



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0127886
(43) 공개일자 2009년12월14일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7019443
(22) 출원일자 2008년02월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2009년09월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/054792
(87) 국제공개번호 WO 2008/103953
국제공개일자 2008년08월28일
(30) 우선권주장
60/891,424 2007년02월23일 미국(US)

(71) 출원인

베일러 리서치 인스티튜트

미국 텍사스주 75204 달라스 스위트 125 라이브
오크 스트리트 3434

(72) 발명자

방쉐로 자끄 에프.

미국 텍사스주 75230 달라스 노스헤이븐 6730

오상곤

미국 메릴랜드주 21237 볼티모어 캐터햄 코트 45
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 수지상 세포 렉틴 유사 산화된 LDL 수용체-1(LOX-1)을 통한 사람 항원제시세포의 활성화

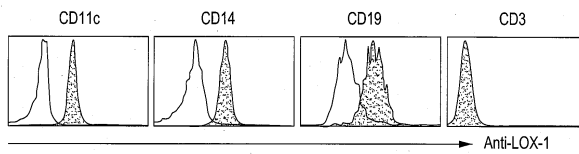
(57) 요약

본 발명은 면역 세포 상의 LOX-1 수용체를 표적화하는 조성물 및 방법, 및 항-LOX-1 항체의 용도를 포함한다.

대표도

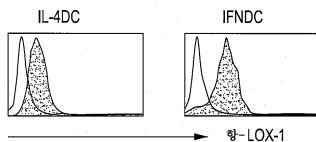
【도 1A】

PBMC

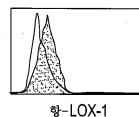


【도 1B】

시험관내 배양된 DC



c. 골수성 DC



(72) 발명자

즈라우스키 제라드

미국 텍사스주 76065 미들로디언 조단 레인 7620

즈라우스키 산드라

미국 텍사스주 76065 미들로디언 조단 레인 7620

리 다평

미국 텍사스주 75206 달라스 빌리지 벤드 #1004
6061

특허청구의 범위

청구항 1

항-LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편과 항원제시세포를 접촉시켜 상기 항원제시세포를 활성화시킴을 포함하여, LOX-1을 발현하는 항원제시세포에 의한 항원 제시의 효과를 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항원제시세포가, 분리된 수지상 세포, 말초혈액 단핵세포, 단핵구, 골수성 수지상 세포 및 이의 조합을 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 항원제시세포가 시험관내에서 GM-CSF 및 IL-4, 인터페론 알파, 항원 및 이의 조합과 함께 배양된, 분리된 수지상 세포, 말초혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 골수성 수지상 세포 및 이의 조합을 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 항원제시세포를 활성화시키는 단계를 추가로 포함하고, 이때 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편과의 접촉이 항원제시세포 상에서의 CD86 및 HLA-DR의 표면 발현을 증가시키는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 항원제시세포가, 수지상 세포를 활성화시키기 위해 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 수지상 세포를 포함하고, 여기서 활성화된 수지상 세포가 CD86, CD80 및 HLA-DR의 표면 발현을 증가시키는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 항원제시세포가, 수지상 세포를 활성화시키기 위해 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 수지상 세포를 포함하고, 여기서 활성화된 수지상 세포가 IL-12p40, MCP-1, IL-8, TNF α , IL-6, MIP-1a 및 IL-1b, 및 이의 조합의 분비를 증가시키는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 항원제시세포가 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 수지상 세포를 포함하고, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 CD40을 통한 시그널링과 함께 활성화를 증가시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 항원제시세포가 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 수지상 세포를 포함하고, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 수지상 세포의 공동자극성 활성을 증가시킨 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편과 접촉된 수지상 세포가 도 4의 유전자 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현 프로필에 변화가 있는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 클론 9D7-10-4, 8B4-10-2, 11C8-B7, 13B11-A8 및 이의 조합 중에서 선택되는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편에 의해 LOX-1 수용체를 통해 활성화된 수지상 세포가 B 세

포, T 세포 및 이의 조합을 활성화시키는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 코헤신/도커린(Cohesin/Dockerin) 쌍의 절반에 결합되는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 코헤신/도커린 쌍의 절반에 결합되고 상기 쌍의 다른 절반이 인터루킨, 전환성장인자(TGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 상피성장인자(EGF), 결합조직 활성화된 펩타이드(CTAP), 골원성 인자 및 이러한 성장인자들의 생물학적 활성 유사체, 단편 및 유도체, B/T-세포 분화인자, B/T-세포 성장인자, 분열촉진성 사이토카인, 화학주성 사이토카인 및 케모카인, 콜로니 자극인자, 혈관형성인자, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 등, 렙틴, 미오스타틴, 대식세포 자극 단백질, 혈소판 유래 성장인자, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, 사람 림프독소- β , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL-1 β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, 에리트로포이에틴, 엔도스타틴, 안지오스타틴, VEGF, 베타 전환성장인자(예컨대, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)를 포함하는 전환성장인자(TGF) 슈퍼유전자 패밀리; 골 형태형성 단백질(예컨대, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); 헤파린 결합 성장인자(섬유아세포 성장인자(FGF), 상피성장인자(EGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF)); 인히빈(예컨대, 인히빈 A, 인히빈 B); 성장분화인자(예컨대, GDF-1); 및 액티빈(예, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB) 중에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인에 결합되는 방법.

청구항 14

새로운 표면 마커를 발현하거나, 하나 이상의 사이토카인을 분비하거나 또는 이 둘 모두를 수행하는 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편을 발현한 하이브리도마.

청구항 15

제14항에 있어서, 하이브리도마가 클론 9D7-10-4, 8B4-10-2, 11C8-B7, 13B11-A8 및 이의 조합 중에서 선택되는 하이브리도마.

청구항 16

항원의 존재하에 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 수지상 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도시킴을 포함하고, LOX-1 활성화된 수지상 세포와 접촉된 B 세포가 항체 생산 증가, 사이토카인 분비, B 세포 활성화 표면 마커 발현 증가 및 이의 복합 작용을 하는, B 세포 면역 반응을 증강시키는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, B 세포가 IL-8, MIP-1a, IL-6, TNF α 및 이의 조합을 분비하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, B 세포가 형질세포를 포함하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 항-LOX-1 항체에 의해 활성화된 B 세포가 점막으로 귀소하는 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 활성화된 B 세포가 LOX-1을 발현하는 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, B 세포가 IgG, IgM, IgA 및 이의 조합의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 22

LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 B-세포 상의 LOX-1 수용체를 유도시킴을 포함하고, 상기 B 세포가 항체 생산을 증가시키는, B 세포 면역 반응을 증강시키는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, B 세포가 분비형 IL-8, MIP-1a, IL-6, TNF α 및 이의 조합의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, B 세포가 IgG, IgM, IgA 및 이의 조합의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, B 세포가 IgA1 및 IgA2의 생산을 증가시키는 방법.

청구항 26

LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 수지상 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도시키고 LOX-1 활성화된 수지상 세포에 T 세포를 접촉시켜 T 세포 활성화를 증강시킴을 포함하는, T 세포 활성화의 증강 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 수지상 세포가 GM-CSF 및 IL-4, 인터페론 알파, 항원 및 이의 조합과 추가로 접촉되는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, CD8⁺ T 세포의 활성화를 증가시키는 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, T 세포가 항-LOX-1 항체 또는 이의 단편으로 활성화된 수지상 세포에의 노출시 증식하는 방법.

청구항 30

포유동물 세포로부터 분비되고 항원이 결합되어 있는 항-LOX-1 면역글로불린 또는 이의 일부로서, 상기 면역글로불린이 항원을 항원제시세포로 표적화하고 상기 항원제시세포가 CD4⁺ 세포의 증식을 자극하는, 항-LOX-1 면역글로불린 또는 이의 일부.

청구항 31

제30항에 있어서, 항원 특이적 도메인이 전체 길이의 항체, 항체 가변영역 도메인, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)₂ 단편 및 Fv 단편, 및 Fabc 단편 및/또는 Fc 도메인의 일부를 보유하는 Fab 단편을 포함하는 면역글로불린.

청구항 32

제30항에 있어서, 면역글로불린 또는 이의 일부가 서열번호 1 내지 11 중 적어도 하나를 포함하는 면역글로불린.

청구항 33

LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 활성화된 수지상 세포를 포함하는 백신.

청구항 34

코헤신-도커린 결합쌍의 절반을 포함하는 하나 이상의 항원 운반체 도메인에 결합된 LOX-1 특이적 항체 결합 도메인을 포함하는 모듈식(modular) rAb 운반체.

청구항 35

제34항에 있어서, 항원 특이적 결합 도메인이 항체의 적어도 일부를 포함하는 rAb.

청구항 36

제34항에 있어서, 항원 특이적 결합 도메인이 코헤신-도커린 결합쌍의 절반과의 융합 단백질 내의 항체의 적어도 일부를 포함하는 rAb.

청구항 37

제34항에 있어서, 모듈식 rAb 운반체와 복합체를 형성하는 항원에 결합된 코헤신-도커린 결합쌍의 상보적 절반을 추가로 포함하는 rAb.

청구항 38

제34항에 있어서, 항원과 융합 단백질인 코헤신-도커린 결합쌍의 상보적 절반을 추가로 포함하는 rAb.

청구항 39

제34항에 있어서, 항원 특이적 도메인이 전체 길이의 항체, 항체 가변 영역 도메인, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)₂ 단편 및 Fv 단편, 및 Fabc 단편 및/또는 Fc 도메인의 일부를 보유하는 Fab 단편을 포함하는 rAb.

청구항 40

단독으로 또는 공동활성화제와 함께 면역 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도하는 제제의 용도로서, 이 조합이 치료학적 적용을 위해 항원제시세포를 활성화시키는 제제의 용도.

청구항 41

활성화제와 함께 또는 활성화제 없이 면역 세포 상의 하나 이상의 항원에 결합된 LOX-1 결합제의, 백신 제조를 위한 용도.

청구항 42

면역세포에서 발현된 LOX-1 이외의 다른 세포 표면 수용체를 통해 유도된 면역 반응을 증강시키기 위해 면역세포의 공동활성화제로서 사용되는 항-LOX-1 제제의 용도.

청구항 43

LOX-1 수용체를 통해 면역 세포에 결합하여 면역 세포를 활성화시킬 수 있는 항-LOX-1 항체 V-영역 서열의 용도.

청구항 44

LOX-1을 발현하는 병원성 세포 또는 조직의 환경에서, 또는 LOX-1을 통한 면역 세포의 부적절한 활성화로부터 발생하는 것으로 알려지거나 의심되는 질환의 환경에서 치료 목적으로 하나 이상의 독성 제제에 결합된 DC-LOX-1 결합제의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 면역 세포 활성화 분야에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 LOX-1 수용체를 통한 면역세포의 활성화 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

<2> 본 발명의 배경은 수지상 세포 활성화와 관련하여 설명하지만, 본 발명의 범주를 이것으로 제한하려는 것은 아니다.

<3> 수지상 세포는 가용성 및 세포간 시그널을 제공한 후, 병원균을 인식함으로써 선천면역 및 후천면역의 경계를 제어하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 DC의 기능은 주로 특별한 표면 수용체, '패턴 인식 수용체' (PRR), 예

컨대 가장 눈에 띄는 톨유사 수용체(TLR) 및 C형 렉틴 또는 렉틴 유사 수용체(LLR)의 발현에 의존적이다(2-4).

<4> 현재와 같은 패러다임에서, TLR의 주요 역할은 DC를 각성시켜 면역 반응의 개시를 위한 인터루킨 12(IL-12) 및 다른 염증성 사이토카인을 생산하도록 하는 것이다. C형 LLR은 대식세포 및 DC의 강력한 항원 포획 및 흡수 기전의 구성성분으로서 작용한다(2). 하지만, LLR은 TLR에 비해 세포 이동(5), 세포간 상호작용(6)을 비롯한 더욱 광범위한 생물학적 기능을 갖고 있을 수 있다. 이러한 LLR의 다양한 기능은 TLR과 달리 LLR은 자기 및 비자기(nonself)를 모두 인식할 수 있다는 사실때문일 수 있다. 하지만, 면역세포에서 발현된 다수의 LLR의 과잉을 비롯한 LLR의 복잡성은 각 LLR의 상세한 기능을 이해하는데 방해가 되는 주요 장애 중의 하나였다. 또한, 이러한 수용체들 대부분에 대한 천연 리간드는 아직 확인되지 않은 상태이다. 그럼에도 불구하고, 최근 연구들의 증거는 LLR이 TLR과 함께 미생물 감염동안 면역세포의 활성화에 기여하기도 한다는 것을 시사한다(7-15).

<5> **발명의 개요**

<6> 본 발명은 항사람 LOX-1 모노클로날 항체(mAb)를 표적화하고 사용하는 신규 조성물 및 방법을 포함하며, 이들의 생물학적 기능을 특성분석했다. 항-LOX-1 mAb 및 이의 단편은 면역세포의 표적화, 특성규명 및 활성화에 유용한 것으로 밝혀져 있다. 본 발명자들은 LOX-1이 사람 DC로 대용 항원의 내재화를 유도할 수 있지만, 본 발명은 일부는 항원 흡수(예, 백신집중)의 상황에서, 그 밖에는 DC, B 세포 및 단핵구 상의 이 수용체를 통해 시그널링을 유도할 수 있는 LOX-1 효과인자(단독으로 또는 다른 면역조절분자와 함께)의 고유한 작용을 통해서, 면역계의 특히 바람직한 변화를 가져오는 LOX-1의 신규 생물학적 활성을 확인하고 사용한다. 본 발명의 개시는 LOX-1을 보유하는 세포를 활성화시킬 수 있는 고유한 제제(agent)를 개발하는 방법을 밝히고, 뿐만 아니라 이러한 시그널을 수신한 세포에서 나타나는 변화의 효과가 면역계의 다른 세포에 미치는 작용을 제시한다. 이러한 효과(단독 효과 또는 다른 시그널과 함께(즉, 공동자극))는 백신집중의 환경에서 방어적 결과를 증대시키는지 또는 특정 질환 상태의 치료학적 결과를 나타내는지 잘 예측할 수 있게 해준다.

<7> LOX-1은 원래 내피세포 상의 산화된 저밀도 지질단백(OxLDL)의 수용체로서 확인되었고, 아테롬성경화증과 관련하여 집중 연구되어 있다. OxLDL 매개의 내피세포 활성화, 기능장애 및 손상은 초조기 아테롬성경화증의 진행에 주요 역할을 한다. 보고에 따르면, LOX-1은 OxLDL 시그널을 매개하고, 반응성 산소종 생산, NF-κB 활성화에 의해 매개되는 엔도텔린-1, MCP-1 및 부착 분자의 상승조절된 발현, 및 아포토시스를 유도한다. LOX-1은 D형 스캐빈저 수용체로 분류되지만, 포말세포 형성으로 이어지는 대식세포에 의한 OxLDL의 세포내이입은 주로 다른 스캐빈저 수용체에 의해 매개되는 것으로 밝혀져 있다. 보고에 따르면, LOX-1은 아포토시스성/늙은 세포를 내재화시킬 수 있다. 또한, LOX-1은 세균 성분을 인식할 수 있다. LOX-1 발현은 미성숙 골수성 DC뿐만 아니라 단핵구 유래의 DC, 단핵구, 대식세포 및 B 세포에서 관찰된 바 있다.

<8> DC는 단백질 항원을 교차 제시(cross-present)할 수 있다(Rock KL Immunol Rev. 2005 Oct; 207: 166-83). 생체 내에서, DC는 다수의 수용체를 이용하여 항원을 흡수하고 항원 펩타이드를 I형과 II형으로 제시한다. 특히, LOX-1은 항원을 효과적으로 흡수하고 항원 펩타이드를 교체 제시하는 '패턴 인식' 수용체이다(Delneste Y Immunity 2002 17: 353). 실제로, 마우스 모델에서 항-LOX-1과 접합된 항원은 항원공격을 받은 종양에 대해 면역 반응을 유도하기에 충분했다. 하지만, 세균 성분에 의한 활성화는 LOX-1(1) 단독으로는 관찰할 수 없었고, 공동국재성 TLR2가 활성화 시그널링에 관여하는 것으로 밝혀졌다. LOX-1에서 세포질 티로신 잔기 또는 막관통 양이온성 아미노산은 시그널링 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

<9> 본 발명은 항원제시세포를 활성화시킬 수 있는 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편을 분리하는 단계 및 활성화된 항원제시세포를 항-LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편과 접촉시키는 단계에 의해 LOX-1 발현 항원제시세포에 의한 항원 제시 효과를 증가시키는 조성물 및 방법을 포함한다. 항원제시세포는 분리된 수지상 세포, 말초혈액 단핵세포, 단핵구, 골수성 수지상 세포 및 이의 조합일 수 있다. 항원제시세포는 GM-CSF 및 IL-4, 인터페론 알파, 이의 항원 및 조합과 함께 시험관내에서 배양된, 분리된 수지상 세포, 말초혈액 단핵세포, 단핵구, B 세포, 골수성 수지상 세포 및 이의 조합일 수 있다. 또한, 이 방법은 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 항원제시세포를 활성화시키는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편과의 접촉은 항원제시세포 상에서 CD86 및 HLA-DR의 표면 발현을 증가시킨다. 예를 들어, 항원제시세포는 수지상 세포를 활성화시키기 위해 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편, GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉시킨 수지상 세포일 수 있고, 여기서 활성화된 수지상 세포는 CD86, CD80 및 HLA-DR의 표면 발현을 증가시킨다. 다른 예로, 항원제시세포는 수지상 세포를 활성화시키기 위해 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편, GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉시킨 수지상 세포일 수 있고, 여기서 활성화된 수지상 세포는 IL-12p40, MCP-1, IL-8, TNFα, IL-6, MIP-1a 및 IL-1b 및 이의 조합의 분비를 증가시키고, 및/또는 CD40을 통한 시그널링과 관련되어 활성화를 증

가시킬 수 있다. 또한, 항원제시세포는 GM-CSF 및 IL-4 또는 인터페론 알파와 접촉된 수지상 세포를 포함하고 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편은 수지상 세포의 공동자극 활성을 증가시킨 것으로 밝혀져 있다. 본 발명의 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편에 노출 시에 발현 프로필이 변화하는 유전자의 구체예로는 도 4에 제시된 하나 이상의 유전자를 포함한다. LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편의 비제한적 예는 클론 9D7-10-4, 8B4-10-2, 11C8-B7, 13B11-A8 및 이의 조합 중에서 선택될 수 있다. LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편에 의해 LOX-1을 통해 활성화된 수지상 세포는 B 세포, T 세포 및 이의 조합을 활성화시킬 수 있다.

<10> 또한, 본 발명은 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편이 코헤신/도커린(Cohesin/Dockerin) 쌍의 절반에 결합된 재조합 항체(rAb)를 포함한다. rAb의 일부인 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편은 코헤신/도커린 쌍의 절반에 결합될 수 있고 이 쌍의 나머지 절반은 인터루킨, 전환성장인자(TGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 상피성장인자(EGF), 결합조직 활성화된 췌타이드(CTAP), 골원성 인자 및 이러한 성장인자들의 생물학적 활성 유사체, 단편 및 유도체, B/T-세포 분화인자, B/T-세포 성장인자, 분열촉진성 사이토카인, 화학주성 사이토카인 및 케모카인, 콜로니 자극인자, 혈관형성인자, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 등, 랩틴, 미오스타틴, 대식세포 자극 단백질, 혈소판 유래 성장인자, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, 사람 림프독소- β , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL-1 β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, 에리트로포이에틴, 엔도스타틴, 안지오스타틴, VEGF, 베타 전환성장인자(예컨대, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)를 포함하는 전환성장인자(TGF) 슈퍼유전자 패밀리를; 골 형태형성 단백질(예컨대, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); 헤파린 결합 성장인자(섬유아세포 성장인자(FGF), 상피성장인자(EGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF)); 인히빈(예컨대, 인히빈 A, 인히빈 B); 성장분화인자(예컨대, GDF-1); 및 액티빈(예, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB) 중에서 선택되는 하나 이상의 사이토카인에 결합될 수 있다.

<11> 또한, 본 발명은 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편을 발현하는 하이브리도마를 포함하고, 여기서 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편은 항원제시세포를 활성화시켜 새로운 표면 마커를 발현시키거나, 하나 이상의 사이토카인을 분비시키거나 또는 이 둘 모두를 나타낸다. 하이브리도마의 비제한적 예로는 클론 9D7-10-4, 8B4-10-2, 11C8-B7, 13B11-A8 및 이의 조합을 포함한다.

<12> 또한, 본 발명은 항원의 존재 하에 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 수지상 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도하여 B 세포 면역 반응을 증강시키는 방법을 포함하며, 여기서 LOX-1 활성화된 수지상 세포와 접촉된 B 세포는 항체 생산을 증가시키고, 사이토카인을 분비하며, B 세포 활성화 표면 마커 발현을 증가시키고, 이의 복합 효과를 나타낸다. 본 발명에 의해 활성화된 B 세포는 IL-8, MIP-1a, IL-6, TNF α 및 이의 조합을 분비할 수 있고, 형질세포일 수 있으며, LOX-1을 발현하도록 B 세포를 활성화시킬 수 있고/있거나 IgG, IgM, IgA 및 이의 조합의 생산이 증가하도록 B 세포를 유도할 수 있다.

<13> 다른 방법으로, 본 발명은 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 B 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도하여 B 세포 면역 반응을 증강시키는 것을 포함하고, 여기서 B 세포는 항체 생산, 분비형 IL-8, MIP-1a, IL-6, TNF α 및 이의 조합을 증가시키고/시키거나 IgG, IgM, IgA 및 이의 조합의 생산을 증가시킨다.

<14> 또한, 본 발명은 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편으로 수지상 세포 상의 LOX-1 수용체를 유도하고, LOX-1 활성화된 수지상 세포에 대해 T 세포를 접촉시켜, T 세포 활성화를 증강시키는, T 세포 활성화의 증강방법을 포함한다. 수지상 세포는 GM-CSF 및 IL-4, 인터페론 알파, 항원 및 이의 조합과 접촉시킬 수도 있고, CD8+ T 세포의 활성화를 유도한다. 한 구체예로서, T 세포는 항-LOX-1 항체 또는 이의 단편에 의해 활성화된 수지상 세포에 노출된 후 증식한다.

<15> 또한, 본 발명은 포유동물 세포로부터 분비된 항-LOX-1 면역글로불린 또는 이의 일부, 및 이 면역글로불린에 결합된 항원을 포함하고, 여기서 면역글로불린은 항원제시세포에 대한 항원을 표적으로 삼는다. 면역글로불린은 전체 길이의 항체, 항체 가변영역 도메인, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)2 단편 및 Fv 단편, 및 Fabc 단편 및/또는 Fc 도메인의 일부를 보유한 Fab 단편일 수 있다. 이 항체 또는 이의 단편은 LOX-1 특이적 항체 또는 이의 단편에 의해 활성화된 수지상 세포를 포함하는 백신을 제조하는 데에도 사용될 수 있다.

<16> 또한, 본 발명은 치료학적 용도를 위해 항원제시세포를 활성화시키는 조합인, LOX-1 수용체를 단독으로 또는 공동활성화제와 함께 면역 세포에 유도시키는 제제의 용도; 백신의 제조에 사용되는, 면역 세포 상의 하나 이상의 항원에 활성화제와 함께 또는 활성화제 없이 결합된 LOX-1 결합제의 용도; 면역세포에서 발현된 LOX-1 외에 다른 세포 표면 수용체를 통해 유도되는 면역 반응을 증강시키기 위한 면역세포의 공동활성화제로서 항-LOX-1 제제의 용도; LOX-1 수용체를 통해 면역 세포에 결합하여 면역 세포를 활성화시킬 수 있는 항-LOX-1 항체 V-영역

서열의 용도 및/또는 LOX-1을 발현하는 병원성 세포 또는 조직의 상황에서, 또는 LOX-1을 통한 면역 세포의 부적절한 활성화로부터 발생하는 것으로 알려지거나 의심되는 질환의 상황에서 치료를 목적으로 하는, 하나 이상의 독성 제제에 결합된 DC-LOX-1 결합제의 용도를 포함한다.

<17> 또한, 본 발명은 코헤신-도커린 결합 쌍의 절반을 포함하는 하나 이상의 항원 운반체 도메인에 결합된 LOX-1 특이적 항체 결합 도메인을 포함하는 모듈식(modular) rAb 운반체를 포함한다. rAb의 항원 특이적 결합 도메인은 항체의 적어도 일부 및/또는 코헤신-도커린 결합쌍의 절반과 융합 단백질로 항체의 적어도 일부를 포함할 수 있다. rAb는 모듈식 rAb 운반체와 복합체를 형성하는 항원에 결합된 코헤신-도커린 결합쌍의 상보적 절반, 또는 항원과 융합 단백질인 코헤신-도커린 결합쌍의 상보적 절반을 포함할 수도 있다. 항원 특이적 도메인은 전체 길이의 항체, 항체 가변 영역 도메인, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)₂ 단편 및 Fv 단편, 및 Fc 단편 및/또는 Fc 도메인의 일부를 보유하는 Fab 단편일 수 있다.

발명의 상세한 설명

<39> 본 발명의 다양한 구체예의 제조 및 사용은 이하에 상세하게 논의되지만, 본 발명은 다양한 특정 상황에서 구현될 수 있는 다수의 적용가능한 발명의 사상을 제공한다. 본 명세서에서 논의되는 구체예는 단지 본 발명을 제조 및 사용하기 위한 특정 방식을 예시하는 것일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

<40> 본 발명의 이해를 촉진하기 위해, 다수 용어들의 정의는 다음과 같다. 본 명세서에 정의된 용어들은 본 발명이 관련된 분야의 당업자라면 일반적으로 이해하고 있는 의미를 갖는 것이다. 단수적 표현은 단일 실체만을 언급하려는 것이 아니며, 예증을 위해 사용될 수 있는 특정 예의 일반적인 클래스를 포함하는 것이다. 본 발명의 용어들은 본 발명의 구체예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 청구의 범위에 개략된 것을 제외하고는, 그 용어들의 사용이 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

<41> 본 명세서에 사용된 바와 같이, "모듈식 rAb 운반체"란 용어는 단일 재조합 모노클로날 항체(mAb), 여기서는 항-LOX-1 모노클로날 항체에 다양한 항원, 활성화 단백질 또는 다른 항체의 조절 모듈식 첨가(controlled modular addition)를 제공하도록 유전자조작된 재조합 항체 시스템을 나타내기 위해 사용되고 있다. rAb는 표준 하이브리도마 기술, 재조합 항체 디스플레이, 사람화된 모노클로날 항체 등을 사용하여 제조한 모노클로날 항체일 수 있다. 모듈식 rAb 운반체는 다중 항원 및/또는 항원과 활성화 사이토카인을 수지상 세포(DC)로, 예컨대 표적화(사람 수지상 세포 수용체와 같은 내재화 수용체에 대한 하나의 1차 재조합 항체를 통해)하는데 사용될 수 있다. 또한, 모듈식 rAb 운반체는 2개의 다른 재조합 mAb를 말단끼리 조절된 일정한 방식으로 결합시키는 데에도 사용될 수 있다.

<42> "모듈식 rAb 운반체"의 항원결합부는 하나 이상의 가변 도메인, 하나 이상의 가변 도메인과 제1 불변 도메인, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)₂ 단편 및 Fv 단편, Fc 단편 및/또는 동족 모듈식 결합 부분이 아미노산 서열에 첨가되고/되거나 결합된 Fc 도메인 부분을 보유한 Fab 단편일 수 있다. 모듈식 rAb 운반체에 사용되는 항체는 임의의 이소타입 또는 클래스, 서브클래스이거나, 임의의 근원(동물 및/또는 재조합체) 유래인 것일 수 있다.

<43> 한가지 비제한적 예로서, 모듈식 rAb 운반체는, 유전자조작된 재조합 mAb인 경우에, 특이적인 분명한 단백질 복합체를 제조하기 위해 하나 이상의 모듈식 코헤신-도커린 단백질 도메인을 보유하도록 유전자조작되어 있다. 상기 mAb는 mAb의 항원 결합 도메인으로부터 카복시 쪽에 하나 이상의 모듈식 코헤신-도커린 단백질을 포함하는 융합 단백질의 일부이다. 코헤신-도커린 단백질 도메인은 심지어 화학적 가교제 및/또는 이항화 결합을 사용해서 해독후 부착시킬 수도 있다.

<44> 본 명세서에 사용된 "항원"이란 용어는 항원의 수용체 중에서 체액 및/또는 세포 면역 반응을 개시시킬 수 있는 분자를 의미한다. 항원은 본 발명과 2가지 다른 상황에서 사용될 수 있다: rAb의 항체 또는 다른 항원 인식 도메인에 대한 표적으로서, 또는 모듈식 rAb 운반체에 대한 도커린/코헤신-분자 보체의 일부로서 rAb에 의해 세포 또는 표적으로 및/또는 세포 또는 표적 내로 운반되는 분자로서 사용될 수 있다. 항원은 일반적으로 백신접종이 유리한 치료일 수 있는 질환을 유도하는 물질이다. 항원이 MHC 상에 제시될 때, 이 펩타이드는 종종 약 8개 내지 약 25개의 아미노산을 갖는다. 항원은 임의의 종류의 생물학적 분자, 예컨대 단순 중간 대사산물, 당, 지질 및 호르몬 뿐만 아니라 거대분자, 예컨대 복합 탄수화물, 인지질, 핵산 및 단백질을 포함한다. 항원의 일반적인 범주에는 바이러스 항원, 세균 항원, 진균 항원, 원핵생물 및 다른 기생충 항원, 종양 항원, 자가면역 질환, 알러지 및 이식편 거부와 관여하는 항원, 및 여타 수많은 항원이 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

- <45> 모달식 rAb 운반체는 임의의 수의 활성 제제, 예컨대 항생제, 항감염제, 항바이러스제, 항종양제, 해열제, 진통제, 소염제, 골다공증 치료제, 효소, 사이토카인, 항응고제, 다당류, 콜라겐, 세포 및 이러한 활성 제제 중 2 이상의 조합을 운반할 수 있다. 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 항생제의 예로는 테트라사이클린, 아미노글리코사이드, 페니실린, 세팔로스포린, 설펜아미드 약물, 클로람페니콜 소듐 석시네이트, 에리트로마이신, 반코마이신, 린코마이신, 클린다마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 아만티딘, 이독수리딘, p-아미노 살리실산, 이소니아지드, 리팜핀, 악티노마이신 D, 미트라마이신, 다우노마이신, 아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 프록아바진, 이미다졸 카르복사미드 등을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <46> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 항종양제의 예로는 독소루비신, 다우노루비신, 탁솔, 메토트렉세이트 등을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 해열제 및 진통제의 예로는 아스피린, Motrin®, Ibuprofen®, 나프로신(naprosyn), 아세트아미노펜 등이 포함된다.
- <47> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 소염제의 예로는 NSAIDS, 아스피린, 스테로이드, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 프레드니솔론, 디클로페낙 Na 등이 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <48> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한, 골다공증을 치료하는 치료제 및 골과 골격에 작용하는 다른 인자들의 예로는 칼슘, 알렌드로네이트, 골 GLa 펩타이드, 부갑상선 호르몬 및 이의 활성 단편, 히스톤 H4 관련 골 형성 및 증식 펩타이드 및 이의 돌연변이, 유도체 및 유사체를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다.
- <49> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 효소 및 효소 보조인자의 예로는 판크레아제, L-아스파라기나제, 히알우로니다제, 키모트립신, 트립신, tPA, 스트렙토키나제, 우로키나제, 판크레아틴, 콜라게나제, 트립시노겐, 키모트립시노겐, 플라스미노겐, 스트렙토키나제, 아테닐 사이클라제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 등이 포함되지만, 이에 국한되지는 않는다.
- <50> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 사이토카인의 예로는 인터루킨, 전환성장인자(TGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 상피성장인자(EGF), 결합조직 활성화된 펩타이드(CTAP), 골원성 인자 및 이러한 성장인자들의 생물학적 활성 유사체, 단편 및 유도체를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 사이토카인은 B/T-세포 분화인자, B/T-세포 성장인자, 분열촉진성 사이토카인, 화학주성 사이토카인, 콜로니 자극인자, 혈관형성인자, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18 등, 랩틴, 미오스타틴, 대식세포 자극 단백질, 혈소판 유래 성장인자, TNF- α , TNF- β , NGF, CD40L, CD137L/4-1BBL, 사람 림프독소- β , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, PDGF, IL-1 α , IL-1 β , IP-10, PF4, GRO, 9E3, 에리트로포이에틴, 엔도스타틴, 안지오스타틴, VEGF 또는 이의 임의의 단편 또는 조합일 수 있다. 다른 사이토카인으로는 베타 전환성장인자(예컨대, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3)를 포함하는 전환성장인자(TGF) 슈퍼유전자 패밀리의 구성원; 골 형태형성 단백질(예컨대, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9); 해파린 결합 성장인자(섬유아세포 성장인자(FGF), 상피성장인자(EGF), 혈소판 유래 성장인자(PDGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF)); 인히빈(예컨대, 인히빈 A, 인히빈 B); 성장분화인자(예컨대, GDF-1); 및 액티빈(예, 액티빈 A, 액티빈 B, 액티빈 AB)을 포함한다.
- <51> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 성장인자의 예로는 자연 또는 천연 근원, 예컨대 포유동물 세포에서 분리할 수 있는 성장 인자, 또는 재조합 DNA 기술 또는 다양한 화학적 방법으로 합성 제조할 수 있는 성장인자를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 이러한 인자의 유사체, 단편 또는 유도체도, 자연 분자의 생물학적 활성을 적어도 일부 나타낸다면 사용할 수 있다. 예를 들어, 유사체는 부위 특이적 돌연변이유발 또는 다른 유전자조작 기술에 의해 변경된 유전자를 발현시켜 제조할 수 있다.
- <52> 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 항응고제의 예로는 와파린, 헤파린, 히루딘 및 이의 유사물이 포함되지만, 이에 국한되지는 않는다. 본 발명을 사용하여 전달하기 위한 면역계 작용 인자의 예로는 염증 및 악성 신생물을 제어하는 인자, 및 화학주성 펩타이드 및 브래디키닌과 같은 감염성 미생물을 공격하는 인자를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <53> 바이러스 항원의 예로는, 예컨대 레트로바이러스 항원, 예를 들어 gag, pol 및 env 유전자의 유전자 산물, Nef 단백질, 역전사효소 및 다른 HIV 성분과 같은 사람 면역결핍바이러스(HIV) 항원 유래의 레트로바이러스 항원; B형 간염 바이러스의 S, M 및 L 단백질과 같은 간염 바이러스 항원, B형 간염 바이러스의 전구-S 항원, 및 다른 간염, 예컨대 A형, B형 및 C형 간염 바이러스 성분, 예컨대 C형 간염 바이러스 RNA; 인플루엔자 바이러스 항원, 예컨대 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 및 다른 인플루엔자 바이러스 성분; 홍역 바이러스 항원, 예컨대 홍역 바이러스 융합 단백질 및 다른 홍역 바이러스 성분; 풍진 바이러스 항원, 예컨대 E1 및 E2 단백질, 및 다른 풍진

바이러스 성분; 로타바이러스 항원, 예컨대 VP7sc 및 다른 로타바이러스 성분; 사이토메갈로바이러스 항원, 예컨대 엔벨로프 당단백질 B 및 다른 사이토메갈로바이러스 항원 성분; 호흡기 세포융합 바이러스, 예컨대 RSV 융합 단백질, M2 단백질 및 다른 호흡기 세포융합 바이러스 항원 성분; 헤르페스 단순 바이러스 항원, 예컨대 조기발현 단백질, 당단백질 D 및 여타 헤르페스 단순 바이러스 항원 성분; 수두대상포진 바이러스 항원, 예컨대 gpI, gpII, 및 다른 수두대상포진 바이러스 항원 성분; 일본 뇌염 바이러스 항원, 예컨대 단백질 E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A, 80% E 및 다른 일본 뇌염 바이러스 항원 성분; 광견병 바이러스 항원, 예컨대 광견병 당단백질, 광견병 핵단백질 및 여타 광견병 바이러스 항원 성분을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 바이러스 항원의 다른 예에 대해서는 문헌[Fundamental Virology, Second Edition, eds. Fields, B. N. and Knipe, D. M. (Raven Press, New York, 1991)]을 참조한다.

<54> 본 발명의 rAb-DC/DC-항원 백신을 사용하여 전달할 수 있는 항원성 표적으로는, 바이러스 항원, 세균 항원, 진균 항원 또는 기생충 항원과 같은 항원을 암호화하는 유전자를 포함한다. 바이러스로는 피코나바이러스, 코로나 바이러스, 토가바이러스, 플라비바이러스, 랩도바이러스, 파라믹소바이러스, 오르토믹소바이러스, 부니아바이러스, 아레나바이러스, 레오바이러스, 레트로바이러스, 파필로마바이러스, 파르보바이러스, 헤르페스바이러스, 폭스바이러스, 헤파드나바이러스 및 해면상 바이러스를 포함한다. 다른 바이러스 표적으로는 인플루엔자, 헤르페스 단순바이러스 1 및 2, 홍역, 뎅기, 마마, 폴리오 또는 HIV를 포함한다. 병원균으로는 파동편모충, 촌충, 회충, 연충, 말라리아를 포함한다. 중앙 마커, 예컨대 태아 항원 또는 전립선 특이적 항원은 이러한 방식으로 표적화될 수 있다. 다른 예로는 HIV env 단백질 및 B형 간염 표면 항원을 포함한다. 백신접종을 위한 본 발명에 따른 백신의 투여는, 강한 면역 반응이 필요할 수 있어 돌연변이유전자를 장기간 발현할 수 있도록 백신 결합 항원이 충분히 비면역원성일 필요가 있을 수 있다. 일부 경우에는 개체의 백신접종을 단지 드물게, 예컨대 매년 또는 2년마다 필요로 할 수 있고, 감염 물질에 대해 장기간 면역학적 보호를 제공할 수 있다. 백신에 사용되고 궁극적으로 본 발명에 항원으로서 사용되는 유기체, 알러지항원 및 핵산 및 아미노산 서열의 구체예는 미국 특허 6,541,011, 여기에 참고인용된 관련 부분, 특히 본 발명에 사용될 수 있는 유기체와 구체적 서열을 매치하는 표에서 찾아볼 수 있다.

<55> 본 명세서에 개시된 rAb 백신에 사용되는 세균 항원으로는, 예컨대 백일해 독소, 사상 헤마글루티닌, 퍼택틴, FIM2, FIM3, 아테닐레이트 사이클라제 및 다른 백일해균 항원 성분; 디프테리아균 항원, 예컨대 디프테리아 독소 또는 유독소 및 다른 디프테리아균 항원 성분; 과상풍균 항원, 예컨대 과상풍 독소 또는 유독소 및 다른 과상풍균 항원 성분; 스트렙토코커스균 항원, 예컨대 M 단백질 및 다른 스트렙토코커스균 항원 성분; 그람 음성 바실러스균 항원, 예컨대 지질다당류 및 다른 그람음성균 항원 성분, 결핵균 항원, 예컨대 마이콜산, 열충격 단백질 65(HSP65), 30kDa 주요 분비 단백질, 항원 85A 및 다른 마이코박테리아 항원 성분; 헬리코박터 파일로리균 항원 성분; 폐렴균 항원, 예컨대 뉴모라이신, 폐렴균 협막 다당류 및 다른 폐렴균 항원 성분; 헤모필러스 인플루엔자균 항원, 예컨대 협막 다당류 및 다른 헤모필러스 인플루엔자균 항원 성분; 탄저균 항원, 예컨대 탄저 예방 항원 및 다른 탄저균 항원 성분; 리케치아균 항원, 예컨대 rompA 및 다른 리케치아균 항원 성분을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에 기술된 세균 항원에는 임의의 다른 세균, 마이코박테리아, 마이코플라즈마, 리케치아 또는 클라미디아 항원이 포함된다. 또한, 부분 또는 전체 병원균은 헤모필러스 인플루엔자; 열대열원충; 수막염균; 폐렴연쇄구균; 임균; 살모넬라 혈청형 티피; 시겔라; 비브리오 콜레라; 뎅기열; 뇌염; 일본 뇌염; 라임병; 페스트균; 서부나일강 바이러스; 황색열; 야토병; 간염(바이러스, 세균); RSV(호흡기 합포체 바이러스); HPIV 1 및 HPIV 3; 아데노바이러스; 천연두; 알러지 및 암일 수 있다.

<56> 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되는 진균 항원에는 칸디다 진균 항원 성분; 히스토플라스마 진균 항원, 예컨대 열충격 단백질 60(HSP60) 및 다른 히스토플라스마 진균 항원 성분; 크립토코커스 진균 항원, 예컨대 협막 다당류 및 다른 크립토코커스 진균 항원 성분; 콕시디오테스 진균 항원, 예컨대 구상체 항원 및 다른 콕시디오테스 진균 항원 성분; 및 백신 진균 항원, 예컨대 트리코피틴 및 다른 콕시디오테스 진균 항원 성분이 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

<57> 원핵생물 및 다른 기생충 항원의 예에는, 플라스모듐 팔시파럼 항원, 예컨대 분열소체 표면 항원, 포자소체 표면 항원, 포자소체 항원, 생식세포/생식자 표면 항원, 혈액기(blood-stage) 항원 pf155/RESA 및 다른 플라스모디아 항원 성분; 톡소플라스마 항원, 예컨대 SAG-1, p30 및 다른 톡소플라스마 항원 성분; 주혈흡충 항원, 예컨대 글루타치온-S-트랜스퍼라제, 파라미오신 및 다른 주혈흡충 항원 성분; 큰 리슈만편모충 및 다른 리슈만편모충 항원, 예컨대 gp63, 리포포스포글리칸 및 이의 관련 단백질 및 다른 리슈만편모충 항원 성분; 및 크루스파동편모충 항원, 예컨대 75-77kDa 항원, 56kDa 항원 및 다른 파동편모충 항원 성분을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

- <58> 본 발명의 rAb를 사용하여 표적화될 수 있는 항원은 일반적으로 내재화 가능성, 면역세포 특이성 수준, 표적화된 면역세포 종류, 면역세포 성숙도 및/또는 활성화 수준 등을 비롯한 다수의 요인을 기초로 하여 선택할 수 있다. 수지상 세포를 위한 세포 표면 마커의 예로는 MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, B7-2, CD18, CD29, CD31, CD43, CD44, CD45, CD54, CD58, CD83, CD86, CMRF-44, CMRF-56, DCIR 및/또는 DECTIN-1 등이 포함되지만, 이에 국한되지 않고; 몇몇 경우에는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD 19, CD20, CD56 및/또는 CD57의 부재를 포함하기도 한다. 항원제시세포를 위한 세포 표면 마커의 예로는 MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, CD40, CD45, B7-1, B7-2, IFN- γ 수용체 및 IL-2 수용체, ICAM-1 및/또는 Fc γ 수용체를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. T 세포를 위한 세포 표면 마커의 예로는 CD3, CD4, CD8, CD 14, CD20, CD11b, CD16, CD45 및 HLA-DR을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <59> 전달을 위한 세포 표면 상의 표적 항원은 통상 종양 조직 세포의 세포 표면, 세포질, 핵, 소기관 등에서 유래되는 종양 항원의 특징적인 것을 포함한다. 본 발명의 항체 부분에 대한 종양 표적의 예로는 백혈병 및 림프종과 같은 혈액암, 성상세포종 또는 아교모세포종, 흑색종, 유방암, 폐암, 두경부암, 위암 또는 결장암과 같은 위장암, 간암, 췌장암, 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 질암, 고환암, 전립선암 또는 음경암과 같은 비뇨생식암, 골암, 혈관암, 또는 입술, 비강인두, 인두 및 구강, 식도, 직장, 담낭, 담도계, 후두, 폐 및 기관지, 방광, 신장, 뇌 및 신경계의 다른 부분의 암, 갑상선암, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 다발골수종 및 백혈병을 포함하되, 이에 국한되는 것은 아니다.
- <60> 본 발명을 사용하여 항원 제시를 위해 면역 세포에 단독으로 또는 복합적으로 전달될 수 있는 항원의 예로는 종양 단백질, 예컨대 돌연변이된 종양유전자; 종양과 관련이 있는 바이러스 단백질; 및 종양 미신 및 당지질을 포함한다. 이러한 항원은 앞에서 언급한 바이러스 클래스의 것일 수 있는 종양과 관련이 있는 바이러스 단백질일 수 있다. 특정 항원은 종양의 특징을 나타내거나(한 서브세트는 종양 전구체 세포에 의해 일반적으로 발현되지 않는 단백질이다) 또는 종양 전구체 세포에서 보통 발현되지만, 종양의 특징적인 돌연변이를 보유하는 단백질일 수 있다. 다른 항원으로는 종양 항원을 유발하는 유전자의 돌연변이와 같이, 변경된 활성 또는 세포하 분포를 보유하는 정상 단백질의 돌연변이 변형체(들)를 포함한다.
- <61> 종양 항원의 구체적인 비제한적 예로는 다음을 포함한다: CEA, 전립선 특이적 항원(PSA), HER-2/neu, BAGE, GAGE, MAGE 1-4, 6 및 12, MUC(뮤신)(예, MUC-1, MUC-2 등), GM2 및 GD2 강글리오사이드, ras, myc, 티로시나제, MART(흑색종 항원), Pme1 17(gp100), GnT-V 인트론 V 서열(N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 V 인트론 V 서열), 전립선 Ca psm, PRAME(흑색종 항원), β -카테닌, MUM-1-B(흑색종 편재성 돌연변이 유전자 산물), GAGE(흑색종 항원) 1, BAGE(흑색종 항원) 2-10, c-ERB2(Her2/neu), EBNA(엡스타인-바르 바이러스 핵 항원) 1-6, gp75, 사람 유두종 바이러스(HPV) E6 및 E7, p53, 폐내성단백질(LRP), Bcl-2 및 Ki-67. 또한, 면역원성 분자는 SLE 또는 MG와 같이 병리가 주로 관련 표적 기관, 조직 또는 세포에 의해 발현되는 분자에 특이적인 항체의 활성으로 인해 일어나는 자가면역 질환의 개시 및/또는 전파에 관여하는 자가항원일 수 있다. 이러한 질환에서는 관련 자가항원에 대한 진행성 항체 매개(즉, Th2형)의 면역 반응을 세포(즉, Th1형) 면역 반응으로 유도하는 것이 바람직할 수 있다. 또는, 관련 자가면역 질환에 걸리지 않았지만 걸리기 쉬울 것으로 의심되는 피검체에서, 적당한 자가항원에 대한 Th1 반응을 예방학적으로 유도하여 자가항원에 대한 Th2 반응의 개시를 차단하거나 Th2 반응의 수준을 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 당해의 자가항원으로는 (a) SLE와 관련하여, 스미스(Smith) 단백질, RNP 리보핵단백질, 및 SS-A 및 SS-B 단백질; 및 (b) MG와 관련하여, 아세틸콜린 수용체를 포함하되, 이에 국한되는 것은 아니다. 1 이상의 자가면역 반응의 유형에 관여하는 여타 수많은 항원의 예로는, 예컨대 황체형성 호르몬, 여포자극호르몬, 테스토스테론, 성장호르몬, 프로락틴 및 여타 호르몬을 포함한다.
- <62> 자가면역 질환, 알러지 및 이식거부에 관여하는 항원은 본 발명의 조성물 및 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 자가면역 질환 또는 장애 중 어느 하나 또는 그 이상에 관여하는 항원은 본 발명에 사용될 수 있다: 당뇨병, 진성당뇨병, 관절염(예, 류마티스성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 골관절염, 건선 관절염), 다발성경화증, 중증근무력증, 진신흡반루푸스, 자가면역 갑상선염, 피부염(예, 아토피 피부염 및 습진 피부염), 건선, 쇼그렌 증후군, 예컨대 쇼그렌 증후군에 이차적인 건조각막결막염, 원형탈모증, 절지동물물립증 반응으로 인한 알러지 반응, 크론병, 아파타레양, 홍채염, 결막염, 각막결막염, 췌양성 결장염, 천식, 알러지 천식, 피부홍반루푸스, 공피증, 질염, 직장염, 약물 발진, 나병전환반응, 나병결절홍반, 자가면역 포도막염, 알러지성 뇌척수염, 급성 괴사출혈뇌병증, 특발성 양측 진행성 감각신경성 난청, 재생불량빈혈, 진정적혈구계빈혈, 특발성 혈소판감소증, 다발연골염, 베게너 육아종증, 만성 활성 간염, 스티븐스-존슨 증후군, 특발성 스프루, 편평태선, 크론병, 그레이브스 눈병증, 사르코이드증, 원발담즙성간경변, 뒤포도막염,

및 사이질폐섬유증. 자가면역 질환에 관여하는 항원의 예로는 글루탐산 탈카르복실효소 65(GAD 65), 천연 DNA, 미엘린 염기성 단백질, 미엘린 단백질지질 단백질, 아세틸콜린 수용체 성분, 티로글로불린 및 갑상선 자극 호르몬(TSH) 수용체를 포함한다. 알러지에 관여하는 항원의 예로는 일본 삼목 화분 항원, 돼지풀 화분 항원, 호밀풀 화분 항원과 같은 화분 항원, 먼지진드기 항원 및 고양이 항원과 같은 동물 유래 항원, 조직적합 항원, 및 페니실린 및 여타 치료 약물을 포함한다. 이식편 거부에 관여하는 항원의 예로는 심장, 폐, 간, 췌장, 신장 및 신경 이식편 성분과 같은, 이식편 수용체로 이식되어야 하는 이식편의 항원성 성분을 포함한다. 항원은 자가면역 질환의 치료에 유용한 변경된 펩타이드 리간드일 수 있다.

<63> 본 명세서에 사용된, "에피토프(들)"는 병원균 DNA 또는 RNA에 의해 암호화된 임의의 다수의 병원균 폴리펩타이드 내에 존재하는 에피토프와 유사한 1차, 2차 또는 3차 구조를 포함하는 펩타이드 또는 단백질 항원을 의미한다. 유사성 정도는 상기 폴리펩타이드에 대하여 유발된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체가 또한 펩타이드 또는 단백질 항원에 결합하거나, 그 항원과 반응하거나, 또는 다른 방식으로 인식하는 정도인 것이 일반적이다. 이러한 항체와 함께 사용될 수 있는 면역분석법에는 다양한 종류가 있으며, 그 예로는 웨스턴 블로팅, ELISA, RIA 등이 있고, 이 모두는 당업자에게 공지되어 있다. 백신에 사용하기에 적합한 병원균 에피토프 및/또는 이의 기능성 증가물의 확인도 본 발명의 일부이다. 일단 분리 및 확인되면, 기능성 증가물은 쉽게 수득할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 참고 인용되고, 친수성을 기초로 하여 아미노산 서열들로부터 에피토프의 확인 및 제조에 대해 교시하는, 미국 특허 4,554,101에 교시된 호프(Hopp)법을 이용할 수 있다. 다른 여러 논문에 기술된 방법과 이를 기초로 한 소프트웨어 프로그램도 에피토프의 코어 서열을 확인하는데 사용될 수 있다(예컨대, Jameson and Wolf, 1988; Wolf et al., 1988; 미국 특허 4,554,101). 이러한 "에피토프 코어 서열"의 아미노산 서열은 펩타이드 합성이나 재조합 기술을 통해 펩타이드 내로 쉽게 혼입될 수 있다.

<64> 활성성분으로서 본 발명의 항원을 암호화하는 핵산을 포함하는 백신 조성물의 제제는 액체 용액이나 현탁액으로서의 주사제; 주사 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액으로 만들기 적합한 고체 형태로도 제조할 수 있다. 이 제제는 유효되어 리포솜에 캡슐화될 수 있다. 활성 면역원성 성분은 종종 약제학적으로 허용되고 활성 성분과 화합성인 운반체와 혼합되기도 한다.

<65> "약제학적으로 허용되는 운반체"란 용어는 이것이 투여된 피검체에서 알러지 반응이나 다른 부적합한 효과를 유발하지 않는 운반체를 의미한다. 적합한 약제학적으로 허용되는 운반체로는, 예컨대 1 이상의 물, 식염수, 인산염완충식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 또는 이의 유사물과 이의 조합을 포함한다. 또한, 필요하다면 백신은 합성제 또는 유화제, pH 완충화제, 및/또는 백신의 효과를 증강시키는 보강제와 같은 보조 물질을 소량 함유할 수 있다. 효과적일 수 있는 보강제의 예로는 수산화알루미늄, N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-nor-뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민, MTP-PE 및 RIBI(세균에서 추출된 3가지 성분, 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 디마이콜레이트 및 세포벽 골격(MPL+TDM+CWS)을 2% 스퀴알렌/Tween 80 에멀전에 함유한다)를 포함하되, 이에 국한되지는 않는다. 보강제의 다른 예로는 DDA(디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드), 프로인트 완전 및 불완전 보강제 및 QuilA를 포함한다. 또한, 면역 조절 물질, 예컨대 림포카인(예, IFN- γ , IL-2 및 IL-12) 또는 합성 IFN- γ 유발물질, 예컨대 폴리I:C가 본 명세서에 기술된 보강제와 함께 사용될 수 있다.

<66> 약제학적 산물은 본 발명에 기술된 바와 같이 혈장 지단백질에 존재하는 아포지단백질의 특정 DNA 결합 부위에 결합하는 특정 뉴클레오타이드 서열의 단일 또는 다중 카피를 보유하는 나출형 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 생물학적 활성 펩타이드, 안티센스 RNA 또는 리보자임을 암호화할 수 있고, 생리학적으로 허용되는 투여형으로 제공될 것이다. 본 발명에서 유래될 수 있는 또 다른 약제학적 산물은 환자의 혈액이나 다른 근원으로부터 본원에 기술된 방법에 따라 분리된, 고도 정제된 혈장 지단백질 분획, 및 정제된 지단백질 분획에 사전결합시킨, 혈장 지단백질에 존재하는 아포지단백질의 특이적인 DNA 결합 부위에 결합하는 특이적인 뉴클레오타이드 서열의 단일 또는 다중 카피를 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 생리학적으로 허용되는 투여형으로 포함할 수 있다.

<67> 또 다른 약제학적 산물은 특이적인 뉴클레오타이드 서열의 단일 또는 다중 카피를 함유하는 폴리뉴클레오타이드에 사전결합된, 특이적인 DNA 결합 모티프의 단일 또는 다중 카피를 함유하는 재조합 아포지단백질 단편을 함유하는 고도 정제된 혈장 지단백질 분획을 생리학적으로 허용되는 투여형으로 포함할 수 있다. 또 다른 약제학적 산물은 특이적인 뉴클레오타이드 서열의 단일 또는 다중 카피를 함유하는 폴리뉴클레오타이드에 사전결합된, 특이적인 DNA 결합 모티프의 단일 또는 다중 카피를 함유하는 재조합 아포지단백질 단편을 함유하는 고도 정제된 혈장 지단백질 분획을 생리학적으로 허용되는 투여형으로 포함할 수 있다.

- <68> 투여되는 투여량은 투여 경로 및 치료 빈도뿐만 아니라 치료받는 피검체의 체중 및 신체 상태에 따라 크게 달라진다. 고도 정제된 지단백질 분획에 사전결합된 나출형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물은 폴리뉴클레오타이드 1 μ g 내지 1mg 및 단백질 1 μ g 내지 100mg의 양으로 투여할 수 있다.
- <69> 환자에게 rAb 및 rAb 복합체의 투여는 백터의 독성(존재한다면)을 고려하여 화학치료제의 일반적인 투여 프로토콜에 따른다. 필요하다면, 치료 사이클을 반복할 수 있을 것으로 생각한다. 또한, 수술적 중재뿐만 아니라 다양한 표준 치료법을 본원에 기술한 유전자 요법과 함께 적용할 수도 있을 것으로 생각한다.
- <70> 유전자 요법의 임상적 적용이 고려되는 경우에는 상기 복합체를 의도된 적용에 적당한 약제학적 조성물로서 준비할 필요가 있을 수 있다. 일반적으로, 이것은 발열원 뿐만 아니라 사람이나 동물에게 유해할 수 있는 임의의 다른 불순물이 본질적으로 없는 약제학적 조성물을 제조하는 단계를 수반할 것이다. 또한, 복합체를 안정하게 하고 표적 세포에 의해 복합체가 흡수되도록 하기에 적당한 염 및 완충액을 이용하는 것이 바람직할 것이다.
- <71> 본 발명의 수성 조성물은 약제학적으로 허용되는 운반체 또는 수성 매질에 용해 또는 분산된 유효량의 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 점증물이라 불릴 수도 있다. 이러한 약제학적 활성 물질을 위한 매질과 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 활성 성분과 불화합성인 경우를 제외하고는, 임의의 통상의 매질 또는 제제는 치료 조성물에서의 사용이 고려된다. 또한, 보충적인 활성 성분도 상기 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 조성물은 고전적인 약제학적 제조물을 포함할 수 있다. 또한, 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물, 및 오일로도 제조할 수 있다. 보관 및 사용의 일반적인 조건 하에서, 이들 제조물은 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 함유한다.
- <72> 질병 상태. 치료하고자 하는 특정 질환에 따라서, 본 발명에 따른 치료 조성물의 투여는 임의의 일반적인 경로를 통해 이루어질 수 있으나, 단 표적 조직은 그 경로를 통해 최대 (또는 일부 경우에는 최소) 면적 반응을 위한 부위로 항원의 전달을 최대화할 수 있어야 한다. 투여는 일반적으로 동소이식, 피내, 피하, 근육내, 복강내 또는 정맥내 주사로 이루어질 것이다. 다른 전달 영역으로는, 구강, 비측, 협측, 직장, 질 또는 국소를 포함한다. 국소 투여는 피부암의 치료에 특히 유리할 것이다. 이러한 조성물은 보통 생리학적 허용성 운반체, 완충액 또는 다른 부형제를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물로 투여될 것이다.
- <73> 본 발명의 백신 또는 치료 조성물은 주사에 의해 비경구로, 예컨대 피하 또는 근육내로 투여될 수 있다. 다른 투여 방식에 적합한 또 다른 제형으로는 좌약이 있고, 몇몇 경우에는 에어로졸로서 분산에 적합한 제형 또는 경구용 제형이 있다. 경구용 제형인 경우에, 보강제를 이용한 T-세포 서브세트의 처리, 항원 패키징 또는 다양한 제형에 각 사이토카인의 첨가는 최적화된 면역 반응을 나타내는 개량된 경구용 백신을 제공한다. 좌약인 경우에, 통상적인 결합제 및 운반체로는 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세라이드를 포함할 수 있고, 이러한 좌약은 활성 성분을 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1% 내지 2% 범위로 함유하는 혼합물로 제조할 수 있다. 경구용 제형은 보통 이용되는 부형제, 예컨대 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 및 이의 유사물을 포함한다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡슐, 지속방출형 포물레이션 또는 분말의 형태이며, 활성 성분을 10% 내지 95%, 바람직하게는 25 내지 70% 함유한다.
- <74> 본 발명의 항원 암호화 핵산은 중성 형태 또는 염 형태로서 백신 또는 치료 조성물에 배합될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염으로는 산부가염(펩타이드의 유리 아미노기에 형성됨)을 포함하고 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 말레산 등의 유기산으로 제조된다. 또한, 유리 카르복시기에 제조된 염은 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.
- <75> 백신 또는 치료 조성물은 투여량 포물레이션과 양립할 수 있는 방식으로, 예방학적 및/또는 치료학적으로 효과적일 수 있는 양으로 투여된다. 투여되는 양은 치료받는 피검체에 따라, 예컨대 항체를 합성하는 피검체의 면역계의 능력, 원하는 보호 또는 치료 정도 등에 따라 달라진다. 적당한 투여량 범위는 백신접종 1회당 활성성분 수백 마이크로그램 정도로서, 약 0.1mg 내지 1000mg 범위, 예컨대 약 1mg 내지 300mg 범위, 바람직하게는 약 10mg 내지 50mg 범위이다. 1차 투여 및 추가 용량에 적당한 요법도 역시 다양하지만, 1차 투여에 이어 후속 접종 또는 다른 투여 방식이 일반적이다. 투여되어야 하는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 따라 달라지고 각 피검체 특유의 양일 수 있다. 당업자에게 자명한 것처럼, 본 발명의 핵산 분자 또는 융합 폴리펩타이드의 치료학적 유효량은 특히 투여 스케줄, 투여되는 항원의 단위 용량, 핵산 분자 또는 융합 폴리펩타이드의 다른 치료제와의 배합 투여 여부, 수용체의 면역 상태 및 건강, 및 특정 핵산 분자 또는 융합 폴리펩타이드의 치료 활성에 따라 달라질 것이다.

- <76> 조성물은 1회 용량 스케줄 또는 다회 용량 스케줄로 제공될 수 있다. 다회 용량 스케줄은 백신접종의 1차 과정이 예컨대 1 내지 10회의 분리 용량을 포함할 수 있고, 이어서 다른 용량들이 면역 반응의 유지 및/또는 보강에 필요한 후속 시간 간격을 두고, 예컨대 2차 용량은 1 내지 4개월째, 그리고 필요하다면 후속 용량(들)은 수개월 후에 제공된다. 1 내지 5년마다, 보통 3년마다의 주기적인 추가 접종이 예방 면역의 바람직한 수준을 유지하는데 필요할 수 있다. 면역화 과정에 이어, ESAT6 또는 ST-CF와 공동배양한 말초혈액 림프구(PBL)의 시험관내 증식 분석, 및 초회항원자극된 림프구로부터 방출된 IFN- γ 의 수준을 측정할 수 있다. 이 분석법들은 통상의 표지, 예컨대 방사능뉴클레오타이드, 효소, 형광 표지 등을 사용하여 수행할 수 있다. 이 기술들은 당업자에게 공지되어 있고, 관련 부분이 참고 인용된 미국 특허 3,791,932, 4,174,384 및 3,949,064에서 찾아볼 수 있다.
- <77> 모듈식 rAb 운반체 및/또는 접합된 rAb 운반체-(코헤신/도커린 및/또는 도커린-코헤신)-항원 복합체(rAb-DC/DC-항원 백신)는 핵산 벡터의 사용 여부, 최종 정제된 단백질 또는 사용된 최종 백신 형태에 따라서 1 이상의 "단위 용량"으로 제공될 수 있다. 단위 용량은 적당한 경로 및 치료 요법과 같이, 그 투여와 관련하여 바람직한 반응을 나타내도록 계산된 치료 조성물의 소정의 양을 함유하는 것으로 정의된다. 투여되는 양, 및 특정 경로와 제형은 임상 분야의 숙련된 자의 기술 범위 내인 것이다. 치료받는 피검체, 특히 피검체의 면역계 상태 및 원하는 예방 효과가 평가될 수 있다. 단위 용량은 반드시 1회 주사로서 투여될 필요는 없고, 정해진 시간 기간 동안 연속 주입으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 단위 용량은 편리하게 DNA/kg(또는 단백질/kg)체중 단위로 나타낼 수 있으며, 약 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.5, 1, 10, 50, 100, 1,000 또는 그 이상의 mg/DNA 또는 단백질/kg체중 사이의 범위가 투여된다. 이와 유사하게, 전달되는 rAb-DC/DC-항원 백신의 양은 약 0.2 내지 약 8.0mg/kg 체중 범위에서 달라질 수 있다. 즉, 특정 구체예에 따르면, 0.4mg, 0.5mg, 0.8mg, 1.0mg, 1.5mg, 2.0mg, 2.5mg, 3.0mg, 4.0mg, 5.0mg, 5.5mg, 6.0mg, 6.5mg, 7.0mg 및 7.5mg의 백신이 개체에게 생체내로 전달될 수 있다. 투여되는 rAb-DC/DC-항원 백신의 투여량은 치료받는 피검체의 체중과 신체 상태 뿐만 아니라 투여 경로와 치료 빈도에 따라 크게 달라진다. 리포좀 또는 바이러스 전달 벡터에 사전결합된 나출형 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 약제학적 조성물은 1 μ g 내지 1mg 폴리뉴클레오타이드 범위 또는 1 μ g 내지 100mg 단백질 범위의 양으로 투여될 수 있다. 즉, 특정 조성물은 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g, 50 μ g, 60 μ g, 70 μ g, 80 μ g, 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 600 μ g, 700 μ g, 800 μ g, 900 μ g, 1mg, 1.5mg, 5mg, 10mg, 20mg, 30mg, 40mg, 50mg, 60mg, 70mg, 80mg, 90mg 또는 100mg 벡터에 독립적으로 결합된 약 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 40 μ g, 50 μ g, 60 μ g, 70 μ g, 80 μ g, 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g, 250 μ g, 500 μ g, 600 μ g, 700 μ g, 800 μ g, 900 μ g 또는 1,000 μ g 사이의 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 포함할 수 있다.
- <78> 본 발명은 Flu 항원이 표적화된 수지상 세포에 의한 사람 Flu-특이적 T 세포의 면역 자극을 측정하는 시험관내 세포계에서 검사했다. 여기에 제시된 결과는 이세포계에서 비효과적인 항원의 용량에서 상기 항원 특이적 세포의 특이적인 증대를 입증하고 있다.
- <79> 또한, 본 발명은 리신, 탄저독소 및 스타필로코커스 B 장독소 유래의 방어 항원과 복합체를 형성한 재조합 사람화된 mAb(특이적 사람 수지상 세포 수용체 지향성임) 중인 모듈식 rAb 운반체를 제조하는데 사용될 수도 있다. 이 실체의 잠재적 시장은 군대의 전 대원의 백신접종 및 이러한 물질과 관련된 임의의 생물위협에 대하여 대집단 센터에 투여하기 위해 확보해 두는 보관 백신이다. 본 발명은 일반적으로 사람 및 동물 용도의 백신 설계에 광범하게 이용된다. 당해의 산업으로는 약제학적 및 생물공학적인 산업이 있다.
- <80> 본 발명은 항원에 대항하여 지향된 강력하고 광범위한 면역 반응을 유도하기 위한 목적으로 항원제시세포(APC)에 대한 항원을 특이적으로 표적화(전달)하는, 조성물 및 방법, 예컨대 백신을 포함한다. 이러한 조성물은 항원이 유래된 물질(병원균 또는 암)에 대항한 예방학적 또는 치료학적 면역 반응을 야기시킨다. 또한, 본 발명은 항원제시세포에서 발현되는 LOX-1 수용체의 특이적인 유도를 통해 직접 치료성이거나 다른 제제와 함께 치료성인 제제를 창출한다.
- <81> **재료 및 방법**
- <82> 항체 및 4량체 - DC와 B 세포를 표면 염색하기 위한 항체(Ab), 예컨대 이소타입 대조군 Ab는 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences; CA)에서 구입했다. ELISA를 위한 Ab는 베틀(Bethyl, TX)에서 구입했다. 항-BLyS 및 항-APRIL은 PeproTech(NJ)에서 구입했다. 4량체, HLA-A*0201-GILGFVFTL(Flu M1) 및 HLA-A*0201-ELAGIGILTV(Mart-1)는 베크만 쿨터(Beckman Coulter, CA)에서 구입했다.
- <83> 세포 및 배양물 - 정상 공여자 유래의 단핵구(1×10^6 /ml)는 GM-CSF(100ng/ml)와 IL-4(50ng/ml)(R&D, CA)를 함유하는 Cellgenics(프랑스) 배지에서 배양했다. 3일과 6일마다, 동량의 사이토카인인 DC를 각각 1일과 3일에 배지

에 보충했다. B 세포는 음성 분리 키트(BD)로 정제했다. CD4 및 CD8 T 세포는 밀도구배원심분리에 의해 Percoll™ 구매(GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 백혈구연층(Buffy coat)으로부터 분리했다. DC 활성화를 위해, 1×10^5 DC를 mAb 코팅된 96웰 평판에서 16 내지 18시간 동안 배양했다. 탄산염 완충액(pH 9.4) 중의 mAb(1 내지 2 μg /웰)를 37°C에서 적어도 3시간 동안 항온배양했다. 배양 상청액은 수거하고, 사이토카인/케모카인은 루미넥스(Biorad, CA)로 측정했다. 유전자 분석을 위해, DC는 mAb 코팅된 평판에서 8시간 동안 배양했다. 일부 실험에서는 배양물에 가용성 CD40L(R&D, CA) 50ng/ml 또는 50nM CpG(InVivogen, CA)를 첨가했다. DC와 B 세포 공동배양물에서는, 먼저 10% FCS 및 항생제(Biosource, CA)를 보유한 RPMI 1640에 재현탁시킨 DC 5×10^3 을 mAb가 코팅된 평판에서 적어도 6시간 동안 배양하고, 그 다음 CFSE(Molecular Probes, OR)가 표지된 정제된 자기 B 세포 1×10^5 를 첨가했다. 일부 실험에서는 DC를 열불활성화된 인플루엔자 바이러스(A/PR/8 H1N1) 5moi(감염 다중도)로 2시간 동안 펄스화하고 B 세포와 혼합했다. DC와 T 세포 공동배양물을 위해서는 5×10^3 DC를 1×10^5 정제된 자기 CD8 T 세포 또는 혼합된 동종이계 T 세포와 함께 배양했다. 동종이계 T 세포는 항온배양의 마지막 18시간 동안 $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ $^3\text{[H]}$ -티미딘으로 펄스화한 뒤, cpm을 감마계수기(Wallac, MN)로 측정했다. 5×10^5 PBMC/웰을 mAb가 코팅된 평판에서 배양했다. 배양 10일과 7일째에 각각 세포를 항-CD8 및 4량체로 염색해서 Mart-1 및 Flu M1 특이적 CD8 T 세포의 빈도를 측정했다. Mart-1 펩타이드(ELAGIGILTV) 10 μM 및 Mart-1 펩타이드를 함유하는 재조합 단백질(이하 참조) 20nM을 DC 및 CD8 T 세포 배양물에 첨가했다. 20nM 정제된 재조합 Flu M1 단백질(이하 참조)을 PBMC 배양물에 첨가했다.

<84> 모노클로날 항체 - 마우스 mAb는 통상적인 기술로 생산했다. 간략히 설명하면, 6주령의 BALB/c 마우스에게 Ribi 보강제와 함께 수용체 엑토도메인.hIgGFc 융합 단백질 20 μg 을 복강내 주사하여 면역화한 뒤, 10일과 15일 후에 20 μg 의 항원을 추가 접종했다. 3개월 후, 비장을 떼어내기 3일 전에 다시 마우스에게 추가접종했다. 또는, 30일 내지 40일 기간 동안 3 내지 4일마다 Ribi 보강제 중의 1 내지 10 μg 항원을 마우스의 발바닥으로 주사했다. 최종 추가접종 후 3일 내지 4일 후에, 배수 림프절을 수집했다. 림프절 세포 또는 비장 유래의 B 세포를 SP2/O-Ag 14 세포와 융합시켰다. 하이브리도마 상청액을 선별하여 융합 파트너 단독과 비교하여 수용체 엑토도메인 융합 단백질에 대한 Ab 또는 알칼리성 포스포타제에 융합된 수용체 엑토도메인에 대한 Ab를 분석했다(16). 그 다음, 전체 길이의 수용체 cDNA를 암호화하는 발현 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 293F 세포를 사용하여 FACS에서 양성 웰을 선별했다. 선별된 하이브리도마는 단세포 클로닝하고 CELLline 플라스크(Integra, CA)에서 증대시켰다. 하이브리도마 상청액을 동량의 1.5M 글리신, 3M NaCl, 1x PBS, pH 7.8과 혼합하고 MabSelect 수지와 텀블링시켰다. 수지는 결합 완충액으로 세척하고 0.1M 글리신, pH 2.7로 용출시켰다. 2M Tris로 중화시킨 후에 mAb는 PBS에 대하여 투석했다.

<85> ELISA - 샌드위치 ELISA는 총 IgM, IgG 및 IgA 뿐만 아니라 flu-특이적 면역글로불린(Ig)을 측정하기 위해 수행했다. 공지된 양의 Ig 및 사람 AB 혈청을 함유하는 표준 사람 혈청(Bethyl)은 총 Ig 및 flu-특이적 Ig의 표준으로서 각각 사용했다. 샘플에 존재하는 flu 특이적 Ab 역가는 동일한 광학 밀도를 나타내는 AB 혈청의 희석비(dilution factor)로서 정의했다. BAFF 및 BlyS의 양은 ELISA 키트(Bender MedSystem, CA)로 측정했다.

<86> RNA 정제 및 유전자 분석 - 총 RNA는 RNeasy 컬럼(Qiagen)으로 추출하고 2100 Bioanalyser(Agilent)로 분석했다. 비오틴 표지된 cRNA 표적은 Illumina 토탈프랩 라벨링 키트(Ambion)를 사용하여 제조하고 Sentrrix Human6 BeadChip(46K 전사체)에 하이브리드화시켰다. 이 마이크로어레이는 실리콘 웨이퍼 표면에 식각된 마이크로웰에 담긴 3 μm 비드에 부착된 50량체 올리고뉴클레오타이드 프로브로 구성된다. 스트렙타비딘(Streptavidin)-Cy3으로 염색한 후, 어레이 표면은 일루미나 제품인 서브마이크론 해상 스캐너(Beadstation 500X)를 사용하여 영상화시켰다. 유전자 발현 분석 소프트웨어 프로그램 GeneSpring 7.1판(Agilent)을 사용하여 데이터 분석을 수행했다.

<87> 재조합 Flu M1 및 MART-1 단백질의 발현 및 정제 - PCR을 사용하여, 개시인자 코돈에서 먼 위치에 NheI 부위 및 종결 코돈에서 먼 위치에 NotI 부위를 혼입시키면서 인플루엔자 A/푸에르토 리코/8/34/마운트 시나이(H1N1) M1 유전자의 ORF를 증폭시켰다. 절단된 단편은 His6 태그와 함께 프레임내에 M1 ORF를 배치하여 His.Flu M1 단백질을 암호화하도록 pET28b(+)(Novagen)에 클로닝했다. NcoI과 NheI 부위 사이에 삽입된 씨.썸모셀럼 (*C. thermocellum*)(미공지됨) 유래의 N-말단 169개 잔기 코헤신 도메인을 암호화하는 pET28b(+)₁₆₉ 유도체는 Coh.His를 발현했다. 코헤신-Flex-hMART-1-펩타이드A-His의 발현을 위해, 상기 벡터의 NheI과 XhoI 부위 사이에 서열

GACACCACCGAGGCCGCCACCCACCCCGTGACCACCCACCCACCCGAC
CCGGAAGGGCACCACCGCCGAGGAGCTGGCCGGCATCGGCATCCTGACCGTGATCC
TGGGCGGCAAGCGGACCAACAACAGCACCCACCAAGGGCGAATTCTGCAGATAT
<88> CCATCACACTGGCGGCCG (서열번호 1)

DTTEARHPHPVTTPTTDRKGTAEELAGIGILTVILGGKRTNNSPTPKGEFCRYPSHWR

<89> (P (서열번호 2)

를 암호화한다 - 음영처리된 잔기는 면역우성 HLA-A2 제한적 펩타이드이고 이 펩타이드 주위의 밀출된 잔기는 MART-1 유래이다)를 삽입시켰다. 카나마이신 내성에 대한 선택(40µg/ml) 하에 LB에서 200 회전/분으로 진탕시키면서 120mg/L IPTG를 첨가한 대수기 증기까지 37°C에서 성장시킨 이.콜라이 균주 BL21(DE3)(Novagen) 또는 T7 Express(NEB)에서 단백질을 발현시켰다. 3시간 후, 세포를 원심분리로 수집하고 -80°C에 보관했다. 각각 1L 발효 유래의 이.콜라이 세포를 30ml의 빙냉 50mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0(완충액 B) 및 0.1ml의 프로테아제 억제제 카테일 II(Calbiochem, CA)에 재현탁시켰다. 이 세포를 세팅 18(Fisher Sonic Dismembrator 60)에서 5분 휴식 시간을 두고 2x 5분씩 얼음에서 초음파처리한 뒤, 4°C에서 20분동안 17,000rpm(Sorvall SA-600)으로 침강시켰다. His.Flu M1 정제를 위해, 50ml 세포 용해물 상청액 분획을 5ml Q Sepharose 비드를 통해 통과시키고, Q Sepharose 관통물에 6.25ml의 160mM Tris, 40mM 이미다졸, 4M NaCl pH 7.9를 첨가했다. 이것을 Ni++ 주입된 5ml HiTrap 킬레이팅 HP 컬럼 위에 4ml/분씩 로딩했다. 컬럼에 결합된 단백질은 20mM NaPO₄, 300 mM NaCl pH 7.6 (완충액 D)로 세척한 다음, 다시 100 mM H₃COONa pH 4.0으로 세척했다. 결합된 단백질은 100mM H₃COONa pH 4.0에 의해 용출되었다. 피크 분획을 모으고, 100 mM H₃COONa pH 5.5로 평형화된 5 ml HiTrap S 컬럼 위에 4ml/분 씩 로딩하고, 상기 평형 완충액으로 세척한 후, 50 mM NaPO₄ pH 5.5 중의 0 내지 1M의 NaCl 구배로 용출시켰다. 약 500mM NaCl에서 용출하는 피크 분획을 수집했다. Coh.Flu M1.His 정제를 위해 2L 배양물의 세포를 전술한 바와 같이 용해시켰다. 원심분리한 후, 얼음에 5분간 항온처리한 상청액에 2.5ml Triton X114를 첨가했다. 다시 25°C에서 5분 동안 항온처리한 후, 상청액을 25°C에서 원심분리한 후 Triton X114로부터 분리했다. 추출을 반복하고, 상청액을 5ml의 Q Sepharose 비드를 통해 통과시키고, Q Sepharose 관통물에 6.25ml의 160 mM Tris, 40 mM 이미다졸, 4 M NaCl pH 7.9를 첨가했다. 그 다음, 단백질을 전술한 바와 같이 Ni⁺⁺ 킬레이팅 크로마토그래피로 정제하고 완충액 D 중의 0 내지 500mM 이미다졸로 용출시켰다.

<90> 항-LOX-1 mAb - 본 발명은 치료 또는 예방 제품의 바람직한 성분(예컨대, 사람화된 재조합 항체의 상황에서)인 항-LOX-1 모노클로날 항체에 대응하는 이하에 제시된 특정 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 서열이 키메라 마우스 V 영역(밀출된 부분) - 사람 C 영역(진한 글씨) 재조합 항체의 상황에 있는 서열은 다음과 같다. 마우스 V 영역은 당업자에 의해 쉽게 '사람화'될 수 있고, 즉 LOX-1 복합 영역이 사람 V 영역 프레임워크 서열 위에 접목될 수 있다. 또한, 서열들은 항체 기능성을 보존하지만, 원하는 치료 적용을 위해 항원, 사이토카인 또는 독소 등을 첨가한 융합 단백질의 환경에서 발현될 수 있다.

<91> [mAnt i-LOX-1_11C8H-LV-hIgG4H-C]

EVQLQDSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKORPGGLEWIGAIYPGNSDITYNOKFKGKA
KLTAVTSTSTAYMELSSLTNEDSAVYYCTPTYYFDYWGQGTSLTVSSAKTKGPSVVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLRQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPAPAFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLKAS (서열번호 3)

<93> [mAnt i-LOX-1_11C8K-LV-hIgGK-C]

DVVMTOTPLTSLVIGOPASISCKSSOSSLDSGKTYLNWFLORPGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGS
GTDFTLKISRVEADLGVYCWQGTTFPWFEGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC (서열번호 4)

<95> [mAnt i-LOX_1_10F9H-LV-hIgG4H-C]

QVQLQDSGAEMLKPGASVKISCKATGYTFTGSYWIEWVKORPGHGLEWIGELPGSGNTNYNENFKGKATF
IADTSSNTAYMOLTSLTSEDSAVYYCARAGIYWGQGTITVTSAAKTKGPSVVFPLAPCSRSTSESTAAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLRQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRV
SKYGPFCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLKAS (서열번호 5)

<97> [mAnt i-LOX-1_10F9K-LV-hIgGK-C]

DIVLTQSPAFLAVSLGORATISCRASESVNDYGISFMNWFOOKPGOPPKLLIYVASKQGSQGVPARFSGSGSG
TDFSLNIHPMEEDDTAMYFCOOSKEVPRTEGGGKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC (서열번호 6)

<98>

<99> [mAnt i-LOX-1_15C4H-LV-hIgG4H-C]

EIOLQOTGPPELVKPGASVKISCKASGYPFTDYIMVWVKOSHGKSLEWIGNISPYGTTNYNLKFKGKATLT
VDKSSSTAYMOLNSLTSEDSAVYYCARSPNWDGAWFAHWGOGALVTVSAAKTKGPSVFPLAPCSRSTSE
STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPAPAFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPP
SQEQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGKAS (서열번호 7)

<100>

<101> [mAnt i-LOX-1_15C4K-LV-hIgGK-C]

DIVLTQSPASLAVSLGORATISCKASQSVVDYDGDSYMNVWFOOKPGOPPKLLIYAASNLESGIPARFSGSGSG
TDFSLNIHPVEEEDAATYVCOQSNEDPFTFGSGTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (서열번호 8)

<102>

<103> 본 발명은 V 영역 서열 및 당업자에 의해 LOX-1에 대한 친화성 향상을 위해 변형되고/되거나 항원제시세포 상의 LOX-1에 결합할 수 있는 단백질 형태의 발현을 유도하기 위해 발현 벡터로 유전자조작되는 사람 V-영역 프레임 워크에 통합된 관련 서열을 포함한다. 또한, 본 발명에 개시된 다른 mAb(또는 본 명세서에 개시된 유일한 상태에 대한 유사한 방법과 선별을 이용하여 유도된 다른 mAb)는 유사한 수단(1차적으로 마우스 하이브리도마 V 영역의 PCR 클로닝 및 서열분석을 통해)을 통해 유사한 재조합 항체(rAb)를 암호화하는 발현 작제물로 제공될 수 있다. 이러한 항-LOX-1 V 영역은 치료학적 rAb의 잠재적 면역 반응성을 최소화하기 위해, 다시 당업자에 의해 '사람화'(즉, 마우스 특이적 조합 서열이 사람 V 영역 프레임워크 서열에 이식됨)될 수 있다.

<104> 유전자조작된 재조합 항-LOX-1 재조합 항체 - 항원 융합 단백질(rAb. 항원)은 시험관내에서 효능적인 표본 백신이다 - 발현 벡터는 다양한 단백질 암호화 서열을 예컨대 H쇄 암호화 서열에 프레임내 융합시켜 작제할 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 HA5, 인플루엔자 M1, HIV gag 또는 암 항원 유래의 면역 우성 펩타이드와 같은 항원 또는 사이토카인은 이어서 rAb. 항원 또는 rAb.사이토카인 융합 단백질로서 발현될 수 있고, 이는 본 발명의 상황에서 상기 항원 또는 사이토카인(또는 독소)이 직접 LOX-1을 보유하는 항원제시세포의 표면으로 유도하는 항-LOX-1 V 영역 서열의 사용에서 유래되는 유용성이 있을 수 있다. 이것은 예컨대 항원 - 때로는 수용체의 활성화 및 이어서 치료학적 또는 예방학적 작용의 개시(예컨대, 잠재적 면역 반응의 개시를 통해 또는 표적화된 세포의 사멸을 통해)와 관련이 있는 항원을 내재화시킨다. 이러한 개념을 기초로 한 백신은 H쇄 마우스 mAb V 영역(밀출친 부분)-사람 IgG4 C 영역-Flu HA5-1(진한 글씨) 융합 단백질의 합성을 유도하는, rAb-pIRES2[mAnt i-LOX-1_15C4H-LV-hIgG4H-C-Flex-FluHA5-1-6xHis]과 같은 H쇄 벡터를 이용할 수 있다. 유사한 경쇄 발현 플라스미드(상기 제시된 암호화 서열)와 공동발현된다면, 이는 LOX-1에 결합하여 Flu HA5-1 항원을 세포 표면으로 전달하여 DC 활성화, 항원 내재화, 항원 가공, 항원 제시 및 특정 항-Flu HA5-1 B 및 T 세포의 해명 및 증대를 수행하는 다기능성 재조합 항체(rAb)를 생산한다.

EIOLQOTGPPELVKPGASVKISCKASGYPFTDYIMVWVKOSHGKSLEWIGNISPYGTTNYNLKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMOLNSLTSEDSAVYYCARSPNWDGAWFAHWGOGALVTVSAAKTKGPSVFPLAPC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTC
NVDHKPSNNTKVDKRVESKYGPPCPAPAFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKA
KGQPREPQVYTLPPSQEQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGKASDTTEPATPTTPVTTDQICIGYHANN
STEQVDITIMEKNVTVTHAQDILEKKNHNGKLCDLGDKPLLRDCSVAGWLLGNPMDCEFINVPE
WSYIVEKANPVDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEEKIHPKSSWSSHEASLGVSSACPYQGKS
SFFRNVVWLJKKNSTYPTIKRSYNNNTQEDLLVWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLN
QRLVPRIATRSKVNQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSSTIMKSELEY
 GNCNTKCCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKSRLVLAHHHHHHH (서열번호 9)

<105>

<106> 이와 유사하게, rAb-pIRES2[mAnt i-LOX-1_15C4H-LV-hIgG4H-C-Docker in]는 도커린(이하에 제시된 서열)에 융합된 항-LOX-1 H쇄를 암호화한다. 도커린은 코헤신-항원(coh. 항원) 융합 단백질과 강한 특이적 비공유 상호작용을 허용하여, DC 및 다른 항원제시세포에 항원을 전달하는 대체 수단을 제공한다.

EIQLOOTGPELVKPGASVKISCKASGYPTDYIMVWVKQSHGKSLWIGNISPYGTTNYNLKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMOLNSLTSEDSAVYYCARSPNWDGAWFAHWGOGALVTVSAAKTKGPSVFPLAFC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEFGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKA
KGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASKASNSPQNEVLYGDVNDGKVNSTDL
TLLKRYVLRKAVSTLPSKAEKNADVNRDGRVNSSDVTLISRYLRIRVIEKLP (서열번호 10)

<107>

EIQLOOTGPELVKPGASVKISCKASGYPTDYIMVWVKQSHGKSLWIGNISPYGTTNYNLKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMOLNSLTSEDSAVYYCARSPNWDGAWFAHWGOGALVTVSAAKTKGPSVFPLAFC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTC
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFEFGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKA
KGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKASKASDTEPATPTTPVTPPTTLLAPLILSR
IVGWCEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVILLGRHSLFHPEDTG
QVFOVSHSFPFLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTT
CYASGWSGIEPEEFLTPKQLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVIKFMLCAGRWTTGGKSTCSGDSG
GPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (서열번호 11)

<108>

<109> 재조합 항체(rAb) 및 rAb. 항원의 클로닝 및 발현에 관한 방법

<110> 키메릭 마우스/사람 mAb의 cDNA 클로닝 및 발현 - 총 RNA는 하이브리도마 세포로부터 준비하고(RNeasy 키트, Qiagen), 공급된 5' 프라이머와 유전자 특이적 3' 프라이머를 이용하는 cDNA 합성 및 PCR(SMART RACE 키트, BD Biosciences)에 사용했다:

mIgGκ, 5'ggatggtgggaagatggatacagttggtgcagcatc3' (서열번호 12);

mIgGλ, 5'ctaggaacagtcagcacgggacaactctctccacagtgtagcttc3' (서열번호 13);

mIgG1, 5'gtcactggtcagggaaatagcccttgaccagcagcatc3' (서열번호 14);

mIgG2a, 5'ccagcagcatcctagagtcaccgaggagccagt3' (서열번호 15); 및

mIgG2b, 5'ggtgctggaggggacagtcactgagctgctcatagtg3' (서열번호 16).

<111>

<112> PCR 산물은 클로닝하고 (pCR2.1 TA 키트, Invitrogen), DNA 서열분석으로 특성규명했다. 마우스 H 및 L쇄 V 영역 cDNA의 유도된 서열을 사용하면서 특정 프라이머를 사용하여 시그널 펩타이드 및 V 영역을 PCR 증폭시키는 한편, 하류 사람 IgGκ 또는 IgG4H 영역을 암호화하는 발현 벡터에 클로닝하기 위한 인접 제한 부위를 혼입시켰다. 키메릭 mVκ-hIgκ의 발현용 벡터는 XhoI 및 NotI 부위에 인접한 잔기 401-731(gi|63101937|)을 증폭시키고, 이를 pIRES2-DsRed2 (BD Biosciences)의 Xho I - Not I 구간에서 삽입하여 제작했다. Nhe I 또는 Spe I 부위와 그 다음 CACC를 붙이고 있는 개시인자 코돈에서부터 XhoI 부위를 붙이고 있는 암호화 영역(예컨대, gi|76779294|의 잔기 126)까지인 mAb Vκ 영역을 증폭시키기 위해 PCR을 사용했다. 이 PCR 단편은 그 다음 상기 벡터의 NheI - NotI 사이에 클로닝했다. mSLAM 리더를 이용하는 키메릭 mVκ-hIgκ용 벡터는, 이 벡터의 NheI-

5'ctagttgctgctaattggaccccaaggctcccttctgagaataactctgttctctccctgcttttgagtgtcgtacggattaataag

XhoI 사이에 서열 5' ggcccactcgag3' (서열번호 17)

을 삽입하여 제

작했다. 예측된 성숙 N-말단 코돈(SignalP 3.0 Server에 의해 정의됨)(Bendtsen, Nielsen et al. 2004)과 mVκ 영역의 말단(위에서 정의됨) 사이의 구간을 증폭시키면서 5'tcgtacgga3'을 부속시키기 위해 PCR을 사용했다. Bsi WI와 Xho I로 절단한 단편은 상기 벡터의 대응 부위에 삽입했다. 대조군 hIgκ 서열은 gi|49257887| 잔기 26-85 및 gi|21669402| 잔기 67-709에 대응한다. 대조군 hIgG4H 벡터는 종결 코돈 대신에 서열 5'gctagctgattaattaa3'을 첨가하면서 pIRES2-DsRed2 벡터 Bgl II와 Not I 부위 사이에 삽입된, 이황화 결합을 안정화시키고 잔기 FcR 결합을 폐기시키는 S229P 및 L236E 치환을 보유하는 gi|19684072|의 잔기 12-1473에 대응한다(Reddy, Kinney et al. 2000). mAb VH 영역은 CACC와 그 다음 Bgl II 부위가 부속되어 있는 개시인자 코돈부터 gi|19684072|의 잔기 473을 암호화하는 영역까지 증폭시키기 위해 PCR을 사용했다. 이 PCR 단편은 그 다음 상기 벡터의 BglIII- Apa I 구간에 클로닝했다. mSLAM 리더를 이용하는 키메릭 mVH-hIgG4 서열을 위한 벡터는 이 벡터의 NheI - Apa I 구간에 서열

5'ctagttgctgctaattggaccccaaggctcccttctgagaataactctgttctctccctgcttttgagtgtcgtacggattaataag

ggccc3' (서열번호 18)

을 삽입하여 작

제했다. 예측된 성숙 N-말단 코돈과 mVH 영역의 말단 사이의 구간을 증폭시키면서 5'tcgtacgga3'을 부속시키기 위해 PCR을 사용했다. Bsi WI 및 ApaI로 절단한 단편은 상기 벡터의 대응 부위에 삽입했다. 부록 2는 본 연구에 사용된 다양한 mVκ와 mVH 영역의 뉴클레오타이드 서열을 열거한 것이다.

- <113> 종결 코돈 다음에 근위 Nhe I 부위와 원위 Not I 부위가 인접해 있는 다양한 항원 암호화 서열은 H 쇠 벡터의 NheI - PacI - NotI 구간에 삽입했다. Flu HA1-1은 근위의 5'gctagcgatacaacagaacctgcaacacctacaacacctgtaacaa3' 서열(NheI 부위 다음에는 cipA 코헤신-코헤신 링커 잔기를 암호화하는 서열이 후속된다)과 원위의 5'caccatcaccatcaccattgagcgcgcc3' (His6, 종결 코돈 및 NotI 부위를 암호화한다)을 보유하는 인플루엔자 A 바이러스 (A/Puerto Rico/8/34(H1N1)) 헤마글루티닌 gi|21693168| 잔기 82-1025 (C982T 변화 보유)에 의해 암호화되었다. Flu HA5-1은 Flu HA1-1과 동일한 서열이 결합되어 있는 gi|50296052| 인플루엔자 A 바이러스 (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)) 헤마글루티닌 잔기 49-990에 의해 암호화되었다. Doc는 근위의 NheI과 원위의 NotI 부위를 보유하는 gi|40671| celD 잔기 1923-2150 에 의해 암호화되었다. PSA는 근위 서열 5'gctagcgatacaacagaacctgcaacacctacaacacctgtaacaacaccgacaacaacacctctagcg3' (서열번호 19) (Nhe I 부위 및 cipA 스페이서) 및 원위 Not I 부위를 보유하는 gi | 34784812 | 전립선 특이적 항원 잔기 101-832에 의해 암호화되었다. Flu M1-PEP는 tcgtttcacactactaagcgcgcc3' (서열번호 20) 에 의해 암호화되었다. 이 서열 및 모든 다른 펩타이드 암호화 서열은 NheI 및 NotI 제한적 H쇠 벡터 또는 NheI-XhoI 제한적 Coh.His 벡터에 클로닝하기에 적합한 말단을 가진 상보성 합성 DNA 단편의 혼합물을 통해 만들었다. 제한효소 부위가 혼입되어 야 하는 곳이나 CipA 스페이서 서열을 제외하고는, 바람직한 사람 코돈을 항상 사용했다.
- <114> rAb 발현 작제물의 생산 수준은 전술한 프로토콜과 L쇄 및 H쇄 작제물을 각각 약 2.5 μ g 사용하는 5ml 일시적 형질감염물에서 검사했다. 상청액을 항-hIgG ELISA(AffiniPure 염소 항사람 IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch)로 분석했다. 이 프로토콜의 검사들에서, 분비된 rAb의 생산은 각 DNA 농도의 약 2배 범위에서는 H쇄 및 L쇄 벡터 농도와 무관했다(즉, 시스템은 DNA 포화되어 있었다).
- <115> 본 발명자들은 본원에서 LLR 중의 하나인 LOX-1이 세포(예컨대, DC) 활성화 측면에서 단독으로 또는 다른 세포 시그널과 함께 기능한다는 것을 입증했다. LOX-1 매개의 세포 활성화는 특정 항-LOX-1 mAb에 의해 유도되고, 따라서 이러한 항-사람 LOX-1 mAb는 질환 대항성 시약의 개발에 유용할 것이다.
- <116> 본 발명은 신규 항사람 LOX-1 시약 및 본 발명의 기초인 신규 생체를 밝히는데 사용되는 용도 및 예상되는 응용을 포함한다. 이를 요약하면, 신규 항-LOX-1 모노클로날 항체(mAb)는 항원제시세포 상에서 발견되는 세포 표면 수용체와 관련이 있는 종래 알려지지 않은 생체를 밝혀내기 위해 개발되고 사용되었다. 이러한 신규 생체는 다양한 치료 및 예방학적 적용을 위해 상기 수용체를 활성화시키는 항-LOX-1 제제의 적합성에 대해 매우 예측성이 다. 이하에 제시된 데이터는 최초의 예측을 강하게 지지하고 임상 용도에 대해 여기서 밝혀진 발견들을 환원시키는 경로를 입증한다.
- <117> 사람 LOX-1에 대한 고친화성 모노클로날 항체의 개발 - 수용체 엑토도메인.hIgG(사람 IgGIFc) 및 AP(사람 태반 알칼리성 포스파타제) 융합 단백질은 각각 마우스의 면역화 및 mAb의 선별을 위해 제조했다. DCIR 엑토도메인.IgG의 발현 작제물은 종래 기술된 바 있고(16), 분비를 유도하기 위한 마우스 SLAM(mSLAM) 시그널 펩타이드를 사용했다(17). 또한, DCIR 엑토도메인.AP를 위한 발현 벡터는 근위의 프레임내 Xho I 부위와 원위의 TGA 종결 코돈 및 NotI 부위를 첨가하면서 AP 잔기 133-1581(gb | BC009647 |)의 증폭을 위한 PCR을 사용하여 제조했다. 이 XhoI-NotI 단편은 상기 DCIR 엑토도메인.IgG 벡터 중의 IgG 암호화 서열을 대신했다. 동일한 Ig 및 AP 벡터 시리즈 중의 LOX-1 엑토도메인 작제물은 LOX-1(bp 224-874, gi | 18490152 |)을 암호화하는 삽입체를 함유했다. LOX-1 융합 단백질은 제조업자의 프로토콜에 따라 FreeStyle™ 293 Expression System(Invitrogen)을 사용하여 생산했다(1mg 총 플라스미드 DNA와 형질감염용 293 Fectin 시약 1.3ml/L). rAb 생산을 위해, H쇄와 L쇄를 암호화하는 동량의 벡터를 공동형질감염시켰다. 형질감염된 세포는 3일 동안 배양하고, 배양 상청액을 수집하고, 새 배지를 첨가한 후 2일 동안 계속 항온배양했다. 수집한 상청액을 여과하여 정화했다. 수용체 엑토도메인.hIgG는 0.1M 글리신 pH 2.7에 의한 용출을 이용하는 HiTrap 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한 뒤, PBS에 대하여 투석했다. rAb(이하에 기술되는 제조항체)도 유사하게 HiTrap MabSelect™ 컬럼을 사용하여 정제했다. 마우스 mAb는 종래의 세포 융합 기술을 사용하여 생산했다. 간략히 설명하면, 6주령의 BALB/c 마우스에게 20 μ g의 수용체 엑토도메인.hIgGFc 융합 단백질을 Ribi 보강제와 함께 복강 내로 면역화시킨 다음, 10일 및 15일 후에 20 μ g 항원을 추가접종한다. 3개월 후에, 비장을 채취하기 3일 전에 다시 마우스에게 추가접종했다. 또는, 30일 내지 40일 동안 3 내지 4일마다 Ribi 보강제 중의 1 내지 10 μ g 항원을 마우스의 발바닥으로 주사했다. 최종 추가접종 3 내지 4일 후, 배출성 림프절을 수집했다. 비장 유래의 B 세포 또는 림프절 세포를 종래 기술을 사용하여 SP2/O-Ag 14 세포(18)와 융합시켰다. 수용체 엑토도메인 융합 단백질에 대하여 하이브리도마 상청액을 선별하기 위해 ELISA를 융합 파트너 단독과 비교하여 또는 AP에 융합된

수용체 엑토도메인(16)에 대비해서 사용했다. 그 다음, 양성 세포는 전체 길이의 수용체 cDNA를 암호화하는 발현 플라스미드로 일시적으로 형질감염된 293F 세포를 사용하여 FACS로 선별했다. 선별한 하이브리도마는 단세포 클로닝하고, 무혈청 배지에 순응시킨 뒤, CELLline 플라스크(Intergra)에서 증대시켰다. 하이브리도마 상청액은 동량의 1.5M 글리신, 3M NaCl, 1x PBS, pH 7.8과 혼합하고, MabSelect 수지와 텀블링시켰다. 이 수지는 결합 완충액으로 세척하고, 0.1M 글리신 pH 2.7로 용출시켰다. 2M Tris로 중화한 후, mAb를 PBS에 대하여 투석했다.

<118> 직접 ELISA에 의한 정제된 항-LOX-1 모노클로날 항체의 특성규명: 이하 도면은 ELISA를 이용하여 여러 항-LOX-1 mAb의 상대적 친화성에 대해 검사한 실시예를 나타낸다(즉, LOX-1.Ig 단백질을 미량역가 평판 표면에 고정시키고, LOX-1.Ig에 결합하는 능력에 대해 용량 역가 시리즈로 검사했다(항마우스 IgG.HRP 접합체 시약으로 검출함). 패널들은 LOX-1.Ig 단백질에 대한 mAb 반응성(왼쪽); hIgGfc 단백질에 대한 mAb 반응성 (오른쪽), 및 LOX-1.알칼리성 포스파타제 융합 단백질에 대한 mAb 반응성(하단)이다. 후자의 경우에, mAb는 평판에 결합되고 (항마우스 IgG 시약을 통해), 용액 중의 일정한 양의 LOX-1.AP를 결합시킨다. 항-LOX-1 mAb는 LOX-1 엑토도메인에 시판 항-LOX-1 mAb보다 우수한 친화성으로 특이적으로 반응한다.

<119> 생체내 DC 및 시험관내 배양된 DC는 모두 LOX-1을 발현한다: 도 1은 정상 공여자 유래의 PBMC에서 발현되는 LOX-1의 발현 수준을 나타낸다. 이하 도 1A에 도시된 바와 같이, 항원제시세포, 예컨대 CD11c+ DC, CD14+ 단핵구 및 CD19+ B 세포는 LOX-1을 발현한다. CD3+ T 세포는 검출가능한 표면 LOX-1을 발현하지 않는다. 시험관내 배양된 DC와 정제된 혈액 골수계(mDC) 상의 LOX-1의 발현 수준은 도 1B에 제시했다. IL-4 및 IFNDC는 LOX-1의 유의적인 수준을 발현한다. mDC는 LOX-1의 높은 수준을 발현하지만, pDC는 LOX-1을 발현하지 않아서(제시되지 않음), 이러한 DC 서브세트들이 생체내에서 보유하는 여러 기능들로 인해, LOX-1을 통한 DC 처리가 고유 반응을 유도할 것이라는 것을 시사한다.

<120> LOX-1을 통한 시그널링은 DC를 활성화시키고 DC를 자극하여 사이토카인 및 케모카인을 생산한다: 수지상 세포는 활성화에 따라서 유도 또는 내성 중 하나인 면역 반응의 결과를 결정하는 일차 면역 세포이다(19). DC 활성화에서 LOX-1의 역할은 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 마우스 항-hLOX-1 mAb를 생산하는 8개의 다른 클론을 제조했고, 각 mAb가 DC를 활성화시키는지의 여부를 DC 표현형 및 DC로부터 분비되는 사이토카인과 케모카인을 측정하여 검사했다. 도 2A에 데이터는 PAB1, 4, 5, 8 및 10이 DC를 활성화시킬 수 있지만, 다른 항-LOX-1 mAb 또는 대조군 mAb는 DC를 활성화시키지 않았음(데이터는 미제시)을 보여준다. 또한, 도 2에 제시된 모든 mAb가 DC 성숙을 유도할 수 있기는 하지만, 각 mAb는 DC를 자극하여 다른 수준의 사이토카인과 케모카인을 생산했다.

<121> 도 3은 LOX-1을 통한 시그널링이 DC 활성화를 야기할 수 있음을 입증한다. IL-4DC는 LOX-1에 특이적인 mAb에 의해 자극되었고, 도 3A에 데이터는 LOX-1을 통한 시그널이 IL-4DC를 활성화시킬 수 있고, 결과적으로 CD86과 HLA-DR의 발현 증가를 초래한다는 것을 입증한다. LOX-1은 또한 IFNDC를 활성화시킬 수도 있다(제시되지 않음). LOX-1이 생체내 DC를 활성화시킬 수 있는지를 시험하기 위해, 정제된 mDC를 항-LOX-1로 24시간 동안 자극한 다음, 항-CD86, CD80 및 HLA-DR(이것들은 DC 활성화의 마커이다)로 염색했다. 도 3B에 도시된 것처럼, LOX-1은 또한 생체내 유도된 mDC를 활성화시켜 CD86, CD80 및 HLA-DR의 증가된 발현 수준을 나타낼 수 있다. 후자의 데이터는 이들이 생체의 세포에서 특정 항-LOX-1 mAb의 직접적인 생물학적 효과를 나타내기 때문에 특히 중요하다.

<122> LOX-1을 통한 시그널링은 DC의 독특한 활성화를 유도한다: LOX-1을 통한 DC 활성화를 더욱 상세하게 특성규명하기 위하여, 마이크로어레이 유전자 발현 분석을 수행했다. 도 4는 항-LOX-1 mAb가 여러 종류의 유전자를 상승조절 또는 억제조절하도록 DC를 자극하여, LOX-1을 통한 시그널이 DC 활성화의 독특한 패턴을 야기한다는 것을 보여준다. 이 데이터는 DC-ASGPR 및 CLEC-6(제시되지 않음)을 통한 시그널링과 비교했을 때, 각 세포 표면 DC 렉틴이 DC를 활성화시키기 위해 독특한 시그널을 전달한다는 것을 밝히고 있다. 따라서, 본 발명자들은 여러 시그널을 통해 활성화된 DC가 다른 면역 반응을 야기할 것으로 생각한다.

<123> LOX-1을 통한 시그널링은 DC를 활성화시켜 사이토카인과 케모카인을 분비한다: LOX-1 특이적 mAb로 자극된 DC는 케모카인 및 사이토카인 관련 유전자뿐만 아니라 공동자극성 분자를 비롯하여 다수 유전자의 증가된 수준을 발현한다(도 5A 및 B). 시험관내 배양된 IL-4DC 및 mDC는 모두 항-LOX-1 mAb로 자극되었을 때, 유의적으로 증가된 양의 분비형 IL-12p40, MCP-1 및 IL-8을 생산한다. 다른 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 TNFa, IL-6, MIP-1a, IL-1a 및 IL-1b 등의 증가된 수준도 항-LOX-1로 자극된 DC의 배양 상청액에서 관찰되었다. TLR2 및 TLR4 매개의 면역 세포 활성화에서 LLR의 기여 가능성은 종래 개시된 바 있다(14, 20).

<124> LOX-1을 통한 시그널링은 CD40 DC를 통한 시그널링을 증대시킨다 - LOX-1을 통한 시그널은 CD40을 통한 시그널과 상승작용하여 DC의 활성화를 증가시킨다(도 5). CD40-CD40L 상호작용 동안 LOX-1 유도는 활성화 마커 CD83의

급증된 세포 표면 발현(도 6A), 및 IL-12p70 및 IL-12p40의 분비 증가(도 6B)를 야기한다. 이는 LOX-1이 생체 내 DC 활성화 동안 공동자극성 분자로서 작용할 수 있고 LOX-1을 통해 활성화되는 물질(여기에 기술된 바와 같은 mAb, 또는 천연 또는 대용 LOX-1 리간드)의 광범위하게 관련된 치료학적 용도를 입증한다. 이를 종합해보면, 도 1 내지 도 6에 제시된 데이터는 LOX-1을 통한 시그널링이 DC를 활성화시킬 수 있고 LOX-1이 DC 활성화의 신규 공동자극성 분자임을 보여준다.

- <125> LOX-1을 통해 자극된 DC는 강력한 체액 면역 반응을 유도한다 - DC는 T-의존적 및 T-독립적 B 세포 반응의 시그널을 제공하고(21-24) 항원을 B 세포로 전달하여(25, 26) 체액 면역 반응에 중요한 역할을 한다. DC 외에, 제 3 시그널로서 TLR9를 통한 시그널링은 효과적인 B 세포 반응에 필수적이다(27, 28). LOX-1은 TLR9 리간드 CpG의 존재 하에 DC 매개된 체액 면역 반응에 영향을 미칠 수 있다. 6일 IL-4 DC를 항-LOX-1 mAb로 자극하고, 그 후 정제된 B 세포를 공동배양했다. 도 6A에 제시된 바와 같이, 항-LOX-1 mAb로 활성화된 DC는 대조군 mAb로 자극된 DC와 비교했을 때 현저하게 증가된 B 세포 증식(CFSE 희석을 통해 측정됨) 및 형질세포 분화(CD38⁺CD20⁻의 증가)를 야기한다. CD38⁺CD20⁻ B 세포는 형질세포의 전형적인 형태를 나타내지만, CD138을 발현하지는 못한다. 대다수의 증식성 세포는 CCR2, CCR4, CCR6 또는 CCR7을 발현하지 못한다.
- <126> 생산된 총 면역글로불린(Ig)의 양은 ELISA로 측정했다(도 7B). 도 7A의 데이터와 일관되게, 항-LOX-1에 의해 자극된 DC와 배양된 B 세포는 총 IgM의 유의적인 생산 증가를 초래했다. 총 Ig 증가외에도, LOX-1 유발에 의해 활성화된 DC는 B 세포에 의한 인플루엔자 바이러스 특이적 IgM, IgG 및 IgA(도 7C)의 생산에 있어서 대조군 mAb로 자극된 DC보다 훨씬 강력하여, LOX-1 매개의 DC 활성화가 전체 체액 면역 반응 및 항원 특이적 체액 면역 반응 모두에 기여한다는 것을 입증한다.
- <127> DC 유래 B 림프구 자극인자 단백질(BLyS, BAFF) 및 증식 유도성 리간드(APRIL)는 중요한 분자이며, 이로 인해 DC는 사람 B 세포 증식 및 기능을 직접 조절할 수 있다(29-32). 도 6D의 데이터는 LOX-1을 통해 자극된 DC가 BLyS은 아니지만(제시되지는 않음), 분비형 APRIL뿐만 아니라 세포내 APRIL의 발현 수준을 증가시킨다는 것을 보여준다. 혼합된 배양액에서 B세포상의 BLyS 및 APRIL 수용체의 발현 수준이 측정되었지만, 현저한 변화가 없었다(제시되지 않음). 이는 도 7E의 데이터를 통해 확인되었다. DC 및 B 세포 공동배양 동안, BAFF 수용체(BAFFR), TACI 및 BCMA의 배합물은 가용성 수용체-Fc 융합 단백질에 의해 차단되었다. IgM 및 IgA 생산은 모두 TACI 또는 BCMA가 차단되었을 때 유의적으로 감소되었다. 이것은 배양물에 BAFFR-Fc가 첨가되었을 때에는 관찰되지 않았고, 이는 항-LOX-1로 자극된 DC로부터 생산된 APRIL이 면역글로불린의 생산 증가에 중요한 역할을 한다는 것을 입증한다.
- <128> 상기 발견들은 LOX-1을 통해 특이적으로 활성화하는 물질의 치료학적 용도들에 대해, 예컨대 백신접종의 보강제로서 또는 면역억제된 개체의 면역계 자극제로서 상당한 함축성이 있다. 또한, 상기 발견은 LOX-1을 통해 자연 또는 이상 조절된 활성화의 차단이 여러 용도(예컨대 이식 환경에서 내성의 유도 또는 자가면역 질환의 경감)를 가질 수 있을 것이라는 것을 예언한다.
- <129> 항-LOX-1 mAb는 B 세포를 활성화시킨다: CD19⁺ B 세포는 LOX-1을 발현하고(도 1 및 도 8A), 이는 B 세포에서 발현된 LOX-1의 역할을 예고한다. 도 8B의 데이터는 B 세포 상의 LOX-1의 유발이 분비형 IL-8 및 MIP-1a의 생산 증가를 야기하고, 이는 LOX-1이 직접 B 세포 활성화에 기여할 수 있음을 시사한다는 것을 보여준다. IL-8 및 MIP-1a 외에도, B 세포가 항-LOX-1 mAb에 의해 자극되었을 때 대조군 mAb에 비해 IL-6 및 TNF α 의 약간의 증가도 관찰되었다. 도 8C는 항-LOX-1 mAb에 의해 활성화된 B 세포가 총 IgG, IgM 및 IgA의 증가량을 분비한다는 것을 보여준다.
- <130> 상기 LOX-1의 유도를 통해 B 세포에 직접 영향을 미친다는 발견은 LOX-1을 통해 또는 LOX-1에 대항하여 작용하는 제제들의 상기 개략된 치료학적 용도의 범위를 증대시킨다.
- <131> T 세포 반응에서 LOX-1의 역할 - LOX-1을 통해 자극된 DC는 증가된 수준의 공동자극성 분자를 발현하고 증가량의 사이토카인 및 케모카인을 생산하며(도 1 및 3), 이는 LOX-1이 체액 면역 반응뿐만 아니라 세포 면역 반응에도 기여한다는 것을 시사한다. 이는 혼합 림프구 반응(MLR)으로 검사했다. 정제된 동종이계 T 세포의 증식은 LOX-1에 특이적인 mAb로 자극된 DC에 의해 유의적으로 증대되었다(도 9A). 또한, LOX-1을 통해 활성화된 DC는 대조군 mAb로 자극된 DC(도 9B의 상부 패널)보다 더욱 효율적으로 Mart-1 특이적 CD8 T 세포를 초회감작시킨다. 더욱 중요하게는, LOX-1을 통한 시그널링이 DC로 하여 CD8 T 세포에 대해 Mart-1 펩타이드를 교차-초회감작(cross-prime)하게 한다는 것이다(도 9C의 하단 패널). 도 9B 및 9C의 오른쪽 패널은 각각 5명과 4명의 다른 정상 공여자 유래의 세포에 의해 획득된 데이터를 나타낸 것이다. 이는 LOX-1이 DC 기능의 증대에 중요한 역할을

하여, CD8 T 세포에 대한 항원의 초회감작 및 교차-초회감작을 향상시킨다는 것을 시사한다. 또한, 항-LOX-1 mAb 및 항원 융합 단백질은 또한 대조군 mAb 융합 단백질보다 더욱 강력한 항원 특이적 CD8 T 세포 반응을 유도한다. IL-4DC에 Flu M1 단백질을 보유한 mAb 접합체 10nM 또는 1nM을 로딩하고, 자기 CD8+ T 세포를 7일 동안 공동배양했다. 세포는 항-CD8 및 Flu M1 4량체를 염색했다. 도 9D의 데이터는 항-LOX-1 융합 단백질이 유의적으로 증강된 Flu M1 특이적 CD8 T 세포 반응을 유도했음을 입증한다.

<132> DC의 LOX-1 활성화는 이웃 T 세포에 영향을 미쳐 증식 증가를 유도하는 것으로 발견되었다. 더욱이, 이러한 상호작용 동안 항원이 존재할 때에는 LOX-1 활성화된 DC는 항원 특이적 T 세포의 증대를 증가시킨다. 이는, LOX-1 활성화가 예컨대 백신 환경에서, 항원 특이적 천연 T 세포의 선택적 증대를 유도할 수 있고, 이것은 B 세포에 대한 상기 LOX-1 활성화의 직접 또는 간접 효과와 함께 항원 특이적 B 세포의 증대, 및 이에 따라 항원 특이적 항체의 생산을 분명하게 예고한다는 것을 나타낸다. 항-LOX-1 유용성의 추가 증거는 항-LOX-1 mAb 접합체를 통해 항원이 DC로 직접 집중될 때 DC가 항원 특이적 기억 CD8+ 세포의 증대를 유도한다는 점이다.

<133> 사람을 제외한 영장류의 생체내 DC는 LOX-1을 발현한다 - 사람을 제외한 영장류(사노노몰거스)의 혈액 DC가 항-LOX-1 mAb에 의해 인식되는지를 검사하기 위해, 원숭이 PBMC를 항-LOX-1 mAb 및 다른 세포 마커, CD3, CD14, CD11c, CD27, CD56 및 CD16에 대한 항체로 염색했다. 도 10의 데이터는 CD14 및 CD11c+ 세포가 항-LOX-1 mAb에 의해 염색되었음을 입증한다. CD14+ 및 CD11c+ 세포와 달리, CD3+, CD16+, CD27+ 및 CD56+ 세포는 LOX-1을 발현하지 않았다. 이러한 데이터는 원숭이 항원제시세포에 대한 특정한 항-LOX-1 mAb의 교차반응성을 증명한다. 이는 원숭이가 계획된 사람 치료법의 효능 및 안전한 연구 모두에 대해 확실한 모델로서 사용될 수 있는 바, 본 명세서에 기술된 본 발명을 실행할 필요성을 상당히 감소시킨다.

<134> 도 11은 전립선암에 대한 백신접종을 목적으로, 항원제시세포의 표면으로 전립선 특이적 항원(강조된 회색)을 유도할 수 있는, 항-LOX-1-15C4.PSA를 비롯한 전형적인 rAb. 항원 융합 단백질의 환원 SDS.PAGE 분석을 나타낸 것이다.

<135> 도 12 및 13은 결합된 항원을 LOX-1 보유 세포의 표면으로 전달하는 항-LOX-1 rAb의 능력을 직접 증명한다.

<136> 도 14A 및 14B는 항-LOX-1 mAb로 활성화된 DC에 의한 B 세포의 점막 귀소(mucosal-homing)를 나타낸다. 도 14B는 B 세포 상의 점막 동족체 수용체의 발현 수준이 측정되었음을 나타낸다. 항-LOX-1에 의해 활성화된 DC와 공동배양된 순수 B세포는 대조 면역글로불린(Ig)에 의해 자극된 DC와 배양된 B 세포보다 더 양호하게 증식한다(도 14A의 상단 2개의 패널). 향상된 증식 및 형질세포 분화로, 항-LOX-1 mAb로 자극된 DC와 공동배양된 순수 B 세포는 CCR10을 발현한다. 이 B 세포는 CCL28에 반응하여 이동할 수 있다. CCR10은 원위의 창자 귀소 수용체로 알려져 있지만, 최근 연구는 호흡기 점막도 상당량의 CCL28을 발현한다는 것을 보여준다. 따라서, CCR10은 현재 점막 귀소 수용체인 것으로 입증되어 있다.

<137> 도 14B는 LOX-1을 통해 활성화된 DC와 상호작용하는 B 세포가 점막으로 귀소하도록 프로그램되어 있음을 보여준다. 이러한 DC가 B 세포 증식, 형질 유사 세포로의 분화 및 면역글로불린(LOX-1을 통한 항원 표적화와 LOX-1 활성화가 관련이 있을 때 항원 특이적 Ig를 포함하여)의 분비 증가를 활성화시킨다는 것을 보여주는 데이터와 함께, 이러한 B 세포 CCR10의 발현 증가는 LOX-1 활성화 및 항원 특이적 점막 면역성을 유발하기 위한 항원 표적화의 높은 가능성을 입증한다.

<138> 도 15는 항-LOX-1 mAb가 IgA1 및 IgA2의 생산 증가에 기여한다는 것을 보여준다. 다음으로, 항-LOX-1 mAb에 의해 활성화된 DC가 IgA1 및 IgA2를 생산하도록 순수 B 세포를 유도할 수 있는지를 측정했다. 순수 B 세포(IgD+CD27-)는 FACS 분류법으로 정제했다. 도 15는 항-LOX-1에 의해 활성화된 DC와 배양된 순수 B 세포가 유의적으로 증가된 IgA1 및 IgA2 생산을 야기한다는 것을 입증한다. 또한, IgM 및 IgG 수준도 항-LOX-1로 자극된 DC에 의해 증가되었다. 이를 종합하면, DC-렉틴, 특히 LOX-1을 통한 DC의 활성화는 체액 면역 반응을 증강시킬 수 있다. 특히, DC에 의해 유도된 B 세포는 점막 귀소 수용체, CCR10을 발현하고 IgA1 및 IgA2를 생산할 수 있다. 따라서, 항-LOX-1로 제조된 백신은 강력한 점막 면역 반응을 유도할 것이다.

<139> 도 16은 항-LOX-1 및 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA1, H1N1, PR8)의 재조합 융합 단백질이 로딩된 DC가 flu 특이적 IgM을 분비하도록 순수 B 세포를 유도한다는 것을 입증한다. 항-LOX-1과 비교했을 때, 항-ASGPR 및 항-CLEC-6의 HA1 융합 단백질들은 모두 약한 반응을 야기했다. 항-LOX-1-HA5가 로딩된 DC와 공동배양된 순수 B 세포 역시 HA1 특이적 IgM을 생산했다. 이를 종합해 볼 때, 항-렉틴 mAb 및 항원으로 제조된 백신은 바이러스 감염을 방지하는 강력한 점막 IgA1 및 IgA2 반응을 유도할 수 있다.

<140> 도 17은 항-LOX-1-HA5 표적화된 DC가 또한 HA5 특이적 CD4+ T 세포를 증대시키는 능력을 갖고 있고, 이는 강력

한 백신으로서 본 발명의 유용성을 추가로 증명하는 것임을 보여준다.

- <141> 도 18은 항-LOX-1 백신이 DC-서브세트 특이적 면역 반응을 유도한다는 것을 보여준다. 항-LOX-1-HA5 백신에 의해 표적화된 여러 DC 서브세트가 HA5 펩타이드로의 자극에 의해 정의되는, HA5 특이적 T 세포의 증대에 의해 증명되는 다양한 범위의 면역 반응을 유도하는지를 측정했다. 따라서, 동일한 항원을 여러 DC 아형으로 표적화함으로써 항-LOX-1계 백신은 그 항원에 대해 지향성인 광범위한 면역 반응을 야기한다. 또한, 이 데이터들은 IFN γ 의 생산을 통해 특징지어지듯이, 작동세포일 것으로 강하게 예상되는 항원 특이적 T 세포 반응을 유도하는데 있어서 항-LOX-1 표적화 백신의 바람직한 성질을 강조한다.
- <142> 도 19는 머카크 LOX-1에 대한 항-LOX-1 항체의 교차 반응성을 나타낸다. 4가지 변형 LOX-1 cDNA에 해당하는 cDNA 클론을 머카크에서 분리하여 포유동물 발현 벡터에 배치했다. 도 19는 사람 LOX-1 발현 벡터로 형질감염된 293F 세포 대 상기 발현 벡터로 형질감염된 293F 세포에 대한 3개의 특히 바람직한 항사람 LOX-1 항체의 FACS 분석 결과를 도시한 것이다. 이 결과는 검사된 2종의 mAb 모두(15C4 및 11C8)가 검사된 3종의 머카크 LOX-1 변형체 모두와 교차반응하는 반면, 10F9는 변형체 중 하나와 교차반응한다는 것을 보여준다. 이러한 교차 반응성은 사람 임상 실험 전에 NHP 모델에서의 기전을 기반으로 한 독성 및 효능 검사를 가능하게 하기 때문에 바람직하다.
- <143> 도 20은 사람 LOX-1과 머카크 유래의 4가지 서열 변형체(5U1-5U4)의 Clustal W 정렬을 나타낸 것이다.
- <144> 도 21A 내지 21D는 LOX-1을 통해 전달된 항원이 항원 특이적 CD4 T 세포 반응을 제공한다는 것을 보여준다. 항-LOX-1-HA1 및 대조군 Ig-HA1의 결합 친화성을 검사했다(도 21A). 항-LOX-1-HA1과 대조군 Ig-HA1은 모두 단핵구 유래의 IFNDC에 결합할 수 있지만, DC에는 항-LOX-1-HA1이 대조군 Ig-HA1보다 약간 더 잘 결합했다. 항-LOX-1-HA1 또는 대조군 Ig-HA1이 로딩된 DC에 의해 유도된 CD4 T 세포 증식을 측정했다. 도 21B는 항-LOX-1-HA1이 로딩된 IFNDC가 대조군 Ig-HA1(7%)보다 높게 CD4 T 세포 증식(69%)을 유도했음을 보여준다.
- <145> 증식성 CD4 T 세포가 항원(HA1) 특이적인지 또는 아닌지를 측정하기 위해, 항-LOX-1-HA1이 로딩된 DC에 의해 증대된 CD4 T 세포를 HA1의 펩타이드 풀이 로딩된 IFNDC로 재자극시켰다. 도 21C는 펩타이드 풀 37-48이 비교적 높은 빈도의 IFN γ -생산성 CD4 T 세포를 야기한다는 것을 보여준다. 펩타이드 풀 37-48 중의 각 펩타이드에 대한 CD4 T 세포의 반응성도 측정했다. 도 21D는 CD4 T 세포가 3가지 펩타이드, 펩타이드 43, 펩타이드 44 및 펩타이드 45에 대한 반응으로 세포내 IFN γ 를 생산한다는 것을 보여준다. 이를 종합해보면, 이 데이터들은 항-LOX-1-HA1에 의한 사람 DC의 표적화가 항원 특이적 CD4 T 세포 반응을 유도할 수 있음을 증명한다.
- <146> 본 명세서에서 논한 모든 구체예는 본 발명의 모든 방법, 키트, 시약 또는 조성물로 실행될 수 있으며, 그 반대로도 실행될 수 있는 것으로 생각되어야 한다. 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하는데 사용될 수 있다.
- <147> 물론, 본 명세서에 기술된 특정 양태들은 본 발명을 제한하는 것이 아닌, 예시적으로 나타내는 것이다. 본 발명의 주요 특징은 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 다양한 구체예에 이용될 수 있다. 당업자는 통상의 실험만으로도 본 명세서에 기술된 특정 절차들에 대한 다양한 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주되며 청구의 범위 안에 포함되는 것이다.
- <148> 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌 및 특허출원은 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련된 자의 수준을 나타낸다. 모든 공개문헌과 특허출원은 각각의 공개문헌 또는 특허출원이 특별하게 개별적으로 참고인용되는 것으로 표시되었지만 동일한 정도로 참고인용된 것이다.
- <149> 청구의 범위 및/또는 명세서에서 "포함하는"이란 용어와 함께 사용된 단수 용어의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나보다 많은"의 의미와도 일치한다. 청구의 범위에서 "또는"이란 용어의 사용은 명세서가 대체예만을 언급하는 정의 및 "및/또는"을 의미하는 정의를 지지하고 있더라도, 단지 대체예만을 언급하는 것으로 분명하게 표시되거나 또는 대체예가 호환 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다. 본 출원을 통해, "약"이란 용어는 장치의 고유 오차 변동, 값을 측정하는데 이용된 방법 또는 연구 피검체 간에 존재하는 변동이 값에 포함된다는 것을 나타내기 위해 사용된 것이다.
- <150> 본 명세서와 청구항(들)에 사용된 "포함하는"(및 '포함하는'의 모든 형태, 예컨대 "포함한다"), "보유하는"(및 '보유하는'의 모든 형태, 예컨대 "보유한다"), "포함하는"(및 '포함하는'의 모든 형태, 예컨대 "포함한다") 또는 "함유하는"(및 '함유하는'의 모든 형태, 예컨대 "함유한다")이란 용어들은 포괄적 또는 비제한적이며, 언급되지 않은 추가 요소 또는 방법 단계들을 배제하지 않는다.

<151> 본 명세서에 사용된 "또는 이의 조합"이란 용어는 이 용어 앞에 열거된 품목들의 모든 과돌연변이 및 조합을 의미한다. 예를 들어, "A, B, C 또는 이의 조합"은 A, B, C, AB, AC, BC 또는 ABC, 및 특정 상황에서 순서가 중요하다면, BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC 또는 CAB 중 적어도 하나를 포함하는 것으로 생각한다. 이 예를 계속해서 들면, 하나 이상의 품목 또는 용어의 반복체를 함유하는 조합, 예컨대 BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB 등도 분명하게 포함된다. 당업자는 전후상황에서 다른 분명한 언급이 없는 한, 모든 조합에서 품목 또는 용어의 수에 일반적으로 제한이 없다는 것을 이해할 것이다.

<152> 본 명세서에 개시되고 권리주장되는 모든 조성물 및/또는 방법은 본 발명의 개시에 비추어 과도한 실험없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법은 바람직한 구체예를 들어 설명했지만, 본 발명의 개념, 취지 및 범위 내에서 조성물 및/또는 방법, 본 명세서에 기술된 방법의 단계 또는 단계의 순서에서 변형이 있을 수 있다는 것을 당업자라면 잘 알고 있을 것이다. 당업자에게 자명한 이러한 유사한 대체물 및 변형은 모두 이하 청구의 범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주한다.

<153> 참고문헌

1. Delneste, Y., G. Magistrelli, J. Gauchat, J. Haeuw, J. Aubry, K. Nakamura, N. Kawakami-Honda, L. Goetsch, T. Sawamura, J. Bonnefoy, and P. Jeannin. 2002. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17:353-362.
2. Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2:77-84.
3. Pyz, E., A. S. Marshall, S. Gordon, and G. D. Brown. 2006. C-type lectin-like receptors on myeloid cells. *Ann Med* 38:242-251.
4. Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* 6:33-43.
5. Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1:353-357.
6. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585.

<154>

7. d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191:1661-1674.
8. Fradin, C., D. Poulain, and T. Jouault. 2000. beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* 68:4391-4398.
9. Cambi, A., K. Gijzen, J. M. de Vries, R. Torensma, B. Joosten, G. J. Adema, M. G. Netea, B. J. Kullberg, L. Romani, and C. G. Figdor. 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33:532-538.
10. Netea, M. G., J. W. Meer, I. Verschueren, and B. J. Kullberg. 2002. CD40/CD40 ligand interactions in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection: the role of macrophage-derived nitric oxide. *Eur J Immunol* 32:1455-1463.
11. Lee, S. J., S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen, and M. C. Nussenzweig. 2002. Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295:1898-1901.
12. Maeda, N., J. Nigou, J. L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P. H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 278:5513-5516.
13. Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, and O. Neyrolles. 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197:121-127.
14. Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandembroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. Van Kooyk. 2003. *Mycobacteria* target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197:7-17.
15. Cooper, A. M., A. Kipnis, J. Turner, J. Magram, J. Ferrante, and I. M. Orme. 2002. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 168:1322-1327.

<155>

16. Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, S. Patel, J. S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone, and S. Saeland. 1999. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 163:1973-1983.
17. Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-795.
18. Shulman, M., C. D. Wilde, G. Kohler, M. J. Shulman, N. S. Rees, D. Atefi, J. T. Horney, S. B. Eaton, W. Whaley, J. T. Galambos, H. Hengartner, L. R. Shapiro, and L. Zemel. 1978.
19. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
20. Jeannin, P., B. Bottazzi, M. Sironi, A. Doni, M. Rusnati, M. Presta, V. Maina, G. Magistrelli, J. F. Haeuw, G. Hoeffel, N. Thieblemont, N. Corvaia, C. Garlanda, Y. Delneste, and A. Mantovani. 2005. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 22:551-560.
21. Wykes, M., and G. MacPherson. 2000. Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology* 100:1-3.
22. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17:341-352.
23. Kikuchi, T., S. Worgall, R. Singh, M. A. Moore, and R. G. Crystal. 2000. Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells. *Nat Med* 6:1154-1159.
24. Dubois, B., J. M. Bridon, J. Fayette, C. Barthelemy, J. Banchereau, C. Caux, and F. Briere. 1999. Dendritic cells directly modulate B cell growth and differentiation. *J Leukoc Biol* 66:224-230.
25. Qi, H., J. G. Egen, A. Y. Huang, and R. N. Germain. 2006. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312:1672-1676.
26. Bergtold, A., D. D. Desai, A. Gavhane, and R. Clynes. 2005. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23:503-514.

<156>

27. Ruprecht, C. R., and A. Lanzavecchia. 2006. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 36:810-816.

28. Bernasconi, N. L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298:2199-2202.

29. Moore, P. A., O. Belvedere, A. Orr, K. Pieri, D. W. LaFleur, P. Feng, D. Soppet, M. Charters, R. Gentz, D. Parmelee, Y. Li, O. Galperina, J. Giri, V. Roschke, B. Nardelli, J. Carrell, S. Sosnovtseva, W. Greenfield, S. M. Ruben, H. S. Olsen, J. Fikes, and D. M. Hilbert. 1999. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science* 285:260-263.

30. Gross, J. A., J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S. R. Dillon, K. Madden, W. Xu, J. Parrish-Novak, D. Foster, C. Lofton-Day, M. Moore, A. Littau, A. Grossman, H. Haugen, K. Foley, H. Blumberg, K. Harrison, W. Kindsvogel, and C. H. Clegg. 2000. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature* 404:995-999.

31. Craxton, A., D. Magaletti, E. J. Ryan, and E. A. Clark. 2003. Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF. *Blood* 101:4464-4471.

32. MacLennan, I., and C. Vinuesa. 2002. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17:235-238.

<157>

도면의 간단한 설명

- <18> 본 발명의 특징과 장점의 더욱 완전한 이해를 위해, 이제 본 발명의 상세한 설명을 첨부 도면과 함께 언급한다.
- <19> 도 1A, 1B 및 1C. 생체내 및 시험관내 배양된 DC가 모두 LOX-1을 발현한다는 것을 보여준다. 도 1A는 항-LOX-1 mAb와 함께 항-CD11c, CD14, CD19 및 CD3으로 염색된 정상 공여자 유래의 PBMC를 도시한 것이다. 각 항체로 염색된 세포는 LOX-1의 발현 수준을 측정하기 위해 게이트(gate)화되었다. 도 1B는 IL-4(IL-4DC) 또는 IFN α (IFNDC)와 함께 GM-CSF의 존재하에 배양하고 항-LOX-1 mAb로 염색한, 정상 공여자 유래의 단핵구를 도시한 것이다. C. 골수성 DC(Lin-HLA-DR + CD11c + CD123-)는 FACS 분리기로 혈액으로부터 정제하고, 항-LOX-1 mAb로 염색했다.
- <20> 도 1C는 용액 중의 LOX-1 엑토도메인을 포획하는 결합 등급 순위 15C4>10F9>1G6>>시판 항-LOX-1을 나타낸다. 15C4-10-1 및 15C4.1은 최초 15C4 하이브리도마의 2개의 서브클론 유래의 2가지 독립된 항체 제조물이다.
- <21> 도 2A 및 2B는 항-LOX-1 mAb가 DC를 활성화시키는 것을 보여준다. IFNDC는 mAb의 여러 클론으로 코팅된 평판에서 18시간 동안 배양했다. 도 2A. 세포를 항-CD86으로 염색했다. 도 2B. 사이토카인과 케모카인을 측정하기 위해 배양 상청액을 루미넥스(Luminex)로 분석했다.
- <22> 도 3A 및 3B는 항-LOX-1 mAb가 DC를 활성화시키는 것을 보여준다. 도 3A는 IL-4DC를 항-LOX-1로 24시간 동안 자극하고, 그 후 세포를 항-CD86과 HLA-DR로 염색했다. 도 3B. FACS 분류에 의해 혈액으로부터 골수성 DC를 정제하고, 세포를 항-CD86, CD80 및 HLA-DR로 염색했다.
- <23> 도 4는 항-LOX-1 또는 대조군 mAb로 10시간 동안 자극된 IL-4DC의 유전자 발현 프로필을 나타낸 것이다. 총 RNA는 RNeasy 컬럼(Qiagen)으로 추출하고, 2100 Bioanalyser(Agilent)로 분석했다. 비오틴-표지된 cRNA 표적은 Illumina 토탈프렙 라벨링 키트(totalprep labeling kit)(Ambion)를 사용하여 준비하고 Sentrix Human6 BeadChips(46K 전사체)에 하이브리드화했다. 이 마이크로어레이는 실리콘 웨이퍼 표면에 에칭된 마이크로웰에 담긴 3 μ m 비드에 부착된 50량체 올리고뉴클레오타이드 프로브로 구성되어 있다. 스트렙타비딘-Cy3으로 염색한 후, 어레이 표면은 Illumina(Beadstation 500X)에서 제조한 서브마이크론 해상도 스캐너를 이용하여 영상화시켰다. 데이터를 분석하기 위해 유전자 발현 분석 소프트웨어 프로그램(GeneSpring, Version 7.1(Agilent))을 사용했다.
- <24> 도 5A 및 5B는 항-LOX-1로 활성화된 DC가 사이토카인 및 케모카인의 증가량을 생산한다는 것을 나타낸 것이다. 도 1A 및 1B에 설명된 바와 같이 시험관내 배양된 IL-4DC 및 정제된 mDC(1x10⁵/200 μ l)를 각각 항-LOX-1 mAb(2 μ g/웰)가 코팅된 평판에서 18시간 동안 배양했다. 배양 상청액을 루미넥스(Luminex)로 분석하여 사이토카인과 케

모카인을 측정했다.

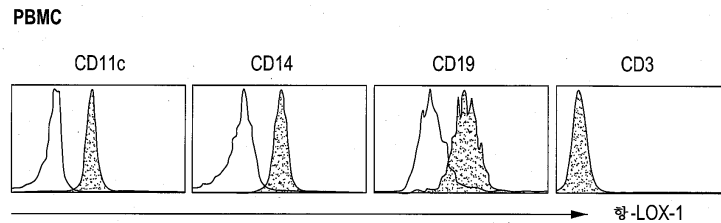
- <25> 도 6A 및 6B는 항-LOX-1 항체 및 CD40 리간드가 상승작용으로 DC를 활성화시킨다는 것을 입증한다. IL-4DC(2×10^5 /200 μ l/웰)를 항-LOX-1이 코팅된 96웰 평판에서 가용성 CD40L(20ng/ml)의 존재 또는 부재 하에 18시간 동안 배양했다. 또한, 대조군 mAb도 검사했다. 18시간 후 세포는 항-CD83으로 염색하고, 배양 상청액을 루미넥스로 분석하여 사이토카인과 케모카인을 측정했다.
- <26> 도 7A 내지 7F는 DC에서 발현된 LOX-1이 체액 면역 반응의 증강에 기여한다는 것을 보여준다. 6일 GM/IL-4 DC, 5×10^3 /웰을 항-LOX-1 또는 대조군 mAb가 코팅된 96웰 평판에서 16-18시간 동안 항온배양한 다음, CFSE로 염색된 1×10^5 자기 CD19+ B 세포를 20 단위/ml IL-2 및 50nM CpG의 존재 하에 공동배양했다. 도 7A: 형광 표지된 항체로 염색한 세포의 6일째 염색 결과를 나타낸다. CD3+ 및 7-AAD+ 세포가 게이트아웃(gate out)되었다. CD38+ 및 CFSE- 세포는 FACS 분류기로 정제하고 검사 염색을 수행했다. 도 7B는 13일째 배양 상청액을 샌드위치 ELISA법으로 총 IgM에 대해 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 7C는 열불활성화된 인플루엔자 바이러스(PR8) 5moi로 펄스화하고 B 세포와 배양한 DC를 나타낸 것이다. 도 7D는 50nM CpG의 존재(하단 패널) 또는 부재(상단 패널) 하에 mAb 코팅된 평판에서 배양된 백혈구 연층(buffy coat) 유래의 CFSE 표지된 5×10^5 PBMC의 결과를 나타낸다. 세포는 7일째 항-CD38로 염색했다. CD3⁺ 및 7-AAD⁺ 세포가 게이트아웃되었다. 도 7E는 PBMC 배양물 유래의 배양 상청액을 13일째 ELISA로 총 Ig에 대해 측정하여 분석한 결과를 나타낸다. 도 7F는 6일 GM/IL-4DC를 mAb 코팅된 평판에서 48시간 동안 배양하고 세포의 세포내 염색을 통해 APRIL의 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸다. 점선은 대조군 항체로 염색된 세포이다. 가는선과 굵은선은 각각 항-LOX-1 mAb 또는 대조군 mAb로 코팅된 평판에서 배양된 세포를 나타낸다. 데이터는 3명의 다른 정상 공여자 유래의 세포를 각각 사용한 2회의 별개의 실험의 대표값이다.
- <27> 도 8A 내지 8C는 B 세포에서 발현된 LOX-1이 B 세포 활성화 및 면역글로블린 생산에 기여한다는 것을 나타낸다. 도 8A는 백혈구 연층 유래의 PBMC를 항-CD19, 항-CD3 및 항-LOX-1 또는 대조군 mAb로 염색한 결과이다. CD19⁺ 세포는 게이트화하고 CD19⁺ B 세포 상에서의 분자의 발현 수준은 유세포분석으로 측정했다. 도 8B는 CD19+ B 세포를 상기 mAb로 코팅된 평판에서 16-18시간 동안 배양한 뒤, 배양 상청액을 루미넥스로 사이토카인과 케모카인에 대해 분석한 결과를 나타낸다. 도 8C는 1×10^5 CD19+ B 세포를 상기 mAb로 코팅된 평판에서 13일 동안 배양한 결과를 나타낸다. 총 Ig 수준은 ELISA로 측정했다. 데이터는 3명의 다른 정상 공여자 유래의 세포를 사용하여 2회 반복 실험한 값을 나타낸다.
- <28> 도 9A 내지 9D는 DC에서 발현된 LOX-1이 증강된 세포 면역 반응에 기여한다는 것을 입증한다. 도 9A. 5×10^3 의 6일 GM/IL-4 DC를 항-LOX-1 또는 대조군 mAb가 코팅된 평판에서 16-18시간 동안 배양한 뒤, 정제된 동종이형 T 세포를 공동배양했다. 세포는 수집하기 전에 18시간 동안 ³[H]-티미딘 1 μ Ci/웰로 펄스화했다. ³[H]-티미딘 흡수는 베타계수기로 측정했다. 도 9B 및 9C는 6일 GM/IL-4 DC(5×10^3 /웰)를 상기 mAb로 코팅된 평판에서 20 μ M Mart-1 펩타이드(A) 또는 27 μ g/ml Mart-1의 재조합 융합 단백질(B)의 존재 하에 16시간 동안 항온배양했다. 2×10^6 정제된 자기 CD8 T 세포는 10일 동안 공동배양했다. 2일째, 배양물에 20 단위/ml의 IL-2 및 10 단위/ml의 IL-7을 첨가했다. 세포는 항-CD8 및 Mart-1-4량체로 염색했다. 도 9C. 상기 mAb로 코팅된 평판에서 0.1 μ M Flu M1 펩타이드와 1주일 동안 배양된 백혈구 연층 유래의 5×10^5 PBMC를 나타낸다. 세포는 항-CD8 및 Flu M1 4량체로 염색했다. D. IL-4DC에 10nM 또는 1nM의 항-LOX-1-Flu M1 또는 대조군 Ig-Flu-M1 융합 단백질을 2시간 동안 로딩했다. 2×10^6 정제된 자기 CD8 T 세포를 7일 동안 공동배양했다. 세포를 항-CD8 및 Flu M1-특이적 4량체로 염색했다.
- <29> 도 10은 항-LOX-1 mAb 및 세포 표면 마커에 대한 항체로 염색한, 사람을 제외한 영장류(사노모겔거스) 유래의 PBMC를 나타낸다.
- <30> 도 11은 전립선 암에 대한 백신접종을 목적으로 항원제시세포의 표면으로 전립선 특이적 항원(강조된 회색)을 유도할 수 있는, 항-LOX-1.15C4.PSA를 비롯한 전형적인 rAb.항원 융합 단백질의 환원 SDS.PAGE 분석 결과이다.
- <31> 도 12는 LOX-1 cDNA로 형질감염된 CHO 세포의 표면으로 Flu M1을 전달하는 항-LOX-1.Doc:Coh.Flu M1 복합체를 도시한 것이다. 1 μ g/ml(적색 플롯)의 항-LOX-1.Doc rAb 또는 대조군 hIgG4.Doc rAb(녹색 플롯)를 비오틴화된

Coh.Flu M1(2 μ g/ml)과 실온에서 1시간 동안 항온배양했다. 형질감염된 CHO 세포를 첨가하고, 얼음에서 20분 동안 계속 항온처리했다. 그 다음, 세포를 세척하고 PE-표지된 스트렙타비딘으로 염색했다. 그 다음, 세포를 PE 형광도에 대해 분석했다(X축은 강도이다). 형질감염되지 않은 CHO 세포에 대한 항-LOX-1.Doc 복합체의 플롯은 황색으로 나타냈다.

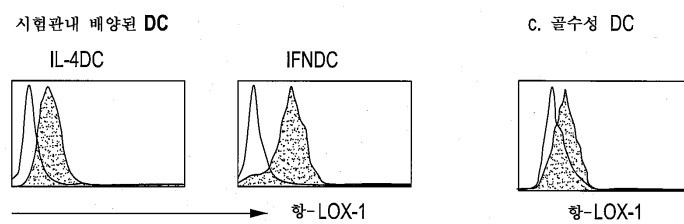
- <32> 도 13은 사람 편도 절편의 항-LOX-1 mAb 염색 결과이다. 적색으로 염색된 세포는 배중심 주변 영역에 있는 LOX-1 보유 세포의 특정 집단이다. 항-LOX-1 mAb로 염색한 이 조직과 다른 조직은 인체의 매우 특정 조직 세포가 LOX-1을 발현한다는 것을 나타낸다. 이러한 방법은, 예컨대 항원 표적화를 위해 개발된 mAb가 특이적이고 LOX-1을 보유하는 세포가 체내에 존재하여 치료용 항-LOX-1 제제의 준비된 표적임을 입증하는데 사용될 수 있다.
- <33> 도 14A 및 14B는 항-LOX-1 mAb로 활성화된 DC에 의한 B 세포의 점막 귀소(mucosal-homing)를 나타낸다.
- <34> 도 15는 항-LOX-1 mAb가 IgA1 및 IgA2의 생산 증강에 기여한다는 것을 보여준다.
- <35> 도 18은 항-LOX-1 백신이 DC-서브세트 특이적 면역 반응을 유도할 수 있음을 보여준다.
- <36> 도 19는 머카크 LOX-1에 대한 항-LOX-1 항체의 교차 반응성을 나타낸다.
- <37> 도 20은 사람 LOX-1과 머카크 유래의 4가지 서열 변형체(5U1-5U4)의 Clustal W 정렬을 나타낸 것이다.
- <38> 도 21A 내지 21D는 LOX-1을 통해 전달된 항원이 항원 특이적 CD4 T 세포 반응을 제공한다는 것을 보여준다.

도면

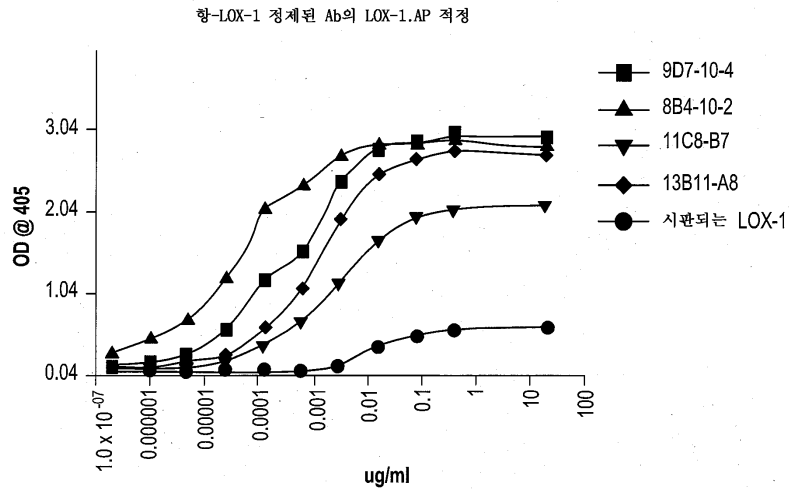
도면1A



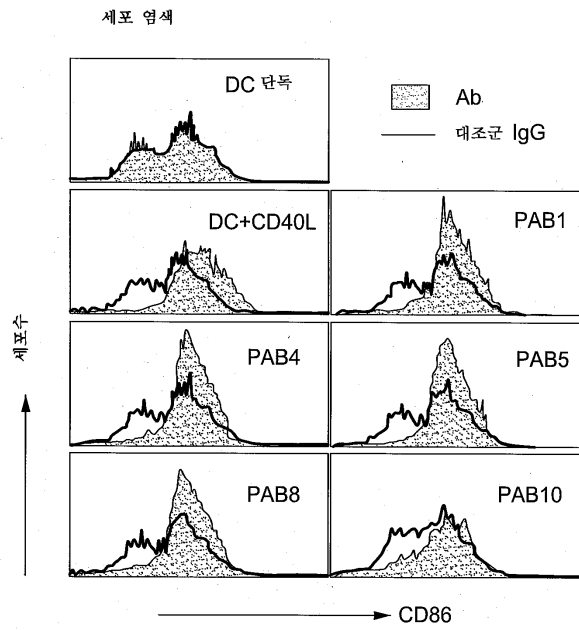
도면1B



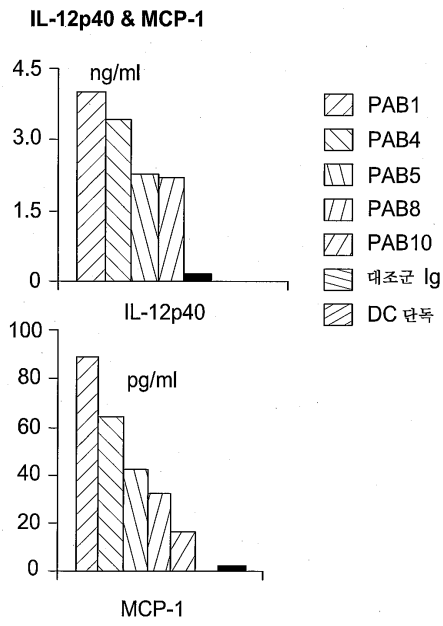
도면1C



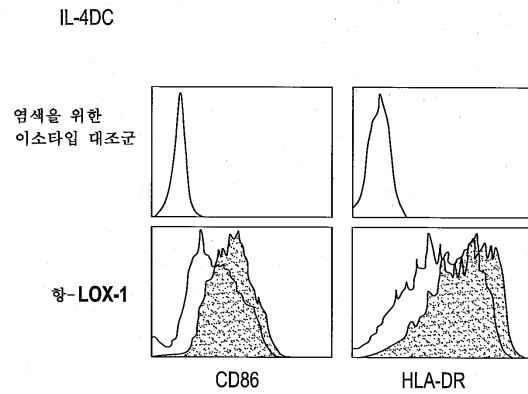
도면2A



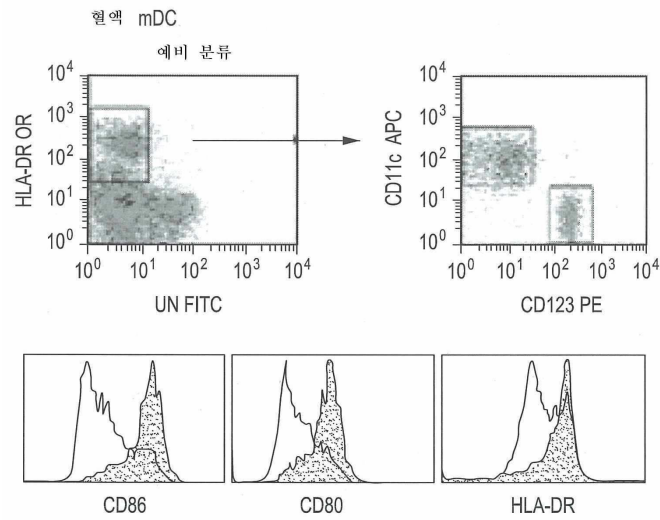
도면2B



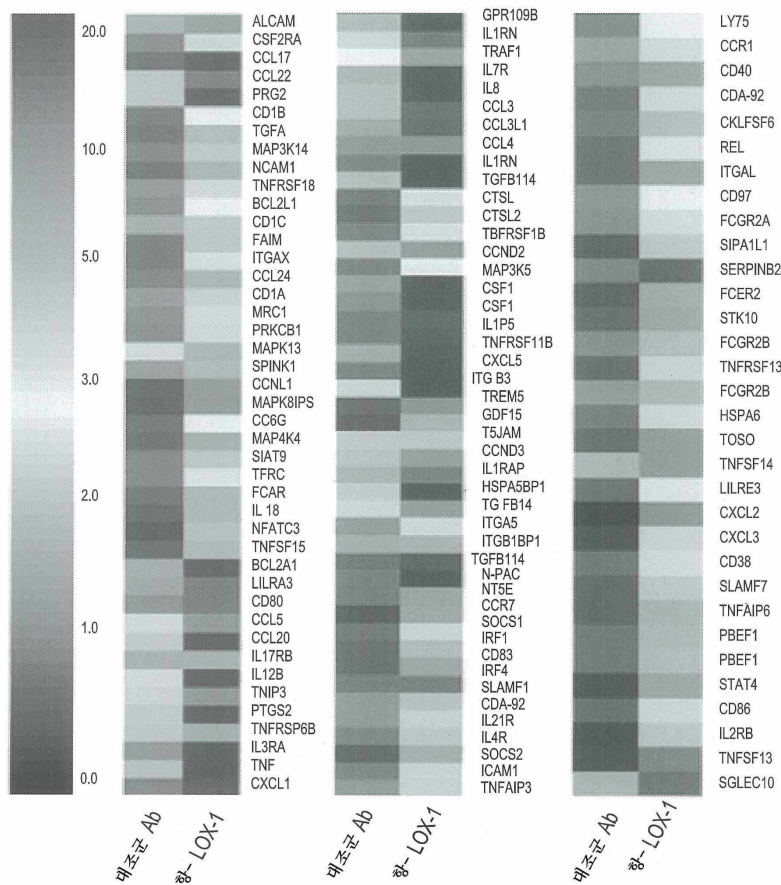
도면3A



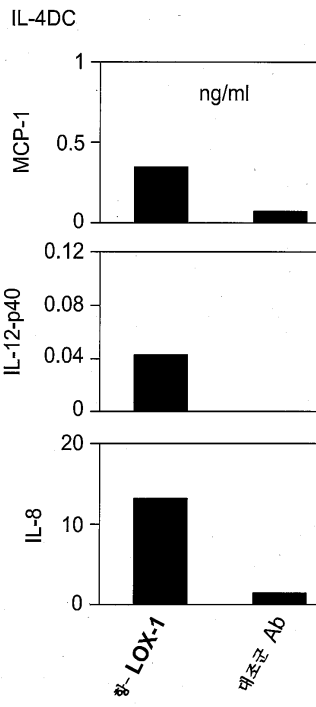
도면3B



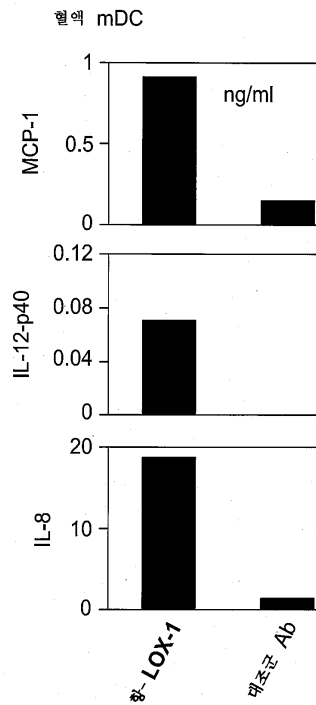
도면4



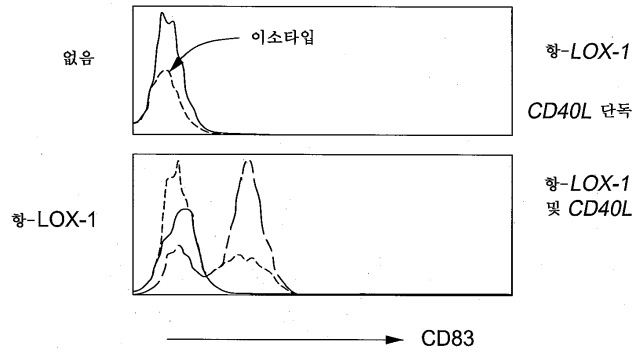
도면5A



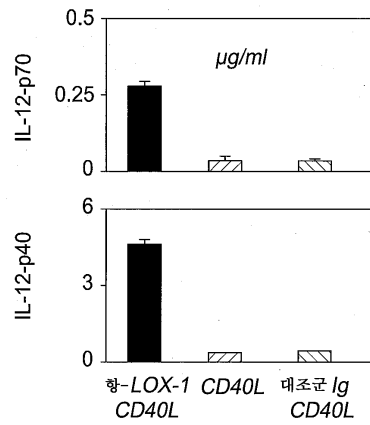
도면5B



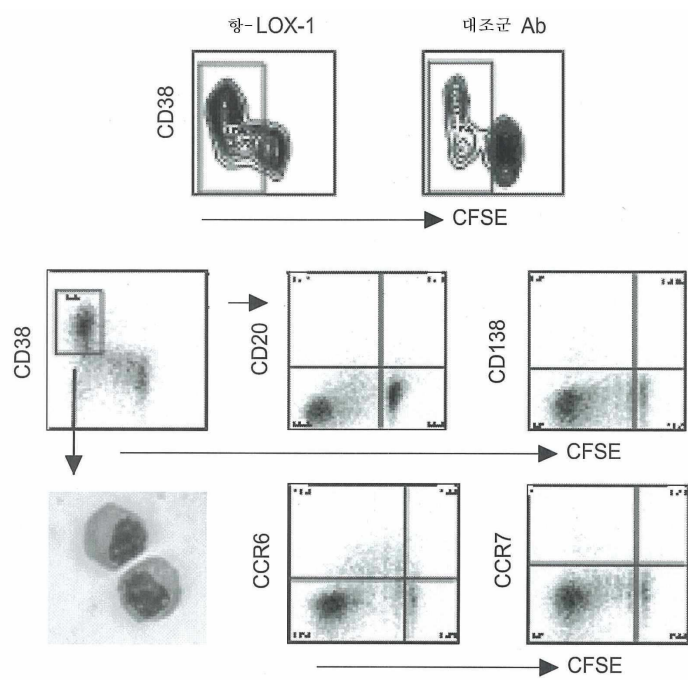
도면6A



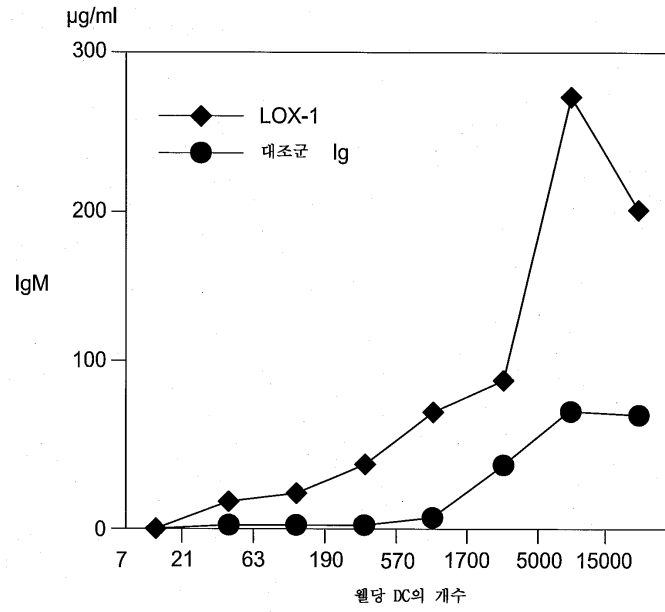
도면6B



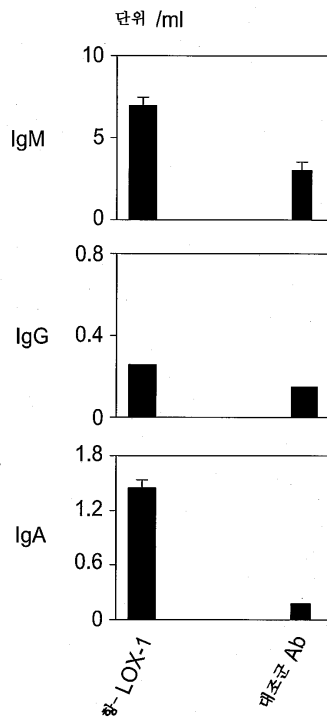
도면7A



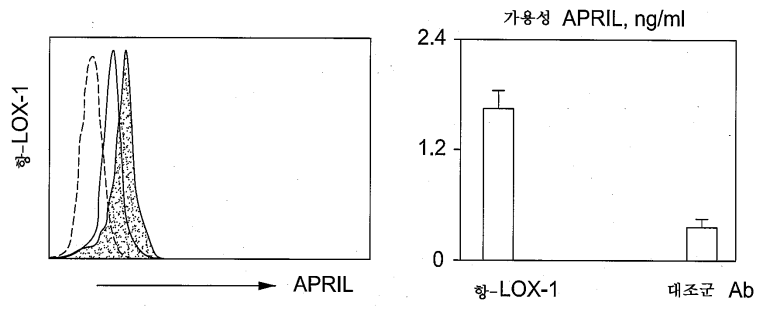
도면7B



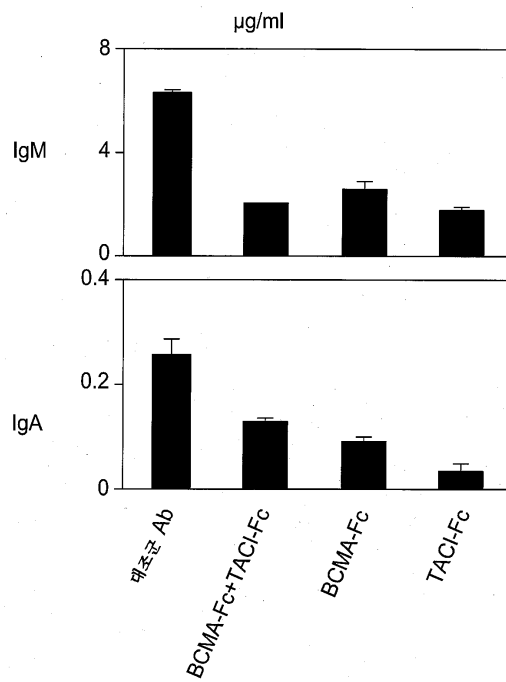
도면7C



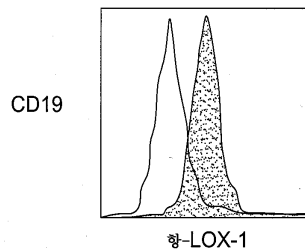
도면7D



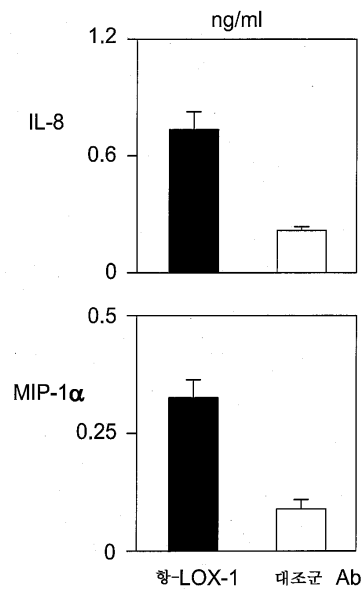
도면7E



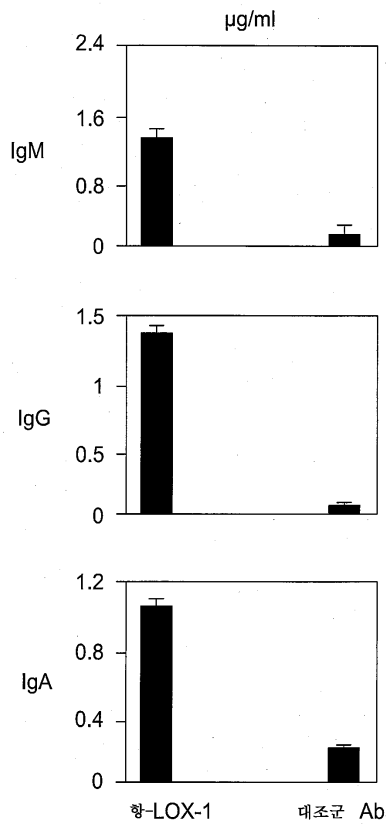
도면8A



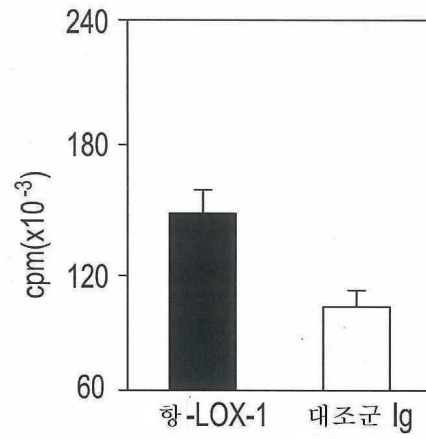
도면8B



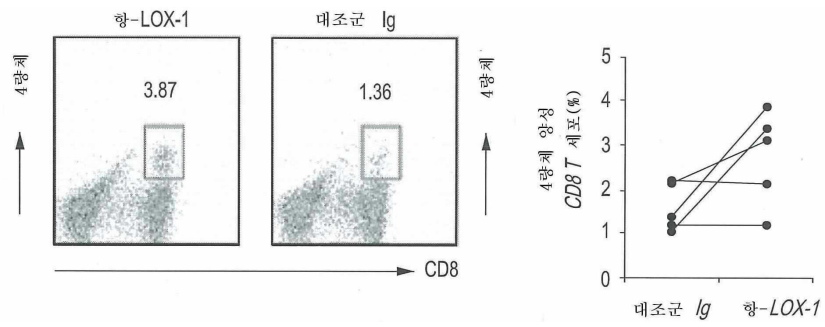
도면8C



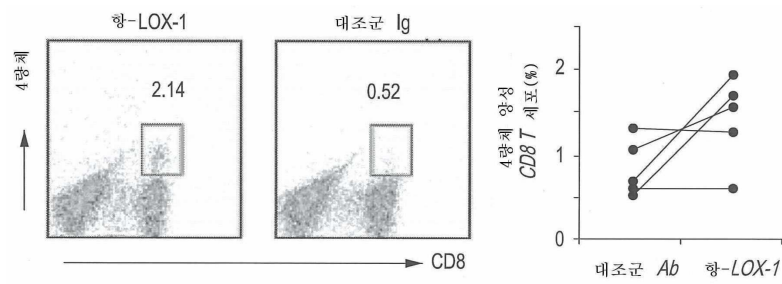
도면9A



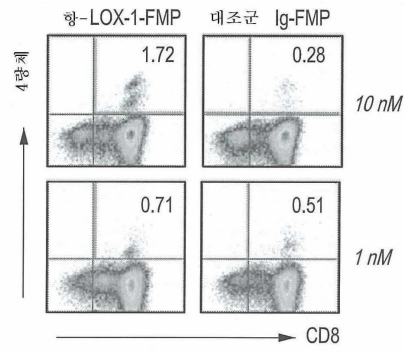
도면9B



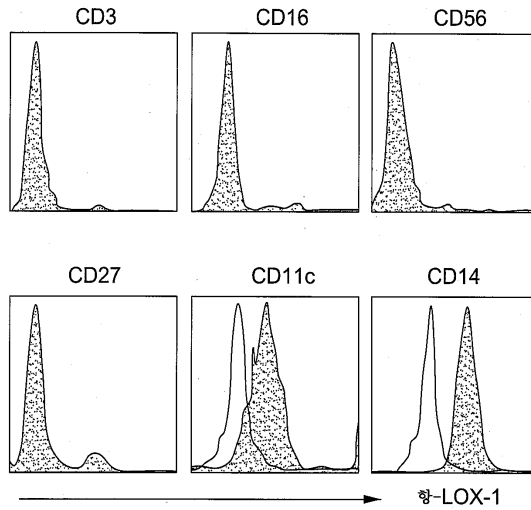
도면9C



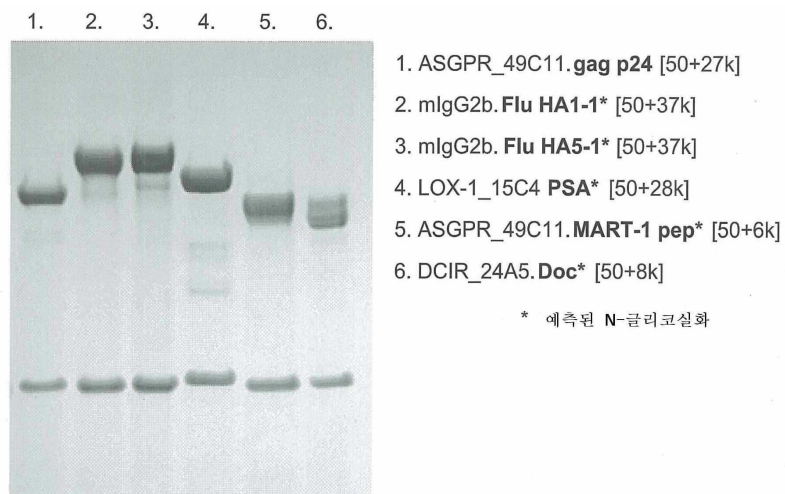
도면9D



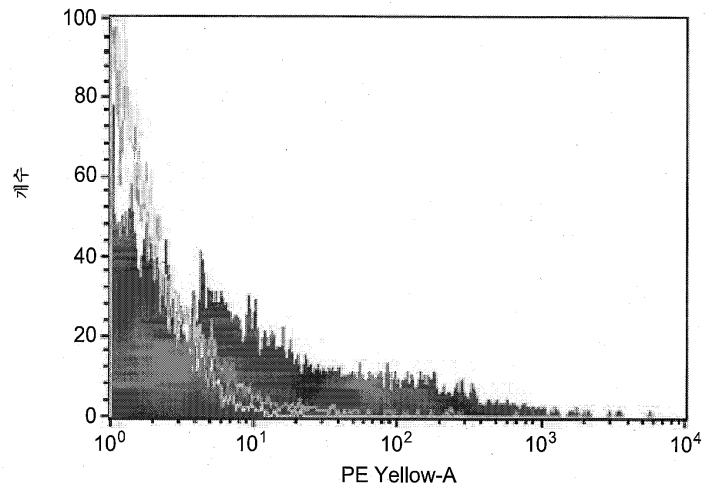
도면10



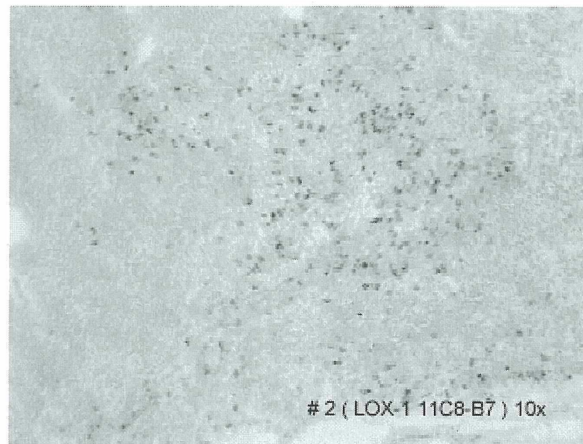
도면11



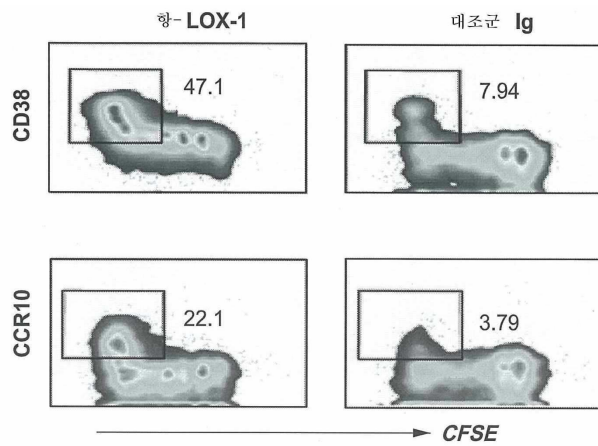
도면12



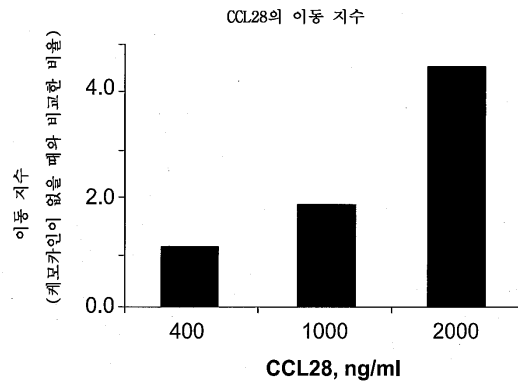
도면13



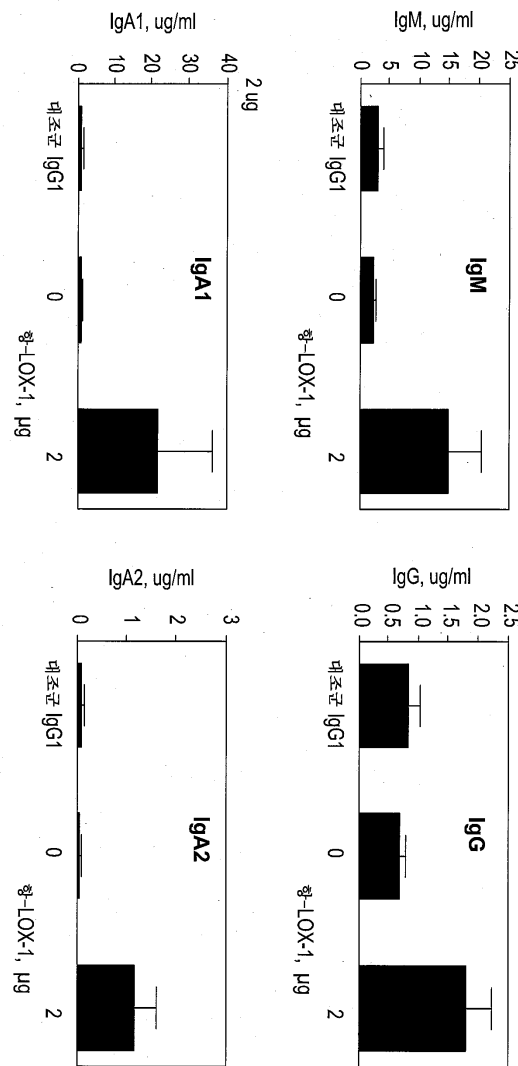
도면14A



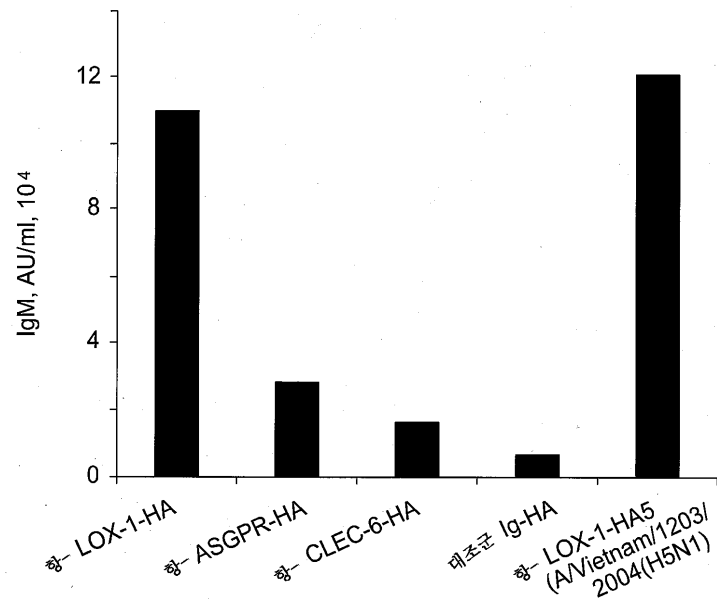
도면14B



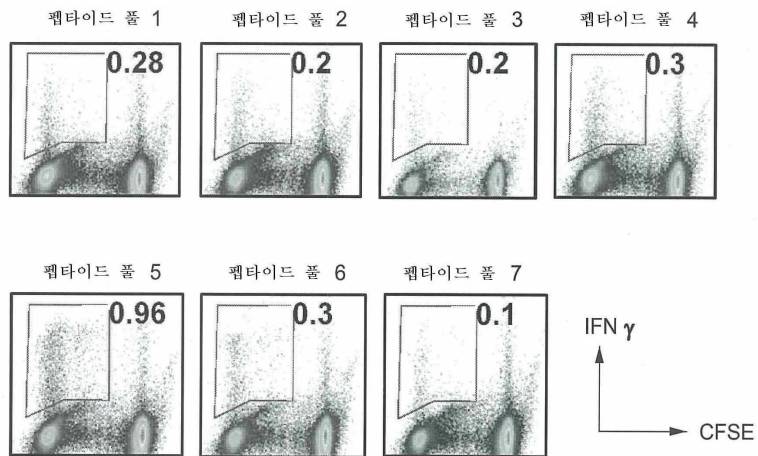
도면15



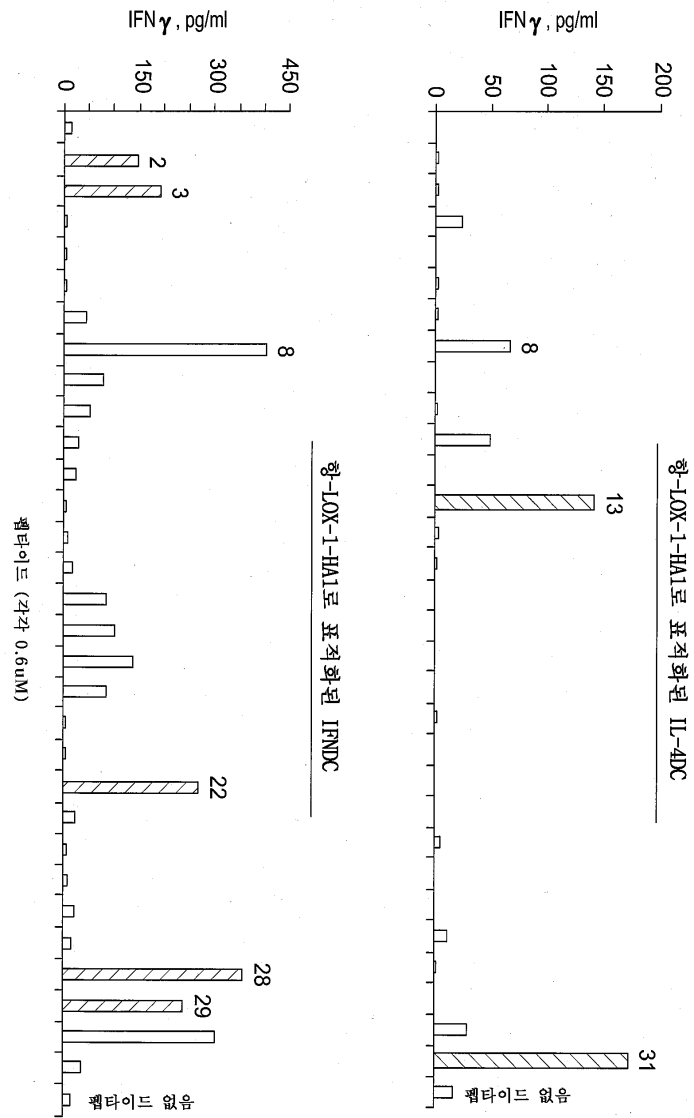
도면16



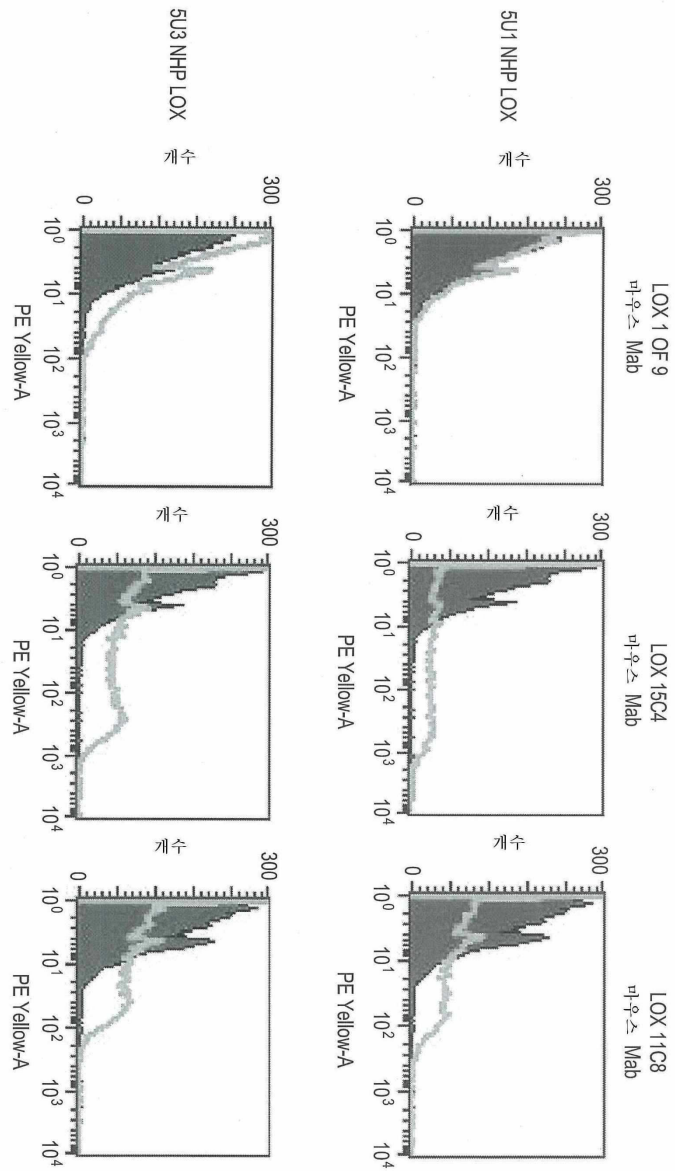
도면17



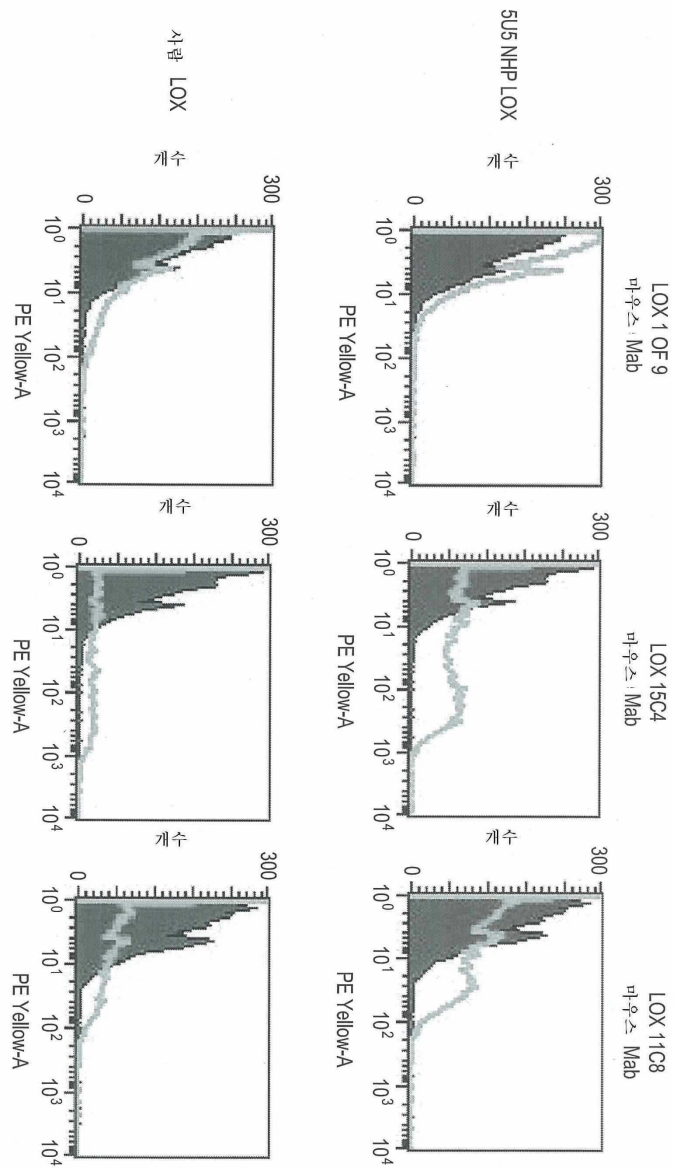
도면18



도면19A



도면19B



도면20

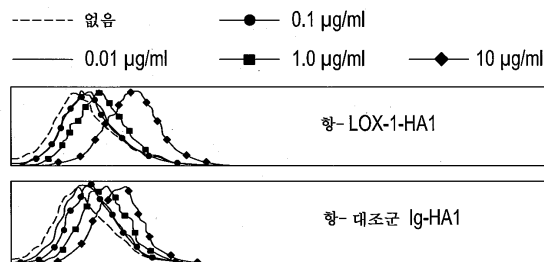
CLUSTAL W (1.83) 다중 서열 정렬

```

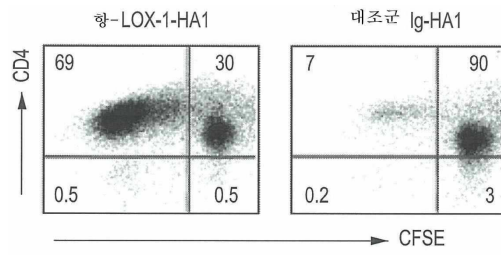
501 MFEDDLKIQTMRKDDQPDPEKSNNGKAKAGLQFLYSPWMCVAVTLAVLCLGLSVTIVLGMQL 60
503 MFEDDLKIQTMRKDDQPDPEKSNNGKAKAGLQFLYSPWMCVAVTLAVLCLGLSVTIVLGMQL 60
505 MFEDDLKIQTMRKDDQPDPEKSNNGKAKAGLQFLYSPWMCVAVTLAVLCLGLSVTIVLGMQL 60
504 MFEDDLKIQTMRKDDQPDPEKSNNGKAKAGLQFLYSPWMCVAVTLAVLCLGLSVTIVLGMQL 60
*****
501 SQVSNLIKQOQNTLTHQKRNKLEGI SARQQAEEAASQESQNEHLKEMIEETLAWKLNKRSKEQ 120
503 SQVSNLIKQOQNTLTHQKRNKLEGI SARQQAEEAASQESQNEHLKEMIEETLAWKLNKRSKEQ 120
505 SQVSNLIKQOQNTLTHQKRNKLEGI SARQQAEEAASQESQNEHLKEMIEETLAWKLNKRSKEQ 120
504 SQVSNLIKQOQNTLTHQKRNKLEGI SARQQAEEAASQESQNEHLKEMIEETLAWKLNKRSKEQ 120
*****
501 MELIHHQNLINLQETLTKRVANGSAPCPQDWTWHEENCYLFSTGSEFNWERSQEKCLSIDAKTL 180
503 MELIHHQNLINLQETLTKRVANGSAPCPQDWTWHEENCYLFSTGSEFNWERSQEKCLSIDAKTL 180
505 MELIHHQNLINLQETLTKRVANGSAPCPQDWTWHEENCYLFSTGSEFNWERSQEKCLSIDAKTL 180
504 MELIHHQNLINLQETLTKRVANGSAPCPQDWTWHEENCYLFSTGSEFNWERSQEKCLSIDAKTL 180
*****
501 KINSTADLDLFTQQALSDSSPFPWMLSRNPSTYPTLWEDGSPIMPHILFRTIRGAVSQTYPS 240
503 KINSTADLDLFTQQALSYSSPFPWMLSRNPSTYPTLWEDGSPIMPHILFRTIRGAVSQTYPS 240
505 KINSTADLDLFTQQALSYSSPFPWMLSRNPSTYPTLWEDGSPIMPHILFRTIRGAVSQTYPS 240
504 KINSTADLDLFTQQALSYSSPFPWMLSRNPSTYPTLWEDGSPIMPHILFRTIRGAVSQTYPS 240
*****
501 GTCAYIQRGAVYAENCIIAFASTICQKANIIRAQ 273
503 GTCAYIQRGAVYAENCIIAFASTICQKANIIRAQ 273
505 GTCAYIQRGAVYAENCIIAFASTICQKANIIRAQ 273
504 GTCAYIQRGAVYAENCIIAFASTICQKROT---- 269
*****

```

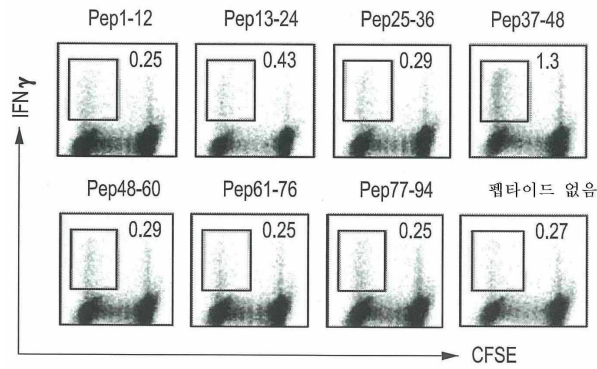
도면21A



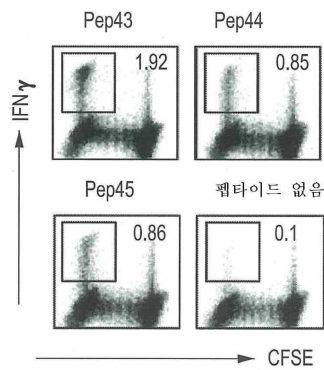
도면21B



도면21C



도면21D



서열 목록

<110> Baylor Research Institute

<120> Activation of human antigen-presenting cells through dendritic cell lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)

<130> BHCS:1046

<150> US 60/891,424

<151> 2007-02-23

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

gacaccaccg aggcccgcca cccccaccc cccgtgacca cccccaccac caccgaccgg 60

aagggcacca ccgccgagga gctggccggc atcggcatcc tgaccgtgat cctgggcggc 120

aagcggacca acaacagcac ccccaccaag ggcgaattct gcagatatcc atcacactgg 180

cggccg 186

<210> 2

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 2

Asp Thr Thr Glu Ala Arg His Pro His Pro Pro Val Thr Thr Pro Thr
1 5 10 15

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

Leu Thr Val Ile Leu Gly Gly Lys Arg Thr Asn Asn Ser Thr Pro Thr
 35 40 45

Lys Gly Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ser His Trp Arg Pro
 50 55 60

<210> 3
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 3

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ser
 435 440

<210> 4
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 5
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 5

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

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

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ala Gly Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

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

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp

130

135

140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ser
 435 440

<210> 6
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 6

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Lys Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

Glu Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 7

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

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

Ile Met Val Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Trp Asp Gly Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala
 435 440 445

Ser

<210> 8
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 8

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 783
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 9

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

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

Ile Met Val Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Trp Asp Gly Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

130

135

140

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala
 435 440 445

Ser Asp Thr Thr Glu Pro Ala Thr Pro Thr Thr Pro Val Thr Thr Asp
 450 455 460

Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp
 465 470 475 480

Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu
 485 490 495

Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro
 500 505 510

Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro
 515 520 525

Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu
 530 535 540

Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp
 545 550 555 560

Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys
 565 570 575

Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser Leu
 580 585 590

Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe Arg
 595 600 605

Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys
 610 615 620

Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly
 625 630 635 640

Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln Asn
 645 650 655

Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg Leu
 660 665 670

Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly Arg
 675 680 685

Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn Phe
 690 695 700

Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile Val
 705 710 715 720

Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly Asn
 725 730 735

Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser Met
 740 745 750

Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys Tyr
 755 760 765

Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala His His His His His His
 770 775 780

<210> 10
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Polypeptide

<400> 10

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

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

Ile Met Val Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Trp Asp Gly Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

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

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala
 435 440 445

Ser Asn Ser Pro Gln Asn Glu Val Leu Tyr Gly Asp Val Asn Asp Asp
 450 455 460

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

Ala Arg Ser Pro Asn Trp Asp Gly Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu
675 680 685

Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp
690 695 700

Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
705 710

<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 12
ggatggtggg aagatggata cagttggtgc agcatc 36

<210> 13
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 13
ctaggaacag tcagcacggg acaaactctt ctccacagtg tgaccttc 48

<210> 14
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 14
gtcactggct cagggaaata gcccttgacc aggcatac 37

<210> 15
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 15
ccagcatcc tagagtcacc gaggagccag t 31

<210> 16
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 16
ggtgctggag gggacagtca ctgagctgct catagtgt 38

<210> 17
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 17
ctagttgctg gctaatggac cccaaaggct ccctttcctg gagaatactt ctgtttctct 60

ccctggcttt tgagttgtcg tacggattaa ttaaggcccc actcgag 107

<210> 18
<211> 100

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 18
 ctagttgctg gctaattggac cccaaagct ccctttctg gagaatactt ctgtttctct 60

ccctggcttt tgagttgctg tacgattaa ttaaggccc 100

<210> 19
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 19
 gctagcgata caacagaacc tgcaaacct acaaacctg taacaacacc gacaacaaca 60

cttctagcgc 70

<210> 20
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Chemically Synthesized Oligonucleotide

<400> 20
 gctagcccca ttctgagccc cctgaccaa ggcattctgg gctttgtgtt taccctgacc 60

gtgccagcg aacgcaagg tatacttga ttcgtttca cacttactta agcggcgc 119