는 결합되거나 결합되지 않은 결합체의 검출을 촉진하는 검출가능한 물질로 직접 또는 간접 표지될 수 있다. 적합한 검출가능한 물질에는 다양한 생물학적 활성 효소, 리간드, 보철기, 형광 재료, 발광 재료, 화학발광 재료, 생물발광 재료, 발색 재료, 전자 밀집 재료, 상자성(예로, 핵 자기 공명 활성) 재료, 및 방사활성 재료가 포함된다. 일부 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 방사활성 이온, 예로, 인듐(¹¹¹In), 요오드(¹³¹I 또는 ¹²⁵I), 이트륨(⁹⁰Y), 루테튬(¹⁷⁷Lu), 액티늄(²²⁵Ac), 비스무스(²¹²Bi 또는 ²¹³Bi), 황(³⁵S), 탄소(¹⁴C), 삼중수소(³H), 로듐(¹⁸⁸Rh), 테크네튬(⁹⁹mTc), 프라세오디뮴, 또는 인(³²P); 또는 양전자-방출 방사선 핵종, 예로 탄소-11(¹¹C) 칼륨-40(⁴⁰K), 질소-13(¹³N), 산소-15(¹⁵O), 불소-18(¹⁸F), 갈륨(⁶⁸Ga), 및 요오드-121(¹²¹I)에 커플링된다. 시험관 내 또는 생체 내 진단/검출 방법에 사용하기 위한 본 발명의 항체에 콘주게이트될 수 있는 추가적인 방사활성 제제는 아래에 기재된다.

[0282] 예시적인 표지에는 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레신 및 그 유도체, 로다민 및 그 유도체, 단실, 움벨리페론, 루세리퍼라아제, 예로 초파리 루시퍼라아제 및 박테리아 루시퍼라아제(U.S. 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 및 2,3-디히드로프탈라진디온이 포함된다. 다른 예시적인 표지에는 홀스래디쉬 페록시다아제(HRP), 알칼린 포스파타아제, 갈락토시다아제, 글루코아밀라아제, 라이소자임, 당류 옥시다아제, 예로 글루코오스 옥시다아제, 갈락토오스 옥시다아제, 및 글루코오스 6-포스페이트 데히드로게나아제, 헤테로시클릭 옥시다아제, 예컨대 유리카아제 및 잔틴 옥시다아제로, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 채용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토펜록시다아제, 또는 마이크로페록시다아제에 커플링된 것, 바이오틴/애비딘, 회전 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등이 포함된다.

[0283] 형광단 및 발색단 표지된 항체 분자는 당분야에 공지된 표준 부분에서 제조될 수 있다. 항체 및 다른 단백질은 약 310nm까지의 파장을 갖는 광을 흡수하므로, 형광 부분은 310nm 초과, 바람직하게는 400nm 초과와 파장에서 실질적 흡광을 갖는 것이 선택되어야 한다. 다양한 적합한 형광 화합물 및 발색단은 [Stryer Science, 162:526(1968) 및 Brand, L. 등, *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868(1972)]에 기재된다. 항체는 통상적 절차, 예컨대 U.S. 특허 번호 3,940,475, 4,289,747, 및 4,376,110에 개시된 것에 의해 형광 발색단으로 표지될 수 있다.

[0284] 상기 기재된 여러 바람직한 특성을 갖는 형광체의 한 그룹은 잔틴 염료로, 여기에는 3,6-디히드록시-9-해닐잔트히드롤에서 유래된 플루오레신 및 3,6-디히드록시-9-페닐잔트히드롤에서 유래된 레사민 및 로다민, 그리고 리사님 로다민 B가 포함된다. 9-o-카르복시페닐잔트히드롤의 로다민 및 플루오레신 유도체는 9-o-카르복시페닐기를 갖는다. 반응성 커플링기, 예컨대 아미노 및 이소티오시아네이트기를 갖는 플루오레신 화합물, 예컨대 플루오레신 이소티오시아네이트 및 플루오레스카민이 쉽게 이용가능하다. 형광 화합물의 또 다른 그룹은 α 또는 β 위치에 아미노기를 갖는 나프틸아민이다.

[0285] 표지된 항체 분자는, 예를 들어 (i) 표준 기법, 예컨대 친화도 크로마토그래피 또는 면역침전에 의해 소정 항원을 단리하고; (ii) 단백질의 발현 과다성 및 패턴을 평가하기 위해 소정 항원을 검출하고(예로, 세포성 용해액 또는 세포 상청액에서); (iii) 임상 평가 절차의 일환으로, 예로 주어진 치료 요법의 유효성을 결정하기 위해 조직에서 단백질 수준을 모니터링하는 것을 포함하는 여러 맥락에서 진단적으로 및/또는 실험적으로 사용될 수 있다.

[0286] **시험관 내 진단**

[0287] 본원에 기재된 항-GCC 항체 및 면역콘주게이트는 GCC의 존재 또는 부재를 검출하기 위해, 예로 대상체로부터 수득된 생체 외 생물학적 표본에서 GCC의 존재 또는 분포 또는 부재를 검출(즉, 시험관 내 검출)하기 위해, 또는 대상체에서 GCC의 존재 또는 부재를 검출(즉, 생체 내 검출)하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 검출 방법은 다양한 장애를 검출하거나 진단하는데 또는 치료 결정을 안내하는데 유용하다. 본원에서 이용되는 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 본원에서 이용되는 GCC 또는 GCC 단백질의 검출은 항-GCC 항체 분

자가 결합하는 에피토프를 포함하는 GCC 단백질 부분의 검출을 또는 온전한 GCC 단백질의 검출을 의미한다.

- [0288] 따라서 또 다른 측면에서, 본 발명은 생물학적 표본, 예컨대 세포 또는 조직, 예로 종양 세포, 또는 GCC를 발현하는 하나 이상의 세포를 갖는 종양에서 GCC 발현의 검출 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자(예로, MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4)와 생물학적 표본을 접촉시키는 단계; 및 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체의 형성을 검출하여 GCC 단백질의 존재를 검출하는, 예로 GCC 발현 세포 또는 종양을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0289] 하나의 구현예에서, 항-GCC 항체 분자는 검출가능한 표지를 포함하는 면역공주게이트이다. 검출가능한 표지는 방사활성 제제일 수 있다. 대안적으로, 검출가능한 표지는 비-방사활성 제제(예로 전술된 바와 같은 형광단 또는 발색단)이다.
- [0290] 특정 구현예에서, 생물학적 표본에는 GCC를 발현하는 정상 및/또는 암성 세포 또는 조직이 포함된다. GCC를 발현하는 정상 세포 또는 조직의 예에는 세포 또는 조직 또는 위장관 유래, 특히 정상 결직장 세포 또는 조직이 비제한적으로 포함된다. GCC를 발현하는 암성 세포 또는 조직의 예에는 위장관 유래 암, 예컨대 결직장암, 위암, 소장암 및 식도암; 췌장암; 폐암, 예컨대 편평상피세포 암종, 선편평상피 암종 및 선암종; 연조직 육종, 예컨대 평활근육종 및 횡문근육종; 위장관 및 기관지폐 신경내분비 종양; 및 신경외배엽 종양이 비제한적으로 포함된다. 특정한 구현예에서, 정상 및/또는 암성 세포 조직은 다른 조직, 예를 들어 B 세포 및/또는 B 세포 연관 조직에 비해 더 높은 수준으로 GCC를 발현할 수 있다.
- [0291] 본원에 기재된 검출 방법은 시험관 내이건 생체 내이건 무관하게, 대상체에서 장애를 평가하는데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 장애는 세포 증식성 장애, 예컨대 암 또는 종양, 예로 결직장암, 위암 또는 췌장암이다.
- [0292] 하나의 측면에서, 본 발명은 시험관 내 생물학적 표본에서(예로, 대상체에서 수득된 세포 또는 조직 생검에서) GCC 단백질의 존재 또는 부재의 검출 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 대상체로부터 수득된 생물학적 표본과 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역공주게이트를 접촉시키는 단계 및 (ii) 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함한다. 복합체 형성은 생물학적 표본에서 GCC 단백질의 존재 또는 수준을 시사하는 반면, 복합체 형성의 부재는 생물학적 표본에서 GCC 단백질의 부재를 시사한다.
- [0293] 본원에 기재된 방법을 위한 예시적인 생물학적 표본은 세포, 세포들, 조직 또는 체액, 예컨대 염증성 삼출액, 혈액, 혈청, 장액, 대변 표본을 포함한다. 특정한 구현예에서, 생물학적 표본은 암성 세포(들) 또는 조직을 포함한다. 예를 들어, 표본은 종양 생검, 예로 결직장 종양, 위 종양, 식도 종양, 소장 종양, 폐 종양, 연조직 육종, 신경내분비 종양, 신경외배엽 종양의 생검, 또는 이들의 임의의 전이성 부위로부터의 조직 표본일 수 있다. 다른 구현예에서, 생물학적 표본은 혈액 또는 또 다른 유체일 수 있고, 여기서 유체는 암 세포를 포함한다. 생물학적 표본은 당분야에서의 임의의 여러 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 또한, 생물학적 표본은 고정제, 예컨대 포르말린으로 처리되고 파라핀 중에 임베딩되어 이용을 위해 절편화될 수 있다. 대안적으로, 신선 또는 냉동 조직이 채용될 수 있다. 다른 구현예에서, 미세 바늘 흡입물이 이용될 수 있다.
- [0294] 특정 구현예에서, 평가 세포 또는 조직은 GCC 발현과 연관된 장애를 갖는 것으로 추정되는 개인으로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 평가 세포 또는 조직은 장 상피 세포의 침단 표면 이외의 위치에서의 GCC 발현(예로, 장 상피 세포에서의 세포질 GCC 발현)과 연관된 장애, 또는 비-장 세포 또는 조직, 예컨대 췌장, 폐, 연조직, 또는 신경내분비 또는 신경외배엽 유래 조직에서의 GCC 발현과 연관된 장애를 갖는 것으로 추정되는 개인으로부터 수득된다. 특정 구현예에서, 평가 세포 또는 조직은 증가된 GCC 발현과 연관된 장애를 갖는 것으로 추정되는 개인으로부터 수득된다.
- [0295] 하나의 구현예에서, 대상체로부터의 표본에서 또는 대상체에서 GCC의 수준은 참조 수준, 예로 대조군 재료, 예로 대상체의 세포와 동일한 조직 유래의 정상 세포 또는 정상 세포와 필적하는 수준의 GCC를 갖는 세포에서 GCC의 수준과 비교된다. 상기 방법은, 예로 검출된 GCC 수준에 대한 반응성, 진단의 제공, 예후, 치료의 유효성 평가 또는 장애의 단계결정을 포함할 수 있다. 대조군 재료와 비교하여 표본 또는 대상체에서 더 높은 수준의 GCC는 증가된 GCC 발현과 연관된 장애의 존재를 시사한다. 대조군 재료와 비교하여 표본 또는 대상체에서 더 높은 수준의 GCC는 또한 치료 유효성의 상대적 부재, 상대적으로 더 불량한 예후 또는 더 후기 질환 단계를 시사할 수 있다. GCC 수준은 또한 향후 치료, 예로 더 많거나 더 적은 공격적인 치료의 필요성 또는 하나의 치료요법에서 다른 것으로의 전환 필요성을 평가하거나 선택하는데 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 GCC-표적 치료법, 예컨대 적어도 부분적으로 결정된 GCC 수준에 근거하여 본원에 기재된 GCC-표적화 치료법을 선택하고, 선택적으로 대상체에 대한 선택된 GCC-표적화 치료법의 투여를 추가로 포함한다.

- [0296] 항-GCC 항체 분자 및 GCC 간 복합체 형성은 GCC 항원에 결합된 항체(또는 항체 단편) 또는 미결합 항체 분자의 측정 또는 가시화에 의해 검출될 수 있다. 당업자는 항-GCC 항체의 GCC에 대한 결합을 검출하기 위한 여러 방식을 쉽게 이해할 수 있다. 이러한 방법에는 비제한적으로 당분야에 공지된 항원-결합 분석, 예컨대 웨스턴 블롯, 방사선 면역분석, ELISA(효소 연관 면역흡착 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역침전 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 및 면역조직화학(IHC)이 포함된다.
- [0297] 특정한 구현예에서, GCC는 본 발명의 항-GCC 항체를 이용한 면역조직화학에 의해 검출되거나 측정된다. 면역조직화학 기법은 GCC를 발현하는 세포를 확인하고 본질적으로 염색하는데 이용될 수 있다. 이러한 "염색"은 전이성 이동의 분석을 허용한다. 항-GCC 항체, 예컨대 본원에 기재된 것들이 고정 세포와 접촉되고, 세포에 존재하는 GCC가 항체와 반응한다. 항체는 세포를 염색하기 위한 단백질 A 또는 표지된 제2 항체를 이용하여 검출되거나 검출가능하게 표지된다. 하나의 특정한 구현예에서, MIL-44-148-2 항체는 생물학적 표본에서 GCC 발현을 검출하거나 측정하기 위해 IHC 분석에서 이용된다.
- [0298] 다른 통상적 검출 분석, 예로 웨스턴 블롯, 방사선 면역분석, ELISA(효소 연관 면역흡착 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역침전 분석, 형광 면역분석, 단백질 A 면역분석, 및 면역조직화학(IHC) 또는 방사선 면역분석(RIA)이 이용될 수 있다.
- [0299] 항-GCC 항체 분자의 표지에 대안적으로, GCC의 존재는 검출가능한 물질로 표지된 표준물질 및 미표지 항-GCC 항체 분자를 이용하는 경쟁 면역분석에 의해 표본에서 분석될 수 있다. 상기 분석에서, 생물학적 표본, 표지된 표준물질 및 GCC 결합체가 조합되고 미표지 항체에 결합된 표지된 표준물질의 양이 결정된다. 표본에서 GCC의 양은 GCC 결합체에 대한 표지된 표준물질의 양에 역으로 비례한다.
- [0300] 예를 들어 형광 에너지 전달 기법(FET, 예를 들어, Lakowicz 등, U.S. 특허 번호 5,631,169; Stavrianopoulos 등, U.S. 특허 번호 4,868,103 참고)을 이용하여 어느 한 성분(GCC 또는 항체 분자)의 추가 조작 또는 표지 없이 항-GCC 항체 분자 복합체 형성에 대해 GCC를 직접 검출할 수도 있다. 제1 "공여자" 분자 상의 형광단 표지는 적절한 파장의 입사광으로 여기 시 그 방출된 형광 에너지가 제2 "수신자" 분자 상의 형광 표지에 의해 흡수될 것이고, 이는 다시 흡수된 에너지로 인해 형광을 낼 수 있도록 선택된다. 대안적으로 "공여자" 단백질 분자는 단순히 트립토판 잔기의 천연 형광 에너지를 이용할 수 있다. "수신자" 분자 표지가 "공여자"의 것과 구분될 수 있도록 상이한 파장의 빛을 방출하는 표지가 선택된다. 표지 간 에너지 전달 효율은 분자를 분리하는 거리에 관련되므로, 분자 간의 공간적 관계가 평가될 수 있다. 분자 간 결합이 일어나는 상황에서, 분석에서의 "수신자" 분자 표지의 형광 방출이 최대여야 한다. FET 결합 이벤트는 당분야에 널리 공지된 표준 형광측정 검출 수단을 통해(예로 형광측정기를 이용해서) 편리하게 측정될 수 있다.
- [0301] 또 다른 예에서, 항체 분자가 GCC를 인식하는 능력의 결정은 기술, 예컨대 실시간 생체분자 상호작용 분석(BIA)(예로, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 및 Szabo 등, 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 참고)의 이용에 의해 어느 한 분석 성분(GCC 또는 항체 분자)을 표지하지 않고 수행될 수 있다. 본원에서 이용되는, "BIA" 또는 "표면 플라스몬 공명"은 임의 상호작용물의 표지 없이 실시간으로 생체특이적 상호작용을 연구하기 위한 기술이다(예로, BIACORETM). 결합 표면에서의 질량 변화(결합 이벤트의 지표)는 표면 근처 광의 굴절율을 변형시켜(표면 플라스몬 공명(SPR) 광학 현상), 생물학적 분자 간 실시간 반응의 지표로 이용될 수 있는 검출가능한 신호를 일으킨다.
- [0302] 일부 측면에서, 본 개시는 본원에 기재된 항체 분자(예로, 본원에 기재된 항체 분자 및, 예로 표지를 포함하는 면역콘주게이트) 및 생물학적 표본, 예로 본원에 기재된 생물학적 표본을 포함하는 반응 혼합물을 특징으로 한다. 다른 구현예에서, 반응 혼합물에는 본원에 기재된 항체 분자(예로, 본원에 기재된 항체 분자 및, 예로 표지를 포함하는 면역콘주게이트) 및 생물학적 표본, 예로 본원에 기재된 생물학적 표본에서 수득된 GCC를 포함할 수 있다.
- [0303] 특정 구현예에서, 방법, 예컨대 전술된 것들은 그 표면 상에 GCC를 발현하는 세포에서 수득되는 막 조제물 또는 세포 표면 상에 발현되는 GCC에 대한 항-GCC 항체의 결합 검출을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 항-GCC 항체의 GCC에 대한 결합을 허용하는 조건 하에 세포를 항-GCC 항체와 접촉시키는 단계 및 복합체가 세포 표면 상의 항-GCC 항체 및 GCC 간에 형성되는지를 검출하는 단계를 포함한다. 항-GCC 항체의 세포 표면 상에서 발현되는 GCC에 대한 결합의 검출을 위한 예시적인 분석은 "FACS" 분석이다.
- [0304] 생체 내 진단
- [0305] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 생체 내에서 GCC-발현 세포 또는 조직의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제

공한다. 상기 방법에는 (i) 대상체(예로, 암을 갖는 환자)에게 본 발명의 항-GCC 항체 분자(즉, MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67-4), 또는 이들의 항원 결합 단편, 바람직하게는 검출가능한 표지 또는 마커에 콘주게이트된 항체 또는 이들의 항원 결합 단편을 투여하는 단계; (ii) GCC-발현 조직 또는 세포에 대한 상기 검출가능한 표지 또는 마커를 검출하기 위한 수단에 대상체를 노출시키는 단계가 포함된다. 이러한 생체 내 방법은 장애, 예컨대 암을 앓는 환자의 평가, 진단, 단계결정 및/또는 예후를 위해 이용될 수 있다. 상기 방법은 (i) 대상체에 항-GCC 항체 분자 또는 이들의 면역콘주게이트를 투여하는 단계; 및 (ii) 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함한다. 복합체 형성은 대상체에서 GCC의 존재 또는 수준을 시사하는 반면, 복합체 형성의 부재는 대상체에서 GCC의 부재를 시사한다.

[0306] 이러한 개인은 전이된 GCC-발현 암을 앓는 것으로 진단될 수 있고, 전이된 GCC-발현 암 세포는 항-GCC 항체 분자 및 활성 부분을 포함하는 콘주게이트된 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물의 개인에 대한 투여에 의해, 바람직하게는 정맥내 투여에 의해 검출될 수 있고, 여기서 활성 부분은 방사활성 제제이며, 편재된 방사활성의 추적 또는 응집의 존재 검출은 GCC 발현 세포의 존재를 시사한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 및 항-GCC 항체 분자 및 활성 부분을 포함하는 콘주게이트된 화합물을 포함하며, 여기서 활성 부분은 방사활성 제제이고 항-GCC 항체 분자는 본원에 기재된 MIL-44-148-2 항체, 또는 이들의 단편 또는 이들의 유도체이다.

[0307] 하나의 특정한 구현예에서, 방사선 핵종은 생체 내 조영 절차에서 조영제로 이용하기 위한 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 콘주게이트될 수 있다. 조영제는 진단 절차뿐만 아니라 전이된 세포의 위치를 확인하는데 이용되는 절차에도 유용하다. 예를 들어, 개인은 전이된 결직장암을 앓는 것으로 진단될 수 있고, 전이된 결직장암 세포는 본 발명의 항-GCC 항체 분자 및 활성 부분을 포함하는 콘주게이트된 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물의 개인에 대한 투여에 의해, 바람직하게는 정맥내 투여에 의해 검출될 수 있고, 여기서 활성 부분은 방사선 핵종이며, 편재된 방사활성의 추적 또는 응집의 존재 검출은 GCC 발현 세포의 존재를 시사한다.

[0308] 조영은 당업자에게 널리 공지된 여러 절차에 의해 수행될 수 있고, 이러한 절차에서 유용한 적절한 조영제는 널리 공지된 수단에 의해 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 콘주게이트될 수 있다. 본 발명에 따른 진단 조영에 유용한 표지의 예는 방사표지, 예컨대 ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{188}Rh , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, ^{99}Tc , ^{111}In , $^{113}\text{M In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb 및 ^{206}Bi , 및 ^{213}Bi ; 형광 표지, 예컨대 플루오레신 및 로다민; 핵 자기 공명 활성 표지; 단일 광자 방출 전산 단층촬영("SPECT") 검출기 또는 양전자 방출 단층촬영("PET") 스캐너에 의해 검출가능한 산소, 질소, 철, 탄소 또는 갈륨(예로, ^{68}Ga , ^{18}F)의 양전자 방출 동위원소; 화학발광제, 예컨대 루시페린; 및 효소 마커, 예컨대 페록시다아제 또는 포스포타아제이다. 단거리 방사선 방출체, 예컨대 단거리 검출기 탐침으로 검출가능한 동위원소, 예컨대 경직장 탐침이 또한 채용될 수 있다. 조영은 또한, 예를 들어 방사선 선허조영술, 핵 자기 공명 조영(MRI) 또는 전산화 단층촬영(CT 스캔)에 의해 수행될 수 있다. CT 스캔에 의한 조영은 중금속, 예컨대 철 킬레이트를 채용할 수 있다. MRI 스캐닝은 가돌리늄 또는 망간의 킬레이트를 채용할 수 있다.

[0309] 항체는 당분야에 공지된 기법을 이용하여 이러한 제제로 표지될 수 있다. 예를 들어, 각각 본원에 참조로 도입된 [Magerstadt, M.(1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton, Fla.; 및 Barchel, S. W. and Rhodes, B. H.,(1983) Radioimaging and Radiotherapy, Elsevier, NY, N.Y.]는 항체의 아미노산에 대한 다양한 치료 및 진단 방사선 핵종의 콘주게이션을 교시한다. 이러한 반응은 적절한 킬레이트 제제 및/또는 링커를 이용하여 본 발명의 항-GCC 항체 분자에 방사선 핵종을 콘주게이트하는데 적용될 수 있다. 또한 항체의 방사표지에 관한 기법에 대해서는 [Wensel and Meares(1983) Radioimmunoimmunotherapy and Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y.]를 참고하라. 또한 [D. Colcher 등, Meth. Enzymol. 121: 802-816(1986)]를 참고하라.

[0310] 방사표지된 항체의 경우, 항체는 환자에게 투여되고, 항체가 반응하는 항원을 보유하는 종양으로 편재되고, 예로 감마 카메라 또는 방출 단층촬영 또는 전산화 단층촬영을 이용하여 공지된 기법, 예컨대 방사핵 스캐닝을 이용하여 생체 내 검출되거나 "조영된다". 예로, [A. R. Bradwell 등, "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin 등,(eds.), pp 65-85(Academic Press 1985)]를 참고하라. 대안적으로, 양전자 방출 횡측 단층촬영 스캐너, 예컨대 Brookhaven 국립 연구소에 위치한 지정 Pet VI가 이용될 수 있고, 여기서 방사표지는 양전자(예로, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , 및 ^{13}N , ^{68}Ga)를 방출한

다.

[0311] 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체, 예로 인간 대상체에 방사활성 동위원소가 콘주게이트된 항-GCC 항체 분자가 투여되는 경우 상이한 조직이 노출되는 선량, 예로 방사 선량을 결정하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법에는 (i) 대상체에 본원에 기재된 항-GCC 항체 분자, 예로 방사활성 동위원소로 표지된 항-GCC 항체 분자를 투여하는 단계; (ii) 방사활성 동위원소의 일부 또는 전부가 대상체의 신체에서 제거될 때까지 다양한 시점에서 상이한 조직, 예로 종양, 또는 혈액에 위치한 방사활성 동위원소의 양을 측정하는 단계; 및 (iii) 분석되는 각 조직이 받는 전체 방사선 선량을 계산하는 단계가 포함된다. 측정은 예정된 시점에, 예로 방사활성 표지된 항-GCC 항체 분자의 대상체로의 투여(0일) 후 1, 2, 3, 5, 7, 및 12일에 섭취될 수 있다. 주어진 조직에 존재하고, 경시적으로 적분되어 방사선 동위원소의 비활성이 곱해지는 방사선 동위원소의 농도를 이용하여 주어진 조직이 받는 선량을 계산할 수 있다. 하나의 방사활성 동위원소, 예로 감마-방출체, 예로 ^{111}In 으로 표지된 항-GCC 항체 분자를 이용하여 생성되는 약리학적 정보를 이용하여 쉽게 측정될 수 없는 상이한 방사활성 동위원소, 예로 베타-방출체, 예로 ^{90}Y 로부터 동일한 조직이 받을 예측 선량을 계산할 수 있다.

[0312] GCC-표적화 치료법을 위한 동반 진단

[0313] 본원에 기재된 시험관 내 및 생체 내 진단 방법은 환자의 세포 또는 조직 내 또는 표면의 GCC 발현의 존재 또는 부재에 각각 근거하여 환자가 증식성 질환, 예컨대 암, 또는 위장관 장애, 예컨대 염증성 장 증후군, 크론병 또는 변비를 앓는지 또는 GCC-표적화 치료법으로 치료받아야 하는지 아닌지를 알려주는데 유용하다. 세포 표면 상이나 세포 내에 GCC를 발현하는 하나 이상의 세포를 갖는 환자는 GCC-표적화 치료법을 이용한 치료의 후보이다.

[0314] 특정 측면에서, 본 발명은 GCC-발현 질환 또는 장애를 앓는 것으로 추정되는 환자의 GCC-표적화 치료법에 대한 민감성 결정 방법에 있어서, (i) 대상체에서 수득된 생물학적 표본과 본 발명의 항-GCC 항체 분자를 접촉시키는 단계; (ii) 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하며; 여기서, 복합체 형성은 생물학적 표본에서 GCC 단백질의 존재 또는 수준을 시사하는 반면 복합체 형성의 부재는 생물학적 표본에서 GCC 단백질의 부재를 시사하여 GCC-표적화 치료법에 대한 환자의 민감성을 결정하는 방법을 제공한다. 특정한 구현예에서, 생물학적 표본에서 항-GCC 항체 분자 및 GCC 단백질 간 복합체 형성은 본원에 기재된 항체 분자, 예로 본원에 기재된 MIL-44-1482 항체를 이용하는 면역조직화학을 통해 검출된다.

[0315] 예시적인 생물학적 표본은 세포, 세포들, 조직 또는 체액, 예컨대 염증성 삼출액, 혈액, 혈청, 장액, 대변 표본을 포함할 수 있다. 특정한 구현예에서, 생물학적 표본은 암성 세포(들) 또는 조직을 포함한다. 예를 들어, 표본은 종양 생검, 예로 결직장 종양, 위 종양, 식도 종양, 소장 종양, 폐 종양, 연조직 육종, 신경내분비 종양, 신경외배엽 종양의 생검, 또는 이들의 임의의 전이성 부분의 조직 표본일 수 있다. 다른 구현예에서, 생물학적 표본은 혈액 또는 또 다른 유체일 수 있고, 여기서 유체는 암 세포를 포함한다. 생물학적 표본은 당분야의 임의의 여러 방법을 이용하여 수득될 수 있다. 또한, 생물학적 표본은 고정제, 예컨대 포름알데히드로 처리되고 파라핀 중에 임베딩되어 이용을 위해 절편화될 수 있다. 대안적으로, 신선 또는 냉동 조직이 채용될 수 있다. 다른 구현예에서, 미세 바늘 흡입물이 이용될 수 있다.

[0316] 본원에 기재된 동반 진단 방법을 이용하여 평가되고(예로 진단되고) 치료될 수 있는 예시적인 질환/장애에는 비제한적으로 결직장암, 위암, 소장암, 식도암, 췌장암, 폐암(예로, 편평상피세포 암종, 선형상피암종, 선암종), 연조직 육종, 예컨대 평활근육종 및 횡문근육종, 위장관 및 기관지폐 신경내분비 종양, 및 신경외배엽 종양을 비제한적으로 포함하는 증식성 장애, 염증성 장 증후군, 크론병, 및 변비와 같은 위장관 장애, 및 파킨슨병과 같은 신경학적 장애가 포함된다.

[0317] 본 발명의 방법은 환자를 GCC-표적화 치료법으로 치료할지에 대해 의사의 결정을 안내한다. 본원에 제공된 방법은 또한 개인별 치료 보고서, 예로 본원에 기재된 GCC-표적화 치료법을 이용한 개인별 암 치료 보고서의 생성을 허용한다.

[0318] GCC-표적화 치료법은 본원에 기재된 GCC-발현 질환 또는 GCC-매개 질환, 예로 GCC-발현 질환 또는 GCC-매개 질환을 치료 또는 예방하는 치료제이다. 본 발명의 특정 측면에서, GCC-표적화 치료법은 GCC-리간드, 예컨대 제제, 예컨대 치료제에 콘주게이트된 항-GCC 항체 분자 또는 펩티드 리간드(예로, ST 펩티드)이다. 치료제에 콘주게이트된 예시적인 GCC-리간드(즉, 면역콘주게이트)는, 예로 그 내용의 전문이 본원에 참조로 도입되는 U.S. 공개 특허 출원 번호 20110110936에 기재된다. 특정한 구현예에서, GCC-표적화 치료제는 세포독성제에 콘주게이트된 항-GCC 인간 IgG1 모노클로날 항체이고, 여기서 mAb에는 아래 표 7(아미노산 서열) 및 8(대응하는 핵산

서열)에 기재된 3개의 경쇄 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 갖는 경쇄 가변 영역(VL) 및 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2, 및 CDR3)을 갖는 중쇄 가변 영역(VH), 및 아래 표 9(아미노산 서열) 및 10(대응하는 핵산 서열)에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 포함된다.

[0319] [표 7]

[0320] VL CDR 및 VH CDR의 아미노산 서열

VH CDR1	서열 목록 번호 67	GYWS
VH CDR2	서열 목록 번호 68	EINHRGNTNDNPSLKS
VH CDR3	서열 목록 번호 69	ERGYTYGNFDH
VL CDR1	서열 목록 번호 70	RASQSVSRNLA
VL CDR2	서열 목록 번호 71	GASTRAT
VL CDR3	서열 목록 번호 72	QQYKTWPRT

[0321]

[0322] [표 8]

[0323] VL CDR 및 VH CDR의 핵산 서열

VH CDR1	서열 목록 번호 73	GGTTACTACTGGAGC
VH CDR2	서열 목록 번호 74	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCTCAA G
VH CDR3	서열 목록 번호 75	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTGACCAC
VL CDR1	서열 목록 번호 76	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCC
VL CDR2	서열 목록 번호 77	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
VL CDR3	서열 목록 번호 78	CAGCAGTATAAACCTGGCCTCGGACG

[0324]

[0325] [표 9]

[0326] mAb 가변 영역의 아미노산 서열

중쇄	서열 목록 번호 79	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIG EINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARE RGYTYGNFDHWGGGTLTVSS
경쇄	서열 목록 번호 80	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRTF GGGTNVEIK

[0327]

[0328] [표 10]

[0329] mAb 가변 영역의 핵산 서열

중쇄	서열 목록 번호 81	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTCA GTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG CTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGA CAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGT CCAAGAACCAGTTGCGCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCG GACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAAGCTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT CCTCA
경쇄	서열 목록 번호 82	GAAATAGTGATGACGCGAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAGAGCCACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTTA GCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACAGGGCCACTGGAATCCC AGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCA CCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGT CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTGCGCCAAGGGACCAA CGTGGAAATCAAA

[0330]

[0331] 표 7 및 8에 나타난 VL CDR 및 VH CDR을 함유하는 전장 hIgG1 중쇄 및 h카파 경쇄 서열 그리고 표 9 및 10에 나타낸 가변 중쇄 및 경쇄 영역에 대한 아미노산 및 대응하는 핵산 서열을 아래에 나타낸다:

[0332] hIgG1 중쇄 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACA
GGTGTCCTACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC
GGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGG
AGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAATCAATCA
TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAG
ACACGTCCAAGAACCAGTTGCGCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACG
GCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAAGCTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGG
GGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
ACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG

[0333]

[0334] TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG

[0335] GTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG (서열 목록 번호 83)

[0336] hIgG1 중쇄 단백질 서열은 다음과 같다:

MGWSCILFLVATATGVHVSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIRQ
PPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTVISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARE
RGYTYGNFDHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0337]

[0338] (서열 목록 번호 84)

[0339] 카과 경쇄 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

GCGGCCGCCCTACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTA
CAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTC
CAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTA
GCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC
ACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTT
CACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCA
GTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTA
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGC
AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT

[0340]

CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

[0341]

[0342] (서열 목록 번호 85)

[0343] h카과 경쇄 단백질 서열은 다음과 같다:

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKP
GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTIGSLQSEDFVYYCQYKTWPRTFGQ
GTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

[0344]

QESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0345]

[0346] (서열 목록 번호 86)

[0347] 본 발명의 하나의 특정 측면에서, GCC-표적화 치료법은 오리스타틴 분자에 콘주게이트된 항-GCC 항체 분자를 갖는 면역콘주게이트이다. 하나의 구현예에서, 면역콘주게이트는 오리스타틴 분자에 콘주게이트된, 서열 목록 번호 67, 68 및 69에 따른 3개의 중쇄(VH) CDR 및 서열 목록 번호 70, 71 및 72에 따른 3개의 경쇄(VL) CDR을 포함하는 항-GCC 항체 분자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 면역콘주게이트는 오리스타틴 분자에 콘주게이트된, 서열 목록 번호 79에 따른 중쇄 가변 영역 및 서열 목록 번호들 80에 따른 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-GCC 항체 분자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 면역콘주게이트는 각각 오리스타틴 분자에 콘주게이트된, 서열 목록 번호 79 및 80에 따른 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-GCC 항체 분자를 포함한다.

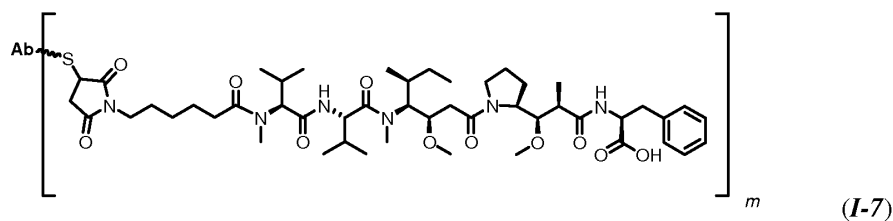
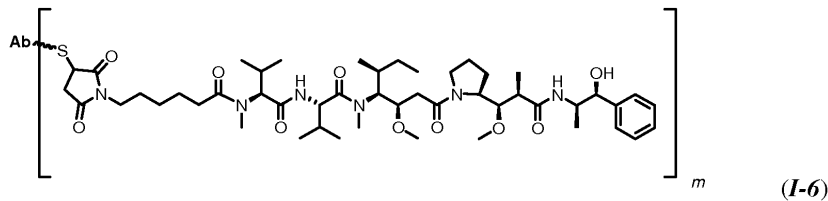
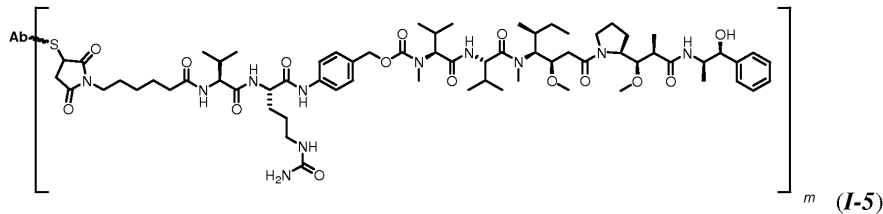
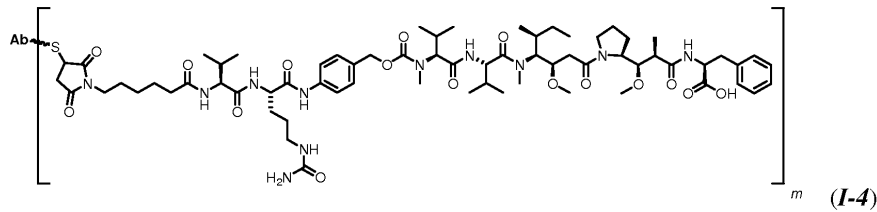
[0348] 일부 구현예에서, 오리스타틴 분자는 말레이미드 부분, 예로 말레이미도카프로일 부분을 함유하는 링커에 의해 항-GCC 항체 분자 상의 시스테인 부분에 연결된다.

[0349] 일부 구현예에서, 오리스타틴 분자는 오리스타틴 분자 상의 히드록실기에 연결된 이중기능성 링커를 이용하여 항-GCC 항체 분자에 커플링된다. 이러한 일부 구현예에서, 링커는 히드라존을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 말레이미도카프로일히드라지드 및 케토카르복실산, 예로 5-벤조일발레르산의 반응에 의해 형성된 히드라존 화합물이다. 특정한 구현예에서, 링커는 (Z)-6-(2-(6-(2,5-디옥소-2,5-디히드로-1H-피롤-1-일)-헥사노일)-히드

라조노)-6-페닐헥산산이다.

[0350] 일부 다른 구현예에서, 오리스타틴 분자는 오리스타틴 분자 상의 모노메틸 아미노기에 연결된 이중기능성 링커를 이용하여 항-GCC 항체 분자에 커플링된다. 일부 구현예에서, 링커는 절단가능한 부분, 예로 펩티드 부분 및 자가-파괴성 *p*-아미노벤질카르바메이트 스페이서를 포함한다. 예시적인 링커에는 말레이미도카프로일(mc), 말레이미도카프로일-L-페닐알라닌-L-라이신-*p*-아미노벤질-카르바메이트, 및 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-*p*-아미노벤질카르바메이트(vc)가 포함된다.

[0351] 특정 구현예에서, GCC-표적화 치료법은 화학식 Ab-(vc-MMAF)_m(화학식 (I-4)); Ab-(vc-MMAE)_m(화학식 (I-5)); Ab-(mc-MMAE)_m(화학식 (I-6)); 또는 Ab-(mc-MMAF)_m(화학식 (I-7))을 특징으로 하는 면역결합제이며, 여기서 Ab는 특정, 예컨대 표 7, 8, 9 또는 10 중 어느 하나에 기재된 특징을 포함하는 항-GCC 항체 분자이고, S는 항체의 황 원자이고, *m*은 약 1 내지 약 15 범위이다. 특정 구현예에서, *m*은 1 내지 약 5의 범위이다.



[0352] 일부 구현예에서, 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)에서의 변수 *m*은 약 2 내지 약 10, 약 6 내지 약 8, 약 4 내지 약 6, 약 3 내지 약 5, 또는 약 1 내지 약 3 범위이다.

[0353] 특정한 구현예에서, 표적화 GCC 치료법은 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 면역결합제이며, 여기서 Ab는 서열 목록 번호 67, 68 및 69에 따른 3개의 중쇄(VH) CDR 및 서열 목록 번호 70, 71 및 72에 따른 3개의 경쇄(VL) CDR 영역을 포함하는 항체 분자이고, *m*은 약 3 내지 약 5(예로, 약 4)이다. 특정 측면에서, 각각 서열 목록 번호들 67, 68 및 69에 따른 중쇄 CDR 및 서열 목록 번호들 70, 71 및 72에 따른 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 Ab는 인간 모노클로날 항체, 바람직하게는 인간 IgG1 항체이다.

[0354] 다른 특정한 구현예에서, GCC-표적화 치료법은 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 면역결합제이며, 여기서 Ab는 서열 목록 번호들 79에 따른 중쇄 가변 영역 및 서열 목록 번호들 80에 따른 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체 분자이고, *m*은 약 3 내지 약 5(예로, 약 4)이다. 특정 측면에서, 서열 목록 번호 79 및 80에 따른 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 Ab는 인간 모노클로날 항체, 바람직하게는 인간 IgG1 항체이다.

다.

- [0357] 또 다른 특정한 구현예에서, GCC-표적화 치료법은 화학식 (I-4), (I-5), (I-6), 또는 (I-7)의 면역곤주게이트이며, 여기서 Ab는 서열 목록 번호 84에 따른 중쇄 IgG1 서열 및 서열 목록 번호 86에 따른 카파 경쇄 서열을 포함하는 인간 IgG 모노클로날 항체 분자이고, m 은 약 3 내지 약 5(예로, 약 4)이다.
- [0358] 또 다른 구현예에서, GCC-표적화 치료법은 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 GCC-리간드 곤주게이트이다. 예를 들어 특정 측면에서, 본 발명은 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 있는 신경보호 제제, 예컨대 L-도파에 곤주게이트된 GCC-리간드에 관한 것이다. 이러한 GCC-리간드 곤주게이트의 예는 그 내용의 전문이 본원에 참조로 도입된 공개된 PCT 출원 W02013/016662에 기재되어 있다. 본 발명의 구현예에서, 그 뉴론이 GCC를 발현하는 신경학적 장애(예로, 파킨슨병)를 앓거나 갖는 것으로 추정되는 환자는 신경보호 제제에 곤주게이트된 GCC-리간드를 이용한 치료에 대해 우수한 후보로 간주될 것이다.
- [0359] 본 발명의 일부 측면에서, GCC-표적화 치료법은 GCC 길항제이다. 하나의 구현예에서, GCC-표적화 치료법은 GCC의 펩티드 길항제(예로, ST 펩티드) 또는 소분자 저해제이다.
- [0360] 일부 측면에서, GCC-표적화 치료법은 GCC 작용제이다. 하나의 구현예에서, GCC 작용제는 ST 펩티드이다. 특정한 구현예에서, GCC 작용제는 아미노산 서열 $\text{H-Cys}^1\text{-Cys}^2\text{-Glu}^3\text{-Tyr}^4\text{-Cys}^5\text{-Cys}^6\text{-Asn}^7\text{-Pro}^8\text{-Ala}^9\text{-Cys}^{10}\text{-Thr}^{11}\text{-Gly}^{12}\text{-Cys}^{13}\text{-Tyr}^{14}\text{-OH}$ (서열 목록 번호 87)을 포함하는 ST 펩티드이며, 여기서 Cys^1 및 Cys^6 간에, Cys^2 및 Cys^{10} 간에, 그리고 Cys^5 및 Cys^{13} 간에 3개의 디설피드 결합이 존재한다. 특정한 구현예에서, GCC 작용제는 GCC에 결합하는 펩티드 작용제, 예컨대 리나클로티드(Ironwood Pharmaceuticals)이다.
- [0361] 본 발명의 특정 구현예에서, 그 종양 세포가 이들의 표면 상에 GCC를 발현하는 환자는 독소-곤주게이트된 항-GCC 항체 분자, 예컨대 본원에 기재된 면역곤주게이트, 또는 그 내용의 전문이 본원에 참조로 도입된 U.S. 공개 특허 출원 번호 20110110936에 기재된 바와 같은 독소-곤주게이트된 항체를 이용한 치료를 위해 우수한 후보로 간주될 것이다. 임의의 이론에 구애받지 않고, 그 종양 세포가 이들의 표면 상에 소량의 GCC를 발현하는 환자는 이를 위해 우수한 후보가 아닐 수 있거나 추가적인 치료 방법과 GCC-표적화 치료법의 조합을 위한 후보일 수 있거나 또는 네이키드 항체 치료법을 위한 후보일 수 있다. 또 다른 예에서, GCC-표적화 치료법의 용량은 종양 세포의 표면 상에 발현되는 GCC 분자의 수를 반영하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 이들의 종양 세포 표면 상에 다수의 GCC 분자를 갖는 환자는 종양 세포 표면에 발현되는 소수의 GCC 분자를 갖는 환자에 비해 더 낮은 용량의 GCC-표적화 치료법으로 치료받을 수 있다. 생체 내 GCC-발현 종양 세포의 존재 검출은 일차 GCC-발현 종양이 전이된 조직의 확인을 허용할 수 있다. 어느 조직이 전이를 갖는지에 대한 지식은 종양 치료법의 표적화 적용으로 이어질 수 있다.
- [0362] 상기 논의된 비와 같이, 본원에 기재된 항체 분자는 정상 대 신생물 조직에서 GCC 단백질의 존재 평가를 허용하며, 이를 통해 질환의 존재 또는 중증도, 질환 진행 및/또는 치료법의 유효성이 평가될 수 있다. 예를 들어, 치료법이 모니터링되고 유효성이 평가될 수 있다. 하나의 예에서, GCC 단백질은 증식성 질환을 갖는 대상체로부터 수득된 제1 표본에서 검출 및/또는 측정될 수 있고, 치료법이 개시될 수 있다. 이후, 대상체로부터 제2 표본이 수득될 수 있고, 표본에서의 GCC 단백질이 검출 및/또는 측정될 수 있다. 제2 표본에서 측정 또는 검출되는 GCC 단백질의 양의 감소는 치료 유효성을 시사할 수 있다.
- [0363] 임의의 이론에 구애받지 않고, 혈관화는 GCC-표적화 치료제가 GCC 발현 종양에 접근하기 위해, 특히 GCC-표적화 치료제가 정맥내 투여되는 경우에 필요할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법의 특정 구현예에서, GCC 단백질의 검출에 부가하여 또는 이와 함께 종양 혈관계를 평가하거나 분석하는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 조직 표본은 GCC 발현 및 조직 혈관화를 동시에 또는 동시대적으로 분석하기 위해 혈관 내피 세포를 확인하는 제제, 예컨대 항-CD-31 항체 또는 항-폰 빌레브란트 인자 항체 분자, 및 본 발명의 항-GCC 항체로 염색될 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, GCC 발현 및 혈관계의 이러한 동시적 또는 동시대적 분석은 표적화-치료제를 위한 환자 선택 도구로서 유용하다.
- [0364] 또 다른 측면에서, GCC의 세포 표면 발현은 GCC-표적화 치료제가 GCC 발현 종양 세포의 사멸에 영향을 미치는 데 필요할 수 있다. 예를 들어, 일부 종양 세포는 GCC를 발현할 수 있지만 세포 표면 상에서는 아니다. 치료제가 세포 표면 GCC 발현에 의존하는 경우, 이러한 치료제는 GCC가 주로 세포내에 있는 세포를 사멸시키지 못할 수 있다. 따라서 본 발명의 일부 구현예에서, 진단 또는 예후 분석에는, 예로 그 방법이 세포내 발현으로부터 세포 표면 발현을 구별하고/하거나 정량할 수 있는, GCC의 세포성 위치의 분석 및/또는 정량이 추가로 포함될 수

있다. 임의 이론에 구애받고자 하지 않고, 그 종양이 주로 세포내 GCC 발현을 갖는 환자는 GCC의 세포외 도메인에 결합하는 항-GCC 항체 분자에 대한 우수한 후보가 아닐 수 있다. 대안적으로, 이러한 분석 결과는 GCC의 세포 표면 발현을 유도하는 제제를 이용한 초기 치료를 촉발시킬 수 있다(예로, PCT 공개 번호 W004/071436 참고). GCC 세포 표면 유도에 이어 또는 이와 함께, 세포외 발현되는 GCC에만 접근하거나 결합하는 항-GCC 항체 분자가 투여될 수 있다.

[0365] **키트**

[0366] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트를 포함하는 키트가 본 발명의 범위에 속한다. 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트를 포함하는 리포좀 조성물을 포함하는 키트가 추가로 포함된다. 키트에는 사용 지침; 다른 시약, 예로 표지, 치료제, 또는 킬레이터 또는 다른 커플링에 유용한 제제, 표지 또는 치료제에 대한 항체, 또는 방사보호 조성물; 투여를 위해 항체를 제조하기 위한 장치 또는 다른 재료; 약학적으로 허용가능한 담체; 및 대상체에 투여하기 위한 장치 또는 다른 재료를 포함하는 하나 이상의 다른 요소가 포함될 수 있다. 사용 지침에는 시험관 내, 예로 표본에서, 예로 암을 갖는 환자의 생검 또는 세포에서, 또는 생체 내에서 GCC를 검출하기 위한 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트의 진단 적용을 위한 지침이 포함될 수 있다. 지침에는, 예로 암(예로, 위장관 유래 암, 예컨대 결장암, 위암, 식도암)을 갖는 환자에서 제시되는 투여량 및/또는 투여 방식을 포함하는 치료적 적용을 위한 안내가 포함될 수 있다. 다른 지침에는 킬레이터, 표지 또는 치료제에 대한 항체의 커플링에 대한 또는 곤주게이트된 항체, 예로 미반응 곤주게이션 성분으로부터의 정제를 위한 지침이 포함될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 키트에는 표지, 예로 본원에 기재된 임의의 표지가 포함될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 키트에는 치료제, 예로 본원에 기재된 치료제가 포함될 수 있다. 일부 적용에서, 항체는 다른 성분, 예로 킬레이터 또는 표지 또는 치료제, 예로 방사선 동위원소, 예로 이트륨 또는 루테튬과 반응할 것이다. 이러한 경우, 키트에는 반응을 수행하기 위한 하나 이상의 반응 용기 또는 분리 장치, 예로 원료 또는 반응 중간체로부터 최종 산물을 분리하는데 사용하기 위한 크로마토그래피 컬럼이 포함될 수 있다.

[0367] 키트는 추가로 적어도 하나의 추가적 시약, 예컨대 진단제 또는 치료제, 예로 본원에 기재된 진단제 또는 치료제, 및/또는 하나 이상의 별도의 약학 조제물에 적절히 제형화된 하나 이상의 추가적인 항-GCC 항체 분자 또는 면역곤주게이트를 추가로 함유할 수 있다.

[0368] 키트는 추가로 방사선보호제를 함유할 수 있다. 동위원소, 예로 ⁹⁰이트륨(⁹⁰Y)의 방사선분해 성질이 알려져 있다. 이러한 방사선분해를 극복하기 위해, 방사선보호제가 양성인 한, 즉 이들이 예로 동위원소, 예컨대 ⁹⁰Y의 항체에 대한 표지 반응을 저해하거나 달리 악영향을 미치지 않는 한, 예로 반응 완충액에 포함될 수 있다. 본 발명의 제형화 완충액에는 방사선보호제, 예컨대 이트륨이나 다른 강한 방사선 핵종의 방사선분해를 최소화하는 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 아스코르베이트가 포함될 수 있다. 다른 방사선보호제, 즉 자유 라디칼 포획제(페놀, 설파이트, 글루타치온, 시스테인, 겐티신산, 니토탄산, 아스코르빌 팔미테이트, HOP(:O)H₂I 글리세롤, 나트륨 포름알데히드 설폭실레이트, Na₂S₂O, Na₂S₂O₃, 및 SO₂ 등)는 당분야에 공지되어 있고 또한 본 발명의 제형화 완충액에 이용될 수 있다.

[0369] 제공된 키트는 환자에 대한 투여를 위해 치료적 방사선 동위원소를 갖는 킬레이터-곤주게이트된 단백질 또는 펩티드를 방사선 표지하는데 유용한 것이다. 키트에는 (i) 킬레이터-곤주게이트된 항체를 포함하는 바이알, (ii) 환자에게 방사선 표지된 항체를 투여하고 안정화하기 위한 제형화 완충액을 함유하는 바이알, 및 (iii) 방사선 표지 절차를 수행하기 위한 지침이 포함된다. 상기 키트는, 예로 지침에 권장된 바와 같은 온화한 조건 하에 충분한 양의 시간 동안 방사선 동위원소 또는 이들의 염에 대한 킬레이터-곤주게이트된 항체의 노출을 제공한다. 충분한 온도, 비활성 및 결합 특이성을 갖는 방사선 표지된 항체가 제조된다. 방사선 표지된 항체는, 예로 제형화 완충액 중에 적절한 농도로 희석되고, 추가 정제와 함께 또는 이것이 없이 직접 환자에게 투여될 수 있다. 킬레이터-곤주게이트된 항체는 동결건조된 형태로 공급될 수 있다.

[0370] 하기 실시예는 예시적인 것이지, 본 발명을 제한하려는 것이 아니다.

[0371] **실시예**

[0372] **실시예 1: 인간 GCC 세포외 도메인-마우스 Fc(hGCC-ECD-mFc) 융합 단백질의 생성**

[0373] 면역화 및 스크리닝을 위해, 분비된 인간(h) 구아닐릴 사이클라아제(GCC)(hGCC) 세포외 도메인(ECD)/마우스 면역글로불린(Ig)G2a 중쇄 불변(Fc)(수용체 결합 영역 돌연변이(FcRbr-mutII))를 갖는 융합 단백질(즉,

hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mut II 융합 단백질, 또한 본원에서 pLKTOK108 및 MIL-44로 불림)의 생성을 하기와 같이 수행하였다. pLKTOK4 발현 벡터 내로 하기 GCC 서열(신호 서열 및 세포외 도메인)을 포함하는 서열을 인코딩하는 GCC 유전자 부분을 서브클로닝하여 GCC 항원을 제조하였다:

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEP
LKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSGLIHNSGDCRSSTC
EGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLS
CDYKETLTRLMS PARKLMYFLVNFWKTNLDPFKTYSWSTSYVYKNGTETE
DCFWYLNAL EASVSYSF SHELGFKVVL RQDKFQDILMDHNRKSNVIIMCG
GPEFLYKLGDR AVE DIVIILVDL FNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS
PGNSLLNSSFSRNLSP TKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPK
FAHA FRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTH

[0374]

VNKTYPVDMSP TFTWKN SKL (서열 목록 번호 46)

[0375]

[0376]

위치 427 내지 430에서의 아미노산 서열 Gly-Arg-Gly-Pro-Gln(서열 목록 번호 66)을 세포외 GCC 단편을 종료시키기 위해 선택하였다. GCC에서, 상기 서열은 역사적으로 인간 IgG1 Fc 융합 단백질을 개시하는데 이용되는 Pro에 상동성인 위치에서 Pro와 잘 정렬하는 Pro가 바로 뒤따른다.

[0377]

pLKTOK108의 마우스 IgG2a Fc 영역을 기능적으로 CH1 도메인의 말단인 아미노산 서열[Pro-Arg-발린(Val)-Pro-이소류신(Ile)-트레오닌(Thr)-Glu-아스파라긴(Asn)](서열 목록 번호 58)로 시작하도록 설계하였다. 마우스 IgG2a 불변 영역에서는 2개 영역이 돌연변이되었다. 류신(Leu)-Leu-Gly-Gly(서열 목록 번호 59)에서 Leu-알라닌(Ala)-Gly-Ala(서열 목록 번호 60) 돌연변이(위치 234 내지 237의 라이신[Lys]-Lys-Gly-Gly(서열 목록 번호 61)에서 Lys-Ala-Gly-Ala(서열 목록 번호 62)로)에 부가하여, 위치 318 내지 322의 제2 Fc 수용체 영역도 다음과 같이 돌연변이되었다: 글루탐산(Glu)-페닐알라닌(Phe)-Lys-시스테인(Cys)-Lys(서열 목록 번호 63)에서 Ala-Phe-Lys-Cys-Lys(서열 목록 번호 64)로, 이어서 Phe-Lys-Cys-Lys(서열 목록 번호 65)으로.

[0378]

완전한 융합 단백질 서열이 설계되면, BamHI 및 XbaI에 대한 인접 제한효소 서열뿐만 아니라 Kozak 서열(CTCACC) 및 말단 정지 코돈을 부가하여 융합 단백질 cDNA를 완성하였다. 융합 단백질 pLKTOK108(hGCC/mIgG2a FcRmut II)의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 아래에 제공된다(서열 목록 번호 47에서 BamHI 및 XbaI 제한효소 부위는 소문자로 나타낸다):

[0379]

인간 GCC-ECD/마우스 IgG2a Fc 뉴클레오타이드 서열(서열 목록 번호 47)

cgcggtaccctaccATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGCTTTGTGGTCACTGCTCTTCCAG
CCCCGGTGGCTGTCTCTTTAGTTCCCAGGTGAGTCAGAACTGCCACAATGGCAGCTAT
GAAATCAGCGTCTGATGATGGGCAACTCAGCCTTTCAGAGCCCCGTGAAAACTTG
GAAGATGCGGTGAATGAGGGGCTGGAATAGTGAGAGGACGTCTGCAAAATGCTGG
CCTAAATGTGACTGTGAACGCTACTTTCATGTATTCGGATGGTCTGATTTCATAACTCA
GGCGACTGCCGGAGTAGCACCTGTGAAGGCCCTCGACCTACTCAGGAAAAATTTCAA
TGACAACGGATGGGCTGTGTCTCATAGGGCCCTCATGTACATACTCCACCTTCCA
GATGTACCTTGACACAGAATTGAGCTACCCCATGATCTCAGCTGGAAGTTTGGATT
GTCATGTGACTATAAAGAAACCTTAACCAGGCTGATGTCTCCAGCTAGAAAGTTGAT
GTACTTCTTGGTTAACTTTGGAAAAACACGATCTGCCCTTCAAACTTATTCCTGG
AGCACTTCGTATGTTTACAAGAATGGTACAGAACTGAGGACTGTTTCTGGTACCTT
AATGCTCTGGAGGCTAGCGTTTCTTCTCTCCACGAACTCGGCTTTAAGGTGGTGT
TAAGACAAGATAAGGAGTTTCAGGATATCTTAATGGACCACAACAGGAAAAAGCAAT
GTGATTATTATGTGTGGTGGTCCAGAGTTCTCTACAAGCTGAAGGGTGACCGAGCA
GTGGCTGAAGACATTGTCAATTATCTAGTGGATCTTTTCAATGACCACTACTGGAG
GACAATGTACAGCCCCGACTATATGAAAAATGTCTTGTCTGACGCTGTCTCTCT
GGGAATTCCTTCTAAATAGCTCTTCTCTCCAGGAATCTATCACCAACAAAACGAGAC

[0380]

TTTGCTCTTGCCATTATTGAATGGAATCCTGCTCTTTGGACATATGCTGAAGATATTTT
TTGAAAATGGAGAAAATATTACCACCCCAAATTTGCTCATGCTTTCAGGAATCTCA
CTTTTGAAGGGTATGACGGTCCAGTGACCTTGGATGACTGGGGGGATGTTGACAGTA
CCATGGTGCTTCTGTATACCTCTGTGGACACCAAGAAATACAAGGTTCTTTTGACCT
ATGATACCCACGTAAATAAGACCTATCCTGTGGATATGAGCCCCACATTCACCTTGA
AGAACTCTAAACTTCCTAATGATATTACAGGCCGGGGCCCTCAGCCCAGAGTGCCCA
TAACACAGAACCCCTGTCTCCACTCAAAGAGTGTCCCCCATGCGCAGCTCCAGACC
TCGCAGGTGCACCATCCGCTTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGA
TCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAG
ACGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAA
ACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAG
CACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGCATTCAAATGCAAGGTCAACAACAGAGCCCT
CCCATCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAACCCAGAGGGCCAGTAAGAGCTCCAC
AGGTATATGTCTTGCCCTCCACCAGCAGAAGAGATGACTAAGAAAGAGTTCAGTCTG
ACCTGCATGATCACAGGCTTCTTACCTGCCGAAATTGCTGTGGACTGGACCAGCAAT
GGGCGTACAGAGCAAAACTACAAGAACACCGCAACAGTCCTGGACTCTGATGGTTC
TTACTTCATGTACAGCAAGCTCAGAGTACAAAAGAGCACTTGGGAAAGAGGAAGTC
TTTTCGCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCTTACGACTAAGACCA
TCTCCCGGTCTCTGGGTAAATAAAtctagagca

[0381]

[0382] 인간 GCC-ECD/마우스 IgG2a Fc 아미노산 서열(서열 목록 번호 48):

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCNHSYISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAV
NEGLEIVRGRILQNAGLNVTNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGC
VLIGPSTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFLSCLDYKETLTRLMSPARKLMYFLVNFVK
TNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNALASVSYSFHELGFKVVLQRDKEFQDI
LMDHNRKSNVIIMCGPEFLYKLGDRVAEDIVILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKN
VLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTRKDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHA
FRNLTFEGYDGPVTLDDWDGVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSP
TFTWKNSKLPNDITGRGPQRPVITQNPCPPLKECPPCAAPDLLAGAPSVFIFPPKIKDVLMI

[0383]

SLSPMVTCTVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH
DWMGKAFKCKVNNRALPSPIETISKPRGPVRAPQVYVLPPEEMTKKEFSLTCMIT
GFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERSLFACTSVV
HEGLHNHLTTKTISRSLGK

[0384]

[0385] 위에 나타난 바와 같이, 재조합 단백질 pLKTOK108은 2개의 돌연변이된 Fc 수용체 결합 영역(FcR)이 Fc 수용체 결합(mIgG2a FcRmutII)을 예방하기 위해 돌연변이된 마우스 IgG2a Fc 영역에 융합된 인간 GCC의 세포외 영역과 조합한다. pLKTOK108을 위한 재조합 DNA 삽입물은 다음과 같은 3단계 PCR 절차에 의해 생성되었다:

[0386]

제1 단계는 35 뉴클레오티드의 겹침 서열을 함유하는 채택된 마우스 IgG2a FcRmutII DNA 단편 및 채택된 세포외 인간 GCC를 생성하였다. 이들 PCR 반응은 표 13에 기재된 프로토콜로 표 11 및 표 12에 기재된 주형 및 프라이머를 이용하여 2개의 단편을 생성하였다. 이들 DNA 단편을 Qiagen 겔 정제 키트(Valencia, CA)를 이용하여 1% 아가로오스 겔로부터 분리하였다. 인간 GCC 주형은 인간 GCC에 대한 서열을 함유하는 단백질 발현 벡터(Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)에 의해 제공되었다. Fc 도메인에 대한 주형은 자체가 주형으로 벡터 pLKTOK61(그 내용의 전문이 본원에 참조로 도입된 U.S. 특허 7,053,202에 기재됨)을 이용하여 생성된 pLKTOK84로 불리는, 2개의 돌연변이된 Fc 수용체 결합 영역(FcRmutII)을 갖는 마우스 IgG2aFc에 융합된 인간 1228에 대한 발현 구축물로부터 획득되었다.

[0387]

[표 11]

[0388] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위한 제1 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용되는 주형

번호	산물	주형	프라이머 1	프라이머 2	크기
1A	세포외 GCC	인간 GCC-Vect	pGCCFC5	pGCCFCMuA	1300bp
1B	마우스 IgG2a-FcRmut II	pLKTOK84	pGCCFCMuB	pMICOS-4	700bp

[0389]

[0390] [표 12]

[0391] pLKTOK108을 생성하기 위한 모든 PCR 반응에서 이용된 프라이머

프라이머 이름	서열	서열 목록 번호
pGCCFC5	5'-CGCGGATCCCTCACCATGAAGACGTTGCTGTTGGACTTGGC-3'	49
pGCCFCMuA	5'- TGGGCACTCTGGGCTGAGGGCCCGGCCCTGTAATATCATTAG -3'	50
pGCCFCMuB	5'-CAGGCCGGGGCCCTCAGCCAGAGTCCCCATAACACAGAACCCCTGTCC -3'	51
pMICOS-4	5'-TGCTCTAGATTATTTACCCAGAGACCGGAGATGGTCTTA	52
pSMUCH2	5'-ACCTGTGGAGCTCTTACTGG-3'	53
EF5S	5'-CATTTTCAGGTGTCGTGAGGA-3'	54
SP6	5'-ATTAGGTGACACTATAG-3'	55
M13f	5'-GTTTTCACAGTCACGAC-3'	56
M13r	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	57

[0392]

[0393] [표 13]

[0394] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위해 제1 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용된 반응 프로토콜

반응 혼합물	기계 설정
1uL DNA(주형의 1:100 miniprep)	94℃- 2분
0.2uL 200mM 프라이머 1	
0.2uL 200mM 프라이머 2	30 사이클
10uL 10x PCR 완충액	94℃- 1분
3uL 50mM MgCl ₂	55℃- 30초
2uL 10mM dNTP 혼합물	72℃- 2분
83.5uL H ₂ O	
0.5uL Taq 폴리머라아제	72℃- 10분

[0395]

[0396] 두 번째 PCR 반응은 표 14에 기재된 농도로 주형과 조합되었다. 표 15에 기재된 반응 프로토콜은 단일 재조합 융합 단백질 유전자를 생성하였다. 상기 반응의 산물을 직접 세 번째 PCR 반응에서 주형으로 이용하였다.

[0397] [표 14]

[0398] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위해 제2 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용된 주형

번호	주형 1	주형 2	농도
2A	세포외 GCC	마우스 IgG2a-FcRmut II	10uM(각각 2.5uL)
2B	세포외 GCC	마우스 IgG2a-FcRmut II	30uM(각각 7.5uL)

[0399]

[0400] [표 15]

[0401] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위해 제2 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용된 반응 프로토콜

반응 혼합물	기계 설정
각각의 DNA 2.5 또는 7.5uL	8사이클
10uL 10x PCR 완충액	94℃- 1분
3uL MgCl ₂	30초 만폭부
2uL dNTP	72℃- 2분
79.5 또는 69.5uL H ₂ O	30초 만폭부
0.5uL Taq	

[0402]

[0403] 세 번째 PCR 반응은 전체 단편을 생성하기 위해 아래 표 17에 기재된 프로토콜로 표 16 및 표 12에 기재된 주형 및 프라이머를 이용하였다. 이들 DNA 단편을 Qiagen 겔 정제 키트(별첨 F), 및 티아민 아데노신(TA) 오버행 TOPO[®] TA 클로닝 키트(별첨 F)를 이용하여 0.7% 아가로오스 겔로부터 단리하였다. 독특한 클론을 단리하고,

DNA를 Qiagen의 DNA miniprep 키트(별첨 F)를 이용하여 정제하였다. 원하는 서열을 갖는 것들을 확인하기 위해 DNA를 프라이머 M13f, M13r 및 pSMUCH2로 서열분석하였다. 중간체 TOPO 클론 TOK108-15는 원하는 재조합 DNA 서열을 함유하였다.

[0404] [표 16]

[0405] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위해 제3 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용된 주형

[0406]

[0407] [표 17]

[0408] pLKTOK108을 위한 재조합 DNA를 생성하기 위해 제3 단계 PCR 어셈블리 반응에서 이용된 반응 프로토콜

[0409]

[0410]

반응 혼합물	기계 설정
5 μ L PCR 반응 2A 또는 2B	94°C-2분
0.2 μ L 200mM 프라이머 1	
0.2 μ L 200mM 프라이머 2	30 사이클
10 μ L 10x PCR 완충액	94°C-1분
3 μ L 50mM MgCl ₂	55°C-30초
2 μ L 10mM dNTP 혼합물	72°C-2분
79.5 μ L H ₂ O	
0.5 μ L Taq 폴리머라아제	72°C-10분

발현 벡터 pLKTOK4를 생성하기 위해, pcDNA3.1™을 골격 벡터로 이용하였다. 이는 연구 조건 하에 용이한 선택을 허용하기 위해 G-418(Geneticin®)에 대한 내성을 위한 네오마이신(NEO) 유전자를 함유한다. 부위-지정 돌연변이화에 의해 pcDNA™3.1로부터 SpeI 제한효소 부위를 제거하였다. 플라스미드 pcDEF3(pEF-BOS⁴ 유래)으로부터의 EF-1 α 프로모터를 pcDNA™3.1 내로 삽입하여 CMV 프로모터를 제거하였다. pLKTOK4 발현 벡터에 대한 원형 지도를 도 1에 도시한다.

[0411]

TOPO® TA 클로닝 키트를 이용하여 최종 PCR 산물 상에 클로닝을 수행하였다. BamHI 및 XbaI 제한 효소를 이용한 소화 후, TOPO 클론으로부터 원하는 단편을 역시 BamHI 및 XbaI으로 소화된 발현 벡터 pLKTOK4로 절찰하였다. 절찰 반응을 이용하여 K12 화학적 적격 *E.coli* 세포를 형질전환한 뒤 Luria 배지(LB)/엠페실린 한천 플레이트 상에서 선택하였다. 개별 *E. Coli* 클론으로부터의 플라스미드를 QIAGEN의 DNA miniprep 키트를 이용하여 단리하고 프라이머 SP6(서열 목록 번호 55), EF5S(서열 목록 번호 54) 및 pSMUCH2(서열 목록 번호 53)로 서열분석하였다.

[0412]

DNA 서열분석에 의해 원하는 재조합 DNA를 함유하는 클론을 결정하고, QIAGEN Maxiprep 키트를 이용하여 다량의 순수한 플라스미드 DNA를 제조하는데 이용하였다. 상기 maxiprep DNA를 디히드로플레이트 환원효소-결핍 중국 햄스터 난소(CHO-DG44) 세포 내로의 전달감염을 위해 이용하였다.

[0413]

S1-CHO-DG44로 불리는 무혈청의 현탁 적응 CHO-DG44 세포주를 pLKTOK108 생산 세포주 개발을 위해 이용하였다. 간략하게, PvuI 제한 효소로 처리된 선형화된 플라스미드 DNA 또는 선형화되지 않은 원형 DNA를 이용하여 Nucleofection® 키트 V 및 Amaxa Biosystems의 Nucleofector® 장치를 이용하여 전달감염을 수행하였다. 전달감염된 세포를 G-418 선택 배지로의 교환 전에 48시간 동안 IS-CHO-V-GS 성장 배지 중에 유지하였다. 살아 있는 전달감염된 세포에 신선 G-418 선택 배지를 공급하고 융합성이 될 때까지 배양 중에 유지하였다(~10 내지 14 일). 각각의 전달감염 폴의 pLKTOK108 생산성을 마우스 IgG2a ELISA 분석을 이용하여 평가하고 냉동 세포 은행을 제조하기 위해 세포를 증식시켰다. 세포를 G-418 선택 배지 중 5x96웰 조직 배양 플레이트 내로(매 웰마다 약 1개 세포를) 접종하는 제한 희석 클로닝에 대해 마우스 IgG2a ELISA에 의해 가장 높은 생산성을 갖는 전달감염 폴을 확인하였다. 96-웰 플레이트를 배지 공급 없이 2주 동안 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 단일 콜로니를 가진 각 웰로부터의 50 μ L의 상청액을 96웰 분석 플레이트 내로 직접 전달하여 마우스 IgG2a ELISA 분석을 수행하였다. 높은 생산성을 갖는 23개 클론을 확인하고, 순차적으로 24웰 세포 배양 플레이트, 이어서 6-웰 세포 배양 플레이트를 통해 증식시켰다. 이들 클론으로부터의 상청액의 항체 역가를 마우스 IgG2a ELISA 분석에서 3회의 상이한 희석도에서 측정하였다.

- [0414] 마우스 IgG2a 역가에 근거하여 최적의 6개 클론을 냉동 세포 은행을 제조하기 위해 G-418 선택 배지 중에 증식시키고, 무혈청 현탁 Sigma #21 배지에 적응시켰다. 세포 밀도 및 생활성을 Cedex 자동화 세포 배양 분석기를 이용하여 결정하고, 상청액에서의 단백질 농도를 마우스 IgG2a ELISA 분석을 이용하여 측정하였다. 일단 세포가 지수적 성장상에 도달하면, 이들을 수확하고 하룻밤 동안 -80℃에 냉동한 뒤 보관을 위한 액체 질소 급냉 챔버로 옮겼다.
- [0415] 융합 단백질을 제조하기 위해, 세포를 해동하고 집중한 뒤, 더 큰 T 플라스크 내에서, 이어서 3.0×10^5 세포/mL의 시작 밀도로 진탕 플라스크 내에서 연속해서 증식시키고 105rpm으로 설정된 케도 진탕기에서 5% CO₂, 37℃로 설정된 가습 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 최종 배양물에 4일 및 7일에 10부피% 및 10일에 5부피%의 Sigma #21 특수 공급 배지를 공급하였다. Sigma #21 공급 배지는 40g/L 글루코오스, 10g/L L-글루타민, 10g/L 효모 추출물, 및 10g/L 대두 펩톤이 보강된 Sigma #21 배지로 구성된다. 진탕 배양물을 원심분리에 의해 수확하였다. 선택된 pLKTOK108 단백질을 함유하는 상청액을 0.2- μ m 저단백질 결합 폴리에테르설폰(PES) 막 필터 단위를 통해 여과하여, 조정제 pLKTOK108-함유 여액을 정제를 위해 준비하거나 향후 정제를 위해 -80℃에 보관한다.
- [0416] 초기 정제에는 대략 4℃에서 단백질 A 세파로오스 컬럼에 걸친 pLKTOK108 함유 여과 상청액의 순환이 관여되었다. 이어서 수지를 PBS, pH7.4로 세척하고 단백질을 PBS, pH 3.0 중 0.1M 글리신으로 용출하고 pH 6.5에서 1M 나트륨 포스페이트로 중화하였다. 중화된 용출액을 분자량 컷오프(MWCO) 30kDa의 Vivaspin 농축기를 이용하여 농축하고 상기 단백질의 응집물을 분리하기 위해 PBS pH 7.4 완충액으로 사전 평형화된 Superdex 200 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 컬럼(별첨 G) 상에 로딩하였다. 정제된 pLKTOK108 단백질은 단일 피크로 용출되며, 순도는 SDS-PAGE 및 쿠마시 염색으로 확인하였다. hGCC(ECD)/mIgG2a Fc 동중이량체를 함유하는 분획을 폴링하였다. 폴링된 재료의 농도를 NanoDrop™ ND1000 분광측정기 상에서 280nm의 UV 흡광도로 결정하고, 정제된 pLKTOK108 단백질을 분취하여 -80℃에 보관하였다.
- [0417] **실시예 2: 단백질 면역화에 의한 토끼 mAb의 생성**
- [0418] hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII 융합 단백질(pLKTOK108)에 대한 토끼 모노클로날 항체를 Epitomics(Burlingame, CA)에서 제공되는 RabMAB[®] 서비스를 이용하여 생성하였다. MAb 생성 목적을 위해, hGCC(ECD)-mIgG2a RcRbr-mutII 융합 단백질(pLKTOK108) 융합 단백질을 본원에서 MIL-44로 부른다.
- [0419] 3마리 토끼(ML1009, ML1010 및 ML1011)를 통상적 면역화 기법을 이용하여 면역화하였다. MIL-44 및 비-GCC 역스크리닝 항원(hMadCAM-mFc)에 대한 혈청 역가를 평가 채혈을 이용하여 평가하였다. 초기 면역화 이후 추가접종 면역화를 제공하였다. 가장 높은 혈청 역가를 갖는 토끼인 토끼 ML1010을 비장절제 및 Epitomics의 전용 융합 파트너 세포주 및 방법을 이용한 모노클로날 융합을 위한 후보로 선택하였다.
- [0420] 별도의 두 날에(1일 및 2일), 2억 개의 림프구 세포를 1억 개의 융합 파트너 세포와 융합시키고 각각 20X 96-웰 플레이트 상에 접종하였다. 플레이트를 표준 조건 하에 조직 배양 인큐베이터에서 유지하였다. 융합 후 2-3주 세포 성장을 검사하고, 검사한 전체 웰의 개수로 나눈 성장한 웰의 개수를 이용해서 융합 효율성을 전산으로 계산하였다. 1일에 융합에 대한 융합 효율은 72% 융합 효율성으로 측정된 반면, 2일에 융합 효율성은 79%였다. 최소 2개의 플레이트를 다음과 같이 각각의 융합에 대해 검사하였다:
- [0421] 전체 40개 플레이트를 50ng의 MIL-44/웰로 코팅된 플레이트로 표준 ELISA 방법을 이용하여 스크리닝하였다. 1:10K 희석도의 ML1010의 채혈을 양성 대조군으로 이용하였다. 0.5 초과 O.D.를 갖는 151개 클론을 추정 양성으로 간주하고, 24웰 플레이트 내에서 추가 증식시켰다.
- [0422] 50ng의 MIL-44 또는 50ng의 hMadCAM-mFc/웰로 코팅된 플레이트를 이용한 ELISA로 후속 확인 스크리닝을 수행하였다. 143개 클론은 MIL-44에 대해 양성으로 확인되었고, 이들 중 72개가 MIL-44 특이적인 것으로 확인되었다, 즉 이들은 hMadCAM-mFc 단백질에 대해 음성이었다.
- [0423] 다중클론 상청액 평가 후, 다중클론 #148 및 #67을 포함하는 몇몇 MIL-44 특이적 다중클론을 서브클로닝하였다. 제한 세포 희석 방법을 이용하여 서브클로닝을 수행하였다. 몇몇 서브클론 상청액을 ELISA로 스크리닝하였다. 서브클론 #148-2 및 #67-4에 대한 하이브리도마 세포를 냉동/은행수입을 위해 그리고 실시예 3에 기재된 바와 같은 면역조직화학(IHC) 분석에서 GCC 검출 시약으로서 추가 스크리닝 및 분석을 위해 선택하였다.
- [0424] MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 항체를 또한 포유류 세포에서의 일시적 전달감염에 의해 제조를 위한 그리고 서열

분석을 위해 pcDNA3.1+ neo(Invitrogen) 내로 클로닝하였다. MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 항체를 위한 중쇄 및 경쇄에 대한 핵산 및 아미노산 서열을 아래에 제공한다. 각각의 Ig 사슬에서의 신호 서열은 이탤릭체로 나타낸다; 각각의 Ig 사슬에서의 가변 영역은 진한 글씨체로 나타낸다; CDR은 밑줄을 쳐서 나타낸다.

[0425]

MIL-44-148-2 H2 핵산 서열(서열 목록 번호 4)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT
CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTCTTCAAGCCAACGGATACCCTGACACTCACCTGCA
CCGTCTCTGGATTCTCCCTCAGT**AGTCATAGAATGAACTGGGTCCGCCAGACTCCAGGGAAGGG**
GCTGGAATGGATCGCAATCATTACTCATAATAGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAAGC
CGATCCACCATCACCAGAAACACCAGCGAGAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACAG
CCGCGGACACGGCCACTTATTTCTGTGCCAGAGAGGATAGTATGGGGTATTATTTGACTTGTG
GGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCA
GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCA
CGGTGACCCCTGGGCTGCTGTGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAATC
GGGCACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCTCAGGCCTCTACTCG
CTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCCGTACCTGCAACGTGGCCACCCAG
CCACCAACACCAAAGTGACAAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCACC
CCCTGAACCTCTGGGGGACCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCATG
ATCTCAGCACCCCGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGC
AGTTCACATGGTACATAAACAACGAGCAGGTGCGCACCCGCCGCCGCTACGGGAGCAGCA
GTTCAACAGCAGATCCGCGTGGTCAGCACCTCCCCATCGCGCACCAGGACTGGCTGAGGGGC
AAGGAGTTCAAGTGCAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAG
CAGCAGGTCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAG
TGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACG
GCTCCTACTTCCCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTACCTGCTCC
GTGATGCACGAGGCCTTGCAACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCTCCGGGTAAATGA

[0426]

[0427]

MIL-44-148-2 H2 아미노산 서열(서열 목록 번호 42)

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVKESGGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSHRMNWVRQTPGKGLE
WIAIITHNSITYYASWAKSRSTITRNTSENTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDSMGYYFDLWGP
GTLVTISS
GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGLCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYS
LSSVSVTSSSQPVTCNVAPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPELLGGPSVFIFFPKPKDILM
ISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVTRAPPLREQQFNSTIRVSTLPIAHQDWLRG
KEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE
WEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRS
PGK

[0428]

[0429]

MIL-44-148-2 L5 핵산 서열(서열 목록 번호 5)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGAT
GTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCAT
CAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAG
TCTCCCAAGCCCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTGAGAG
GCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCTCACCATCAGTGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCAC
TTACTACTGTCTCAGCAGACTTATACTAATAATCATCTTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAG
GTGGTGGTCAA

GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAA
CAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGA
TGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAGAAATTCTGCAGATTGTACC
TACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCT
GCAGGGTGACCCAGGGCAGCACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

[0430]

[0431]

MIL-44-148-2 L5 아미노산 서열(서열 목록 번호 43)

MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARCA~~Y~~DMTQTPASVEVAVGGTVTIKC~~Q~~AS~~Q~~SISNWLAWYQ~~Q~~KPGQ
SPKPLIY~~R~~ASTLASGVSSRFRGSGSGTQ~~F~~TLTISGVECADAA~~T~~Y~~Y~~CQ~~Q~~TYTNHLDNGFGGGTE
VVVK
GDPVAPITVLIFPPAADQVATGTVIIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTGIENSKTPQNSADCT
YNLSSTLTLTSTQYNHKEYTCRVTTQGTTSVVQSFNRGDC

[0432]

[0433]

MIL-44-67-4 H2 핵산 서열(서열 목록 번호 6)

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGT**CAGTCGG**
TGGAGGAGTCCGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTC
TGGATCCGACATCAGTA**AACTATGCAATATCCT****GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAA**
TTCATCGGATATATTAGTTATGGTAAAAGTATATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGGTTCG
CCATCTCCAAAACCTCGTCGACCACGGTGGATCTGGAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACAC
GGCCACCTATTTTTGTGCCAGAGAGGATAGTGCTACTTATAGTCCTAACTTGTGGGGCCAGGC
ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

GGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCA
CGGTGACCTGGGCTGCCTGGTCAAAGGGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAATC
GGGACCCCTACCAATGGGGTACGCACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCTTCAGGCCTCTACTCG
CTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGACCTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCACCCAG
CCACCAACACCAAAGTGGACAAGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCACC
CCCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCTGTCTTTCATCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATG
ATCTCAGCACCCCCGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGC
AGTTACATGGTACATAAACCAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGCCGCTACGGGAGCAGCA
GTTCAACAGCACGATCCGCGTGGTCAGCACCTCCCCATCGCGCACCCAGGACTGGCTGAGGGGC
AAGGAGTTCAAGTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAGAGGGCAGCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCGGGAGGAGCTGAG
CAGCAGGTGCGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCTTCCGACATCTCGGTGGAG
TGGGAGAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACCTACAAGACCACGCCGCGCTGCTGGACAGCGACG

[0434]

GCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTT
CACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTTGACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTCT
CCGGGTAAATGA

[0435]

[0436]

MIL-44-67-4 H2 아미노산 서열(서열 목록 번호 44)

METGLRWLLLVAVLKGVQCSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGSDISNYAISWVRQAPGKGLE
FIGYISYGKSIYYASWAKGRFAISKTSSTTVLDLEITSPTTEDTATYFCAREDSATYSPNLWGPG
TLVTVSS
 GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEFVTVTWNSGTLTNGVRTFSPVRQSSGLYS
 LSSVSVTSSSQPVICNVAPATNKKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPKPKDILM
 ISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRG
 KEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVE
 WEKNGKAEDNYKTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRS
 PGK

[0437]

[0438]

MIL-44-67-4 L4 핵산 서열(서열 목록 번호 7)

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGAT
 GTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCAT
CAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGTATTAACACCTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAG
CGTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGTCTCATCGCGGTTCAAAG
GCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCAC
TTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTTATAATAATCTTGATCGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAG
GTGGTGGTCACA
 GGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCTCATCTTCCCACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAA
 CAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACTTTCCCGATGTACCGCTACCTGGGAGGTGGA
 TGGCACCACCCAAACAACTGGCATCGAGAACAGTAAACACCGCAGAAATTCTGCAGATTGTACC
 TACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCT
 GCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAGTCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

[0439]

[0440]

MIL-44-67-4 L4 아미노산 서열(서열 목록 번호 45)

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKQASQSINTYLAWYQQKPGQ
RPKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISGVECADEAATYYCQOGYSYNNLDRAFGGGTE
VVVT
 GDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVITVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCT
 YNLSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

[0441]

[0442]

실시예 3: 항-GCC 항체를 이용한 면역조직화학

[0443]

mCRC의 인간 종양 이종이식편 모델에서 GCC 발현의 검출

[0444]

자성 SCID 마우스에서 전이성 결직장암(mCRC) 환자 표본 유래의 몇몇 일차 인간 종양 이종이식편(PHTX) 및 HEK293-GCC 이종이식편 종양에서의 GCC 발현을 평가하기 위해 MIL-44-148-2 항체를 이용한 IHC 분석을 개발하였다.

[0445]

포르말린 고정되고 파라핀-임베딩된(FFPE) 조직에서의 GCC 단백질 수준을 5 μ m 두께 절편 상에서 평가하고, Ventana Medical Systems(Tucson, AZ) Discovery XT[®] 자동화 염색기 상에서 1시간 동안 MIL-44-148-2 항체(3.5 μ g/mL)와 인큐베이션하였다. 항체를 토끼 항-염소 이차 항체(Vector Laboratories)로 바이오티ن화하고, 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 기질 지도 시스템(Ventana Medical Systems)으로 발색하였다. 슬라이드를 헤마톡실린으로 카운터염색하고 Aperio 전체 슬라이드 스캐닝 시스템을 이용하여 이미지화하였다.

[0446]

GCC 수준은 HEK293-GCC 종양 이종이식편의 4+ 그리고 다양한 PHTX 종양 이종이식편의 1+, 1-2+, 2+, 2-3+, 및 4+의 범위의 H-스코어(아래 기재된 스코어링 시스템)으로 이들 종양 간에 유의미하게 상이하였다. 일반적으로, 극화된 상피 구조를 유지하는 중간/잘 분화된 종양 세포를 갖는 종양에서, GCC는 종양 조직의 내강측에 집중되어 있었다.

[0447]

인간 결장 표본 및 종양 마이크로어레이에서 GCC 발현의 검출

[0448]

본원에 기재된 MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 항체를 또한 악성 및 양성 인간 결장 표본(FFPE 및 종양 마이크로

어레이(TMA))에 부가하여 상기-참조 일차 인간 종양 이종이식편(PHTX), HT29 및 HEK293 GCC 전달감염 세포 펠렛을 이용하여 전술된 IHC 프로토콜에서 GCC 검출 시약으로 스크리닝하였다.

[0449] HT-29 및 HEK293 GCC 전달감염 세포 펠렛은 예측된 바와 같이 염색되었다. PHTX는 MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 클론으로 광범위한 염색 강도를 나타내었다. MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4는 모두 잘 또는 중간으로 분화된 결장암종의 원 위치에서 또는 전이에서 양성으로 염색되었다. 약하게 분화된 종양은 덜 진하게 염색되었다. 정상 결장 조직은 MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 서브클론 모두에 의해 생성되는 항체를 이용하여 양성 침단 염색을 나타내었다.

[0450] MIL-44-148-2 및 MIL-44-67-4 서브클론 둘 다로부터의 항체는 HEK293 및 HT29 모 세포주에서 임의의 비-특이적 염색 없이 GCC 전달감염 HEK293 세포 및 HT29 세포에서 쉽게 자명하고, 진하고 특이적인 염색을 제공하였다. 두 클론은 또한 원 위치 또는 전이에서 잘 또는 중간으로 분화된 결장암종에서 양성으로 염색되었다. 약하게 분화된 암종에서 두 서브클론에 대해 약한 염색이 나타났다. 정상 결장은 예측된 바와 같이, 두 클론 모두에 대해 양성 침단 염색을 나타내었다. MIL-44-148-2는 IHC에서 MIL-44-67-4에 비해 전반적으로 더 높은 민감성 및 특이성을 나타내었다. MIL-44-67-4는 세포 펠렛에서 MIL-44-148-2에 비해 더 우수한 동적 범위를 나타낸 반면, MIL-44-148-2는 TMA에서 MIL-44-67-4에 비해 더 월등한 동적 범위를 나타내었다. 전체적으로 MIL-44-148-2 서브클론은 MIL-67-4에 비해 우수성을 나타내어, IHC에서 더 높은 민감성과 특이성을, TMA에서 완전 동적 범위를, 그리고 낮은 농도에서 정상 결장에서 더 진한 염색(+2 IHC 스코어)을 나타내었다.

[0451] 전술된 초기 IHC 실험 결과에 근거하여, MIL-44-148-2 서브클론을 Tek-Mate 자동화 염색기를 이용하여 전술된 IHC 프로토콜과 동등한 자동화 프로토콜의 개발 및 검증을 위해 선택하였다. 자동화 IHC 분석은 GCC-표적화 암 치료제를 위한 임상 실험 등록 기준으로 그리고 일반적으로 GCC-표적화 치료법을 받아야 하는 환자(예로, 암 환자)의 선택을 위한 스크리닝 도구로서 GCC 발현 종양에 대한 암 환자 스크리닝을 위해 유용한 도구이다.

[0452] 표 18에 나타난 IHC 프로토콜은 FFPE 인간 세포 및 조직에서 GCC의 검출을 위해 개발되었으며, 대략 53개의 결장암 종양 및 20개의 정상 결장 조직뿐만 아니라 2개의 결장암 TMA(US Biomax에서 구매)가 GCC 발현에 대해 스크리닝되었다. 이들 종양은 다양한 범위의 종양 등급뿐만 아니라 결장암 전이 조직을 커버하였다.

[0453] 4마이크론 절편을 다양한 조직 표본에서 제조하였다. 조직 절편을 4, 5분의 자일렌, 이어서 등급별 알코올 시리즈, 이어서 증류수로의 교환을 통해 탈왁스화하였다. Black and Decker 증열기 상부 챔버의 모세관 캡에서 20분 동안 SHIER2 용액과 함께 증기열 유도 에피토프 회복(SHIER)을 이용하였다.

[0454] [표 18A]

[0455] IHC 절차

TechMate 단계	UltraVision 검출(UV)
1.	UltraVision 블로킹-15분
2.	일차 항체 인큐베이션-하룻밤 동안
3.	일차 항체 인헨서-25분
4.	과산화수소 블로킹-3 x 각각 2.5분
5.	중합체 검출-25분
6.	DAB 발색원-3 x 각각 5.0분
7.	헤마톡실린 카운터 염색 - 1분

[0456]

[0457] [표 18B]

[0458] 항체 반응성 사양 시트

항체	GCC
공급업체	MLNM Takeda 내부 항체
카탈로그 번호	N/A
원천/이소형	RbIgG
공급업체 Lot #	결정되지 않음
QualTek Lot #	R3512
클론	148-2
농도	0.475 μ g/ml
제시 희석도	1.0 μ g/ml
인큐베이션 시간	하룻밤 동안
사전 처리	SHIER2, 효소 없음
TechMate 프로토콜	MIP
검출 시스템	UltraVision 검출 시스템
세포내 위치	세포질 및/또는 침단

[0459]

[0460]

당분야 숙련자는 일차 항체 인헨서가 MIL-44-148-2 또는 MIL-44-67 토끼 mAb(토끼 IgG)와 같은 이소형을 갖는 토끼 이외의 종(예로, 인간, 래트, 염소, 마우스 등)에서 생성된 항-토끼 이차 항체 또는 MIL-44 신호를 증폭시키기 적합한 유사한 시약일 수 있음을 인지할 것이다.

[0461]

상기 프로토콜은 발색원으로 DAB 및 비-바이오틴 기반 페록시다아제 검출(Ultravision 키트, Thermo/Lab Vision)로 1.0 μ g/ml에서 MIL-44-148-2의 하룻밤 동안의 항체 인큐베이션을 이용하였다. 상기 절차는 TechMate 500 또는 TechMate 1000(Roche Diagnostics)을 이용하여 완전 자동화되었다. 염색 후, 슬라이드를 절대 알코올까지의 알코올 시리즈를 통해 탈수시킨 뒤 자일렌으로 행구었다. 슬라이드를 유리 커버슬립 및 CytoSeal로 영구 커버슬립처리하였다. 슬라이드를 현미경 하에 조사하여 염색을 평가하였다. 양성 염색은 갈색(DAB-HRP) 반응 산물의 존재로 나타난다. 헤마톡실린 카운터염색은 세포 및 조직 형태를 평가하기 위한 파란색 핵 염색을 제공한다.

[0462]

GCC 염색 평가 시, H-스코어 접근이 GCC 발현을 정량하기 위한 최적 접근일 것으로 결정되었다. H-스코어 접근은 종양 유형 간에 그리고 내에서 염색 강도와 종양 백분율 변이를 결정하기 위한 최적의 데이터 해상도를 제공한다. 또한 양성 염색에 대한 역치 결정을 위해 우수한 도구를 제공한다. 상기 방법에서, 염색 강도 0-3+ 범위의 종양 내 세포 백분율(0-100)이 제공된다. 본 발명의 방법으로, 0, 0.5, 1, 2 및 3의 강도를 갖는 스코어가 제공되었다. 마커에 따라, 0.5 염색은 양성 또는 음성으로 스코어링될 수 있고, 마커에 대해 약하지만 감지 가능한 염색을 나타낸다. H-스코어를 수득하기 위해, 종양 세포의 백분율을 각 강도로 곱하고 함께 더한다:

[0463]

H 스코어 = (종양% * 1) + (종양% * 2) + (종양% *3). 예를 들어, 종양이 20% 음성이고(0), 30%가 +1, 10%가 +2, 40%가 +3인 경우, 이는 H 스코어 170을 제공할 것이다.

[0464]

100%의 종양 세포가 3+ 강도로 표지되는 경우, 최대 H-스코어는 세포하 위치(즉, 침단 또는 세포질) 당 300(100% * +3)이다. 처음에는 대조군으로, 전체 H-스코어만을 표본 비교에 이용하지 않았고, 각 강도에서 세포 백분율의 봉괴를 검토하기 위해 부가적으로 평가하였다. 예를 들어, 스코어 90은 1+ 강도로 염색된 90% 종양 세포 또는 3+ 강도로 염색된 30% 세포를 나타낼 수 있다. 이들 표본은 동일한 H-스코어를 갖지만 매우 상이한 GCC 발현을 갖는다. 각 강도에서 스코어링될 세포의 백분율은 변할 수 있지만, 보통 10% 증분으로 스코어링된다; 그러나 일부 염색 수준이 존재하는 것을 나타내기 위해 단일 성분의 작은 백분율의 스코어링이 1% 및 5%에서도 추정될 수 있다. GCC에 있어서, 침단 염색은 낮은 수준의 증분에서, 예컨대 1 및 5%에서 평가에 대해 고려될 수 있다.

[0465]

2개의 상이한 세포하 위치가 H-스코어 접근을 이용하여 GCC에 대해 스코어링되었다. 이들에는 세포질 염색 및 침단 연관 염색이 포함되었다. 세포질 염색 패턴은 일반적으로 종양 세포의 세포질에 걸쳐 확산된 것으로 관찰되었다. 그러나 일부 경우, 진한 구형 염색 또는 반점상의 거친 과립형 염색이 포함되는 세포질 염색의 변이가 있었다. 진한 구형 염색은 3+ 세포질 염색으로 스코어링되었다. 반점상 염색은 침단 염색과 연관되었으며, 상기 유형의 세포질 염색에 대해서는 별도의 스코어가 주어지지 않았다(반점상 염색에 대한 n=4의 표본). 내강이 존재하는 경우 GCC 침단 염색이 관찰되었다. 관찰된 다른 GCC 염색 패턴에는 막 유사, 비-내강 염색(1개 사례) 및 종양 내강에 존재하는 세포외 염색이 포함되었다. 정상 결장 조직에서, 염색은 일반적으로 확산 세포질 염색과 함께 침단에 있었다.

- [0466] H 스코어가 세포질 및 침단 GCC 발현 모두에 대해 수득되었고, 하나의 위치 유형이 GCC-표적화 치료법의 유효성에 있어서 다른 것에 비해 더 결정적인지가 알려져 있지 않으므로 모든 데이터를 캡처하였고, 일부 경우 침단 및 세포질 GCC 발현 모두의 합을 이용하여 집합 H 스코어를 생성하였다. 이러한 경우, 최대 H 스코어는 집합 스코어(300 침단 + 300 세포질)에 대해 600이 되었다.
- [0467] 전반적으로, 정상 결장 표본에서의 염색은 GCC가 해부학적으로 격리되며, 침단 표면에 발현된다는 것을 나타내었다. GCC는 정상 조직과는 대조적으로 종양 표본의 95% 초과에서 발현되었고, 일부 경우 확산된 세포질 염색을 나타내었다. 인간 CRC 간 전이 표본에서의 강한 국소 GCC 염색도 나타났다.
- [0468] 표 19A는 스크리닝된 정상 및 종양 조직에 대한 세포질 및 침단 H-스코어 염색 결과를 나타낸다. 표 19A에 나타난 데이터는 표본 유래(내부(MLNM로 표시됨), TMA(BIOMAX로 표시됨), 및 CRO(QualTek으로 표시됨)) 및 종양 등급에 따라 나타낸다. 역치 0.5 및 1.0+의 염색 강도를 이용하는 경우의 양성 요약 데이터가 제공된다. 전체 173개 종양 표본이 스코어링되었다. 세포질 또는 침단 염색에 대해 양성 염색 강도로 0.5+ 컷오프를 이용하는 경우, 종양의 95%가 양성으로 간주된다. 1.0+ 컷오프를 이용하는 경우, 표본의 92%가 양성으로 간주된다.
- [0469] 조직 유래는 양성 종양 세포의 백분율뿐만 아니라 H-스코어의 변이를 나타낸다. 1+ 염색 양성 역치에서, 상기 범위는 84%(CRO 종양 MTB 표본) 내지 100%이다(내부 표본 또는 CRO 단일 조직 표본-이들 그룹에서의 표본 수가 더 적음을 주지하라). 내부 종양 조직은 253의 매우 높은 침단 H-스코어를 나타내었다(n=9 표본). 2 TMA의 스코어링 결과에서도 차이가 있었다. US Biomax TMA C0992는 C0701보다 강하게 염색되었다. 특정 이론에 구애받지 않아서, TMA에서의 차이는 조직 유래의 고정도의 차이에 기인할 수 있거나 한 블록이 다른 것에 비해 더 최근에 절단되었을 수 있다.
- [0470] 절단 절편에서의 항원의 안정성 및 절단 표본의 신선도가 고려되었다. 본 연구에서 평가된 표본에는 절단되고 보관된 표본 및 절단된 신선 표본이 포함되어, 경시적인 조직 표본의 안정성에 대한 추가 연구의 필요성을 시사한다.
- [0471] GCC 양성 및 종양 등급에서 일부 차이가 관찰되어(표 19B 참고), 더 큰 양성 염색이 약하게 분화된 종양에 비해 잘 분화된 종양에 연관되었다(US Biomax로부터의 6개 종양에는 등급이 포함되지 않음). 등급 1 종양(n=20)은 100% 양성을 나타내었고; 등급 2 종양(n=95)은 98% 양성 케이스로 표지되었고; 등급 3 종양(n=44)은 88% 양성 비율로 표지되었다. 약하게 분화된 종양은 일반적으로 내강이 없어서, 침단 염색의 부재로 인한 상기 염색 감소의 일부를 설명할 수 있다. 상기 양성 백분율은 0.5+ 염색 강도 역치를 기준으로 하였다. 7개의 구별되는 mets 중 7개가 양성이었다(내부 및 CRO 조직 유래). US Biomax TMA로부터의 전이성 종양은 림프절에 대해 mets로 기재되었다.
- [0472] 전반적으로, GCC는 조직 유래 또는 종양 등급과 무관하게, 매우 높은 백분율의 결장 종양 및 정상 결장 조직을 염색한다.
- [0473] [표 19A]
- [0474] 표본 유래에 따른 결장암 염색의 요약

결장 CA 표본	총 결장 CA 표본	양성 표본의 수				평균 H-스코어	
		0.5+ 이상		1.0+ 이상		0-300	
		수	%	수	%	세포질	침단
MLNM 표본	9	9	100%	9	100%	83	253
QualTek 단일 표본	4	4	100%	4	100%	69	98
QualTek 결장 CA MTBS	43	39	91%	36	84%	66	118
BIOMAX C0992 어레이	65	63	97%	63	97%	144	164
BIOMAX C0701 어레이	52	49	94%	48	92%	98	118
전체	173	164	95%	160	92%	102	138

[0475]

[0476]

[표 19B]

[0477] 종양 등급에 따른 결장암 염색의 요약

결장 표본	양성의 수	전체 표본	%
정상	57	58	98%
등급 1	20	20	100%
등급 2	95	97	98%
등급 3	44	50	88%
전체	216	225	96%

[0478]

[0479] 3개 세포 펠렛 및 14개의 상이한 결장암종 조직 각각의 5개 복제물을 이용하는 1개 분석으로 GCC IHC 분석의 분석내 정밀도를 평가하였다. 세포 펠렛은 별도의 슬라이드 상에 제조하였다. 2개의 상이한 다중종양 블록에 결장 종양 표본을 포함시켰다. 이들 조직을 GCC IHC 반응성에 대해 스코어링하였다.

[0480]

[0481] 세포 펠렛의 염색 정밀도: 3개 세포 펠렛의 5개 분석내 복제물 모두에서 거의 동일한 염색이 관찰되었다. 결장 종양 표본의 염색 정밀도: 14 결장 종양 표본의 5개 분석내 복제물 모두에서 매우 유사하거나 거의 동일한 염색이 관찰되었다. 전술된 바와 같은 H-스코어 접근을 이용하여 자격을 갖춘 병리학자가 표본을 스코어링하였다. 표준 편차는 모든 경우 분산이 최소임을 나타내어, 동일한 분석수행 내에 우수한 염색 정밀도를 나타내었다. 전체적으로, 평가된 세포 펠렛 및 결장암종 표본의 분석내 GCC IHC 염색에는 매우 일관성이 있었다.

[0482]

[0483] 분석간 변이 및 상이한 작동자로 인한 변이를 별도의 5개 GCC IHC 염색 수행에서 평가하였다. 4개 분석을 1명의 작동자가 다른 날에 수행하였고, 제2 작동자가 5번째 분석을 수행하였다. 염색에는 전술된 정밀도 평가에서와 동일한 조직의 평가가 포함되었다.

[0483]

[0484] 세포 펠렛의 염색 재현성: 3개 세포 펠렛의 5개 분석간 복제물 모두에서 거의 동일한 염색이 관찰되었다. 결장 종양 표본의 염색 재현성: 14개 결장 종양 표본의 5개 분석간 복제물에서 매우 유사하거나 거의 동일한 염색이 관찰되었다. 전술된 바와 같이 H-스코어 접근을 이용하여 자격을 갖춘 병리학자가 표본을 스코어링하였다. 표준 편차는 모든 경우 분산이 최소를 나타내어, 날별 및 상이한 작동자별 염색의 우수한 재현성을 나타내었다. 전체적으로, 평가된 세포 펠렛 및 결장암종 표본의 분석간 및 작동자간 GCC IHC 염색에는 매우 우수한 일관성이 있었다.

[0485]

[0485] 정상 인간 조직의 패널을 평가하여 GCC IHC 분석의 특이성을 평가하였다. 이들 정상 인간 조직에는 30개의 상이한 조직 유형이 포함되었다: 부신, 방광, 골수, 유방, 대뇌 피질, 자궁경부, 나팔관, 심장, 신장, 간, 폐, 림프절, 신경, 난소, 췌장, 이하선(침샘), 뇌하수체, 태반, 전립선, 골격근, 피부, 척추, 비장, 위, 정소, 흉선, 갑상선, 편도선, 요관 및 자궁. 각각의 조직 유형에 있어서, 적어도 3개의 독특한 시편을 염색하고 GCC 면역반응성에 대해 평가하였다.

[0486]

[0486] 전반적으로, MIL-44-148-2 항체를 이용한 GCC IHC 분석은 본원에 기재된 IHC 분석에 의해, 정상 조직 염색에 비해, 특히 침단 염색에 있어서 결장 종양 표본에 매우 특이적인 것으로 나타났다. 침단 염색은 2개의 위 표본에서만 검출되었다; 그러나 상기 염색은 또한 음성 대조군에서도 관찰되었다. 일반적으로 약한 세포질 염색은 난포(3개 표본 중 하나), 피부(소포 및 진피, 3개 표본 중 2개), 위 측벽 세포(3개 표본 중 2개), 전립선 샘상피(3개 표본 중 3개에서 약하게), 뇌하수체(3개 중 2개), 자궁 상피(3개 중 3개), 나팔관 상피(3개 중 2개), 태반 영양막(3개 중 2개에서 약하게) 및 폐(3개 중 3개의 내피, 그리고 3개 중 1개의 세기관지 상피)를 포함하는 몇몇 조직 유형에서 관찰되었다. 가장 강한 세포질 염색(2+)은 1개의 나팔관 및 1개의 뇌하수체에 존재하였다. 두 경우 모두에서, 음성 대조군의 동일 구획에는 더 약한 염색이 존재하였다. 혈장 세포는, 비장, 편도선 및 림프절을 포함하는 여러 조직에서 양성이었다. 조직구는 비장, 폐 및 림프절에서 양성이었다. 기질 염색은 정소(3개 중 2개), 자궁(3개 중 3개) 및 난소(3개 중 1개)에 존재하였다. 혈관의 세포의 염색이 널리 관찰되었고 혈청의 비-특이적 결합인 것으로 나타났다.

[0487]

[0487] TechMate 염색 플랫폼에서 토끼 모노클로날 항체, MIL-44-148-2를 이용한 GCC 분석은 종양 및 대조군 세포 펠렛의 일관된 분석간 및 분석내 염색을 나타낸다. GCC 분석은 평가된 결장 종양 표본의 대다수를 염색하므로, 결장암종에서 상당히 민감한 것으로 나타난다. GCC 분석은 또한 정상 조직에 비해 결장 종양에 대해 훨씬 더 특이적인 것으로 나타난다. 여러 결장 종양에서 관찰되는 GCC 발현은 각 조직 유형의 적어도 3개 복제물을 이용한 30개 조직의 정상 패널에서 관찰되는 임의 염색에 비해 훨씬 더 강하다. 어느 정상 조직에서도 특이적 침단 GCC 염색은 검출되지 않은 반면, 대부분의 GCC 표본에서는 침단 염색이 일반적이다. 일부 정상 조직 유형에서는 세포질 염색만 관찰되며, 이 염색은 일반적으로 약하다. MIL-44-148-2 항체는 포르말린 고정되고 파라핀-임

배당된(FFPE) 결장 종양의 염색을 위해 재현성있고 민감하며 상대적으로 특이적 IHC 마커인 것으로 나타난다.

- [0488] 실시예 4: 비-결직장 PHTX 모델 및 종양 마이크로어레이 그리고 결직장 및 비-결직장 인간 임상 표본에서의 추가적인 면역조직화학
- [0489] 실시예 3에 기재된 자동화 IHC 분석을 이용하여 자성 SCID 마우스에서 위암 및 췌장암 환자 표본 유래의 일차 인간 종양 이종이식편(PHTX) 및 췌장암, 위암, 식도암, 폐암 및 평활근육종/횡문근육종에 특이적인 다양한 종양 마이크로어레이(TMA)(US BioMax, Pantomics 및 다른 상업적 공급원에서 구매)를 포함하여, 상이한 원천의 다양한 비-결직장 표본에서 GCC 발현(즉, 침단, 세포질 및/또는 집합 GCC 발현)을 평가하였다. 또한 구아닐릴 사이클라아제 C를 발현하는 진행된 위장관 악성물을 갖는 성인 환자에서, MLN0264로 지정된 GCC-표적화 항체-약물 콘주게이트의 개방형, 다기관, 용량 증가, 인간 내 최초 연구(연구 C26001, ClinicalTrials.gov 식별자 NCT01577758)의 등록 전에 GCC 발현에 대해 평가된 암 환자에서 유래된 결직장암, 위암, 췌장암, 식도암, 및 소장암, 그리고 자동화 IHC 분석을 수행하는데 관여된 특수 CRO 조직 데이터베이스(QualTek)에서 수득한 인간 위, 췌장 및 식도 종양 표본을 포함하는 다양한 인간 임상 표본에서 실시예 3에 기재된 자동화 IHC 분석을 통해 GCC 발현을 또한 평가하였다.
- [0490] 다양한 원천(PHTX, 인간 임상 표본 및 종양 마이크로어레이)의 다양한 정상 및 암성 결직장 조직 표본 및 비-결직장 조직(위, 췌장, 소장, 식도, 폐, 횡문근육종, 평활근육종)에서의 IHC 염색 결과를 아래 표 20-32에 나타낸다. 표 20-32에는 평가된 다양한 조직에서 침단("A") 및 세포질("C" 또는 "Cyto") GCC 모두에 대한 IHC 스코어(0, 0.5+, 1+, 2+ 및 3+) 및 IHC 스코어에 근거하여 계산된 대응 H 스코어가 포함된다. 또한, 표 32는 각 경우 동일한 환자에서 수득된 일차 및 전이성 암의 인간 임상 표본에서의 GCC IHC 발현 데이터의 비교를 제공한다. 첫 번째 왼쪽 열에 나타낸 "A" 표본(즉, 1A, 2A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A, 9A 10A 등)은 일차 종양 표본을 나타내는 반면, "B" 표본(즉, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, 10B 등)은 대응하는 일차 종양 표본(대응하는 "A" 표본)이 수득된 동일한 환자에서 수득된 전이성 종양 표본을 나타낸다. 다시 말하면, 명칭 "1A" 및 "1B"는 각각 동일한 환자에서 수득된 일차 및 전이성 종양을 나타내며; 명칭 "2A" 및 "2B"는 각각 또 다른 환자에서 수득된 일차 및 전이성 종양을 나타내는 등이다. 표 32에 나타낸 대부분의 종양 표본은 특정 유형의 비-결직장암이 명시되는 "코멘트"에 표시된 열에 반영되어 달리 나타내지 않는 한, 일차 및 전이성 결직장암을 갖는 환자에서 수득되었다. 표 32의 "코멘트" 열에서 알 수 있듯이, 신경내분비 종양, 신장 세포 암종, 위 종양, 위 GIST, 췌장 종양 및 자궁 평활근육종의 일부 표본이 또한 IHC 분석에 의한 GCC 발현에 대한 것이었다.

표 20: 인간 위암에서 PHTX 모델의 IHC 분석

표본 번호	표본 유형	GCC 침단 & 세포질 염색(%)										H-스코어	
		0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	H-스코어 세포질	H-스코어 침단
GAF-023	위 CA 이종이식편			100							100	50	300
GAF-025	위 CA 이종이식편		100			90		5		5		115	0
GAF-055	위 CA 이종이식편					70		30			100	130	300
GAF-074	위 CA 이종이식편	100	90						10			0	20
GAF-075	위 CA 이종이식편	90	100	10								5	0
GAF-087	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAF-114	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAF-152	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAF-318	위 CA 이종이식편					60		40	20		80	140	280
GAF-019	위 CA 이종이식편					60		20		20	100	160	300
GAF-151	위 CA 이종이식편	50	50	50					40		10	25	110
GAM-006	위 CA 이종이식편		100	50		40		10				85	0
GAM-016	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAM-022	위 CA 이종이식편		100	100								50	0
GAM-031	위 CA 이종이식편	90	100	10								5	0
GAM-033	위 CA 이종이식편	70	30	20		10			40		30	20	170
GAM-037	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAM-042	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAM-044	위 CA 이종이식편					50		50	50		50	150	250
GAM-046	위 CA 이종이식편	50	100	50								25	0

[0491]

[0492]

표본 번호	표본 유형	GCC 침단 & 세포질 염색(%)										H-스코어	
		0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포질	침단
GAM-060	위 CA 이종이식편					20		30		50	100	230	300
GAM-080	위 CA 이종이식편	80	100	20								10	0
GAM-093	위 CA 이종이식편	10	20	10		20	10	30	40	30	30	175	180
GAM-095	위 CA 이종이식편	80	100	10		10						15	0
GAM-098	위 CA 이종이식편		10	70		30			40		50	65	230
GAM-110	위 CA 이종이식편	50	100	50								25	0
GAM-119	위 CA 이종이식편		100					40		60		260	0
GAM-138	위 CA 이종이식편	100	100									0	0
GAM-139	위 CA 이종이식편	90	90	10			10					5	10

표 21: 인간 채장암의 PHIX 모델

표본 #	종양 유형	침단 & 세포질 염색(%)										양성/음성		양성%		H	
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성/음성	양성%	세포질	침단	양성%	세포질	침단	침단
117	위		40	100	20		20		20	양성	100	100	120	60	100	100	0
118	채장		100	50		40		10		양성	100	100	0	0	160	0	0
119	채장		50		50	60		40		양성	100	100	50	50	240	50	50
120	위	30	70	70	30					양성	70	70	30	30	70	30	30
121	채장	20	20	80	70		10			양성	80	80	90	80	80	90	90
122	채장				50	50	50	50		양성	100	100	150	100	250	150	150
123	위	100				50		50		양성	100	100	0	0	250	0	0

표본 #	종양 유형	침단 & 세포질 염색(%)										양성/음성		양성%		양성%		H	H
		0C	0A	1+C	1+A	2+C	2+A	3+C	3+A	양성/음성	세포질	양성%	침단	세포질	양성%				
124	혜강	30	80	50	10	20	10			양성	70	20	90	30					
125	혜강				20	50	50	50	30	양성	100	100	250	210					
126	혜강		50	80	20	20	20	20	10	양성	100	50	120	90					
127	혜강	50		50			20		80	양성	50	100	50	280					
128	혜강			20		40		40	100	양성	100	100	220	300					
129	혜강	50	100	50						양성	50	0	50	0					
130	혜강		80	80	20	20				양성	100	20	120	20					
131	혜강					50		50	100	양성	100	100	250	300					
132	혜강		30	20	30	40	30	40	10	양성	100	70	220	120					
133	혜강	100	100							음성	0	0	0	0					
134	혜강			40	40	40	40	20	20	양성	100	100	180	180					
135	혜강		70	70	20	30	10			양성	100	30	130	40					
136	혜강		30		30	100	30		10	양성	100	70	200	120					
137	혜강					70	50	30	50	양성	100	100	230	250					
138	혜강		0	100						양성	100	0	100	0					
139	혜강			50	40	50	30		30	양성	100	100	150	190					
140	혜강		50	100	50					양성	100	50	100	50					
141	혜강	30	40	40	30	30	30			양성	70	60	100	90					
142	혜강		100	30		70				양성	100	0	170	0					
143	혜강		30		30	50	20	50	20	양성	100	70	250	130					
144	혜강		20	50	20	50	20		40	양성	100	80	150	180					
145	혜강			40		30		30	100	양성	100	100	190	300					

[0493]

표 22A: US Biomax P1921 웨장 중앙 마이크로레이 (TMA)에서의 GCC IHC 염색

USBiomax PA1921 웨장 TMA															
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	점단 & 세포질 염색(%)										양성/ % 세포 질
					0C	0A	1+C	A	C	2+	A	C	3+	C	
A1	48	F	샘선암종 (체장 조직의 만성 염증)	-	100	100									양성 % 세포 질
A2	41	F	샘선암종	1											양성 % 세포 질
A3	57	M	샘선암종	1	100								100		양성 % 세포 질
A4	42	F	샘선암종	1	100	100									양성 % 세포 질
A5	47	F	샘선암종	1											양성 % 세포 질
A6	54	F	샘선암종	1											양성 % 세포 질
A7	40	F	샘선암종	2			30	70					100		양성 % 세포 질
A8	54	F	샘선암종	2	100	100									양성 % 세포 질
A9	48	F	샘선암종	1	100	100									양성 % 세포 질
A10	41	F	샘선암종 (회박)	1	100	100									양성 % 세포 질
A11	57	M	샘선암종	1	100					50			50		양성 % 세포 질
A12	42	F	샘선암종	1	100	100									양성 % 세포 질
A13	47	F	샘선암종 (회박)	1											양성 % 세포 질
A14	54	F	샘선암종	1	50	10	50	40		40			10		양성 % 세포 질
A15	40	F	샘선암종	1			30	70					100		양성 % 세포 질
A16	54	F	샘선암종	2	100	100									양성 % 세포 질

[0494]

USBiomax PA1921 해당 TMA																
					침단 & 세포질 염색(%)								양성/ % 세포 질	양성% 세포 질	H 세포 질	H 침단
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	0C	0A	I+C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+A	음성			
B1	51	F	샘선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B2	54	M	샘선암종	2	80	80	20	20					양성	20	20	20
B3	60	M	샘선암종	1	90	90	10	10					양성	10	10	10
B4	47	M	샘선암종	1	100	100							음성	0	0	0
B5	39	M	샘선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B6	54	M	샘선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B7	62	F	샘선암종	1	100	80	10	10		10			양성	0	20	0
B8	64	F	샘선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B9	51	F	샘선암종	2	100	90		10					양성	0	10	0
B10	54	M	샘선암종	2	50	70	50	30					양성	50	30	50
B11	60	M	샘선암종	1	50	80	50	20					양성	50	20	50
B12	47	M	샘선암종	1	100	100							음성	0	0	0
B13	39	M	샘선암종	2	50	100	50						양성	50	0	50
B14	54	M	샘선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B15	62	F	샘선암종	1	100	80		20					양성	0	20	0
B16	64	F	샘선암종 (회박)	-	100	100							음성	0	0	0
C1	67	F	샘선암종	2	100	90		10					양성	0	10	0
C2	65	M	샘선암종	2	50	80	50	20					양성	50	20	50
C3	57	M	샘선암종	2	100	50		50					양성	0	50	0
C4	48	M	샘선암종	2		50	100	50					양성	100	50	100

[0495]

USBiomar FA1921 회장 TMA																
						침단 & 세포질 염색(%)						양성/	양성 %	H	H	
아래이 위치	연령	성별	병태	등급	0C	0A	1+C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+A	음성	세포 질	침단	세포 질
C5	76	M	샘 선암종	2		80	100	20					양성	100	20	100
C6	43	F	샘 선암종 (섬유지방조직)	-	100	100							음성	0	0	0
C7	57	M	샘 선암종	2	100	70				30			양성	0	30	0
C8	49	M	샘 선암종	1	100	80		20					양성	0	20	0
C9	67	F	샘 선암종	2	100	80		20					양성	0	20	0
C10	65	M	샘 선암종	2	80	50	20	50					양성	20	50	20
C11	57	M	샘 선암종	2	50	80	50	20					양성	50	20	50
C12	48	M	샘 선암종	2	50	80	50	20					양성	50	20	50
C13	76	M	샘 선암종	2	50	40	50	50		10			양성	50	60	50
C14	43	F	샘 선암종 (섬유지방조직의 만성 염증)	-	90	90	10	10					양성	10	10	10
C15	57	M	샘 선암종	2												
C16	49	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0	0	0
D1	52	M	샘 선암종	2		20	80	20		20	20	40	양성	100	80	140
D2	72	F	샘 선암종	2	100	100							음성	0	0	0
D3	53	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0	0	0
D4	55	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0	0	0
D5	51	M	샘 선암종	2	100	90		10					양성	0	10	0

USBiomar PA1921 제창 TMA														
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)									
					0C	0A	I+C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성/ 음성	양성 % 세포 질
D6	57	M	샘 선암종 (섬유지방조직)	-		100	100						양성	100
D7	49	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0
D8	64	M	샘 선암종	2		100	100						양성	100
D9	52	M	샘 선암종	2		10	100	30		30		30	양성	100
D10	72	F	샘 선암종	2	100	100							음성	0
D11	53	M	샘 선암종	2	100	90		10					양성	0
D12	55	M	샘 선암종	2	100	90		10					양성	0
D13	51	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0
D14	57	M	샘 선암종 (섬유지방 조직의 만성 염증)	-	100	100							음성	0
D15	49	M	샘 선암종	2	100	100							음성	0
D16	64	M	샘 선암종	2		90	100	10					양성	100
E1	57	M	샘 선암종	2	50	50	50	50					양성	50
E2	72	M	샘 선암종 (회박)	-	50	90	50	10					양성	50
E3	42	M	샘 선암종	2	50	40	50	30		30			양성	50
E4	55	M	샘 선암종	2	50	100	50						양성	50
E5	47	M	샘 선암종 (채장샘 조직)	-			100	0					양성	100
E6	44	M	샘 선암종	2									양성	100

[0497]

[0498]

USBiomax PA1921 측정 TMA															
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	점단 & 세포질 염색(%)										양성/ 음성
					0C	0A	1+C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+A	양성 % 세포질	양성 % 세포질	
E7	59	M	샘선암종	2	100	100							0	0	0
E8	34	M	샘선암종	1		50	100	30		20			100	50	100
E9	57	M	샘선암종	2	50	80	50	20					50	20	50
E10	72	M	샘선암종	2	50	70	50	30					50	30	50
E11	42	M	샘선암종	2											
E12	55	M	샘선암종	2	100	100							0	0	0
E13	47	M	샘선암종	2	50	50	50	50					50	50	50
E14	44	M	샘선암종	2											
E15	59	M	샘선암종 (회박)	2	100	100							0	0	0
E16	34	M	샘선암종	1											
F1	61	M	샘선암종	2	100	100							0	0	0
F2	39	F	샘선암종	2	90	100	10						10	0	10
F3	44	M	샘선암종	2		90	100	10					100	10	100
F4	59	M	샘선암종	1	80		20	70		20		10	20	100	140
F5	67	F	샘선암종	2	100	100							0	0	0
F6	72	F	샘선암종	2	50	90	50	10					50	10	50
F7	41	F	샘선암종	2	50	100	50						50	0	50
F8	51	M	샘선암종	2	80		20	70		30			20	100	130
F9	61	M	샘선암종	2	50	80	50	20					50	20	50
F10	39	F	샘선암종	2	100	100							0	0	0

USBiomax PA1921 회장 TMA																			
					점단 & 세포질 염색(%)								양성/ 음성	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 점단			
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	0C	0A	1+C	A	1+	2+ C	A	2+	3+ C	3+A					
F11	44	M	샘 선암중	2		70	80		20	30					양성	100	30	120	60
F12	59	M	샘 선암중	2			80	30	20	30		40			양성	100	100	120	210
F13	67	F	샘 선암중	2	100	100									음성	0	0	0	0
F14	72	F	샘 선암중	2	50	90	50	10							양성	50	10	50	10
F15	41	F	샘 선암중	2	50	100	50								양성	50	0	50	0
F16	51	M	샘 선암중	2	50	50	50	40		10					양성	50	50	50	60
G1	41	M	샘 선암중	2	100	100									음성	0	0	0	0
G2	58	F	샘 선암중	2	100	100									음성	0	0	0	0
G3	60	M	샘 선암중	2	50	50	50	50							양성	50	50	50	50
G4	41	M	샘 선암중	2	50	90	50	10							양성	50	10	50	10
G5	68	F	샘 선암중	2	50	100	50								양성	50	0	50	0
G6	52	M	샘 선암중 (회박), 폐사 포함	-	50	100	50								양성	50	0	50	0
G7	51	F	샘 선암중	2		90	100	10							양성	100	10	100	10
G8	76	F	샘 선암중	2		20	80	40	20	40					양성	100	80	120	120
G9	41	M	샘 선암중	2	100	100									음성	0	0	0	0
G10	58	F	샘 선암중	2	50	100	50								양성	50	0	50	0
G11	60	M	샘 선암중	2	50	50	50	50							양성	50	50	50	50
G12	41	M	샘 선암중	2		50	100	30		20					양성	100	50	100	70
G13	68	F	샘 선암중	2		80	100	20							양성	100	20	100	20

USBiomax PA1921 배양 TMA

어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성 % 세포 질	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
					0C	0A	1+C	1+	2+ A	2+ C	3+ A	3+ C	3+A					
G14	52	M	샘 선암종 (회박), 파사 포함	-	50	100	50							양성	50	0	50	0
G15	51	F	샘 선암종	2	50	50	50	50						양성	50	50	50	50
G16	76	F	샘 선암종	2														
H1	62	F	선암종	3	100	100								음성	0	0	0	0
H2	51	M	선암종	3	50	100	50							양성	50	0	50	0
H3	60	F	샘 선암종	2		100	100							양성	100	0	100	0
H4	76	M	샘 선암종	2	60	100	30		10					양성	40	0	50	0
H5	78	M	샘 선암종	2	50	80	50	20						양성	50	20	50	20
H6	53	F	샘 선암종	2	100	100								음성	0	0	0	0
H7	48	F	샘 선암종	2	50	100	50							양성	50	0	50	0
H8	55	M	샘 선암종	3	50	80	50	20						양성	50	20	50	20
H9	62	F	선암종	3	100	100								음성	0	0	0	0
H10	51	M	선암종	3	50	100	50							양성	50	0	50	0
H11	60	F	샘 선암종	2		100	100							양성	100	0	100	0
H12	76	M	샘 선암종 (섬유 조직 및 혈관)	-	100	100								음성	0	0	0	0
H13	78	M	샘 선암종	2	50	100	50							양성	50	0	50	0
H14	53	F	샘 선암종	2		90	100	10						양성	100	10	100	10
H15	48	F	샘 선암종	2	100	100								음성	0	0	0	0

[0501]

USBiomax PA1921 휘장 TMA																
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	점단 & 세포질 염색(%)								양성/ 음성	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 점단
					0C	0A	I+C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+A				
H16	55	M	샘 선암종	2		100	90	10				양성	100	0	110	0
I1	59	M	샘 선암종	2-3	50	90	50	10				양성	50	10	50	10
I2	62	M	샘 선암종	3	100	100						음성	0	0	0	0
I3	67	M	선암종 (회박)	-		100	50	50				양성	100	0	150	0
I4	66	F	샘 선암종	3	50	100	50					양성	50	0	50	0
I5	49	M	선편평상피 암종 (섬유 조직 및 혈관)	-												
I6	50	M	편평상피세포 암종	3	50	100	50					양성	50	0	50	0
I7	73	M	미분화 암종	-	100	100						음성	0	0	0	0
I8	65	M	미분화 암종	-	50	100	50					양성	50	0	50	0
I9	59	M	샘 선암종	2	50	80	50	20				양성	50	20	50	20
I10	62	M	샘 선암종 (회박)	2	100	100						음성	0	0	0	0
I11	67	M	선암종	3		100	50	50				양성	100	0	150	0
I12	66	F	샘 선암종	3	50	100	50					양성	50	0	50	0
I13	49	M	선편평상피 암종	-		100	100					양성	100	0	100	0
I14	50	M	편평상피세포 암종	3		80	100	20				양성	100	20	100	20
I15	73	M	미분화 암종	-		100	100					양성	100	0	100	0
I16	65	M	미분화 암종	-												
J1	56	F	미분화 암종	-	100	100						음성	0	0	0	0

[0502]

USBiomax PA1921 채집 TMA																			
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성/ 음성	양성 % 세포 질	양성% 절단	H 세포 질	H 절단
					0C	0A	1+C	1+A	2+C	2+A	3+C	3+A							
J2	52	F	유암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J3	51	M	비정형 유암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J4	42	M	신경내분비 암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J5	52	F	선암종	1	50	90	50	10						양성	50	10	50		
J6	45	F	선암종	2	100	90		10						양성	0	10	0		
J7	49	M	선암종	2															
J8	65	M	선암종	2															
J9	56	F	미분화 암종	-	90	100	10							양성	10	0	10		
J10	52	F	유암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J11	51	M	비정형 유암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J12	42	M	신경내분비 암종	-	100	100								음성	0	0	0		
J13	52	F	선암종 (해장 조직의 만성 염증)	-		100	100							양성	100	0	100		
J14	45	F	선암종	2	50	80	50			20				양성	50	20	50		
J15	49	M	선암종	2															
J16	65	M	선암종	2															
K1	52	M	선암종	2		80	100	20						양성	100	20	100		
K2	56	F	선암종	2		90	100	10						양성	100	10	100		
K3	76	F	선암종	2	100	100								음성	0	0	0		
K4	45	M	선암종	3	100	100								음성	0	0	0		

USBiomax PA1921 해당 TMA																	
						점단 & 세포질 염색(%)							양성/ 음성	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 점단	
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	0C	0A	1+C	1+A	2+C	2+A	3+C	3+A					
K5	41	M	선암종	3			50		50	50		50	양성	100	100	150	250
K6	62	M	선암종	3													
K7	50	M	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
K8	60	M	선암종	3													
K9	52	M	선암종	2	100	90		10					양성	0	10	0	10
K10	56	F	선암종	2	50	80	50	20					양성	50	20	50	20
K11	76	F	간의 선암종 (회박)	3	100	100							음성	0	0	0	0
K12	45	M	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
K13	41	M	선암종	3													
K14	62	M	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
K15	50	M	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
K16	60	M	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
L1	56	M	샘 선암종	3													
L2	49	F	선관평상피 암종	-	100	100							음성	0	0	0	0
L3	25	M	선암종	2	100	90		10					양성	0	10	0	10
L4	38	M	선암종	2	50	90	50	10					양성	50	10	50	10
L5	42	M	샘 선암종	2													
L6	59	M	선암종 (해경 조직)	-		100			50		50		양성	100	0	250	0
L7	60	F	샘 선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0
L8	13	F	고형 위유두모양	-	100	100							음성	0	0	0	0

[0503]

USBiomax PA1921 해당 TMA																
					절단 & 세포질 염색(%)								양성/ 세포 질	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	0C	0A	1+C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+A				
			암종													
L9	56	M	샘선암종	3	100	100							음성	0	0	0
L10	49	F	선편평상피 암종	-	90	100	10						양성	10	0	10
L11	25	M	선암종 (회박)	2	100	100							음성	0	0	0
L12	38	M	선암종	2	100	90		10					양성	0	10	10
L13	42	M	샘선암종	2	100	40		40		20			양성	0	60	0
L14	59	M	선암종	3		100			50		50		양성	100	0	250
L15	60	F	샘선암종	3	100	100							음성	0	0	0
L16	13	F	고형위유두모양 암종	-	100	100							음성	0	0	0

표 22B: US Biomax P1921 해당 종양 마이크로어레이(TMA)에서의 GCC 염색 요약

평균 양성% 세포질	평균 양성% 절단	평균 H 세포질	평균 H 절단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
33	16	38	25	106	171	62%

[0504]

표 23A: US Biomax PA1002 웨장 종양 마크로어레이(TMA)에서의 GCC IHC 염색

USBiomax PA1002 웨장 TMA																
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	H 세포 질	H 절단
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
A1	65	M	선암종	2												
A2	52	M	선암종	1												
A3	45	F	선암종	2		80	100			10		10	양성	100	20	50
A4	44	M	선암종	2				10		0			양성	0	200	300
A5	47	M	선암종 (희박)	1		90	100			10			양성	100	10	20
B1	55	M	선암종	2	100	100							음성	0	0	0
B2	57	M	선암종 (희박), 피사 포함	2	100	100							음성	0	0	0
B3	34	M	선암종	1	80	80			20	20			양성	20	40	40
B4	56	F	선암종	1	100	80				20			양성	0	20	40
B5	42	M	선암종	1	100	100							음성	0	0	0
C1	39	F	선암종	2	100	100							음성	0	0	0

USBiomax PA1002 측정 TMA																						
						결단 & 세포결염색(%)										양성 /	양성 %	H	H			
어레이 위치	연령	성	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 결	결단	세포 결	결단	세포 결	결단	세포 결	결단	
C2	44	M	선암종	2		100	100						양성	100	0	100	0	100	0	100	0	
C3	59	M	선암종	2	70	80	20	10					양성	20	10	20	10	20	10	20	10	
C4	65	M	선암종 (섬유지방 조직)	-																		
C5	67	F	선암종 (횡장 조직의 만성 염증)	-	80	100	20						양성	20	0	20	0	20	0	20	0	
D1	53	M	선암종	1	100	100							음성	0	0	0	0	0	0	0	0	
D2	52	M	선암종	2	80	60	20	20		20			양성	20	40	20	40	20	60	20	60	
D3	72	F	선암종	1	50	90	50	10					양성	50	10	50	10	50	10	50	10	
D4	58	F	선암종	2	30	100	70						양성	70	0	70	0	70	0	70	0	
D5	41	M	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	0	0	0	0	
E1	51	M	선암종	2	90	80	10	20					양성	10	20	10	20	10	20	10	20	
E2	41	M	선암종 (회박)	-																		
E3	68	F	선암종	2	90	100	10						양성	10	0	10	0	10	0	10	0	
E4	41	F	선암종	2		100	100						양성	100	0	100	0	100	0	100	0	
E5	72	F	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	0	0	0	0	
F1	76	F	선암종, 피사 포함	2	100	100							음성	0	0	0	0	0	0	0	0	
F2	52	M	선암종	2	30	100	70						양성	70	0	70	0	70	0	70	0	
F3	60	F	선암종	2	70	100	30						양성	30	0	30	0	30	0	30	0	
F4	76	M	선암종 (회박)	2	80	90	20	10					양성	20	10	20	10	20	10	20	10	
F5	78	M	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0506]

USBiomax PA1002 해당 TMA																			
						침단 & 세포질염색(%)										양성 /	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	침단	세포 질	침단		
G1	41	M	선암종	2	70	50	30			20		30	양성	30	50	30	130		
G2	62	F	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0		
G3	51	M	선암종 (회박)	-		100	100						양성	100	0	100	0		
G4	50	M	선암종	3		100	100						양성	100	0	100	0		
G5	60	M	선암종	2															
H1	53	F	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0		
H2	59	M	선암종	2		100	70	30					양성	100	0	130	0		
H3	56	M	선암종	3		100	50	50					양성	100	0	150	0		
H4	60	F	선암종	3															
			선암종 (섬유 조직 및 혈관)																
H5	66	F		-															
I1	40	M	정상혜장 조직	-	100	100							음성	0	0	0	0		
I2	47	M	정상혜장 조직	-										0	0	0	0		
I3	25	M	정상혜장 조직	-		70	100			30			양성	100	30	100	60		
I4	35	F	정상혜장 조직	-										0	0	0	0		
I5	30	M	정상혜장 조직	-		70	100	30					양성	100	30	100	30		
J1	50	M	정상혜장 조직	-		100	100						음성	100	0	100	0		
J2	30	M	정상혜장 조직	-		100	100						음성	100	0	100	0		
J3	40	M	정상혜장 조직	-									음성	0	0	0	0		
J4	35	M	정상혜장 조직	-										0	0	0	0		
J5	21	F	정상혜장 조직	-										0	0	0	0		

[0507]

[0508]

표 23B: US Biomax PA1002 웨장 중앙 마이크로어레이(TMA)에서 GCC 염색 요약

양성% 세포질	양성% 침단	H 세포질	H 침단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
35	12	38	21	22	33	67%

표 24A: Pantomics PAC481 웨장 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색 파트 1

Pantomics PAC481 웨장 TMA-파트 1																		
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성/음성	양성% 세포질	양성% 절단	H 세포질	H 절단	
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
A01	46	M	정상	-										0	0	0	0	
A02	48	M	정상	-										0	0	0	0	
A03	58	F	정상	-		100	100						음성	0	0	0	0	
A04	28	F	도세포종양	-		100	100						음성	0	0	0	0	
A05	44	F	선암종	I		50	100	50					양성	50	0	50	0	
A06	64	F	선암종	I		100	100						음성	0	0	0	0	
A07	39	F	선암종	I			50		50			100	양성	100	100	150	300	
A08	49	F	선암종	I		90	100			10			양성	10	0	20	0	
C01	56	F	선암종	I														
C02	49	F	선암종	II		100	100						음성	0	0	0	0	
C03	52	F	선암종	II		100	100						음성	0	0	0	0	
C04	42	F	선암종	II		90	100	10					양성	10	0	10	0	
C05	54	M	선암종	II		100	100						음성	0	0	0	0	
C06	59	M	선암종	II		100	100	30					양성	30	0	30	0	
C07	34	F	선암종	II			100	100	20				양성	100	20	100	20	
C08	69	M	선암종	II			100	100					양성	100	0	100	0	
E01	40	F	선암종	II		100	100						음성	0	0			
E02	79	F	선암종	III		100	100						음성	0	0	0	0	

[0509]

Pantomics PAC481 웨장 TMA-파트 1														
어레이 위치	연령	성	병태	등급	침단 & 세포질 염색(%)									
					0C	0A	I+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성/ 음성	양성% 세포질
E03	76	F	선암종	III	100	100							음성	0
E04	52	M	선암종	III	80	100	20						양성	20
E05	51	F	선암종	III	50	100	50						양성	50
E06	42	F	선암종	III										
E07	40	M	선암종	III	50	100	50						양성	50
E08	64	M	전이성 암종	II										

표 24B: Pantomics PAC481 웨장 TMA 에서의 GCC 염색 요약-파트 1

양성% 세포질	양성% 침단	H 세포질	H 침단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
29	7	34	19	10	18	56%

표 24C: Pantomics PAC481 채장 종양 마이크로어레이에서의 GCC-IHC 염색 파트 2

Pantomics PAC481 채장 TMA-파트 2															
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포결 염색(%)						양성/ 음성	양성%	양성%	H 세포 결	H
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	절단		절단
B01	46	M	정상	-											
B02	48	M	정상	-											
B03	58	F	정상	-											
B04	28	F	도세포 종양	-	100	100							0	0	0
B05	44	F	선암종	I	100	100							0	0	0
B06	64	F	선암종	I	70	70	30	30					30	30	30
B07	39	F	선암종	I			100					100	100	100	300
B08	49	F	선암종	I	90	100	10						10	0	0
D01	56	F	선암종	I	100	100							0	0	0
D02	49	F	선암종	II	100	100							0	0	0
D03	52	F	선암종	II	100	100							0	0	0
D04	42	F	선암종	II	90	100	10						10	0	0
D05	54	M	선암종	II	100	100							0	0	0
D06	59	M	선암종	II	80	100	20						20	0	0
D07	34	F	선암종	II	100	100							100	0	0
D08	69	M	선암종	II	100	100							0	0	0

Pantomics PAC481 채장 TMA-파트 2

어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포표질 염색(%)								양성/ 음성	양성% 세포표질	양성% 절단	H 세포질	H 절단
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
F01	40	F	선암종	II	100	100							음성	0	0	0	0
F02	79	F	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0
F03	76	F	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0
F04	52	M	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0
F05	51	F	선암종	III	60	100	40						양성	40	0	40	0
F06	42	F	선암종	III	50	100	50						양성	50	0	50	0
F07	40	M	선암종	III	50	100	50						양성	50	0	50	0
F08	64	M	전이성 암종	II	100	70			30				양성	30	0	60	0

표 24D: Pantomics PAC481 채장 TMA 에서의 GCC 염색 요약-파트 2

양성% 세포표질	양성% 절단	H 세포표질	H 절단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
21	7	21	17	10	21	48%

[0512]

표 25: US Biomax STC1501 위 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색-파트 1

USBiomax STC1501 위 IMA - 파트 1																			
어레이 위치	연령	성	병태	등급	염단 & 세포질 염색 (%)										양성 / 음성	양성% 세포질	양성% 염단	H 세포 질	H 염단
					0C	0A	1+	1+	2+	2+	3+	3+	3+	3+					
A1	35	M	정상	-															
A2	83	M	정상	-		100	100								양성	100	0	100	0
A3	53	M	만성 위염	-		70	100								양성	100	30	100	90
A4	54	M	만성 위염	-			50		20	50	30	50			양성	100	100	180	250
A5	59	M	위 기질 종양	-	100	100									음성	0	0	0	0
A6	68	F	반지 세포 선암종	-		100			100						양성	100	0	200	0
A7	42	M	선암종	III		100	100								양성	100	0	100	0
A8	44	F	선암종	II-III		20	50		50	30		50			양성	100	80	150	210
A9	54	F	선암종	I		50			100	20		30			양성	100	50	200	130
A10	51	M	선암종	II-III		100	100								양성	100	0	100	0
A11	61	M	선암종	II-III					100	50		50			양성	100	100	200	250
A12	50	M	선암종	II		70			100			30			양성	100	30	200	90
A13	53	F	선암종	III		100	70		30						양성	100	0	130	0
A14	55	M	선암종	III		100			70		30				양성	100	0	230	0
A15	73	F	선암종	II											음성				
C1	47	F	선암종	II-III	100	100									음성	0	0	0	0

[0513]

USBiomax STC1501 위 TMA - 파트 1																
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	침단 & 세포질 염색(%)							양성 / 음성	양성% 세포질	양성% 침단	H 세포 질	H 침단
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C					
C2	70	M	선암종	II-III	50	50	50				50	양성	50	50	50	150
C3	36	M	선암종	I-II	100	50					50	양성	0	50	0	150
C4	65	M	선암종	III	60	70			20		20	양성	40	30	100	90
C5	62	M	선암종	III	100	100						음성	0	0	0	0
C6	77	M	선암종	II-III	50	100	50					양성	50	0	50	0
C7	45	F	선암종	I-II	100	30					70	양성	0	70	0	210
C8	67	M	선암종	II-III	70	90	30		10			양성	30	10	30	20
C9	62	M	선암종	II-III	100	100						음성	0	0	0	0
C10	55	F	선암종	II-III	50	100	50					양성	50	0	50	0
C11	75	M	선암종	III		100	100					양성	100	0	100	0
C12	73	M	미분화 암종	-	100	100						음성	0	0	0	0
C13	41	M	선암종	II-III	50	80	50	10	10			양성	50	20	50	30
C14	58	M	선암종	II-III	70	80	30	20				양성	30	20	30	20
C15	52	F	선암종	I-II		40			100	30	30	양성	100	60	200	150
E1	63	M	위 기질 종양	-	60	100	20		20			양성	40	0	60	0
E2	72	M	선암종	II		100	20		30		50	양성	100	0	230	0
E3	57	M	반지 세포 선암종	-	100	100						음성	0	0	0	0
E4	60	M	선암종	III	100	100						음성	0	0	0	0
E5	66	F	선암종	III												
E6	62	M	선암종	I-II			10		60		30	양성	100	100	220	300
E7	48	F	선암종	III	50	100	20		30			양성	50	0	80	0

[0514]

USBiomax STC1501 위 TMA - 파트 I																						
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)												양성 / 음성		양성%	양성%	H	H
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포질	절단	세포질	절단					
E8	60	M	선암종	II-III		100	20		30		50		양성	100	0	230	0					
E9	56	M	선암종	III		100	50				50		양성	100	0	200	0					
E10	54	M	선암종	III		100	100						양성	100	0	100	0					
E11	64	F	선암종	III		100	30				70		양성	100	0	240	0					
E12	59	M	선암종	III		80	100		20				양성	20	0	40	0					
E13	75	M	미분화 암종	-	30	100					70		양성	70	0	210	0					
E14	65	M	반지 세포 선암종	-		100					10		양성	100	0	300	0					
E15	35	F	선암종	III		100			70		30		양성	100	0	230	0					
G1	71	M	선암종	III	90	100	10						양성	10	0	10	0					
G2	38	M	반지 세포 선암종	-	50	100			50				양성	50	0	100	0					
G3	68	M	위 기질 종양	-	100	100							음성	0	0	0	0					
G4	56	F	선암종	I-II			50		30		20	100	양성	100	100	170	300					
G5	45	M	선암종	II		100	100						양성	100	0	100	0					
G6	45	M	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0					
G7	74	M	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0					
G8	24	F	선암종	II	30	50	50		20	50			양성	70	50	90	100					
G9	51	M	립프종?	-		100	100						양성	100	0	100	0					
G10	53	M	반지 세포 선암종	-	50	100	50						양성	50	0	50	0					
G11	58	F	립프종	-																		
G12	58	F	립프종	-																		

USBiomax STC1501 위 TMA - 파트 1

USBiomax SIC1501 위 TMA - 파트 1																			
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	침단 & 세포질 열색(%)										양성 / 음성	양성%		H	
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성 세포질	양성%		양성 세포 질	H		
G13	81	M	선암종	I-II	20	70	50	30	30				양성	80	30	110	30		
G14	56	M	반지 세포 선암종	-															
G15	35	M	선암종	I-II			100				100		양성	100	100	100	200		
I1	61	M	선암종	II	100	100							음성	0	0	0	0		
I2	42	M	미분화 암종	-	100	100							음성	0	0	0	0		
I3	78	M	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0		
I4	65	F	선암종	III	40	80	20		40			20	양성	60	20	100	60		
I5	68	M	선암종	II-III	100	100							음성	0	0	0	0		
I6	60	M	선암종	II-III															
I7	53	M	선암종	II	100	50						50	양성	0	50	0	150		
I8	76	F	결핵 선암종	II	100	100			20		80		양성	100	0	280	0		
I9	50	M	선암종	II															
II0	74	M	선암종	III	100	100							음성	0	0	0	0		
II1	75	F	반지 세포 선암종	-		100						100							
II2	68	F	선암종	II-III		70	100						양성	100	0	300	0		
II3	56	F	선암종	II-III								30	양성	100	30	100	90		
II4	53	F	립프종	-															
II5	80	M	선암종	II		100			100				양성	100	0	200	0		

[0517]

표 25B: US Biomax STC1501 위 TMA 에서의 GCC 염색 요약-파트 1

양성% 세포질	양성% 침단	H 세포질	H 침단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
57	17	100	45	47	61	77%

표 25C: US Biomax STC1501 위 종양 마크로어레이에서의 GCC IHC 염색 파트 2

어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성 / 음성	양성% 세포질	H 세포	H 절단		
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A								
B1	M	35	정상	-	100	100								0	0	0	0			
B2	M	83	정상	-		90	100					10			100	10	100	30		
B3	M	53	만성 위염	-		100	100								100	0	100	0		
B4	M	54	만성 위염	-						50		50	100		100	100	250	300		
B5	M	59	위 기질 종양	-	100	100									0	0	0	0		
B6	F	68	반지 세포 선암종	-	50	100				50						50	0	100	0	
B7	M	42	선암종	III		100	50			50						100	0	150	0	
B8	F	44	선암종	II-III		100				50		50				100	0	250	0	
B9	F	54	선암종	I						100	30		70			100	100	200	270	
B10	M	51	선암종	II-III		90	100				10					100	10	100	20	
B11	M	61	선암종	II-III						100			100			100	100	200	300	
B12	M	50	선암종	II																
B13	F	53	선암종	III		100	90					10				100	0	120	0	
B14	M	55	선암종	III		100	40			30		30				100	0	190	0	
B15	F	73	선암종	II		100	100									100	0	100	0	
D1	F	47	선암종	II-III	100	100										0	0	0	0	
D2	M	70	선암종	II-III		50	100						50			100	50	100	150	
D3	M	36	선암종	I-II	100	50							50				0	50	0	150
D4	M	65	선암종	III		100	20			30		50				100	0	230	0	
D5	M	62	선암종	III	90	90	10	10								10	10	10	10	
D6	M	77	선암종	II-III	40	100	30			30						60	0	90	0	

[0518]

어레이 위치	연 령	성 별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성 / 음성	양성% 세포질	양성% 절단	H 세포 질	H 절단
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A							
D7	F	45	선암종	I-II	100	50						50			0	50	0	150	
D8	M	67	선암종	II-III	80	90	10		10	10					20	10	30	20	
D9	M	62	선암종	II-III	100	100									0	0	0	0	
D10	F	55	선암종	II-III	100	100									0	0	0	0	
D11	M	75	선암종	III	50	100			50						50	0	100	0	
D12	M	73	미분화 암종	-	100	100									0	0	0	0	
D13	M	41	선암종	II-III					100			100			100	100	200	300	
D14	M	58	선암종	II-III	100	90				10					0	10	0	20	
D15	F	52	선암종	I-II		80			100			20			100	20	200	60	
F1	M	63	위 기질 종양	-	80	100	20								20	0	20	0	
F2	M	72	선암종	II		100	20		30			50			100	0	230	0	
F3	M	57	반지 세포 선암종	-	100	100									0	0	0	0	
F4	M	60	선암종	III															
F5	F	66	선암종	III		100	30		50			20			100	0	190	0	
F6	M	62	선암종	I-II					100			100			100	100	200	300	
F7	F	48	선암종	III	50	100	50								50	0	50	0	
F8	M	60	선암종	II-III	40	50			50	10	10	50			60	60	130	170	
F9	M	56	선암종	III		100			100						100	0	200	0	
F10	M	54	선암종	III	80	100	20								20	0	20	0	
F11	F	64	선암종	III		100	50		20			30			100	0	180	0	
F12	M	59	선암종	III	80	100			20						20	0	40	0	
F13	M	75	미분화 암종	-	100	100									0	0	0	0	
F14	M	65	반지 세포 선암종	-		100						100			100	0	300	0	
F15	F	35	선암종	III		100	30		50			20			100	0	190	0	

[0519]

어레이 위치	연 령	성 별	병태	등급	결단 & 세포결 염색(%)										양성 / 음성	양성% 세포결	양성% 결단	H 세포 결	H 결단
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A							
H1	M	71	선암종	III	90	100	10								10	0	10	0	
H2	M	38	반지 세포 선암종	-															
H3	M	68	위 기결 종양	-	100	100									0	0	0	0	
H4	F	56	선암종	I-II						100			100						
H5	M	45	선암종	II		100	100												
H6	M	45	선암종	III		100	100								100	0	100	0	
H7	M	74	선암종	III	100	100									100	0	100	0	
H8	F	24	선암종	II	80	80			20				20		20	20	40	60	
H9	M	51	립프종?	-															
H10	M	53	반지 세포 선암종	-	70	100	30								30	0	30	0	
H11	F	58	립프종	-															
H12	F	58	립프종	-															
H13	M	81	선암종	I-II		90	100	10							100	10	100	10	
H14	M	56	반지 세포 선암종	-															
H15	M	35	선암종	I-II		70	80		20										
J1	M	61	선암종	II	80	100	20								100	30	120	90	
J2	M	42	미분화 암종	-											20	0	20	0	
J3	M	78	선암종	III	100	100													
J4	F	65	선암종	III		50	50		50						0	0	0	0	
J5	M	68	선암종	II-III	100	80				20					100	50	150	150	
J6	M	60	선암종	II-III	100	100			50				50		0	20	0	40	
J7	M	53	선암종	II	50	80	50				10				100	0	250	0	
J8	F	76	결핵 선암종	II											50	20	50	50	
J9	M	50	선암종	II		40			100	30									
															100	60	200	150	

[0520]

어레이 위치	연령	성별	병태	등급	결단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성% 세포질	양성% 결단	H 세포질	H 결단
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
J10	M	74	선암종	III	100	100								0	0	0	0
J11	F	75	반지 세포선암종	-		100					100			100	0	300	0
J12	F	68	선암종	II-III	90	70	10			30				10	30	10	60
J13	F	56	선암종	II-III													
J14	F	53	림프종	-													
J15	M	80	선암종	II		100			100					100	0	200	0

표 25D: US Biomax STC1501 위 TMA 에서의 GCC 염색 요약-파트 2

양성% 세포질	양성% 결단	H 세포질	H 결단	진체 양성	진체 전체	백분율 양성
58	17	102	48	49	59	83%

[0521]

표 26A: Pantomics ESC1021 식도 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색

Pantomics ESC1021 식도 TMA															
어레이 위치	연령	성별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성 / 음성
					0C	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성 % 세포질	H 세포질	H 절단	
A01	56	M	정상		100	100						음성	0	0	0
A02	53	M	정상		100	100						음성	0	0	0
A03	53	M	정상		100	100						음성	0	0	0
A04	62	M	식도염		100	100						음성	0	0	0
A05	66	M	식도염		100	100						음성	0	0	0
A06	58	M	편평상피세포 암종	I	30	100		20		50		양성	70	0	190
A07	36	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100						음성	0	0	0
A08	72	F	편평상피세포 암종	I	50	100		50				양성	50	0	100
A09	62	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100						음성	0	0	0
A10	56	M	편평상피세포 암종	I	70	100		30				양성	30	0	60
A11	68	F	편평상피세포 암종	I	100	100						음성	0	0	0
A12	62	M	편평상피세포 암종	I	80	100	20					양성	20	0	20
A13	56	M	편평상피세포	I	70	100	30					양성	30	0	30

[0522]

Panomics ESC1021 식도 TMA																
					절단 & 세포질 염색(%)								양성 /	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	세포 질	절단
			양종													
B01	60	M	편평상피세포 양종	I	100	100							음성	0	0	0
B02	50	M	편평상피세포 양종	I	90	100					10		양성	10	0	30
B03	44	M	편평상피세포 양종	I	70	100			30				양성	30	0	60
B04	60	M	편평상피세포 양종	I	100	100							음성	0	0	0
B05	64	F	편평상피세포 양종	I	70	100	30						양성	30	0	30
B06	55	M	편평상피세포 양종	I	70	100	30						양성	30	0	30
B07	56	M	편평상피세포 양종	I	60	100			20		20		양성	40	0	100
B08	48	M	편평상피세포 양종	I	80	100			20				양성	20	0	40
B09	51	M	편평상피세포 양종	I-II	100	100							음성	0	0	0
B10	56	M	편평상피세포 양종	I-II	100	100							음성	0	0	0
B11	71	M	편평상피세포 양종	I-II	100	100							음성	0	0	0
B12	55	M	편평상피세포	I-II	80	100			10		10		양성	20	0	50

[0523]

Panomics ESC1021 식도 TMA																
					점단 & 세포질 염색(%)								양성 /	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포질	세포질	점단
			암종													
B13	58	M	편평상피세포 암종	I-II	70	100	30						양성	30	0	30
C01	26	F	편평상피세포 암종	I-II	30	100			70				양성	70	0	140
C02	56	F	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0
C03	65	M	편평상피세포 암종	I-II	30	100			70				양성	70	0	140
C04	43	M	편평상피세포 암종	I-II	30	100	60		10				양성	70	0	80
C05	62	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100	10						양성	10	0	10
C06	55	M	편평상피세포 암종	I-II	50	100	50						양성	50	0	50
C07	59	M	편평상피세포 암종	I-II	70	100			30				양성	30	0	60
C08	42	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100	10						양성	10	0	10
C09	61	M	편평상피세포 암종	I-II	20	100	80						양성	80	0	80
C10	57	M	편평상피세포 암종	I-II	80	100	20						양성	20	0	20
C11	62	M	편평상피세포	I-II		100	100						양성	100	0	100

[0524]

Panomics ESCI021 식도 TMA																
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / %	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
			암종													
C12	62	M	편평상피세포 암종	I-II	80	100			10		10		양성	20	0	50
C13	55	M	편평상피세포 암종	I-II	50	100	50						양성	50	0	50
D01	70	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0
D02	68	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100	10						양성	10	0	10
D03	55	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100			10				양성	10	0	20
D04	65	F	편평상피세포 암종	I-II	80	100	20						양성	20	0	20
D05	60	M	편평상피세포 암종	I-II		100	100						양성	100	0	100
D06	66	M	편평상피세포 암종	I-II	80	100	20						양성	20	0	20
D07	56	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0
D08	68	F	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0
D09	55	M	편평상피세포 암종	I-II	50	100	50						양성	50	0	50
D10	60	M	편평상피세포	I-II	80	100	20						양성	20	0	20

Pantomics ESC1021 식도 TMA																		
					절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	H 세포질	H		
어레이 위치	연령	성	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포질	절단	결과		
			암종															
D11	61	F	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0		
D12	56	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0		
D13	71	F	편평상피세포 암종	I-II		100			100				양성	100	0	200		
E01	57	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100	10						양성	10	0	10		
E02	64	M	편평상피세포 암종	I-II	50	100	20		30				양성	50	0	80		
E03	72	M	편평상피세포 암종	I-II	90	100	10						양성	10	0	10		
E04	74	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0		
E05	51	M	편평상피세포 암종	I-II	80	100			20				양성	20	0	40		
E06	61	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0		
E07	62	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0		
E08	63	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0		
E09	71	M	편평상피세포 암종	I-II	100	100							음성	0	0	0		

[0526]

Pantomics ESC1021 식도 TMA																	
						침단 & 세포질 염색(%)								양성 /	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	세포 질	침단	
			암종														
E10	51	M	편평상피세포 암종	II													
E11	54	M	편평상피세포 암종	II	70	100	30						양성	30	0	30	
E12	77	M	선암종	II	80	70	20				30		양성	20	30	20	
E13	64	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0	
F01	45	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0	
F02	52	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0	
F03	59	M	편평상피세포 암종	II		100	50						양성	50	0	50	
F04	68	M	편평상피세포 암종	II		100	100						양성	100	0	100	
F05	53	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0	
F06	62	M	편평상피세포 암종	II		100			50		50		양성	100	0	250	
F07	67	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0	
F08	54	M	편평상피세포 암종	II	70	100	30						양성	30	0	30	

[0527]

Panomics ESC1021 식도 TMA																
어레이 위치	연령	성	병태	등급	절단 & 세포진 염색(%)							양성 / 음성	양성 %	양성 / 세포진	H	H
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
F09	67	M	편평상피세포 암종	II	100	100							음성	0	0	0
F10	56	F	편평상피세포 암종	II	80	100	20						양성	20	0	20
F11	56	M	선암종	II	20				80			100	양성	80	100	300
F12	57	F	편평상피세포 암종	II-III	80	100			20				양성	20	0	40
F13	53	M	편평상피세포 암종	II-III	70	100			30				양성	30	0	60
G01	57	M	편평상피세포 암종	II-III	100	100							음성	0	0	0
G02	47	M	편평상피세포 암종	II-III	100	100							음성	0	0	0
G03	66	M	편평상피세포 암종	II-III	100	100							음성	0	0	0
G04	47	F	편평상피세포 암종	II-III	70	100	30						양성	30	0	30
G05	53	M	편평상피세포 암종	II-III		100	100						양성	100	0	100
G06	57	M	편평상피세포 암종	II-III	90	100	10						양성	10	0	10
G07	59	M	편평상피세포 암종	II-III	100	100							음성	0	0	0
G08	42	M	편평상피세포 암종	II-III		100	100						양성	100	0	100

Panomics ESC1021 식도 TMA																
어레이 위치	연령	성	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)							양성 / 음성	양성 %	양성 %	H 세포	H 절단
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
			암종													
G09	49	M	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
G10	48	M	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
G11	67	M	편평상피세포 암종	III		100	100						양성	100	0	100
G12	58	M	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
H01	58	M	선암종?	III	100	100	100						양성	100	0	100
H02	56	M	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
H03	61	F	편평상피세포 암종	III	90	100	10						양성	10	0	10
H04	72	F	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
H05	60	M	편평상피세포 암종	III		100	100						양성	100	0	100
H06	49	M	편평상피세포 암종	III		100	50		50				양성	100	0	150
H07	56	M	편평상피세포 암종	III	100	100							음성	0	0	0
H08	53	M	편평상피세포 암종	III		100	100						양성	100	0	100

[0529]

Pantomics ESC1021 식도 TMA																
					절단 & 세포질 염색(%)								양성 /	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성	병태	등급	0C	0A	1+	1+	2+	2+	3+	3+	양성 /	양성 %	H	H

표 26B: Pantomics ESC1021 식도 종양 마이크로어레이에서의 GCC 염색 요약

양성%	양성%	H	H	전체	전체	백분율
세포질	절단	세포질	절단	양성	N	양성
28	1	39	4	57	96	59%

[0530]

표 27A: US BioMax ES8010 식도 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색-파트 1

USBioMax ES8010 식도 TMA-파트 1																	
					절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성 /	양성 %	H	H	
어레이 위치	연령	성	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성 / 음성 /	양성 %	H	H	
A1	69	M	편평상피세포 암종	1	50	100	50						양성	50	0	50	0
A3	56	M	편평상피세포 암종	1	50	100					50		양성	50	0	150	0
A5	62	M	편평상피세포 암종	2	80	100			20				양성	20	0	40	0
A7	58	M	편평상피세포 암종	1		100			70		30		양성	100	0	230	0
A9	46	M	편평상피세포 암종	1	50	100			50				양성	50	0	100	0
B1	43	M	편평상피세포 암종	1	40	100	30				30		양성	60	0	120	0
B3	61	F	편평상피세포 암종	1	100	100							음성	0	0	0	0
B5	62	M	편평상피세포 암종	2	90	100					10		양성	10	0	30	0
B7	50	M	편평상피세포 암종	1	40	100	30		30				양성	60	0	90	0
B9	68	M	편평상피세포 암종	2	70	100	30						양성	30	0	30	0
C1	65	M	편평상피세포 암종	1	100	100							음성	0	0	0	0
C3	50	M	편평상피세포 암종	2	90	100	10						양성	10	0	10	0
C5	60	M	편평상피세포 암종	2	70	100			30				양성	30	0	60	0
C7	49	F	편평상피세포 암종	2	80	100			20				양성	20	0	40	0
C9	59	F	편평상피세포 암종	2	80	100	20						양성	20	0	20	0
D1	43	M	편평상피세포 암종	2	80	100			20				양성	20	0	40	0
D3	62	M	편평상피세포 암종	2	60	100	40						양성	40	0	40	0
D5	62	M	편평상피세포 암종	3	90	100			10				양성	10	0	20	0

[0531]

USBioMax ES8010 식도 TMA-파트 1

어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	결단 & 세포질 염색(%)								양성 / %	양성 %	H 세포 질	H	
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
D7	60	F	편평상피세포 암종	2		100	70		30			음성	양성	100	0	130	0
D9	54	F	편평상피세포 암종	2	80	100	20					양성	양성	20	0	20	0
E1	48	M	편평상피세포 암종	2	80	100	20					양성	양성	20	0	20	0
E3	57	M	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
E5	58	M	편평상피세포 암종	2	80	100	20					양성	양성	20	0	20	0
E7	53	F	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
E9	56	F	편평상피세포 암종	2	30	100	70					양성	양성	70	0	70	0
F1	76	M	편평상피세포 암종	2	100	100						음성	음성	0	0	0	0
F3	60	M	편평상피세포 암종 (회박 식도 조직)	-	20	100	80					양성	양성	80	0	80	0
F5	53	M	편평상피세포 암종	2	100	100						음성	음성	0	0	0	0
F7	49	F	제자리 암종	-		100	0		10			양성	양성	100	0	100	0
F9	62	F	편평상피세포 암종	2	100	100						음성	음성	0	0	0	0
G1	48	F	편평상피세포 암종	2	100	100						음성	음성	0	0	0	0
G3	57	M	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
G5	45	M	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
G7	55	F	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
G9	53	F	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
H1	68	M	편평상피세포 암종	3	100	100						음성	음성	0	0	0	0
H3	64	M	편평상피세포 암종	2	90	100			10			양성	양성	10	0	20	0

[0532]

[0533]

USBioMax ES8010 식도 TMA-파트 1																
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / %	양성 %	H 세포 질	H
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
H5	55	M	편평상피세포 암종	3	100	100							음성	0	0	0
H7	63	F	편평상피세포 암종	3	100	100							음성	0	0	0
H9	54	F	편평상피세포 암종	3	100	100							음성	0	0	0

표 27B: US BioMax ES8010 식도 TMA 에서의 GCC 염색 요약 파트 1

양성 %	양성 %	H	H	전체	전체	백분율
세포질	절단	세포질	절단	양성	N	양성
25	0	38	0	24	40	60%

표 27C: US BioMax ES8010 식도 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색-파트 2

USBioMax ES8010 식도 TMA (80 포어)															
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	결단 & 세포결 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	H 세포 결단
					0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			
A2	69	M	정상 식도 조직 근처의 암 (점막의 만성 염증)	-	100	100							음성	0	0
A4	56	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	50	100	50						양성	50	0
A6	62	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0
A8	58	M	정상 식도 조직 근처의 암 (점막의 만성 염증)	-											
A10	46	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	20	100	80						양성	80	0
B2	43	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	70	100	30						양성	30	0
B4	61	F	정상 식도 조직 근처의 암	-	100	100							음성	0	0
B6	62	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	70	100					30		양성	30	0
B8	50	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	20	100	80						양성	80	0
B10	68	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0
C2	65	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	70		30				양성	100	0
C4	50	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0
C6	60	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0
C8	49	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0

[0535]

USBioMax ES8010 식도 TMA (80 포어)																	
						절단 & 세포질 열색(%)							양성 /	양성 %	H	H	
어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	양성 %	세포 질	
C10	59	F	정상 식도 조직 근처의 암	-	30	100	70						양성	70	0	70	0
D2	43	M	정상 식도 조직 근처의 암 (결막의 만성 열증)	-	50	100	50						양성	50	0	50	0
D4	62	M	정상 식도 조직 근처의 암 (회박 결막)	-		100	100						양성	100	0	100	0
D6	62	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
D8	60	F	정상 식도 조직 근처의 암 (결막의 만성 열증)	-	100	100							음성	0	0	0	0
D10	54	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
E2	48	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
E4	57	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
E6	58	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
E8	53	F	정상 식도 조직 근처의 암 (결막의 만성 열증)	-		100	100						양성	100	0	100	0
E10	56	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
F2	76	M	정상 식도 조직 근처의 암 (결막의 만성 열증)	-	70	100	30						양성	30	0	30	0
F4	60	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	20	100	80						양성	80	0	80	0
F6	53	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
F8	49	F	정상 식도 조직 근처의 암 (결막의 만성 열증)	-		100	100						양성	100	0	100	0
F10	62	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0

USBioMar ES8010 식도 TMA (80 코어)

어레이 위치	연령	성 별	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / %	양성 %	H 세포 질	H 절단	
					0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
G2	48	F	정상 식도 조직 근처의 암 (평활근 및 점액선 조직)	-	20	100	80						양성	80	0	80	0
G4	57	M	정상 식도 조직 근처의 암 (섬유 조직, 혈관 및 평활근 조직)	-	20	100	80						양성	80	0	80	0
G6	45	M	정상 식도 조직 근처의 암 (평활근 조직)	-													
G8	55	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
G10	53	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
H2	68	M	정상 식도 조직 근처의 암 (점막의 만성 염증)	-	70	100	30						양성	30	0	30	0
H4	64	M	정상 식도 조직 근처의 암	-	100	100							음성	0	0	0	0
H6	55	M	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0
H8	63	F	정상 식도 조직 근처의 암 (점막의 만성 염증)	-		100	100						양성	100	0	100	0
H10	54	F	정상 식도 조직 근처의 암	-		100	100						양성	100	0	100	0

[0536]

[0537]

표 27D: US BioMax ES8010 식도 TMA 에서의 GCC 염색 요약 파트 2

양성% 세포질	양성% 결단	H 세포질	H 결단	전체 양성	전체 N	백분율 양성
76	0	78	0	34	38	89%

표 28A: US BioMax LC20813 폐 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색

USBiomax LC20813 폐 TMA																				
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)										양성 / 음성	양성 % 세포 질	양성% 세포 질	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+	1+	2+	2+	3+	3+							
								C	A	C	A	C	A							
A1	72	M	폐	편평상피세포 암종	1	100	100								음성	0	0	0	0	
A2	63	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A3	55	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A4	50	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A5	61	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A6	63	M	폐	편평상피세포 암종 (회박)	-	100	100								음성	0	0	0	0	
A7	73	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A8	53	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A9	69	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A10	66	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100								음성	0	0	0	0	
A11	61	M	폐	편평상피세포	2	100	100								음성	0	0	0	0	

[0539]

USBiomax LC20813 패 TMA																		
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 % 세포 질	양성% 세포 질	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
				암종														
A12	64	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
A13	48	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
A14	59	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
A15	51	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
A16	70	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B1	63	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B2	55	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B3	76	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B4	68	M	폐	편평상피세포 암종	2	50	100	50						양성	50	0	50	
B5	45	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B6	54	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	
B7	50	M	폐	편평상피세포	2	100	100							음성	0	0	0	

USBiomax LC20813 폐 TMA																
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)						양성 / 음성	양성 % 세포 질	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			
				암종												
B8	57	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B9	43	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B10	46	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B11	72	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B12	62	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B13	64	M	폐	편평상피세포 암종, 피사 포함	2	100	100					음성	0	0	0	0
B14	61	M	폐	편평상피세포 암종, 피사 포함	3	90	100	10				양성	10	0	10	0
B15	54	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
B16	61	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
C1	35	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100					음성	0	0	0	0
C2	53	M	폐	편평상피세포	2	100	100					음성	0	0	0	0

[0540]

USBiomax LC20813 폐 TMA

어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	세포 질	양성 % 절단	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
				암종															
C3	76	M	폐	편평상피세포 암종 (외박), 괴사 포함	2	100	100							음성		0	0	0	
C4	53	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성		0	0	0	
C5	66	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성		0	0	0	
C6	76	M	폐	편평상피세포 암종 (폐 조직)	-	100	100							음성		0	0	0	
C7	70	M	폐	편평상피세포 암종 (종양 괴사)	-														
C8	64	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성		0	0	0	
C9	68	M	폐	편평상피세포 암종 (기관지, 섬유 조직 및 혈관)	-	100	100							음성		0	0	0	
C10	25	M	폐	편평상피세포 암종	2														
C11	66	M	폐	편평상피세포 암종	2	90	100	10						양성		10	0	10	
C12	66	M	폐	편평상피세포	2	90	100	10						양성		10	0	10	

[0541]

USBiomax LC20813 페 TMA																		
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 % 세포 질	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
				암종														
C13	53	M	페	편평상피세포 암종	2		100	0						양성	100	0	100	0
C14	39	M	페	편평상피세포 암종	2	60	100	40						양성	40	0	40	0
C15	60	M	페	편평상피세포 암종	2	70	100	30						양성	30	0	30	0
C16	59	M	페	편평상피세포 암종 (원발, 섬유 조직 및 혈관의 만성 염증)	-													
D1	62	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
D2	54	M	페	편평상피세포 암종	-	100	100							음성	0	0	0	0
D3	67	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
D4	54	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
D5	49	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
D6	46	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0

[0542]

[0543]

USBiomax LC20813 페 TMA																			
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	침단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	양성 % 세포 침단	H 세포 침단	H	H 침단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
D7	56	M	페	편평상피세포 암종	3	90	100			10				양성	10	0	20		0
D8	55	F	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D9	45	M	페	편평상피세포 암종	2	80	100	20						양성	20	0	20		0
D10	47	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D11	72	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D12	66	M	페	편평상피세포 암종	2	50	100	50						양성	50	0	50		0
D13	62	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D14	48	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D15	57	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
D16	70	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
E1	55	M	페	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0		0
E2	64	M	페	편평상피세포 암종	2	50	100	50						양성	50	0	50		0

USBiomax LC20813 폐 TMA

어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	점단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 점단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
E3	67	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
E4	75	M	폐	편평상피세포 암종	-	100	100							음성	0	0	0	0
E5	56	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
E6	77	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
E7	51	F	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
E8	64	M	폐	편평상피세포 암종 (폐 조직)	-													
E9	65	M	폐	편평상피세포 암종, 폐사 포함	2	100	100							음성	0	0	0	0
E10	63	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100							음성	0	0	0	0
E11	52	M	폐	편평상피세포 암종	2		100	10	0					양성	100	0	100	0
E12	55	F	폐	편평상피세포 암종	2		100	10	0					양성	100	0	100	0
E13	71	M	폐	편평상피세포 암종	2	100	100	50	30			20		양성	100	0	170	0
E14	52	M	폐	편평상피세포	2	100	100	10						양성	100	0	100	0

[0544]

USBiomax LC20813 폐 TMA															
어레이 위치	연령	성	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)						양성 / 음성	양성 % 세포 질	양성 % 세포 질	H 세포 질
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		
				암종				0							
E15	63	F	폐	선편평상피 암종	-	50	100	50				양성	50	0	50
E16	67	F	폐	선편평상피 암종	-		100	50		40		10	양성	100	0
F1	46	F	폐	선편평상피 암종	-	50	100	50					양성	50	0
F2	61	M	폐	선편평상피 암종	-	100	100						음성	0	0
F3	54	M	폐	선편평상피 암종	-	100	100						음성	0	0
F4	55	F	폐	선편평상피 암종	-	50	100	50					양성	50	0
F5	68	M	폐	선편평상피 암종	-		100	50		50			양성	100	0
F6	54	F	폐	유두모양 선암종	2	100	100						음성	0	0
F7	61	M	폐	선암종	2			80		20	50	50	양성	100	120
F8	60	F	폐	선암종	2	100	100						음성	0	0
F9	62	F	폐	선암종	2	100	100						음성	0	0
F10	38	M	폐	선암종	2	100	100						음성	0	0
F11	42	F	폐	선암종	2	50	80	50	20				양성	50	20
F12	56	F	폐	선암종	2	100	100						음성	0	0

[0545]

[0546]

USBiomax LC20813 페 TMA																			
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성		양성 %	양성 % 세포 질	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
														100	100				
F13	59	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	
F14	33	M	페	선면평상피 암종	-	80	100	20						양성	20	0	20	0	
F15	68	F	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	
F16	49	F	페	선암종, 피사 포함	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G1	56	F	페	선암종 (섬유 조직 및 혈관의 만성 염증)	-														
G2	60	M	페	유두모양 선암종	2	80	100	10		10				양성	20	0	30	0	
G3	39	M	페	유두모양 선암종	2	80	100	20						양성	20	0	20	0	
G4	58	M	페	유두모양 선암종	2														
G5	56	F	페	유두모양 선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G6	55	M	페	유두모양 선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G7	62	M	페	유두모양 선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G8	64	F	페	유두모양 선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G9	72	M	페	선암종	3	50	100	50						양성	50	0	50	0	

USBiomax LC20813 폐 TMA																			
						절단 & 세포질 염색(%)								양성 /	양성 %	H	H		
어레이 위치	연령	성	기관	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	세포 질	절단	절단	
G10	53	F	폐	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G11	65	M	폐	유두모양 선암종	2	90	100			10				양성	10	0	20	0	
G12	52	F	폐	유두모양 선암종	2		100	0	10					양성	100	0	100	0	
G13	47	F	폐	유두모양 선암종	2	70	100	20		10				양성	30	0	40	0	
G14	71	F	폐	유두모양 선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
G15	49	M	폐	선암종	2		100	0	10					양성	100	0	100	0	
G16	58	M	폐	선암종	2		100	0						양성	100	0	100	0	
H1	62	M	폐	선암종	2	100	90			10				양성	0	10	0	10	
H2	54	F	폐	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	
H3	38	M	폐	선암종, 피사 포함	2	100	100							음성	0	0	0	0	
H4	68	M	폐	선암종	2	50	100	50						양성	50	0	50	0	
H5	64	F	폐	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	
H6	41	F	폐	선암종	-	90	100	10						양성	10	0	10	0	
H7	40	M	폐	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	
H8	58	F	폐	선암종, 피사 포함	3	100	100							음성	0	0	0	0	

[0547]

USBiomax LC20813 페 TMA																			
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	양성 % 세포 질	H 세포 질	H	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
H9	64	M	페	선암종, 피사 포함	3	100	100							음성		0	0	0	0
H10	56	F	페	유두모양 선암종	2		90	10	10					양성	100	10	100	10	10
H11	57	F	페	유두모양 선암종	2	80	100	20						양성	20	0	20	0	0
H12	62	F	페	선암종, 피사 포함	2		100	80		20				양성	100	0	120	0	0
H13	60	M	페	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	0
H14	64	F	페	선암종	2	100	100							음성	0	0	0	0	0
H15	82	M	페	선암종	3	100	90		10					양성	0	10	0	0	10
H16	60	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I1	50	F	페	선암종	3	50	100	50						양성	50	0	50	0	0
I2	46	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I3	69	M	페	선암종 (희박)	3														
I4	51	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I5	70	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I6	67	M	페	선암종	3		10	60		20	30	20	60	양성	100	90	160	160	240
I7	36	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I8	49	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I9	60	M	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0
I10	39	F	페	선암종	3	100	100							음성	0	0	0	0	0

[0548]

USBiomax LC20813 폐 TMA

어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	절단 & 세포질 염색(%)						양성 / 음성	양성 %	양성 % 절단	H 세포 질	H 절단
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			
J13	52	M	폐	선암종	3	100	100						음성	0	0	0
J14	66	M	폐	선암종	3	100	100						음성	0	0	0
J15	47	M	폐	선암종	3	100	100						음성	0	0	0
J16	52	F	폐	선암종	3	90	100	10					양성	10	0	10
K1	58	F	폐	선암종	3	100	100						음성	0	0	0
K2	46	F	폐	선암종	3	50	100	50					양성	50	0	50
K3	69	M	폐	선암종	3	100	100						음성	0	0	0
K4	58	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K5	51	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K6	63	F	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K7	63	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K8	60	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K9	63	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K10	66	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K11	71	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K12	60	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K13	31	F	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K14	61	M	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K15	52	F	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
K16	69	F	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0
L1	43	F	폐	소세포암종	-	100	100						음성	0	0	0

[0550]

USBiomax LC20813 페 TMA																
						절단 & 세포질 염색(%)							양성 / %	양성 %	H	H
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	음성	세포 질	절단
L2	56	M	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L3	62	M	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L4	42	F	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L5	59	F	페	소세포암종 (섬유 조직 및 혈관)	-	100	100							음성	0	0
L6	55	F	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L7	28	M	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L8	39	M	페	소세포암종	-	100	100							음성	0	0
L9	61	M	페	대세포암종	-	100	100							음성	0	0
L10	72	F	페	대세포암종	-	90	100	10						양성	10	0
L11	46	M	페	대세포암종	-	70	100	30						양성	30	0
L12	64	F	페	대세포암종	-	100	100							음성	0	0
L13	55	F	페	세기관지폐포 암종	-	100	100							음성	0	0
L14	52	M	페	세기관지폐포 암종	-	90	100	10						양성	10	0
L15	55	M	페	세기관지폐포 암종	-	100	100							음성	0	0
L16	64	F	페	세기관지폐포 암종	-	100	100							음성	0	0
M1	59	M	페	결핵 세기관지폐포	-	100	100							음성	0	0

[0551]

USBiomax LC20813 패 TMA																	
						절단 & 세포질 염색(%)								양성 / 음성	양성 %	H 세포 질	H 절단
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
				암종													
				결핵													
M2	50	F	폐	세기관지폐포 암종 (회박)	-												
				결핵													
M3	27	M	폐	세기관지폐포 암종	-	100	100							음성	0	0	0
				결핵													
M4	48	M	폐	세기관지폐포 암종	-	100	100							음성	0	0	0
				결핵표피양													
M5	56	M	폐	암종	-	90	100	10						양성	10	0	10
				결핵표피양													
M6	51	M	폐	암종	-												
				결핵표피양													
M7	48	M	폐	암종	-	100	100							음성	0	0	0
				결핵표피양													
M8	58	M	폐	암종	-	90	100	10						양성	10	0	10
				비정형 유암종													
M9	49	M	폐	비정형 유암종	-	100	100							음성	0	0	0
				비정형 유암종													
M10	47	M	폐	비정형 유암종	-	100	100							음성	0	0	0
				비정형 유암종													
M11	67	M	폐	비정형 유암종	-	100	100							음성	0	0	0
				대세포													
				신경내분비													
M12	65	M	폐	암종	-	100	100							음성	0	0	0

[0552]

[0553]

USBiomax LC20813 폐 TMA															
어레이 위치	연령	성 별	기관	병태	등급	침단 & 세포질 염색(%)								양성 %	양성 % 세포 질
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		
				혼합대세포 신경내분비											
M13	43	M	폐	암종	-	100	100							0	0
M14	58	M	폐	거대세포암종	-	100	100							0	0
M15	36	F	폐	기저세포암종	-	100	100							0	0
M16	66	M	폐	다형태암종	-	100	100							0	0

표 28B: US BioMax LC20813 폐 TMA 에서의 GCC 염색 요약

평균 양성% 세포질	평균 양성% 침단	평균 H 세포질	평균 H 침단	전체 양성 N	전체 N	백분율 양성
14	1	15	3	56	199	28%
11	0	12	0	15	74	20%
23	3	26	7	36	82	44%
0	0	0	0	0	21	0%
3	0	3	0	5	22	23%

표 29A: 평활근육종/형문근육종 종양 마이크로어레이에서의 GCC IHC 염색

코어 위치	성별	연령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형	절단 & 세포질 염색(%)								양성/음성	양성 %	양성%	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
A1	M	85	섬유 조직	고 전이성 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
A2	M	85	섬유 조직	고 전이성 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
A3	M	26	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A4	M	26	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A5	F	56	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
A6	F	56	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
A7	F	74	섬유 조직	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A8	F	74	섬유 조직	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A9	M	34	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0
B1	M	34	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIA		100	10	0					양성	100	0	100	0

[0554]

코어 위치	성별	연령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형	절단 & 세포질 염색(%)								양성/음성	양성 %	양성 %	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
B2	F	20	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIIA	100	100							음성	0	0	0	0
B3	F	20	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIIA	100	100							음성	0	0	0	0
B4	F	49	지방 조직	중등 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
B5	F	49	지방 조직	중등 전이성 평활근육종	IIB	NET	100							n/a				
B6	F	34	지방 조직	중등 전이성 상피모양 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
B7	F	34	지방 조직	중등 전이성 상피모양 평활근육종	IIB		100	10	0					양성	100	0	100	0
B8	M	38	평활근	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
B9	M	38	평활근	저 전이성 평활근육종	IA	80	100	20						양성	20	0	20	0
C1	F	44	인대	저 전이성 평활근육종	IB	100	100							음성	0	0	0	0
C2	F	44	인대	저 전이성 평활근육종	IB	100	100							음성	0	0	0	0
C3	F	69	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
C4	F	69	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIB		100	10	0					양성	100	0	100	0

[0555]

코어 위치	성 별	연 평	기관/조 직	병태 진단/조직 설명	유형	절단 & 세포질 염색(%)								양성/ 음성	양성 %	양성%	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
C5	F	88	평활근	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
C6	F	88	평활근	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
C7	F	54	평활근	전이성 다형태 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
C8	F	54	평활근	전이성 다형태 평활근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
C9	F	58	평활근	저 전이성 평활근육종	IIB		100	10						양성	100	0	100	0
D1	F	58	평활근	저 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
D2	F	57	평활근	저 전이성 평활근육종	IB	90	100	10						양성	10	0	10	0
D3	F	57	평활근	저 전이성 평활근육종	IB	50	100	50						양성	50	0	50	0
D4	M	78	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	NET	100							n/a				
D5	M	78	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	NET	100							n/a				
D6	F	52	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0
D7	F	52	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	50	100	50						양성	50	0	50	0
D8	M	61	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA		100	10	0					양성	100	0	100	0

[0556]

표어 위치	성 별	연 령	기관/조 직	병태 진단/조직 설명 증등 전이성 평형근육종 (섬유 조직, 혈관 및 평형근)	유형	점단 & 세포질 염색(%)								양성/ 음성	양성 %	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
D9	M	61	평형근		IIA		100	10					양성	100	0	100	0
E1	F	33	섬유 조직	다형태 평문근육종	IIA	100	100						음성	0	0	0	0
E2	F	33	섬유 조직	다형태 평문근육종	IIA	100	100						음성	0	0	0	0
E3	M	21	후복막 강	배아 평문근육종	IIIA		100	10					양성	100	0	100	0
E4	M	21	후복막 강	배아 평문근육종	IIIA		100	10					양성	100	0	100	0
E5	F	51	자궁 경부	다형태 평문근육종	IIIB	100	100						음성	0	0	0	0
E6	F	51	자궁 경부	다형태 평문근육종	IIIB	100	100						음성	0	0	0	0
E7	M	16	고환	방추 세포 평문근육종	IIA	100	100						음성	0	0	0	0
E8	M	16	고환	방추 세포 평문근육종	IIA		100	10					양성	100	0	100	0
E9	F	49	자궁	다형태 평문근육종	IIIB	100	100						음성	0	0	0	0
F1	F	49	자궁	다형태 평문근육종	IIIB	100	100						음성	0	0	0	0
F2	M	30	평문근	평문근육종	IIB	100	100						음성	0	0	0	0
F3	M	30	평문근	평문근육종	IIB	70	100	30					양성	30	0	30	0
F4	M	18	혀	배아 평문근육종	IIIA	100	100						음성	0	0	0	0

[0557]

코어 위치	성 별	연 령	기관/조 직	병태 진단/조직 설명	유형	점단 & 세포질 염색(%)								양성/ 음성	양성 %	양성%	H	H
						0C	0A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
F5	M	18	려	배아 횡문근육종	IIIA	100	100	10						음성	0	0	0	0
F6	M	91	횡문근	다형태 횡문근육종	IIIB		100	0						양성	100	0	100	0
F7	M	91	횡문근	다형태 횡문근육종	IIIB		100	0						양성	100	0	100	0
F8	F	74	방광	다형태 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
F9	F	74	방광	다형태 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G1	F	67	자궁 경부	다형태 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G2	F	67	자궁 경부	다형태 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G3	F	40	복강	배아 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G4	F	40	복강	배아 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G5	F	23	골반강	배아 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G6	F	23	골반강	배아 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0
G7	M	50	횡문근	다형태 횡문근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0
G8	M	50	횡문근	다형태 횡문근육종	IIA		100	0						양성	100	0	100	0
G9	M	10	횡문근	폐포 횡문근육종	IIB		100	70		30				양성	100	0	130	0
H1	M	10	횡문근	폐포 횡문근육종	IIB	50	100	50						양성	50	0	50	0
H2	F	32	자궁 경부	다형태 횡문근육종	IIIB	70	100	30						양성	30	0	30	0
H3	F	32	자궁 경부	다형태 횡문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0

[0558]

			절단 & 세포질 염색(%)										양성/음성	양성 %	양성 %	H	H	
			0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A								
표어 위치	성별	연령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형													
H4	M	48	연조직	폐포 횡문근육종	IIB	80	100	20						양성	20	0	20	0
H5	M	48	연조직	폐포 횡문근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
H6	M	40	연조직	방추 세포 횡문근육종	IA	80	100	20						양성	20	0	20	0
H7	M	40	연조직	방추 세포 횡문근육종	IA	80	100	20						양성	20	0	20	0
H8	M	49	고환	배아 횡문근육종	IIB		100	0	10					양성	100	0	100	0
H9	M	49	고환	배아 횡문근육종	IIB		100	0	10					양성	100	0	100	0
I1	F	48	자궁	평활근	-	100	100							음성	0	0	0	0
I2	F	8	심장	심장 근육	-	100	100							음성	0	0	0	0
I3	F	14	심장	심장 근육	-	100	100							음성	0	0	0	0
n/a			방광	정상 방광	n/a	100	100							음성	0	0	0	0
			1007 (GCC29 3): 이종이 식편	인간 배아 신장 이종이식편 - GCC 전탈간염	n/a													
n/a			신장 세포주 - 293 HEK- GCC#2	인간 배아 신장 세포주 - GCC 전탈간염	n/a		100						10 0	양성	100	0	300	0
n/a			신장 세포주	인간 배아 신장 세포주	n/a		100						10 0	양성	100	0	300	0
n/a				인간 배아 신장 세포주	n/a		100							음성	0	0	0	0

[0559]

표어 위치				성 별		연 령	기 관/조 직	병태 진단/조직 설명	유 형	결단 & 세포질 염색(%)								양성 % 세포 결	양성 % 세포 결단	H	H 세포 결	H
										0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
n/a								결장암 MTB	n/a	100					10		90	양성	0	100	0	290
n/a								결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a								결장암 MTB	n/a	80	60	20	10		20		10	양성	20	40	20	80
n/a								결장암 MTB	n/a	90	90	10	10					양성	10	10	10	10
n/a								결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a								결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a								결장암 MTB	n/a	40		40		20	50		50	양성	60	100	80	250
n/a								결장암 MTB	n/a	80	20	20			30		50	양성	20	100	20	230

[0560]

표 29B: 평활근육종/횡문근육종 종양 마이크로어레이에서의 음성 대조군 Ab 스코어링

코어 위치	성별	연령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형	점단 & 세포질 염색(%)								양성/음성	양성 %	양성%	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
A1	M	85	섬유 조직	고 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
A2	M	85	섬유 조직	고 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
A3	M	26	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A4	M	26	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A5	F	56	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
A6	F	56	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
A7	F	74	섬유 조직	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A8	F	74	섬유 조직	저 전이성 평활근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
A9	M	34	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0
B1	M	34	섬유 조직	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0
B2	F	20	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIIA	100	100							음성	0	0	0	0

[0561]

				결단 & 세표결 염색(%)								양성 %	양성 %	H	H			
표어 위치	성 별	연 령	기관/조 직	병태 진단/조직 설명	유형	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성/ 음성	세표 결	결단	세표 결	결단
B3	F	20	평환근	중등 전이성 평환근육종	IIIA	100	100							음성	0	0	0	0
B4	F	49	지방	중등 전이성 평환근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
B5	F	49	지방	중등 전이성 평환근육종	IIB	100	100							n/a				
B6	F	34	지방	중등 전이성 상피모양 평환근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
B7	F	34	지방	중등 전이성 상피모양 평환근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
B8	M	38	평환근	저 전이성 평환근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
B9	M	38	평환근	저 전이성 평환근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0
C1	F	44	인대	저 전이성 평환근육종	IB	100	100							음성	0	0	0	0
C2	F	44	인대	저 전이성 평환근육종	IB	100	100							음성	0	0	0	0
C3	F	69	평환근	중등 전이성 평환근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
C4	F	69	평환근	중등 전이성 평환근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0
C5	F	88	평환근	저 전이성 평환근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0

[0562]

코어 위치	성 별	연 평	기관/조 직	병태 진단/조각 설명	유형	절단 & 세포질 염색(%)						양성/ 음성	양성 %	H	H
						0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		
C6	F	88	평활근	저 전이성 평활근육종	IA	100	100						음성	0	0
C7	F	54	평활근	전이성 다형태 평활근육종	IIIB	100	100						음성	0	0
C8	F	54	평활근	전이성 다형태 평활근육종	IIIB	100	100						음성	0	0
C9	F	58	평활근	저 전이성 평활근육종	IIB	100	100						음성	0	0
D1	F	58	평활근	저 전이성 평활근육종	IIB	100	100						음성	0	0
D2	F	57	평활근	저 전이성 평활근육종	IB	100	100						음성	0	0
D3	F	57	평활근	저 전이성 평활근육종	IB	100	100						음성	0	0
D4	M	78	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100						n/a		
D5	M	78	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100						n/a		
D6	F	52	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100						음성	0	0
D7	F	52	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100						음성	0	0
D8	M	61	평활근	중등 전이성 평활근육종	IIA	100	100						음성	0	0
D9	M	61	평활근	중등 전이성 평활근육종 (섬유	IIA	100	100						음성	0	0

[0563]

표어 위치					기관/조 직					병태 진단/조직 설명 (조직, 혈관 및 평원근)					유형					점단 & 세포점 염색(%)										양성/ 음성	양성 %	양성%	H	H																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
																				0C					1+ C A										2+ C A					3+ C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
성 별					연 령					기 관/조 직					병태 진단/조직 설명 (조직, 혈관 및 평원근)					유형					0C					1+ C A					2+ C A					3+ C A																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								

포어 위치				절단 & 세포질 염색(%)											양성/음성	양성 %	양성 %	H	H
				절단 & 세포질 염색(%)															
				성 별	연 령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A					
F6	M	91	화문근	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
F7	M	91	화문근	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
F8	F	74	방광	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
F9	F	74	방광	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G1	F	67	자궁	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G2	F	67	자궁	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G3	F	40	복강	배아 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G4	F	40	복강	배아 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G5	F	23	골반강	배아 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G6	F	23	골반강	배아 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
G7	M	50	화문근	다형태 화문근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0	
G8	M	50	화문근	다형태 화문근육종	IIA	100	100							음성	0	0	0	0	
G9	M	10	화문근	세포 화문근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H1	M	10	화문근	세포 화문근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H2	F	32	자궁	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H3	F	32	자궁	다형태 화문근육종	IIIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H4	M	48	연조직	세포 화문근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H5	M	48	연조직	세포 화문근육종	IIB	100	100							음성	0	0	0	0	
H6	M	40	연조직	세포 화문근육종	IA	100	100							음성	0	0	0	0	

절단 & 세포질 염색(%)										양성/ 음성	양성 %	H	H
코어 위치	성별	연령	기관/조직	병태 진단/조직 설명	유형	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A
				황문근육종									
H7	M	40	연조직	방주 세포	IA	100	100					음성	0
H8	M	49	고환	황문근육종	IIB	100	100					음성	0
H9	M	49	고환	배아 황문근육종	IIB	100	100					음성	0
I1	F	48	자궁	배아 황문근육종	-	100	100					음성	0
I2	F	8	심장	평원근	-	100	100					음성	0
I3	F	14	심장	심장 근육	-	100	100					음성	0
n/a			방광	심장 근육		100	100					음성	0
			방광	정상 방광	n/a	100	100					음성	0
n/a			1007 (GCC29 이종이 식편)	인간 배아 신장 이종이 식편 - GCC 전달감염됨	n/a	100	100					음성	0
n/a			신장 세포주 -293 HEK-GCC#2	인간 배아 신장 세포주 -293 HEK-GCC 전달감염됨	n/a	100	100					음성	0
n/a			신장 세포주 -293 [HEK-293]	인간 배아 신장 세포주	n/a	100	100					음성	0

[0566]

						결단 & 세포결염색(%)								양성/음성	양성 %	양성%	H	H
포어 위치	성별	연령	기관/조직	병태진단/조직설명	유형	0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
n/a			조직 1	결장암 MTB	n/a	100	100							음성	0	0	0	0
n/a			조직 2	결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a			조직 3	결장암 MTB	n/a	100	100							음성	0	0	0	0
n/a			조직 4	결장암 MTB	n/a	100	100							음성	0	0	0	0
n/a			조직 5	결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a			조직 6	결장암 MTB	n/a	NET								n/a				
n/a			조직 7	결장암 MTB	n/a	100	100							음성	0	0	0	0
n/a			조직 8	결장암 MTB	n/a	100	100							음성	0	0	0	0

[0567]

표 30A: CRO (QualTek) 조직 데이터베이스의 비결직장암 인간 임상 표본에서의 GCC IHC 염색

QualTek 조직 데이터베이스 표본														
표본	QML 슬라이트 번호	등급	결단 & 세포결 염색(%)						양성 / 음성	양성% 세포결	양성% 결단	H 세포결	H 결단	
			0C	0A	1+C	1+A	2+C	2+A						3+C
췌장암종	MPL#7	2	80	100	20					양성	20	0	20	0
췌장암종	MPL#7	3	100	100						음성	0	0	0	0
췌장암종	MPL#7	2	60	80	30		10	10	10	양성	40	20	50	50
위선암종	MPL#8	3	60	80	20	0	20	10	10	양성	50	20	90	50
위선암종	MPL#9	3	100	100						음성	0	0	0	0
위선암종	MPL#10	2-3	80	100	20					양성	20	0	20	0
식도 편평상피세포 암종	MPL#33	2	90	100	10					양성	10	0	10	0
식도 편평상피세포 암종	MPL#12	2	30		50		20			양성	70	0	90	0
식도 편평상피세포 암종	MPL#13	2	100	100						음성	0	0	0	0

표 30B: CRO (QualTek) 조직 데이터베이스의 정상 결과 및 결직장암(종양 등급 1, 2, 2&3 또는 3)의 인간 임상 표본에서의

GCC IHC 염색

QualTek 표본 번호	MLNM 표본 번호	표본 유형	GCC 절단 & 세포질 염색(%)										H- 스코어 절단	조직 등급
			0C	0A	0.5+C	0.5+A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A		
Q34	PRGNX000525	결장							100	30		70	200	정상
Q35	PRGNX000526	결장			50		50					100	75	2
Q36	PRGNX000527	결장			50		50			50		50	75	정상
Q37	PRGNX000528	결장			50		20		30			100	105	2
Q38	PRGNX000529	결장			50		50			20		80	75	정상
Q39	PRGNX000530	결장					50			50	50	50	200	3
Q40	PRGNX000531	결장			50		50			50		50	75	정상
Q41	PRGNX000532	결장		30	100			10		30		30	50	2
Q42	PRGNX000533	결장					50		50	20		80	150	정상
Q43	PRGNX000534	결장					50		50	30		70	150	2
Q44	PRGNX000535	결장		80	100			20					50	정상
Q45	PRGNX000536	결장					50		50			100	150	2
Q46	PRGNX000537	결장							100	30		70	200	정상
Q47	PRGNX000538	결장			80		20					100	60	2
Q48	PRGNX000539	결장			50		50			50		50	75	정상
Q49	PRGNX000540	결장							100	80		20	200	2
Q50	PRGNX000541	결장			50		50	50		50			75	정상
Q51	PRGNX000542	결장							100			100	200	2
Q52	PRGNX000543	결장					70		30			100	130	정상

QualTek 표본 번호	MLNM 표본 번호	표본 유형	GCC 절단 & 세포질 염색(%)												H-스코어		조직 등급
			0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	I+ C	I+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포질	절단			
Q53	PRGNX000544	결장					100						100	300	2		
Q54	PRGNX000545	결장			50		50						75	300	정상		
Q55	PRGNX000546	결장		20	90		10				30		55	210	2		
Q56	PRGNX000547	결장			100	50		50					50	75	정상		
Q57	PRGNX000548	결장			40		30		30				110	300	2		
Q58	PRGNX000549	결장			100			30		40			50	200	정상		
Q59	PRGNX000550	결장			30		50		20				105	300	2		
Q60	PRGNX000551	결장					80		10	10	50	10	130	250	정상		
Q61	PRGNX000552	결장	80	80			10		10				30	60	2 & 3		
Q62	PRGNX000553	결장			50		50			50			75	250	정상		
Q63	PRGNX000554	결장					20		80				180	300	2		
Q64	PRGNX000555	결장					100			50			100	250	정상		
Q65	PRGNX000556	결장					90		10				110	300	2		
Q66	PRGNX000557	결장			30		50		20	50			105	250	정상		
Q67	PRGNX000558	결장															
Q68	PRGNX000559	결장			50		50						75	300	정상		
Q69	PRGNX000560	결장	50		50			20		30			25	230	2		
Q70	PRGNX000561	결장			50		50	20		30			75	230	정상		
Q71	PRGNX000562	결장															
Q72	PRGNX000563	결장		40	70		30	20		20			65	120	정상		
Q73	PRGNX000564	결장			100								50	300	2		
Q74	PRGNX000565	결장			50		50						75	300	정상		
Q75	PRGNX000566	결장			100			10		20			50	260	2		

[0570]

QualTek 표본 번호	MLNM 표본 번호	표본 유형	GCC-점단 & 세포결 영역(%)										H- 스코어		조직
			0C	0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포결	점단	
Q76	PRGNX000567	결장			50		50			50		50	75	250	경상
Q77	PRGNX000568	결장	20				70		10			100	90	300	2
Q78	PRGNX000569	결장		30	100			20		30		20	50	140	경상
Q79	PRGNX000570	결장			100							100	50	300	2
Q80	PRGNX000571	결장					50		50			100	150	300	경상
Q81	PRGNX000572	결장			80		20					100	60	300	2
Q82	PRGNX000573	결장			50		50					100	75	300	경상
Q83	PRGNX000574	결장			50		50			20		80	75	280	2
Q84	PRGNX000575	결장					100			20		80	100	280	경상
Q85	PRGNX000576	결장			50		20		30	20		80	105	280	2
Q86	PRGNX000577	결장			50		50			50		50	75	250	경상
Q87	PRGNX000578	결장			20		60		20			100	110	300	2
Q88	PRGNX000579	결장					50		50			100	150	300	경상
Q89	PRGNX000580	결장					50		50			100	150	300	3
Q90	PRGNX000581	결장			50		50			50		50	75	250	경상
Q91	PRGNX000582	결장			30		50		20	20		80	105	280	2
Q92	PRGNX000583	결장			50		50			50		50	75	250	경상
Q93	PRGNX000584	결장		20	100			30				50	50	180	2
Q94	PRGNX000585	결장			50		50			20		80	75	280	경상
Q95	PRGNX000586	결장													
Q96	PRGNX000587	결장			50		50			50		50	75	250	경상
Q97	PRGNX000588	결장					20		80			100	180	300	2
Q98	PRGNX000589	결장			50		50					100	75	300	경상

[0571]

QualTek 표본 번호	MLNM 표본 번호	표본 유형	GCC 집단 & 세포질 염색(%)												H- 스코어	H-스코어 세포질	H- 스코어 침단	조직 등급
			0C	0A	0.5+C	0.5+A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
Q99	PRGNX000590	결장			50		30		20	50		50	95	250	2			
Q100	PRGNX000591	결장			50		50			50		50	75	250	정상			
Q101	PRGNX000592	결장		20	100					50		30	50	190	2			
Q102	PRGNX000593	결장			50		50					100	75	300	정상			
Q103	PRGNX000594	결장	100	100									0	0	3			
Q104	PRGNX000595	결장			50		50			90		10	75	210	정상			
Q105	PRGNX000596	결장			60		40	20		30		50	70	230	2			
Q106	PRGNX000597	결장							100			100	200	300	정상			
Q107	PRGNX000598	결장	10	10	10		30		30	40	20	50	155	230	2 & 3			
Q108	PRGNX000599	결장							100			100	200	300	정상			
Q109	PRGNX000600	결장	80	100			20						20	0	2			
Q110	PRGNX000601	결장			50		50					100	75	300	정상			
Q111	PRGNX000602	결장	10		20		60		10			100	90	300	2			
Q112	PRGNX000603	결장			50		50			50		50	75	250	정상			
Q113	PRGNX000604	결장			50		50			20		80	75	280	2			
Q114	PRGNX000605	결장			50		50			50		50	75	250	정상			
Q115	PRGNX000606	결장			50				20		30	100	155	300	2			
Q116	PRGNX000607	결장					100			50		50	100	250	정상			
Q117	PRGNX000608	결장		100	70		30						65	0	3			
Q118	PRGNX000609	결장					100			50		50	100	250	정상			
Q119	PRGNX000610	결장			30		50		20			100	105	300	2			
Q120	PRGNX000611	결장					100			50		50	100	250	정상			
Q121	PRGNX000612	결장			30		60		10	20		80	95	280	2			

[0572]

QualTek 표본 번호	MLNM 표본 번호	표본 유형	GCC 점단 & 세 포결 영역(%)												H- 스코어	H- 스코어 절단	조각
			0C		0A	0.5+ C	0.5+ A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A				
Q122	PRGNX000613	결장					100						100	100	300	정상	
Q123	PRGNX000614	결장			30		50		20				100	105	300	2	
Q124	PRGNX000615	결장		60			100	20					20	100	80	정상	
Q125	PRGNX000616	결장			100	20		20		30			30	50	180	2	
Q126	PRGNX000617	결장					100			30			70	100	270	정상	
Q127	PRGNX000618	결장					80		20				100	120	300	2	
Q128	PRGNX000619	결장			50		50	40		40			20	75	180	정상	
Q129	PRGNX000620	결장	100										100	0	300	2	
Q130	PRGNX000621	결장					80		20				100	120	300	정상	
Q131	PRGNX000622	결장			20		30		50				100	140	300	2	
Q132	PRGNX000623	결장					70		30				100	130	300	정상	
Q133	PRGNX000624	결장					70		30				100	130	300	2	

[0573]

표 31: GCC 표적화 치료제 MLN0264 의 C260001 I 상 용량 증가 연구에서의 임상 표본

대상체 #	암 유형	성 별	수집일	표본 유형/개수	수집일	첨단 & 세포질염색(%)										양성/ 음성	양성 %	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
						0C	0	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	양성	양성 %					
58001-102**	CRC	M	03-SEP-2008	5 개의 미염색 슬라이드	5/22/2012	100	0	0	0	0	0	0	100	양성	0	100	0	300		
58001-103**	CRC	F	17-FEB-2010	5 개의 미염색 슬라이드	5/22/2012	100	20	0	30	0	30	0	20	양성	0	80	0	150		
58001-101**	췌장	F	15-MAY-2012	1 개의 파라핀 블록	5/22/2012	0	0	0	0	0	0	10	100	양성	100	100	300	300		
58001-104	CRC	M	12-APR-2011	5 개의 미염색 슬라이드	6/6/2012	10	0	50	0	20	0	20	100	양성	90	100	150	300		
58001-105	췌장	M	23-AUG-2006	20 개의 미염색 슬라이드	7/3/2012	90	0	10	0	0	0	0	0	양성	10	0	10	0		
58002-103	식도	M	17-AUG-2010	5 개의 미염색 슬라이드	7/3/2012	90	0	0	0	10	0	0	0	양성	10	0	20	0		
58002-101	췌장	M	20-JAN-2011	5 개의 미염색 슬라이드	7/3/2012	90	0	10	0	0	0	0	0	양성	10	0	10	0		
58002-102	CRC	M	09-AUG-2007	1 개의 FFPE 블록	7/3/2012	100	0	0	0	0	0	0	0	음성	0	0	0	0		
58002-106	CRC	F	22-JUN-2011	5 개의 미염색 슬라이드	7/11/2012	100	0	0	0	0	0	0	0	음성	0	0	0	0		
58001-107	CRC	F	28-NOV-2008	5 개의 미염색 슬라이드	7/24/2012	80	20	20	0	0	20	0	60	양성	20	80	20	220		
58001-107	CRC	F	28-NOV-2008	5 개의 미염색 슬라이드	7/24/2012	90	10	10	10	0	30	0	50	양성	10	90	10	220		

[0574]

대상체 #	암유형	성별	수집일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	절단 & 세포결염색(%)										양성/음성	양성 %	양성%	H	H
						절단 & 세포결염색(%)														
						0C	1+ A	1+ C	2+ A	2+ C	3+ A	3+ C	3+ A	3+ C	3+ A					
58001-107	CRC	F	28-NOV-2008	5 개의 미염색 슬라이드	7/24/2012	40	0	50	0	10	20	0	80	양성	60	100	70	280		
58002-111	CRC	F	23-OCT-2009	5 개의 미염색 슬라이드	7/25/2012	0	0	10	0	0	0	0	100	양성						
58002-112	CRC	F	01-DEC-2011	5 개의 미염색 슬라이드	7/25/2012	0	0	80	0	20	20	0	80	양성	100	100	100	300		
58002-107	CRC	F	12-FEB-2007	5 개의 미염색 슬라이드	7/26/2012	80	50	10	0	10	50	0	0	양성	20	50	30	100		
58002-108	위	M	27-JUL-2012	5 개의 미염색 슬라이드	7/31/2012	20	0	20	0	50	0	10	0	양성	80	0	150	0		
58002-113	CRC	M	09-JUL-2008	5 개의 미염색 슬라이드	7/31/2012	50	20	30	10	20	20	0	50	양성	50	80	70	200		
58001-108	식도	M	12-MAY-2010	20 개의 미염색 슬라이드	8/8/2012	100	0	10						음성	0	0	0	0		
58002-114	CRC	F	12-SEP-2005	5 개의 미염색 슬라이드	8/10/2012	100		10			80		10	양성	0	100	0	200		
58002-105	CRC	M	19-APR-2010	1 개의 FFPE 블록	8/16/2012	10		70		20	20		80	양성	90	100	110	280		
58001-109	식도	M	20-SEP-2011	6 개의 미염색 슬라이드	8/21/2012	100	0	10						음성	0	0	0	0		
58002-115	CRC	M	24-AUG-2010	5 개의 미염색 슬라이드	8/21/2012	100		10		20			70	양성	0	100	0	260		
58002-109	췌장	M	08-AUG-2012	5 개의 미염색 슬라이드	8/22/2012	20	10	40	30	20	30	20	30	양성	80	90	140	180		
58002-117	췌장	M	28-FEB-2011	5 개의 미염색 슬라이드	8/22/2012	40	10	40	50	20	30		10	양성	60	90	80	140		

[0575]

대상제 #	암 유형	성 별	수입일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	점단 & 세포킬 영역(%)							양성/ 음성	양성 %	양성 %	H	H
						0C	0	1+ A	1+ C	2+ A	2+ C	3+ A	3+ C	세포 킬	양성 %	H	H
58002-118	CRC	M	22-NOV-2010	1 개의 FFPE 블록	9/7/2012		10		10	70	10	30	70	양성	100	230	240
58001-110	소장	F	31-AUG-2012	1 개의 FFPE 블록	9/11/2012		80			30		70	20	양성	100	270	60
58002-120	CRC	F	12-MAY-2010	1 개의 FFPE 블록	9/12/2012		70	30		40		30	30	양성	100	200	90
58002-121	위	F	03-MAY-2012	1 개의 FFPE 블록	9/12/2012	40	0	10		40		10		양성	60	0	120
58002-123	췌장	F	20-MAY-2011	5 개의 미염색 슬라이드	9/13/2012	100	80					20		양성	0	20	0
51001-101	CRC	M	03-AUG-2010	5 개의 미염색 슬라이드	9/17/2012					10	0		100	양성	100	200	300
58002-119	CRC	M	09-NOV-2005	5 개의 미염색 슬라이드 + 2 개의 H&E	9/19/2012	40	20	40	20	20	20	40		양성	60	80	180
58002-122	식도	M	10-MAY-2010	1 개의 FFPE 블록 및 2 개의 H&E	9/19/2012		10							양성			
51001-102	CRC	M	23-NOV-2010	5 개의 미염색 슬라이드	10/10/2012	20	0	20		30		30		양성	80	0	170
51001-103	췌장	F	05-AUG-2009	5 개의 미염색 슬라이드	10/15/2012					50		50	100	양성	100	250	300
51001-104	CRC	F	24-MAR-2010	5 개의 미염색 슬라이드	10/22/2012		50	80	50			10		양성	50	20	50
58002-116	CRC	M	19-OCT-2010	5 개의 미염색 슬라이드	10/24/2012		70	30				10	90	양성	30	100	290
										50		50	100	양성	100	250	300

[0576]

[0577]

대상체 #	암유형	성별	수집일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	첨단 & 세포질 염색(%)								양성/음성	양성 %	양성%	H	H
						0C	0 A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					
51001-105	채장	M	29-DEC-2010	5 개의 미염색 슬라이드	10/24/2012	90	90	10	10					양성	10	10	10	10
51001-106	CRC	F	17-SEP-2010	5 개의 미염색 슬라이드	10/25/2012	80		20		20			80	양성	20	100	20	280
58001-111	CRC	F	05-FEB-2005	10 개의 미염색 슬라이드	10/31/2012	90		10	10	10	10		80	양성	10	100	10	270
58003-105	CRC	F	09-JUN-2010	5 개의 미염색 슬라이드	11/6/2012	70						30	100	양성	30	100	90	300
51001-107	CRC	M	31-AUG-2009	5 개의 미염색 슬라이드	11/7/2012	80		20					100	양성	20	100	20	300
58002-127	위	F	03-AUG-2011	5 개의 미염색 슬라이드	11/8/2012	100	10	0						음성	0	0	0	0
58003-101	CRC	F	13-SEP-2010	1 개의 파라인 블록	11/8/2012		10	70	10	30	10		70	양성	100	90	130	240
58003-107	채장	F	29-FEB-2012	5 개의 미염색 슬라이드	11/8/2012	100	10	0						음성	0	0	0	0
58003-106	CRC	F	25-JUN-2009	5 개의 미염색 슬라이드	11/9/2012	100			10		10		80	양성	0	100	0	270
58003-108	CRC	F	28-JUL-2011	5 개의 미염색 슬라이드	11/9/2012	100					20		80	양성	0	100	0	280
51001-108	CRC	M	UK-UK-UK	5 개의 미염색 슬라이드	11/9/2012			30	0	30	30	40	70	양성	100		210	270
51001-109	CRC	M	09-OCT-2007	5 개의 미염색 슬라이드	11/12/2012	70		30			30		70	양성	30	100	30	270
58003-103	식도	M	09-MAR-2011	5 개의 미염색 슬라이드	11/13/2012	100	10	0						음성	0	0	0	0

대상채 #	암 유형	성 별	수집일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	점단 & 세포질 열색(%)										양성/ 음성	양성 %	H	H
						0C	0 A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
58001-112	CRC	M	11-JUN-2012	20 개의 미열색 슬라이드	11/13/2012 2	30	30	30				10	100	양성	70	100	120	300	
58003-110	CRC	F	30-MAY-2012	5 개의 미열색 슬라이드	11/14/2012 2		10			30		70		양성	100	0	270	0	
58003-102	CRC	M	17-MAR-2010	1 개의 파라핀 블록	11/16/2012 2	20	30	10	40	20	10	70		양성	80	100	140	260	
58002-126	채강	F	04-AUG-2011	5 개의 미열색 슬라이드	11/16/2012 2			30		70				양성	100		170		
58003-112	식도	M	21-OCT-2011	5 개의 미열색 슬라이드	11/29/2012 2	40	10	50		10				양성	60	0	70	0	
58001-114	채강	M	30-NOV-2011	5 개의 미열색 슬라이드	11/29/2012 2	100	0							음성	0	0	0	0	
58003-104	채강	M	16-MAR-2012	5 개의 미열색 슬라이드	12/3/2012	20	0	40		20	20			양성	80	0	140	0	
51001-110	CRC	F	10-FEB-2009	5 개의 미열색 슬라이드	12/3/2012		20	70	10	30	20		50	양성	100	80	130	200	
51001-111	CRC	M	16-SEP-2009	5 개의 미열색 슬라이드	12/7/2012			10											
58003-113	위	F	07-FEB-2011	5 개의 미열색 슬라이드	12/13/2012 2	100	0							음성	0	0	0	0	
58001-113	식도	F	06-JUN-2012	5 개의 미열색 슬라이드	12/21/2012 2			10	0					양성	100		100		
58002-128	채강	M	09-NOV-2011	1 개의 파라핀 블록	12/21/2012 2														
58002-130	채강	M	10-DEC-2008	1 개의 파라핀 블록	12/21/2012 2			50		50			100	양성	100	100	150	300	

[0578]

대상체 #	암 유형	성 별	수집일	표본 유형/개수	Rev'd Date	절단 & 세포질 염색(%)							양성/ 음성	양성 %	양성 %	H	H
						0 C A	1+ C A	2+ C A	3+ C A	3+ A							
58002-130	췌장	M	10-DEC-2008	1 개의 파라핀 블록	12/21/2012		50	50	25	75			양성	100	100	150	275
58002-130	췌장	M	10-DEC-2008	1 개의 파라핀 블록	12/21/2012		50	50		100			양성	100	100	150	300
58002-130	췌장	M	13-APR-2011	1 개의 파라핀 블록	12/21/2012		25	75	25	75			양성	100	100	175	275
58003-114	CRC	M	29-MAR-2010	5 개의 미염색 슬라이드	12/26/2012	25	50	25	25	50			양성	75	100	100	225
58003-117	CRC	F	20-MAY-2011	5 개의 미염색 슬라이드	12/28/2012	100	100	30					양성	100	0	130	0
58001-116	췌장	M	26-JAN-2006	5 개의 미염색 슬라이드	1/4/2013 & 1/18/2013 **	100	100						음성	0	0	0	0
58001-115	식도	M	14-DEC-2010	5 개의 미염색 슬라이드	1/9/2013	50	40	10		100			양성	50	100	60	300
58003-119	식도	M	27-DEC-2011	9 개의 미염색 슬라이드	1/14/2013	70	10	30	10	80			양성	30	90	30	260
58002-132	식도	M	23-NOV-2010	5 개의 미염색 슬라이드 & 1 개의 FFPE 블록	1/16/2013		50	40	30	30			양성	100	50	190	130
51001-112	위	M	26-JAN-2009	5 개의 미염색 슬라이드	1/16/2013	70	70	10	20	30			양성	30	30	50	90
58003-115	CRC	M	08-SEP-2009	5 개의 미염색 슬라이드	1/17/2013	20	80			100			양성	80	100	80	300
58003-	식도	M	15-NOV-	5 개의 미염색	1/25/2013	10	10	60	10	30	10		양성	90	90	120	240

[0579]

대상제 #	암 유형	성 별	수검일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	절단 & 세포질 염색(%)										양성/ 음성	양성 %	H	H
						0C	1+ A	1+ C	2+ A	2+ C	3+ A	3+ C							
120			2011	슬라이드															
51001-113	CRC	M	20-JUL-2009	5 개의 미염색 슬라이드	1/28/2013	50	50				100		양성	50	100	50	300		
51001-114	췌장	F	08-NOV-2007	5 개의 미염색 슬라이드	1/28/2013	80	70	20	20	10			양성	20	30	20	40		
58001-117	위	M	15-SEP-2012	5 개의 미염색 슬라이드	1/29/2013		80	90	10	10	10		양성	100	20	110	50		
58003-118	위	M	28-MAY-2010	5 개의 미염색 슬라이드	2/4/2013	100		10		40	50		양성	0	100	0	240		
58003-123	CRC	M	01-NOV-2011	5 개의 미염색 슬라이드	2/6/2013		30		70		100		양성	100	100	170	300		
58003-121	췌장	M	07-SEP-2012	5 개의 미염색 슬라이드	2/6/2013	100	95			5			양성	0	5	0	10		
58003-125	췌장	M	04-SEP-2012	5 개의 미염색 슬라이드	2/11/2013		10	10					양성	100	0	100	0		
58003-127	장	M	11-APR-2011	5 개의 미염색 슬라이드	2/11/2013		10				80		양성	100	80	100	240		
58002-135		F	19-DEC-2012	5 개의 미염색 슬라이드	2/14/2013	100	20	30		50			양성	0	80	0	130		
58001-119	위	M	29-OCT-2012	5 개의 미염색 슬라이드	2/15/2013	100	95			5			양성	0	5	0	10		
58001-120	CRC	F	22-MAY-2012	16 개의 미염색 슬라이드	2/15/2013	100	20			40			양성	0	80	0	200		
58003-126	CRC	M	29-DEC-2010	5 개의 미염색 슬라이드	2/18/2013	70	30				100		양성	30	100	30	300		
58003-	췌장	M	23-MAR-	5 개의 미염색	2/18/2013		90	10	10				양성	100	10	100	10		

[0580]

대상제 #	암 유형	성 별	수집일	표본 유형/개수	Rcv'd Date	점단 & 세포질 염색(%)							양성/ 음성	양성 %	양성 H	H
						0 C	0 A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C				
129			2012	슬라이드				0								
58003-131	CRC	M	10-MAY-2012	5개의 미염색 슬라이드	2/18/2013	100	0						음성	0	0	0
58002-133	췌장	M	03-MAR-2011	5개의 미염색 슬라이드	2/20/2013											
58002-133	췌장	M	03-MAR-2011	5개의 미염색 슬라이드	2/20/2013											
58003-122	CRC	M	24-MAR-2009	5개의 미염색 슬라이드	2/25/2013			90		10		100	양성	100	100	300
58003-128	췌장	M	21-DEC-2011	5개의 미염색 슬라이드	2/25/2013	100	0						음성	0	0	0
58001-121	CRC	F	22-JUN-2010	20개의 미염색 슬라이드	2/25/2013	100	90		10				양성	0	10	10
58001-115	식도	F	25-FEB-2011	5개의 미염색 슬라이드	2/25/2013	100	55		30		10	5	양성	0	45	0
58003-124	위	M	07-JUN-2012	5개의 미염색 슬라이드	2/28/2013		10	20		20		60	양성	100	0	240
58002-133	췌장	M	03-MAR-2011	10개의 미염색 슬라이드	2/28/2013											
58002-129	식도	M	20-MAR-2012	5개의 미염색 슬라이드	2/28/2013			70		30		100	양성	100	100	300
58002-129	식도	M	08-MAR-2012*	5개의 미염색 슬라이드	2/28/2013		70	80		20		30	양성	100	30	120
58002-137		F	03-OCT-2011	1개의 파라핀 블록	3/1/2013	20	0	40		30		10	양성	80	0	130

[0581]

표 32: 일차 및 전이성 결직장암 종양 표본에서의 GCC IHC 발현

표본 #	슬라이드 #	절단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성% 세포질	양성% 절단	H 세포질	H 절단
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
1A	1			20		80			100		양성	100	100	180	300
1B	2			80		20			100		양성	100	100	120	300
2A	3		50	100	20		20		10		양성	100	50	100	90
2B	4		100	60		40					양성	100	0	140	0
3A	5			20		80			100		양성	100	100	180	300
3B	6			80		20			100		양성	100	100	120	300
4A	7	50		50	50		20		30		양성	50	100	50	180
4B	8		50	100	20		30				양성	100	50	100	80
5A	9			80		20	20		80		양성	100	100	120	280
5B	10	50	40	30	20	20	20		20		양성	50	60	70	120
6A	11			80	10	20	30		60		양성	100	100	120	250
6B	12			50	10	50	20		70		양성	100	100	150	260
7A	13	30		50		20	20		80		양성	70	100	90	280
7B	14	30		50		20	20		80		양성	70	100	90	280
8A	15					100			100		양성	100	100	200	300
8B	16			50		50			100		양성	100	100	150	300
9A	17		100			50		50		고동결- 공포에 염색	양성	100	0	250	0

[0582]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)										코멘트	양성/음성	양성%	양성%	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포질	침단						
9B	18		60	100	20		20					양성	100	40	100	60	
10A	19			80		20				100		양성	100	100	120	300	
10B	20			50		50				100		양성	100	100	150	300	
11A	21		50	50	30		30			30		양성	50	90	50	180	
11B	22		50	50	20		10			10		양성	50	40	50	70	
12A	23			80		20	50			50		양성	100	100	120	250	
12B											고등갑-주로 공포에 염색- 소수의 내강 존재						
	24					20	10	30	90	50		양성	100	100	290	230	
13A	25		50	20	50	10		20		50		양성	50	80	50	200	
13B	26		80	100	10		10					양성	100	20	100	30	
14A											반지 세포 성분은 스코어링하지 않음						
	27			80		20				100		양성	100	100	120	300	
14B	28			50		50				100		양성	100	100	150	300	
15A	29		50	40	10	10	30			10		양성	50	50	60	100	
15B	31		50	100	50							양성	50	0	50	0	
16A	32		60	20	30	20	10	30		30	점액	양성	40	80	50	170	
16B	33			70		30				100		양성	100	100	130	300	

[0583]

표본 #	슬라이드 #	절단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%	양성% 세포질	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
17A	34			90		10			100		양성	100	100	110	300
17B	35	50	20	50	20		20		40		양성	50	80	50	180
18A	36			70	20	30	30		50		양성	100	100	130	230
18B	37	10	50	80	10	10	20		20		양성	90	50	100	110
19A	38			80		20			100		양성	100	100	120	300
19B	39	70	70	30			20		10	신경내분비	양성	30	30	30	70
20A	40	80	100	20							양성	20	0	20	0
20B	41	50	90	20		30	10				양성	50	10	80	20
21A	42	50		50					100		양성	50	100	50	300
21B	43	NET								종양의 증거 없음					
22A	44	60	10	30	10	10	20		60		양성	40	90	50	230
22B	45		10	100			10		80		양성	100	90	100	260
23A	46	50	10	50					90		양성	50	90	50	270
23B	47			70		30			100		양성	100	100	130	300
24A	48		10	80		20	40		50		양성	100	90	120	230
24B	49	80	40	10		10	30		30	소량의 종양만 존재	양성	20	60	30	150
25A	50	50	30	50	20		20		30		양성	50	70	50	150
25B	51			80		20			100		양성	100	100	120	300

[0584]

[0585]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)										코멘트	양성/음성	양성%		H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포질	침단						
26A	52			80		20	50		50			양성	100	100	120	250	
26B	53	Net									종양의 증거 없음						
27A	54	40	70	20	10	20	10	20	10	20		양성	60	30	120	60	
27B	55			60		20	30	20	70			양성	100	100	160	270	
28A	56			50		50			100			양성	100	100	150	300	
28B	57			30		50		20	100			양성	100	100	190	300	
29A	58			50		50			100			양성	100	100	150	300	
29B	59	50		40	20	10	30		50			양성	50	100	60	230	
30A	61	10		70		20	20		80			양성	90	100	110	280	
30B	62			50		50	50		50			양성	100	100	150	250	
31A	63					50		50	100			양성	100	100	250	300	
31B	64			50		50	50		50			양성	100	100	150	250	
32A	65			80		20			100			양성	100	100	120	300	
32B	66	50	50	50					50			양성	50	50	50	150	
33A	67			80		20	50		50			양성	100	100	120	250	
33B	68			20		80			100			양성	100	100	180	300	
34A	69			100			30		70			양성	100	100	100	270	
34B	70			100	20		40		40			양성	100	100	100	220	
35A	71			70		20		10	100			양성	100	100	140	300	

표본 #	슬라이드 #	첨단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%	양성% 세포질	H 세포질	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
35B	72			70		20		10	100		양성	100	100	140	300
36A	73			50	40	40	50	10	10		양성	100	100	160	170
36B	74			30	40	40	30	30	30		양성	100	100	200	190
37A	75			20	100	10	20		50		양성	100	80	100	200
37B	76		50	90					10		양성	50	10	50	30
38A	77		30	70			50		50		양성	70	100	70	250
38B	78		80	20					100		양성	20	100	20	300
39A	79			100			50		50		양성	100	100	100	250
39B	80			100					100		양성	100	100	100	300
40A	81			40		60	20		80		양성	100	100	160	280
40B	82	NET								종양의 증거 없음					
41A	83		20	60	80		10		10		양성	80	40	80	70
41B	84		50	40	50		20		20		양성	50	60	50	120
42A	85			10	80	10	20		40		양성	100	90	120	210
42B	86			10	80	10	20		50		양성	100	90	120	220
43A	87			10	30	30	50		30		양성	100	90	190	180
43B	88				50		40		10		양성	100	100	160	270
44A	89				80		20		100		양성	100	100	120	300
44B	91		60	100	30		10				양성	40	0	50	0

[0586]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%	양성%	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A						
45A	92			30		50		20	100		양성	100	100	190	300
45B	93									세포질에서 클지와 유사한 염색	양성	100	100	140	300
	94		90	10	10					양성	양성	10	10	10	10
46B	95		20	80			10		10		양성	80	20	80	50
47A	96		50	100	50					선종-종양 없음	양성	50	0	50	0
47B	97			40	80	20	20	20	20		양성	100	60	120	120
48A	98		30		70			20	80		양성	70	100	70	280
48B	99		90		10			20	80		양성	10	100	10	280
49A	100		30		40		30	30	70		양성	70	100	100	270
49B	101		30	70	50		20		30		양성	70	30	90	90
50A	102			10	90	30	10		60		양성	100	90	110	210
50B	103		100	70		10			20		양성	0	30	0	70
51A	104		50	80	50			20			양성	50	20	50	40
51B	105		NET							종양의 증거 없음					
52A	106		50	90	50			10			양성	50	10	50	20
52B	107		90	90	10	10					양성	10	10	10	10
53A	108			40	80	20	20	20	20		양성	100	60	120	120

[0587]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%		H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			세포질	침단		
53B	109	50	80	50	20						양성	50	20	50	20
54A	110		50	70	20	30	20		10		양성	100	50	130	90
54B	111		20	80		20	20		60		양성	100	80	120	220
55A	112	100	100								음성	0	0	0	0
55B	113	100	100								음성	0	0	0	0
56A	114	50	70	50	30						양성	50	30	50	30
56B	115	100	100								음성	0	0	0	0
57A	116	50	70	50	10		10		10		양성	50	30	50	60
57B	117		80	50		50	10		10	소량의 종양 존재	양성	100	20	150	50
58A	118	10		80	20	10	40		40		양성	90	100	100	220
58B	119		40	100	20		20		20	소량의 종양 존재	양성	100	60	100	120
59A	121			70		30	30		70		양성	100	100	130	270
59B	122			30		70			100		양성	100	100	170	300
60A	123	50	70	50	10		10		10		양성	50	30	50	60
60B	124	10	30	70	20	20	20		30		양성	90	70	110	150
61A	125	50		30		20	50		50		양성	50	100	70	250
61B	126	100			20		30		50		양성	0	100	0	230
62A	127		80	100			10		10		양성	100	20	100	50
62B	128		90	80		20	10				양성	100	10	120	20

[0588]

표본 #	슬라이드 #	첨단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%		H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			세포질	첨단		
63A	129	10	50	80		10	20		30		양성	90	50	100	130
63B	130		100	90		10					양성	100	0	110	0
64A	131		90	80		20	10				양성	100	10	120	20
64B	132		60	70	10	30	20		10		양성	100	40	130	80
65A	133	50	90	50			10				양성	50	10	50	20
65B	134	70	100	30						고등압 종양	양성	30	0	30	0
66A	135		30	80		20	50		20		양성	100	70	120	160
66B	136		100	100						소량의 종양 존재	양성	100	0	100	0
67A	137	10	20	80		10			80		양성	90	80	100	240
67B	138	30	20	70			40		40		양성	70	80	70	200
68A	139	20	90			20			10	공포 염색	양성	80	10	220	30
68B	140		100	70					30		양성	100	0	160	0
69A	141		40	20		80	30		30		양성	100	60	180	150
69B	142		20	20	20	50	30		30		양성	100	80	210	170
70A	143			50		50			100		양성	100	100	150	300
70B	144		10	40	30	40	30		30		양성	100	90	180	180
71A	145									소수의 종양 세포만 존재-스코어링할					

[0589]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)										코멘트	양성/음성	양성%	양성%	H	H
		0C	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A									
												수 없음					
71B	71-2	60	50	20		20	20					양성	40	50	60	130	130
72A	72-1											더 높은 등급- 침단에서 음성	양성	100	50	170	130
72B	72-2	100	100										음성	0	0	0	0
73A	73-1	20	80	80								양성	80	20	80	60	60
73B	73-2	40	50	40	10	10	20	10	20			양성	60	50	90	110	110
74A	74-1										100	공포 염색	양성	100	100	300	300
74B	74-2		20	50	10	50	30				40		양성	100	80	150	190
75A	75-1			70	30	30					70	양성	100	100	130	270	270
75B	75-2	10	50	90	10		20		20		20	양성	90	50	90	110	110
76A	76-1		10	60	10	40	20		20		60	양성	100	90	140	230	230
76B	76-2			50	10	50	30				60	양성	100	100	150	250	250
77A	77-1		20	90	20	10	20				40	양성	100	80	110	180	180
77B	77-2	10	20	90	10		20		20		50	양성	90	80	90	200	200
78A	78-1			100							100	양성	100	100	100	300	300
78B	78-2			100							100	양성	100	100	100	300	300
79A	79-1			80			20				100	양성	100	100	120	300	300
79B	79-2			50		50					100	양성	100	100	150	300	300

[0590]

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)										코멘트	양성/음성	양성%		H	H	
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A	세포질	침단							
80A	80-1	90		10						100		양성	10	100	10	300		
80B	80-2			20		50		30		100		양성	100	100	210	300		
81A	81-1					80		20	30		70		양성	100	100	120	270	
81B	81-2		10	90	10	10	20				60		양성	100	90	110	230	
82A	82-1					50					100		양성	100	100	150	300	
82B	82-2	20		80							100		양성	80	100	80	300	
83A	83-1	30		70	50		20				30		양성	70	100	70	180	
83B												세포질에서 플지와 유사한 염색						
83-2				80		20	20				80			양성	100	100	120	280
84A	84-1	80		20							100			양성	20	100	20	300
84B	84-2	100	60		20		10				10			양성	0	40	0	70
85A	85-1					100							양성	100	100	100	300	
85B	85-2	100									100		양성	0	100	0	300	
86A	86-1	10	40	80						10			양성	90	60	100	180	
86B	86-2			50		50				50			양성	100	100	150	300	
87A	87-1	10	10	80	20	10	20						양성	90	90	100	210	
87B	87-2	10	10	50	30	30	30	10			30		양성	90	90	140	180	
88A	88-1		30	80	20	20	20				30		양성	100	70	120	150	
88B	88-2		100	50		50							양성	100	0	150	0	
89A	89-1	100	100									신장 세포	음성	0	0	0	0	

[0592]

표본 #	슬라이드 #	첨단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%		H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A			세포질	첨단		
89B	89-2	100	100								음성	0	0	0	0
90A	90-1	50	100	20				30		핵장- 신경내분비	양성	50	0	110	0
90B	90-2		100			20		80		세포염색	양성	100	0	280	0
91A	91-1	100	100							복강- 지방육종	음성	0	0	0	0
91B	91-2	100	100								음성	0	0	0	0
92A	92-1	100	100							위 GIST	음성	0	0	0	0
92B	92-2	100	100								음성	0	0	0	0
93A										세포질에서 골지와 유사한 염색					
93-1	93-1	50	30		20			100		양성	양성	50	100	70	300
93-2	93-2	50	30	30	20			100		양성	양성	50	100	70	300
94-1	94-1	50	50					100		양성	양성	50	100	50	300
94-2	94-2		80		20			100		양성	양성	100	100	120	300
95-1	95-1		40		50			10	100	양성	양성	100	100	170	300
95-2	95-2	50	50						100	양성	양성	50	100	50	300
96-1	96-1				100				100	양성	양성	100	100	200	300
96-2	96-2	100	40		20		20		20	양성	양성	0	60	0	120
97-1	97-1	100	100							핵장	음성	0	0	0	0

표본 #	슬라이드 #	침단 & 세포질 염색(%)								코멘트	양성/음성	양성%	양성%	H	H
		0C	0A	1+ C	1+ A	2+ C	2+ A	3+ C	3+ A					세포질	침단
97B	97-2	100	100								음성	0	0	0	0
98A	98-1		100					100		자궁- 평활근육종	양성	100	0	300	0
98B	98-2		100					100			양성	100	0	300	0
99A	99-1	10	100					90		췌장- 신경내분비	양성	90	0	270	0
99B	99-2	100	100								음성	0	0	0	0
100A	100-1			100			50		50	위	양성	100	100	100	250
100B	100-2		20	60		40	40		40		양성	100	80	140	200

[0593]

[0594] GCC IHC 염색 결과의 요약

[0595] 실시예 3 및 4에 나타난 GCC IHC 염색 결과는 GCC가 결직장, 위, 소장 및 식도 종양을 포함하는 다양한 위장관 악성물뿐만 아니라 췌장 종양 및 폐 선암종, 폐 편평상피세포 암종, 평활근육종 및 횡문근육종을 포함하는 비-위장관 종양에서도 발현됨을 나타낸다. 다양한 종양 마이크로어레이 분석의 요약을 아래 표 33에 나타낸다.

[0596] [표 33]

[0597] TMA 분석은 GCC가 다양한 악성물에서 발현됨을 나타냄

종양 유형	평가 N	GCC 양성 염색%		
		침단/막	세포질	어느 하나가 양성인 %
결직장	298	76	90	95
위	154	33.1	63	79
췌장	221	15.4	43.4	63
식도	138	1.4	30	30
폐 선암종	81	2.4	25.6	44
폐 편평상피	74	0	10.8	10.8
명활근육종	18	0	44.4	44.4
횡문근육종	18	0	55.6	55.6

[0598]

[0599] *(양성%는 H 스코어 >10으로 정의됨)

[0600] 위장관 및 GI-관련 악성물의 인간 임상 표본도 아래 표 34에 요약된 바와 같이 다양한 수준의 GCC 발현에 대해 양성으로 평가되었다.

[0601] [표 34]

[0602] C26001 양성에서 스크리닝된 종양의 백분율

	N	임의 양성%	400 초과% (조합/집합 침단 및 세포질 H 스코어 상에서)
결직장	46	93.5	26.1
위	9	77.8	0
식도	14	78.6	7.1
췌장	22	81.8	22.7
소장	2	100	0
전체	93	86.0	

[0603]

[0604] (양성은 침단 또는 세포질에서 H 스코어 ≥ 10 으로 정의됨)

[0605] 표 34에 요약된 결과는 표 33에 요약된 TMA 스크리닝을 통해 관찰된 결과와 유사하다.

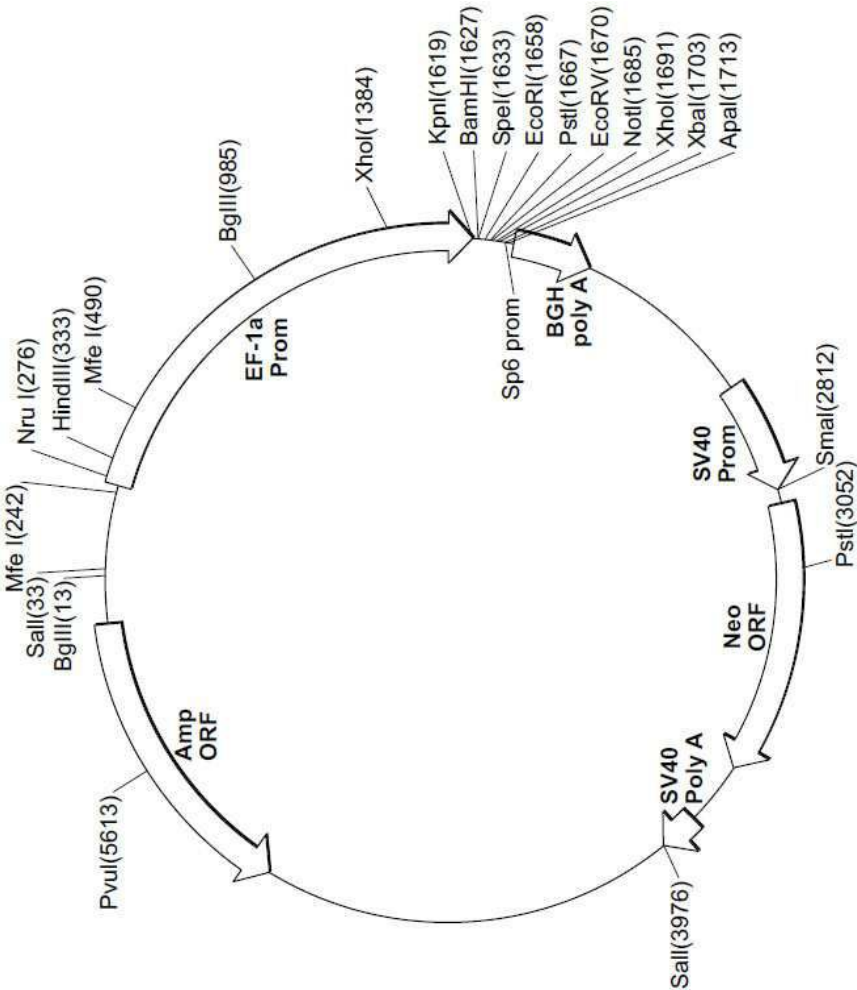
[0606] C26001 시험을 위한 환자 등록 스크리닝에서의 종양 유형에 걸친 GCC 발현의 조합/집합 H 스코어 분포를 도 2a-2d에 도시한다.

[0607] 스크리닝된 다양한 결직장, 위, 및 췌장 종양 마이크로어레이에서의 GCC 발현의 조합/집합 H 스코어 분포를 도 3a-3c에 도시한다.

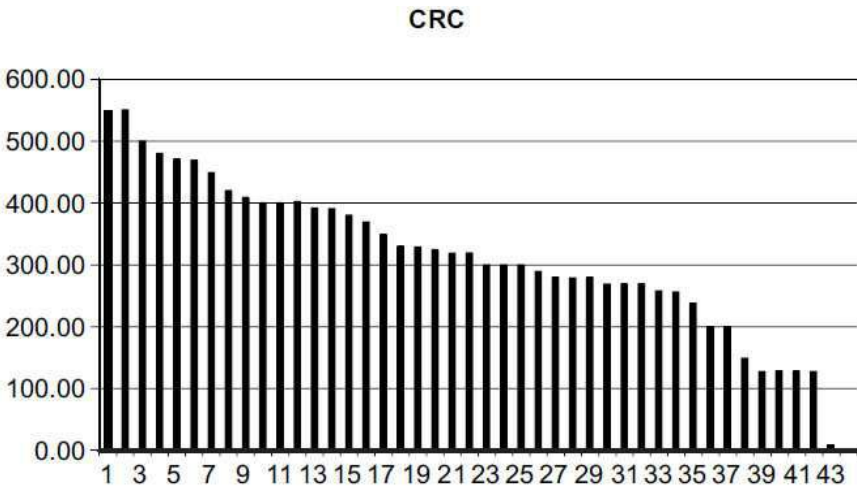
[0608] 본 발명을 이들의 제공되는 구현예를 참조하여 나타내고 기재하였지만, 당분야 숙련자에게는 첨부되는 특허청구 범위에 포괄되는 본 발명의 범위에서 벗어나지 않고 형태 및 상세내용에 다양한 변화가 수행될 수 있음이 이해될 것이다.

도면

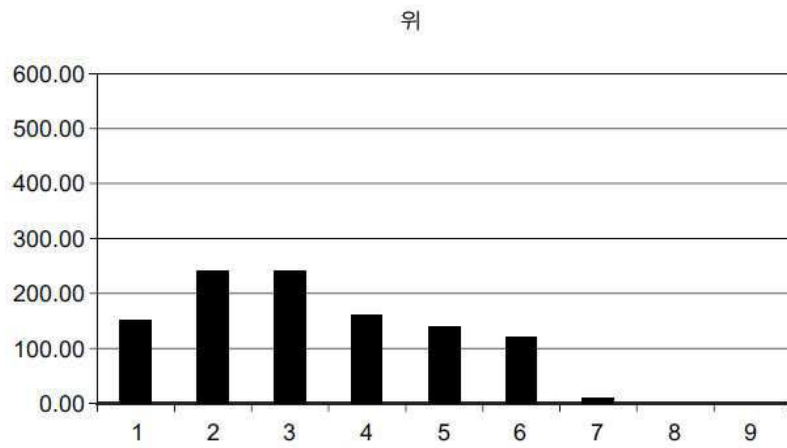
도면1



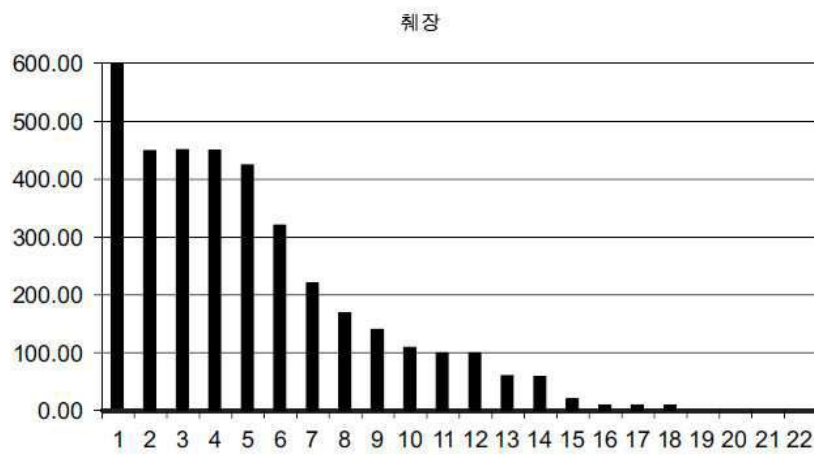
도면2a



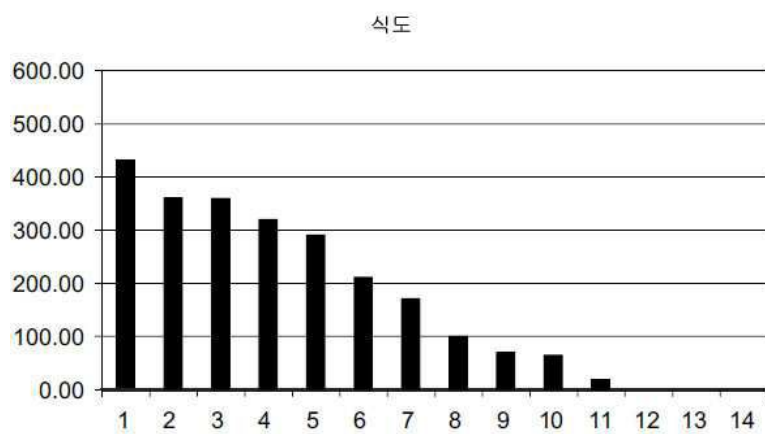
도면2b



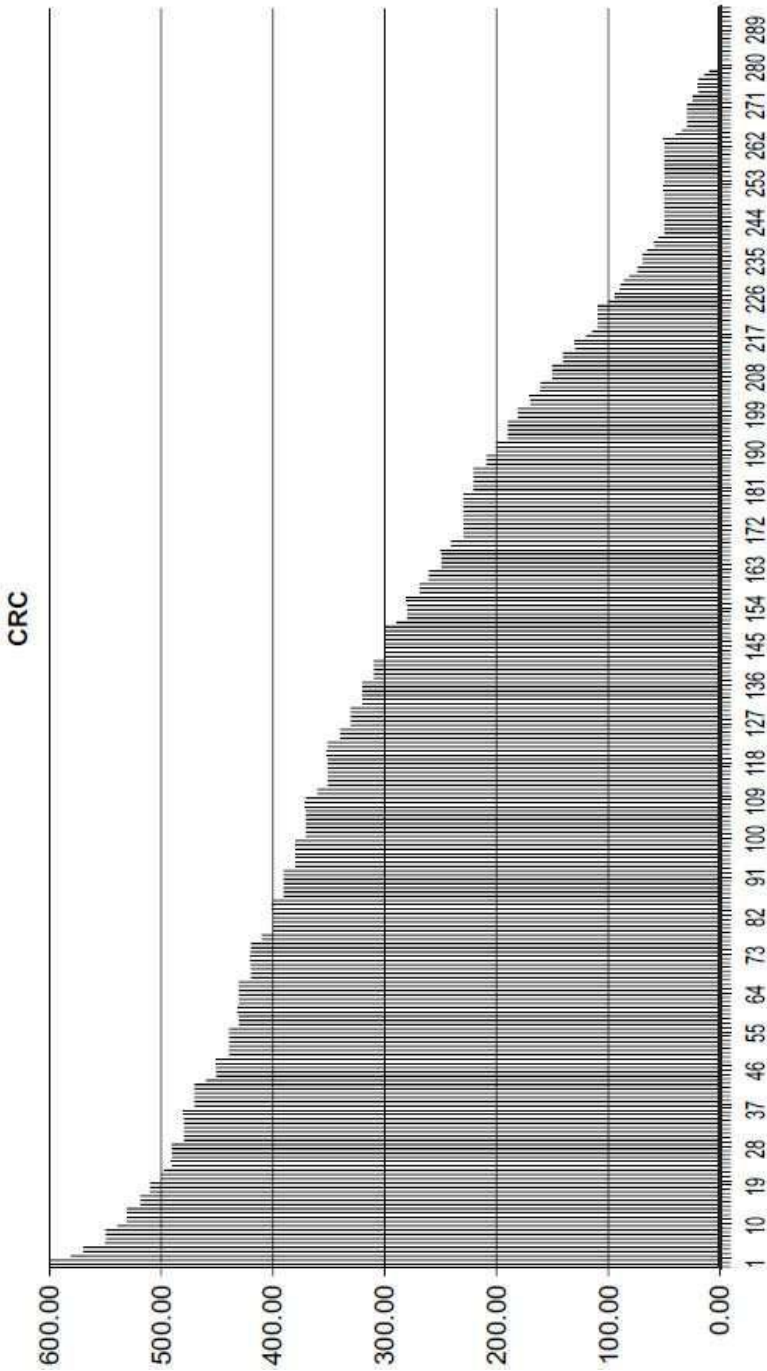
도면2c



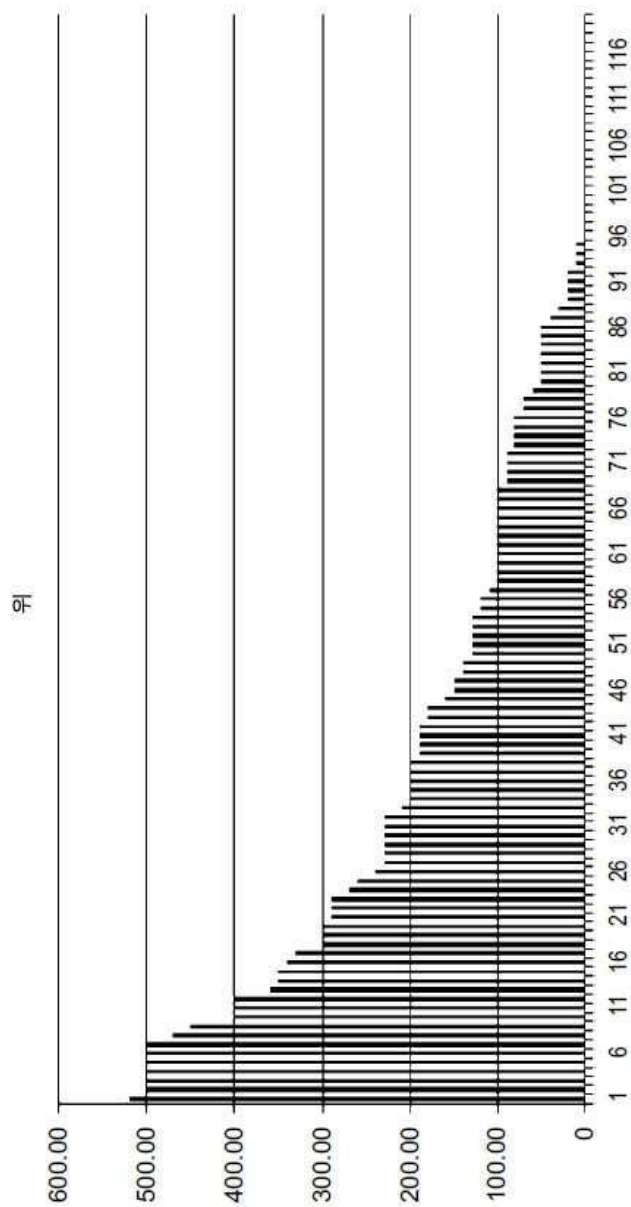
도면2d



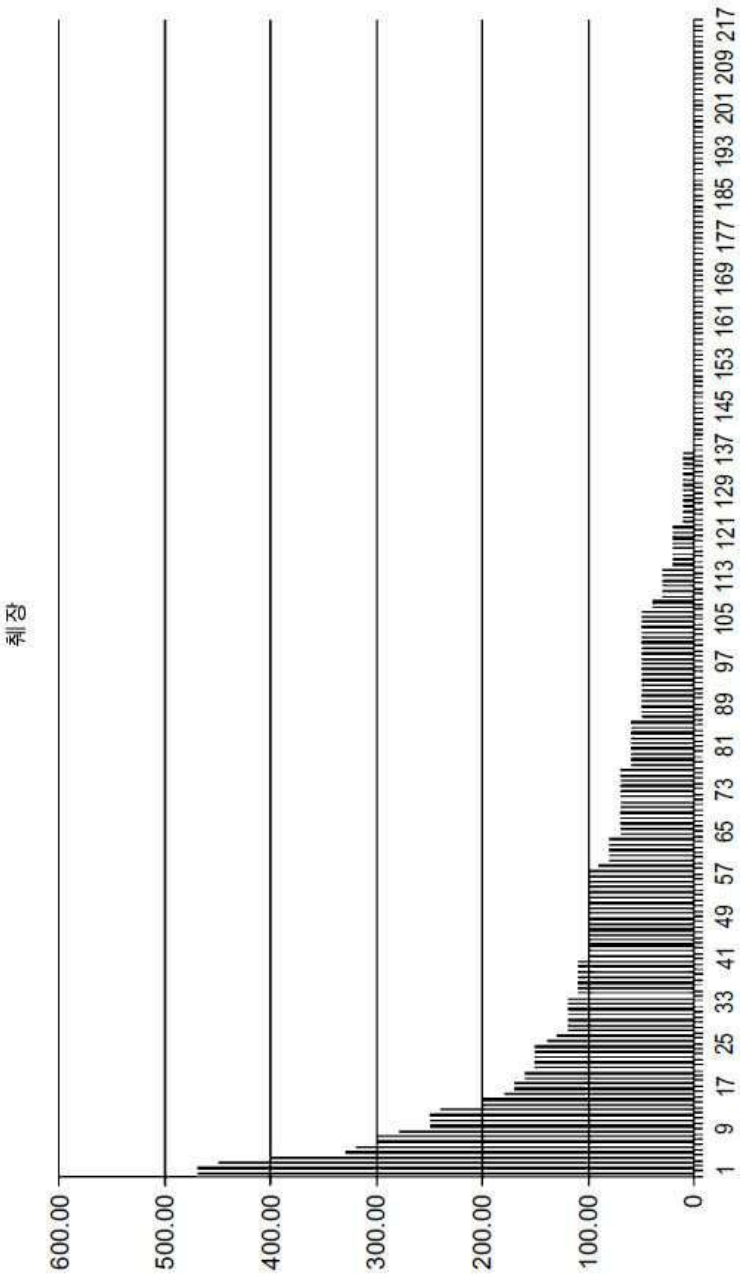
도면3a



도면3b



도면3c



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> ANTI-GCC ANTIBODY MOLECULES AND USE OF SAME TO TEST FOR SUSCEPTIBILITY TO GCC-TARGETED THERAPY
- <130> MPI12-018P1RNWOM
- <140> US 61/639,376
- <141> 2012-04-27
- <160> 89

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 2

<211> 3360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaccagagag aagcgtgggg aagagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg 60

gattccctgc ctccctagga gcccacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt 120

ctaactgat tggggtcatg aagacgttgc tgttggactt ggctttgtgg tcaactgctct 180

tccagcccg gtggctgtcc tttagtcccc aggtgagtca gaactgccac aatggcagct 240

atgaaatcag cgtcctgatg atgggcaact cagcctttgc agagcccctg aaaaacttgg 300

aagatgcggt gaatgagggg ctggaaatag tgagaggacg tctgcaaaat gctggcctaa 360

atgtgactgt gaacgtact ttcattgatt cggatggtct gattcataac tcaggcgact 420

gccggagtag cactgtgaa ggcctcgacc tactcaggaa aatttcaaat gcacaacgga 480

tgggctgtgt cctcataggg cctcatgta catactccac cttccagatg taccttgaca 540

cagaattgag ctaccccatg atctcagctg gaagttttgg attgtcatgt gactataaag 600

aaaccttaac caggctgatg tctccagcta gaaagttgat gtacttcttg gttaactttt 660

ggaaaaccaa cgatctgccc ttcaaaactt attcctggag cacttcgtat gtttacaaga 720

atggtacaga aactgaggac tgtttctggt accttaatgc tctggaggct agcgtttcct 780

atttctccca cgaactcggc ttttaaggtgg tgtaagaca agataaggag tttcaggata 840

tcttaatgga ccacaacagg aaaagcaatg tgattattat gtgtggtggt ccagagttec 900

tctacaagct gaagggtgac cgagcagtgg ctgaagacat tgtcattatt ctagtggatc 960

ttttcaatga ccagtacttt gaggacaatg tcacagcccc tgactatatg aaaaatgtcc 1020

ttgttctgac gctgtctcct gggaattccc ttctaaatag ctctttctcc aggaatctat	1080
caccaacaaa acgagacttt gctcttgcct atttgaatgg aatcctgctc ttggacata	1140
tgctgaagat atttcttgaa aatggagaaa atattaccac ccccaattt gctcatgctt	1200
tcaggaatct cacttttgaa gggtatgacg gtccagtac cttggatgac tggggggatg	1260
ttgacagtac catggtgctt ctgtatacct ctgtggacac caagaaatac aagggtcttt	1320
tgacctatga taccacgta aataagacct atcctgtgga tatgagcccc acattcactt	1380
ggaagaactc taaacttctt aatgatatta caggccgggg ccctcagatc ctgatgattg	1440
cagtcttcac ctcactgga gctgtggtgc tgctcctgct cgtcgtctc ctgatgctca	1500
gaaaatatag aaaagattat gaacttcgtc agaaaaaatg gtccacatt ctcctgaaa	1560
atatctttcc tctggagacc aatgagacca atcatgttag cctcaagatc gatgatgaca	1620
aaagacgaga tacaatccag agactacgac agtgcaaata cgacaaaaag cgagtgattc	1680
tcaaagatct caagcacaat gatggttaatt tcaactgaaa acagaagata gaattgaaca	1740
agttgcttca gattgactat tacaacctga ccaagttcta cggcacagtg aaacttgata	1800
ccatgatctt cggggtgata gaatactgtg agagaggatc cctccgggaa gttttaaatg	1860
acacaatttc ctacctgat ggcacattca tggattggga gtttaagatc tctgtcttgt	1920
atgacattgc taagggaatg tcatatctgc actccagtaa gacagaagtc catggctgctc	1980
tgaaatctac caactgcgta gtggacagta gaatggtggt gaagatcact gattttggt	2040
gcaattccat ttacctcca aaaaaggacc tgtggacagc tccagagcac ctccgccaag	2100
ccaacatctc tcagaaagga gatgtgtaca gctatgggat catcgcacag gagatcatcc	2160
tcgggaaaga aaccttctac actttgagct gtcgggaccg gaatgagaag attttcagag	2220
tggaaaattc caatggaatg aaaccttcc gccagattt attcttgaa acagcagagg	2280
aaaaagagct agaagtgtac ctacttgtaa aaaactgttg ggaggaagat ccagaaaaga	2340
gaccagattt caaaaaatt gagactacac ttccaagat atttggaatt tttcatgacc	2400
aaaaaaatga aagctatatg gatacttga tccgacgtct acagctatat tctcgaacc	2460
tggaacatct ggiagaggaa aggacacagc tglacaaggc agagaggac agggctgaca	2520
gacttaactt tatgttgctt ccaaggctag tggtaaagtc tctgaaggag aaaggctttg	2580
tggagccgga actatatgag gaagttacaa tctacttcag tgacattgta ggtttcacta	2640
ctatctgcaa atacagcacc cccatggaag tggaggacat gcttaatgac atctataaga	2700
gttttgacca cattgttgat catcatgatg tctacaaggt ggaaaccatc ggtgatgcgt	2760
acatggtggc tagtggtttg cctaagagaa atggcaatcg gcatgcaata gacattgcca	2820

```

agatggcctt ggaaatcctc agcttcattg ggacctttga gctggagcat cttcctggcc 2880

tcccaatatg gattcgcatg ggagttcact ctggtccttg tgctgctgga gttgtgggaa 2940
tcaagatgcc tcgttattgt ctatttgag atacgggtcaa cacagcctct aggatggaat 3000
ccactggcct ccctttgaga attcacgtga gtggctccac catagccatc ctgaagagaa 3060
ctgagtgcc gttcctttat gaagtgagag gaaaaacata cttaaaggga agaggaaatg 3120
agactaccta ctggctgact gggatgaagg accagaaatt caacctgcca accctccta 3180
ctgtggagaa tcaacagcgt ttgcaagcag aattttcaga catgattgcc aactctttac 3240
agaaaagaca ggcagcaggg ataagaagcc aaaaaccag acgggtagcc agctataaaa 3300

aaggcactct ggaatacttg cagctgaata ccacagacaa ggagagcacc tatttttaa 3360
<210> 3
<211> 1073
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1          5          10          15
Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
          20          25          30
Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
          35          40          45

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

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
          115          120          125
Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala

```

130	135	140	
Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu			
145	150	155	160
Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys			
	165	170	175
Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val			
	180	185	190
Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala			
	195	200	205
Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val			
	210	215	220
Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn			
225	230	235	240
Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr			
	245	250	255
Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu			
	260	265	270
Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro			
	275	280	285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser			
290	295	300	
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp			
305	310	315	320
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu			
	325	330	335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala			
	340	345	350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr			
	355	360	365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr			
370	375	380	

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415

Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
420 425 430

Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
435 440 445

Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
450 455 460

Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
465 470 475 480

Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
485 490 495

Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
500 505 510

Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
515 520 525

Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
530 535 540

Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
545 550 555 560

Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
565 570 575

Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
580 585 590

Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
595 600 605

Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
610 615 620

Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro

625	630	635	640
Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn			
	645	650	655
Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu			
	660	665	670
Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg			
	675	680	685
Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe			
	690	695	700
Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val			
	705	710	715
Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro			
	725	730	735
Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe			
	740	745	750
His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu			
	755	760	765
Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln			
	770	775	780
Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu			
	785	790	795
Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu			
	805	810	815
Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly			
	820	825	830
Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met			
	835	840	845
Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp			
	850	855	860
Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly			
	865	870	875
			880

Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
 885 890 895
 Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
 900 905 910
 Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
 915 920 925
 Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
 930 935 940

 Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
 945 950 955 960
 Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
 965 970 975
 Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
 980 985 990
 Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
 995 1000 1005

 Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
 1010 1015 1020
 Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
 1025 1030 1035
 Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
 1040 1045 1050
 Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
 1055 1060 1065

 Glu Ser Thr Tyr Phe
 1070
 <210> 4
 <211> 1380
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 4

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
tcagtgaagg agtccggggg aggcctcttc aagccaacgg ataccctgac actcacctgc	120
accgtctctg gattctccct cagtagtcat agaatgaact gggtccgcca gactccaggg	180
aaggggctgg aatggatcgc aatcattact cataatagta tcacatacta cgcgagctgg	240
gcgaaaagcc gatccacat caccagaaac accagcgaga acacggtgac tctgaaaatg	300
accagtctga cagccgcgga cacggccact tatttctgtg ccagagagga tagtatgggg	360
tattattttg acttgtgggg cccaggcacc ctggtcacca tctctcagg gcaacctaa	420
gtcccatcag tcttccact ggccccctgc tgcggggaca caccagctc cacggtgacc	480
ctgggctgcc tggtaaagg gtacctccg gagccagtga ccgtgacctg gaactcgggc	540
acctcacca atggggtacg caccttccg tccgtccggc agtctcagg cctctactcg	600
ctgagcagcg tggtagcgt gacctcaagc agccagcccg tcacctgaa cgtggccac	660
ccagccacca acaccaaagt ggacaagacc gttgcgcct cgacatgcag caagcccacg	720
tgcccacccc ctgaactcct ggggggaccg tctgtcttca tcttccccc aaaaccaag	780
gacacctca tgatctcag caccgccgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccag	840
gatgacccc aggtgcagtt cacatggtac ataaacaacg agcaggtgcg caccgcccg	900
ccgccgtac gggagcagca gttcaacagc acgatccgcg tggtcagcac cctcccac	960
gcgcaccagg actggctgag gggcaaggag ttcaagtca aagtcacaa caaggcactc	1020
ccggccccc tcagaaaaac catctccaaa gccagagggc agccctgga gccgaaggtc	1080
tacacatgg gccctcccg ggaggagctg agcagcaggt cggtcagcct gacctgcatg	1140
atcaacggct tctacccttc cgacatctcg gtggagtggg agaagaacgg gaaggcagag	1200
gacaactaca agaccacgcc ggccgtgtg gacagcgacg gctcctactt cctctacagc	1260
aagctctcag tgcccacgag tgagtggcag cggggcgacg tcttcacctg ctccgtgatg	1320
cacgaggcct tgcacaacca ctacacgcag aagtccatct cccgctctcc gggtaaatga	1380

<210> 5

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 5

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60

agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120

gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagc attagtaact ggtagcctg gtatcagcag 180

aaaccagggc agtctccaa gccctgatc tacagggcat ccactctggc atctggggtc 240

tcctgcgggt tcagaggcag tggatctggg acacagtca ctctcaccat cagtggcgtg 300

gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt cagcagactt atactaataa tcattctgat 360

aatggtttcg gcggaggagc cgaggtgggt gtcaaagggt atccagttgc acctactgtc 420

ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcacat cgtgtgtgtg 480

gcgaataaat actttccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac cacccaaaca 540

actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600

agcactctga cactgaccag cacacgtac aacagccaca aagagtacac ctgcagggtg 660

acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711

<210> 6

<211> 1377

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccaggtgcag 60

tcggtggagg agtccggggg tcgcttggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120

acagctctg gatccgacat cagtaactat gcaatatact gggtccgcca ggctccaggg 180

aaggggctgg aattcatcgg atatattagt tatggtaaaa gtatatacta cgcgagctgg 240

gcgaaaggcc ggttcgcat ctccaaaacc tcgtcgacca cggtggatct ggaaatcacc 300

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttttgtcca gagaggatag tgctacttat 360

agtcctaact tgtggggccc aggcacctg gtcaccgtct cctcagggca acctagggt 420

ccatcagtct tccactggc cccctgctgc ggggacacac ccagctccac ggtgacctg 480

ggctgcctgg tcaaagggtg cctcccgag ccagtgaccg tgacctggaa ctcgggcacc 540

ctcaccaatg gggtacgcac cttcccgctc gtccggcagt cctcaggcct ctactcgtg 600

agcagcgtgg tgagcgtgac ctcaagcagc cagcccgta cctgcaacgt ggccaccca 660

gccaccaaca ccaaagtga caagaccgtt gcgccctga catgcagcaa gccacgtgc 720

ccacccctg aactcctggg gggaccgtct gtcttcatct tcccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcacgcac ccccgaggtc acatgcgtgg tggaggacgt gagccaggat 840
gaccccgagg tgcagttcac atggtacata aacaacgagc aggtgcgcac cgcccgccg 900

ccgctacggg agcagcagtt caacagcacg atccgcgtgg tcagcaccct ccccatcgcg 960
caccaggact ggctgagggg caaggagttc aagtgcaaag tccacaacaa ggcactccg 1020
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc agagggcagc ccctggagcc gaaggctac 1080
accatgggcc ctccccgga ggagctgagc agcaggtcgg tcagcctgac ctgcatgac 1140
aacggcttct acccttcga catctcggtg gagtgggaga agaacgggaa ggcagaggac 1200
aactacaaga ccacgccgcg cgtgctggac agcgacggct cctacttct ctacagcaag 1260
ctctcagtgc ccacagatga gtggcagcgg ggcgacgtct tcacctgctc cgtgatgcac 1320

gaggccttgc acaaccacta cagcagaag tccatctccc gctctcggg taaatga 1377

<210> 7

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggt cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagt attaacacct acttagcctg gtatcagcag 180
aaaccagggc agcgtccaa gctcctgac tacaggcat ccactctggc atctggggtc 240

tcacgcggt tcaaaggcag tggatctggg acagagtca ctctacat cagcggcgtg 300
gagtgtgcc atgctgccac ttactactgt caacagggtt atagtataa taatcttgat 360
cgtgctttcg gcggagggac cgaggtggtg gtcacaggtg atccagttgc acctactgtc 420
ctcatcttc caccagctgc tgatcagggt gcaactggaa cagtcacat cgtgtgtgtg 480
gcgaataaat actttccga tgtcacgctc acctgggagg tggatggcac caccacaaca 540
actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg 660

accaggga cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgtta g 711

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr

1 5 10 15

Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser

20 25 30

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro

1 5 10 15

Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val

20 25

<210> 10

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 10

cagtcagtga aggagtccgg gggaggcctc ttcaagccaa cggatacct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggattctc cctcagtagt catagaatga actgggtccg ccagactcca 120

gggaaggggc tggaatggat cgcaatcatt actcataata gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaaa gccgatccac catcaccaga aacaccagcg agaacacggt gactctgaaa 240

atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acttatttct gtgccagaga ggatagtatg 300

gggtattatt ttgacttgtg gggcccaggc accctggtea ccatctctc a 351

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Arg

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser

50 55 60

Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Ser Glu Asn Thr Val Thr Leu Lys

65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg

85 90 95

Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Ile Ser Ser

115

<210> 12

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 12

gcctatgata tgaccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt aactggtag cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagtctc ccaagccct gatctacagg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcagag gcagtggatc tgggacacag ttcactctca ccatcagtg cgtggagtgt 240

gccgatgctg ccacttacta ctgtcagcag acttatacta ataactcatct tgataatggt 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

cagtcggtgg aggagtcgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60
tgcacagcct ctggatccga catcagtaac tatgcaatat cctgggtccg ccaggtcca 120
gggaaggggc tggaattcat cggatatatt agttatggta aaagtatata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccggttcgc catctccaaa acctcgtcga ccacggtgga tctggaaatc 240
accagtccga caaccgagga caggccacc tatttttgtg ccagagagga tagtgctact 300
tatagtecta acttgtgggg cccaggcacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 15

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

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Ser Asn Tyr Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ile Ser Tyr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

Arg Phe Ala Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Glu Ile

65 70 75 80

Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Glu

85 90 95

Asp Ser Ala Thr Tyr Ser Pro Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 16

gcctatgata tgaccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
atcaagtgcc aggccagtca gagtattaac acctacttag cctggatatca gcagaaacca 120
gggcagcgct ccaagctcct gatctacagg gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180
cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag ggttatagtt ataataatct tgatcgtgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaca 330

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 17

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Tyr Asn Asn

85 90 95

Leu Asp Arg Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr

100 105 110

<210> 18

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 18
agtcatagaa tgaac
<210> 19
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 19
atcattactc ataatagtat cacatactac gcgagctggg cgaaaagc
<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 20
gaggatagta tggggtatta ttttgacttg
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 21
Ser His Arg Met Asn
1 5
<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

15

48

30

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

peptide

<400> 22

Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 23

Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 24

caggccagtc agagcattag taactgggta gcc 33

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 25

agggcaccca ctctggcatc t 21

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 26

cagcagactt atactaataa tcattcttgat aatggt

36

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 27

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 28

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Asn His Leu Asp Asn Gly

1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 30

aactatgcaa tatcc 15

<210> 31

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 31

tatattagtt atggtaaaag tatatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 32

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 32

agtcctaact tg 12

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 33

Asn Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 34

Tyr Ile Ser Tyr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 35

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Ser Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 36

caggccagtc agagtattaa cacctactta gcc 33

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 37

agggcaccca ctctggcatc t 21

<210> 38

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 38

caacagggtt atagttataa taatcttgat cgtgct

36

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 39

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 40

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 41

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

1 5 10

<210> 42

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

 polypeptide

<400> 42

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

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

 20 25 30

Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser

 35 40 45

Ser His Arg Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu

 50 55 60

Trp Ile Ala Ile Ile Thr His Asn Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp

65 70 75 80

Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Ser Glu Asn Thr Val

 85 90 95

Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe

 100 105 110

Cys Ala Arg Glu Asp Ser Met Gly Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro

 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val

130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr

145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr

 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val

 180 185 190

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

195 200 205

Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn

210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr

225 230 235 240

Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

245 250 255

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

260 265 270

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr

275 280 285

Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg

290 295 300

Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile

305 310 315 320

Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His

325 330 335

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

340 345 350

Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu

355 360 365

Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe

370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu

385 390 395 400

Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr

405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly

420 425 430

Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

435 440 445
Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 43
<211> 236
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 43
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30
Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Gln Ser Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60
Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80
Ser Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Thr Tyr Thr Asn Asn His Leu Asp Asn Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro
130 135 140
Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val
145 150 155 160
Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly

165

170

175

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

180

185

190

Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr

195

200

205

Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Arg Val Thr Gln Gly Thr

210

215

220

Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys

225

230

235

<210> 44

<211

> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 44

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Ser

35

40

45

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

50

55

60

Phe Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Gly Lys Ser Ile Tyr Tyr Ala Ser Trp

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Ala Arg Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Ser Pro Asn Leu Trp Gly Pro Gly

115	120	125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe		
130	135	140
Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu		
145	150	155
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp		
165	170	175
Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg		
180	185	190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser		
195	200	205
Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr		
210	215	220
Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys		
225	230	235
Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
245	250	255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
260	265	270
Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp		
275	280	285
Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu		
290	295	300
Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala		
305	310	315
His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn		
325	330	335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly		
340	345	350
Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu		
355	360	365

Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 405 410 415
 Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp
 420 425 430

 Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 45
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 45
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser

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

 85 90 95
 Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

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

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

 210 215 220
 Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 225 230 235
 <210> 46
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30
 Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala

 35 40 45
 Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
 50 55 60
 Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
 65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
 85 90 95
 Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
 100 105 110
 Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
 115 120 125
 Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
 130 135 140
 Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
 145 150 155 160
 Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
 165 170 175
 Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
 180 185 190
 Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
 195 200 205
 Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
 210 215 220
 Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255
 Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu

325 330 335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr

355 360 365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380
Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400
Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415
Asn Ser Lys Leu

420

<210> 47

<

211> 2028

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 47

cgcgatccc tcaccatgaa gacgttgctg ttggacttgg ctttgtggtc actgctcttc 60
cagcccgggt ggctgtcctt tagttcccag gtgagtcaga actgccacaa tggcagctat 120
gaaatcagcg tctgatgat gggcaactca gcctttgcag agcccctgaa aaacttggaa 180
gatgcggtga atgaggggct ggaaatagt agaggacgtc tgcaaaatgc tggcctaaat 240
gtgactgtga acgctacttt catgtattcg gatggtctga ttcataactc aggcgactgc 300

cggagtagca cctgtgaagg cctcgacctc ctcaggaaaa tttcaaatgc acaacggatg 360
ggctgtgtcc tcatagggcc ctcatgtaca tactccacct tccagatgta ccttgacaca 420
gaattgagct acccatgat ctcagctgga agttttggat tgtcatgtga ctataaagaa 480
accttaacca ggctgatgtc tccagctaga aagttagatg acttcttggt taacttttgg 540
aaaaccaacg atctgccctt caaaacttat tcttgagca cttcgtatgt ttacaagaat 600
ggtacagaaa ctgaggactg tttctggtac cttaatgctc tggaggctag cgtttcctat 660

ttctcccacg aactcggtt taagtggtg ttaagacaag ataaggagtt tcaggatatt 720

ttaatggacc acaacaggaa aagcaatgtg attattatgt gtgggtgtcc agagttcctc 780

tacaagctga aggggtgaccg agcagtggct gaagacattg tcattattct agtggatctt 840

ttcaatgacc agtacttgga ggacaatgtc acagccctg actatatgaa aaatgtcctt 900

gttctgacgc tgtctctgg gaattccctt ctaaataagct ctttctccag gaattctatca 960

ccaacaaaac gagactttgc tcttgccctat ttgaatggaa tctgtctctt tggacatatg 1020

ctgaagatat ttcttgaaaa tggagaaaat attaccaccc ccaaatgtgc tcattgtttc 1080

aggaatctca cttttgaagg gtatgacggt ccagtgcctt tggatgactg gggggatgtt 1140

gacagtacca tgggtcttct gtatacctct gtggacacca agaaatacaa ggttcttttg 1200

acctatgata cccacgtaaa taagacctat cctgtggata tgagccccac attcacttgg 1260

aagaactcta aacttcttaa tgatattaca ggccggggcc ctacagccag agtgcccata 1320

acacagaacc cctgtcctcc actcaaagag gtcccccat gcgcagctcc agacctcgca 1380

ggtgcaccat ccgtcttcat ctccctcca aagatcaagg atgtactcat gatctcctg 1440

agccccatgg tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgaccaga cgtccagatc 1500

agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaccca tagagaggat 1560

tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt 1620

ggcaaggcat tcaaatgcaa ggtcaacaac agagccctcc catccccat cgagaaaacc 1680

atctcaaaac ccagagggcc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagca 1740

gaagagatga ctaagaaaga gttcagtctg acctgcatga tcacaggtt cttacctgcc 1800

gaaattgctg tggactggac cagcaatggg cgtacagagc aaaactaaa gaacaccgca 1860

acagtctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctcagagt acaaaagagc 1920

acttgggaaa gaggaagtct ttctgcctgc tcagtgttcc acgagggtct gcacaatcac 1980

cttacgacta agaccatctc ccggtctctg ggtaaataat ctagagca 2028

<210> 48

<211> 667

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 48

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln

1 5 10 15
 Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30
 Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala

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

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

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

 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Arg
 420 425 430
 Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro
 435 440 445
 Cys Ala Ala Pro Asp Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 450 455 460
 Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr
 465 470 475 480
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
 485 490 495
 Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His

500 505 510
 Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
 515 520 525
 Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Ala Phe Lys Cys Lys Val Asn
 530 535 540
 Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg

 545 550 555 560
 Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu
 565 570 575
 Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe
 580 585 590
 Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu
 595 600 605
 Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr

 610 615 620
 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly
 625 630 635 640
 Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu
 645 650 655
 Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
 660 665

<210> 49

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 49

cgcggtatccc tcaccatgaa gacgttgctg ttggacttgg c

41

<210> 50

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 50

tgggcactct gggctgaggg ccccggcctg taatatcatt ag 42

<210> 51

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 51

caggccgggg ccctcagccc agagtgccca taacacagaa cccctgtcc 49

<210> 52

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 52

tgctctagat tattaccca gagaccggga gatggtctta 40

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 53

acctgtggag ctcttactgg 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 54

catttcaggt gtcgtgagga

20

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 55

atttaggtga cactatag

18

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 56

gttttccag tcacgac

17

<210> 57

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

primer

<400> 57

aacagctatg accatg

16

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 58

Pro Arg Val Pro Ile Thr Glu Asn

1 5

<210> 59

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 59

Leu Leu Gly Gly

1

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 60

Leu Ala Gly Ala

1

<210> 61

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 61

Lys Lys Gly Gly

1

<210> 62

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 62

Lys Ala Gly Ala

1

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 63

Glu Phe Lys Cys Lys

1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 64

Ala Phe Lys Cys Lys

1 5

<210> 65

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 65

Phe Lys Cys Lys

1

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Arg Gly Pro Gln

1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 67

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 68

Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 69

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His

1 5 10

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 71

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 72

Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 73

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 73

ggttactact ggagc

15

<210> 74

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<400> 74

gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccgcgtccc tcaag 45

<210> 75

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 75

gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

<210> 76

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 76

agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc 33

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 77

ggtgcatcca ccaggccac t 21

<210> 78

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 78

cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

<210> 79

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 80

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 80

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

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

<210> 81

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 81

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat cgcgcagccc 120

ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcadc gtggaacac caacgacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300
 tacacctatg gtaactttga ccaactgggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 82

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 82

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agaaacttag cctggtatca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcggcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagttttatta ctgtcagcag tataaaacct ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaacg tggaaatcaa a 321

<210> 83

<211> 1444

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt 60

gtccactccc aggtgcagct acagcagtgg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc 120

ctgtccctca cctgcgtgt ctttgggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc 180

cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc 240

aacgacaacc cgtccctcaa gattcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag 300

ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga 360

gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaacct ggtcacctgc 420

agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 480

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccgc tgtcctacag 600

tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780

gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 840

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1080

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc 1200

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260

cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcacgt ggacaagagc 1320

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac 1380

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtactact 1440

agag 1444

<210> 84

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

165	170	175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
180	185	190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
195	200	205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
210	215	220
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
225	230	235
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
245	250	255
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
260	265	270
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
275	280	285
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
290	295	300
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
305	310	315
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
325	330	335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
340	345	350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
355	360	365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
370	375	380
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
385	390	395
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
405	410	415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys

465

<210> 85

<211> 722

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

gcggccgcct caccatggga tggagctgta tcatacctctt cttggttagca acagctacag 60

gtgtccactc cgaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg 120

aaagagccac cctctctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctggtatc 180

agcagaaacc tggccaggtt cccaggtctc tcatactatgg tgcattccacc agggccactg 240

gaatccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcgga 300

gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga 360

cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca 420

tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctcgtttgtg tgcctgctga 480

ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaggt ggataacgcc ctccaatcgg 540

gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca 600

gcacctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca 660

cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgtagtcta 720

ga 722

<210> 86

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

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

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

 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 87
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> N-term H

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(6)

<223> Disulfide bond between residues

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(10)

<223> Disulfide bond between residues

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(13)

<223> Disulfide bond between residues

<220><223> C-term OH

<400> 87

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
His tag

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(6)

<223> This sequence may encompass 2, 3, 4, 5, or 6 residues

<400> 88

His His His His His His

1 5

<210> 89

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 89

Gly Phe Leu Gly

1