



등록특허 10-2399005



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월17일  
(11) 등록번호 10-2399005  
(24) 등록일자 2022년05월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/2863* (2013.01)  
*A61K 39/3955* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7025833
- (22) 출원일자(국제) 2015년03월10일  
심사청구일자 2020년03월03일
- (85) 번역문제출일자 2016년09월20일
- (65) 공개번호 10-2016-0131026
- (43) 공개일자 2016년11월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/019722
- (87) 국제공개번호 WO 2015/138460  
국제공개일자 2015년09월17일
- (30) 우선권주장  
61/950,963 2014년03월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현  
WO2009067242 A1  
KR1020110122848 A\*  
KR1020120060788 A\*  
WO2013075048 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 22 항

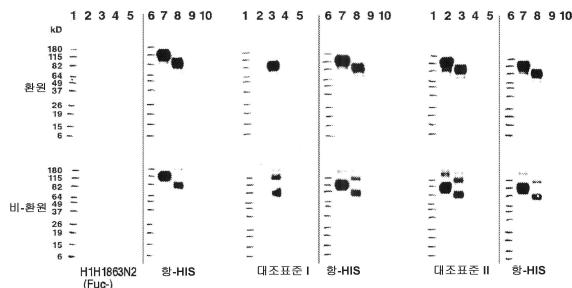
심사관 : 허명숙

## (54) 발명의 명칭 항-EGFRvIII 항체 및 그것의 용도

## (57) 요약

본 개시는 EGFR의 부류 III 변이체 (EGFRvIII)에 결합하는 항체 및 그것의 사용 방법을 제공한다. 특정 구체예에 따르면, 개시의 항체는 인간 EGFRvIII에 고친화성으로 결합한다. 개시의 항체는 전체 인간 항체일 수 있다. 개시는 세포독성제, 방사성 핵종 또는 세포 성장 또는 증식에 유해한 다른 부분에 컨쥬게이트된 항-EGFRvIII 항체를 포함한다. 개시의 항체는 다양한 암의 치료에 유용하다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류

*A61K 39/39558* (2013.01)

*A61K 47/6803* (2017.08)

*A61K 47/6851* (2017.08)

*C07K 16/30* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*A61K 2039/507* (2013.01)

*C07K 2317/565* (2013.01)

*C07K 2317/77* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**씨스톤 가빈**

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**마틴 조엘 에이치.**

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**엘피노 프랭크**

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

---

**니톨리 토마스**

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**켈리 마르쿠스**

미국 뉴욕 10591 태리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 그것의 단편은 중쇄 가변 영역 (HCVR) 및 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 이때 HCVR은 SEQ ID NO:34의 아미노산 서열에 함유된 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCVR은 SEQ ID NO:42의 아미노산 서열에 함유된 3개의 CDR, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3은 각각 SEQ ID NO:36, 38 및 40의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 SEQ ID NO:44, 46 및 48의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 4

인간 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 분리된 항체 또는 그것의 항원-결합 단편으로서, 항체 또는 그것의 단편은 SEQ ID NO:4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96 및 132/134/136/140/142/144로 구성되는 군으로부터 선택된 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3의 조합을 포함하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, HCVR은 SEQ ID NO:2, 18, 34, 50, 66, 82 및 130으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 6

제4항에 있어서, LCVR은 SEQ ID NO:10, 26, 42, 58, 74, 90 및 138로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 7

제4항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90 및 130/138로 구성되는 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 서열 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 8

제4항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:34/42의 HCVR/LCVR 서열 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 9

제4항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:36/38/40/44/46/48의 HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 세포독소에 컨쥬게이트되는 것을 특징으로 하는 항체 또는

그것의 항원-결합 단편.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 세포독소는 생물 독소, 화학요법제 및 방사성 동위원소로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

### 청구항 12

제10항에 있어서, 세포독소는 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 토메이마이신, 듀오카르마이신, <sup>225</sup>Ac, <sup>227</sup>Th 및 그 것들의 임의의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

### 청구항 13

제1항의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, EGFRvIII을 발현하는 암 또는 종양 치료용 약학 조성물.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 화학요법제, 항-염증제 및 진통제로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 추가 치료제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 15

제13항에 있어서, 암 또는 종양은 교아세포종, 도관 또는 도관내 유방 암종, 비-소세포성 폐 암종, 난소 암종, 전립선암 및 두경부의 편평성 세포 암종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 16

환자에서 암을 치료하고, 종양 성장을 감소시키며 및/또는 종양 퇴행을 유발하기 위한 약학 조성물로서, 조성물은 항체 또는 그것의 항원-결합 단편 및 세포독소를 포함하는 제1 항체-약물 컨쥬게이트 (ADC)를 포함하고, 이때 제1 ADC의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:36, 38, 40, 44, 46 및 48 또는 SEQ ID NO:84, 86, 88, 92, 94 및 96을 포함하는 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역을 포함하고, 제1 ADC의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하지만 SEQ ID NO:148의 접합 웹티드 또는 SEQ ID NO:165의 웹티드에는 결합하지 않는, 약학 조성물.

### 청구항 17

제16항에 있어서, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편 및 세포독소를 포함하는 제2 ADC를 추가로 포함하고, 이때 제2 ADC의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하며 또한 SEQ ID NO:148의 접합 웹티드 및/또는 SEQ ID NO:165의 웹티드에도 결합하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 18

제16항에 있어서, 제1 ADC의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:34를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:42를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 19

제16항에 있어서, 제1 ADC의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:82를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:90을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 20

제10항에 있어서, 세포독소는 1-(2클로로에틸)-1,2-다이메탄설포닐 하이드라지드, 1,8-다이하이드록시-바이사이클로[7.3.1]트라이데카-4,9-다이엔-2,6-다이인-13-온, 1-데하이드로테스토스테론, 5-플루오로우라실, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 9-아미노 캄프토테신, 악티노마이신 D, 아만니틴, 아미노프테린, 안구이딘, 안트라사이클린, 안트라마이신 (AMC), 아우리스타틴, 블레오마이신, 부술판, 부티르산, 칼리케아미신, 캄프토테신, 카르미노마이신, 카르무스틴, 세마도틴, 시스플라틴, 콜키신, 콤브레타스타틴, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 시토칼라

신 B, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데카르바진, 다이아세톡시펜틸독소루비신, 다이브로모만니톨, 다이하이드록시 안트라신 다이온, 다이소라졸, 돌라스타틴, 독소루비신, 듀오카르마이신, 에키노마이신, 엘레우테로빈, 에메틴, 에포틸론, 에스페라미신, 에스트라무스틴, 에티듐 브로마이드, 에토포시드, 플루오로우라실, 겔다나마이신, 그라미시딘 D, 글루코코르티코이드, 이리노테칸, 렙토마이신, 류로신, 리도카인, 로무스틴 (CCNU), 메이탄시노이드, 메클로레타민, 멜팔란, 메르캅토퓨린, 메토프테린, 메토트렉세이트, 미트라마이신, 미토마이신, 미토크산트론, N8-아세틸 스퍼미딘, 포도필로톡신, 프로카인, 프로프라놀롤, 프테리딘, 퓨로마이신, 피롤로벤조다이아제핀 (PDB), 리죽신, 스트렙토조토신, 탈리소마이신, 탁솔, 테노포시드, 테트라카인, 티오에파 클로람부실, 토메이마이신, 토포테칸, 투불라이신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 21

제10항에 있어서, 세포독소는 메이탄시노이드인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 22

제10항에 있어서, 세포독소는 DM1인 것을 특징으로 하는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편.

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 상피 성장 인자 수용체 (EGFR)의 결실 돌연변이, 특히 부류 III의 결실 돌연변이, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 인간 항체 및 인간 항체의 항원-결합 단편, 및 이를 항체를 사용하는 치료 및 진단 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 상피 성장 인자 (EGF) 수용체, 또는 EGFR의 과잉발현 및/또는 유전자 증폭은 유방, 난소, 방광, 뇌 및 다양한 편평상 암종을 포함한 다수의 인간 종양에서 보고되었다 (Wong, A.J. et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6899-6903; Harris et al., 1992, Natl. Cancer Inst. Monogr. 11:181-187). 그러나, EGFR을 항-신생물 치료 방법으로서 표적화하는 것은 많은 정상 조직이 또한 이 수용체를 발현하고 신생물 표적과 함께 표적화될 수 있기 때문에 문제가 되어 왔다. 한편, EGFR 유전자 증폭을 가지는 많은 교아세포종이 빈번하게 유전자 재배열을 함유하는 것으로 보고되었다 (Ekstrand, A.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4309-4313; Wong A.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:2965-2969). 한 연구에서, 44개의 교아세포종 중 17개가 EGFR 코딩 서열에 하나 또는 그 이상의 변경을 가지는 것으로 밝혀졌고 이들 사례는 모두 증폭된 EGFR을 함유한 한편, 유전자 증폭이 없는 22 사례중 어느 것도 어떠한 종양-특이적 서열 비정상을 나타내지 않았다 (Frederick, L. et al., 2000, Cancer Res 60:1383-1387). 동일한 연구는 또한 다중 유형의 EGFR 돌연변이가 개별적인 종양에서 검출될 수 있었음을 보였다.

[0003] EGFR의 부류 III 변이체 (EGFRvIII)는 교아세포종에서 가장 흔하게 발견되는 EGFR 변이체이다 (Bigner et al., 1990, Cancer Res 50:8017-8022; Humphrey et al., 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87:4207-4211; Yamazaki et al., 1990, Jap J Cancer Res 81:773-779; Ekstrand et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4309-4313; Wikstrand et al., 1995, Cancer Res 55:3140-3148; 및 Frederick et al., 2000, Cancer Res 60:1383-1387). EGFRvIII은 EGFR 유전자의 액손 2 내지 7이 결실되고, 그 결과 코딩 영역의 801 염기쌍의 프레임-내 결실, 즉 6 내지 273 아미노산 잔기의 결실 (성숙한 EGFR의 잔기 번호를 기준으로 함), 및 뿐만 아니라 융합 접합부

(fusion junction)에서 새로운 클리신의 생성을 초래하는 것을 특징으로 한다 (Humphrey *et al.*, 1988, *Cancer Res* 48:2231-2238; Yamazaki *et al.*, 1990, 상기 동일). EGFRvIII은 증강된 종양유발성뿐 아니라 리간드-의존성의 약하지만 구성적으로 활성인 키나아제 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다 (Nishikawa *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7727-7731; 및 Batra *et al.*, 1995, *Cell Growth and Differentiation* 6:1251-1259). 신경교종에 더불어, EGFRvIII은 관성 및 관내성 유방암종에서 (Wikstrand *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:3140-3148), 비-소세포 폐암종에서 (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *Cancer Res* 53:3217-3220), 난소암종에서 (Moscatello *et al.*, 1995, *Cancer Res* 55:5536-5539), 전립선암에서 (Olapade-Olaopa *et al.*, 2000, *British J Cancer* 82:186-194) 및 두경부의 편평상세포암종에서 (Tinhofer *et al.*, 2011, *Clin Cancer Res* 17(15):5197-5204) 검출되었다. 대조적으로, 이들 및 다른 연구들은 정상 조직은 EGFRvIII을 발현하지 않는다고 보고한다 (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993, *supra*; Wikstrand *et al.*, 1995, *supra*; and Wikstrand *et al.*, 1998, *J Neuro Virol* 4:148-158). EGFRvIII의 고도로 종양-특이적인 성질은 EGFRvIII을, 특히 이 분자를 발현하는 암 및 종양을 치료하기 위한 특히 유용한 표적으로 만든다.

## [0004]

인간 EGFR의 핵산 및 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO:145 및 146에 제시되고, EGFRvIII의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:147에 제시된다. EGFRvIII에 대한 항체는 예를 들면 US 5,212,290, US 7,736,644, US 7,589,180 및 US 7,767,792에서 기술된다.

**발명의 내용**

## [0005]

본 발명은 EGFRvIII에 결합하는 항체들 및 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다. 발명의 항체는 무엇보다도 EGFRvIII을 발현하는 종양 세포를 표적화하는데 유용하다. 발명의 항-EGFRvIII 항체 및 그것의 항원-결합 부분은 비변형 형태로 단독으로 사용되거나, 또는 항체-약물 컨쥬게이트 또는 이중특이성 항체의 일부로서 포함될 수 있다.

## [0006]

발명의 항체는 전-길이이나 (예를 들면 IgG1 또는 IgG4 항체) 또는 단지 항원-결합 부분 (예를 들면 Fab, F(ab')<sub>2</sub> 또는 scFv 단편)만을 포함할 수 있고 기능성에 영향을 주기 위해, 예컨대 잔류하는 이펙터 기능을 제거하기 위해 변형될 수 있다 (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

## [0007]

본 발명의 예시적인 항-EGFRvIII 항체들은 본원의 표 1 및 표 2에 열거한다. 표 1은 예시적인 항-EGFRvIII 항체들의 중쇄 가변 영역 (HCVR), 경쇄 가변 영역 (LCVR), 중쇄 상보성 결정 영역 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 상보성 결정 영역 (LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 나타낸다. 표 2는 예시적인 항-EGFRvIII 항체들의 HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 핵산 서열 확인자를 나타낸다.

## [0008]

본 발명은 표 1에 열거한 HCVR 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 HCVR을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

## [0009]

본 발명은 또한 표 1에 열거한 LCVR 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

## [0010]

본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 어느 것과 짹을 이룬 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열의 어느 것을 포함하는 HCVR과 LCVR 아미노산 서열 쌍 (HCVR/LCVR)을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다. 특정 구체예에 따르면, 본 발명은 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들의 어느 것에 함유된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는, 항체들 또는 그것의 항원-결합 단편들을 제공한다. 특정 구체예에서, HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍은 2/20, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122 및 130/138로 구성되는 군으로부터 선택된다.

## [0011]

본 발명은 또한 표 1에 열거된 HCDR1 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR1 (HCDR1)을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

## [0012]

본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서

열을 포함하는 중쇄 CDR2 (HCDR2)를 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 (HCDR3)를 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR1 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR1 (LCDR1)을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR2 (LCDR2)를 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 것으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 (LCDR3)을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 것과 짹을 이룬 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열의 어느 것을 포함하는 HCDR3과 LCDE3 아미노산 서열 쌍 (HCDR3/LCDR3)을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것의 항원-결합 단편들을 제공한다. 특정 구체예에 따르면, 본 발명은 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 쌍을 포함하는, 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것에 함유된 6개의 CDR의 세트 (즉 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다. 특정 구체예에서, 또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트는 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 및 132-134-136-140-142-144로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0019] 관련된 구체예에서, 본 발명은 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것에 의해 정의된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 6개의 CDR의 세트 (즉 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; 및 370/378로 구성되는 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3을 포함하는, EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항체들 또는 그것들의 항원-결합 단편들을 제공한다. HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 내에서 CDR을 확인하기 위한 방법 및 기법들은 기술분야에 잘 알려져 있고 본원에서 개시된 명시된 HCVR 및/또는 LCVR 아미노산 서열 내에서 CDR을 확인하기 위해 사용될 수 있다. CDR의 경계를 확인하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 관례는 예컨대 Kabat 정의, Chothia 정의 및 AbM 정의를 포함한다. 일반적으로, Kabat 정의는 서열 가변성을 기반으로 하고, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치를 기반으로 하며, AbM 정의는 Kabat과 Chothia 접근법 사이의 절충이다. 예컨대 Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); 및 Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989) 참조. 대중적인 데이터베이스는 또한 항체 내의 CDR 서열을 확인하기 위해 입수 가능하다.

[0020] 본 발명은 또한 항-EGFRvIII 항체 또는 그것의 일부를 코드화하는 핵산 분자들을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자를 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 HCVR 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서

열을 포함한다.

- [0021] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 LCVR 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0022] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 HCDR1 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 HCDR1 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0023] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 HCDR2 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 HCDR2 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0024] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 HCDR3 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 HCDR3 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0025] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR1 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 LCDR1 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0026] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR2 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 LCDR2 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0027] 본 발명은 또한 표 1에 열거된 LCDR3 아미노산 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하고; 특정 구체예에서 그 핵산 분자는 표 2에 열거된 LCDR3 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0028] 본 발명은 또한 HCVR을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하는데, 이때 HCVR은 3개의 CDR의 세트 (즉 HCDR1-HCDR2-HCDR3)를 포함하고, 여기서 HCDR1-HCDR2-HCDR3 아미노산 서열 세트는 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것에 의해 정의되는 대로이다.
- [0029] 본 발명은 또한 LCVR을 코드화하는 핵산 분자들을 제공하는데, 이때 LCVR은 3개의 CDR의 세트 (즉 LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하고, 여기서 LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트는 표 1에 열거된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것에 의해 정의되는 대로이다.
- [0030] 본 발명은 또한 HCVR과 LCVR 둘 다를 코드화하는 핵산 분자를 제공하는데, 이때 HCVR은 표 1에 열거된 HCVR 아미노산 서열들 중 어느 것의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 표 1에 열거된 LCVR 아미노산 서열들 중 어느 것의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 핵산 분자는 표 2에 열거된 HCVR 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열, 및 표 2에 열거된 LCVR 핵산 서열들 중 어느 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그것에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 그것의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 발명의 이런 측면에 따르는 특정 구체예에서, 핵산 분자는 HCVR 및 LCVR을 코드화하고, 이때 HCVR과 LCVR은 둘 다 표 1에 열거된 동일한 항-EGFRvIII 항체로부터 유도된다.
- [0031] 본 발명은 또한 항-EGFRvIII 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 상기 언급된 핵산 분자들 중 어느 것, 즉 표 1에 제시된 것과 같

은 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 서열들 중 어느 것을 코드화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함한다. 또한 본 발명의 범주에는 그런 벡터들이 도입된 숙주 세포, 및 그 숙주 세포를 항체들 또는 항체 단편들의 제조를 허용하는 조건하에서 배양시키고 그렇게 제조된 항체들 및 항체 단편들을 회수함으로써 항체들 또는 그것의 부분들을 제조하는 방법이 포함된다.

[0032] 본 발명은 변형된 글리코실화 패턴을 가지는 항-EGFRvIII 항체들을 포함한다. 일부 구체예에서, 바람직하지 못한 글리코실화 부위를 제거하기 위한 변형이 유용하거나, 또는 예를 들면 항체 의존성 세포의 세포독성 (ADCC) 기능을 증가시키기 위하여 올리고당 사슬 상에 큐코오스 부분이 없는 항체가 존재할 수 있다 (Shield et al. (2002) JBC 277:26733 참조). 다른 적용에서, 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 변형시키기 위하여 갈락토실화의 변형이 이루어질 수 있다.

[0033] 다른 측면으로, 발명은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 재조합 인간 항체 또는 그것의 단편 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 관련된 측면으로, 발명은 항-EGFRvIII 항체 및 제 2 치료제의 조합인 조성물을 특징으로 한다. 한 구체예에서, 제 2 치료제는 항-EGFRvIII 항체와 유익하게 조합되는 어떠한 제제이다. 본 발명은 또한 세포독성제에 컨쥬게이트된 항-EGFRvIII 항체를 포함하는 항체-약물 컨쥬게이트 (ADC)를 제공한다. 예시적인 조합 치료법, 공-제형 및 본 발명의 항-EGFRvIII 항체를 포함하는 ADC가 본원의 다른 곳에서 개시된다.

[0034] 또 다른 측면으로, 발명은 발명의 항-EGFRvIII 항체 또는 항체의 항원-결합 부분을 사용하여 종양 세포를 사멸시키기 위한 또는 종양 세포를 억제 또는 약화시키기 위한 치료 방법을 제공한다. 발명의 이런 측면에 따르는 치료 방법들은 발명의 항체 또는 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 치료되는 장애는 EGFRvIII을 표적화함으로써 및/또는 EGFRvIII을 통해 리간드-중재된 세포 신호화를 억제함으로써 개선되거나, 완화되거나, 억제되거나 또는 방지되는 어떠한 질환 또는 상태이다.

[0035] 다른 구체예들은 이어지는 상세한 설명의 검토로부터 드러날 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 항-EGFRvIII 항체 [즉 도 1a에서 H1H1863N2(Fuc-) 및 대조표준 I 및 II; 및 도 1b에서 H1H1911, H1H1912 및 H1H1915] 또는 항-His 항체를 사용하여 환원 (상부 패널) 및 비-환원 (하부 패널) 조건하에서 EGFR 및 EGFRvIII을 웨스턴 블로팅한 결과를 도시한다. 레인 1 및 6: 10  $\mu$ l의 BENCHMARK<sup>TM</sup> 표준 (INVITROGEN<sup>TM</sup>); 레인 2 및 7: 400 ng의 hEGFR-mmh (SEQ ID NO:154); 레인 3 및 8: 400 ng의 hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152); 및 레인 4, 5, 9 및 10: 공간. 대조표준 I: 미국 특허 제 7,736,644호에 개시된 인간 항-EGFRvIII 접합 웹티드 (junctional peptide) 항체 (IgG1); 및 대조표준 II: 미국 특허 제 7,589,180호에 개시된 키메라 항-EGFRvIII/EGFR 항체.

도 2는 H1H1863N2(Fuc-)의 결합 특성을 도시한다. 각각 C-말단에서 비오틴을 포함한 링커를 통해 태그된, EGFRvIII 접합 웹티드 또는 EGFR의 잔기 311 내지 326의 웹티드 ("EGFR311-326 웹티드")는 ForteBio<sup>®</sup> OCTET<sup>®</sup> RED 기기 상에서 스트렙트아비딘-코팅된 OCTET<sup>®</sup> 텁에 포획되었고 H1H1863N2(Fuc-) 또는 대조표준 I 내지 III과 반응하였다. 대조표준 I 및 II: 상기와 동일함; 및 대조표준 III: 미국 특허 출원 공개 번호 2010/0056762에 개시된 인간화된 항-EGFRvIII 항체 (hIgG1). (□): C-말단 비오틴-표지된 EGFRvIII 접합 웹티드 (SEQ ID NO:149); 및 (■): C-말단 비오틴-표지된 EGFR311-326 웹티드 (SEQ ID NO:151).

도 3은 EGFRvIII (HEK293/EGFRvIII)을 발현하는 HEK293 세포에 의한 항-EGFRvIII mAb의 내부화를 도시한다. 세포-표면 결합된 항-EGFRvIII 항체 및 대조 항체들은 염료-컨쥬게이트된 이차 항체 (Fab)에 의해 검출되었고; 영상들은 40x에서 얻어졌으며 내부화된 소포체들이 정량되었다. 대조표준 I 및 II: 상기와 동일함; 및 대조표준 IV: 미국 특허 제 7,060,808호에 개시된 키메라 항-EGFR 항체. (□): 37°C에서 내부화; 및 (■): 4°C에서 내부화.

도 4는 심각한 조합 면역결핍성 (SCID) 마우스에 이종이식된 EGFRvIII (B16F10.9/EGFRvIII)을 발현하는 B16F10.9 종양 또는 B16F10.9 종양에 의한 항-EGFRvIII 항체 H1H1863N2(Fuc-)의 결합 및 내부화를 도시한다. 세포-표면 결합된 (도 4a) 또는 세포-표명-결합된 플리스 내부화된 (도 4b) 항-EGFRvIII 항체 또는 아이소타입 대조 항체는 세포 유동분석을 사용하여 알로파이코시아닌 컨쥬게이트된 항-인간 Fc (hFc-APC) 항체에 의해 검출되었다. 항체 주입 후 10분 (□), 4시간 (▨) 및 24시간 (■)째의 평균 형광 세기 (MIF)가 도시된다.

도 5는 야생형 마우스 (●) 또는 인간 EGFR을 발현하는 마우스 (■)에서 항-EGFRvIII 항체 H1H863N2(Fuc+) (도 5d) 및 대조 항체들 (상기에서 기술됨), 즉 대조표준 I (도 5b), 대조표준 III (도 5c) 및 대조표준 IV (도 5a)에 대한 약물동역학적 분석 결과를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 본 발명을 기술하기 전에, 본 발명은 기술되는 특정 방법들 및 실험 조건들이 달라질 수 있기 때문에 그것들에 한정되지 않는다는 것이 인지되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는, 본 발명의 범주가 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에, 단지 특정 구체예들을 기술할 목적을 위한 것이고, 제한하려는 의도가 아님이 인지되어야 한다.
- [0038] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적이고 과학적인 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적인 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 사용되는 용어 "약"은 특별한 인용된 수치와 관련하여 사용될 때, 그 값이 인용된 값으로부터 1%보다 많지 않게 달라질 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 표현 "약 100"은 99 및 101과 둘 사이의 모든 값 (예컨대 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등)을 포함한다.
- [0039] 비록 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 어떠한 방법 및 물질들이 본 발명의 실시 또는 실험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질들이 이제 기술된다. 본 명세서에서 언급되는 모든 특허, 출원 및 비-특허 공개물은 전체적으로 참조로 본원에 포함된다.
- [0040] 정의
- [0041] 본원에서 사용된 용어 "EGFRvIII"은 특별히 다르게 표시되지 않는 한, 정상적으로 발현된 EGFR과 공통적인 것들과는 대조적으로, EGFRvIII에 대해 특이적인 어떠한 특징을 나타내는, SEQ ID NO:147에 제시된 아미노산 서열 또는 그것의 생물학적 활성 단편을 가지는 인간 EGFR 부류 III 변이체를 나타낸다. EGFRvIII은 성숙한 EGFR의 아미노산 잔기 6 내지 273이 없고 (즉 신호 웨티드, 즉 잔기 1 내지 24가 없는 SEQ ID NO:146) 아미노산 잔기 5 와 274 사이의 6개 위치에서 새로운 글리신 잔기를 함유한다.
- [0042] 본원에서 단백질, 폴리펩티드 및 단백질 단편에 대한 모든 언급은 비-인간 종으로부터 유래된 것으로 명백하게 명시되지 않는 한 각각의 단백질, 폴리펩티드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 나타내는 것으로 의도된다. 그러므로, 표현 "EGFRvIII"은 비-인간 종으로부터 유래된 것, 예컨대 "마우스 EGFRvIII", "원숭이 EGFRvIII" 등으로서 명시되지 않는 한 인간 EGFRvIII을 의미한다.
- [0043] 본원에서 사용되는 표현 "세포 표면-발현된 EGFRvIII"은 시험관 내 또는 생체 내에서 세포 표면에서 발현됨으로써 EGFRvIII 단백질의 적어도 일부분이 세포막의 세포외 측면에 노출되고 항체의 항원-결합 부분에 접근하기 쉽게 되는 하나 또는 그 이상의 EGFRvIII 단백질(들) 또는 그것의 세포외 도메인을 의미한다. "세포 표면-발현된 EGFRvIII"은 정상적으로 EGFRvIII 단백질을 발현하는 세포의 표면에서 발현된 EGFRvIII 단백질을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 다른계는, "세포 표면-발현된 EGFRvIII"은 정상적으로 표면에 인간 EGFRvIII를 발현하지 않지만 표면에 EGFRvIII를 발현하도록 인공적으로 엔지니어링되어 있는 세포의 표면에 발현된 EGFRvIII 단백질을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다.
- [0044] 본원에서 사용된 표현 "항-EGFRvIII 항체"는 단일 특이성을 가지는 일가 항체뿐만 아니라 EGFRvIII에 결합하는 제 1 아암 및 제 2 (표적) 항원에 결합하는 제 2 아암을 가지는 이중특이성 항체 둘 다를 포함하며, 이때 항-EGFRvIII 아암은 본원의 표 1에 제시된 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열들 중 어느 것을 포함한다. 표현 "항-EGFRvIII 항체"는 또한 약물 또는 독소 (즉 세포독성제)에 친죽게이트된 항-EGFRvIII 항체 또는 그것의 항원-결합 부분을 포함하는 항체-약물 친죽게이트 (ADC)를 포함한다. 표현 "항-EGFRvIII 항체"는 또한 방사성 핵종에 친죽게이트 된 항-EGFRvIII 항체 또는 그것의 항원-결합 부분을 포함하는 항체-방사성 핵종 친죽게이트 (ARC)를 포함한다.
- [0045] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 특정 항원 (예컨대 EGFRvIII)에 특이적으로 결합하거나 상호작용하는 상보성 결정 영역 (CDR)을 적어도 하나 포함하는 어떠한 항원-결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"는 이화학 결합에 의해 사슬간-연결된 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)인, 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자 및 그것의 다양체 (예컨대 IgM)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는  $V_H$ 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  및  $C_{H3}$ 을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는  $V_L$ 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영

역은 하나의 도메인 ( $C_L1$ )을 포함한다.  $V_H$  및  $V_L$  영역은 추가로, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명되고, 프레임워크 영역 (FR)으로 명명된 보다 보존된 영역이 개재되어 있는, 초가변성 영역으로 세분화될 수 있다. 각각의  $V_H$  및  $V_L$ 은 다음의 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단 쪽으로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 발명의 상이한 구체예에서, 항-EGFRvIII 항체 (또는 그것의 항원-결합 단편)의 FR들은 인간 생식선 서열에 동일하거나 또는 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 일치 서열은 2 또는 그 이상의 CDR의 사이드-바이-사이드 분석을 기준으로 정의될 수 있다.

[0046]

본원에서 사용되는 용어 "항체"는 또한 전체 항체 분자의 항원-결합 단편을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 항체의 "항원-결합 부분", 항체의 "항원-결합 단편" 등은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 어떠한 자연적으로 발생하거나, 효소적으로 얻을 수 있는, 합성 또는 유전자상에서 엔지니어링된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 항체의 항원-결합 단편은 예컨대 전체 항체 분자로부터, 항체 가변 및 임의로 불변 도메인을 코드화하는 DNA의 조작 및 발현을 포함하는 단백질 가수분해성 소화 또는 재조합 유전자 엔지니어링 기법과 같은 어떠한 적합한 표준 기법을 사용하여 유도될 수 있다. 그런 DNA는 공지되어 있거나 및/또는 상업적 공급원, DNA 라이브러리 (예컨대 파지-항체 라이브러리를 포함함)로부터 쉽게 입수 가능하거나, 또는 합성될 수 있다. DNA는 예를 들면 하나 또는 그 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 형태로 배열하기 위하여, 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하며, 아미노산을 변형시키거나, 침가시키거나 결실시키기 위하여 등등의 목적으로 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용함으로써 서열화되고 조작될 수 있다.

[0047]

항원-결합 단편의 비-제한적인 실례는 (i) Fab 단편; (ii)  $F(ab')_2$  단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일 사슬 Fv (scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변성 영역을 모방하는 아미노산 잔기들로 구성되는 최소 인식 단위 (예컨대 CDR3 펩티드와 같은 분리된 상보성 결정 영역 (CDR)), 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드를 포함한다. 다른 엔지니어링된 분자, 예컨대 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라 항체, CDR-그라프트된 항체, 다이아바디, 트라이아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디 (예컨대 일가 나노바디, 이가 나노바디 등), 작은 모듈의 면역약제 (SMIP) 및 상어 가변성 IgNAR 도메인 또한 본원에서 사용된 표현 "항원-결합 단편"에 포함된다.

[0048]

항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 어떠한 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있고 일반적으로 하나 또는 그 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 그것과 한 프레임 내에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다.  $V_L$  도메인과 결합된  $V_H$  도메인을 가지는 항원-결합 단편에서,  $V_H$  및  $V_L$  도메인은 어떠한 적합한 배열로든 서로에 대해 배치될 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체 일 수 있고  $V_H-V_H$ ,  $V_H-V_L$  또는  $V_L-V_L$  이량체를 함유할 수 있다. 다르게는, 항체의 항원-결합 단편은 단량체  $V_H$  또는  $V_L$  도메인을 함유할 수 있다.

[0049]

특정 구체예에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유적으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원-결합 도메인 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인들의 예시적인 형태는 다음을 포함한다: (i)  $V_H-C_{H1}$ ; (ii)  $V_H-C_{H2}$ ; (iii)  $V_H-C_{H3}$ ; (iv)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}$ ; (v)  $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vi)  $V_H-C_{H2}-C_{H3}$ ; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_{H1}$ ; (ix)  $V_L-C_{H2}$ ; (x)  $V_L-C_{H3}$ ; (xi)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}$ ; (xii)  $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ; (xiii)  $V_L-C_{H2}-C_{H3}$ ; 및 (xiv)  $V_L-C_L$ . 상기 열거된 예시적인 형태 중 어느 것을 포함하여, 가변 및 불변 도메인의 어떠한 형태에서든지, 가변 및 불변 도메인들은 서로 직접 연결되거나 또는 전체 또는 부분적인 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩티드 분자의 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에서 가요성 또는 반-가요성 연쇄를 초래하는 적어도 2 (예컨대 5, 10, 15, 20, 40, 60 또는 그 이상)개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체의 항원-결합 단편은 서로 및/또는 하나 또는 그 이상의 단량체  $V_H$  또는  $V_L$  도메인과의 (예컨대 이황화 결합(들)에 의한) 비-공유 결합으로 상기 열거된 가변 및 불변 도메인 형태들 중 어느 것의 단일-이량체 또는 이종-이량체 (또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다.

[0050]

전체 항체 분자와 같이, 항원-결합 단편들은 단일특이성이거나 다중특이성 (예컨대 이중특이성)일 수 있다. 항체의 다중특이성 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이고, 이때 각 가변 도메인은 별도의 항원에 또는 동일 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 개시된 예시적인 이중특이성 항체를 포함하여, 어떠한 다중특이성 항체 방식이든 기술분야에서 활용할 수 있는 기본적인 기법들을 사용하여 본 발명의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에 사용하기 위해 적응될 수 있다.

[0051]

본 발명의 항체는 보체-의존성 세포독성 (CDC) 또는 항체-의존성 세포-중재 세포독성 (ADCC)을 통해 기능할 수

있다. "보체-의존성 세포독성 (CDC)"은 보체의 존재하에 발명의 항체에 의해 항원-발현 세포가 용해되는 것을 나타낸다. "항체-의존성 세포-중재 세포독성 (ADCC)"은 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예컨대 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 마크로파지)가 표적 세포 상에 결합된 항체를 인식하고 그로써 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-중재 반응을 나타낸다. CDC 및 ADCC는 기술분야에 잘 알려져 있고 활용될 수 있는 분석들을 사용하여 측정될 수 있다 (예컨대 미국 특허 제 5,500,362호 및 제 5,821,337호, 및 Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 참조). 항체의 불변 영역은 항체가 보체를 고정시키고 세포-의존성 세포독성을 중재하는 능력에 중요하다. 그러므로, 항체의 아이소타입은 항체가 세포독성을 중재하는 데 바람직한 것인지 여부를 기준으로 선택될 수 있다.

[0052]

발명의 특정 구체예에서, 발명의 항-EGFRvIII 항체는 인간 항체이다. 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역들을 가지는 항체들을 포함하는 것으로 의도된다. 발명의 인간 항체들은 예를 들면 CDR에, 특히 CDR3에, 인간 생식선 면역글로불린 서열들에 의해 코드화되지 않은 아미노산 잔기들 (예컨대 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 생성에 의해, 또는 생체 내에서 체세포성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)을 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 다른 포유류 종, 예컨대 마우스의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프트되어 있는 항체들을 포함하는 것을 의도하지는 않는다.

[0053]

발명의 항체는, 일부 구체예에서, 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 숙주 세포 안에 트랜스펙션된 재조합 발현 벡터 (아래에서 추가로 기술됨)를 사용하여 발현된 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리 (아래에서 추가로 기술됨)로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 도입된 동물 (예컨대 마우스) (예컨대 Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 참조)로부터 분리된 항체 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 포함한 어떠한 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 항체와 같은, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 인간 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 그런 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역들을 가진다. 그러나 특정 구체예에서, 그런 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 생성 (또는 인간 Ig 서열에 대해 유전자도입된 동물이 사용되는 경우 생체 내 체세포 돌연변이 생성)을 받기 쉽고, 그로써 재조합 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 영역의 아미노산 서열들은, 인간 생식선 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 서열로부터 유도되고 그것에 관련된 한편으로, 생체 내에서 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열들이다.

[0054]

인간 항체는 헌지 이종성과 관련된 2가지 형태로 존재할 수 있다. 한 가지 형태에서, 면역글로불린 분자는 이량체가 사슬간 중쇄 이황화 결합에 의해 함께 유지되는, 대략 150 내지 160 kDa의 안정한 4 사슬 구성물을 포함한다. 두 번째 형태에서, 이량체는 사슬-간 이황화 결합을 통해 연결되지 않고 약 75 내지 80 kDa의 분자가 공유적으로 결합된 경쇄 및 중쇄로 구성되어 형성된다 (절반-항체). 이들 형태는 친화성 정제 후에도 분리하기가 매우 어려웠다.

[0055]

다양한 무상 IgG 아이소타입에서 제 2 형태의 출현의 빈도는, 그것에 한정되는 것은 아니지만 항체의 헌지 영역 아이소타입과 관련된 구조적 차이로 인한 것이다. 인간 IgG4 헌지의 헌지 영역의 단일 아미노산 치환은 제 2 형태의 발생을 전형적으로 인간 IgG1 헌지를 사용하여 관찰된 수준으로까지 상당히 감소시킬 수 있다 (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105). 본 발명은 예를 들면 제조시, 바람직한 항체 형태의 수율을 개선시키기 위해 바람직할 수 있는, 헌지, C<sub>H</sub>2 또는 C<sub>H</sub>3 영역에서 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 가지는 항체들을 포함한다.

[0056]

발명의 항체는 분리된 항체일 수 있다. 본원에 사용된 "분리된 항체"는 그것의 천연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 항체를 의미한다. 예를 들어, 유기체의 적어도 한 성분으로부터, 또는 항체가 자연적으로 존재하거나 자연적으로 생성되는 조직 또는 세포로부터 분리 또는 제거된 항체는 본 발명으로 목적에 대해서 "분리된 항체"이다. 분리된 항체는 또한 재조합 세포 내에서 인시튜 항체를 포함한다. 분리된 항체는 적어도 하나의 정제 또는 분리 단계를 거친 항체이다. 특정 구체예에 따르면, 분리된 항체는 실질적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 없을 수 있다.

[0057]

본원에 개시된 항-EGFRvIII 항체들은 그 항체들이 유도된 해당 생식선 서열에 비교하여 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 그런 돌연변이들은 본원에 개시된 아미노산 서열을, 예를 들면 대중 항체 서열 데이터베이스로부터 입수

가능한 생식선 서열과 비교함으로써 쉽게 확인될 수 있다. 본 발명은 본원에 개시된 어떠한 아미노산 서열로부터 유도된 항체 및 그것의 항원-결합 단편들을 포함하며, 이때 하나 또는 그 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내에 있는 하나 또는 그 이상의 아미노산은 그 항체가 유도된 생식선 서열의 해당 잔기(들) 또는 해당 생식선 잔기(들)의 보존성 아미노산 치환으로 돌연변이된다 (그런 서열 변화는 본원에서 포괄적으로 "생식선 돌연변이"로 언급된다). 기술분야의 숙련자는 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열들로 시작하여 하나 또는 그 이상의 개별적인 생식선 돌연변이 또는 그것의 조합을 포함하는 수많은 항체 및 항원-결합 단편들을 쉽게 제조할 수 있다. 특정 구체예에서,  $V_H$  및/또는  $V_L$  도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 그 항체가 유도된 원래의 생식선 서열에서 발견되는 잔기들로 복귀 돌연변이된다. 다른 구체예에서는, 단지 특정 잔기들, 예를 들면 FR1의 처음 8개의 아미노산 내에서 또는 FR4의 마지막 8개의 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기들 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기들만이 원래의 생식선 서열로 복귀 돌연변이된다. 다른 구체예에서, 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들) 중 하나 또는 그 이상이 상이한 생식선 서열 (즉 항체가 원래 유도된 생식선 서열과 상이한 생식선 서열)의 상응하는 잔기(들)로 돌연변이된다. 나아가, 본 발명의 항체는 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내에서 둘 또는 그 이상의 생식선 돌연변이의 어떠한 조합을 함유할 수 있는데, 예컨대 특정한 개별 잔기가 특별한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이되는 한편, 원래의 생식선 서열과 상이한 특정한 다른 잔기는 유지되거나 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단, 하나 또는 그 이상의 생식선 돌연변이를 함유한 항체들 및 항원-결합 단편들이 얻어지면, 예컨대 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화성, 개선된 또는 증강된 길항성 또는 아고니스트성 생물학적 특성 (사례에 따라), 감소된 면역원성 등과 같은 하나 또는 그 이상의 바람직한 특성에 대해 쉽게 시험될 수 있다. 이런 일반적인 방식으로 얻어진 항체들 및 항원-결합 단편들은 본 발명에 포함된다.

[0058] 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 보존성 치환을 가지는, 본원에 개시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 것의 변이체를 포함하는 항-EGFRvIII 항체를 포함한다. 예를 들면, 본 발명은 본원의 표 1에 제시된 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 것과 관련하여 예컨대 10 이하, 8 이하, 6 이하, 4 이하 등의 보존성 아미노산 치환을 가지는 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 아미노산 서열을 가지는 항-EGFRvIII 항체를 포함한다.

[0059] 용어 "에피토프"는 파라토프로서 알려져 있는 항체 분자의 가변 영역의 특이성 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원 결정기를 나타낸다. 단일 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 그러므로, 상이한 항체들이 한 항원 상의 상이한 지역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 어떠한 형태를 가지거나 선형일 수 있다. 형태학적 에피토프는 선형 폴리펩티드 사슬의 상이한 절편들로부터 공간적으로 병렬위치한 아미노산들에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩티드 사슬의 인접한 아미노산 잔기들에 의해서 생성된다. 특정 환경에서, 에피토프는 항원 상의 당류, 포스포릴기 또는 설포닐기의 부분들을 포함할 수 있다.

[0060] 용어 "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은 핵산 또는 그것의 단편을 언급할 때, 다른 핵산 (또는 그것의 상보하는 가닥)으로의 적절한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실을 포함하여 최적으로 배열될 때, 아래에서 논의되는 것과 같이, FASTA, BLAST 또는 Gap와 같은 서열 동일성의 어떠한 잘 알려져 있는 알고리즘에 의해 측정되는 바, 적어도 약 95%, 보다 바람직하게는 적어도 약 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오티드 염기에서 뉴클레오티드 서열 동일성이 있는 것을 나타낸다. 참조 핵산 분자에 대해 실질적인 동일성을 가지는 핵산 분자는, 특정 경우에, 참조 핵산 분자에 의해 코드화된 폴리펩티드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드를 코드화할 수 있다.

[0061] 폴리펩티드에 적용될 때, 용어 "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은 두 개의 펩티드 서열이 디폴트 캡 중량을 사용하여 GAP 또는 BESTFIT 프로그램에 의해서와 같이 최적으로 배열될 때, 적어도 95%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 바람직하게, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존성 아미노산 치환에 의해 상이하다. "보존성 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성 (예컨대 전하 또는 소수성)을 가지는 측쇄 (R 기)를 가지는 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존성 아미노산 치환은 실질적으로는 단백질의 기능적 특성을 변화시키지 않을 것이다. 둘 또는 그 이상의 아미노산 서열이 보존성 치환에 의해 서로 상이한 경우에, 퍼센트 서열 동일성 또는 유사성 정도는 치환의 보존성 성질을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이런 조정을 실시하기 위한 수단은 기술분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있다. 예컨대 Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331 참조 (참조로 포함됨). 유사한 화학적 특성을 가지는 측쇄를 가지는 아미노산 그룹의 실례는 다음을 포함한다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 로이신 및 아이소로이신; (2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄:

라이신, 아르기닌 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파테이트 및 글루타메이트; 및 (7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 바람직한 보존성 아미노산 치환기는 다음과 같다: 발린-로이신-아이소로이신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트 및 아스파라긴-글루타민. 다르게는, 보존성 대체는 문헌: Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445 (본원에 참조로 포함됨)에서 개시된 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 포지티브 값을 가지는 어떠한 변화이다. "적당히 보존성"인 대체는 PAM250 로그-가능성 매트릭스에서 네거티브하지 않은 값을 가지는 어떠한 변화이다.

[0062]

서열 동일성으로도 언급되는, 폴리펩티드에 대한 서열 유사성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존성 아미노산 치환을 포함하여, 다양한 치환, 결실 및 다른 변형에 배정된 유사성의 척도를 사용하여 유사한 서열들을 매치시킨다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는 밀접하게 관련된 폴리펩티드들, 예컨대 상이한 종의 유기체로부터의 상동하는 폴리펩티드들 또는 야생형 단백질과 그것의 뮤테인 사이의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 측정하기 위하여 디폴트 변수들과 함께 사용될 수 있는 Gap 및 Bestfit과 같은 프로그램을 포함한다. 예컨대 GCG 버전 6.1 참조. 폴리펩티드 서열은 또한 GCG 버전 6.1의 프로그램인, 디폴트 또는 권장된 변수들을 사용하는 FASTA를 사용하여 비교될 수 있다. FASTA (예컨대 FASTA2 및 FASTA3)는 의문의 서열과 연구 서열 사이의 최상의 중복 영역의 배열 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다 (Pearson (2000) 상기 동일). 발명의 서열을 상이한 유기체로부터의 대다수의 서열을 함유하는 데이터베이스에 비교할 때 다른 바람직한 알고리즘은 디폴트 변수를 사용하는 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예컨대 Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 및 Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402 참조 (각각 본원에 참조로 포함됨).

[0063]

### pH-의존성 결합

[0064]

본 발명은 pH-의존성 결합 특성을 가지는 항-EGFRvIII 항체들을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 항-EGFRvIII 항체는 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 EGFRvIII에 대한 감소된 결합을 나타낼 수 있다. 다르게는, 발명의 항-EGFRvIII 항체는 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 EGFRvIII에 대한 증강된 결합을 나타낼 수 있다. 표현 "산성 pH"는 약 6.2 미만, 예컨대 약 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0 또는 그 미만의 pH 값을 포함한다. 본원에서 사용되는 표현 "중성 pH"는 약 7.0 내지 약 7.4의 pH를 의미한다. 표현 "중성 pH"는 약 7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35 및 7.4의 pH 값을 포함한다.

[0065]

특정 경우에, "중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 EGFRvIII에 대한 감소된 결합"은 중성 pH에서 EGFRvIII에 대한 항체 결합의  $K_D$  값에 대한 산성 pH에서의 EGFRvIII에 대한 항체 결합의  $K_D$  값의 비율의 관점에서 표시된다 (또는 그 역). 예를 들어, 만약 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이 약 3.0 또는 그 이상의 산성/중성  $K_D$  비율을 나타낸다면, 항체 또는 그것의 항원-결합 단편은 본 발명의 목적에 대해 "중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 EGFRvIII에 대한 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 예시적인 특정 구체예에서, 본 발명의 항체 또는 그것의 항원-결합 단편에 대한 산성/중성  $K_D$  비율은 약 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 또는 그 이상일 수 있다.

[0066]

pH-의존성 결합 특성을 가지는 항체들은 예컨대 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 특정 항원에 대해 감소된 (또는 증강된) 결합에 대해 항체 집단을 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. 추가로, 아미노산 수준에서 항원-결합 도메인의 변형은 pH-의존성 특성을 가지는 항체들을 유발할 수 있다. 예를 들어, 항원-결합 도메인의 하나 또는 그 이상의 아미노산을 (예컨대 CDR 내에서) 히스티딘 잔기로 치환함으로써, 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 감소된 항원-결합을 가지는 항체가 얻어질 수 있다.

[0067]

### Fc 변이체들을 포함하는 항-EGFRvIII 항체들

[0068]

본 발명의 특정 구체예에 따르면, 예컨대 중성 pH에 비교하여 산성 pH에서 FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 증강시키거나 감소시키는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-EGFRvIII 항체가 제공된다. 예를 들어, 본 발명은 Fc 도메인의 C<sub>H</sub>2 또는 C<sub>H</sub>3 영역에 돌연변이를 포함하는 항-EGFRvIII 항체를 포함하는데, 이때 돌연변이(들)는 산성 환경에서 (예컨대 pH가 약 5.5 내지 약 6.0 범위인 엔도솜에서) Fc 도메인의 FcRn에 대한 친화성을 증가시킨다. 그런 돌연변이는 동물에게 투여될 때 항체의 혈청 반감기의 증가를 초래할 수 있다. 그런 Fc 변형의 비-제한적인 실례는, 예컨대 위치 250에서의 변형 (예컨대 E 또는 Q); 250 및 428에서의 변형 (예컨대 L 또는 F); 252에서의 변형 (예컨대 L/Y/F/W 또는 T), 254에서의 변형 (예컨대 S 또는 T) 및

256에서의 변형 (예컨대 S/R/Q/E/D 또는 T); 또는 위치 428 및/또는 433에서의 변형 (예컨대 H/L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434에서의 변형 (예컨대 A, W, H, F 또는 Y [N434A, N434W, N434H, N434F 또는 N434Y]); 또는 위치 250 및/또는 428에서의 변형; 또는 위치 307 또는 308에서의 변형 (예컨대 308F, V308F) 및 434에서의 변형을 포함한다. 한 구체예에서, 변형은 428L (예컨대 M428L) 및 434S (예컨대 N434S) 변형; 428L, 259I (예컨대 V259I) 및 308F (예컨대 V308F) 변형; 433K (예컨대 H433K) 및 434 (예컨대 434Y) 변형; 252, 254 및 256 (예컨대 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형 (예컨대 T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형 (예컨대 308F 또는 308P)을 포함한다. 다른 구체예에서, 변형은 265A (예컨대 D265A) 및/또는 297A (예컨대 N297A) 변형을 포함한다.

[0069] 예를 들어, 본 발명은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 돌연변이의 하나 또는 그 이상의 쌍 또는 그룹을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-EGFRvIII 항체를 포함한다: 250Q 및 248L (예컨대 T250Q 및 M248L); 252Y, 254T 및 256E (예컨대 M252Y, S254T 및 T256E); 428L 및 434S (예컨대 M428L 및 N434S); 257I 및 311I (예컨대 P257I 및 Q311I); 257I 및 434H (예컨대 P257I 및 N434H); 376V 및 434H (예컨대 D376V 및 N434H); 307A, 380A 및 434A (예컨대 T307A, E380A 및 N434A); 및 433K 및 434F (예컨대 H433K 및 N434F). 전술한 Fc 도메인 돌연변이 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이들의 모든 가능한 조합은 본 발명의 범주 내에서 고려된다.

[0070] 본 발명은 또한 키메라 중쇄 불변 ( $C_H$ ) 영역을 포함하는 항-EGFRvIII 항체를 포함하며, 이때 키메라  $C_H$  영역은 하나 이상의 면역글로불린 아이소타입의  $C_H$  영역으로부터 유도된 절편들을 포함한다. 예를 들어, 발명의 항체는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유도된  $C_H3$  도메인의 일부 또는 전부와 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유도된  $C_H2$  도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 키메라  $C_H$  영역을 포함할 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 발명의 항체는 키메라 힌지 영역을 가지는 키메라  $C_H$  영역을 포함한다. 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유도된 "하부 힌지" 서열 (EU 넘버링에 따라 위치 228 내지 236의 아미노산 잔기)과 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유도된 "상부 힌지" 아미노산 서열 (EU 넘버링에 따라 위치 216 내지 227의 아미노산 잔기)을 포함할 수 있다. 특정 구체예에 따르면, 키메라 힌지 영역은 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 상부 힌지로부터 유도된 아미노산 잔기 및 인간 IgG2 하부 힌지로부터 유도된 아미노산 잔기를 포함한다. 본원에 기술된 키메라  $C_H$  영역을 포함하는 항체는, 특정 구체예에서, 항체의 치료적 또는 약물동역학적 특성에 불리하게 영향을 미치지 않으면서 변형된 Fc 이펙터 기능을 나타낼 수 있다 (예컨대 2013년 2월 1일에 출원된 미국 출원 번호 61/759,578 참조, 출원의 개시는 본원에 전체적으로 참조로 포함됨).

#### 항체-약물 컨쥬케이트 (ADC)

[0072] 본 발명은 세포독성제, 화학요법 약물 또는 방사성 동위원소와 같은 치료 부분에 컨쥬케이트된 항-EGFRvIII 항체 또는 그것의 항원-결합 단편을 포함하는 항체-약물 컨쥬케이트 (ADC)를 제공한다.

[0073] 세포독성제는 세포의 성장, 생존율 또는 증식에 해로운 어떠한 제제를 포함한다. 발명의 이 측면에 따라 항-EGFRvIII 항체들에 컨쥬케이트될 수 있는 적합한 세포독성제 및 화학요법제의 실례는 예컨대 다음을 포함한다: 1-(2클로로에틸)-1,2-다이에틸설톤 하이드라지드, 1,8-다이아이드록시-바이사이클로[7.3.1]트라이데카-4,9-다이엔-2,6-다이인-13-온, 1-테하이드로테스토스테론, 5-플루오로우라실, 6-머캅토퓨린, 6-티오구아닌, 9-아미노캄프토테신, 악티노마이신 D, 아미니틴, 아미노프테린, 안구이딘, 안트라사이클린, 안트라마이신 (AMC), 아우리스타틴, 블레오마이신, 부술판, 부티르산, 칼리케아미신, 캄프토테신, 카르미노마이신, 카르무스틴, 세마도틴, 시스플라틴, 콜키신, 콤브레타스타틴, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 시토칼라신 B, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테카르바진, 다이아세톡시펜틸독소루비신, 다이브로모만니톨, 다이하이드록시 안트라신 다이온, 다이소라졸, 돌라스타틴, 독소루비신, 듀오카르마이신, 에키노마이신, 엘레우테로빈, 에메틴, 에포필론, 에스페라미신, 에스트라무스틴, 에티듐 브로마이드, 에토포시드, 플루오로우라실, 겔다나마이신, 그라미시딘 D, 글루코코르티코이드, 이리노테칸, 렙토마이신, 류로신, 리도카인, 로무스틴 (CCNU), 메이탄시노이드, 메클로레타민, 멜팔란, 메르캅토퓨린, 메토프테린, 메토트렉세이트, 미트라마이신, 미토마이신, 미토크산트론, N8-아세틸 스퍼미딘, 포도필로톡신, 프로카인, 프로파놀롤, 프테리딘, 퓨로마이신, 피롤로벤조다이아제핀 (PDB), 리죽신, 스트렙토조토신, 탈리소마이신, 탁솔, 테노포시드, 테트라카인, 티오에파 클로람부실, 토메이마이신, 토포테칸, 투불라이신, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 및 전술한 것들 중 어느 것의 유도체. 특정 구체예에 따르면, 항-EGFRvIII 항체에 컨쥬케이트되는 세포독성제는 DM1 또는 DM4와 같은 메이탄시노이드, 토메이마이신 유

도체 또는 돌라스타틴 유도체이다. 기술분야에 공지되어 있는 다른 세포독성제, 이를테면 예컨대 리신, C. difficile 독소, 슈도모나스 내독소, 리신, 디프테리아 독소, 보툴리눔 독소, 브리오딘, 사포린, 포키위드 독소 (즉 파이토라카톡신 및 파이토라시게닌)와 같은 단백질 독소 및 문헌 (Sapra et al., *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469)에 제시된 것과 같은 다른 것들도 본 발명의 범주 내에서 고려된다.

[0074] 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 방사성 핵종에 컨쥬케이트된 항-EGFRvIII 항체를 포함하는 항체-방사성 핵종 컨쥬케이트 (ARC)를 포함한다. 발명의 이 측면의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 방사성 핵종은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>186</sup>Re, <sup>227</sup>Th, <sup>222</sup>Rn, <sup>223</sup>Ra, <sup>224</sup>Ra 및 <sup>90</sup>Y를 포함한다.

[0075] 본 발명의 특정 구체예에서, 링커 분자를 통해 세포독성제 (예컨대 상기 개시된 세포독성제 중 어느 것)에 컨쥬케이트된 항-EGFRvIII 항체를 포함하는 ADC가 제공된다. 기술분야에 공지되어 있는 어떠한 링커 분자 또는 링커 기술이든지 본 발명의 ADC를 생성 또는 구성하기 위해 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 링커는 절단 가능한 링커이다. 다른 구체예에 따르면, 링커는 절단 가능하지 않은 링커이다. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 링커는 예컨대 다음을 포함하거나 그것들로 구성되는 링커를 포함한다: MC (6-말레이미도카프로일), MP (말레이미도프로파노일), val-cit (발린-시트룰린), val-alanine (발린-알라닌), 프로테아제-절단 가능한 링커의 2펩티드 부위, ala-phe (알라닌-페닐알라닌), 프로테아제-절단 가능한 링커의 2펩티드 부위, PAB (p-아미노벤질 옥시카르보닐), SPP (N-석신이미딜 4-(2-파리딜티오)펜타노에이트), SMCC (N-석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1 카르복실레이트), SIAB (N-석신이미딜 (4-요오도-아세틸)아미노벤조에이트) 및 그것들의 변이체 및 조합. 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 링커들의 추가의 실례는 예컨대 US 7,754,681 및 Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21:5-13 및 본원에 인용된 참고문헌들에 개시되고, 참고문헌들의 내용은 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0076] 본 발명은 링커가 항체 또는 항원-결합 분자 내의 특별한 아미노산에서의 부착을 통해 약물 또는 세포독소에 항-EGFRvIII 항체 또는 항원-결합 분자를 연결시키는 ADC를 포함한다. 발명의 이 측면의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 아미노산 부착은 예컨대 라이신 (예컨대 US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; 및 US 2012/0585592 참조), 시스테인 (예컨대 US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; 및 US 7,750,116 참조), 셀레노시스테인 (예컨대 WO 2008/122039; 및 Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456 참조), 포르밀 글리신 (예컨대 Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51 및 Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067 참조) 및 산성 아미노산 (예컨대 WO 2013/068874 및 WO 2012/166559 참조) 및 산성 아미노산 (예컨대 WO 2012/05982 참조)을 포함한다. 링커는 또한 탄수화물에의 부착을 통해 (예컨대 US 2008/0305497, 및 Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130 참조) 및 이황화 링커를 통해 (예컨대 WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 및 Shaunik et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313 참조) 항원-결합 단백질에 컨쥬케이트될 수 있다.

[0077] 화학적 부분을 펩티드, 폴리펩티드 또는 다른 마크로분자에 컨쥬케이팅하기 위한 것으로 기술분야에 알려져 있는 어떠한 방법이든지 본원에 기술된 항-EGFRvIII ADC를 제조하기 위해 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 링커를 통한 항체-약물 컨쥬케이션을 위한 예시적인 방법은 하기 실시예 12에서 설명된다. 이 예시적인 방법에 대한 변형은 기술분야의 통상적인 기술자에 의해 인지될 것이고 본 발명의 범주 내에서 고려된다.

[0078] 특정 구체예에 따르면, 본 발명은 ADC를 제공하고, 이때 본원에 기술된 항-EGFRvIII 항체 (예컨대 H1H1863N2로 표시된 항체)는 WO2014/145090 (개시는 본원에 전체적으로 참조로 포함됨)에 제시된 것과 같이 링커-약물 조성물에 컨쥬케이트된다 (예컨대 본원에서 "M0026"으로서도 언급되는 화합물 "7") (하기 실시예 12 참조).

#### 에피토프 지도화 및 관련된 기술들

[0080] 본 발명의 항체가 결합하는 에피토프는 EGFRvIII 단백질의 3 또는 그 이상 (예컨대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 그 이상)의 아미노산의 단일한 연속 서열로 구성될 수 있다. 다르게는, 에피토프는 EGFRvIII의 다수의 비-연속적 아미노산 (또는 아미노산 서열)으로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 에피토프는 EGFRvIII의 리간드-결합 도메인 상에 또는 그것에 가깝게 위치한다. 다른 구체예에서, 에피토프는 EGFRvIII의 리간드-결합 도메인 외부에, 예컨대 항체가 그런 에피토프에 결합할 때 EGFRvII에 대한 리간드 결합을 간섭하지 않는 EGFRvIII의 표면상의 위치에 위치한다.

[0081] 특정 구체예에 따르면, 본 발명은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 (그리고 EGFR에는 결합하지 않는) 항-

EGFRvIII 항체를 포함하는데, 이때 항체는 EGFRvIII 접합 펩티드 (예컨대 SEQ ID NO:148)를 인식한다. 그런 항체들은 본원에서 "접합 펩티드 결합제", "EGFRvIII 펩티드-결합 항체" 등으로 언급될 수 있다. 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 (그리고 EGFR에 결합하지 않는) 항-EGFRvIII 항체를 포함하며, 이때 항체들은 EGFRvIII 접합 펩티드를 인식하지 않는다 (예컨대 SEQ ID NO:148의 접합 펩티드를 인식하지 않거나 및/또는 SEQ ID NO:165의 펩티드를 인식하지 않는다). 그런 항체들은 본원에서 "형태적 결합제", "EGFRvIII 형태적 에피토프 결합제" 등으로 언급될 수 있다.

[0082] 기술분야에서 통상적인 기술을 가진 사람들에게 알려져 있는 다양한 기법들은 항체가 폴리펩티드 또는 단백질 내에서 "하나 또는 그 이상의 아미노산과 상호작용"하는 지의 여부를 측정하기 위하여 사용될 수 있다. 예시적인 기법으로는, 예컨대 Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)에 기술된 것과 같은 기본적인 교차-차단 분석, 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩티드 블롯 분석 (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463) 및 펩티드 절단 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절출, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법들도 사용될 수 있다 (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). 항체와 상호작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 확인하기 위해 사용될 수 있는 다른 방법은 질량 분석에 의해 검출된 수소/중수소 교환이다. 일반적인 의미로, 수소/중수소 교환 방법은 관심의 단백질을 중수소로 교환하고, 이어서 중수소-표지된 단백질에 항체를 결합시키는 것을 포함한다. 다음으로, 단백질/항체 복합체는 물에 전달되어 항체에 의해 보호된 잔기들 (중수소-표지된 채로 유지됨)을 예외로 하고 모든 잔기에서 수소-중수소 교환이 일어나는 것이 허용된다. 항체의 분리 후에, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분광분석에 의해 분석되고, 그로써 항체가 상호작용하는 특이적 아미노산들에 해당하는 중수소-표지된 잔기들을 드러낸다. 예컨대 Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A 참조.

[0083] 본 발명은 추가로 본원에 기술된 특이적 예시 항체들 (예컨대 하기 표 1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열들 중 어느 것을 포함하는 항체) 중 어느 것과 동일한 에피토프에 결합하는 항-EGFRvIII 항체를 포함한다. 마찬가지로, 본 발명은 또한 본원에 기술된 특이적 예시 항체들 (예컨대 하기 표 1에 제시된 것과 같은 아미노산 서열들 중 어느 것을 포함하는 항체) 중 어느 것과 EGFRvIII에 대한 결합에 대해 경합하는 항-EGFRvIII 항체를 포함한다.

[0084] 당업자는 기술분야에 공지되어 있고 본원에 예시된 기본적인 방법들을 사용함으로써 항체가 참조 항-EGFRvIII 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 그것과의 결합에 대해 경합하는지를 쉽게 측정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 발명의 참조 항-EGFRvIII 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지를 측정하기 위하여, 참조 항체가 EGFRvIII 단백질에 결합하는 것이 허용된다. 다음에, 시험 항체가 EGFRvIII 분자에 결합하는 능력이 평가된다. 만약 시험 항체가 참조 항-EGFRvIII 항체와 충분히 결합한 후에 EGFRvIII에 결합할 수 있다면, 시험 항체는 참조 항-EGFRvIII 항체보다 상이한 에피토프에 결합한다고 결론지울 수 있다. 다른 한편으로, 만약 시험 항체가 참조 항-EGFRvIII 항체와 충분한 결합 후에 EGFRvIII 분자에 결합할 수 없다면, 그때에는 시험 항체는 발명의 참조 항-EGFRvIII 항체에 의해 결합된 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 것이다. 그런 다음 시험 항체의 관찰된 결합 부족이 실제로 참조 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합 때문인지 또는 입체적 차단 (또는 다른 현상)이 관찰된 결합 부족의 원인이 되는지를 확인하기 위하여 추가의 기본적인 실험 (예컨대 펩티드 돌연변이 및 결합 분석)이 수행될 수 있다. 이런 종류의 실험은 ELISA, RIA, BIacire, 유동 세포분석 또는 기술분야에서 활용 가능한 어떠한 다른 정량적 또는 정성적 항체-결합 분석을 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에 따르면, 만약 1-, 5-, 10-, 20- 또는 100-배 과잉량의 한 항체가 경합 결합 분석에서 측정되는 바, 적어도 50%, 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%까지 다른 항체의 결합을 억제한다면 두 항체는 동일한 (또는 중복되는) 에피토프에 결합한 것이다 (예컨대 Junghans et al., Cancer Res. 1990;50:1495-1502 참조). 다르게는, 만약 본질적으로 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거한다면 두 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 여겨진다. 두 항체는 만약 한 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 아미노산 돌연변이의 하위세트만이 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거한다면 "중복하는 에피토프"를 가지는 것으로 여겨진다.

[0085] 항체가 참조 항-EGFRvIII 항체와의 결합에 대해 경합 (또는 결합에 대해 교차-경합)하는지를 측정하기 위하여, 상기-기술된 결합 방법론은 두 가지 방향으로 수행된다: 첫 번째 방향에서는, 참조 항체는 포화 조건하에서 EGFRvIII 단백질에 결합하는 것이 허용되고 FEGFRvIII 분자에 대한 시험 항체의 결합의 평가가 이어진다. 두 번째 방향에서는, 시험 항체는 포화 조건하에서 EGFRvIII 단백질에 결합하는 것이 허용되고 FEGFRvIII 분자에 대한 참조 항체의 결합의 평가가 이어진다. 만약 둘 다의 방향에서, 단지 첫 번째 (포화) 항체가 EGFRvIII 분자에 결합할 수 있다면, 시험 항체 및 참조 항체는 EGFRvIII에 대한 결합에 대해 경합한다고 결론지울 수 있다. 기술

분야의 당업자에 의해 인지되는 것과 같이, 참조 항체와의 결합에 대해 경합하는 항체는 본질적으로 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 없지만, 중복되는 또는 인접한 에피토프에의 결합에 의해 참조 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

#### [0086] 인간 항체의 제조

본 발명의 항-EGFRvIII 항체는 전체 인간 항체일 수 있다. 전체 인간 단클론성 항체를 포함하여, 단클론성 항체의 제조 방법은 기술분야에 공지되어 있다. 어떠한 그런 공지된 방법이든지 인간 EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 제조하기 위하여 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.

예를 들면 VELOCIMMUNE™ 기술 또는 전체 인간 단클론성 항체를 생성하기 위한 어떠한 다른 유사한 공지된 방법을 사용하여, 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 가지는, EGFRvIII에 대한 고친화성 키메라 항체들이 처음에 분리된다. 하기 실시예 단원에서처럼, 항체들은 친화성, 리간드 차단 활성, 선택성, 에피토프 등을 포함하여, 바람직한 특성들에 대해 특성화되고 선택된다. 필요하다면, 마우스 불변 영역은 전체 인간 항-EGFRvIII 항체를 생성하기 위하여 원하는 인간 불변 영역, 예를 들면 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4로 대체된다. 선택된 불변 영역은 특이한 용도에 따라 달라질 수 있는 한편, 고친화성 항원-결합 및 표적 특이성 특성들은 가변 영역에 존재한다. 특정한 경우에, 전체 인간 항-EGFRvIII 항체들은 직접 항원-포지티브 B 세포로부터 분리된다.

#### [0089] 생물학적 동등물

본 발명의 항-EGFRvIII 항체 및 항체 단편들은 기술된 항체들의 아미노산 서열들과 다른 아미노산 서열들을 갖지만 인간 EGFRvIII에 결합하는 능력은 보유하는 단백질들을 포함한다. 그런 변이 항체 및 항체 단편들은 모 서열과 비교할 때 아미노산의 하나 또는 그 이상의 첨가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기술된 항체들의 생물학적 활성과 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 본 발명의 항-EGFRvIII 항체-코드화 DNA 서열은 개시된 서열과 비교할 때 하나 또는 그 이상의 첨가, 결실 또는 치환을 포함하지만 발명의 항-EGFRvIII 항체 또는 항체 단편에 본질적으로 생물학적으로 동등한 항-EGFRvIII 항체 또는 항체 단편을 코드화하는 서열들을 포함한다. 그런 변이 아미노산 및 DNA 서열의 실례는 상기에서 논의된다.

2개의 항원-결합 단백질 또는 항체들은, 만약, 예를 들어 그것들이 흡수되는 속도와 정도가 유사한 실험 조건하에서 단일 용량이나 다중 용량으로 동일한 물 용량으로 투여될 때 유의할만한 차이를 나타내지 않는, 약학적으로 동등하거나 약학적으로 대체 가능한 것이라면 생물학적으로 동등한 것으로 여겨진다. 일부 항체는 그것들이 흡수되는 정도에서는 동등하지만 흡수 속도에서는 그렇지 않고 그런 흡수 속도에서의 차이가 고의적이고 표지화를 반영하는 것이기 때문에 아직은 생물학적으로 동등한 것으로 여겨질 수 있고, 예컨대 만성 용도에 대해 효과적인 신체 약물 농도의 도달에 필수적이지 않으며 연구된 특정 약물 생성물에 대해 의학적으로 중요하지 않는 것으로 여겨진다면, 동등하거나 약학적으로 대체 가능한 것으로 여겨질 것이다.

한 구체예에서, 2 항원-결합 단백질은 그것들의 안전성, 순도 및 효능에서 임상적으로 의미있는 차이가 없다면 생물학적으로 동등하다.

한 구체예에서, 2 항원-결합 단백질은 만약 스위칭이 없을 때의 연속적인 치료법과 비교하여 면역원성의 임상적으로 유의미한 차이 또는 감소된 유효성을 포함하여, 부작용의 위험성의 예상되는 증가 없이 환자가 참조 생성물과 생물학적 생성물 사이에서 1회 또는 그 이상 스위칭될 수 있다면 생물학적으로 동등하다.

한 구체예에서, 2 항원-결합 단백질은 그것들이 둘 다 사용 조건 또는 조건들에 대하여 통상적인 작용 메커니즘 또는 메커니즘들에 의해 작용한다면 그런 메커니즘이 알려져 있는 정도까지, 생물학적으로 동등하다.

생물학적 동등성은 생체 내 및 시험관 내 방법들에 의해 증명될 수 있다. 생물학적 동등성 척도는 예컨대 (a) 항체 또는 그것의 대사물의 농도가 혈액, 혈장, 혈청 또는 다른 생물학적 유체에서 시간의 함수로서 측정되는, 인간 또는 다른 포유류에서의 생체 내 시험; (b) 생체 내 생물학적 활용성 데이터와 상관되고 합리적으로 인간에서 예측되는 시험관 내 시험; (c) 항체 (또는 그것의 표적)의 적절한 급성 약물학적 효과가 시간의 함수로서 측정되는, 인간 또는 다른 포유류에서의 생체 내 시험; 및 (d) 항체의 안전성, 효능 또는 생물학적 활용성 또는 생물학적 동등성을 수립하는, 잘-제어된 임상 실험을 포함한다.

발명의 항-EGFRvIII 항체의 생물학적으로 동등한 변이체는, 예를 들면 잔기 또는 서열들의 다양한 치환을 만들었으나 또는 생물학적 활성에 대해 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열들을 결실시킴으로써 구성될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성에 필수적이지 않은 시스테인 잔기는 재생시 불필요한 또는 부정확한 분자내

이황화 가교의 형성을 방지하기 위하여 결실되거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 다른 맥락으로는, 생물학적으로 동등한 항체는 항체의 글리코실화 특성을 변형시키는 아미노산 변화, 예컨대 글리코실화를 제거하거나 없애는 돌연변이를 포함하는 항-EGFRvIII 항체 변이체를 포함할 수 있다.

### [0097] 종 선택성 및 종 교차-반응성

특정 구체예에 따르면, 본 발명은 인간 EGFRvIII에 결합하지만 다른 종의 EGFRvIII에는 결합하지 않는 항-EGFRvIII 항체들을 제공한다. 본 발명은 또한 인간 EGFRvIII에 및 하나 또는 그 이상의 비-인간 종으로부터의 EGFRvIII에 결합하는 항-EGFRvIII 항체들을 포함한다. 예를 들어, 발명의 항-EGFRvIII 항체들은 인간 EGFRvIII에 결합할 수 있고, 경우에 따라 마우스, 래트, 기니아 피그, 햄스터, 게르빌루스 쥐, 돼지, 고양이, 개, 토끼, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 사이노몰구스 원숭이, 붉은털 원숭이 또는 침팬지 EGFRvIII에 결합하거나 결합하지 않을 수 있다. 본 발명의 특정 예시적인 구체예에 따르면, 인간 EGFRvIII 및 사이노몰구스 원숭이 (예컨대 마카카 파시큘라리스 (*Macaca fascicularis*)) EGFRvIII에 특이적으로 결합하는 항-EGFRvIII 항체가 제공된다. 발명의 다른 항-EGFRvIII 항체는 인간 EGFRvIII에 결합하지만 사이노몰구스 원숭이 EGFRvIII에는 결합하지 않거나 또는 단지 약하게 결합한다.

### [0099] 다중특이성 항체들

본 발명의 항체들은 단일특이성이거나 다중특이성 (예컨대 이중특이성)일 수 있다. 다중특이성 항체들은 하나의 표적 폴리펩티드의 상이한 에피토프에 대해 특이적이거나 또는 하나 이상의 표적 폴리펩티드에 특이적인 항원-결합 도메인을 함유할 수 있다. 예컨대 Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244 참조. 본 발명의 항-EGFRvIII 항체들은 다른 기능성 분자, 예컨대 다른 웨პ티드 또는 단백질에 연결될 수 있거나 또는 그것과 공-발현될 수 있다. 예를 들면, 항체 또는 그것의 단편은 제 2 결합 특이성을 가지는 이중특이성 또는 다중특이성 항체를 생성하기 위해 하나 또는 그 이상의 다른 분자 실체, 예컨대 다른 항체 또는 항체 단편에 기능적으로 (예컨대 화학적 커플링, 유전자 융합, 비공유성 결합 또는 그 외의 것에 의해) 연결될 수 있다.

본 발명은 면역글로불린의 한 아암이 인간 EGFRvIII에 결합하고, 면역글로불린의 다른 아암은 제 2 항원에 특이적인 이중특이성 항체들을 포함한다. EGFRvIII-결합 아암은 하기의 표 1에 표시된 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열 중 어느 것을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, EGFRvIII-결합 아암은 인간 EGFRvIII에 결합하고 EGFRvIII에의 리간드 결합을 차단한다. 다른 구체예에서, EGFRvIII-결합 아암은 인간 EGFRvIII에 결합하지만 EGFRvIII에의 리간드 결합을 차단하지 못한다.

본 발명의 맥락에서 사용될 수 있는 예시적인 이중특이성 항체는 제 1 면역글로불린 (Ig) C<sub>H</sub>3 도메인 및 제 2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인의 사용을 포함하며, 이때 제 1 및 제 2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 적어도 하나의 아미노산만큼 서로 상이하고, 이때 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중특이성 항체에 비교하여 단백질 A에의 이중특이성 항체의 결합을 감소시킨다. 한 구체예에서, 제 1 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 단백질 A에 결합하고 제 2 Ig C<sub>H</sub>3 도메인은 H95R 변형 (IMGT 엑손 넘버링에 의함; EU 넘버링에 의해서는 H435R)과 같은 단백질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이를 함유한다. 제 2 C<sub>H</sub>3은 추가로 Y96F 변형 (IMGT에 의함; EU에 의하면 Y436F)을 포함할 수 있다. 제 2 C<sub>H</sub>3 내에서 찾을 수 있는 추가의 변형은 다음을 포함한다: IgG1 항체의 경우에 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I (IMGT에 의함; EU에 의하면 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 항체의 경우에 N44S, K52N 및 V82I (IMGT; EU에 의하면 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4의 경우에 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I (IMGT에 의함; EU에 의하면 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I). 상기 기술된 이중특이성 항체 포맷에 대한 변형은 본 발명의 범주 내에서 고려된다.

본 발명의 맥락에 사용될 수 있는 다른 예시적인 이중특이성 포맷은, 제한 없이, 예컨대 scFv-기준 또는 다이아바디 이중특이성 포맷, IgG-scFv 융합, 이중 가변성 도메인 (DVD)-Ig, 콰드로마 (Quadroma), 뉘스-인투-홀스 (knobs-into-holes), 공통 경쇄 (예컨대 뉘스-인투-홀스를 가지는 공통 경쇄 등), 크로스Mab, 크로스Fab, (시드 (SEED))바디, 로이신 지퍼, 듀오바디, IgG1/IgG2, 이중 작용성 Fab (DAF)-IgG 및 Mab<sup>2</sup> 이중특이성 포맷을 포함한다 (전술한 포맷의 논평을 위해서는 예컨대 Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 및 그것에 인용된 참고문헌들 참조). 이중특이성 항체는 또한 웨პ티드/핵산 컨쥬게이션을 사용하여 구성될 수 있고, 이때 예컨대 직각의 화학적 반응성을 가진 비천연 아미노산이 부위-특이적 항체-올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트를 생성하기 위해 사용되며 그런 다음 규정된 조성, 원자가 및 기하학적 구조를 가진 다양체 복합체로 자체-어셈블링된다 (예컨대

Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012] 참조).

#### [0104] 치료적 제형 및 투여

발명은 본 발명의 항-EGFRvIII 항체들 또는 그것의 항원-결합 단편들을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 발명의 약학 조성물은 개선된 수송, 전달, 내성 등을 제공하는 적당한 담체, 부형제 및 다른 제제들과 제형된다. 다수의 적절한 제형은 모든 약학적 화학물질에 대해 알려져 있는 처방집에서 찾아볼 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. 이들 제형은 예를 들면, 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 소포체를 함유하는 지질 (양이온성 또는 음이온성) (예컨대 LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), DNA 컨쥬게йт, 무수 흡수 페이스트, 수-중-유 및 유-중-수 에멀션, 에멀션 카르보왁스 (다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반-고체 젤 및 카르보왁스를 함유하는 반-고체 혼합물을 포함한다. 또한 Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311 참조.

[0106] 환자에게 투여된 항체의 용량은 환자의 연령 및 크기, 표적 질병, 상태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 바람직한 용량은 전형적으로 체중 도는 체표면적에 따라 계산된다. 성인 환자에서는, 본 밤령의 항체가 정상적으로 약 0.01 내지 약 20 mg/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.02 내지 약 7, 약 0.03 내지 약 5 또는 약 0.05 내지 약 3 mg/kg 체중의 단일 용량으로 정맥 내로 투여되는 것이 유리할 것이다. 상태의 심각성에 따라, 치료의 빈도 및 기간은 조정될 수 있다. 항-EGFRvIII 항체를 투여하기에 효과적인 단위용량 및 스케줄은 실험적으로 측정될 수 있다; 예를 들면 환자 진전은 주기적인 평가에 의해 모니터링될 수 있고, 따라서 용량이 조정된다. 더욱이, 단위용량의 종 내 스케일링은 기술분야에 잘 알려져 있는 방법들을 사용하여 수행될 수 있다 (예컨대 Mordini et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

[0107] 다양한 전달 시스템, 예컨대 리포솜으로의 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 돌연변이 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 중재된 식세포작용 (예컨대 Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 참조)은 알려져 있고 발명의 약학 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다. 도입 방법들은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 피내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 비강 내, 경막외 및 구강 경로를 포함한다. 조성물은 어려한 편리한 경로에 의해, 예를 들면 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 내피 또는 점막 피부의 라이닝 (예컨대 구강 점막, 직장 및 소장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성 제제들과 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적이거나 국소적일 수 있다.

[0108] 본 발명의 약학 조성물은 표준 바늘 및 주사기로 피하로 또는 정맥 내로 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치는 본 발명의 약학 조성물을 전달하는 데 쉽게 적용될 수 있다. 그런 펜 전달 장치는 재사용할 수 있거나 일회용일 수 있다. 재사용할 수 있는 펜 전달 장치는 일반적으로 약학 조성물을 함유하는 교체 가능한 카트리지를 활용한다. 일단 카트리지 내의 모든 약학 조성물이 투여되고 카트리지가 비워지면, 빈 카트리지는 쉽게 베려질 수 있고 약학 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 교체될 수 있다. 그런 다음 펜 전달 장치가 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서는 교체 가능한 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 저장고에 보유된 약학 조성물로 사전충전된다. 일단 저장고의 약학 조성물이 비워지면, 전체 장치는 베려진다.

[0109] 수많은 재사용 가능한 펜 및 자동주사기 전달 장치는 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에 사용될 수 있다. 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 몇몇 예를 들자면 AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ 펜 (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25™ 펜, HUMALOG™ 펜, HUMALIN 70/30™ 펜 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II 및 III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ 펜 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ 및 OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에서 사용될 수 있는 일회용 펜 전달 장치의 실례는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 몇몇 예를 들자면, SOLOSTAR™ 펜 (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) 및 KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ 자동주사기 (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) 및 HUMIRA™ 펜 (Abbott Labs, Abbott Park IL)을 포함한다.

- [0110] 특정 상황에서, 약학 조성물은 제어된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 구체예에서, 펌프가 사용될 수 있다 (Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 참조). 다른 구체예에서, 중합체 물질이 사용될 수 있다; Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida 참조. 또 다른 구체예에서, 제어된 방출 시스템은 조성물의 표적에 근접하여 배치될 수 있어서, 전신적 용량의 부분만을 필요로 한다 (예컨대 Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, 상기 동일, vol. 2, pp. 115-138 참조). 다른 제어된 방출 시스템은 Langer에 의해 논평에서 (Langer, 1990, Science 249:1527-1533) 논의된다.
- [0111] 주사 가능한 제제는 정맥 내, 피하, 피부 내 및 근육 내 주사, 드립 주입 등을 위한 단위용량 형태를 포함할 수 있다. 이들 주사 가능한 제제는 대중적으로 알려져 있는 방법들에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 주사 가능한 제제는 예컨대 상기 기술된 항체 또는 그것의 염을 관례적으로 주사를 위해 사용된 멸균 수성 매질 또는 유성 매질에 녹이거나, 혼탁시키거나 또는 유화시킴으로써 제조될 수 있다. 주사용 수성 매질로서, 예를 들면 생리 식염수, 글루코오스 및 다른 보조제를 함유한 등장성 용액 등이 있고, 그것들은 알코올 (예컨대 에탄올), 다가알코올 (예컨대 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 게면활성제 (예컨대 폴리소르베이트 80, 수소화된 캐스터유의 HCO-50 (폴리옥시에틸렌 (50 mol) 첨가물)와 같은 적절한 가용화제와 함께 사용될 수 있다. 유성 매질로서는 예컨대 참기름, 대두유 등이 사용될 수 있고, 그것들은 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과 같은 가용화제와 함께 사용될 수 있다. 그로써 제조된 주사제는 바람직하게 적절한 앰풀에 채워진다.
- [0112] 유리하게도, 상기 기술된 경우 또는 비경구용 약학 조성물은 활성 성분들의 용량을 적용하기에 적합한 단위 용량으로 단위용량 형태로 제조된다. 단위 용량의 그런 단위용량 형태는 예를 들면, 정제, 환, 캡슐, 주사액 9앰풀, 좌제 등을 포함한다. 함유된 상기 항체의 양은 일반적으로 단위 용량의 단위용량 형태당 약 5 내지 약 500 mg이고, 상기 항체는 다른 단위용량 형태에 대해서는 약 5 내지 약 100 mg 및 약 10 내지 약 250 mg으로 함유된다.
- [0113] **항체의 치료적 용도**
- [0114] 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상에게 항-EGFRvIII 항체 또는 항-EGFRvIII 항체 (예컨대 하기 표 1에 표시된 HCVR/LCVR 또는 CDR 서열 중 어느 것을 포함하는 를 포함하는 항-EGFRvIII 항체 또는 ADC)를 포함하는 항체-약물 컨쥬게이트를 포함하는 치료 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 치료 조성물은 항-EGFRvIII 항체, 그것의 항원-결합 단편 또는 본원에 개시된 ADC 중 어느 것과, 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0115] 발명의 항체 및 ADC는, 그 중에서도, EGFRvIII과 EGFR 리간드 사이의 상호작용을 차단하거나 또는 그렇지 않으면 EGFRvIII 활성 및/또는 신호화를 억제하거나, 및/또는 수용체 내부화를 촉진하거나 및/또는 세포 표면 수용체 수를 감소시킴으로써 EGFRvIII 발현 또는 활성과 관련되거나 그것에 의해 중재된 어떠한 질환 또는 장애의 치료, 방지 및/또는 개선에 유용하거나 또는 치료 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 항체 및 ADC는 EGFRvIII을 발현하거나 및/또는 리간드-중재된 신호화에 반응하는 종양의 치료에 유용하다. 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 또한 뇌 및 뇌막, 인두 중앙부, 폐 및 기관지 구조, 위장관, 남성 및 여성의 생식관, 근육, 뼈, 피부 및 부속물, 연결 조직, 비장, 면역 시스템, 혈액 형성 세포 및 골수, 간 및 뇨도 및 눈과 같은 특수한 감각 기관에서 발생하는 원발성 및/또는 전이성 종양의 치료에도 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 발명의 항체 및 ADC는 다음의 암 중 하나 또는 그 이상을 치료하기 위해 사용된다: 신장 세포 암종, 췌장 암종, 두경부 암, 전립선암, 악성 신경교종, 골육종, 대장암, 위암 (예컨대 MET 증폭이 있는 위암), 악성 중피종, 다발성 골수종, 작은 세포 폐암, 비-작은 세포 폐암, 활액막 육종, 갑상선암, 유방암 또는 흑색종.
- [0116] 본원에 기술된 치료 방법의 맥락에서, 항-EGFRvIII 항체는 단일치료법으로서 (즉 유일한 치료제로서) 또는 하나 또는 그 이상의 추가의 치료제 (예를 들면 본원의 다른 곳에서 기술된 것들)와 함께 투여될 수 있다.
- [0117] 특정 구체예에 따르면, 본 발명은 환자에서 암을 치료하고, 종양 성장을 감소시키며 및/또는 종양 퇴행을 유발하는 방법들을 제공한다. 발명의 이런 측면에 따르는 방법들은 제 1 항체-약물 컨쥬게이트 (ADC)를 단독으로 또는 제 2 항-EGFRvIII 항체 또는 ADC와 함께 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 제 1 ADC는 전형적으로 항체 또는 항체의 항원-결합 단편 및 세포독소를 포함하며, 이때 제 1 ADC의 항체 또는 항원-결합 단편은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하지만 SEQ ID NO:148의 접합성 EGFRvIII 웨პ티드 또는 SEQ ID NO:165의 웨პ티드에는 결합하지 않는다 (즉 제 1 ADC는 형태상의 EGFRvIII-결합 항체를 포함한다). 제 2 항체 또는 ADC가 투여되는 구체예에서, 제 2 항체 또는 ADC는 전형적으로 항체 또는 항체의 항원-결합 단편 및 세포독소를 포함할 것이고, 이때 제 2 항체 또는 항원-결합 단편은 EGFRvIII에 특이적으로 결합하고 또한 SEQ ID NO:148의 접합성 EGFRvIII 웨პ티드 또

는 SEQ ID NO:165의 펩티드에는 결합한다 (즉 제 2 항체 또는 ADC는 EGFRvIII 접합 펩티드-결합 항체를 포함한다). 두 개의 별도의 항-EGFRvIII ADC가 발명의 이런 측면의 맥락에 사용될 때, 특정 구체예에서 ADC는 둘 다 동일한 세포독성제 또는 동일한 부류의 세포독성제를 포함할 수 있다. 두 개의 별도의 항-EGFRvIII ADC가 사용되는 다른 구체예에서, 각각의 ADC는 상이한 세포독성제 및/또는 상이한 부류의 세포독성제를 포함할 수 있다. 발명의 이런 측면의 비-제한적인 예시적인 구체예는 하기 실시예 14에서 설명된다. 특정 구체예에 따르면, 제 1 ADC의 항체 또는 항원-결합 단편 (즉 형태상의 EGFRvIII 결합 항체)은 SEQ ID NO:36, 38, 40, 44, 46 및 48을 포함하는 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역, 또는 SEQ ID NO:34를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:42를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

#### [0118] 조합 치료법 및 제형

본 발명은 본원에 기술된 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것을 하나 또는 그 이상의 추가의 치료적 활성 성분들과 함께 포함하는 조성물 및 치료 제형 및 그런 조합을 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 포함한다.

본 발명의 항-EGFRvIII 항체들은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 추가의 치료적 활성 성분(들)과 공동-제형되거나 및/또는 함께 투여될 수 있다: PRLR 길항체 (예컨대 항-PRLR 항체 또는 PRLR의 작은 분자 억제제), EGFR 길항체 (예컨대 항-EGFR 항체 [예컨대 세톡시맙 (cetuximab) 또는 파니투무맙 (panitumumab)] 또는 EGFR의 작은 분자 억제제 [예컨대 게피티닙 (gefitinib) 또는 애를로티닙 (erlotinib)]), 다른 EGFR 패밀리 구성원의 길항체, 예컨대 Her2/ErbB2, ErbB3 또는 ErbB4 (예컨대 항-ErbB2 [예컨대 트라스투주맙 (trastuzumab) 또는 T-DM1 {KADCYLA®}], 항-ErbB3 또는 항-ErbB4 항체 또는 ErbB2, ErbB3 또는 ErbB4 활성의 작은 분자 억제제), cMET 길항체 (예컨대 항-cMET 항체), IGF1R 길항체 (예컨대 항-IGF1R 항체), B-raf 억제제 (예컨대 베무라페닙 (vemurafenib), 소라페닙 (sorafenib), GDC-0879, PLX-4720), PDGFR- $\alpha$  억제제 (예컨대 항-PDGFR- $\alpha$  항체), PDGFR- $\beta$  억제제 (예컨대 항-PDGFR- $\beta$  항체 또는 작은 분자 키나아제 억제제, 예를 들면, 예컨대 이마티닙 (imatinib) 메실레이트 또는 수니티닙 (sunitinib) 말레이트), PDGF 리간드 억제제 (예컨대 항-PDGF-A, -B, -C 또는 -D 항체, 암타머, siRNA, 등), VEGF 길항체 (예컨대 VEGF-트랩, 예컨대 아플리버셉트 (afiblivercept), 예컨대 US 7,087,411 참조 (본원에서는 또한 "VEGF-억제 융합 단백질"로도 언급됨), 항-VEGF 항체 (예컨대 베바시주맙 (bevacizumab)), VEGF 수용체의 작은 분자 키나아제 억제제 (예컨대 수니티닙, 소라페닙 또는 파조파닙 (pazopanib)), DLL4 길항체 (예컨대 US 2009/0142354에 개시된 항-DLL4 항체, 예컨대 REGN421), Ang2 길항체 (예컨대 US 2011/0027286에 개시된 항-Ang2 항체, 예컨대 H1H685P), FOLH1 길항체 (예컨대 항-FOLH1 항체), STEAP1 또는 STEAP2 길항체 (예컨대 항-STEAP1 항체 또는 항-STEAP2 항체), TMPRSS2 길항체 (예컨대 항-TMPRSS2 항체), MSLN 길항체 (예컨대 항-MSLN 항체), CA9 길항체 (예컨대 항-CA9 항체), 유로플라킨 길항체 (예컨대 항-유로플라킨 [예컨대 항-UPK3A] 항체), MUC16 길항체 (예컨대 항-MUC16 항체), Tn 항원 길항체 (예컨대 항-Tn 항체), CLEC12A 길항체 (예컨대 항-CLEC12A 항체), TNFRSF17 길항체 (예컨대 항-TNFRSF17 항체), LGR5 길항체 (예컨대 항-LGR5 항체), 1가 CD20 길항체 (예컨대 1가 항-CD20 항체, 예컨대 리툭시맙), PD-1 항체, PD-L1 항체, CD3 항체, CTLA-4 항체 등. 발명의 이중특이성 항원-결합 분자들과 조합하여 유리하게 투여될 수 있는 다른 제제들은 예컨대 타목시펜, 아로마타제 억제제 및, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 또는 그것들의 각각의 수용체와 같은 사이토kin에 결합하는 작은-분자 사이토kin 억제제 및 항체들을 포함하여 사이토kin 억제제를 포함한다.

본 발명은 본원에 기술된 항-EGFRvIII 항체들 중 어느 것을 하나 또는 그 이상의 화학요법제와 함께 포함하는 조성물 및 치료 조성물을 포함한다. 화학요법제의 실례는 티오태파 및 사이클로포스파미드 (Cytoxan<sup>TM</sup>)와 같은 알킬화제; 부술판, 임프로술판 및 피포술판과 같은 알킬 살포네이트; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포라미드, 트라이에틸렌티오포스포라미드 및 트라이메틸롤로멜라민을 포함한 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 염산염, 멜팔란, 노벰비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 무스타드와 같은 질소 무스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴과 같은 니트로스우레아; 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 카티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 5-다이아조-5-옥소-L-노르로이신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니벡스, 지노스타틴, 조루비신과 같은 항생물질; 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU)과 같은

항-대사물질; 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트라이메트렉세이트와 같은 폴산 유사체; 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 푸린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 다이테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에리티오스탄올, 메피티오스탄, 테스토락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트라이로스탄과 같은 항-아드레날; 프롤린산과 같은 폴산 보충물; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파미드; 데메콜신; 다이아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 웬티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모페디클; 니트라크린; 웨토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK™; 라족산; 시조피란; 스피로제르마늄; 테누아존산; 트라이아지쿠온; 2,2',2'''-트라이클로로트라이에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오텐파; 탁산, 예컨대 파클리탁셀 (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀 (Taxotere™; Aventis Antony, France); 클로람부실; 켐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 시스플라틴 및 카르보플라틴과 같은 플라티늄 유사체; 빈블라스틴; 플라티늄; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포아이소메라제 억제제 RES 2000; 다이플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 중 어느 것의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한 이 정의에는 예를 들면 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-아미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트라이옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (Farestone)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 플루타미드, 널루타미드, 비칼루타미드, 로이프롤리드 및 고셀레린과 같은 항-안드로겐; 및 상기 중 어느 것의 약학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체와 같은, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제가 포함된다.

[0122]

발명의 항-EGFRvIII 항체들은 또한 항바이러스제, 항생물질, 진통제, 코르티코스테로이드, 스테로이드, 산소, 항산화제, COX 억제제, 심장 보호제, 금속 킬레이터, IFN-감마 및/또는 NSAID와 함께 투여되거나 및/또는 함께 공-제형될 수 있다.

[0123]

추가의 치료 활성 성분(들), 예컨대 상기 열거된 제제들 중 어느 것 또는 그것의 유도체는 본 발명의 항-EGFRvIII 항체의 투여 직전, 동시에 또는 잠시 후에 투여될 수 있다 (본 개시의 목적에 대해, 그런 투여 처방법은 추가의 치료적 활성 성분"과 함께" 항-EGFRvIII 항체를 투여하는 것으로 여겨진다). 본 발명은 본 발명의 항-EGFRvIII 항체가 본원의 다른 곳에서 기술되는 하나 또는 그 이상의 추가의 치료적 활성 성분(들)과 함께 공-제형되는 약학 조성물을 포함한다.

[0124]

#### 투여 처방

[0125]

본 발명의 특정 구체예에 따르면, 다중 용량의 항-EGFRvIII 항체 (또는 항-EGFRvIII 항체 및 본원에서 언급된 추가의 치료적 활성 제제 중 어느 것의 조합을 포함하는 약학 조성물)는 규정된 시간 과정에 걸쳐 대상에게 투여될 수 있다. 발명의 이런 측면에 따르는 방법은 다중 용량의 발명의 항-EGFRvIII 항체를 순차적으로 투여하는 것을 포함한다. 본원에서 사용되는 "순차적으로 투여하는"은 각 용량의 항-EGFRvIII 항체가 대상에게 상이한 시점, 예컨대 예정된 간격 (예컨대 시간, 일, 주 또는 개월)을 두고 분리된 상이한 날에 투여되는 것을 의미한다. 본 발명은 단일 초기 용량의 항-EGFRvIII 항체, 이어서 1회 또는 그 이상의 이차 용량의 항-EGFRvIII 항체, 그리고 임의로 1회 또는 그 이상의 3차 용량의 항-EGFRvIII 항체를 순차적으로 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다.

[0126]

용어 "초기 용량", "이차 용량" 및 "3차 용량"은 발명의 항-EGFRvIII 항체의 투여의 잠정적 순서를 나타낸다. 그러므로, "초기 용량"은 치료 처방을 시작할 때 투여되는 용량 (또한 "기준선 용량"으로도 언급됨)이고; "이차 용량"은 초기 용량 후 투여된 용량이며; "3차 용량"은 이차 용량 후 투여된 용량이다. 초기, 이차 및 3차 용량은 모두 동일한 양의 항-EGFRvIII 항체를 함유할 수 있지만, 일반적으로는 투여 빈도의 관점에서 서로 상이할 수 있다. 그러나 특정 구체예에서, 초기, 이차 및/또는 3차 용량에 함유된 항-EGFRvIII 항체의 양은 치료 과정 중에는 서로 다르다 (예컨대 필요에 따라 상향 또는 하향 조정된다). 특정 구체예에서, 둘 또는 그 이상 (예컨대 2, 3, 4 또는 5)의 용량이 치료 처방이 시작될 때 "로딩 용량"으로서 투여되고 이어서 더 적은 빈도로 후속 용량 (예컨대 "유지 용량")이 투여된다.

[0127]

본 발명의 특정한 예시적인 구체예에서, 각각의 이차 및/또는 3차 용량은 치전의 선행 용량 후 1 내지 26 (예컨

대 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ 또는 그 이상) 주 후에 투여된다. 본원에서 사용되는 구절 "직전의 선행 용량"은 다중 투여의 순서에서, 중간에 끼어있는 용량이 없이 순서상 바로 다음 용량의 투여 전에 환자에게 투여되는 항-EGFRvIII 항체의 용량을 의미한다.

[0128] 발명의 이런 측면에 따르는 방법은 어떠한 수의 이차 및/또는 3차 용량의 항-EGFRvIII 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 구체예에서, 단지 단일한 이차 용량만이 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 둘 또는 그 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상)의 이차 용량이 환자에게 투여된다. 마찬가지로, 특정 구체예에서, 단지 단일한 3차 용량이 환자에게 투여된다. 다른 구체예에서, 둘 또는 그 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상)의 3차 용량이 환자에게 투여된다. 투여 처방은 특별한 대상의 일생에 걸쳐 무한하게 수행되거나 또는 그런 치료가 더 이상 치료적으로 필요하거나 유리하지 않을 때까지 수행될 수 있다.

[0129] 다중 이차 용량을 포함하는 구체예에서, 각각의 이차 용량은 다른 이차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 이차 용량은 직전의 선행 용량 후 1 내지 2주 후 또는 1 내지 2개월 후에 환자에게 투여될 수 있다. 유사하게, 다중 3차 용량을 포함하는 구체예에서, 각각의 3차 용량은 다른 3차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 3차 용량은 직전의 선행 용량 후 2내지 12주 후에 환자에게 투여될 수 있다. 발명의 특정 구체예에서, 이차 및/또는 3차 용량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 처방의 과정에 걸쳐 달라질 수 있다. 투여 빈도는 또한 임상 검사 후에 개별적인 환자의 필요에 따라 의사에 의해 치료 과정 중에 조정될 수 있다.

[0130] 본 발명은 2 내지 6 로딩 용량이 제 1 빈도로 (예컨대 주 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 월 1회, 2개월마다 1회 등) 환자에게 투여되고, 이어서 둘 또는 그 이상의 유지 용량이 덜 빈번하게 환자에게 투여되는 투여 처방을 포함한다. 예를 들어, 발명의 이 측면에 따르면, 만약 로딩 용량이 월 1회의 빈도로 투여되면, 유지 용량은 6주마다 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회 등으로 환자에게 투여될 수 있다.

### 항체의 진단 용도

[0132] 본 발명의 항-EGFRvIII 항체들은 또한 샘플 중의 EGFRvIII 또는 EGFRvIII-발현 세포를 검출 및/또는 측정하기 위해, 예컨대 진단 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-EGFRvIII 항체 또는 그것의 단편은 EGFRvIII의 일탈적인 발현 (예컨대 과잉 발현, 하향-발현, 발현의 결핍 등)에 의해 특성화되는 상태 또는 질환을 진단하기 위해 사용될 수 있다. EGFRvIII에 대한 예시적인 진단 분석은 예컨대 환자로부터 얻어진 샘플을 발명의 항-EGFRvIII 항체와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 이때 항-EGFRvIII 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지화된다. 다르게는, 표지되지 않은 항-EGFRvIII 항체는 그 자체가 검출 가능하게 표지되는 이차 항체와 함께 진단 용도에 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 방사성 동위원소, 예컨대 <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S 또는 <sup>125</sup>I; 플루오레신 아이소티오시아네이트 또는 로다민과 같은 형광 또는 화학발광 부분; 또는 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 양고추냉이 페옥시다제 또는 루시페라제와 같은 효소일 수 있다. 샘플 중의 EGFRvIII를 검출 또는 측정하기 위해 사용될 수 있는 구체적인 예시적인 분석은 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA), 방사성 면역분석 (RIA) 및 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)를 포함한다.

[0133] 본 발명에 따라 EGFRvIII 진단 분석에서 사용될 수 있는 샘플은 검출 가능한 양의 EGFRvIII 단백질 또는 그것의 단편을 함유하는, 환자로부터 정상적이거나 병리적인 조건하에서 얻을 수 있는 어떠한 조직 또는 유체 샘플을 포함한다. 일반적으로, 건강한 환자 (예컨대 비정상 EGFRvIII 수준 또는 활성화 관련된 질환 또는 상태로 영향을 받지 않는 환자)로부터 얻어진 특정 샘플 중의 EGFRvIII의 수준은 EGFRvIII의 기준선 또는 표준 수준을 초기에 수립하기 위해 측정될 것이다. EGFRvIII의 이런 기준선 수준은 그런 다음 EGFRvIII 관련 질환 또는 상태를 가진 것으로 의심되는 개체로부터 얻어진 샘플 중의 측정된 EGFRvIII의 수준에 대해 비교될 수 있다.

### 실시예

[0135] 다음의 실시예는 기술분야의 통상적인 기술을 가진 사람들에게 발명의 방법 및 조성물을 제조하고 사용하는 방법을 완전하게 개시하고 설명하기 위하여 제시한 것이고, 발명자들이 자신의 발명으로서 간주한 것의 범주를 제한하려는 의도는 아니다. 사용된 숫자와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만 일부 실험상의 에러와 편차는 설명될 것이다. 다르게 표시되지 않는 한, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이며, 압

력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0136] **실시예 1. 항-EGFRvIII 항체의 생성**

[0137] 항-EGFRvIII 항체를 VELOCIMMUNE® 마우스 (즉 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 코드화하는 DNA를 포함하는 엔지니어링된 마우스)를 EGFRvIII의 세포외 도메인을 포함하는 면역원으로 면역시킴으로써 얻었다. 제 1 세트의 항체들은 H1H2194P, H1H2195P, H2M1863N2, H2M1911N, H2M1912N, H2M1915N, H2M1917N, H2M1918N 및 H3M1913N (하기 표 1 및 2에 표시됨)으로서 표시된 항체들을 포함한다.

[0138] 항체 면역 반응을 EGFRvIII-특이적 면역분석에 의해 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 이루어졌을 때 비장 세포를 수득하고 마우스 골수종 세포와 융합시켜서 그것의 생존성을 보존시키고 하이브리도마 셀라인을 형성하였다. EGFRvIII-특이적 항체를 생성하는 셀라인을 확인하기 위하여 하이브리도마 셀라인을 스크리닝하고 선택하였다. 이 기법을 사용하여 여러 항-EGFRvIII 키메라 항체들 (즉 인간 가변 도메인과 마우스 불변 도메인을 가지는 항체들)을 얻었다. 또한, 여러 전체 인간 항-EGFRvIII 항체를 직접, US 2007/0280945A1에 기술되어 있는 대로 항원-포지티브 B 세포로부터 골수종 세포에의 융합 없이 분리하였다.

[0139] 별도로, 푸코실화가 감소된 H1H1863N2 ["H1H1863N2(Fuc-)"]를 또한 미국 특허 출원 번호 2010/0304436A1 (구체적으로 전체 내용이 참조로 포함됨)에 "8088"로서 기술되어 있는 CHO 숙주 셀라인에서 제조하였다. 간단히 설명하면, H1H1863N2의 경쇄 및 중쇄 서열을 발현 벡터에 클론하였다. 2백만개의 8088 세포를 경쇄 및 중쇄 플라스미드 및 Cre를 코드화하는 유전자를 함유하는 pR4004 벡터로 트랜스펙션시켰다. 400 μg/ml의 하이그로마이신으로 선택하여 생존한 트랜스펙션된 세포를 혈청-유리, 푸코오스-유리 배지 중의 혼탁액에서 성장하도록 채택하였다. 트랜스펙션된 세포로부터 형광 단백질 EGFP를 발현하지만 DsRed 또는 ECFP를 발현하지 못하는 세포들을 유동 세포분석에 의해 분리하였다. 분류된 세포를 전동 플라스크에  $4 \times 10^5$  세포/ml로 시딩하고, 3일 후, 배양 배지를 수집하고, 그 안의 항체 단백질 [즉 H1H1863N2(Fuc-)]을 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 그 결과의 H1H1863N2(Fuc-)의 질량 분광분석 분석은 코어의 푸코오스가 원래의 항체인 H1H1863N2(Fuc+)에 비해 제거된 것을 확인해주었다. 여기서 표시, "H1H1863N2" 및 "H1H1863N2(Fuc+)"는 둘 다 푸코실화 변형이 없는 원래의 항체를 나타낸다.

[0140] 이 실시예의 방법에 따라 생성된 예시적인 항-EGFRvIII 항체들의 특정한 생물학적 특성은 하기에서 설명되는 실시예에서 상세하게 기술된다.

[0141] **실시예 2. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 및 핵산 서열들**

[0142] 표 1은 발명의 선택된 항-EGFRvIII 항체들의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 아미노산 서열 확인자를 나타낸다. 해당하는 핵산 서열 확인자는 표 2에 나타낸다.

**표 1**

아미노산 서열 확인자

SEQ ID NO:								
항체 표시	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

**표 2**

[0144]

## 핵산 서열 확인자

항체 표시	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

[0145]

항체들은 전형적으로 본원에서 다음 명명법에 따라 언급된다: 표 1 및 2에서 볼 수 있는 것과 같이, Fc 접두어 (예컨대 "H1H," "H2M," "H3M" 등), 이어서 숫자 확인자 (예컨대 "2194," "2195," "1863" 등), 그리고 이어서 "P" 또는 "N" 접미어. 그러므로, 이 명명법에 따르면, 항체는 본원에서 예컨대 "H1H2194N," "H2M1911N," "H3M1913N" 등으로 언급될 수 있다. 여기서 사용된 항체 표시에서 H1H, H2M 및 H3M 접두어는 항체의 특별한 Fc 영역 아이소타입을 나타낸다. 예를 들어, "H1H" 항체는 인간 IgG1 Fc를 가지고, "H2M" 항체는 마우스 IgG2 Fc를 가지며, "H3M" 항체는 마우스 IgG3 Fc를 가진다 (항체 표시에서 첫 번째 'H'에 의해 표시되는 바 모든 가변 영역은 전체 인간이다). 기술분야에 통상적인 기술을 가진 사람에 의해 인지되는 것과 같이, 특별한 Fc 아이소타입을 가지는 항체는 상이한 Fc 아이소타입을 가지는 항체로 전환될 수 있지만 (예컨대 마우스 IgG1 Fc를 가지는 항체는 인간 IgG4를 가지는 항체로 전환될 수 있고, 등등), 어떤 경우든, 표 1 및 2에서 나타낸 숫자 확인자에 의해 표시되는 가변 도메인 (CDR을 포함하여)은 동일하게 유지될 것이고, 결합 특성을 Fc 도메인의 성질과 관계 없이 동일하거나 실질적으로 유사할 것으로 예상된다.

[0146]

## 하기 실시예에서 사용된 대조 구성물들

[0147]

다음 실험들에서 비교 목적을 위해 대조 구성물들을 포함시켰다: 대조표준 I: 미국 특허 제 7,736,644호에 개시된 "13.1.2" 항체의, 각각 SEQ ID NO:142 및 144에 해당하는 아미노산 서열을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 가지는 인간 항-EGFRvIII 항체 (IgG1); 대조표준 II: 미국 특허 제 7,589,180호에 개시된 "ch806" 항체의, 각각 SEQ ID NO:11 및 12에 해당하는 아미노산 서열을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 가지는 키메라 항-EGFRvIII 항체 (hIgG1); 대조표준 III: 미국 특허 출원 공보 번호 2010/0056762에 개시된 "hu806" 항체의, 각각 SEQ ID NO:42 및 47에 해당하는 아미노산 서열을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 가지는 인간화된 항-EGFRvIII 항체 (hIgG1); 대조표준 IV: US 7,060,808에 표시된 "C225"의 해당 도메인의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 가지는 키메라 항-EGFR 항체; 및 대조표준 V: 미국 특허 제 7,736,644 B2호의 "131" 항체의, 각각 SEQ ID NO:2 및 19에 해당하는 아미노산 서열을 가지는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 가지는 인간 항-EGFRvIII 항체 (IgG1). "13.1.2" 항체는 EGFRvIII의 접합 웹티드 (SEQ ID NO:148)에 대해 특이적인 것으로 알려져 있고; "ch806" 및 "hu806" 항체는 중폭되거나 과잉발현된 EGFR (SEQ ID NO:146)의 잔기 311 내지 326 (SEQ ID NO:165), 또는 EGFRvIII (SEQ ID NO:147)의 잔기 44 내지 59에 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0148]

## 실시예 3. EGFRvIII 결합 친화성 측정

[0149]

인간 단클론성 항-EGFRvIII 항체들의 결합 친화성 및 동역학적 상수들을 표면 플라스몬 공명에 의해 37°C에서 측정하였다. 측정을 T100 BIACORE™ 기기 상에서 수행하였다. 인간 IgG1 Fc (즉 "H1H" 표시)로서 표시된 항체들을 항-인간 Fc 센서 표면상에 포획하였고 (mAb-포획 포맷), 가용성 단량체 [EGFR-mmh (SEQ ID NO:154) 및 EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152)] 또는 이량체 [EGFR-mFc (SEQ ID NO:155) 및 EGFRvIII-mFc (SEQ ID NO:153)] 단백질을 표면 위로 주입하였다. 수용체-포획 포맷으로, EGFRvIII-mFc 또는 EGFR-mFc를 BIACORE™ 칩상에 포획하였고, 각각의 항체를 그 위로 흐르게 하였다. 동역학적 결합 ( $k_a$ ) 및 해리 ( $k_d$ ) 속도 상수를 Scrubber 2.0 곡선 맞춤 소프트웨어를 사용하여 1:1 결합 모델에 데이터를 처리하고 맞춤으로써 측정하였다. 결합 해리 평형 상수 ( $K_D$ ) 및 해리성 반감기 ( $t_{1/2}$ )를 동역학적 속도 상수로부터 다음과 같이 계산하였다:  $K_D$  (M) =  $k_d / k_a$ ; 및  $t_{1/2}$  (분) =  $\ln 2 / (60 * k_d)$ .

[0150]

그 결과를 표 3 및 4에 나타낸다. NB = 시험 조건하에서 결합하지 않음; NT = 시험하지 않음.

## 표 3

인간 Fc 항체들의 결합 동역학

37°C에서의 결합/ MAb-포획 포맷					
Ab	분석물	$k_a$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)	$T_{1/2}$
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mmh	1.97E+04	8.95E-03	4.54E-07	1.3
	EGFR-mmh	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mFc	7.28E+04	8.07E-04	1.11E-08	14
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mmh	3.02E+04	1.02E-02	3.39E-07	1.1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.12E+05	6.42E-04	5.73E-09	18
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1.83E+04	1.64E-02	8.99E-07	0.7
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.04E+04	9.71E-04	4.77E-08	12
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1.63E+02	1.14E-03	7.03E-06	10
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.40E+04	3.16E-04	2.26E-08	37
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1915N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H2194P	EGFRvIII-mmh	8.10E+04	1.37E-03	1.70E-08	8
	EGFR-mmh	7.60E+04	9.60E-04	1.26E-08	12
	EGFRvIII-mFc	9.54E+04	2.22E-04	2.33E-09	52
	EGFR-mFc	8.10E+04	1.99E-04	2.43E-09	58
H1H2195P	EGFRvIII-mmh	6.48E+04	6.94E-04	1.07E-08	17
	EGFR-mmh	5.66E+04	5.23E-04	9.20E-09	22
	EGFRvIII-mFc	1.02E+05	1.13E-04	1.10E-09	103
	EGFR-mFc	9.20E+04	1.89E-04	2.05E-09	61
대조표준 I	EGFRvIII-mmh	1.29E+05	1.53E-01	1.19E-06	0.1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	7.15E+04	7.36E-03	1.03E-07	1.6
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
대조표준 II	EGFRvIII-mmh	4.90E+04	7.33E-03	1.50E-07	2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.02E+05	4.08E-04	2.02E-09	28
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
대조표준 III	EGFRvIII-mmh	8.57E+04	5.16E-03	6.02E-08	2.2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.52E+05	2.98E-04	1.18E-09	39
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
대조표준 V	EGFRvIII-mmh	1.94E+05	1.59E-02	8.20E-08	1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.91E+05	3.71E-04	1.95E-09	31
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT

표 4

인간 Fc 항체들의 결합 동역학

[0152]

37°C에서의 결합 / 수용체-포획 포맷					
Ab	포획된 수용체	ka ( $M^{-1} s^{-1}$ )	kd ( $s^{-1}$ )	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub>
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mFc	9.00E+05	2.06E-04	2.30E-10	56
	EGFR-mFc	2.11E+05	1.82E-01	8.65E-07	0.1
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mFc	1.01E+06	2.15E-04	2.10E-10	54
	EGFR-mFc	1.99E+05	4.67E-01	2.34E-06	0.02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3.29E+04	6.43E-04	1.95E-08	18
	EGFR-mFc	7.77E+03	1.74E-03	2.24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9.90E+04	5.37E-04	5.40E-09	22
	EGFR-mFc	3.99E+04	9.14E-04	2.29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6.30E+04	1.00E-06	1.58E-11	11550
	EGFR-mFc	5.93E+03	1.00E-06	1.69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1.00E+05	3.28E-04	3.20E-09	35
	EGFR-mFc	4.35E+04	8.01E-03	1.84E-07	1.4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2.17E+05	5.85E-05	2.68E-10	197
	EGFR-mFc	2.04E+05	9.15E-05	4.47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1.88E+05	7.38E-05	3.94E-10	157
	EGFR-mFc	1.87E+05	7.07E-05	3.80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2.37E+05	2.53E-05	1.06E-10	456
	EGFR-mFc	2.25E+05	5.20E-05	2.31E-10	222
대조표준 I	EGFRvIII-mFc	4.46E+05	4.04E-03	9.06E-09	2.9
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
대조표준 II	EGFRvIII-mFc	1.25E+06	7.31E-05	5.90E-11	158
	EGFR-mFc	4.44E+05	1.46E-04	3.29E-10	79
대조표준 III	EGFRvIII-mFc	1.49E+06	1.00E-06	6.70E-13	11550
	EGFR-mFc	2.86E+05	6.17E-05	2.15E-10	187

[0153]

표 3 및 4로부터 알 수 있는 것과 같이, 여러 항체들이 EGFRvIII에 대한 선택성을 나타냈지만, mAb-포획 포맷으로는 야생형 EGFR에 결합하지 않았다. 수용체 포획 포맷 (표 4)에서 H1H863N2, H1H1915N 및 대조표준 I이 가장 큰 선택성을 나타냈다.

[0154]

#### 실시예 4: ELISA에 의해 측정된 항체 선택성

[0155]

항-hEGFRvIII mAb를 추가로 특성화하기 위하여, 그것의 결합 특이성을 ELISA에 의해 조사하였다. 플레이트를 다음 중 하나로 코팅하였다: EGFR-mmh (SEQ ID NO:154); EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152); 및 접합 웨티드 (J-웨티드) (SEQ ID NO:148). C-말단 (SEQ ID NO:149) 또는 N-말단 (SEQ ID NO:150) 중 어느 하나에서 링커를 통해 비오틴에 연결되어 있는 접합 웨티드에 대해, 플레이트를 아비딘으로 사전-코팅하였다. 또한, 그것의 N-말단에 비오틴이 있거나 없는 무관한 웨티드 (대조 웨티드)를 코팅하였다. 항-EGFRvIII 항체뿐 아니라 아이소타입 대조 항체를 코팅된 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 25°C에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고, 결합된 항-EGFRvIII mAb를, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)로 컨쥬게이트된 항-인간 Fc 항체로 검출하였다. 플레이트를 테트라-메틸-벤자린 (TMB) 기질 용액으로 전개시켜서 비색 반응을 생성하고 황산으로 중화시킨 후 450 nm에서의 흡광도를 VICTOR X5 플레이트 판독기 상에서 판독하였다. 데이터 분석은 PRISM™ 소프트웨어 내부의 사인형 용량-반응 모델을 사용하였다. 최대 반응을 전개시키기 위해 필요한 항체 농도의 50%로서 정의한, 계산된 EC50 값을 결합 효능의 표시자로서 사용하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다. NT: 시험하지 않음. 대조표준 I 내지 III: 상기에서 기술한 것과 같음.

표 5

[0156]

항체	EC50 (nM)						
	EGFR-mmh (25°C)	EGFRvIII-mmh (25°C)	J-웨티드	C-말단 비오 틴 J-웨티드	N-말단 비오 틴 J-웨티드	대조 웨티드	N-말단 비오 틴 대조 웨티드

H1H1863N2 (Fuc-)	>10	0.0766	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1863N2 (Fuc+)	>10	0.113	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1911N	9.06	0.0748	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1912N	0.0405	0.0118	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1913N	2.55	2.14	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1915N	>10	0.167	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2193P	0.0040	0.0035	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2194P	0.0037	0.0032	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2195P	0.0052	0.0049	>10	>10	>10	>10	>10
대조표준 I	>10	0.0094	0.118	0.0153	0.0106	>10	>10
대조표준 II	0.0095	0.0057	>10	>10	>10	>10	>10
대조표준 III	0.0079	0.0048	NT	NT	NT	NT	NT
아이소타입 대조 표준	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

[0157] 항체 H1H1863N2, H1H1915 및 대조표준 I은 EGFRvIII에 대해 강력한 결합을 나타냈지만 야생형 EGFR에는 결합하지 않았다 (>10 nM). 대조표준 I (접합 펩티드로 면역된 마우스로부터 유도된 "13.1.2" 항체 (미국 특허 제 7,736,644호)의 중쇄 및 경쇄 서열에 해당하는 서열을 가짐)를 제외하고, 항체들 중 어느 것도 접합 펩티드에 대한 결합을 나타내지 않았다.

#### 실시예 5: 항-EGFRvIII 항체를 사용한 EGFR 및 EGFRvIII의 웨스턴 블롯

[0159] 항체들 중 하나인 H1H1863N2를 그것의 결합 특성에 대해 환원 및 비-환원 조건 둘 다 하에 웨스턴 블롯으로 시험하였다. EGFR-mmh (SEQ ID NO:154) 또는 EGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152)를 Tris-글리신 SDS PAGE 젤 상에 로딩하고, 이동하도록 한 후 니트로셀룰로오스에 옮겼다. 차단 후에 막을 반으로 절단하고 항-EGFRvIII 항체 또는 항-His 항체 중 어느 하나로 프로브하였다. 대조표준 I 및 II는 상기에서 기술된 것과 같다.

[0160] 도 1a에서 알 수 있는 것과 같이, H1H1862N2 (Fuc-)는 환원된 또는 비-환원된 EGFRvIII-mmh 또는 EGFR-mmh에 결합하지 않았고, 그로써 EGFRvIII에 대한 형태상의 에피토프를 가진다. 대조적으로, 대조표준 II는 야생형과 변이체 III EGFR 둘 다에 환원 및 비-환원 조건하에서 결합한 한편, 접합 펩티드 결합체인 대조표준 I은 EGFRvIII에 대해 특이적이다. 대조표준 I 및 II 둘 다는 H1H1863N2와 대조적으로, 선형 결합 에피토프를 가진다. 도 1b는 다른 EGFRvIII 항체들을 나타내는데, 그것들은 웨스턴 블롯 상에서 혼합 행동방식을 나타낸다.

#### 실시예 6: EGFR/EGFRvIII 펩티드 결합 및 항체 경합 분석

[0162] H1H1863N2(Fuc-)를 그것의 결합 특성에 대해 펩티드 결합 및 항체 경합 분석을 사용하여 시험하였다. 펩티드 결합 실험에 대해 C-말단에서 링커를 통해 비오틴으로 태깅된 EGFRvIII 접합 펩티드 (SEQ ID NO:148) [즉 LEEKKGNYVVTDHGGGSK (SEQ ID NO:149)-비오틴] 또는 링커를 통해 C-말단에서 비오틴으로 태깅된 EGFR의 잔기 311 내지 326으로 구성된 펩티드 ("EGFR 311-326 펩티드"; SEQ ID NO:165) [즉 CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK (SEQ ID NO:151)-비오틴]를 ~0.4 nM의 두께로 스트렙트아비딘 코팅된 OCTET® 텁을 사용하여 ForteBio® OCTET® RED 기기 상에 포획하였다. 펩티드 포획 후에, 코팅된 텁을 항체의 1M 용액에 넣고 결합 반응을 기록하였다 (도 2 참조). 대조표준 I 내지 III은 상기에서 기술한 것과 동일하다.

[0163] 예상과 같이 대조표준 I은 C-말단 비오틴을 가진 접합 펩티드에 결합하였고, 대조표준 II 및 III은 C-말단 비오틴을 가진 EGFR 311-326 펩티드에 결합하였다. H1H1863N2(Fuc-)는 펩티드 중 어느 것과도 결합하지 못하였다.

[0164] 항체 교차 경합에 대해, ~200 공명 단위 (RU)의 hEGFRvIII-mmh (SEQ ID NO:152)를 고밀도의 항-펜타-히스티딘 다클론성 항체 (cat. # 34660, QIAGEN)로 코팅된 BIACORE™ 표면 위에 포획하였다. 공동주입 방법론을 사용하여, 포획된 hEGFRvIII-mmh를 500 nM의 제 1 mAb를 5-분 주입한 직후 또 다른 5-분 동안 500 nM의 제 1 mAb를 첨가한 제 2 mAb (500 nM)의 주입에 의해 포화시켰다. RU로서 표시된, 제 2 mAb의 유의미한 결합은 그것이 결합에 대해 제 1 mAb와 경합하지 않는 것으로 해석되었다. 대조 실험을 위해, 아이소타입 매치된 mAb를 제 1 mAb 또는 제 2 mAb 중 어느 하나로서 사용하였다. 그 결과를 표 6에 나타낸다.

표 6

[0165] BIACORE™ 표면 (제 1 항체)	제 2 항체 결합 (RU)			
	H1H1863N2(Fuc-) 결합 반응	대조표준 I 결합 반응	대조표준 II 결합 반응	대조표준 III 결합 반응
EGFRvIII 단독	270	234	247	247
EGFRvIII - H1H1863N2(Fuc-) 복합체	5	253	191	208
EGFRvIII - 대조표준 I 복합체	291	5	258	272
EGFRvIII - 대조표준 II 복합체	225	252	6	25
EGFRvIII - 대조표준 III 복합체	223	254	13	7

[0166] H1H1863N2(Fuc-)는 hEGFRvIII-mmh 포획 표면에의 결합에 대해 대조 항체 I 내지 III 중 어느 것과도 경합하지 않았다. 예상과 같이, 둘 다 EGFR의 잔기 311 내지 326에 결합하는 것으로 알려져 있는 대조표준 II 및 III은 hEGFRvIII-mmh 포획 표면에의 결합에 대해 서로 경합하였다.

#### [0167] 실시예 7: 항-EGFRvIII 항체의 세포 결합 선택성

[0168] 항-EGFRvIII mAb의 특이성, HEK293에의 결합을 측정하기 위하여, EGFRvIII을 발현하는 HEK293 세포 (HEK293/EGFRvIII) 및 A431 세포를 형광 활성화된 세포 분류법 (FACS)에 의해 분석하였다. HEK293/EGFRvIII 세포를 리포펙타민™ 2000 트랜스펙션 시약 (Invitrogen™)을 사용하여 전-길이 hEGFRvIII (SEQ ID NO:147)을 본질적으로 발현하는 네오마이신 내성 DNA 벡터로 HEK293 세포를 트랜스펙션함으로써 제조하였다. 트랜스펙션 후 2 일 후에, 세포를 대략 2주 동안 G418 선택하에 놓았다. 포지티브로 EGFRvIII을 발현하는 집단을 형광 활성화된 세포 분류법 (FACS)에 의해 분리하였다. 세포당  $\sim 3 \times 10^6$  복사물의 EGFRvIII을 발현하는 HEK293 세포를 실험에 사용하였다. 간단하게 설명하면, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-EGFRvIII 항체를 세포와 함께 30분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 세척하고, 이차 항체, 즉 인간 IgG에 대한 파이코에리트린 (PE)-표지된 염소 F(ab')<sub>2</sub> (cat # 109-116-170, Jackson ImmunoResearch Laboratories)와 함께 인큐베이션한 후 최종 세척한 다음 FACS로 분석하였다. 다른 세트의 실험에서, 항-EGFRvIII 항체를 그것의 라이신 잔기를 통해 직접 형광 염료인 Alexa Fluor® 488 염료 (Invitrogen™)와 컨쥬게이팅하고, 그로써 이차 항체를 사용한 단계를 제거하였다. 직접 표지된 항-EGFRvIII 항체를 사용한 HEK293 세포 및 HEK293/EGFRvIII 세포로부터의 결과를 표 7에 나타내고, 이차 PE-표지된 항-Fc (인간 또는 마우스)를 사용한 결과는 표 8에 나타낸다. 직접 표지된 항-EGFRvIII 항체를 사용한 A431 세포로부터의 결과는 표 9에 나타내고 이차 PE-표지된 항-Fc (인간 또는 마우스)를 사용한 결과는 표 10에 나타낸다. 대조표준 I, II, III, IV 및 V는 상기 기술된 것과 같다. MFI: 평균 형광 세기.

표 7

항체	모 HEK293 MFI	HEK 293/EGFRvIII MFI	비율 (EGFRvIII MFI/모 MFI)
미염색	3548	4005	1.1
H1H1863N2 (Fuc -)	3776	361000	95.6
H1H1863N2 (Fuc +)	3805	360000	94.6
H1H1911N	3593	55064	15.3
H1H1912N	3727	122000	32.7
H1H1913N	4801	239000	49.8
H1H1915N	3461	73413	21.2
대조표준 I	3559	258000	72.5
대조표준 II	3582	313000	87.4
대조표준 IV	24954	439000	17.6

표 8

항체	모 HEK293 MFI	HEK 293/EGFRvIII MFI	비율 (EGFRvIII MFI/모 MFI)
미염색	819	920	1.1
PE 항-인간 IgG	1027	1106	1.1
H1H1863N2 (Fuc -)	1671	301000	180.1
H1H1911N	1812	107000	59.1
H1H2194P	981	18583	18.9
H1H2195P	1176	13517	11.5
대조표준 I	1480	272000	183.8
대조표준 II	1015	313000	308.4
대조표준 IV	23325	354000	15.2
대조표준 V	11732	997062	85.0

표 9

항체	A431 MFI	비탕값 이상의 배수
미염색	6708	1.0
H1H1863N2 (Fuc -)	26036	3.9
H1H1911N	15984	2.4
H1H1912N	14343	2.1
H1H1915N	8440	1.2
대조표준 I	9652	1.4
대조표준 II	15716	2.3
대조표준 III	71514	10.7
대조표준 IV	962000	143.4

표 10

항체	A431 MFI	비탕값 이상의 배수
미염색	1314	0.9
PE 항-인간 IgG	1428	1.0
H1H1863N2 (Fuc -)	3385	2.4
H1H1911N	3140	2.2
H1H2194P	2291	1.6
H1H2195P	2227	1.6
대조표준 I	1448	1.0
대조표준 II	5576	3.9
대조표준 IV	395000	276.6
대조표준 V	4240	3.0

[0173] 여러 항-EGFRvIII 항체들은 직접 표지된 항-EGFRvIII 항체를 사용하거나 (표 7) 또는 이체 PE 표지된 항-인간 IgG를 사용할 때 (표 8) 모 (parental) HEK293 세포를 능가하는 HEK293/EGFRvIII 셀라인에 대한 뚜렷한 결합 선호를 나타냈다. 대부분의 항체는 A431 세포와 인큐베이션했을 때 (30분, 4°C) 대조표준 III 및 IV 항체를 제외하고 최소한의 결합 내지 결합이 없음을 나타냈다 (표 9 및 10).

#### 실시예 8: HEK293/EGFRvIII 세포에 의한 항-EGFRvIII mAb의 내부화

[0174] 항-EGFRvIII mAb (10 ug/ml)를 HEK293/EGFRvIII (실시예 7 참조, 상기 동일) 세포로 2시간 동안 열음 위에서 인큐베이션한 후 PBS로 2회 세척하였다. 그런 다음 세포를 30분 동안 열음 위에서 이차 Dylight™ 488-컨쥬게이트된 항-인간 IgG Fab 단편 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)와 함께 인큐베이션한 다음 추가로 PBS로 2회 세척하였다. 항체를 1시간 동안 37°C에서 내부화 완충액 (PBS+FBS) 중에서 내부화시키거나 4°C에서 유지시켰다. 세포를 4% 포름알데하이드에 고정시키고, 핵을 DRAQ5® DNA 염료 (Cell Signaling Technology, Inc.)로 염

색하였다. 영상을 Imagexpress™ 고함량 시스템 (Molecular Devices) 상에서 40x에서 얻었고, 내부화된 소포체를 컬럼버스 소프트웨어 (Perkin Elmer)를 사용하여 정량하였다. 그 결과를 표 11 및 도 3에 나타낸다.

표 11

Ab	4°C에서의 소포체의 형광 세기		37°C에서의 소포체의 형광 세기	
	평균	± SD	평균	± SD
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
대조표준 I	21981	4613	263506	28067
대조표준 II	20339	5644	615239	144397
대조표준 IV	92311	19386	1078196	106073

[0177] 왕성한 내부화가 37°C에서 H1H1863N2, 대조표준 II 및 대조표준 IV에 대해 발생하였다. 내부화는 또한 H1H1911N, H1H1912N 및 대조표준 I에 대해서도 관찰되었다.

#### 실시예 9: U87/EGFRvIII 종양 이종이식편에 대한 항-EGFRvIII 항체의 결합

[0179] H1H1863N2의 특이성을 추가로 측정하기 위하여, EGFRvIII을 발현하는 인간 교아세포종 셀라인 U87을 실시예 7에서 HEK293/EGFRvIII 세포에 대해 기술한 것과 같이 제조하였다. 세포당  $\sim 1.5 \times 10^5$  복사물의 EGFRvIII을 발현하는 U87 세포 (U87/EGFRvIII)를 이 실험에 사용하였다. U87/EGFRvIII 세포 ( $3 \times 10^6$  세포)를 심각한 조합 면역결핍 (SCID) 마우스에 이종이식하였고, 200 내지  $300 \text{ mm}^3$ 의 중간 크기가 얻어질 때까지 종양이 성장하도록 허용하였다. 그런 다음 마우스에 H1H1863N2(Fuc-) 또는 아이소타입 대조표준을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 항체 주사 후 10분, 4시간 및 24시간 째에 마우스들을 희생시키고 종양을 제거하여 PBS에 넣었다. 종양을 즉시 분해하여 알로파이코시아닌 (APC)-컨쥬게이트된 항-인간 Fc (hFc-APC) 항체로 염색하였다. 염색된 세포를 2% 우태아 혈청 및 0.1% 나트륨 아지드가 함유된 유동 PBS로 3회 세척하였다. 10-분 및 4-시간 시점에서의 종양을 밤새 고정시킨 후 유동 세포분석기에 의해 측정하였다. 24-시간 시점에 수집한 종양을 고정시키지 않고 측정하였다. 모든 샘플을 ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® (Accuri Cytometers, Inc.) 상에 수집하고 평균 형광 세기 (MFI)를 측정하였다. 그 결과를 표 12에 나타낸다. MFI 값은 2 내지 3의 생물학적 복제물의 평균 ± 평균의 표준 편차 (SEM)이다.

표 12

주사 후 시간	MFI ± SEM (U87/EGFRvIII)	
	아이소타입 대조표준	H1H1863N2(Fuc-)
10 분	708 ± 4	2259 ± 115
4 시간	741 ± 34	10620 ± 2881
24 시간	664 ± 34	27923 ± 3297

[0181] 아이소타입-대조표준에 비교하여, H1H1863N2(Fuc-) 항체는 U87/EGFRvIII 종양 세포에 시간-의존성 방식으로 효과적으로 결합하였다.

#### 실시예 10: B16F10.9/EGFRvIII 종양 이종이식편에 대한 항-EGFRvIII 항체의 결합

[0183] SCID 마우스에 5만개의 쥐과 흑색종 세포 B16F10.9 또는 EGFRvIII을 과잉발현하는 B16F10.9 (B16F10.9/EGFRvIII)를 이식하였다. B16F10.9/EGFRvIII 세포를 실시예 7에서 HEK293/EGFRvIII 세포에 대해 기술한 것과 같이 제조하였다. 세포당  $\sim 1.5 \times 10^5$  복사물의 EGFRvIII을 발현하는 B16F10.9 세포를 이 실험에 사용하였다. 200 내지  $300 \text{ mm}^3$ 의 중간 크기가 얻어질 때까지 대략 14일 동안 종양이 성장하도록 허용하였다. 그런 다음 마우스에 H1H1863N2(Fuc-) 또는 아이소타입 대조표준을 사용하여 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 항체 주사 후 10분, 4시간 및 24시간 째에 마우스들을 희생시키고 종양을 제거하여 PBS에 넣었다. 종양을 즉시 분해하여 알로파이코시아닌 컨쥬게이트된 항-인간 Fc (hFc-APC) 항체로 염색하였다. 염색된 세포를 유동 PBS (1xPBS, 2% 우태아 혈청, 0.1% 나트륨 아지드)로 3회 세척하고, 고정한 후 표준 방법을 사용하여 투과시켰다. 유동 세포분

석을 사용하여 세포 표면-결합된 H1H1863N2(Fuc-)를 검출하였고, FlowJo 소프트웨어 (Tree Star, Inc.)를 사용하여 분석을 수행하였다. 그 결과를 표 13 및 도 4a에 나타낸다. 세포 표면-결합된 및 세포내적으로-결합된 항체 둘 다를 검출하기 위하여, 세포를 고정 및 투과 단계 후에 동일한 항-인간 Fc (hFc-APC) 항체를 사용하여 두 번째 시간 동안 염색하였다. 이것으로 세포내 항체가 검출될 수 있었다. 그 결과를 표 14 및 도 4b에 나타낸다. 모든 샘플을 ACCURI® C6 FLOW CYTOMETER® 상에 수집하고 평균 형광 세기 (MFI)를 측정하였다. 각 샘플에 대한 MFI를 미염색 대조표준의 MFI를 뺀 후에 기록하였다. MFI 값은 2개의 생물학적 복제물의 평균 (N=2) ± 평균의 표준 편차 (SEM)이다. \*N=1 시점에 대해 1이다.

표 13

주사 후 시간	MFI ± SEM (B16F10.9/EGFRvIII) - 표면 염색			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	아이소타입 대조표준	H1H1863N2(Fuc-)	아이소타입 대조표준	H1H1863N2(Fuc-)
10 분	74 ± 67	56 ± 2	128 ± 49	2003 ± 216
4 시간	80 ± 15	195 ± 52	54 ± 21	4224 ± 610
24 시간	79 ± 21	155 ± 42	72*	5692 ± 595

표 14

주사 후 시간	MFI ± SEM (B16F10.9/EGFRvIII) - 표면 & 내부 염색			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	아이소타입 대조표준	H1H1863N2(Fuc-)	아이소타입 대조표준	H1H1863N2(Fuc-)
10 분	132 ± 92	117 ± 18	155 ± 44	2627 ± 192
4 시간	165 ± 22	422 ± 106	120 ± 22	7785 ± 782
24 시간	135 ± 11	281 ± 51	132*	9578 ± 852

[0186] H1H1863N2(Fuc-)는 시간-의존성 방식으로 EGFRvIII을 발현하는 B16F10.9 세포의 표면에 효과적으로 결합한 편, 아이소타입 대조표준의 결합은 최소한이었다. 세포 표면 단독에 대한 결합과 비교하여, H1H1863N2(Fuc-)의 총 결합 (즉 결합된 세포 표면 + 초기 결합)의 증가는 세포 표면-결합된 항체들이 B16F10.9 세포에 의해 효과적으로 내부화되었음을 가리켰다.

#### 실시예 11: 항-EGFRvIII 항체의 마우스에서의 약물동역학

[0187] 항-EGFRvIII 항체의 생체 내 선택성을 측정하기 위하여, 마우스 EGFR를 자연적으로 발현하는 야생형 마우스 ("WT 마우스") 및 인간 EGFR를 발현하는 인간화된 EGFR 마우스 ("hEGFR 마우스")를 사용하여 약물동역학 연구를 수행하였다. 마우스들은 C57BL6 (75%)과 129Sv (25%)를 함유하는 바탕을 가진 교차-교배 스트레인으로부터 유래하였다. 집단은 5마리를 포함하였고 각각 WT이거나 hEGFR 마우스였다. 모든 항체를 0.2 mg/kg의 용량으로 피하로 투여하였다. 출혈을 투여 후 0시간, 6시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 10일, 14일, 21일 및 30일 후에 수집하였다. 인간 항체의 혈청 수준을 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 간단히 설명하면, 염소 다클론성 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체 (Jackson ImmunoResearch)를 96-웰 플레이트에 1 µg/ml의 농도로 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 BSA로 차단한 후, 6-용량 연속 희석액 중의 혈청 샘플 및 12-용량 연속 희석액 중의 각각의 항체의 참조 표준을 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 미결합 항체를 제거하기 위해 세척한 후에, 포획된 인간 항체들을 양고추냉이 페옥시다제 (HRP) (Jackson ImmunoResearch)로 컨쥬게이트된 동일한 염소 다클론성 항-인간 IgG (Fc-특이적) 항체를 사용하여 검출하고 표준 비색 테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질에 의해 제조업체의 권장사항을 따라 전개시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 플레이트 판독기 상에서 기록하고 혈청 샘플 중의 hIgG의 농도를 샘플 플레이트에서 생성된 참조 표준 곡선을 사용하여 계산하였다. 마우스 항-인간 항체 (MAHA)를 표준 방법을 사용하여 측정하였고, 일반적으로 낮았다.

[0189] 도 5a 내지 5d는 4개의 시험된 항체에 대한 항체 농도 대 시간 도표를 도시한다. 대조표준 IV ("Mab C225")는 인간 EGFR에 결합하지만 그것의 마우스 상동체에는 결합하지 않는 것으로 나타난다. 예상했던 것과 같이, 이 항체는 hEGFR 마우스에서 빠른 소멸을 나타냈고 WT 마우스에서는 느린 소멸을 나타냈다 (즉 표적-중재된 소멸이 없음) (도 5a). 대조표준 I ("Mab 13.1.2")은 인간 또는 마우스 EGFR에 존재하지 않는 EGFRvIII 접합 웹티드

"LEEKKGNYVVTDH"에 결합하는 것으로 나타난다. 항체는 생체 내에서 인간 또는 마우스 EGFR에 결합하지 않는다. 예상했던 것과 같이, 이 항체는 두 가지 유형의 마우스에서 동일하게 느린 약물동역학적 소멸 속도를 나타냈고 (도 5b) 표적-중재된 소멸은 관찰되지 않았다. 대조표준 III 항체 ("Mab hu806")는 WT 마우스에 비교하여 hEGFR 마우스에서 증가된 소멸을 나타냈다 (도 5c). 이런 발견은 Biacore에 의해 (실시예 3, 표 4 참조) 및 FACS에 의해 (실시예 7, 표 9) 측정된 바 시험관 내에서 hEGFR에 결합하는 그것의 능력과 일치한다. 도 5d는 H1H1863N2(Fuc+)의 소멸을 나타낸다. 대조표준 I과 유사한 이 항체는 두 가지 유형의 마우스에서 동일하게 느린 소멸 속도를 나타냈다. 그러므로 H1H1863N2는 인간 또는 마우스 EGFR에 생체 내에서는 결합하지 않는다.

[0190] **실시예 12: 항-EGFRvIII 항체-약물 컨쥬게이트는 EGFRvIII-포지티브 유방암 동종이식 모델에서 생체 내에서 종양 성장을 억제한다**

[0191] 이 실시예에서는, 예시적인 항-EGFRvIII 항체 H1H1863N2의 두 가지 상이한 항체-약물 컨쥬게이트를 그것의 생체 내에서의 종양 성장 억제 능력에 대해 시험하였다. 제 1 ADC를, 메이탄시노이드 독소 DM1에 절단될 수 없는 MCC 링커 (예컨대 US 5,208,020 및 US 출원 2010/0129314 참조)를 통해 H1H1863N2를 컨쥬게이팅함으로써 제조하여 "H1H1863N2-MCC-DM1"을 제조하였다. 제 2 ADC를, "M0026"으로서 언급되는 (또한 WO2014/145090 (전체 내용은 참조로 본원에 포함됨)에서 "화합물 7"로서도 언급됨), 신규한 절단 가능한 링커에 부착된 DM1의 변형된 벼전에 H1H1863N2를 컨쥬게이팅함으로써 "H1H1863N2-M0026"을 얻었다. 시험관 내에서 MMT/EGFRvIII 세포에 대한 세포 독성에 대해 시험할 때 H1H1863N2-MCC-DM1은 약물 동등물을 기준으로 12 nM의 IC<sub>50</sub>을 나타낸 반면, H1H1863N2-7은 0.8 nM의 IC<sub>50</sub>을 나타냈다.

[0192] DM1 및 M0026에 컨쥬게이트된 항-EGFRvIII 항체들의 생체 내 효능을 비교하기 위하여, EGFRvIII 포지티브 유방암 동종이식편을 내포하고 있는 면역순상된 마우스에서 연구를 수행하였다.

[0193] 간단하게 설명하면,  $0.5 \times 10^6$  MMT/EGFRvIII 세포를 암컷 CB17 SCID 마우스 (Taconic, Hudson, NY)의 좌측 옆구리에 피하 이식함으로써 종양 동종이식을 수립하였다. 일단 종양의 크기가 140 mm<sup>3</sup>의 평균 부피에 도달하면 (~8일), 마우스들을 무작위로 7개의 그룹으로 나눈 후, 항-EGFRvIII ADC로 투여하였다. MCC-DM1 또는 M0026 링커-약물 포맷 중 어느 하나를 사용하여 미결합 ADC를 포함한 대조 시약과 PBS 비히클을 또한 평가하였다. ADC는 1 및 5 mg/kg으로 1주에 걸쳐 3회 투여하였고 그런 다음 비히클 단독을 투여한 그룹에서 대략 2000 mm<sup>3</sup>의 평균 종양 크기가 얻어질 때까지 모니터링하였다. 이 지점에서 종양 성장 억제를 아래에서 기술한 대로 계산하였다.

[0194] 비히클 처리된 그룹에 비하여 평균 종양 크기를 다음과 같이 계산하였다: 비히클 그룹의 평균 크기가 1000 mm<sup>3</sup>에 도달할 때까지 종양을 캘리퍼스를 사용하여 1주에 2회 측정하였고; 종양 크기를 식 ( $\text{길이} \times \text{폭}^2 / 2$ )을 사용하여 계산하였다. 종양 성장 억제를 다음 식을 따라 계산하였다:  $(1 - ((T_{\text{최종}} - T_{\text{초기}}) / (C_{\text{최종}} - C_{\text{초기}}))) \times 100$ , 이때 T (처리된 그룹) 및 C (대조 그룹)는 비히클 그룹이 1000 mm<sup>3</sup>에 도달한 날의 평균 종양 질량을 나타낸다. 그 결과를 표 15에 요약한다.

### 표 15

처리 그룹	8일째 최종 종양 크기 mm <sup>3</sup> (평균 ± SD)	평균 종양 성장 억제 (%)
PBS 비히클	2253 ± 217	0
대조표준-MCC-DM1 1mg/kg	2827 ± 278	-27
대조표준-MCC-DM1 5mg/kg	2402 ± 256	-7
대조표준-M0026 1mg/kg	2729 ± 470	-22
대조표준-M0026 5mg/kg	2787 ± 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 1mg/kg	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 5mg/kg	471 ± 227	84
H1H1863N2-M0026 1mg/kg	679 ± 265	74
H1H1863N2-M0026 5mg/kg	96 ± 34	102

[0196] 표 15에서 요약한 것과 같이, 가장 큰 종양 억제를 5 mg/kg의 H1H1863N2-M0026을 투여한 마우스에서 관찰하였고, 이때 초기 종양의 퇴행을 관찰하였다. 5 mg/kg의 H1H1863N2-M0026으로의 치료로부터 유발된 102%의

종양 성장 억제는 5 mg/kg의 H1H1862N2-MCC-DM1으로 종양을 치료한 후 관찰된 것 (83%)과 비교하여 상당히 더 컸다. H1H1862N2-mcc-DM1에 비교하여 H1H1863N2-M0026에 의해 유도된 억제는 1 mg/kg의 용량에서도 유지되었다. MCC-DM1 또는 M0026을 사용한 대조 ADC로 처리한 그룹에서는 항-종양 효과를 관찰하지 못하였다.

[0197] 그러므로 이 실시예는 본 발명의 항-EGFRvIII 항체가 항체-약물 컨쥬케이트의 형태로 투여될 때 종양 성장을 억제함에 있어 매우 효능이 있음을 나타낸다. 본 실시예는 추가로 특히 신규한 링커/약물 분자 M0026에 컨쥬케이트된 발명의 항-EGFRvIII 항체 (예컨대 H1H1863N2)의 맥락에서, 실제로 종양 퇴행을 촉진하는 발명의 ADC의 역할을 지지한다.

[0198] 본 발명은 본원에서 기술된 특정 구체예들에 의해 범주상 제한되지 않을 것이다. 실제로, 본원에 기술된 것들에 더불어 발명의 다양한 변형이 전술한 설명 및 첨부되는 도면으로부터 기술분야의 당업자들에게 드러날 것이다. 그런 변형은 첨부되는 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0199] 실시예 13: 항-EGFRvIII 항체는 EGFRvIII-발현 세포에 대한 특이성을 나타내고 강력한 세포 사멸 활성을 증명한다

[0200] 이 실시예에서는, 마이탄신 독소 DM1에 컨쥬케이트된 항-인간 EGFRvIII 항체의 세포 생존성을 감소시키는 능력을 시험관 내 세포 기반 분석을 사용하여 측정하였다.

[0201] 전 길이의 인간 EGFRvIII (SEQ ID NO:147) 또는 야생형 인간 EGFR (SEQ ID NO:146)을 HEK293 (293/hEGFRvIII, 293/hEGFRwt), U251 (U251/hEGFRvIII) 및 MMT 060562 (MMT/hEGFRvIII) 셀라인에 안정하게 도입하였다. 모든 세포를 리포펙타민 2000 기반 방법론을 통해 제조하였고 G418의 존재하에 완전 성장 배지에서 배양하였다.

[0202] EGFR wt 또는 EGFRvIII의 세포 표면 발현을 FACS 분석을 통해 측정하였다. 간단하게 설명하면,  $1 \times 10^6$ 의 세포를  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항-EGFRvIII 항체 H1H1863N2, 항-EGFRwt 대조 mAb (대조표준 IV) 또는 아이소타입 대조표준과 함께 항체 희석 완충액에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 항체 희석 완충액으로 2회 세척한 후에, 세포를  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PE 컨쥬케이트된 항-인간 이차 항체와 함께 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 추가로 2회 세척한 후에, 샘플을 Accuri C6 (BD) 또는 Hypercyt (Intellicyt) 세포분석기 상에서 이동하게 하고 데이터를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 그 결과를 표 16에 요약한다. n.d = 측정되지 않음.

### 표 16

[0203] EGFRwt 및 EGFRvIII 엔지니어링된 셀라인에서 세포 표면 발현

셀 라인	FACS 결합 (아이소타입 대조표준 이상의 MFI 배수)				
	미염색	H1H1863N2 (항-EGFRvIII)	대조표준 IV (항-EGFRwt)	이차 단독	아이소타입 대조표준
HEK293	1X	1X	49X	1X	1X
HEK293/hEGFRwt	1X	n.d.	332X	1X	1X
HEK293/hEGFRvIII	1X	264X	n.d.	1X	1X
U251	1X	1X	n.d.	1X	1X
U251/hEGFRvIII	1X	13X	n.d.	1X	1X
MMT/	1X	1X	n.d.	1X	1X
MMT/hEGFRvIII	1X	280X	n.d.	1X	1X

[0204] 이를 결과는 EGFRvIII 표면 발현이 HEK293/hEGFRvIII 및 MMT/hEGFRvIII 셀라인에서 비교할만한 하였던 반면, U251/EGFRvIII 발현 수준은 HEK293/hEGFRvIII 및 MMT/hEGFRvIII 세포 시스템에서보다 대략 20-배 더 낮았다. H1H1863N2를 통한 EGFRvIII 결합은 모 셀라인에서는 검출되지 않았다. 대조적으로, HEK293 모 세포에 결합된 항-EGFRwt 대조 항체 (대조표준 IV)는 아이소타입 대조표준보다 49-배 높았다. HEK293 세포 안으로의 EGFRwt 발현 벡터의 안정한 통합은 바탕보다 332배까지 발현을 증가시켰고 HEK293/hEGFRvIII 및 MMT/hEGFRvIII 세포에서의 EGFRvIII 발현에 필적하였다.

[0205] 항-EGFRvIII 항체 H1H1863N2의 EGFRvIII에 대한 선택적 결합을 모 HEK293, HEK293/hEGFRwt, HEK293/hEGFRvIII 및 A431 셀라인을 사용하여 FACS를 통해 평가하였다. 그 결과를 표 17에 나타낸다.

### 표 17

[0206]

## 항-EGFRvIII 항체의 EGFRvIII-발현 셀라인에 대한 결합 특이성

mAb	FACS 결합 (아이소타입 대조표준 이상의 MFI 배수)			
	HEK293	HEK293/ EGFRwt	HEK293/ EGFRvIII	A431
대조표준 IV (항-EGFRwt)	83	251	855	621
H1H1863N2 (항-EGFRvIII)	1	3	662	13
아이소타입 대조표준	1	1	1	1
이차 Ab 단독	1	1	1	1
미염색 세포	1	1	1	1

[0207]

표 17에서 알 수 있는 것과 같이, H1H1863N2 및 항-EGFRwt 대조 항체 (대조표준 IV)는 둘 다 아이소타입 대조표준에 비하여 HEK293/EGFRvIII 세포에 대해 강력한 결합 (바탕값보다 >650배)을 나타냈다. 대조적으로, H1H1863N2는 wt-EGFR HEK293 셀라인 (바탕값보다 3-배) 및 EGFR을 내인적으로 발현하는 셀라인 A431 (대조표준보다 13-배)에서 약하게 결합하였다. wt EGFR-발현 세포에 강력하게 결합된 항-EGFR-wt 대조 항체는 야생형 EGFR을 능가하는 H1H1863N2의 EGFRvIII에 대한 선택성을 확인해주었다.

[0208]

다음으로, 마이탄신 독소 DM1에 컨쥬게이트된 항-인간 EGFRvIII 항체의 세포 생존성을 감소시키는 능력을 시험관 내 세포 기반 분석을 사용하여 측정하였다. 세포를 PDL-코팅된 96 웰 플레이트에 웰당 250 내지 2000 세포로 완전 성장 배지에 시딩하였고 밤새 성장하도록 허용하였다. 세포 생존성 곡선을 위해, ADC 또는 유리 약물 (DM1-SMe)을 500 nM 내지 6 pM 범위의 최종 농도로 세포에 첨가하고 3일 동안 인큐베이션하였다. 세포를 CCK8 (Dojindo)과 함께 최종적으로 1 내지 3시간 동안 인큐베이션하였고, 450 nm에서의 흡광도 ( $OD_{450}$ )를 Flexstation3 (Molecular Devices) 상에서 측정하였다. 디기토닌 (40 nM) 처리된 세포로부터의 바탕 OD450 수준을 모든 웰로부터 빼고, 생존성을 미처리 대조표준의 백분율로서 표시하였다. 10-지점 반응 곡선 (GraphPad Prism) 상에서 IC<sub>50</sub> 값을 4-변수 로그식 방정식으로부터 측정하였다. 그 결과를 표 18A 및 18B에 나타낸다. IC<sub>50</sub> 값은 nM로 나타내고 특정 약물/항체 비율에 대해 표준화한다 (DAR).

## 표 18

표 18A: 항-EGFRvIII-DM1 항체-약물 컨쥬게이트의 세포 사멸 효능

셀라인	HEK293		HEK293/ hEGFRwt		U251	
	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸
H1H1863N2-MCC-DM1	>100	90	1	97	>100	91
항-EGFRwt-MCC-DM1	76	94	0.2	97	~1.0	94
DM1-SMe	0.31	97	0.6	99	0.57	95
아이소타입 대조표준-MCC-DM1	>100	92	>100	96	>100	91

표 18B: 항-EGFRvIII-DM1 항체-약물 컨쥬게이트의 세포 사멸 효능

셀라인	U251/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	>150	40	3	100
항-EGFRwt-MCC-DM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DM1-SMe	1.2	83	0.6	96	0.7	100
아이소타입 대조표준-MCC-DM1	35	76	>150	66	NK	72

[0209]

- [0210] 표 18A 및 18B에서 알 수 있는 것과 같이, H1H1863N2-MCC-DM1은 HEK293/hEGFRvIII, U251/hEGFRvIII 및 MMT/hEGFRvIII 셀라인의 생존성을 감소시켰고, 이때 IC<sub>50</sub>은 1.0 내지 4.0 nM 범위였다. 대조적으로, DM1에 컨쥬게이트된 아이소타입 대조표준은 100 nM보다 큰 IC<sub>50</sub>으로 293/hEGFRvIII 및 MMT/hEGFRvIII 세포 및 35nM의 IC<sub>50</sub>으로 U251/hEGFRvIII 세포의 생존성을 감소시켰다. H1H1863N2-MCC-DM1은 야생형 EGFR을 발현하는 HEK293 세포 (293/hEGFRwt) 또는 대조표준 모 셀라인에 영향을 미치지 않았고, 그것은 EGFRvIII 발현 세포에 대한 특이성을 시사한다.
- [0211] 그러므로, 이 실시예는 EGFRvIII 항체 H1H1863N2가 EGFRvIII-발현 셀라인에 대한 특이성을 가졌음을 증명하고 DM1 독소에 컨쥬게이트될 때 특이적인 세포 사멸 능력을 증명한다.
- [0212] **실시예 14: 개선된 세포 사멸 효능은 EGFRvIII 형태-결합 항체-약물 컨쥬게이트가 EGFRvIII 접합 펩티드-결합 항체-약물 컨쥬게이트와 함께 투여될 때 이루어진다**
- [0213] 이 실시예에서, 항-EGFRvIII 항체-약물 컨쥬게이트의 2가지 상이한 유형의 공동-투여에 의한 세포 사멸을 증강시키는 능력을 측정하였다. 이 실시예를 위해, 다음 2가지의 상이한 항-EGFRvIII 항체로 구성된 조합을 시험하였다: (1) EGFRvIII 접합 펩티드 ADC를 인식하지 못하는 항-EGFRvIII 특이적 항체 (본원에서 "형태상 결합제"로서 언급됨); 및 (2) EGFRvIII 접합 펩티드를 인식하는 항-EGFRvIII 특이적 항체 (본원에서 "펩티드 결합제"로서 언급됨). 실시예 6에서 증명된 것과 같이, 항-EGFRvIII 항체 H1H1863N2는 EGFRvIII 접합 펩티드 또는 인간 EGFR의 잔기 311 내지 326에 결합하지 못하고 따라서 "형태상 결합제"로서 간주된다.
- [0214] **시험관 내 교차 경합**
- [0215] 먼저, EGFRvIII 접합 펩티드에 결합하는 항체와 교차 경합하는 H1H1863N2의 능력을 결합 경합 분석을 통해 측정하였다. 이 실시예에서 사용한 접합 펩티드 결합 항-EGFRvIII 항체는 대조표준 V였다.
- [0216] 교차 경합을 실시간, 표지-유리 바이오-층 간섭법 (BLI) 분석을 사용하여 Octet HTX 바이오센서 (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences) 상에서 측정하였다. 전체 실험을 25°C에서 0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% v/v 계면활성제 P20, 1.0mg/mL BSA (Octet HBST 완충액)로 구성된 완충액 중에서 플레이트를 1000 rpm의 속도로 흔들면서 수행하였다. 두 가지 항체가 재조합 인간 EGFRvIII (hEGFRvIII.mmh; SEQ ID:152)에 대한 결합에 대해 교차-경합하는지를 평가하기 위하여, 대략 ~0.35 nm의 hEGFRvIII.mmh를 항-펜타-His 코팅된 Octet 바이오센서 상에 포획하였다. 그런 다음 항원-포획된 바이오센서를 제 1 항-EGFRvIII 단클론성 항체 (이하 mAb-1로 언급함)로, mAb-1의 50 μg/mL 용액을 함유하고 있는 웰에 5분 동안 침지함으로써 포획시켰다. 그런 다음 바이오센서를 계속해서 제 2 항-EGFRvIII 단클론성 항체 (이하 mAb-2로 언급함)의 50 μg/mL 용액을 함유하고 있는 웰에 3분 동안 담갔다. 모든 바이오센서를 Octet HBST 완충액으로 실험의 각 단계 사이사이에 세척하였다. 실시간 결합 반응을 실험의 전 과정 중에 모니터링하였고, 매 단계가 끝날 때에 결합 반응을 기록하였다. 사전에 mAb-1과 복합체를 형성한 hEGFRvIII에 대한 mAb-2의 결합의 반응을 비교하였고 상이한 항-EGFRvIII 단클론성 항체들의 경합/비-경합 행동방식을 측정하였다.
- [0217] 이 실험의 교차-경합 포맷을 사용하여, H1H1863N2는 시험된 EGFRvIII 접합 펩티드 결합제와의 교차 경합을 나타내지 않았고, 또한 EGFRvIII에의 결합에 대해서도 대조표준 II 또는 대조표준 IV와 교차 경합하지 않았다. 그러므로 이 교차 경합 분석의 결과들은 H1H1863N2가 EGFRvIII 접합 펩티드 결합제뿐 아니라 대조표준 II 및 IV의 그것에 대한 구별되는 결합 에피토프를 가지는 것을 가리킨다.
- [0218] **개별적인 항-EGFRvIII 항체-약물 컨쥬게이트의 세포 사멸 활성**
- [0219] 다음으로, H1H1863N2-MCC-DM1 및 항-EGFRvIII 펩티드-결합 ADC가 함께 투여될 때 세포 생존성을 감소시키는 능력을 평가하였다. 대조표준 V가 SMCC-DM1에 컨쥬게이트될 때 (즉 대조표준 V-MCC-DM1) 세포 사멸을 유도하는 능력을 실시예 13에서 기술된 것과 같은 시험관 내 세포 기반 분석을 사용하여 측정하였다. 그 결과를 표 19에 나타낸다.

**표 19**

항-EGFRvIII-DM1 항체-약물 컨쥬게이트의 세포 사멸 효능

셀라인	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII (높음)		MMT		MMT/ (높음)		hEGFRvIII	
ADC	IC50	% 사멸	IC50	% 사멸	IC50	% 사멸	IC50	% 사멸	IC50	% 사멸

DM1-SMe (유리 DM1)	0.19	98	0.25	99	0.15	100	0.18	99
아이소타입 대조표준-MHCC-DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2-MCC- DM1	80	97	0.37	99	200	95	3.25	97
대조표준 V-MCC-DM1	90	95	0.25	100	200	89	0.35	97

[0221] 표 19에 요약된 것과 같이, 항-EGFRvIII ADC는 0.25 nM 내지 3.25 nM의 범위의 IC<sub>50</sub> 값으로, 다양한 EGFRvIII 과잉발현 셀라인의 세포 생존성을 감소시켰다.

[0222] 항-EGFRvIII 항체-약물 컨쥬게이트의 쌍 방식 조합의 세포 사멸 활성

[0223] 다음으로, 항-EGFRvIII 웨티드-결합 ADC와 쌍을 이룬 H1H1863N2-MCC-DM1의 세포 사멸 효능을 1:1 비율의 EGFRvIII 과잉-발현 셀라인에서 시험하였다. 그 결과를 표 20에 나타낸다.

### 표 20

[0224] 항-EGFRvIII-DM1 ADC의 쌍 방식 조합의 세포 사멸 효능

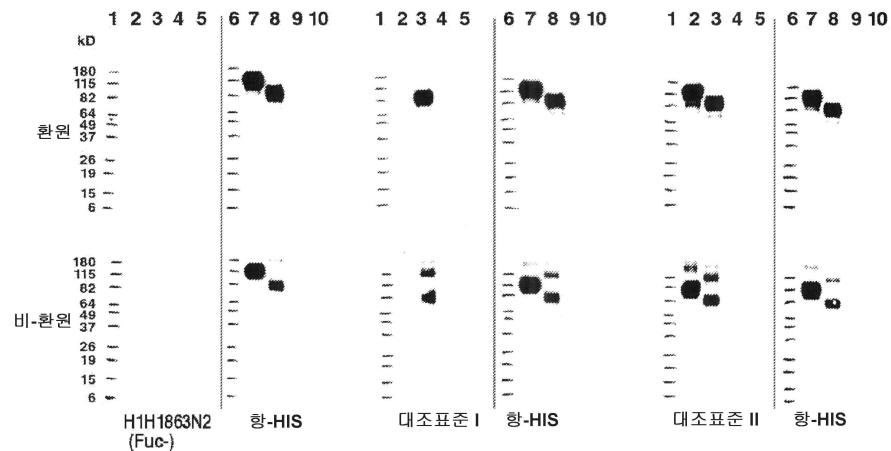
셀라인:		HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	IC <sub>50</sub> (nM)	% 사멸						
H1H1863N2- MCC-DM1	없음	250	87	1.52	95	250	59	11.1	98
대조표준 V-MCC-DM1	없음	100	85	0.14	98	100	67	0.7	95
H1H1863N2-MCC-DM 1	대조표준 V-MCC-DM1	100	91	0.19	99	200	98	0.58	100
DM1-SMe (유리 DM1)	없음	0.21	96	0.28	97	0.19	100	0.19	100
아이소타입 대조 표준-MHCC-DM1	없음	200	93	95	93	150	32	100	36

[0225] 표 20에 요약된 것과 같이, H1H1863N2-MCC-DM1 (형태상 에피토프 결합체)과 대조표준 V-MCC-DM1 (접합 웨티드 결합체)의 조합은 단일-ADC 치료와 비교하여 적어도 동등한, 또는 어떤 경우에는 증강된 세포 사멸 효능을 초래하였다. 항체의 두 가지 유형 사이의 간접의 결핍은 상이한 세포독소, 또는 뚜렷한 작용 메커니즘을 가지는 상이한 부류의 세포독소와 경합하지 않는 2가지 항체의 효과적인 사용을 시사한다.

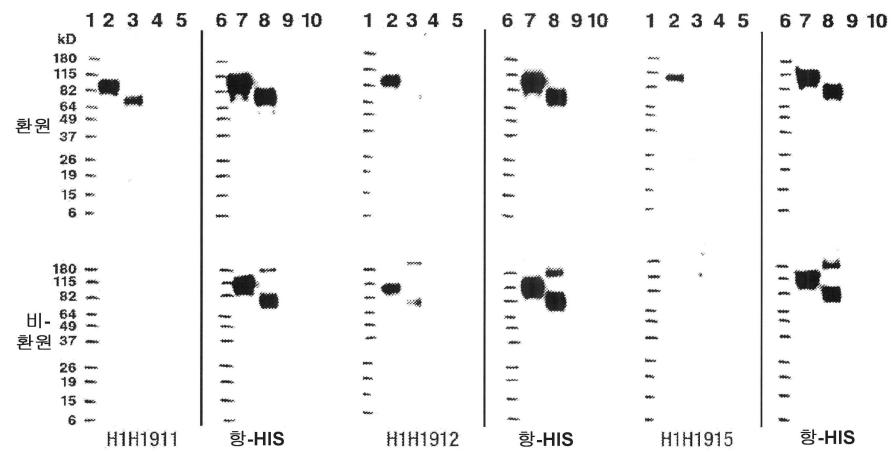
[0226] 요약하면, 이 실시예는 H1H1863N2가 대조 EGFRvIII 웨티드 결합 항체와 경합하지 않는 것을 증명한다. 이런 독특한 에피토프는 세포 사멸 효능을 개선하기 위하여 EGFRvIII 웨티드-결합 ADC와 조합되는 것을 허용한다. EGFRvIII ADC의 이런 신규한 조합은 더 좋은 치료 효능을 허용할 수 있다.

## 도면

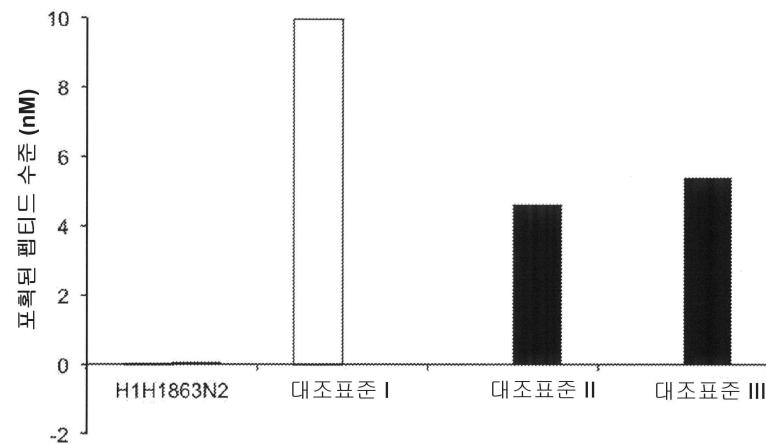
## 도면 1a



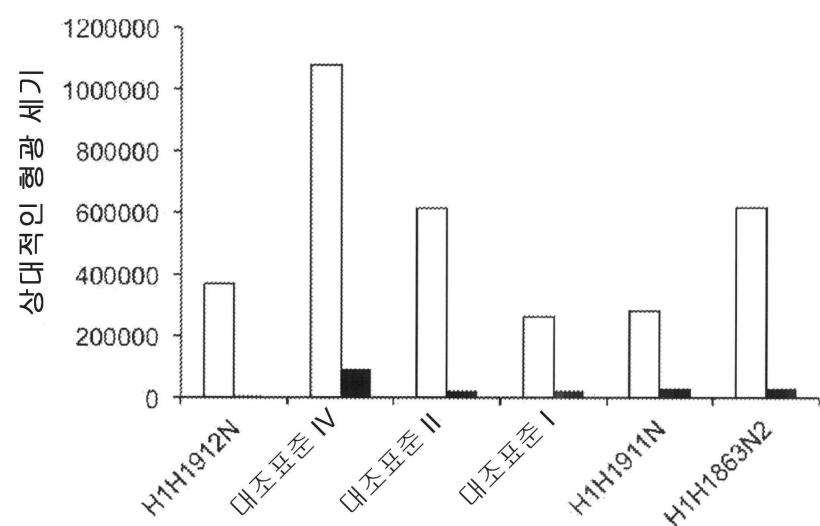
## 도면 1b



## 도면 2



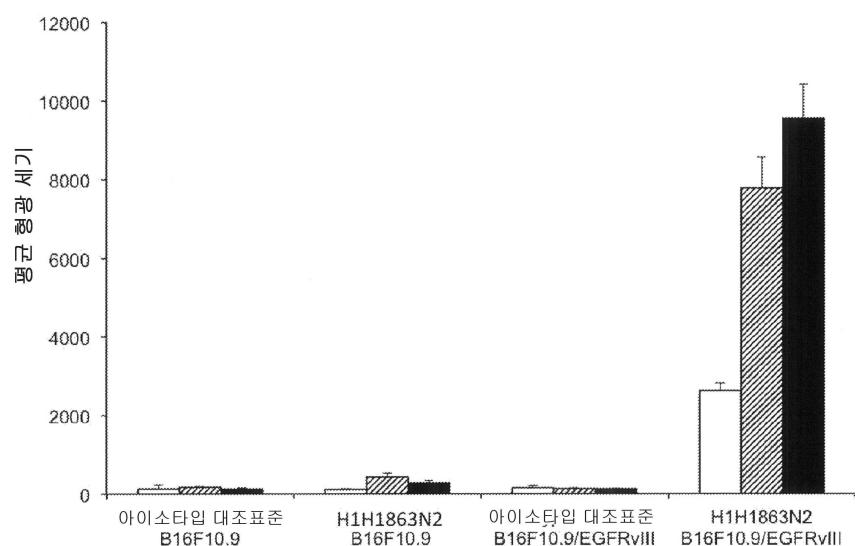
도면3



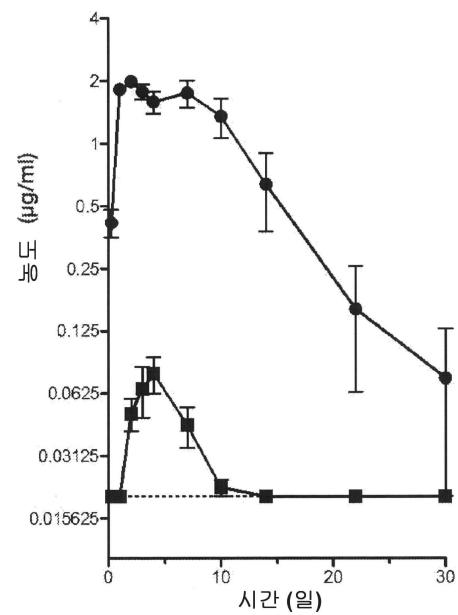
도면4a



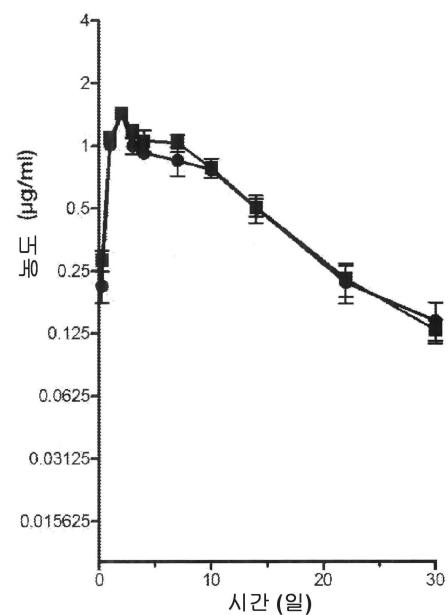
도면4b



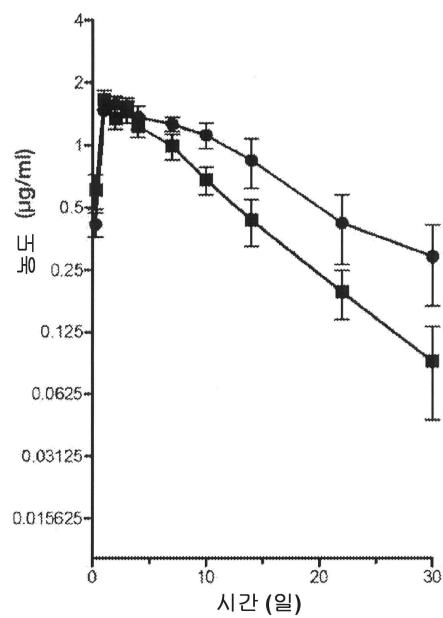
도면5a



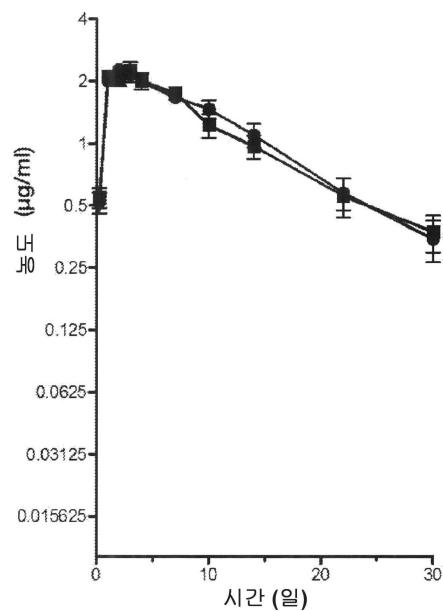
도면5b



도면5c



도면5d



## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

&lt;120&gt; ANTI-EGFRvIII ANTIBODIES AND USES THEREOF

&lt;130&gt; A0020W001

&lt;140&gt; To be assigned

&lt;141&gt; Filed herewith

&lt;150&gt; 61/950,963

&lt;151&gt; 2014-03-11

&lt;160&gt; 165

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 1

```
caggtgcagc tggtagtc tggtggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtaaaagt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt ggcacaggcc 120
```

```
actggacagg ggcttgagtg gatggatgg attaaccta acagtgatta cacaggctat 180
gtacagaagt tccagggcag agtaccatg accagggaca cctccataag tacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gacatcacgg 300
tggctgaac acttccacca ctggggccag ggcaccctgg tcactgtctc ctca      354
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Gln Lys Phe

50 55 60

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

ggatacacct tcaccaggta tgat 24

<210> 4

<211> 8

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp

1	5
---	---

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 5

attAACCTA ACAGTGATTACACA 24

<210> 6

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 6

Ile Asn Pro Asn Ser Asp Tyr Thr

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;

&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 7

gcgacatcac ggtggctctga acacttccac cac 33

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 8

Ala Thr Ser Arg Trp Ser Glu His Phe His His

1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 342

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 9

gacatcgtga tgaccaggc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcgaa gagggccacc 60

atcaactgca agtccagcca gagtgttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtaaccgc acaaaccagg acagcctctt aacctactca ttactggc atctacccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cacttcacc 240  
 atcagcagcc tcgaggctga agatgtggca gtttattact gtacccaata ttatagact 300  
 ccattcaatt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaac ga 342

<210> 10

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 10

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85	90	95
----	----	----

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Lys Arg

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 11

cagagttt tatacagctc caacaataag aactac 36

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 12

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 13

tgggcatct 9

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 14

Trp Ala Ser

1

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 15

caccaatatt atagtactcc attcact 27

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 16

His Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 17

caggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggc ccggagactc 60

tcctgttag tgtctggatt catttcagt agctatggc tgcactgggt ccgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatttatg atgaaatgaa tgaatactat 180

gttagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240

ctccaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgagaggc 300

tacagtccgc ggtacaagta ttacttcgtt atggacgtt gggccaaagg gaccacggc 360

accgtctcct ca 372

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 18

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

1 5 10 15

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 19

ggattcatct tcagtagcta tggc 24

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 20

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 21

atattttatg atggaagtaa tgaa 24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 22

Ile Phe Tyr Asp Gly Ser Asn Glu

1 5

<210> 23

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 23

gcgcgagagg gctacagtca gcggtacaag tattacttcg gtatggacgt c 51

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 24

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Gln Arg Tyr Lys Tyr Tyr Phe Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 25

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 25

gacatccaga tgaccagtc tccatttcc gtgtctgcat ctgtgggaga cagagtacc 60

atcaacttgtc gggcgagtca gggatttgc agctggtag cctggatca gcagcaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagg ttcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcaactcta ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tcccgctcac tttcggcgg 300

gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 26

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65                    70                    75                    80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu

85                    90                    95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100                    105

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 27

caggttata gcagctgg                    18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 28

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1                    5

<210> 29

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 29

gctgcattcc                    9

<210> 30

<211> 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 30

Ala Ala Ser

1

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 31

caacagacta acagtttccc gctcact

27

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 32

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 33

gagggtgcagc tggtgagtc tgggggagcc ttggfacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt agctacgaca tgcactgggt ccgccaagct 120

acagaaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtaactg ctggtgccac atactatcca 180

ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240

caaataaca gcctgagacg cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggggattac 300

gtttggggta ctatcgcc cctttgac tactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 34

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
----	----	----

Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85	90	95
----	----	----

Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr Trp

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115	120
-----	-----

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 35

ggatccccct tcagtagcta cgac

24

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 36

Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr Asp

1 5

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 37

atttgtactg ctggtgccac a

21

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 38

Ile Gly Thr Ala Gly Ala Thr

1 5

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 39

gcaagagggg attacgttg gggacttat cgtccctct ttgactac 48

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 40

Ala Arg Gly Asp Tyr Val Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Leu Phe Asp Tyr

1

5

10

15

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 41

gacatccagt tgaccaggc tccatcctc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60

atcacttgct gggccaggta gggcattaac aattattn cctggatca aaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtc gcatccactt tgcaaactgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactcta caatcagcag cctgcagcct 240

gaagatttg caacttatta ctgtcagcag cttaatagtt acccgctcac tttcgccgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 42

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
-----	-----

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 43

caggcattaaacaattat 18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 44

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

1	5
---	---

<210> 45

<211> 9

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 45

gctgcattcc 9

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 46

Ala Ala Ser

1

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 47

cagcagctta atagttaccc gtcact 27

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 48

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 372

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 49

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttca gatatggca tacactgggt ccgcaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagt atttggcatg atgaaatgaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga ccagcctgag agccgaggac acggctgtt attactgtgc gagagatgga 300  
 ctggagatac gagatcaacta ctactacggt atggacgtt gggccaagg gaccacggc 360  
 accgtctcct ca 372

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 51

ggattcacct tcagtagata tggc 24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Gly

1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 53

atttggcatg atggaagtaa taaa 24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

&lt;400&gt; 54

Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 55

gcgagagatg gactggagat acgagatcac tactactacg gtatggacgt c 51

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 56

Ala Arg Asp Gly Leu Glu Ile Arg Asp His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 57

gacatccaga tgacctcacc ctgtctgcat cggtaggaga cagagtacc 60

atcacttgcc gggccagtca gagtactagt agttgggtgg cctggatca acagaaacca 120

gggaaagccc ctacgctct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtccccatca 180

aaattcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgatttg caacgtatta ctgccaaacag tataacaggt attctcgac gttcggcaa 300  
gggaccaagg tgaaattaa a 321

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 58

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Thr Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 59

cagagtacta gtagttgg 18

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 60

Gln Ser Thr Ser Ser Trp

1 5

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 61

aaggcgtct 9

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 62

Lys Ala Ser

1

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 63

caacagtata acaggtattc tcggacg 27

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 64

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Ser Arg Thr

1 5

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 65

gaagtgcagt tggtgagtc tgggggaggc ttggtagcgc ctggcaggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttat gattatgccca tgcactgggt ccggcaagtt 120

ccagggagg gcctggagtg ggtctcaggat attagttgga atagtggttag cataggctat 180

gcggactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctgcaaatga atagtctgag agctgaggac acggccttgtt attactgtgc aaaagatatac 300

catgactacg gaaaagatta ctactactac tacggatgg acgtctgggg ccaagggacc 360

acggtcacccg tctcctca 378

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 126

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 66

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

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 67

ggattcacct ttgatgatta tgcc 24

<210> 68

<211> 8

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 69

attatgttggaa atatgtggtag cata 24

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 70

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile

1 5

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 57

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 71

gcacaaagata tccatgacta cggaaaagat tactactact actacggtat ggacgtc 57

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 72

Ala Lys Asp Ile His Asp Tyr Gly Lys Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

1 5 10 15

Met Asp Val

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 73

gaaattgcgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgttttg ctcaggggaa aagagccacc 60

ctctcctgca gggcagtca gagtgttagc agcacctatt tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatacca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacticactc tcaccatcgag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatgata gttcaccatcaccc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 74

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 75  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic  
<400> 75

cagagtgtta gcagcaccta t 21

<210> 76  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic  
<400> 76

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr

1 5

<210> 77  
<211> 9  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic  
<400> 77

ggtgcattcc 9

<210> 78  
<211> 3  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic  
<400> 78

Gly Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 79

cagcagtatg atagttcacc gatcacc

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 80

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 81

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 81

caggtgcagc tggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt gcctatgcc tgcactgggt ccgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagggt ggtggcagtt atatggatg atgaaagtaa taaaaattat 180

gcagactccg tgaaggccg attcacgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcta 300

atggtcggag ttactaacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc caca 354

<210> 82

<211> 118

<212> PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr

115

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 83

ggattcacct tcagtgcccta tgcc 24

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala

1 5

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 85

atatggatg atggaagtaa taaa 24

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 86

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 87

gcgagagatc taatggtcgg agttactaac tat 33

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 88

Ala Arg Asp Leu Met Val Gly Val Thr Asn Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 89

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtcg cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacactgatg gaaacaccta cttgaattgg 120

tttaccaga ggcaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggttt taaccggac 180

tctgggtcc cagacagatt caccggcagt gggtcaggca ctgattcac actaaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga ttttgggtc ttttactgca tgcaagggtt acactggct 300

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 90

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 91  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic  
<400> 91  
caaaggctcg tatacactga tgaaaaacacc tac 33

<210> 92  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthetic  
<400> 92

Gln Ser Leu Val Tyr Thr Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 93  
<211> 9  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Synthetic  
<400> 93  
aaggtttct 9

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 94

Lys Val Ser

1

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 95

atgcaagggtt cacactggcc tccgtacact 30

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 96

Met Gln Gly Ser His Trp Pro Pro Tyr Thr

1

5

10

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 97

caggttcagc tacagcagtg gggcgccagga ctgttgaagc ctgcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtaactact ggagctggat ccgccagtc 120  
 ccagggagg ggttggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaactc caactacaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagg caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttatccctg 240  
 aagctgaggt ctgtgaccgc cgccgacacg gccatgtatt attgtgttag aggggtggg 300  
 gactactact tcggcatgga cgtctgggc cagggacca cggcacgt ctcctca 357

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 98

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 99

ggtgatcct tcagtggtaa ctac 24

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 100

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr

1 5

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 101

atcaatcatc gtggaaactc c 21

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 102

Ile Asn His Arg Gly Asn Ser

1 5

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 103

gtgagagggg gtgggacta ctacttcggc atggacgtc 39

&lt;210&gt; 104

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 104

Val Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val

1 5 10

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 105

gccatccagt tgaccaggc tccatctcc ctgtctgcgt ctgttaggaga cagagtacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcatttggaa aatgatttag gctggatca gctgagacca 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgtt acatccaggta tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcaacttca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttgc caacttatttata ctgtctacaattt gattacaattt atccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa g 321

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 106

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 107

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 107

cagggcattg gaaatgat 18

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 108

Gln Gly Ile Gly Asn Asp

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 109

gctacatcc 9

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 110

Ala Thr Ser

1

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 111

ctacaagatt acaatttatcc gtggacg 27

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 112

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 113

cagggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggagg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgcgcgtcc 120  
 ccagggagg ggctggagtg gattgggaa atcaatcata gtgaaagcac caactacaac 180  
 cccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
 aagttgacct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtatatt tctgtgcgag aggggggtggg 300  
 acctactact acggtatgga cggttgggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 114

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

1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu

Thr Cys Ala Val Tyr Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 115

ggagggtcct tcagtggta ctac

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 116

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr

1                    5

<210> 117

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 117

atcaatcata gtggaaggcac c

21

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 118

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr

1 5

<210> 119

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 119

gcgagagggg gtgggaccta ctactacggt atggacggt 39

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 120

Ala Arg Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 121

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 121

gccatccaga tgacctagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga tatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagg tacaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttcaacttatta ctgtctacag gattacaatt acccgtggac gttcgccaa 300

gggaccaagg tggatatcaa a 321

<210> 122

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 122

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

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

&lt;210&gt; 123

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 123

cagggcattg gatatgat 18

&lt;210&gt; 124

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 124

Gln Gly Ile Gly Tyr Asp

1 5

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 125

gctgcattcc 9

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 126

Ala Ala Ser

1

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 127

ctacaggatt acaattaccc gtggacg 27

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 128

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 129

caggtgcgc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60  
 acctgcgctg tctatggtgg atccttcagt ggtgactact ggagctggat tcgccagtc 120  
 ccagggagg ggctggagtg gattgggaa atcaatata gtgaaagcac caactacaac 180  
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttccctg 240

aaactgagct ctgtgaccgc cgccgacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggaggcggg 300

gactactact acggtatgga cgtctgggc ctagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 130

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Leu Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 131

ggtgatcct tcagtggta ctac 24

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 132

Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asp Tyr

1

5

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 133

atcaatata gtgaaagcac c

21

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 134

Ile Asn His Ser Gly Ser Thr

1 5

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 135

gcgagaggag gcggggacta ctactacggt atggacgtc 39

&lt;210&gt;

136

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 136

Ala Arg Gly Gly Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 137

gccatccaga tgacctagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattgga aatgat tag gctggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct acatccagg tacaagggtt ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagect 240  
gaagat ttg caaccttata ctgtctacaa gattacaatt acccgtggac gttcggcaa 300  
gggaccaagg tgaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 138

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asn Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

<400> 139

cagggcattg gaaatgat 18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 140

Gln Gly Ile Gly Asn Asp

1	5
---	---

<210> 141

<211> 9

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 141

gctacatcc 9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 142

Ala Thr Ser

1
---

<210> 143

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

&lt;400&gt; 143

ctacaagatt acaattaccc gtggacg 27

&lt;210&gt; 144

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 144

Leu Gln Asp Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr

1 5

&lt;210&gt; 145

&lt;211&gt; 3633

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 145

atgcgacctt ccgggacggc cggggcagcg ctcctggcgc tgctggctgc gctctgccg 60

gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120

ttggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tttcaataa ctgtgaggtg 180

gtccttggga atttggaaat tacatatgtc cagaggaatt atgatcttc cttcttaag 240

accatccagg aggtggctgg ttatgtcctc attgcctca acacagtggc gcgaattcct 300

ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360

gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccat gagaattta 420

cagggaaatcc tgcattggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgcctgtc caacgtggag 480

agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gacttctca gcaacatgtc gatggacttc 540

cagaaccacc tggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtccaatgg gagctgtgg 600

ggtgccaggagg aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgccca gcagtgtcc 660

gggcgctgcc gtggcaagtc ccccaagtgc tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720

acaggcccccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaatt tccgagacga agccacgtgc 780

aaggacaccc gccccccact catgctctac aacccacca cgtaccagat ggatgtgaac 840

cccgaggc aatacagctt tggtgccacc tgcgtgaaga agtgtccccg taattatgtg 900

gtgacagatc acggctcggtc cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960

gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020  
 ggtattggtg aattnaaga ctcactctcc ataaatgcta cgaatattaa acacttcaaa 1080  
 aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atccctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140  
 ttcacacata ctccctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200  
 atcacagggt tttgctgat tcaggcttgg cctgaaaaca ggacggacct ccatgcctt 1260

gagaacctag aaatcatacg cggcaggacc aagcaacatg gtcatgtttc tcttgcagtc 1320  
 gtcagcctga acataaacatc ctgggatta cgctccctca aggagataag tcatggagat 1380  
 gtgataattt cagggaaacaa aaatttgtc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440  
 tttgggacct ccggtcagaa aaccaaaatt ataagaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500  
 gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtc tccccgagg gctgctggg cccgagccc 1560  
 agggactgctgcttgcg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgcac 1620  
 cttctggagg gtgagccaag ggagttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccaccca 1680  
 gagtgctgc ctcaaggccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgttac 1740

cagtggtcccc actacattga cggcccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg 1800  
 ggagaaaaca acaccctggt ctggaaagtac gcagacgccc gccatgtgtg ccacctgtgc 1860  
 catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtctg aaggctgtcc aacgaatggg 1920  
 cctaagatcc cgtccatcgc cactggatg gtggggccccc tcccttgcgt gctgggtgt 1980  
 gcccgtggga tcggcctt catgcgaagg cgccacatcg ttggaaagcg cacgtgcgg 2040  
 aggctgtgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac 2100  
 caagctctt tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggttcc 2160  
 ggtgcgttcg gcacgggtta taaggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaaatt 2220

cccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa gaaaatccctc 2280  
 gatgaagct acgtgtggc cagcgtggac aaccccccacg tggccgcct gctggcattc 2340  
 tgcctcacct ccaccgtgca gtcatcagc cagctcatgc cttcggtcg cctctggac 2400  
 tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag 2460  
 atcgcaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcggttg tgcacccgca cctggcagcc 2520  
 aggaacgtac tggtaaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa 2580  
 ctgctgggtg cggaaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgcc tatcaagtgg 2640  
 atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tataccacc agagtgtatgt ctggagctac 2700

ggggtgactg tttgggagtt gatgacccctt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc 2760  
 agcgagatct cctccatctt ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc cataatgtacc 2820

atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgcccaaag 2880  
 ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccgag acccccagcg ctaccttgc 2940  
 attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtcc 3000  
 ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtaacct catcccacag 3060  
 cagggttct tcagcagccc ctccacgtca cggaactcccc tcctgagctc tctgagtgca 3120  
 accagcaaca attccaccgt ggcttgcatt gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc 3180

aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggccctt gactgaggac 3240  
 agcatagacg acaccccttccc cccagtgcct gaatacataa accagtcgt tccaaaagg 3300  
 cccgcgtggct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaaccc cgcccccagc 3360  
 agagacccac actaccagga ccccacagc actgcagttgg gcaacccga gtatctcaac 3420  
 actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttgcacagcc ctgcacttgg ggcccgaaaa 3480  
 ggcagccacc aaatttagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa 3540  
 gccaagccaa atggcatctt taaggctcc acagctaaaa atgcagaata cctaagggtc 3600  
 gcccacaaa gcagtgaatt tattggagca tga 3633

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 1210

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 146

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln

20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
145	150	155
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
180	185	190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
210	215	220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
225	230	235
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
245	250	255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
260	265	270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
275	280	285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
290	295	300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
305	310	315
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
325	330	335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
340	345	350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp

355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr

370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu

385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln

420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu

435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser

450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu

485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro

500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn

515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly

530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro

545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro

565 570 575

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

580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

595	600	605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
610	615	620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly		
625	630	635
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu		
645	650	655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His		
660	665	670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu		
675	680	685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu		
690	695	700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser		
705	710	715
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu		
725	730	735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser		
740	745	750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser		
755	760	765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser		
770	775	780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp		
785	790	795
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn		
805	810	815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg		
820	825	830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro		
835	840	845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala  
 850 855 860  
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp  
 865 870 875 880  
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp  
  
 885 890 895  
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser  
 900 905 910  
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu  
 915 920 925  
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr  
 930 935 940  
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys  
  
 945 950 955 960  
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln  
 965 970 975  
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro  
 980 985 990  
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp  
 995 1000 1005  
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe Phe  
  
 1010 1015 1020  
 Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu Ser Ala  
 1025 1030 1035 1040  
 Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn Gly Leu Gln  
 1045 1050 1055  
 Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp  
 1060 1065 1070  
 Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp Asp Thr Phe Leu Pro  
  
 1075 1080 1085  
 Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys Arg Pro Ala Gly Ser

1090	1095	1100
Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser		
1105	1110	1115
Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro		
1125	1130	1135
Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp		

1140	1145	1150
Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp		
1155	1160	1165
Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn		
1170	1175	1180
Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val		
1185	1190	1195
Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala		
1205	1210	

<210> 147  
<211> 943  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

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

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp  
 100 105 110  
 Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu  
 115 120 125  
 Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro  
 130 135 140  
 Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg  
 145 150 155 160  
 Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu  
 165 170 175  
 Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly  
 180 185 190  
 Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile  
 195 200 205  
 Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile  
 210 215 220  
 Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys  
 245 250 255  
 Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys  
 260 265 270  
 Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys  
 275 280 285  
 Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys  
 290 295 300  
 Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp  
 305 310 315 320  
 Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn  
 325 330 335  
 Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu

340	345	350
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly		
355	360	365
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val		
370	375	380
Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe		
385	390	395
Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu		
405	410	415
Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro		
420	425	430
Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile		
435	440	445
Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp		
450	455	460
Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu		
465	470	475
Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala		
485	490	495
Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly		
500	505	510
Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe		
515	520	525
Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser		
530	535	540
Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr		
545	550	555
Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val		
565	570	575
Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala		
580	585	590

Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys  
 595 600 605  
 Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr  
 610 615 620  
 Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu  
  
 625 630 635 640  
 Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile  
 645 650 655  
 Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys  
 660 665 670  
 Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala  
 675 680 685  
 Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met  
  
 690 695 700  
 Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met  
 705 710 715 720  
 His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp  
 725 730 735  
 Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro  
 740 745 750  
 Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu  
  
 755 760 765  
 Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp  
 770 775 780  
 Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln  
 785 790 795 800  
 Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp  
 805 810 815  
 Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys  
  
 820 825 830  
 Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu

835	840	845
Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr		
850	855	860
Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val		
865	870	875
Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His		

885	890	895
Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys		
900	905	910
Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala		
915	920	925
Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala		
930	935	940
<210> 148		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220>		
<223> Synthetic		
<400> 148		
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
1	5	10
<210> 149		
<211> 19		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<400> 149		
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Gly Gly		
1	5	10
Gly Ser Lys		

<210> 150

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 150

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr

1 5 10 15

Asp His

<210> 151

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 151

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys

1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Lys

20

<210> 152

<211> 408

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 152

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr

20 25 30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser

35 40 45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Glu Gly

50 55 60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Glu Phe Lys Asp

65 70 75 80

Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr

85 90 95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp

100 105 110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu

115 120 125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro

130 135 140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg

145 150 155 160

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys

245 250 255

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys

260 265 270

Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys

275                    280                    285

Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys

290                    295                    300

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp

305                    310                    315                    320

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn

325                    330                    335

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu

340                    345                    350

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly

355                    360                    365

Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Gln Lys Leu

370                    375                    380

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

385                    390                    395                    400

Asp Leu His His His His His

405

<210> 153

<211> 613

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 153

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala

1                    5                    10                    15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr

20                    25                    30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser

35                    40                    45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly

50                    55                    60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Glu Phe Lys Asp  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr  
 85                    90                    95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp  
 100                  105                  110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu  
 115                  120                  125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro  
 130                  135                  140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg  
 145                  150                  155                  160

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

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly  
 180                  185                  190

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

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile  
 210                  215                  220

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His  
 225                  230                  235                  240

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys  
 245                  250                  255

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys  
 260                  265                  270

Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys  
 275                  280                  285

Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys  
 290                  295                  300

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp

305	310	315	320
Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Glu Asn			
325	330	335	
Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu			
340	345	350	
Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly			
355	360	365	
Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Pro Arg Gly			
370	375	380	
Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu			
385	390	395	400
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val			
405	410	415	
Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
420	425	430	
Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val			
435	440	445	
Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser			
450	455	460	
Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met			
465	470	475	480
Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala			
485	490	495	
Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro			
500	505	510	
Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln			
515	520	525	
Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr			
530	535	540	
Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr			
545	550	555	560

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu  
 565 570 575  
 Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser  
 580 585 590  
 Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser  
 595 600 605

Arg Thr Pro Gly Lys

610  
 <210> 154  
 <211> 684  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Synthetic  
 <400> 154

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

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

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

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

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu  
 385 390 395 400  
 Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp  
 405 410 415  
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln  
 420 425 430  
  
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu  
 435 440 445  
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser  
 450 455 460  
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu  
 465 470 475 480  
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu  
 485 490 495  
  
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro  
 500 505 510  
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn  
 515 520 525  
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly  
 530 535 540  
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro  
 545 550 555 560  
  
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro  
 565 570 575  
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val  
 580 585 590  
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp  
 595 600 605  
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys  
 610 615 620  
  
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly

625                    630                    635                    640  
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Cys Pro Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile  
 645                    650                    655  
 Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
 660                    665                    670  
 Leu Ser Gly His His His His His Ser Ser Gly

675                    680

<210> 155

<211

> 880

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 155

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Ala

1                    5                    10                    15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Val Cys Gln

20                    25                    30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe

35                    40                    45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn

50                    55                    60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys

65                    70                    75                    80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val

85                    90                    95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr

100                    105                    110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn

115                    120                    125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu

130                    135                    140

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

385	390	395	400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp			
405	410	415	
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln			
420	425	430	
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu			
435	440	445	
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser			
450	455	460	
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu			
465	470	475	480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu			
485	490	495	
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro			
500	505	510	
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn			
515	520	525	
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly			
530	535	540	
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro			
545	550	555	560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro			
565	570	575	
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val			
580	585	590	
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp			
595	600	605	
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys			
610	615	620	
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly			
625	630	635	640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro  
 645 650 655  
 Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 660 665 670  
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu  
 675 680 685  
 Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro  
 690 695 700  
 Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala  
 705 710 715 720  
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val  
 725 730 735  
 Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe  
 740 745 750  
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr  
 755 760 765  
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu  
 770 775 780  
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys  
 785 790 795 800  
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn  
 805 810 815  
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp  
 820 825 830  
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys  
 835 840 845  
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly  
 850 855 860  
 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 865 870 875 880  
 <210> 156  
 <211> 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 156

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 157

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 157

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
115	120	125	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
130	135	140	
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
165	170	175	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
180	185	190	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
195	200	205	
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
210	215	220	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
245	250	255	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 158

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 158

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

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35	40	45
----	----	----

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50	55	60
----	----	----

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95
----	----	----

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145                    150                    155                    160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165	170	175
-----	-----	-----

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
325		
<210> 159		
<211> 19		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (1)...(1)		
<223> Xaa = Ala		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (2)...(2)		

<223> Xaa = Arg or Lys

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Gly or Asp

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asp, Gly, Ile or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Tyr, Leu, His or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Val, Glu, Asp, Met or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223

> Xaa = Trp, Ile, Tyr, Val or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Gly or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Thr, Asp, Lys, Gly or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = His, Asp, Thr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Tyr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (12)...(12)

<223> Xaa = Tyr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)...(13)

<

223> Xaa = Tyr or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (14)...(14)

<223> Xaa = Arg or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (15)...(15)

<223> Xaa = Pro, Tyr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (16)...(16)

<223> Xaa = Leu, Gly or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (17)...(17)

<223> Xaa = Phe, Met or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (18)...(18)

<223> Xaa = Asp or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (19)...(19)

<223> Xaa = Tyr, Val or absent

<400> 159

Xaa Xaa

1	5	10	15
---	---	----	----

Xaa Xaa Xaa

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln, Leu or Met

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Leu, Tyr, Asp or Gly

<220>

<221

> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asn, Asp, Tyr or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ser, Arg, Asn or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Tyr, Ser or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Pro or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Pro or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Leu, Arg, Ile, Trp or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Thr

<400> 160

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly

<220>

<221> VARIANT

&lt;222&gt; (2)...(2)

&lt;223&gt; Xaa = Phe or Gly

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (3)...(3)

&lt;223&gt; Xaa = Pro, Thr or Ser

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (4)...(4)

&lt;223&gt; Xaa = Phe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (5)...(5)

&lt;223&gt; Xaa = Ser or Asp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (6)...(6)

&lt;223&gt; Xaa = Ser, Arg, Asp, Gly or Ala

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (7)...(7)

&lt;223&gt; Xaa = Tyr or Asp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (8)...(8)

&lt;223&gt; Xaa = Asp, Gly, Ala or Tyr

&lt;400&gt; 161

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Synthetic

<220>

<221>

VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gly, Trp, Ser or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = His, Trp, Tyr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Thr, Asp, Asn or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Ala, Gly or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Gly or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Ala, Asn or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Thr, Lys or Ile

<400> 162

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1                    5

<210> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Gly or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ile, Thr, Val or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asn, Ser, Gly or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa = Asn, Ser or Tyr

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Thr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Asp or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Gly or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Asn or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (10)...(10)

<223> Xaa = Thr or absent

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Xaa = Tyr, Trp or Asp

<400> 163

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1	5	10
---	---	----

<210> 164

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Ala, Lys or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Ala, Thr or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa = Ser

<400> 164

Xaa Xaa Xaa

1

<210> 165

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 165

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys

1

5

10

15