



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0036700
(43) 공개일자 2015년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 47/48561 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7004194
(22) 출원일자(국제) 2013년07월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년02월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/050489
(87) 국제공개번호 WO 2014/014821
국제공개일자 2014년01월23일
(30) 우선권주장
61/673,630 2012년07월19일 미국(US)

(71) 출원인
레드우드 바이오사이언스 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94608 에머리빌 홀리스 스트리트
5703
(72) 발명자
라부카 데이비드
미국 캘리포니아 94708 켄싱턴 스탠포드 애비뉴
202
홀게이트 로버트 조지 에드워드
영국 허트포드셔 에스지8 9비엘 로이스턴 프린세스
뮤즈 96
카 프란시스 죠셉
영국 애버딘셔 에이비23 8더블유유 애버딘
(74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 30 항

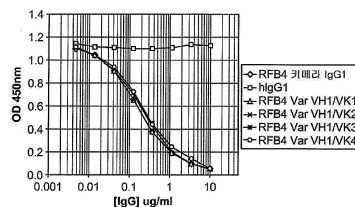
(54) 발명의 명칭 CD22에 대해 특이적인 항체 및 이들의 사용 방법

(57) 요약

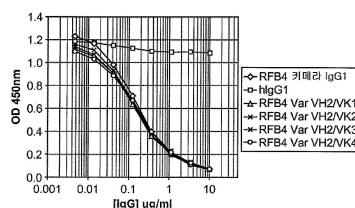
본 개시는 CD22 상에 존재하는 에피토프에 특이적인 항체를 제공한다. 상기 항체는 다양한 치료, 진단 및 모니터링과 같은 응용분야에 유용하며, 상기 응용들 또한 본원에 제공된다. 본 개시의 항-CD22 항체는, 어떤 경우에는, 세포 표면에서 CD22를 발현하는 세포에서의 세포 사멸을 유도한다. 연구대상 항체가 특이적으로 CD22 폴리펩티드에 결합되는데, 여기서 에피토프는 CD22 항원 내부의 아미노산 잔기(예를 들어, CD22 아미노산 서열 중 아미노산 1~847 내부, 아미노산 1~759 내부, 아미노산 1~751 내부, 또는 아미노산 1~670 내부)를 포함한다.

대표도

【도 2a】



【도 2b】



(52) CPC특허분류

C07K 16/2851 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

CD22 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로서,

a) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVKPGGSLX₁LSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAX₂LYLQMX₃SLRAEDTAMYYCARHS
GYGSSYGVLFAIWGQGTLLTVSS(서열번호:1)을 갖는 VH 영역을 포함하는 면역글루블린 중쇄(여기서 X₁은 K 또는 R이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 N 또는 S임); 및

b) 면역글루블린 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 면역글루블린 경쇄가 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT
KVEIK(서열번호:7; VK1)을 포함하는 항체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 면역글루블린 경쇄가 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT
KVEIK(서열번호:8; VK2)를 포함하는 항체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 면역글루블린 경쇄가 아미노산 서열

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT
KVEIK(서열번호:9; VK4)를 포함하는 항체.

청구항 5

CD22 중의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체로서,

a) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSX₁SASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX₂KLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQX₃EDFATYFCQQGNTLPWTFGG
GTKVEIK(서열번호:2)(여기서 X₁은 L(Leu) 또는 V(Val)이고; X₂는 V 또는 P이고; X₃은 Q 또는 P임)를 포함하는
면역글루블린 경쇄; 및

b) 면역글루블린 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 면역글루블린 중쇄가 하기 아미노산 서열:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGY
GSSYGVLFAIWGQGTLLTVSS(서열번호:3; VH3);

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGY
GSSYGVLFAIWGQGTLLTVSS(서열번호:4; VH4);

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHSGY

GSSYGVLFAFWGQGLVTSS(서열번호:5; VH5); 및

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGY
GSSYGVLFAFWGQGLVTSS(서열번호:6; VH6)에서 선택되는 항체.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 경쇄 영역 및 상기 중쇄 영역이 별도의 폴리펩티드에 존재하는 항체.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 경쇄 영역 및 상기 중쇄 영역이 단일 폴리펩티드에 존재하는 항체.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 약 10^{-7} M^{-1} 내지 약 10^{-12} M^{-1} 의 친화도로 상기 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중쇄 영역이 아이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 하나인 항체.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 검출가능하게 표지된 것인 항체.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ 또는 Fab'인 항체.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 공유결합된 비-펩티드 합성 중합체를 포함하는 것인 항체.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합성 중합체가 폴리(에틸렌글리콜) 중합체인 항체.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 공유결합된 지질 또는 지방산 모이어티를 포함하는 것인 항체.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 공유결합된 폴리사카라이드 또는 탄수화물 모이어티를 포함하는 것인 항체.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 조영제를 포함하는 것인 항체.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 친화성 도메인을 포함하는 것인 항체.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 고체 지지체 상에 고정된 것인 항체.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 단일 사슬 Fv(scFv) 항체인 항체.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 scFv가 다합체화(multimerize)된 항체.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 공유결합된 세포독소를 포함하는 것인 항체.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 설파타아제 모티프의 아미노산 서열을 포함하는 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 항체.

청구항 24

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 설파타아제 모티프의 아미노산 서열을 포함하는 불변 영역 아미노산을 포함하고, 여기서 설파타아제 모티프가 변형되어 2-포르밀글리신(FGly) 모이어티를 포함하는 것인 항체.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 항체가 FGly 모이어티를 통해 상기 항체에 공유결합된 이종(heterologous) 모이어티를 포함하는 것인 항체.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 이종 모이어티가 약물, 독소, 검출가능 표지, 수용성 중합체 및 합성 펩티드에서 선택되는 것인 항체.

청구항 27

청구항 1의 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제조합 발현 벡터로, 상기 뉴클레오타이드 서열이 진핵 세포에서 활성인 전사 조절 요소에 작동가능하게 연결된 벡터.

청구항 28

- a) 청구항 1의 항체; 및
- b) 약제학적으로 허용가능한 운반체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

청구항 29에 있어서, 상기 항체가 리포솜에 캡슐화된 약제학적 조성물.

청구항 30

개체의 B 세포 악성종양의 치료 방법으로,

청구항 28의 약제학적 조성물의 유효량을 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원의 상호참조

본원은 2012년 7월 19일에 출원된 미국 임시출원 일련 번호 61/673,630에 우선권 혜택을 주장하고, 상기 출원은

[0001]

[0002]

전체가 본원에 참조로 편입되었다.

[0003] 도입

[0004] Ig 상과(superfamily)에 속하는 혈통-규제(lineage-restricted) B 세포 항원인 CD22는 여러 유형의 악성 B 세포의 표면 상에서 뿐만 아니라 정상적인 성숙 B 림프구 상에서도 발현된다.

[0005] 발명의 요약

[0006] 본원의 개시는 CD22에 특이적인 항체를 제공한다. 상기 항체는 다양한 치료, 진단 및 모니터링과 같은 응용분야에 유용하며, 상기 응용들 또한 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1a 및 도 1b는 키메라 또는 인간화 항-CD22 항체의 중쇄(도 1a) 및 경쇄(도 1b)를 인코딩하는 구성물들(constructs)을 나타낸다.

도 2a~e는 고정된 CD22와의 결합을 위한 바이오티닐화된 양친(parental) 키메라 항-CD22 항체와 인간화 항-CD22 항체의 경쟁을 나타낸 그래프이다.

도 3a~d는 테스트 항체에 대한 건강한 공여체 T 세포 증식 반응을 나타낸다.

도 4는 인간화 항-CD22 항체의 Raji 세포 결합과, Raji 세포에 의한 상기 항체의 내면화(internalization)을 나타낸다.

도 5는 인간 CD22에 대한 변이체 항체의 결합 친화도를 나타낸다.

도 6a~6d는 인간화 항-CD22 변이체들의 응집(aggregation)을 나타낸다.

도 7a 및 7b는 항-CD22 중쇄(도 7a) 및 경쇄(도 7b) 가변 영역의 아미노산 서열을 제공한다.

도 8a~e는 항-CD22 항체 변이체 항체 9~20의 아미노산 서열을 제공한다.

도 9a~c는 CD22 동형체(isoforms)(위에서 아래로: 서열번호:35~38)의 아미노산 서열을 제공한다.

정의

용어 "항체" 및 "면역글루블린"은 항원에 대한 특이적 결합을 보유한 항체, 또는 모든 아이소타입의 면역글루블린, 항체의 단편을 포함하는데, 예를 들면, 비제한적으로 Fab, Fv, scFv 및 Fd 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일사슬 항체 및, 항체의 항원-결합 부위와 비-항체 단백질을 포함하는 융합 단백질 등이다. 항체는 예를 들어, 방사선동위원소, 검출가능 생성물을 생성하는 효소, 형광 단백질 등으로 검출가능하게 표지(label)될 수 있다. 항체는 추가로 특이적 결합쌍의 구성성분, 예컨대, 바이오틴(바이오틴-아비딘 특이적 결합쌍의 구성성분)과 같은 기타 모이어티에 접합(콘주게이트)될 수 있다. 항체는 또한 고체 지지체, 예컨대 비제한적으로 폴리스티렌 플레이트 또는 비드 등에 결합될 수 있다. 또한 상기 용어는 Fab', Fv, F(ab')₂ 또는 항원 특이 결합을 보유하는 기타 항체 단편, 및 단클론 항체를 아우른다. 항체는 1가 또는 2가일 수 있다.

"항체 단편"은 손상되지 않은 항체의 일부분, 예컨대, 손상되지 않은 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(Zapata 등, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); 단일사슬 항체 분자; 및 항체 단편에서 형성된 다중-특이성 항체가 포함된다. 항체의 파파인(Papain) 소화는 이른바 "Fab" 단편이라는 2개의 동일한 항원-결합 단편(각각은 단일 항원-결합 부위를 가짐) 및, 손쉬운 결정화 능력을 반영한 명칭 잔기 "Fc" 단편을 생산한다. 펩신 처리는 2개의 항원 조합 부위가 있고 여전히 항원을 교차결합하는 능력이 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.

"Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 상기 영역은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 엄격한 비-공유결합으로 인해 이루어진 다이머로 구성된다. 바로 이와 같은 구성에서, 각 가변 도메인의 CDRS 3개가 서로 작용하여 VH-VL 다이머의 표면 상의 항원-결합 부위를 규정한다. 종합적으로, CDR 6개가 상기 항체에 항원-결합 특이성을 수여한다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원 특이적 CDR 3개만 포함하는 Fv의 절반)조차, 비록 전체 결합 부위보다 친화도가 더 낮지만, 항원 인식 및 결합 능력을 갖는다.

"Fab" 단편은 또한 상기 경쇄의 불변 도메인 및 상기 중쇄의 제1 불변 도메인(CH₁)을 함유한다. Fab 단편은 중

쇄 CH₁ 도메인의 카르복실 말단에 몇 개의 잔기, 예컨대 항체 힌지 영역에서의 하나 이상의 시스테인의 첨가에 의해 Fab' 단편과는 다르다. Fab'-SH란 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 하나의 티올 유리기를 갖는 Fab'에 대한 본원에서 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 Fab' 단편의 쌍들(이들 사이에 힌지 시스테인이 있음)로 생성되었다. 항체 단편들의 다른 화학적 연합들 역시 알려져 있다.

모든 척추동물종의 항체(면역글로불린)의 "경쇄"는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로, 카파 및 람다라는 분명히 구별되는 두 유형 중 한 유형에 배정될 수 있다. 이들 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린들은 상이한 부류로 배정될 수 있다. 면역글로불린은 5개의 주요 부류(IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)가 있고, 이들 중 여럿은 추가로 하위부류(아이스타입), 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2 등으로 나뉠 수 있다.

"단일사슬 Fv", 즉 "sFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하는데, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일부 구현예에서, Fv 폴리펩티드는 추가로 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 포함하는데, 이로써 sFv가 항원 결합의 원하는 구조를 형성할 수 있다. sFv 대해, *Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)* 참조.

용어 "디아바디"는 항원-결합 부위가 2개인 작은 항체 단편을 가리키고, 상기 단편은 동일 폴리펩티드 사슬(V_H-V_L) 중에 경쇄 가변 도메인(V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 동일 사슬 상의 두 도메인 사이의 결합(pairing)을 가능하게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인들이 다른 사슬의 상보적 도메인들과 쌍을 이루게 되고, 2개의 항원-결합 부위를 형성하게 된다. 디아바디는 예컨대 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)에 좀 더 자세히 기술되었다.

본원에 사용되는 용어 "친화도"는 두 시약의 가역 결합의 평형상수를 가리키고, 해리 상수(K_d)로 표현된다. 친화도는 관련 없는 아미노산 서열들에 대한 항체 친화도보다 최소한 1배, 최소한 2배, 최소한 3배, 최소한 4배, 최소한 5배, 최소한 6배, 최소한 7배, 최소한 8배, 최소한 9배, 최소한 10배, 최소한 20배, 최소한 30배, 최소한 40배, 최소한 50배, 최소한 60배, 최소한 70배, 최소한 80배, 최소한 90배, 최소한 100배, 또는 최소한 1000배 또는 그 이상 크다. 표적 단백질에 대한 항체의 친화도는 예를 들어, 약 100 nanomolar(nM) 내지 약 0.1 nM, 약 100 nM 내지 약 1 picomolar(pM), 또는 약 100 nM 내지 약 1 femtomolar(fM) 또는 그 이상일 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "결합력(avidity)"은 둘 이상의 시약의 복합체의 회색 후 해리에 대한 저항을 가리킨다. 용어 "면역반응성" 및 "우선적으로 결합하는"은 본원에서 항체 및/또는 항원-결합 단편과 관련하여 상호교환되어 사용된다.

용어 "결합"은, 예를 들어, 공유결합, 정전기, 소수성 및 이온 및/또는 수소 결합 상호작용, 예컨대 염 브릿지 및 물 브릿지와 같은 상호작용으로 인한, 두 분자 사이의 직접적인 연계를 가리킨다. 연구대상 항-CD22는 CD-22 폴리펩티드 내부의 에피토프(epitope)에 특이적으로 결합된다. 비특이적 결합은 친화도가 약 10⁻⁷ M 미만인 결합, 예를 들어, 친화도가 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M 등인 결합을 가리킨다.

본원에 사용되는 용어 "CDR", 즉 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두의 가변 영역 내에서 발견되는 비근접(non-contiguous) 항원 결합 부위를 의미하는 것이다. CDRs는 카밧 등, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); 카밧 등, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest"(1991); by 코티아 등, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); 및 맥칼럼 등, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)에 기술되었고, 여기서 정의들은 서로 비교했을 때, 아미노산 잔기들의 중첩부위 또는 하위세트를 포함한다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 접합된(grafted) 항체 또는 이들의 변이체의 CDR를 가리키는 모든 정의의 활용은 본원에서 정의되고 사용되는 용어의 범위 내에 있어야 한다. 상기 참조문헌들 각각에 의해 정의된 CDR를 아우르는 아미노산 잔기는 비교를 위해 하기 표 1에 나타내었다.

표 1: CDR 정의

	카뎃 ¹	코티아 ²	맥칼럼 ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96
¹ 잔기 번호 매기기(numbering)은 상기 카뎃 등의 명명법을 따른다. ² 잔기 번호 매기기는 상기 코티아 등의 명명법을 따른다. ³ 잔기 번호 매기기는 상기 맥칼럼 등의 명명법을 따른다.			

본원에 사용되는 용어 "골격 구조"는, 항체 가변 영역에 관해 사용될 경우, 항체의 가변 영역 내 CDR 영역 밖의 모든 아미노산 잔기를 의미하는 것으로 의도된다. 가변 영역 골격 구조는 일반적으로 그 길이가 약 100 내지 120 아미노산인 불연속 아미노산 서열인데, 그러나 CDR 밖에 있는 아미노산들만을 참조하는 것이다. 본원에 사용되는 용어 "골격 구조 영역"은 CDR에 의해 분리되는 골격 구조의 각 도메인을 의미하는 것이다.

"단리된" 항체는 식별되어 분리되고 그리고/또는 그것의 자연환경에서 회수된 것이다. 그것의 자연 환경의 오염 성분들은 상기 항체의 진단 또는 치료를 위한 사용을 방해하는 금속들로, 예를 들면 효소, 호르몬 및 기타 단백질계 또는 비단백질계 용질 등이다. 일부 구현예에서, 항체는 (1) Lowry 방법에 의해 측정되는 바와 같이, 항체의 중량을 기준으로, 90% 초과, 95% 초과, 또는 98% 초과, 예컨대 99 중량% 초과로 정제되고, (2) 회전컵(spinning cup) 배열 결정장치를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기를 최소한 15개 얻는 데 충분할 정도로, 또는 (3) Coomassie 블루 또는 실버 염색을 사용하여 환원 조건 또는 비환원 조건 하에서 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 균질성을 갖도록 정제될 것이다. 단리된 항체에는 항체의 자연 환경의 최소한 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에 재조합 세포 내부의 제 위치의 항체가 포함된다. 어떤 경우, 최소한 1회의 정제 단계를 거쳐 단리된 항체가 제조된다.

본원에 사용되는 용어 "치료" 또는 "치료하다" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 가리킨다. 상기 효과는 완전히 또는 부분적으로 질병을 또는 그것의 증상을 방지한다는 관점에서 예방적일 수 있고, 그리고/또는 질병의 부분적 또는 완전한 치유 및/또는 상기 질병에서 기인할 수 있는 부작용이라는 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에서 사용되는 "치료"는 포유류, 특히 인간의 질병의 모든 치료를 아우르는데, (a) 질병에 걸릴 성향이 있으나 아직 발병했다고 진단 내려지지 않은 개체에게서 질병의 발생을 예방하고; (b) 질병을 억제하고, 즉, 발병을 저지하고; 그리고 (c) 질병을 완화시키고, 즉, 질병의 퇴보를 야기하는 것을 포함한다.

본원에서 상호교환하여 사용되는 용어들 "개인", "개체", "숙주" 및 "환자"는 포유류, 예컨대 비제한적으로, 쥐과(랫트, 마우스), 인간-제의 유인원, 인간, 개, 고양이과, 발굽동물(예를 들어, 말, 소, 양, 돼지, 염소) 등을 가리킨다.

"치료에 효과적인 양", 즉 "유효량"은 질병 치료를 위해 포유류 또는 기타 개체에 투여되었을 때, 질병의 치료를 야기하기에 충분한 연구대상 항-CD22 Ab의 양을 가리킨다. "치료에 효과적인 양"은 치료 받을 개체의 항-CD22 Ab, 질병 및 그것의 중증도 및 연령, 체중 등에 따라 달라진다.

"생체 시료"는 개인에게서 획득되는 다양한 시료 유형을 아우르며, 진단 또는 모니터링 검사에 사용될 수 있다. 상기 정의는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액체 시료, 생검 시료와 같은 고체 조직 시료 또는 조직 배양액, 또는 그로부터 유도된 세포 및 그들의 후손을 아우른다. 상기 정의에는 또한 이들의 취득 후, 시약 처리, 용해화, 또는 특정 성분들, 예컨대 폴리뉴클레오티드의 농축(enrichment)과 같은 모든 방법으로 조작된 시료들 또한 포함된다. 용어 "생체 시료"는 임상 시료를 아우르고, 또한 배양액, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈청, 장혈, 생물학적 액체 및 조직 시료 중의 세포를 포함한다. 어떤 경우에는, 생체 시료가 B 세포를 포함한다.

본 발명이 추가로 기술되기 전에, 본 발명은 기술된 특정 구현예에 제한되지 않으며, 물론 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 또한 본원에 사용되는 용어들은 특정 구현예들을 기술하기 위한 것일뿐, 제한적인 목적은 없고, 본 발명의 범위는 청구항에 의해서만 제한됨이 이해되어야 한다.

값의 범위가 제공될 경우, 문맥에 달리 정의되지 않는 한, 범위의 최대치에서 최소치까지의 각각의 사이값(최소

한계의 단위의 10분의 1로)과 언급된 범위에서의 모든 기타 언급된 값 또는 사이값은 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이와 같이 적은 범위의 최대치와 최소치는 독립적으로 더 적은 범위에 포함될 수 있고, 또한 본 발명 안에 포함되고, 언급된 범위에서 구체적으로 제외된 한계치에 해당한다. 언급된 범위가 최대치 및 최고치 중 하나 또는 모두를 포함할 경우, 그와 같이 포함된 최대치 및 최고치 중 하나 또는 모두를 제외한 범위 역시 본 발명에 포함된다.

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적/과학적 용어들은 본 발명이 속한 당해기술의 숙련가들에게 일반적으로 이해되는 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 또는 동일한 모든 방법 및 재료가 또한 본 발명의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 재료가 기술되어 있다. 본원에서 언급된 모든 문헌은 본원에 참조로 편입되어, 상기 문헌들이 언급된 것과 관련된 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술한다.

본원과 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥에서 분명하게 달리 지시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체"는 그와 같은 항체의 다수를 포함하고, "CDR"에 대한 언급은 하나 이상의 CDR 또는 당해기술의 숙련가에 알려진 그것의 등가물들을 포함한다는 것을 유의해야 한다. 더 나아가, 청구항은 임의의 선택 요소들은 모두 배제하고 작성되었음을 유의해야 한다. 이와 같이, 본 서술은 청구항 요소들의 설명과 연관된 "오직", "단지"등과 같은 배타적 용어의 사용, 또는 "부정적" 제한의 사용에 대한 선행된 근거 역할을 한다.

본원에서 논의되는 문헌들은 본원의 출원 일자에 앞서 그들이 개시되었음을 알리기 위해 제공된다. 본원의 내용 중 어떤 것도 본 발명이 이전 발명으로 인해 상기 문헌들보다 선행할 자격이 없다는 인정으로 해석되어서는 안 된다. 추가로, 제공되는 문헌의 일자는 실제 출판 일자와 다를 수 있어서 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있다.

상세한 설명

본 개시는 CD22에 특이적인 항체를 제공한다. 상기 항체는 치료, 진단 및 모니터링과 같은 다양한 응용분야에 유용한데, 상기 응용 또한 제공된다.

항체

연구대상 항체가 특이적으로 CD22 폴리펩티드에 결합되는데, 여기서 에피토프는 CD22 항원 내부의 아미노산 잔기(예를 들어, 도 9a~c에 나타낸 CD22 아미노산 서열 중 아미노산 1~847 내부, 아미노산 1~759 내부, 아미노산 1~751 내부, 또는 아미노산 1~670 내부)를 포함한다.

CD22 에피토프는 도 9a~c에 묘사된 근접 구간(contiguous stretch)이 약 500 아미노산 내지 약 670 아미노산인 인간 CD22 동형체 4 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성이 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 85%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%, 최소한 약 98%, 최소한 약 99% 또는 100%인 폴리펩티드에 의해 형성될 수 있다. CD22 에피토프는 도 9a~c에 묘사된 근접 구간이 약 500 아미노산 내지 약 751 아미노산인 인간 CD22 동형체 3 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성이 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 85%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%, 최소한 약 98%, 최소한 약 99% 또는 100%인 폴리펩티드에 의해 형성될 수 있다. CD22 에피토프는 도 9a~c에 묘사된 근접 구간이 약 500 아미노산 내지 약 759 아미노산인 인간 CD22 동형체 2 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성이 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 85%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%, 최소한 약 98%, 최소한 약 99% 또는 100%인 폴리펩티드에 의해 형성될 수 있다. CD22 에피토프는 도 9a~c에 묘사된 근접 구간이 약 500 아미노산 내지 약 847 아미노산인 인간 CD22 동형체 1 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성이 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 85%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%, 최소한 약 98%, 최소한 약 99% 또는 100%인 폴리펩티드에 의해 형성될 수 있다.

연구대상 항체는 CD22와의 높은 친화도 결합을 보여준다. 예를 들어, 연구대상 항체는 CD22에 최소한 약 10^{-7} M, 최소한 약 10^{-8} M, 최소한 약 10^{-9} M, 최소한 약 10^{-10} M, 최소한 약 10^{-11} M 또는 최소한 약 10^{-12} M 또는 10^{-12} M보다 큰 친화도로 결합된다. 연구대상 항체는 CD22 상에 존재하는 에피토프에 약 10^{-7} M 내지 약 10^{-8} M, 약 10^{-8} M 내지 약 10^{-9} M, 약 10^{-9} M 내지 약 10^{-10} M, 약 10^{-10} M 내지 약 10^{-11} M 또는 약 10^{-11} M 내지 약 10^{-12} M 또는 10^{-12} M보다 큰 친화도로 결합된다.

본 개시의 항-CD22 항체는, 어떤 경우에는, 세포 표면에서 CD22를 발현하는 세포에서의 세포 사멸을 유도한다.

"CD22 항원" 또는 "CD22 폴리펩티드"는 도 9a~c에 묘사된 근접 구간이 약 500 아미노산(aa) 내지 약 847 aa (동형체 1), 내지 약 759 aa(동형체 2), 내지 약 751 aa (동형체 3), 또는 내지 약 670 aa(동형체 4)인 CD22 동형체 1, 2, 3 또는 4 아미노산 서열과 아미노산 서열 동일성이 최소한 약 75%, 최소한 약 80%, 최소한 약 90%, 최소한 약 95%, 최소한 약 98%, 최소한 약 99% 또는 100%인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

용어 "항체"는 에피토프에 결합할 수 있는 하나 이상(예를 들어, 하나 또는 둘)의 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 하나 이상(예를 들어, 하나 또는 둘)의 경쇄 가변 영역(VL), 또는 이들의 하위단편을 포함하는 단백질을 가리킨다. VH 및 VL 영역은 다시 "상보성 결정 영역(CDR)"이라고 하는 과변이(hypervariability) 영역으로 세분되고, "골격 구조 영역 (FR)"이라고 하는 좀 더 보존적인 영역들이 사이사이에 섞여 있을 수 있다. FR 및 CDR의 크기는 정확히 규정된 바 있다(카밋, 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; 코티아 등 (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 참조). VH는 하기 순서로 N-말단에서 C-말단 사이에 배열된 CDR 3개 및 FR 4개를 포함할 수 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 이와 유사하게, VL은 하기 순서로 N-말단에서 C-말단 사이에 CDR 3개 및 FR 4개를 포함할 수 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

항체의 VH 또는 VL 사슬은 추가로 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 전부 또는 일부를 포함할 수 있고, 그럼으로써 각각 중쇄 또는 경쇄 면역글루블린 사슬을 형성할 수 있다. 한 구현예에서, 항체는 중쇄 2개 및 경쇄 2개로 이루어진 사합체(tetramer)로, 여기서 상기 중쇄 및 경쇄는 예를 들어 이황화 결합(disulphide bonds)에 의해 상호연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 3개 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 이루어졌다. 경쇄 불변 영역은 1개 도메인, CL으로 이루어졌다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 영역을 포함한다. 항체의 불변 영역은 전형적으로 숙주 조직 및, 면역체계의 다양한 세포와 보체계(complement system)의 제1 성분을 비롯한 인자들과의 항체의 결합을 매개한다. 용어 "항체" 유형은 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM 및 이들의 하위유형의 손상되지 않은 면역글루블린을 포함한다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 IgG 아이소타입이다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 IgG1 아이소타입이다.

본원에 사용되는 용어 "면역글루블린"은 면역글루블린 유전자에 의해 인코딩되는 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 가리킨다. 인식된 인간 면역글루블린 유전자는 카파, 람다, 알파(IgA1 및 IgA2), 감마(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 엡실론 및 muconstant 영역 유전자들; 및 수많은 면역글루블린 가변 영역 유전자들을 포함한다. 전장(Full-length) 면역글루블린 경쇄(약 25 kD 또는 214 아미노산)는 N-말단의 가변 영역 유전자(약 110 아미노산) 및 C-말단의 카파 또는 람다 불변 영역 유전자에 의해 인코딩된다. 전장 면역글루블린 중쇄(약 50 kD 또는 446 아미노산)는 N-말단의 가변 영역 유전자(약 116 아미노산) 및 C-말단의 기타 상기 불변 영역 유전자들 중 하나, 예컨대 감마(약 330 아미노산 인코딩)에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 전장 면역글루블린 중쇄 및 전장 면역글루블린 경쇄를 포함한다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 전장 면역글루블린 중쇄 및 전장 면역글루블린 경쇄를 포함하지 않고, 대신 전장 면역글루블린 중쇄 및 전장 면역글루블린 경쇄의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 단편은 별개의 폴리펩티드 사슬들 상에 함유되어 있고; 다른 구현예에서는, 항원-결합 단편이 단일 폴리펩티드 사슬 내부에 함유되어 있다. 용어 "항원-결합 단편"은 위에서 기술된 바와 같이, 전장 항체 중 CD22에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 단편을 가리킨다. 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편(VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편); (ii) F(ab')₂ 단편(힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결되는 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편); (iii) Fd 단편(VH 및 CH1 도메인으로 구성); (iv) Fv 단편(항체의 단일 팔(arm)의 VH 및 VL 도메인으로 구성); (v) dAb 단편(VH 도메인으로 구성); (vi) 단리된 CDR; (vii) 단일 사슬 Fv(scFv) (항체의 단일 팔의 VH 및 VL 도메인으로 구성되고, 상기 도메인들은 재조합 방법을 사용하는 합성 링커에 의해 연결되어 VH 및 VL 도메인이 한 쌍을 이루으로써 1가 분자를 형성); (viii) 디아바디(2개의 scFvs로 구성되고, 여기서 VH 및 VL 도메인이 연결되지만 쌍을 이루어 1가 분자를 형성하지는 않으며; 하나의 scFv의 VH가 다른 하나의 scFv의 VL 도메인과 쌍을 이루어 2가 분자를 형성); (ix) 이중-특이적(bi-specific) 항체(최소한 2개의 항원 결합 영역으로 구성되고, 각 영역이 서로 다른 에피토프에 결합함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 단편은 Fab 단편이다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 단편은 단일사슬 항체(scFv)이다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 재조합 또는 변형 항체로, 예를 들어, 키메라, 인간화, 탈면역화, 체외 생성 항체 등이다. 본원에서 사용되는 용어 "재조합" 또는 "변형" 항체는 재조합 방법에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 항체를 포함하는 것으로 의도되는데, 예컨대 (i) 숙주 세포에 형질주입된 재조합 발현 벡터를 사용

하여 발현된 항체; (ii) 재조합형, 조합 항체 라이브러리에서 단리된 항체; (iii) 인간 면역글루불린 유전자로 형질전환된 동물(예컨대, 마우스)에서 단리된 항체; 또는 (iv) 인간 면역글루불린 유전자 서열들의 기타 DNA 서열로 이어붙이기(splicing)를 수반하는 기타 다른 방법들에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체 등이다. 이와 같은 재조합 항체는 인간화, CDR 접합, 키메라, 탈면역화 및 체외 생성 항체를 포함하고; 임의로 인간 생식계열 면역글루불린 서열에서 유도된 불변 영역을 포함할 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 a) 아미노산 서열 EVQLVESGGGLVPGGSLX¹LSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAX²LYLQMX³SLRAEDTAMYYCARHS GYSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS(서열번호:1)를 갖는 VH 영역을 포함하는 중쇄(X¹은 K(Lys) 또는 R(Arg)이고; X²는 S(Ser) 또는 T(Thr)이고; 그리고 X³은 N(Asn) 또는 S(Ser)임); 및 b) 면역글루불린 경쇄를 포함한다.

경쇄는 수득된 항체가 CD22에 특이적으로 결합하는 한, 모든 적절한 V_L 아미노산 서열을 가질 수 있다.

예시적 V_L 아미노산 서열은 하기를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT KVEIK(서열번호:7; VK1);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT KVEIK(서열번호:8; VK2); 및

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGT KVEIK(서열번호:9; VK4).

따라서, 예를 들어, 연구대상 항-CD22 항체가 하기를 포함할 수 있다: a) 서열번호:1)에 명시된 아미노산 서열을 갖는 VH 영역을 포함하는 중쇄; 및 VK1의 VL 영역을 포함하는 경쇄. 다른 경우에는, 연구대상 항-CD22 항체가 하기를 포함할 수 있다: a) 서열번호:1)에 명시된 아미노산 서열을 갖는 VH 영역을 포함하는 중쇄; 및 VK2의 VL 영역을 포함하는 경쇄. 또 다른 경우에는, 연구대상 항-CD22 항체가 하기를 포함할 수 있다: a) 서열번호:1)에 명시된 아미노산 서열을 갖는 VH 영역을 포함하는 중쇄; 및 VK4의 VL 영역을 포함하는 경쇄.

일부 경우에는, 연구대상 항-CD22 항체가 하기를 포함한다: a) 아미노산 서열 DIQMTQSPSSX¹SASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAX²KLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQX³EDFATYFCQQGNTLPWTFGG GTKVEIK(서열번호:2)을 포함하는 면역글루불린 경쇄(X¹은 L (Leu) 또는 V(Val)이고; X²는 V(Val) 또는 P(Pro)이고; X³은 Q(Gln) 또는 P(Pro)임); 및 b) 면역글루불린 중쇄. 중쇄는 하기에서 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다:

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAXNTLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGY GSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS(서열번호:3; VH3);

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAXNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGY GSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS(서열번호:4; VH4);

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAXNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGY GSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS(서열번호:5; VH5); 및

EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAXNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGY GSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS(서열번호:6; VH6).

연구대상 항체에 사용하기 적합한 링커는 "신축적 링커"를 포함한다. 링커 분자는, 존재할 경우, 일반적으로 연결된 영역들 사이에 어느 정도의 신축적 움직임을 허용하기에 충분한 길이이다. 링커 분자는 일반적으로 약 6~50개 원자 길이이다. 링커 분자는 또한 예를 들어, 아릴 아세틸렌, 2~10개의 단량체 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이염기산, 아미노산 또는 이들의 조합일 수 있다. 폴리펩티드에 결합할 수 있는 다른 링커 분자가 본 개시의 관점에서 사용될 수 있다.

연구대상 항체는 "인간화"될 수 있다. 용어 "인간화 항체"는 실질적으로 인간 항체 사슬(수용체 면역글루불린 또는 항체라 일컬음)의 가변 영역 골격 구조 잔기를 포함하는 최소한 하나의 사슬과 실질적으로 마우스 항체(공

여체 면역글루블린 또는 항체라 일컬음)의 최소한 하나의 CDR을 포함하는 항체를 가리킨다. 참조, Queen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029 10033 (1989), U.S. Pat. No. 5,530,101, U.S. Pat. No. 5,585,089, U.S. Pat. No. 5,693,761, WO 90/07861 및 U.S. Pat. No. 5,225,539. 불변 영역(들)은, 존재하는 경우, 또한 대체로 또는 전반적으로 인간 면역글루블린에서 유래될 수 있다. 인간화 항체의 제조방법이 당해기술에 알려져 있다. 예를 들어, U.S. Patent No. 7,256,273 참조.

인간 가변 도메인 골격 구조로의 마우스 CDR 치환은 그들의 올바른 공간적 방위(spatial orientation)의 보유를 야기할 수 있는데, 예를 들어, 인간 가변 도메인 골격 구조는 CDRs가 유래된 마우스 골격 구조와 동일하거나 또는 유사한 형태를 채택한다. 이것은 CDRs가 유래된 쥐과 가변 골격 구조 도메인과 서열 동일성이 높은 골격 구조 서열을 갖는 인간 항체에서 인간 가변 도메인을 획득함으로써 달성될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 가변 골격 구조 영역은 동일한 또는 상이한 인간 항체 서열들에서 유래될 수 있다. 인간 항체 서열은 자연발생적인 인간 항체의 서열일 수 있고, 또는 여러 인간 항체들의 합의(consensus) 서열일 수 있다. Kettleborough 등, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger 등, Protein Engineering 6:971 (1993) 참조.

쥐과 공여체 면역글루블린과 적합한 인간 수용체 면역글루블린의 상보성 결정 영역을 식별한 후, 다음 단계는 이와 같은 성분들의 잔기들이, 존재할 경우, 수득되는 인간화 항체의 특성을 최적화하기 위해 치환되어야 하는 지 여부를 결정해야 한다. 일반적으로, 인간 아미노산 잔기를 쥐과로 치환하는 것은 최소화되어야 하는데, 그 이유는 쥐과 잔기의 도입이 인간에게서 상기 항체가 인간-항-마우스-항체(HAMA) 반응을 야기할 위험이 증가하기 때문이다. 당해기술에서 인정받은 면역 반응 결정 방법은 특정 환자에게서 또는 임상 실험 중에 HAMA 반응을 모니터링하기 위해 수행될 수 있다. 인간화 항체를 투여받은 환자에게 초기에 그리고 상기 치료의 투여 내내 면역 원성 평가가 시행될 수 있다. HAMA 반응은, 당해기술의 숙련자에게 잘 알려진 방법, 예컨대 표면 플라즈몬 공명 기술(BIACORE) 및/또는 고체상 ELISA 분석을 사용하여, 상기 환자의 혈청 시료에서 예를 들어 인간화 치료 시약에 대한 항체를 검출함으로써, 측정된다. 여러 구현예에서, 연구대상 인간화 항체는 실질적으로 인간 개체에서 HAMA 반응을 야기하지 않는다.

CDR 형태 및/또는 항원 결합에 미칠 수 있는 영향을 근거로, 인간 가변 영역 골격 구조 잔기의 특정 아미노산들이 치환을 위해 선택된다. 쥐과 CDR 영역과 인간 가변 골격 구조 영역의 자연스럽지 않은 병치는 결과적으로 자연스럽지 않은 형태al re규조ts를 야기할 수 있고, 이것은 특정 아미노산 잔기의 치환에 의해 교정되지않는 한, 결합 친화도의 손실을 가져온다.

치환을 위한 아미노산 잔기의 선택은, 부분적으로 컴퓨터 모형화에 의해 결정될 수 있다. 면역글루블린 분자의 3차원 영상을 생성하기 위한 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어는 당해기술에 알려져 있다. 일반적으로, 분자 모형은 면역글루블린 사슬 또는 이것의 도메인의 풀린(solved) 구조에서 시작하여 생성된다. 모형화된 사슬들은 풀린 3차원 구조의 사슬 또는 도메인과의 아미노산 서열 유사성에 대해 비교되고, 가장 높은 서열 유사성을 보이는 사슬 또는 도메인이 분자 모형의 구성을 위한 시작점으로 선택된다. 최소한 50% 서열 동일성을 공유하는 사슬 또는 도메인이 모형화를 위해 선택되고, 바람직하기는 최소한 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 서열 동일성을 공유하는 것들이 모형화를 위해 선택된다. 풀린 시작 구조물들은 변형되어 모형화되는 면역글루블린 사슬 또는 도메인의 실제 아미노산과 시작 구조물의 그것들과의 차이점을 허용한다. 변형 구조물은 그 후 복합 면역글루블린으로 조립된다. 마지막으로, 에너지 최소화화에 의해, 그리고 모든 원자가 서로 적당한 거리 내에 존재하며 결합 길이 및 결합 각도가 화학적으로 허용가능한 한계 내에 있음을 입증함으로써 상기 모형이 개선된다.

CDR 및 골격 구조 영역은 카밧, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 및 1991)에 의해 정의된 바와 같다. 대안적인 구조적 정의가 코티아 등, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Nature 342:878 (1989); 및 J. Mol. Biol. 186:651 (1989)에 의해 제안된 바 있다(종합적으로"코티아"라 일컬음). 상기의 카밧에 의해 정의된 골격 구조 잔기가 상기 코티아에 의해 정의된 구조적 순환(loop) 잔기를 구성할 경우, 마우스 항체에 존재하는 아미노산이 인간화 항체로의 치환을 위해 선택될 수 있다. "CDR 영역에 근접한" 잔기는 인간화 면역글루블린 사슬의 주요 서열 중 하나 이상의 CDR에 아주 근접한 위치, 예컨대 카밧의 정의한 CDR 또는 코티아가 정의한 CDR에 아주 근접한 위치에 있는 아미노산 잔기를 포함한다(예를 들어, 코티아 및 Lesk JMB 196:901(1987) 참조). 이와 같은 아미노산은 특히 CDRs 중의 아미노산과 상호 작용할 가능성이 있고, 수용체에서 선택된 경우, 공여체 CDRs를 왜곡시키고 친화도를 감소시킬 가능성이 있다. 게다가, 근접한 아미노산은 직접적으로 항원과 상호작용할 수 있고(Amit 등, Science, 233:747 (1986)), 공여체에서 이와 같은 아미노산을 선택하는 것은 원 항체에 친화도를 제공하는 모든 항원 접촉을 유지시키는 데 바람직할 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 scFv 다합체(multimer)를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 scFv 이합체(예컨대, 2개의 직렬(tandem) scFv(scFv₂)를 포함), scFv 삼합체(예컨대, 3개의 직렬 scFv(scFv₃)를 포함), scFv 사합체(예컨대, 4개의 직렬 scFv(scFv₄)를 포함) 또는 4개보다 많은 scFv(직렬 배열)의 다합체이다. scFv 단량체는 길이가 약 2 아미노산 내지 약 10 아미노산인, 예를 들어, 2 aa, 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa 또는 10 aa인 링커를 통해 나란히 연결될 수 있다. 적절한 링커는 예를 들어, (Gly)_x를 포함하고, 여기서 x는 2에서 10까지의 정수이다. 다른 적절한 링커는 상기 논의된 것들이다. 일부 구현예에서, 연구대상 scFv 다합체 중의 scFv 단량체 각각은, 상기와 같이, 인간화되었다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 면역글로불린의 불변 영역(예컨대, Fc 영역)을 포함한다. Fc 영역은, 존재할 경우, 인간 Fc 영역일 수 있다. 불변 영역이 존재할 경우, 상기 항체는 경쇄 및 중쇄 불변 영역을 모두 함유할 수 있다. 적절한 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함한다. 본원에 기술된 항체는 항체 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 비롯한 모든 유형의 불변 영역 및, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한 모든 아이소타입을 갖는 항체를 포함한다. 적절한 중쇄 Fc 영역의 예는 인간 아이소타입 IgG1 Fc이다. 경쇄 불변 영역은 램다 또는 카파일 수 있다. 연구대상 항체(예를 들어, 연구대상 인간화 항체)는 둘 이상의 부류 또는 아이소타입의 서열을 포함할 수 있다. 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 함유하는 사합체로, 별개의 중쇄와 경쇄로, Fab, Fab' F(ab')₂ 및 Fv로, 또는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 스페이스(spacer)를 통해 연결된 단일 사슬 항체로 발현될 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 카르복실 말단에 티올(-SH) 유리기를 포함하는데, 여기서 티올 유리기가 사용되어 상기 항체를 두번째 폴리펩티드(예를 들어, 연구대상 항체를 비롯해, 또 다른 항체), 골격(scaffold), 운반체 등에 부착시킬 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 하나 이상의 비-자연발생적인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 비자연적으로 인코딩된 아미노산은 카보닐 기, 아세틸 기, 아미노옥시 기, 히드라진 기, 히드라자이드 기, 세미카르바자이드 기, 아자이드 기 또는 알킨 기를 포함한다. 적절한 비-자연발생적인 아미노산에 대해 U.S. Patent No. 7,632,924 참조. 비-자연발생적인 아미노산의 포함은 중합체, 두번째 폴리펩티드, 골격 등으로의 연결을 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 수용성 중합체에 연결된 연구대상 항체는 카보닐 기를 포함하는 수용성 중합체(예를 들어, PEG)를, 아미노옥시, 히드라진, 히드라자이드 또는 세미카르바자이드 기를 포함하는 비자연적으로 인코딩된 아미노산을 포함하는 연구대상 항체에 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 또 다른 예로, 수용성 중합체에 연결된 연구대상 항체는 알킨-함유 아미노산을 포함하는 연구대상 항체를 아자이드 모이어티를 포함하는 수용성 중합체(예를 들어, PEG)와 반응시킴으로써 제조될 수 있다; 일부 구현예에서, 아자이드 또는 알킨 기가 아미드 연결을 통해 PEG 분자에 연결된다. "비자연적으로 인코딩된 아미노산"은 20 일반 아미노산 또는 피로라이신 또는 셀레노시스테인 중 하나가 아닌 아미노산을 가리킨다. 용어 "비자연적으로 인코딩된 아미노산"과 동일어로 사용될 수 있는 다른 용어들은 "비자연적 아미노산", "부자연적 아미노산", "비-자연발생 아미노산" 및 이들의 다양한 하이픈 연결 버전들이다. 용어 "비자연적으로 인코딩된 아미노산"은 또한, 비제한적으로, 자연적으로 인코딩된 아미노산(비제한적으로 20 일반 아미노산 또는 피로라이신 및 셀레노시스테인)의 변형(예컨대, 번역 후 변형)에 의해 발생하나, 그 자체로는 번역 복합체(translation complex)에 의해 성장하는 폴리펩티드 사슬에 자연적으로 병합되지 않는 아미노산을 포함한다. 이와 같은 비자연발생 아미노산의 예에는, 비제한적으로, N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포티로신이 포함된다.

본 개시는 또한 관심 대상인 부착된 모이어티, 예컨대, 검출가능 표지, 약물, 반감기(half-life) 연장 모이어티 등을 갖는 항-CD22 항체를 제공한다. 항체의 변형은 다양한 합성 및/또는 재조합 방법에 의해 달성될 수 있다. 항체에 부착된 모이어티(들)은 하나 이상의 광범위한 기능 또는 특성을 제공할 수 있다. 예시적 모이어티에는 검출가능 표지(예를 들어, 염색 표지(예컨대, 발색단, 형광소), 생물물리학적 탐지(스핀 표지, 핵자기공명(NMR) 탐지법), Förster 공명 에너지 전달(FRET)-유형표지(예를 들어, FRET 쌍 중 최소한 한 성분, 예컨대, 형광소/소광제 쌍 중의 최소한 한 성분), 생체발광 공명 에너지 전달(BRET)-유형 표지(예를 들어, BRET 쌍 중의 최소한 한 성분), 면역검출가능 태그(예를 들어, FLAG, His(6) 등); 수용성 중합체(예를 들어, 페길레이션(PEGylation)); 정제 태그(예를 들어, 친화도 크로마토그래피에 의한 단리를 촉진하기 위해(예를 들어, FLAG 에피토프의 부착)); 세포막 위치추적(membrane localization) 도메인(예를 들어, 지질 또는 글리코포스파티딜리노시톨(GPI)-유형 앵커(anchor)); 고정 태그(예를 들어, 표면에 폴리펩티드의 부착을 촉진하기 위해, 선택적 부착 포함); 약물(예를 들어, 약물 적중을 촉진하기 위해, 예를 들어, 항체에 약물의 부착을 통해) 등이 포함된다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 중합체(예를 들어, 폴리펩티드가 아닌 중합체)에 연결(예컨대, 공유결합)된다. 적절한 중합체에는, 예를 들어, 생체적합(biocompatible) 중합체 및 수용성 생체적합 중합체가 포함된다. 적절한 중합체에는 합성 중합체 및 자연발생 중합체가 포함된다. 적절한 중합체에는, 예를 들어, 치환된 또는 치환되지 않은, 선형 또는 분지형 사슬 폴리알킬렌, 폴리알케닐렌 또는 폴리옥시알킬렌 중합체, 또는 분지형 또는 비분지형 폴리사카라이드(예컨대, 동형- 또는 이형-폴리사카라이드)가 포함된다. 적절한 중합체에는, 예를 들어, 에틸렌 비닐 알코올 공중합체(보통 일반명 EVOH 또는 상품명 EVAL로 알려짐); 폴리부틸메타크릴레이트; 폴리(히드록시발러레이트); 폴리(L-락트산); 폴리카프롤락톤; 폴리(락티드-co-글리콜라이드)글리콜라이드-록시부틸레이트; 폴리(히드록시부틸레이트-co-발러레이트); 폴리디옥사논; 폴리오르소에스테르; 폴리산 무수물; 폴리(글리콜산); 폴리(D,L-락트산); 폴리(글리콜산-co-트리메틸렌 카르보네이트); 폴리포스포에스테르; 폴리포스포에스테르 우레탄; 폴리(아미노산); 시아노아크릴레이트; 폴리(트리메틸렌 카르보네이트); 폴리(이미노카르보네이트); 코폴리(에테르-에스테르)(예를 들어, 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(락트산))(PEO/PLA) 공중합체; 폴리알킬렌 옥살레이트; 폴리포스포젠; 피브린, 피브리노겐, 셀룰로오스, 전분, 콜라겐 및 히아루론산과 같은 생체 분자; 폴리우레탄; 실리콘; 폴리에스테르; 폴리올레핀; 폴리이소부틸렌 및 에틸렌-알파올레핀 공중합체; 아크릴 중합체 및 공중합체; 염화폴리비닐과 같은 비닐 할라이드 중합체 및 공중합체; 폴리비닐 메틸에테르와 같은 폴리비닐 에테르; 플루오르화폴리비닐리덴 및 염화폴리비닐리덴과 같은 폴리비닐리덴 할라이드; 폴리아크릴로니트릴; 폴리비닐 케톤; 폴리스티렌과 같은 폴리비닐 방향족; 폴리비닐 아세테이트와 같은 폴리비닐 에스테르; 비닐 단량체들 간의 공중합체 및, 올레핀과의 공중합체(예컨대, 에틸렌-메틸 메타크릴레이트 공중합체, 아크릴로니트릴-스티렌 공중합체, ABS 수지 및 에틸렌-비닐 아세테이트 공중합체; 폴리아미드(예컨대, 나일론 66 및 폴리카프로락톤); 알키드 수지; 폴리카르보네이트; 폴리옥시메틸렌; 폴리이미드; 폴리에테르; 에폭시 수지; 폴리우레탄; 레이온; 레이온-트리아세테이트; 셀룰로오스; 셀룰로오스 아세테이트; 셀룰로오스 부틸레이트; 셀룰로오스 아세테이트 부틸레이트; 셀로판; 셀룰로오스 나이트레이트; 셀룰로오스 프로피오네이트; 셀룰로오스 에테르; 무정형 테플론; 폴리(에틸렌 글리콜); 및 카르복시메틸 셀룰로오스가 포함된다.

적절한 합성 중합체에는 치환되지 않은 그리고 치환된, 선형 또는 분지형 사슬 폴리(에틸렌글리콜), 폴리(프로필렌글리콜) 폴리(비닐알코올) 및 이들의 유도체(예컨대, 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 및 이들의 유도체와 같은 치환된 폴리(에틸렌글리콜))이 포함된다. 적절한 자연발생 중합체에는, 예를 들어, 알부민, 아밀로오스, 텍스트란, 글리코젠 및 이들의 유도체가 포함된다.

적절한 중합체는 평균 분자량의 범위가 500 Da 내지 50000 Da로, 예를 들어, 5000 Da 내지 40000 Da 또는 25000 내지 40000 Da이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 연구대상 항체가 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 또는 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 중합체를 포함하는 경우, PEG 또는 메톡시폴리(에틸렌글리콜) 중합체는 분자량의 범위가 약 0.5 킬로달톤(kDa) 내지 1 kDa, 약 1 kDa 내지 5 kDa, 5 kDa 내지 10 kDa, 10 kDa 내지 25 kDa, 25 kDa 내지 40 kDa 또는 40 kDa 내지 60 kDa일 수 있다.

상기의 내용처럼, 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 PEG 중합체에 공유결합된다. 일부 구현예에서, 연구대상 scFv 다합체는 PEG 중합체에 공유결합된다. 단백질의 폐길레이션에 적절한 방법 및 시약은 당해기술에 잘 알려져 있고, 예를 들어, U.S. Pat. No. 5,849,860에서 찾을 수 있다. 단백질 접합에 적절한 PEG는 일반적으로 실온에서 수용성이며, 일반 화학식 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 을 갖는데, 여기서 R는 수소 또는, 알킬 또는 알카놀 기와 같은 보호기이고, n은 1에서 1000까지의 정수이다. R가 보호기인 경우, 그것은 일반적으로 탄소 원자 1~ 8개를 갖는다.

연구대상 항체에 접합된 PEG는 선형일 수 있다. 연구대상 단백질에 접합된 PEG는 또한 분지형일 수 있다. U.S. Pat. No. 5,643,575에 기술된 것과 같은 분지형 PEG 유도체 "별형(star)-PEG's" 및, Shearwater Polymers, Inc. 카탈로그, "Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998"에 기술된 것과 같은 다중-팔 PEG's 참조. 별형 PEG는, 예를 들어, U.S. Patent No. 6,046,305를 비롯하여, 당해기술에 기술되었다.

연구대상 항체는 당화(glycosylated)될 수 있는데, 예를 들어, 연구대상 항체는 공유결합된 탄수화물 또는 폴리사카라이드 모이어티를 포함할 수 있다. 항체의 당화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결 중 하나이다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티의 부착을 가리킨다. 트리글리콜리드가 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌을 시퀀싱하는데, 여기서 X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이고, 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티의 효소 부착에 대한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 중에 이와 같은 트리펩티드 서열들 중 하나의 존재가 잠재적 당화 부위를 생성한다. O-연결 당화는 히드록시아미노산에, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 (비록 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신 역시 사용될 수 있지만) 당 N-아세틸갈락토사민, 갈

락토오스 또는 자일로오스 중 하나의 부착을 가리킨다. 당화는 예를 들면 원하는 당화 조직을 갖는 숙주 세포에서 재조합 생성에 의해 달성될 수 있다.

항체에 당화 부위의 첨가는 아미노산 서열을 변경하여 서열이 하나 이상의 트리펩티드 서열(N-연결 당화 부위의 경우)을 함유하도록 함으로써 편리하게 달성된다. 상기 변경은 또한 원 항체의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다(O-연결 당화 부위). 이와 유사하게, 당화 부위의 제거는 항체의 본래 당화 부위 내부에서의 아미노산 변경에 의해 달성된다.

연구대상 항체는, 예를 들어, 글루타르알데히드, 동종이작용기(Homobifunctional) 교차 결합 또는 이종이작용기(heterobifunctional) 교차 결합을 사용하여 두번째 모이어티(예컨대, 지질, 연구대상 항체가 아닌 폴리펩티드, 합성 중합체, 탄수화물 등)에 공유결합될 수 있다. 글루타르알데히드는 그것의 아미노 모이어티를 통해 폴리펩티드를 교차결합시킨다. 동종이작용기 교차 결합(예를 들어, 동종이작용기 이미도에스테르, 동종이작용기 N-히드록시숙시니미드(NHS) 에스테르, 또는 동종이작용기 설프히드릴 반응성 교차 결합)은 둘 이상의 동일한 반응성 모이어티를 함유하고, 교차 결합이 연결될 폴리펩티드의 혼합물을 함유하는 용액에 첨가되는 1단계 반응 과정에 사용될 수 있다. 동종이작용기 NHS 에스테르 및 이미도에스테르는 폴리펩티드를 함유하는 아민을 교차결합시킨다. 약 알칼린 pH에서, 이미도에스테르는 1차 아민과만 반응하여 이미도아미드를 형성하고, 교차결합된 폴리펩티드의 전반적인 전하량은 영향을 받지 않는다. 동종이작용기 설프히드릴 반응성 교차 결합은 비스말레이미드벤산(BMH), 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠(DFDNB) 및 1,4-디-(3',2'-피리디디티오) 프로피노아미도 부탄(DPDPB)을 포함한다.

이종이작용기 교차 결합은 둘 이상의 상이한 반응성 모이어티(예를 들어, 아민 반응성 모이어티 및 설프히드릴-반응성 모이어티)를 갖고, 아민 또는 설프히드릴 반응성 모이어티를 통해 폴리펩티드 중 하나와 교차결합된 후, 반응하지 않은 모이어티를 통해 다른 폴리펩티드와 반응한다. 피리딘 디설파이드 교차 결합과 마찬가지로, 다중 이종이작용기 할로아세틸 교차 결합이 가능하다. 카르보다이미드가 카르복실을 아민에 결합시켜 아미드 결합을 야기하는 이종이작용기 교차결합 시약의 전형적인 예이다.

연구대상 항체는 고체 지지체에 고정될 수 있다. 적절한 지지체들은 당해기술에 잘 알려져 있고, 그 중에서도 상업적으로 구매 가능한 컬럼 물질, 폴리스티렌 비드, 라텍스 비드, 자석 비드, 콜로이드 금속 입자, 유리 및/또는 실리콘 칩 및 표면, 니트로셀룰로오스 조각, 나일론막, 시트, 듀라사이트(duracites), 반응 트레이의 웰(well)(예를 들어, 다중-웰 플레이트), 플라스틱판 등을 포함한다. 고체 지지체는 다양한 물질, 예컨대 유리, 폴리스티렌, 염화폴리비닐, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트, 텍스트란, 나일론, 아밀로오스, 천연 및 변형 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 아가로오스 및 자철석을 포함할 수 있다. 연구대상 항체를 고체 지지체에 고정시키는 적절한 방법은 잘 알려져 있고, 비제한적으로 이온결합, 소수성 상호작용, 공유결합 등을 포함한다. 고체 지지체는 예를 들어, 수성 용액에 용해되거나 또는 용해되지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 적절한 고체 지지체는 일반적으로 수성 용액에서 용해되지 않는다.

연구대상 항체는, 일부 구현예에서, 검출가능 표지를 포함할 수 있다. 적절한 검출가능 표지는 분광분석적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 모든 조성물을 포함한다. 적절한 것으로는, 비제한적으로, 자석 비드(예컨대, Dynabeads™), 형광 염료(예컨대, 플루오레세인이소티오시안산염, 텍사스 레드, 로다민, 초록 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질 등), 방사성 표지(예를 들어, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^{32}P), 효소(예를 들어, 겨자무과산화효소, 알칼린 포스파타아제, 루시페라아제 및 효소-결합 면역흡착검사(ELISA)에 일반적으로 사용되는 것들) 및 비색 표지(예컨대, 콜로이드성 금 또는 착색 유리) 또는 플라스틱(예컨대, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드가 포함된다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 조영제 또는 방사선동위원소를 포함하는데, 여기서 조영제 또는 방사선동위원소는, 예를 들어, 인간을 대상으로 실행되는 영상촬영과정에서, 검출가능 표지로 사용하기에 적합한 것이다. 표지의 비제한적 예에는 ^{123}I (요오드), ^{18}F (플루오린), ^{99}Tc (테크네튬), ^{111}In (인듐), ^{67}Ga (갈륨)과 같은 방사선동위원소 및, 가돌리늄(Gd), 디스프로슘, 철과 같은 조영제가 포함된다. 방사성 Gd 동위원소(^{153}Gd) 또한 구입 가능하고, 인간 체외 포유류에서의 영상촬영술에 적합하다.

연구대상 항체는 표준 기법을 사용하여 표지될 수 있다. 예를 들어, 연구대상 항체는 클로르아민 T 또는 1,3,4,6-테트라클로로-3 α ,6 α -데페닐글리코우릴을 사용하여 요오드화될 수 있다. 플루오린화의 경우, 플루오린화 이온 치환 반응(displacement reaction)에 의한 합성 중에 연구대상 항체에 플루오린이 첨가된다. 이와 같은 방사선동위원소와 단백질의 합성에 대한 검토를 위해 Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) 및

Saji, H., Crit. Rev. Ther. 약물 Carrier Syst., 16(2):209-244 (1999) 가 참조되었다. 연구대상 항체는 또한 표준 기법을 통해 조영제로 표지될 수 있다. 예를 들어, 연구대상 항체는 Gd 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산 (GdDTPA) 또는 Gd 테트라아자시클로도데카네테트라아세트산(GdDOTA)와 같은 저분자 Gd 킬레이터를 상기 항체에 접합시킴으로써 Gd로 표지될 수 있다. Caravan 등, Chem. Rev. 99:2293-2352 (1999) 및 Lauffer 등, J. Magn. Reson. Imaging, 3:11-16 (1985) 참조. 연구대상 항체는 예를 들어, 폴리아민-Gd 킬레이터를 상기 항체에 접합시킴으로써 Gd로 표지될 수 있다. 예를 들어, Curtet 등, Invest. Radiol., 33(10):752-761 (1998) 참조. 대안적으로, 연구대상 항체는 아비딘 및 바이오티닐화된 항체를 갖는 Gd 킬레이터 지질을 포함하는 상자성체 중합리포솜을 배양함으로써, Gd로 표지될 수 있다. 예를 들어, Sipkins 등, Nature Med., 4:623-626 (1998) 참조.

연구대상 항체에 연결될 수 있는 적절한 형광 단백질에는, 비제한적으로, 예를 들어, U.S. Patent No. 6,066,476; 6,020,192; 5,985,577; 5,976,796; 5,968,750; 5,968,738; 5,958,713; 5,919,445; 5,874,304에 기술된 *Aequoria victoria*에서 유래된 초록 형광 단백질 또는 이것의 돌연변이체 또는 유도체; 예를 들어, 개선된 GFP(예를 들어, Clontech, Inc.에서 구매 가능한 GFP); 적색 형광 단백질; 황색 형광 단백질; 예를 들어, Matz 등 (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973에 기술된 바와 같이 Anthozoan species에서 유래된 다양한 형광 및 착색 단백질 등이 포함된다.

연구대상 항체는, 일부 구현예에서, "방사선 불투과성" 표지, 예를 들어 x-선을 사용하여 쉽게 시각화될 수 있는 표지를 포함한다. 방사선 불투과성 물질은 당해기술의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 가장 보편적인 방사선 불투과성 물질은 요오드화염, 브롬화염 또는 바륨염을 포함한다. 기타 방사선 불투과성 물질들 역시 알려져 있는데, 비제한적으로, 유기 비스무스 유도체(예를 들어, U.S. Pat. No. 5,939,045 참조), 방사선 불투과성 멀티우레탄(예를 들어, U.S. Pat. No. 5,346,981 참조), 유기비스무스 합성물(예를 들어, U.S. Pat. No. 5,256,334 참조), 방사선 불투과성 바륨 다합체 복합체(예를 들어, U.S. Pat. No. 4,866,132 참조) 등이 포함된다.

연구대상 항체는, 일부 구현예에서, 융합 파트너, 예컨대 리간드; 에피토프 태그; 펩티드; 항체 아닌 단백질 등에 연결(예를 들어, 공유결합 또는 비-공유결합)될 것이다. 적절한 융합 파트너는 펩티드 및, 체내에서 개선된 안정도를 제공하고(예를 들어, 개선된 혈청 반감기); 쉬운 정제법 등을 제공하고; 세포에서 융합 단백질의 분비를 허용하고; (His)_n, 예를 들어, 6His 등과 같은 에피토프 태그를 제공하고; 세포에서 융합 단백질의 분비를 허용하고; 에피토프 태그, 예를 들어, GST, 헤마글루티닌(HA; 예를 들어, CYPYDVPDYA; 서열번호:10), FLAG(예를 들어, DYKDDDDK; 서열번호:11), c-myc(예를 들어, CEQKLISEEDL; 서열번호:12) 등을 제공하고; 검출가능 시그널, 예를 들어, 검출가능 생성물을 생성하는 효소(예를 들어, β -갈락토시다아제, 루시페라아제), 또는 그 자체로 검출가능하고 다합체화, 예를 들어, 면역글로불린의 Fc 일부와 같은 다합체화 도메인을 허용하는 단백질(예를 들어, 초록 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질 등)을 제공하는 폴리펩티드를 포함한다.

상기 융합은 또한 친화도 도메인을 포함할 수 있는데, 예컨대 식별 또는 정제에 유용한 고체 지지체에 고정된 것과 같은 결합 파트너와 상호작용할 수 있는 펩티드 서열이 포함된다. 히스티딘과 같은 연속적인 단일 아미노산은, 단백질에 융합될 때, 니켈 세파로오스와 같은 수지 컬럼에 높은 친화도 결합에 의해 융합 단백질의 1단계 정제를 위해 사용될 수 있다. 친화도 도메인의 예에는 His5(HHHHH)(서열번호:13), HisX6(HHHHHH)(서열번호:14), C-myc (EQKLISEEDL)(서열번호:15), Flag(DYKDDDDK)(서열번호:16), Streptag(WSHPQFEK)(서열번호:17), 헤마글루티닌(예를 들어, HA 태그 (YPYDVPDYA; 서열번호:18)), 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST), 티오레드 옥신, 셀룰로오스 결합 도메인, RYIRS(서열번호:19), Phe-His-His-Thr(서열번호:20), 키틴 결합 도메인, S-펩티드, T7 펩티드, SH2 도메인, C-말단 RNA 태그, WEAAAREACCRECCARA(서열번호:21), 금속 결합 도메인(예를 들어, 아연 결합 도메인 또는, 예를 들어, 칼모듈린, 트로포닌 C, 칼시네우린 B, 미오신 경쇄, 레코베린, S-모듈린, 비시닌, VILIP, 뉴로칼신, 히포칼신, 프레케닌, 칼트락틴, 칼파인 대규모-하위단위, S100 단백질, 파르발부민, 칼빈딘 D9K, 칼빈딘 D28K 및 칼레타닌, 인테인, 바이오틴, 스트렙타비딘, MyoD, 류신 집퍼 서열 및 말토오스 결합 단백질과 같은 칼슘-결합 단백질에서 유래된 것과 같은 칼슘 결합 도메인)이 포함된다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 폴리아민 변형을 포함한다. 연구대상 항체는 자연발생적이거나 또는 합성인 폴리아민을 가지고 변형될 수 있다. 예를 들어, U.S. Pat. No. 5,670,477 참조. 유용한 자연발생적 폴리아민에는 푸트레신, 스페르미딘, 스페르민, 1,3-테아미노프로판, 노르스페르미딘, syn-호모스페르미딘, 테르민, 테르모스페르민, 칼도펜타민, 호모칼도펜타민 및 카나발민이 포함된다. 푸트레신, 스페르미딘 및 스페르민이 특히 유용하다. 합성 폴리아민은 실험식 C_nH_{2n+2} 로 구성되는데, 1-6 NR 또는 N(R)₂ 모이어티를 추가로 포함하는, 탄소 원자가 3-12개인 고리형 또는 비고리형, 분지형 또는 비분지형, 탄화수소 사슬일 수 있고, 여기서 R은 H이고, (C₁-C₄) 알킬, 페닐 또는 벤질이다. 폴리아민은 모든 표준 교차결합 방법을 사용하여 항체에 연결될 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 변형되어 탄수화물 모이어티를 포함하는데, 여기서 탄수화물 모이어티는 항체에 공유결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체는 변형되어 지질 모이어티를 포함하는데, 여기서 상기 지질 모이어티는 상기 항체에 공유결합될 수 있다. 적절한 지질 모이어티에는 예를 들어, N-라우로일, N-올레오일 등과 같은 N-지방 아실 기; 도데실 아민, 올레오일 아민 등과 같은 지방 아민; C3-C16 긴-사슬 지방족 지질 등을 포함한다. 예를 들어, U.S. Pat. No. 6,638,513) 참조. 일부 구현예에서, 연구대상 항체가 리포솜에 병합된다.

본 개시의 항-CD22 항체가 공유결합된 이중 모이어티를 포함할 경우, 상기 이중 모이어티는 직접적으로 또는 링커를 통해 항-CD22 중쇄 및/또는 경쇄에 연결될 수 있다. 적절한 링커는 쉽게 선택될 수 있고, 상이한 길이, 예컨대 1 아미노산(예를 들어, Gly) 내지 20 아미노산, 2 아미노산 내지 15 아미노산, 3 아미노산 내지 12 아미노산(4 아미노산 내지 10 아미노산, 5 아미노산 내지 9 아미노산, 6 아미노산 내지 8 아미노산, 또는 7 아미노산 내지 8 아미노산을 포함) 중 적절한 것일 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7 아미노산일 수 있다.

신축적 링커의 예에는 글라이신 중합체 (G)_n, 글라이신-세린 중합체(예컨대, (GS)_n, GSGGSn(서열번호:22) 및 GGGSn(서열번호:23)포함)가 포함되고, 여기서 n은 최소한 하나의 정수), 글라이신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 및 당해 기술에 알려진 기타 신축적 링커가 포함된다. 글라이신 및 글라이신-세린 중합체는 이들 아미노산 모두 상대적으로 비구조적이고, 그래서 성분들 사이에 중성 사슬(tether)로서 역할을 할 수 있기에 관심의 대상이다. 글라이신 중합체가 특히 관심을 받고 있는데, 글라이신이 심지어 알라닌보다 유의미하게 더 큰 phi-psi 공간에 접근하고, 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 규제되기 때문이다(Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992) 참조). 예시적 신축적 링커에는, 비제한적으로 GSGG(서열번호:24), GSGGG(서열번호:25), GSGSG(서열번호: 26), GSGGG(서열번호: 27), GGGSG(서열번호: 28), GSSSG(서열번호: 29) 등이 포함된다. 당해기술의 숙련가는 상기의 요소에 접합된 펩티드의 디자인에 완전히 또는 부분적으로 신축적인 링커가 포함될 수 있어서, 상기 링커에는 신축적 링커뿐 아니라 덜 신축적인 구조를 제공하는 하나 이상의 부분이 포함됨을 이해할 것이다.

항체의 변형 방법

상기 항체는 다양한 방법들 중 어떤 것이든 사용하여 공유결합된 이중 모이어티(예컨대, 검출가능 표지, 약물 등)를 갖도록 변형될 수 있다. 본 개시는 관심대상 모이어티에 접합된 항-CD22 항체를 제공하는데, 여기서 관심대상 모이어티에 접합된 항-CD22 항체는 "항-CD22 항체 콘주게이트"라 일컫는다. 본 개시의 항-CD22 항체 콘주게이트는 하기를 포함할 수 있다: 1) 관심대상 모이어티에 접합된 Ig 중쇄 불변 영역; 및 관심대상 모이어티에 접합된 Ig 경쇄 불변 영역; 2) 관심대상 모이어티에 접합된 Ig 중쇄 불변 영역; 및 관심대상 모이어티에 접합되지 않은 Ig 경쇄 불변 영역; 또는 3) 관심대상 모이어티에 접합되지 않은 Ig 중쇄 불변 영역; 및 관심대상 모이어티에 접합된 Ig 경쇄 불변 영역. 연구대상 항-CD22 항체 콘주게이트는 또한 VH 및/또는 VL 도메인을 포함할 수 있다.

한 예에서, 상기 항체는 이중 모이어티의 부착을 위한 화학적 손잡이 역할을 할 수 있는 있는 2-포르밀글리신 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 항-CD22의 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역은 2-포르밀글리신 생성 효소(FGE)의 작용에 의해 2-포르밀글리신(FGly)을 함유하도록 전환될 수 있는 설파타아제 모티프의 아미노산 서열을 포함하도록 변형될 수 있다. 이와 같은 설파타아제 모티프는 또한 본원에서 FGE-변형 부위로 일컫는다. FGE의 작용은 서열-특이적 방식으로 지시되기 때문에 FGE는 면역글루블린 폴리펩티드 내부에 위치한 설파타아제 모티프에 작용한다. 관심대상 모이어티는 태그된 Ig 폴리펩티드의 전환된 알데히드 태그의 FGly 잔기의 알데히드 반응을 위한 반응성 파트너 성분으로 제공된다. 광범위한 구매가능 시약들이 사용되어 알데히드-태그 Ig 폴리펩티드의 FGly 잔기에 관심대상 모이어티의 부착을 달성할 수 있다. 예를 들어, 수많은 관심대상 모이어티의 아미노옥시, 히드라자이드 또는 티오세미카르바자이드 유도체가 적절한 반응성 파트너이고, 이들은 쉽게 구할 수 있으며, 표준 화학적 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

예를 들어, 태그된 Ig 폴리펩티드에 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 모이어티를 부착하기 위해, 표준 프로토콜을 사용하여 모노아미노-PEGs 및 아미노옥시글라이신에서 아미노옥시-PEG가 생성될 수 있다. 그러고 나서, 아미노옥시-PEG는 전환된(예컨대, FGly-변형) 알데히드-태그 Ig 폴리펩티드와 반응하여 PEG 모이어티의 부착을 허용할 수 있다. 전환된 알데히드-태그 폴리펩티드에 바이오틴 모이어티의 전달은 아미노옥시 바이오틴, 바이오틴 히드라자이드 또는 2,4 디니트로페닐히드라진을 사용하여 달성될 수 있다.

알데히드 태그의 최소 설파타아제 모티프는 일반적으로 그 길이가 5 또는 6 아미노산 잔기이고, 일반적으로 그 길이가 6 아미노산 잔기 이하이다. Ig 폴리펩티드에 제공되는 설파타아제 모티프는, 16, 15, 14, 13, 12, 11,

10, 9, 8 또는 7 아미노산 잔기보다 길이가 짧은 설파타아제 모티프를 규정하기 위해, 최소한 5 또는 6 아미노산 잔기이고, 예컨대 길이가 5~16, 6~16, 5~15, 6~15, 5~14, 6~14, 5~13, 6~13, 5~12, 6~12, 5~11, 6~11, 5~10, 6~10, 5~9, 6~9, 5~8 또는 6~8 아미노산 잔기일 수 있다. 어떤 구현예에서, 사용되는 설파타아제 모티프는 하기식으로 기술될 수 있다:



여기서

Z^1 은 시스테인 또는 세린(또한 (C/S)로 나타낼 수 있음)이고;

Z^2 는 프롤린 또는 알라닌 잔기 중 하나(또한 (P/A)로 나타낼 수 있음)이고;

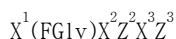
Z^3 은 기본적인 아미노산(예를 들어, 아르기닌(R)이고, 라이신(K) 또는 히스티딘(H)일 수 있고, 일반적으로 라이신임), 또는 지방족 아미노산(알라닌(A), 글라이신(G), 류신(L), 발린(V), 이소류신(I) 또는 프롤린(P), 일반적으로 A, G, L, V 또는 I임)이고;

X^1 은 존재하거나 또는 존재하지 않거나 하는데, 존재할 경우, 모든 아미노산일 수 있고, 일반적으로는 지방족 아미노산, 황-함유 아미노산, 또는 극성, 전하를 띄지 않는 아미노산(즉, 방향족 아미노산 또는 전하를 띤 아미노산 이외의 것들)으로, 일반적으로 L, M, V, S 또는 T이고, 좀 더 일반적으로는 L, M, S 또는 V이며, 전제조건은 설파타아제 모티프가 표적 폴리펩티드의 N-말단에 있을 때, X^1 이 존재한다는 것이고; 그리고

X^2 및 X^3 은 독립적으로 어떤 아미노산이든 될 수 있는데, 일반적으로는 지방족 아미노산, 전하를 띄지 않는 극성 아미노산 또는 황-함유 아미노산(즉, 방향족 아미노산 또는 전하를 띤 아미노산 이외의 것들)으로, 예를 들어, S, T, A, V, G 또는 C이고; 예를 들어, S, T, A, V 또는 G이다. 한 예에서, 알데히드 태그는 화학식 L(C/S)TPSR(서열번호: 30), 예컨대, LCTPSR(서열번호: 31) 또는 LSTPSR(서열번호: 32)이다. 따라서, 본 개시는 알데히드-태그 Ig 중쇄 및/또는 알데히드-태그 Ig 경쇄를 포함하는 항체를 제공하는데, 여기서 알데히드-태그 Ig 항체는 그와 같은 설파타아제 모티프를 함유하는 중쇄 및/또는 경쇄의 Ig 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다.

일반적으로, 표적 폴리펩티드의 알데히드 태그의 설파타아제 모티프에서 시스테인 또는 세린의 FGly로의 전환을 촉진하기 위해 사용되는 FGE는 알데히드 태그에 존재하는 설파타아제 모티프에 따라 달리 선택된다. FGE는 알데히드-태그 폴리펩티드가 발현되는 숙주 세포에 내재되어 있을 수 있고, 또는 숙주 세포가 적당한 FGE를 발현하도록 유전자 변형이 될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 FGE와 양립되는 설파타아제 모티프를 사용하고, FGE를 발현하는 인간 세포, 또는 인간 FGE를 발현하도록 유전자 변형된 숙주 세포(일반적으로 포유류 세포)에서 알데히드-태그 단백질을 발현시키는 것이 바람직할 것이다. 일반적으로, FGly-변형 항체를 생성하는 데 사용하기 적합한 FGE는 자연발생적인 공급원에서 획득되거나 또는 합성하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 적당한 FGE는 자연적으로 FGE를 생성하거나 또는 유전적으로 변형되어 FGE를 인코딩하는 제조업 유전자를 발현하는 생물학적 공급원에서 유래될 수 있다. 수많은 FGE를 인코딩하는 핵산은 당해기술에 잘 알려져 있다.

설파타아제 모티프에 대한 FGE의 작용 이후, Z_1 은 산화되어 2-포르밀글리신(FGly) 잔기를 생성한다. 이와 더불어, FGE-매개 전환 및 관심대상 모이어티를 포함하는 반응성 파트너와의 반응 후, 상기 화학식의 Z_1 에서의 FGly 위치는 관심대상 모이어티(예를 들어, 검출가능 표지, 수용성 중합체, 폴리펩티드, 약물 등)에 공유결합된다. 따라서, 본 개시는 FGly 모이어티를 포함하는 항-CD22 항체 변형을 제공하고, 여기서 상기 항-CD22 항체는 하기 화학식의 FGly-전환 설파타아제 모티프를 포함한다:



여기서,

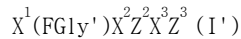
X^1 은 존재하거나 또는 존재하지 않거나 하는데, 존재할 경우, 모든 아미노산이고(전제 조건은 설파타아제 모티프가 폴리펩티드의 N-말단에 있을 경우, X^1 이 존재한다는 것);

X^2 및 X^3 은 각각 독립적으로 어떤 아미노산이나 가능하고; 및

Z^3 은 기본적인 아미노산이고; 그리고

여기서 FGly-변형 항-CD22 항체는, 접힌 상태에서, 용매-접근가능 표면 상에 FGly 작용기를 제공한다. 일부 구현예에서, FGly-전환 설파타아제 모티프는 화학식 L(FGly)TPSR(서열번호: 33)로 나타낸다.

상기의 내용처럼, FGly 모이어티를 포함하도록 변형된 연구대상 항-CD22 항체는 추가로 FGly 모이어티를 통해 항-CD22 항체에 공유결합된 관심대상 이중 모이어티(예를 들어, 검출가능 표지, 수용성 중합체, 폴리펩티드, 약물 등)를 포함하도록 변형될 수 있다. 따라서, 본 개시는 항-CD22 항체 콘주게이트(또한 본원에서는 "항-CD22 콘주게이트"로 일컬음)를 제공하고, 상기 항-CD22 콘주게이트는 하기를 포함한다:



여기서

FGly'는 공유결합으로 부착된 모이어티를 갖는 2-포르밀글리신 잔기이고;

Z^2 는 프롤린 또는 알라닌 잔기 중 하나(P/A)로 표현될 수 있음)이고; Z^3 은 기본적인 아미노산(예를 들어, 아르기닌(R)이고, 라이신(K) 또는 히스티딘(H)일 수 있는데, 일반적으로는 라이신) 또는 지방족 아미노산(알라닌(A), 글라이신(G), 류신(L), 발린(V), 이소류신(I) 또는 프롤린(P)인데, 일반적으로는 A, G, L, V 또는 I임)이고;

X^1 은 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있는데, 존재할 경우, 어떤 아미노산도 될 수 있으나, 일반적으로는 지방족 아미노산, 황-함유 아미노산 또는 전하를 띄지 않는 극성 아미노산(즉, 방향족 아미노산 또는 전하를 띄는 아미노산 이외의 것들)이고, 일반적으로 L, M, V, S 또는 T이고, 좀 더 일반적으로는 L, M 또는 V이고, 전제조건은 설파타아제 모티프가 표적 폴리펩티드의 N-말단에 있을 때, X^1 이 존재한다는 것이고; 그리고

X^2 및 X^3 은 독립적으로 어떤 아미노산이나 될 수 있는데, 일반적으로는 지방족 아미노산, 황-함유 아미노산, 또는 전하를 띄지 않는 극성 아미노산(즉, 방향족 아미노산 또는 전하를 띄는 아미노산 이외의 것들)이고, 일반적으로 S, T, A, V, G 또는 C이고, 좀 더 일반적으로 S, T, A, V 또는 G이다. 일부 구현예에서, 모티프는 화학식 L(FGly')TPSR(서열번호: 34)로 나타낸다.

약물

일부 경우에, 본 개시의 항-CD22 항체는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄에 공유결합된 약물을 포함한다. "약물"은 저분자 약물, 펩티드성 약물, 독소(예를 들어, 세포독소) 등을 포함한다.

본원에 사용되는 "저분자 약물"은 관심대상의 약제학적 활성을 나타내고, 일반적으로 분자량이 약 800 Da 이하 또는 2000 Da 이하의 화합물, 예컨대, 유기 화합물을 가리키는데, 상기 화합물은 최대 5kDa의 분자를 아우를 수 있고, 무려 약 10 kDa일 수 있다. 무기 저분자는 탄소원자를 하나도 포함하지 않은 분자를 가리키고, 반면 유기 저분자는 최소한 하나의 탄소원자를 함유하는 화합물을 가리킨다.

본원에 사용되는 "펩티드 약물"은 중합체성 화합물을 함유하는 아미노산을 가리키고, 이것은 자연발생 및 비-자연발생 펩티드, 올리고펩티드, 환형 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질, 뿐만 아니라 펩티드 모방물을 아우를 것이다. 상기 펩티드 약물은 화학적 합성에 의해 획득되거나 또는 유전적으로 인코딩된 공급원(예를 들어, 재조합 공급원)에서 생성될 수 있다. 펩티드 약물의 분자량의 범위는 200 Da 내지 10 kDa 또는 그 이상일 수 있다.

어떤 경우에는, 약물이 독소, 예를 들어, 세포독소다. 고등식물에서 보편적인 한 단백질 부류인 리보솜-불활성화 단백질(RIPs)이 이와 같은 세포독소의 예이다. RIPs는 유형 I 및 유형 II 부류로 구분되는데, 진행 단백질 합성의 잠재적 억제제로서의 이것의 활성 때문에 세포독성 물질이다. 유형 I RIPs는 리보솜-불활성화 활성을 갖는 단일 펩티드 사슬로 구성되고, 반면 유형 II 단백질은 세포-결합 특성을 갖는 B-사슬에 디설파이드-연결된 A-사슬(근본적으로 Type I 단백질의 증가물)로 구성된다. 특이적 아데닌 염기의 N-글리코시드 결합은 진행 리보솜의 28S rRNA의 높은 보존 루프 영역에서 RIPs에 의해 가수분해로 쪼개지고, 이로써 진행 세포에서의 번역을 불활성화한다. 예를 들어, 미국특허 번호 5,744,580 참조. 겔로닌, 도데칸드린, 트리코산틴, 트리코키린, 브리오딘, 미라빌리스 항바이러스 단백질(MAP), 보리 리보솜-불활성화 단백질(BRIP), 미국자리공(pokeweed) 항바이러스 단백질(PAPS), 사포린, 루프핀 및 모모르딘이 유형 I RIP의 예이고; 반면 리신 및 아브린이 유형 II RIP의

예이다. 적절한 세포독소에는, 비제한적으로, 리신, 아브린, 디프테리아 독소, 슈도모나스 균체외독소(예를 들어, PE35, PE37, PE38, PE40 등), 사포린, 겔로닌, 미국자리공 항바이러스 단백질(PAP), 보툴리눔 독소, 브리오딘, 모모르딘 및 부가닌이 포함된다.

어떤 경우에는, 약물이 항암제다. 항암제는 암 세포의 증식을 감소시키고, 세포독성 약제 및 세포 증식 억제제를 아우르는 비-펩티드성(즉, 비-단백질계) 화합물을 포함한다. 항암제의 비제한적인 예는 알킬화제, 니트로소 요소, 항대사물질, 항종양 항생물질, 식물(빈카) 알칼로이드 및 스테로이드 호르몬을 포함한다. 펩티드성 화합물 또한 사용될 수 있다.

적절한 항암제에는 돌라스타틴 및 이것의 활성 유사체 및 유도체; 및 아우리스타틴 및 이것의 활성 유사체 및 유도체가 포함된다. 예를 들어, WO 96/33212, WO 96/14856 및 USPN 6,323,315 참조. 예를 들어, 돌라스타틴 10 또는 아우리스타틴 PE는 본 개시의 항제-약물 콘주게이트에 포함될 수 있다. 적절한 항암제에는 또한 마이탄시노이드 및 이것의 활성 유사체 및 유도체(예를 들어, EP 1391213; 및 Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) 참조; 및 두오카르마이신 및 이것의 활성 유사체 및 유도체(예를 들어, 합성 유사체, KW-2189 및 CB 1-TM1 포함)를 포함한다.

세포 증식을 감소시키는 역할을 하는 제제들은 당해기술에 알려져 있고 널리 사용된다. 이와 같은 제제에는 질소 머스타드, 니트로소 요소, 에틸렌이민 유도체, 알킬 술포네이트 및 트리아젠와 같은 알킬화제가 포함되고, 여기에는 비제한적으로, 메클로레트아민, 시클로포스포아미드(CytosanTM), 펠팔란(L-사르콜리신), 카르무스틴(BCNU), 로무스틴(CCNU), 세무스틴(메틸-CCNU), 스트렙토조신, 클로로조토신, 우라실 머스타드, 클로르메틴, 이포스파미드, 클로람부실, 피포프로만, 트리에틸렌멜아민, 트리에틸렌티오포스포아민, 부술판, 다카르바진 및 테모졸로미드가 포함된다.

항대사물질 제제에는 엽산 유사체, 피리미딘 유사체, 퓨린 유사체 및 아데노신 데아미나아제 억제제가 포함되고, 여기에는 비제한적으로 시타라빈(CYTOSAR-U), 시토신 아라비노시드, 플루오로우라실(5-FU), 플록스우리딘(FudR), 6-티오구아닌, 6-메르캅토피린(6-MP), 펜토스타틴, 5-플루오로우라실(5-FU), 메토트렉세이트, 10-프로파르길-5,8-디데아자폴레이트(PDDF, CB3717), 5,8-디데아자테트라히드로엽산(DDATHF), 레우코보린, 플루다라빈 포스페이트, 펜토스타틴 및 겐시타빈이 포함된다.

적절한 천연생성물 및 이들의 유도체(예를 들어, 빈카 알칼로이드, 항종양 항생물질, 효소, 림포카인 및 에피도필로톡신)에는 비제한적으로, Ara-C, 파클리탁셀(Taxol[®]), 도세탁셀(Taxotere[®]), 테옥시코포르마이신, 미토마이신-C, L-아스파라기나아제, 아자티오프린; 브레퀴나르; 알칼로이드, 예컨대, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈데신 등; 포도필로톡신, 예컨대, 에토포시드, 테니포시드 등; 항생제, 예컨대, 안트라시클린, 염화수소 다우노루비신(다우노마이신, 루비도마이신, 세루비딘), 이다루비신, 독소루비신, 에피루비신 및 모르폴리노 유도체 등; 폐녹시존 비스시클로헵티드, 예컨대 닥티노마이신; 기본적 글리코헵티드, 예컨대, 블레오마이신; 안트라퀴논 글리코시드, 예컨대 플리카마이신(미트라마이신); 안트라세네디온, 예컨대 미톡산트론; 온아지리노피르롤로 인돌에디, 예컨대 미토마이신; 대환식 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, FK-506(타크로리무스, 프로그래프), 라파마이신 등이 포함된다.

기타 항-증식 세포독성 약제는 나벨렌, CPT-11, 아나스트라졸, 레트라졸, 카페시타빈, 레록사핀, 시클로포스포아미드, 이포사미드 및 드로록사핀이다.

항-증식 활성을 갖는 제제에 영향을 미치는 미세소관 또한 사용하기에 적합하고, 비제한적으로 알로콜키신(NSC 406042), 할리콘드린 B(NSC 609395), 콜키신(NSC 757), 콜키신 유도체(예를 들어, NSC 33410), 돌스타틴 10(NSC 376128), 마이탄신(NSC 153858), 리족신(NSC 332598), 파클리탁셀(Taxol[®]), Taxol[®] 유도체, 도세탁셀(Taxotere[®]), 티오콜키신(NSC 361792), 트리틸 시스템, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 천연 및 합성 에포틸론(예컨대, 비제한적으로 에포틸론 A, 에포틸론 B, 디스코데르몰리드; 에스트라무스틴, 노코다졸 등이 포함된다.

사용하기에 적합한 호르몬 조절제 및 스테로이드(합성 유사체 포함)에는 비제한적으로, 부신피질스테로이드, 예컨대 프레드니손, 텍사메타손 등; 에스트로겐 및 프로게스테론, 예컨대 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 메게스트롤 아세테이트, 에스트라디올, 클로미펜, 타목시펜 등; 및 부신피질 억제제, 예컨대 아미노글루테티미드; 17 α -에티닐에스트라디올; 디에틸stil베스트롤, 테스토스테론, 플루옥시메스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 테스토라톤, 메틸프레드니솔론, 메틸-테스토스테론, 프레드니솔론, 트리암시놀론, 클로르트리아니센, 히드록시프로게스테론, 아미노글루테티미드, 에스트라무스틴, 메드록시프로게

스테론 아세테이트, 류프롤리드, 플루타미드(Drogenil), 토레미펜(Fareston) 및 Zoladex®이 포함된다. 에스트로겐은 증식 및 분화를 자극하고; 따라서, 에스트로겐 수용체에 결합된 화합물이 이와 같은 활성을 저지하기 위해 사용된다.

기타 적절한 화학요법 제제에는 금속 복합체, 예컨대 시스플라틴 (cis-DDP), 카르보플라틴 등; 요소, 예컨대 히드록시요소; 및 히드라진, 예컨대 N-메틸히드라진; epidophyllotoxin; 토포이소머라아제 억제제; 프로카르바진; 미톡산트론; 류코보린; 테가푸르 등이 포함된다. 기타 관심대상인 항-증식 제제에는 면역억제제, 예컨대 마이코페놀산, 탈리도미드, 데속시스페르구알린, 아자스포린, 레플루노미드, 미조리빈, 아자스피란(SKF 105685); Iressa® (ZD 1839, 4-(3-클로로-4-플루오로페닐아미노)-7-메톡시-6-(3-(4-모르폴리닐)프로폭시)퀴나졸린) 등이 포함된다. .

탁산이 사용하기에 적합하다. "탁산"은 모든 활성 탁산 유도체 또는 프로드럭뿐만 아니라 파클리탁셀을 포함한다. "파클리탁셀"(이것은 본원에서 유사체, 제형 및 유도체, 예컨대 도세탁셀, TAXOL□, TAXOTERE□(도세탁셀의 제형), 파클리탁셀의 10-데스아세틸 유사체 및 파클리탁셀의 3'-N-데스벤조일-3'-N-t-부톡시카르보닐 유사체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다)은 당해기술의 숙련가에게 잘 알려진 기법들을 활용하여 쉽게 제조되거나(또한 WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076; U.S. Pat. Nos. 5,294,637; 5,283,253; 5,279,949; 5,274,137; 5,202,448; 5,200,534; 5,229,529; 및 EP 590,267 참조) 또는 다양한 상업적 공급원, 예컨대 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. (Taxus brevifolia에서 T7402; 또는 Taxus yunnanensis에서 T-1912)에서 획득될 수 있다.

파클리탁셀은 파클리탁셀의 화학적으로 획득가능한 일반적 형태를 가리킬 뿐만 아니라, 유사체 및 유도체(예를 들어, 상기의 탁소텔□ 도세탁셀) 및 파클리탁셀 콘주게이트(예를 들어, 파클리탁셀-PEG, 파클리탁셀-텍스트란 또는 파클리탁셀-자일로오스) 또한 가리킴이 이해되어야 한다.

용어 "탁산"에는 또한 잘 알려진 다양한 유도체가 포함되는데, 예컨대 친수성 유도체 및 소수성 유도체 모두 포함된다. 탁산 유도체는, 비제한적으로 국제특허출원 제WO 99/18113호에 기술된 갈락토오스 및 만노오스 유도체; WO 99/14209에 기술된 피페라지노 및 기타 유도체; WO 99/09021, WO 98/22451 및 U.S. Patent No. 5,869,680에 기술된 탁산 유도체; WO 98/28288에 기술된 6-티오 유도체; U.S. Patent No. 5,821,263에 기술된 술렌아미드 유도체; 및 U.S. Patent No. 5,415,869에 기술된 탁솔 유도체를 포함한다. 추가로 이것은 파클리탁셀의 프로드럭을 포함하는데, 비제한적으로 WO 98/58927; WO 98/13059; 및 U.S. Patent No. 5,824,701에 기술된 것들을 포함한다.

항체 생산 방법

연구대상 항체는 알려진 방법, 예컨대 단백질 합성을 위한 종래의 합성 방법; 재조합 DNA 방법 등으로 제조될 수 있다.

연구대상 항체가 단일 사슬 폴리펩티드인 경우, 표준 화학적 펩티드 합성 기법들을 사용하여 합성될 수 있다. 폴리펩티드가 화학적으로 합성될 경우, 상기 합성은 액체상 또는 고체상을 통해 진행될 것이다. 상기 서열의 C-말단 아미노산이 불용성 지지체에 부착되고, 이어서 남아 있는 아미노산들이 상기 서열에 연속적으로 첨가되는 고체상 폴리펩티드 합성(SPPS)은 연구대상 항체의 화학적 합성을 위한 적절한 방법의 한 예이다. 연구대상 항체 합성을 위해 Fmoc 및 Boc과 같은 다양한 형태의 SPPS가 사용가능하다. 고체상 합성을 위한 기법들은 Barany 및 Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, 등 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart 등, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 및 Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6:3-10 및 Camarero JA 등 2005 *Protein Pept Lett.* 12:723-8에 기술되어 있다. 요약하면, 작은 불용성 다공성 비드가 펩티드 사슬이 구축된 작용기 단위로 처리된다. 연결/탈보호의 반복적인 순환 후에, 부착된 고체상의 자유 N-말단 아민이 단일 N-보호 아미노산 단위에 연결된다. 그리고 나서, 이와 같은 단위는 탈보호되어, 추가의 아미노산이 부착될 수 있는 새로운 N-말단 아민이 드러난다. 펩티드는 고체상에 여전히 고정된 상태이고, 떨어져나가기 전에 여과 과정을 거친다.

연구대상 항체의 생산에 표준 재조합 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 인코딩하는 핵산(임의로 불변 영역에 연결)이 발현 벡터에 삽입된다. 상기 경쇄 및 중쇄는 동일한 또는 상이한 발현 벡터에서 클론될 수 있다. 면역글루불린 사슬을 인코딩하는 DNA 단편은 작용가능하게 연결되어 면역글루불린 폴리펩티드의 발현을 보장하는 발현 벡터(들)에서의 서열을 조절한다. 발현 조절 서열에는, 프로모터(예

를 들어, 자연적 결합 또는 이중 프로모터), 시그널 서열, 인핸서 요소 및 전사종료 서열이 포함된다. 발현 조절 서열은 진핵 숙주 세포(예를 들어, COS 또는 CHO 세포)를 형질전환하거나 또는 형질주입할 수 있는 벡터에서의 진핵 프로모터 시스템일 수 있다. 일단 상기 벡터가 적당한 숙주에 편입되면, 상기 숙주는 뉴클레오타이드 서열의 높은 수준의 발현, 상기 항체의 수집 및 정제에 적절한 조건 하에 유지된다.

코드의 퇴화 때문에, 다양한 핵산 서열이 각각의 번역글루블린 아미노산 서열을 인코딩할 수 있다. 원하는 핵산 서열은 신생 고체상 DNA 합성 또는 원하는 폴리뉴클레오타이드의 사전 제조 변이체의 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 돌연변이 생성에 의해 생산될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드-매개 돌연변이 생성은 표적 폴리펩티드 DNA의 치환, 결실 및 삽입 변이체를 제조하기 위한 적절한 방법의 한 예이다. Adelman 등, DNA 2:183 (1983) 참조. 요약하건대, 상기 표적 폴리펩티드 DNA는 원하는 돌연변이를 인코딩하는 올리고뉴클레오타이드를 단일-가닥 DNA 템플레이트로 혼성함으로써 변경된다. 혼성화(hybridization) 이후, DNA 폴리머라아제가 사용되어 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 편입시키고, 표적 폴리펩티드 DNA에서 선택된 변경을 인코딩하는 템플레이트의 온전한 두번째 상보적 가닥을 합성한다.

적절한 발현 벡터는 전형적으로 숙주 염색체 DNA의 에피솜 또는 필수 부분 중 하나로서 숙주 유기체에서 복제될 수 있다. 일반적으로, 발현 벡터는 선택 마커(예를 들어, 엠포실린 내성, 히그로마이신-내성, 테트라시클린 내성, 카나마이신 내성 또는 네오마이신 내성)를 함유하여 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포들의 검출을 가능하게 한다.

대장균은 연구대상 항체-인코딩 폴리뉴클레오타이드를 클로닝하는 데 사용할 수 있는 원핵 숙주 세포의 한 예이다. 그밖에 사용하기에 적합한 세균성 숙주는 바실리, 예컨대 바실러스 서브틸리스, 및 기타 장내세균, 예컨대 살모넬라, 세라티아 및 다양한 슈도모나스 종을 포함한다. 이와 같은 원핵 숙주들에서, 또한 발현 벡터를 만들 수 있고, 이것은 전형적으로 숙주 세포와 양립할 수 있는 발현 조절 서열(예를 들어, 복제개시점)을 함유한다. 이뿐만 아니라, 잘 알려진 수많은 다양한 프로모터, 예컨대 락토오스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 베타-락타마아제 프로모터 시스템, 또는 파지 람다에서 유래된 프로모터 시스템 등이 존재한다. 상기 프로모터는 전형적으로 발현을 조절하고(임의로 작동 서열과 함께), 전사 및 번역의 개시 및 완료를 위해 리보솜 결합 부위 서열 등을 갖는다.

기타 세균들, 예컨대 효모는 또한 발현에 유용하다. 사카로미세스(예를 들어, *S. cerevisiae*) 및 피치아는, 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터), 복제개시점, 종료 서열 등을 갖는 적절한 벡터가 있는 적절한 효모 숙주 세포의 예이다. 전형적인 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나아제 및 기타 글리콜리 효소를 포함한다. 유도 효모 프로모터는, 그 중에서도, 알코올 탈수소효소, 아이소사이토크롬 C 및, 말토오스 및 갈락토오스 활용에 책임이 있는 효소에서 유래된 프로모터들을 포함한다.

세균류 이외에, 포유류 세포(예를 들어, 체외 세포 배양액에서 자라는 포유류 세포) 또한 본 발명의 폴리펩티드(예를 들어, 번역글루블린 또는 이것의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드)를 발현시키고 생산하는 데 사용될 수 있다. Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987) 참조. 적절한 포유류 숙주 세포는 CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 미엘로마 세포주 및 형질전환된 B-세포 또는 하이브리도마를 포함한다. 이들 세포를 위한 발현 벡터는 발현 조절 서열, 예컨대 복제개시점, 프로모터 및 인핸서(Queen 등, Immunol. Rev. 89:49 (1986))를 포함하고, 필요한 프로세싱 정보부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 적절한 발현 조절 서열의 예는 번역글루블린 유전자, SV40, 아데노바이러스, 소유두종바이러스, 거대세포 바이러스 등에서 유래된 프로모터이다. Co 등, J. Immunol. 148:1149 (1992) 참조.

(화학적 또는 재조합 방식 중 하나로) 일단 합성되면, 전체 항체, 이들의 이합체, 개별적인 경쇄 및 중쇄, 또는 연구대상 항체의 다른 형태들(예를 들어, scFv 등)이 황산암모늄 침전, 친화도 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 정제, 겔 전기영동 등과 같은 당해기술의 표준 절차에 따라, 정제될 수 있다(일반적으로 Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982) 참조). 연구대상 항체는 대체로 순수할 수 있는데, 예를 들어, 연구대상 항체 이외의 세포 파편, 거대분자와 같은 오염물질이 없이, 최소한 약 80% 내지 85%, 최소한 약 85% 내지 90%, 최소한 약 90% 내지 95%, 또는 98% 내지 99%, 또는 그 이상의 순도를 갖는다.

조성물

본 개시는 연구대상 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 연구대상 항체 조성물은 연구대상 항체뿐만 아니라 하

기 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 염, 예컨대 NaCl, MgCl₂, KCl, MgSO₄ 등; 완충 제제, 예컨대 트리스 완충용액, N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술포산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄술포산 (MES), 2-(N-모르폴리노)에탄술포산 소듐염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판술포산(MOPS), N-트리스[히드록시메틸]메틸-3-아미노 프로판술포산(TAPS) 등; 용해제; 세척제, 예컨대 Tween-20과 같은 비이온성 세척제; 프로테아제 억제제; 글리 세롤 등.

핵산

본 개시는 연구대상 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 연구대상 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 의도된 표적 세포(예를 들어, 유전자 변형으로 인코딩된 항체를 합성하는 세포)에서 뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용하는 하나 이상의 규제 인자(예를 들어 프로모터 및 인핸서)에 작동가능하게 연결될 수 있다.

적절한 프로모터 및 인핸서 인자는 당해기술에 알려져 있다. 박테리아 세포에서의 발현을 위해 적절한 프로모터는, 비제한적으로, lacI, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P 및 trc를 포함한다. 진핵 세포에서의 발현을 위해 적절한 프로모터는, 비제한적으로, 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 유전자 프로모터 및 인핸서 인자; 거대세포 바이러스 초기발현(immediate early) 프로모터; 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제 프로모터; 초기 및 후기 SV40 프로모터; 레트로바이러스의 긴 말단 반복체에 존재하는 프로모터; 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터; 및 당해기술에 알려진 다양한 조직 특이적 프로모터를 포함한다.

일부 구현예에서, 예를 들어, 효모 세포에서의 발현을 위한 적절한 프로모터는 ADHI 프로모터, PGK1 프로모터, ENO 프로모터, PYK1 프로모터 등과 같은 구성 프로모터; 또는 GAL1 프로모터, GAL10 프로모터, ADH2 프로모터, PHO5 프로모터, CUP1 프로모터, GAL7 프로모터, MET25 프로모터, MET3 프로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, ADH1 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터 및 AOX1(예를 들어, 피치야에서 사용할 경우)와 같은 조절가능프로모터이다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 당해기술의 숙련가의 솜씨에 해당한다.

원핵 숙주 세포에 사용하기에 적절한 프로모터에는, 비제한적으로, 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라아제 프로모터; trp 프로모터; lac 오페론 프로모터; 하이브리드 프로모터, 예컨대 lac/tac 하이브리드 프로모터, tac/trc 하이브리드 프로모터, trp/lac 프로모터, T7/lac 프로모터; trc 프로모터; tac 프로모터 등; araBAD 프로모터; 체내 조절 프로모터, 예컨대 ssaG 프로모터 또는 관련 프로모터(예를 들어, U.S. Patent Publication No. 20040131637 참조), pagC 프로모터 (Pulkkinen 및 Miller, J. Bacteriol., 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda 등, PNAS, 1992; 89(21): 10079-83), nirB 프로모터(Harborne 등 (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813) 등(예를 들어, Dunstan 등 (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie 등 (2004) Vaccine 22:3243-3255; 및 Chatfield 등 (1992) Biotechnol. 10:888-892 참조); 시그마70 프로모터, 예를 들어, 합인 시그마70 프로모터(예를 들어, GenBank Accession Nos. AX798980, AX798961, 및 AX798183 참조); 고정상 프로모터, 예컨대 dps 프로모터, spv 프로모터 등; 병원성 유전자군 SPI-2에서 유래된 프로모터(예를 들어, W096/17951 참조); actA 프로모터(예를 들어, Shetron-Rama 등 (2002) Infect. Immun. 70:1087-1096 참조); rpsM 프로모터(예를 들어, Valdivia 및 Falkow (1996). Mol. Microbiol. 22:367 참조); tet 프로모터(예를 들어, Hillen, W. 및 Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. 및 Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162 참조); SP6 프로모터(예를 들어, Melton 등 (1984) Nucl. Acids Res. 12:7035 참조) 등이 포함된다. 대장균과 같은 원핵생물에 사용하기에 적절한 강력한 프로모터는, 비제한적으로, Trc, Tac, T5, T7 및 P_{Lambda}를 포함한다. 박테리아 숙주 세포에서 사용하는 작동유전자의 비제한적 예에는 락토오스 프로모터 작동유전자(LacI 억제 단백질은 락토오스와 만나면 형태를 바꾸고, 이로써 LacI 억제 단백질의 작동유전자 결합을 방지함), 트립토판 프로모터 작동유전자(트립토판과 복합체를 형성하면, TrpR 억제 단백질은 작동유전자에 결합하는 형태를 갖고; 트립토판의 부재 시, TrpR 억제 단백질은 작동유전자에 결합하지 않는 형태를 가짐), 및 tac 프로모터 작동유전자(deBoer 등 (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25 참조)가 포함된다.

연구대상 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 벡터 및/또는 클로닝 벡터에 존재할 수 있다. 연구대상 항체가 2개의 별도의 폴리펩티드를 포함할 경우, 상기 2개의 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 동일한 또는 별개의 벡터에서 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 선택가능 마커, 복제개시점 및, 벡터의 복제 및/또는 유지를 허용하는 기타 특성들을 포함할 수 있다.

수많은 적절한 벡터 및 프로모터들이 당해기술의 숙련자에게 알려져 있고; 많은 경우 연구대상 재조합 구성물들을 생성하기 위해 구매할 수 있다. 하기 벡터들이 예시로서 제공된다. 박테리아: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 및 pRIT5(Pharmacia, Uppsala, Sweden). 진핵: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL (Pharmacia).

발현 벡터는 일반적으로 프로모터 서열 근처에 위치한 편리한 규제 부위가 있어서 이중 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 삽입을 가능케한다. 발현 숙주에서 작동하는 선택가능 마커가 존재할 수 있다. 적절한 발현 벡터에는, 비제한적으로, 바이러스성 벡터(예컨대 백신 바이러스를 근거로 하는 바이러스성 벡터; 폴리오 바이러스; 아데노바이러스(예를 들어, Li 등, Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543 2549, 1994; Borrás 등, Gene Ther 6:515 524, 1999; Li 및 Davidson, PNAS 92:7700 7704, 1995; Sakamoto 등, H Gene Ther 5:1088 1097, 1999; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655); 아데노-관련 바이러스(예를 들어, Ali 등, Hum Gene Ther 9:81 86, 1998, Flannery 등, PNAS 94:6916 6921, 1997; Bennett 등, Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857 2863, 1997; Jomary 등, Gene Ther 4:683 690, 1997, Rolling 등, Hum Gene Ther 10:641 648, 1999; Ali 등, Hum Mol Genet 5:591 594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski 등, J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson 등, Virol. (1988) 166:154-165; 및 Flotte 등, PNAS (1993) 90:10613-10617); SV40; 단순 포진 바이러스; 인간 면역결핍바이러스(예를 들어, Miyoshi 등, PNAS 94:10319 23, 1997; Takahashi 등, J Virol 73:7812 7816, 1999 참조); 레트로바이러스성 벡터(예를 들어, 쥐과 백혈병 바이러스, 비장괴사 바이러스 및, 라우스 육종바이러스, Harvey 육종바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식 육종바이러스 및 유방암 바이러스와 같은 레트로바이러스에서 유래된 벡터) 등이 포함된다.

상기와 같이, 연구대상 핵산은 연구대상 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 연구대상 핵산은 상기와 같이, 항-CD22 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

세포

본 개시는 연구대상 핵산으로 유전자 변형이 된 단리된 유전자 변형 숙주 세포(예를 들어, 체외 세포)를 제공한다. 일부 구현예에서, 연구대상 단리된 유전자 변형 숙주 세포는 연구대상 항체를 생산할 수 있다.

적절한 숙주 세포는 포유류 세포, 곤충 숙주 세포, 효모 세포와 같은 진핵 숙주 세포; 및 박테리아 세포와 같은 원핵 세포를 포함한다. 숙주 세포로의 연구대상 핵산의 도입은, 예를 들어 인산칼슘 침전법, DEAE 텍스트란-매개 형질주입, 리포솜-매개 형질주입, 전기 천공법 또는 기타 알려진 방법에 의해 야기될 수 있다.

적절한 포유류 세포는 1차 세포 및 무한증식(immortalized) 세포주를 포함한다. 적절한 포유류 세포주는 인간 세포주, 인간 제외 영양류 세포주, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트) 세포주 등을 포함한다. 적절한 포유류 세포주에는, 비제한적으로, HeLa 세포(예를 들어, American Type Culture Collection(ATCC) No. CCL-2), CHO 세포(예를 들어, ATCC Nos. CRL9618, CCL61, CRL9096), Vero 세포, NIH 3T3 세포(예를 들어, ATCC No. CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포(예를 들어, ATCC No. CCL10), PC12 세포(ATCC No. CRL1721), COS 세포, COS-7 세포(ATCC No. CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포(ATCC No. CCL1.3), 인간 배아 신장(HEK) 293 세포(ATCC No. CRL1573), HLHepG2 세포 등이 포함된다.

적절한 효모 세포는, 비제한적으로, *Pichia pastoris*(피치아 파스토리스), *Pichia finlandica*(피치아 핀란드카), *Pichia trehalophila*(피치아 트레할로필라), *Pichia koclamae*(피치아 코클라마), *Pichia membranaefaciens*(피치아 멤브라나에파시엔스), *Pichia opuntiae*(피치아 오푸티아), *Pichia thermotolerans*(피치아 테르모톨레란스), *Pichia salictaria*(피치아 살릭타리아), *Pichia guercuum*(피치아 구에르쿰), *Pichia pijperi*(피치아 피지페리), *Pichia stiptis*(피치아 스틱티스), *Pichia methanolica*(피치아 메타놀리카), *Pichia sp.*(피치아속균), *Saccharomyces cerevisiae*(사카로미세스 세레비시아), *Saccharomyces sp.*(사카로미세스속균), *Hansenula polymorpha*(한세놀라 폴리모르파), *Kluyveromyces sp.*(클루이베로마이세스속균), *Kluyveromyces lactis*(클루이베로마이세스 락티스), *Candida albicans*(칸디다 알비칸스), *Aspergillus nidulans*(아스페르길루스 니둘란스), *Aspergillus niger*(아스페르길루스 니게르), *Aspergillus oryzae*(아스페르길루스 오리자), *Trichoderma reesei*(트리코더마 레세이), *Chrysosporium lucknowense*(크리소스포리움 룩크노웬스), *Fusarium sp.*(푸자리움속균), *Fusarium gramineum*(푸자리움 그라미네움), *Fusarium venenatum*(푸자리움 베네나툼), *Neurospora crassa*(네우로스포라 크라사), *Chlamydomonas reinhardtii*(클라미도모나스 레인하르

드티) 등을 포함한다.

적절한 원핵 세포는, 비제한적으로, 대장균, 락토바실리어스속균, 살모넬라속균, 시겔라속균 등의 다양한 실험실 균주를 포함한다. 예를 들어, Carrier 등 (1992) *J. Immunol.* 148:1176-1181; U.S. Patent No. 6,447,784; 및 Sizemore 등 (1995) *Science* 270:299-302 참조. 본 발명에 사용될 수 있는 살모넬라 균주의 예에는, 비제한적으로, 살모넬라 타이피 및 S. 타이피뮤리움이 포함된다. 적절한 시겔라 균주에는, 비제한적으로, *Shigella flexneri*(시겔라 플렉스네리), *Shigella sonnei*(시겔라 손네이) 및 *Shigella dysenteriae*(시겔라 디센테리아)가 포함된다. 전형적으로, 실험실 균주는 비-병원균이다. 기타 적절한 박테리아의 비제한적 예에는, *Bacillus subtilis*(바실러스 서브틸리스), *Pseudomonas putida*(슈도모나스 푸디타), *Pseudomonas aeruginosa*(슈도모나스 아에루기노사), *Pseudomonas mevalonii*(슈도모나스 메발로니), *Rhodobacter sphaeroides*(로도박터 스페로이데스), *Rhodobacter capsulatus*(로도박터 캡슐라투스), *Rhodospirillum rubrum*(로도스피릴럼 루브룸), *Rhodococcus* sp.(로도코쿠스 속균) 등이 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 대장균이다.

약제학적 조성물

본 개시는 연구대상 항체를 포함하는, 약제학적 조성물을 비롯한 조성물을 제공한다. 일반적으로, 제형은 연구대상 항체의 유효량을 포함한다. "유효량"은 원하는 결과, 예를 들어, 암 B 세포의 숫자 감소, 자가반응성 B 세포의 숫자 및/또는 활성의 감소 등을 야기하기 위해 충분한 복용량을 의미한다. 어떤 경우에는, 원하는 결과가 대조군과 비교할 때, 최소한 B 세포 악성증상의 증상의 감소이다.

제형

연구대상 방법에서, 연구대상 항체는 원하는 효과 또는 진단 효과를 야기할 수 있는 모든 편의 수단을 사용하여 숙주에 투여될 수 있다. 따라서, 제제는 치료를 위한 투여용의 다양한 제형에 편입될 수 있다. 더 특별하게는, 연구대상 항체가 적당한, 약제학적으로 허용가능한 운반체 또는 희석제와의 병용으로, 약제학적 조성물에 제형화될 수 있고, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌약, 주사제, 흡입제 및 에어로졸과 같은 고체, 반-고체, 액체 또는 기체 형태의 제제로 제형화될 수 있다.

약제학적 복용 형태로, 연구대상 항체는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여되거나, 또는 단독으로 사용되거나 또는 다른 약제학적 활성 화합물과의 병용 및 적절한 연계로 사용될 수 있다. 하기 방법 및 부형제는 단지 예시적이며, 결코 제한적이지 않다.

경구형 제제를 위해, 연구대상 항체는 단독으로 또는 적절한 첨가제와 병용하여, 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 종래 첨가제; 결정질 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 옥수수 전분, 감자 전분 또는 소듐 카르복시메틸셀룰로오스와 같은 붕해제; 활성 또는 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제; 및 원할 경우, 희석제, 완충 제제, 습윤 제제, 보존제 및 향미제와 함께, 정제, 분말, 과립 또는 캡슐을 만들 수 있다.

연구대상 항체는 수성 용매 또는, 채소 기름 및 기타 유사 기름, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜과 같은 비수성 용매에 상기 항체를 분해, 현탁 또는 유화시킴으로써 주사제용 제제에 제형화될 수 있는데, 원할 경우, 용해 보조제, 등장성 제제, 현탁 제제, 유화 제제, 안정화제 및 보존제와 같은 종래 첨가제와 함께 제형화될 수 있다.

연구대상 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 원하는 순도의 상기 항체를 임의의 생리학적으로 허용가능한 운반체, 부형제, 안정화제, 계면활성제, 완충용액 및/또는 긴장성 제제와 혼합하여 제조될 수 있다. 허용가능한 운반체, 부형제 및/또는 안정화제는 사용된 복용량 및 농도에서 수혜자에게 해가되지 않고, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충용액; 아스코르브산, 글루타티온, 시스테인, 메티오닌 및 시트린산을 비롯한 항산화제; 보존제(예컨대, 에탄올, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 염화벤잘코늄 또는 이들의 조합들); 아르기닌, 글라이신, 오르니틴, 라이신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린 및 이들의 조합과 같은 아미노산; 당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 젤라틴 또는 혈청 알부민; 킬레이팅 제제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 트레할로오스, 수크로오스, 락토오스, 글루코오스, 만노오스, 말토오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 소르비토오스, 라피노오스, 글루코사민, N-메틸글루코사민, 갈락토사민 및 뉴라민산; 및/또는 Tween, Brij Pluronic, 트리톤-X 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

약제학적 조성물은 액체 형태, 감압하 동결건조 형태 또는 액체 동결건조 형태에서 환원된 액체 형태일 수 있는

데, 여기서 감압하 동결건조된 제제는 투여 전에 살균 용액으로 환원되어야 한다. 동결건조된 조성물의 환원을 위한 표준 절차는 어느 정도의 부피의 순수한 물(전형적으로 감압 하 동결건조 시 제거된 부피와 동등한 양의 물)을 다시 첨가하는 것인데; 그러나 항박테리아 제제를 포함하는 용액이 비경구 투여용 약제학적 조성물의 생산을 위해 사용될 수 있다; Chen (1992) Drug Dev Ind Pharm 18, 1311-54 참조.

연구대상 약제학적 조성물 중의 예시적 항체 농도는 범위가 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/ml 또는 약 50 mg/mL 내지 약 200 mg/mL, 또는 약 150 mg/mL 내지 약 200 mg/mL일 수 있다.

상기 항체의 수성 제형은 예를 들어, pH 범위가 약 4.0 내지 약 7.0 또는 약 5.0 내지 약 6.0 또는 대안적으로 약 5.5인 pH-완충 용액에서 제조될 수 있다. 이 범위 내의 pH에 적절한 완충용액은 포스페이트-, 히스티딘-, 시트레이트-, 숙시네이트-, 아세테이트-완충용액 및 기타 유기산 완충용액을 포함한다. 완충용액 농도는 예를 들어 완충용액 및 제형의 원하는 긴장성에 따라, 약 1 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 50 mM일 수 있다.

긴장성 제제는 상기 제형의 긴장성을 조절하기 위해 항체 제형에 포함될 수 있다. 예시적 긴장성 제제는 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린 및 아미노산의 그룹 중의 성분, 당류 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 수성 제형은 등장성이지만, 고장성 또는 저장성용액이 적절할 수 있다. 용어 "등장성"은 생리 염 용액 또는 혈청과 같이, 비교되는 일부 다른 용액과 동일한 긴장성을 갖는 용액을 가리킨다. 긴장성 제제는 약 5 mM 내지 약 350 mM의 양으로, 예를 들어, 100 mM 내지 350 mM의 양으로 사용될 수 있다.

계면활성제 또한 항체 제형에 첨가되어 제형화된 항체의 응집을 감소시키고 및/또는 상기 제형 중의 입자의 형성을 최소화하고 및/또는 흡착을 감소시킬 수 있다. 예시적 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(Tween), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르 (트리톤-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(Poloxamer, Pluronic) 및 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함한다. 적절한 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르의 예는 폴리소르베이트 20(상표 Tween 20TM으로 판매) 및 폴리소르베이트 80(상표 Tween 80TM으로 판매)을 포함한다. 적절한 폴리에틸렌-폴리프로필렌 공중합체의 예는 Pluronic® F68 또는 Poloxamer 188TM이란 이름으로 판매되는 것들이다. 적절한 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르의 예는 상표 BrijTM으로 판매되는 것들이다. 계면활성제의 예시적 농도는 범위가 약 0.001% 내지 약 1% w/v일 수 있다.

동결건조 과정 동안 불안정화 조건에 대하여 화학변화를 일으키기 쉬운 활성 성분(예컨대, 단백질)을 보호하기 위해 동결건조보호제 또한 첨가될 수 있다. 예를 들어, 알려진 동결건조보호제는 당류(글루코오스 및 수크로오스 포함); 폴리올(만니톨, 소르비톨 및 글리세롤); 및 아미노산(알라닌, 글라이신 및 글루탐산)을 포함한다. 동결건조보호제는 약 10 mM 내지 500 mM의 양으로 포함될 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 제형 연구대상 항체 및 하나 이상의 상기 식별 제제(예를 들어, 계면활성제, 완충용액, 안정제, 긴장성 제제)를 포함하고, 에탄올, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 염화벤잘코늄 및 이들의 조합과 같은 하나 이상의 보존제가 본질적으로 없다. 기타 구현예에서, 보존제는 예를 들어, 약 0.001 내지 약 2% (w/v)의 범위의 농도에서 상기 제형에 포함된다.

예를 들어, 연구대상 제형은 비경구 투여에 적절한 액체 또는 동결건조된 제형일 수 있고, 하기를 포함할 수 있다: 연구대상 항체 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL; 최소한 하나의 계면활성제 약 0.001 % 내지 약 1 %; 완충용액 약 1 mM 내지 약 100 mM; 임의로 안정제 약 10 mM 내지 약 500 mM; 및 긴장성 제제 약 5 mM 내지 약 305 mM; 및 pH는 약 4.0 내지 약 7.0.

또 다른 예로서, 연구대상 비경구 제형은 하기를 포함하는 액체 또는 동결건조된 제형이다: 연구대상 항체 약 1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL; 0.04% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5.

또 다른 예로서, 연구대상 비경구 제형은 하기를 포함하는 동결건조된 제형을 포함한다: 1) 연구대상 항체 15 mg/mL; 0.04% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 2) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.04% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 3) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 4) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.04% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5; 또는 6) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5.

또 다른 예로서, 연구대상 비경구 제형은 하기를 포함하는 액체 제형이다: 1) 연구대상 항체 7.5 mg/mL; 0.022% Tween 20 w/v; 120 mM L-히스티딘; 및 250 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 2) 연구대상 항체 37.5 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 10 mM L-히스티딘; 및 125 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 3) 연구대상 항체

37.5 mg/mL; 0.01% Tween 20 w/v; 10 mM L-히스티딘; 및 125 mM 수크로오스; 및 pH = 5.5; 또는 4) 연구대상 항체 37.5 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 10 mM L-히스티딘; 125 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5; 또는 5) 연구대상 항체 37.5 mg/mL; 0.01% Tween 20 w/v; 10 mM L-히스티딘; 및 125 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5; 또는 6) 연구대상 항체 5 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5; 또는 7) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 만니톨; 및 pH = 5.5; 또는 8) 연구대상 항체 75 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L 히스티딘; 및 140 mM 염화나트륨; 및 pH = 5.5; 또는 9) 연구대상 항체 150 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 트레할로오스; 및 pH = 5.5; 또는 10) 연구대상 항체 150 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 250 mM 만니톨; 및 pH = 5.5; 또는 11) 연구대상 항체 150 mg/mL; 0.02% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 140 mM 염화나트륨; 및 pH = 5.5; 또는 12) 연구대상 항체 10 mg/mL; 0.01% Tween 20 w/v; 20 mM L-히스티딘; 및 40 mM 염화나트륨; 및 pH = 5.5.

연구대상 항체는 흡입을 통해 투여되도록 에어로졸 제형에 활용될 수 있다. 연구대상 항체는 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 가압된 허용가능한 압축가스로 제형될 수 있다.

뿐만 아니라, 연구대상 항체는 유화 염기 또는 수용성 염기와 같은 다양한 염기들을 혼합하여 좌약으로 만들 수 있다. 연구대상 항체를 좌약을 통해 직장으로 투여될 수 있다. 좌약은 코코아 버터, 카보왁스 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 운반체를 포함할 수 있고, 이것은 체온에서 녹지만 실온에서는 고체화된다.

경구 또는 직장 투여를 위한, 시럽, 엘릭시르제 및 현탁액과 같은 단위 복용량 형태가 제공될 수 있고, 여기서 각 복용량 단위, 예컨대 찻숟가락, 밥숟가락 가득 정제 또는 좌약은 하나 이상의 억제제를 함유하는 조성물의 사전결정된 양을 함유한다. 이와 유사하게, 주사제 또는 정맥 투여를 위한 단위 복용량 형태는 살균수, 정상적인 생리식염수 또는 또 다른 약제학적으로 허용가능한 운반체 중의 용액인 조성물 중에 연구대상 항체를 포함할 수 있다.

본원에 사용되는 용어 "단위 복용량 형태"는 인간 및 동물 개체를 위한 단일 복용량으로서 물리적으로 별개의 단위를 가리키고, 각 단위는 약제학적으로 허용가능한 희석제, 운반체 또는 비히클과 관련된 원하는 효과를 야기하기에 충분한 양으로 계산된, 본 발명의 화합물의 사전결정된 양을 함유한다. 연구대상 항체에 대한 사양은 활용된 특정 항체, 달성하려는 효과 및, 숙주 중의 각 항체와 관련된 약동학에 따라 다를 수 있다.

기타 투여 방식은 또한 본 발명의 사용법을 발견하게 한다. 예를 들어, 연구대상 항체는 좌약으로 제형되고, 어떤 경우에는, 에어로졸 및 비강내 조성물로 제형된다. 좌약의 경우, 비히클 조성물은 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드와 같은 전통적인 결합제 및 운반체를 포함한다. 이와 같은 좌약은 약 0.5% 내지 약 10% (w/w), 예를 들어, 약 1% 내지 약 2%의 범위의 활성 성분을 함유하는 혼합물들에서 형성될 수 있다.

비강내 제형은 일반적으로 비강 점막을 자극하지 않고 점도 기능을 의미있게 방해하지 않는 비히클을 포함한다. 물, 수성 생리식염수 또는 기타 알려진 물질과 같은 희석제가 본 발명에서 활용될 수 있다. 비강 제형은 또한 비제한적으로, 클로로부탄올 및 염화벤잘코늄과 같은 보존제를 함유할 수 있다. 계면활성제가 존재하여 비강 점막에 의한 연구대상 단백질의 흡수를 증진시킬 수 있다.

연구대상 항체는 주사가 가능 제형으로서 투여될 수 있다. 전형적으로, 주사가 가능 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로 조성되고; 주입 전 액체 비히클 중의 용액 또는 현탁액으로 적절한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 상기 제제는 또한 유화될 수 있고 또는 상기 항체가 리포솜 비히클 안에서 캡슐화될 수도 있다.

적절한 부형제 비히클은 예를 들어, 물, 생리식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합물이다. 뿐만 아니라, 원하는 경우, 상기 비히클은 습윤제 또는 유화 제제 또는 pH 완충용액 제제와 같은 부가적 물질을 소량 함유할 수 있다. 이와 같은 복용량 형태를 제조하는 실질적인 방법은 알려져 있고, 또는 당해기술의 숙련자에게 명백할 것이다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985 참조. 투여될 조성물 또는 제형은, 어떤 경우에는, 치료받을 개체에서 원하는 상태를 달성하기에 충분한 연구대상 항체의 양을 함유한다.

비히클, 보조제, 운반체 또는 희석제와 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제는 쉽게 구할 수 있다. 게다가, pH 조절 및 완충 제제, 긴장성 조절 제제, 안정화제, 습윤 제제 등과 같은 약제학적으로 허용가능한 보조 물질은 쉽게 구할 수 있다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 서방형 제형으로 제형화된다. 서방형 제제는 당해기술에 잘 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적절한 예에는 예컨대 필름 또는 마이크로캡슐과 같이 형태가 있는 물

품의 형태로 매트릭스가 존재하는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함된다. 서방형 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 히드로겔, 폴리락티드, 분해성 락탄-글리콜산 공중합체 및 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 생물학적 활성의 가능한 손실 및 서방형 제제에 포함되는 항체의 면역원성의 가능한 변화는 적당한 첨가제를 사용함으로써, 수분 함량을 조절함으로써, 그리고 특이적 중합체 매트릭스 조성물을 개발함으로써, 방지될 수 있다.

본 발명의 범위 내에서의 조절된 방출은 수많은 확장된 방출 복용량 형태들 중 하나를 의미하는 것으로 받아들일 수 있다. 하기 용어들은 본 발명의 목적을 위해 실질적으로 조절된 방출과 동등한 의미로 간주될 수 있다: 연속적 방출, 조절된 방출, 지연된 방출, 데포(depot), 점진적 방출, 장기 방출, 프로그램된 방출, 장기적 방출, 비례 방출, 연장된 방출, 지속성, 지체, 느린 방출, 간격 방출, 지속적 방출, 타이프 코트, 시간별 방출, 지연된 작용, 확장된 작용, 증상 시간 작용, 긴 작용, 연장된 작용, 반복 작용, 서행 작용, 지지속적인 작용, 지속적 작용 약물 및 확장된 방출. 이들 용어의 추가 논의는 Leszczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.)에서 발견될 수 있다.

다양한 조절 방출 기술은 약물 복용량 형태의 광범위한 스펙트럼을 아우른다. 조절 방출 기술은, 비제한적으로, 물리적 시스템 및 화학적 시스템을 포함한다.

물리적 시스템은, 비제한적으로, 속도-조절 막을 갖는 저장 시스템, 예컨대 미세캡슐형성, 거대캡슐형성 및 막 시스템; 속도-조절 막이 없는 저장 시스템, 예컨대 유공 섬유, 초미세다공성 셀룰로오스 트리아세테이트, 및 다공성 중합체 기질 및 포말; 비-다공성 중합체형 또는 탄성 중합체형 매트릭스(예를 들어, 침식 불가능, 침식 가능, 환경적 제제 진입, 및 분해성)에 물리적으로 용해되는 시스템을 비롯한 일체식 시스템 및, 비-다공성, 중합체성 또는 탄성 중합체형 매트릭스(예를 들어, 침식 불가능, 침식 가능, 환경적 제제 진입 및 분해성)에 물리적으로 분산된 물질; 외부 조절 층과 화학적으로 유사하거나 또는 유사하지 않은 저장층을 비롯한 적층 구조물; 및 삼투압 펌프 또는 이온 교환 수지 상의 흡착과 같은 기타 물리적 방법을 포함한다.

화학적 시스템은, 비제한적으로, 중합체 매트릭스의 화학적 침식(예를 들어, 이중 또는 동중 침식) 또는 중합체 매트릭스의 생물학적 침식(예를 들어, 이중 또는 동중)을 포함한다. 조절 방출을 위한 시스템의 분류들에 대한 추가적 논의는 Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.)에서 발견될 수 있다.

경구 투여를 위해 개발된 수많은 조절 방출 약물 제형이 있다. 이들은, 비제한적으로, 삼투압-조절 위장내 전달 시스템; 동수압-조절 위장내 전달 시스템; 막 투과-조절 위장내 전달 시스템(미세다공성 막 투과-조절 위장내 전달 장치 포함); 위액-저항 내장 표적 조절-방출 위장내 전달 장치; 겔 확산-조절 위장내 전달 시스템; 및 이온 교환-조절 위장내 전달 시스템(양이온 및 음이온 약물)을 포함한다. 조절 방출 약물 전달 시스템 관련 추가적 정보는 Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.)에서 발견될 수 있다. 이들 제형들 중 일부는 더 상세히 논의될 것이다.

복용량

적절한 복용량은, 다양한 임상 요인을 기준으로, 내과의사 또는 다른 자격 있는 의료요원에 의해 결정될 수 있다. 의료 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 환자 1명을 위한 복용량은 환자의 체격, 체표면 면적, 투여될 특정 화합물, 환자의 성별, 투여 시간 및 방법, 일반적 건강 상태, 및 동시 투여될 기타 약물에 따라 달라진다. 연구대상 항체는 용량당 1 ng/kg 체중 내지 20 mg/kg 체중의 양, 예컨대 0.1 mg/kg 체중 내지 10 mg/kg 체중, 예컨대 0.5 mg/kg 체중 내지 5 mg/kg 체중의 양으로 투여될 수 있으나; 상기 예시적 범위 이상 또는 이하의 용량, 특히 상기 요인들을 고려할 때, 예상된다. 상기 요법이 연속적인 주입인 경우, 이것은 또한 1분당 체중 1kg 당 1 µg 내지 10 mg의 범위일 수 있다.

숙련가들은 특이적 항체의 기능, 증상의 중증도 및 개체의 부작용 민감성에 따라 용량 수준이 달라질 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 주어진 화합물의 바람직한 복용량은 다양한 수단에 의해 당해기술의 숙련가에 의해 쉽게 결정된다.

투여 경로

연구대상 항체는 약물 전달에 적절한 모든 방법 및 방식을 사용하여 개인에게 투여되는데, 여기에는 투여의 체내 및 체외 방법뿐만 아니라 전신 및 국소 경로가 포함된다.

약제학적으로 허용가능한 종래의 투여 경로에는 비강내, 근육내, 기관내, 피하, 피내, 국소 처리법, 정맥내, 동맥내, 직장, 비강, 경구 및 기타 장내 및 비경구 경로 투여가 포함된다. 투여 경로는 원할 경우 병용될 수 있고, 또는 항체 및/또는 원하는 효과에 따라 조정될 수 있다. 연구대상 항체 조성물은 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 경구 투여된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 흡입 방식을 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 비강내로 투여된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 국소적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 두개내로 표현된다. 일부 구현예에서, 연구대상 항체 조성물은 정맥내로 투여된다.

상기 제제는 종래 약물의 전달에 적절한 사용가능한 종래의 모든 방법 및 경로를 사용하여, 숙주에 투여될 수 있는데, 여기에는 전신 또는 국소 경로가 포함된다. 일반적으로, 본 발명에서 고려된 투여 경로는, 비제한적으로, 장내, 비경구 또는 흡입 경로를 포함한다.

흡입 투여 이외의 비경구 투여 경로는, 비제한적으로, 국소, 경피, 피하, 근육내, 안와 내, 관절내, 척수내, 흉골내 및 정맥 경로, 즉 소화관을 통한 것 이외의 모든 투여 경로를 포함한다. 비경구 투여는 연구대상 항체의 전신 또는 국소 전달을 야기하기 위해 실행될 수 있다. 전신 전달이 바람직한 경우, 투여는 전형적으로 약제학적 제제의 침투성 또는 전신 흡수성 국소 또는 점막 투여를 수반한다.

연구대상 항체는 또한 장내 투여에 의해 개체에 전달될 수 있다. 장내 투여 경로는, 비제한적으로, 경구 및 직장(예를 들어, 좌약 사용) 전달을 포함한다.

치료란 최소한 숙주를 괴롭히는 병리적 상태와 관련된 증상의 완화를 의미하는데, 완화는 넓은 의미에서 매개변수, 예컨대 B 세포 악성종양 또는 B 세포-매개 자가면역 장애와 같은, 치료 대상인 병리적 상태와 연관된 증상의 최소한의 감소를 가리킨다. 이와 마찬가지로, 치료는 또한 병리적 상태, 또는 이것과 관련된 최소한의 증상들이 완전히 억제되는 상황, 예컨대 발병의 방지 또는 증상의 중단, 예컨대 종료되어, 병리적 상태, 또는 상기의 병리적 상태를 특징 짓는 최소한의 증상들로 고통받지 않는 상황을 포함한다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 주사에 의해, 예를 들어, 전신 전달(예를 들어, 정맥 주입) 또는 국소 부위로, 투여된다.

다양한 숙주(용어 "숙주"는 본원에서 용어 "개체," "개인" 및 "환자"와 바꿔쓰임)는 연구대상 방법에 따라 치료가 가능하다. 일반적으로 이와 같은 숙주는 "포유류" 또는 "포유동물"인데, 이와 같은 용어는 포유류 강에 포함되는 유기생명체를 묘사하기 위해 광범위하게 사용되고, 여기에는 육식동물 목(예를 들어, 개와 고양이), 설치류(예를 들어, 마우스, 기니아피그 및 래트) 및 유인원(예를 들어, 인간, 침팬지 및 원숭이)가 포함된다. 일부 구현예에서, 숙주는 인간이다.

예컨대, 경구 또는 주사가 가능 용량에, 연구대상 항체의 단위 용량을 갖는 키트가 제공된다. 이와 같은 키트에서, 단위용량을 함유하는 용기뿐만 아니라, 포장의 정보 삽입구에 관심대상의 병리적 상태를 치료하는 데 상기 항체의 사용 및 수반되는 혜택이 기술된다. 바람직한 화합물 및 단위 용량은 상기와 같다.

치료 방법

본 개시는 CD22-양성 B 세포, 예를 들어, 암 CD22-양성 B 세포; 자가반응성 CD22-양성 B 세포와 관련이 있거나 또는 이들로 인해 야기되는 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

B 세포 악성종양의 치료

본 개시는 B 세포 악성종양의 치료 방법을 제공하는데, 상기 방법은 일반적으로 이 방법을 필요로 하는 개인(예를 들어, B 세포 악성종양을 가진 개인)에게 유효량의 연구대상 항체를, 단독으로(예컨대, 단독요법) 또는 하나 이상의 추가적 치료제와 병용하여(예컨대, 병용 요법), 투여하는 것을 수반한다.

B-세포 악성 종양은 예를 들어, 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병 및 전립선구 백혈병을 포함한다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체의 유효량은, 하나 이상의 용량으로, 단독으로(예컨대, 단독요법) 또는 하나 이상의 추가적 치료 제제와의 병용으로(예컨대, 병용 요법) 투여된 경우, 항체를 사용한 치료가 부재한 개인의 암 B 세포의 숫자와 비교했을 때, 개인의 암 B 세포의 숫자를 최소한 약 5%, 최소한 약 10%, 최소한 약 15%, 최소한 약 20%, 최소한 약 25%, 최소한 약 30%, 최소한 약 40%, 최소한 약 50%, 최소한 약 60%, 최소한 약 70%, 최소한 약 80%, 최소한 약 90% 또는 그 이상 감소시키는 효과가 있는 양이다.

병용 요법

일부 구현예에서, B 세포 악성종양을 치료하는 연구대상 방법은 연구대상 항체 및 하나 이상의 추가적 치료 제제를 투여하는 것을 수반한다. 적절한 추가적 치료 제제는, 비제한적으로, 항암제(상기와 같이)를 포함한다.

B 세포-매개 자가면역 장애 치료

본 개시는 B 세포-매개 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 일반적으로 상기 방법을 필요로 하는 개인(예를 들어, B 세포-매개 자가면역 장애를 가진 개인)에게 연구대상 항체의 유효량을 단독으로(예컨대, 단독요법) 또는 하나 이상의 추가적 치료 제제와의 병용으로(예컨대, 병용 요법) 투여하는 것을 수반한다. B 세포-매개 자가면역 장애는 주로 병리가 하나 이상의 자가항원에 특이적 항체의 존재로 인한 것인 자가면역이다. 이와 같이, B 세포-매개 자가면역 장애는 또한 항체-매개 자가면역 장애로 일컬어질 수 있다.

B 세포-매개 자가면역 장애는 예를 들어, 전신 홍반성 낭창, 중증 근무력증, 자가면역 심근염, 류마티스성 관절염 등을 포함한다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체의 유효량은 하나 이상의 용량으로, 단독으로(예컨대, 단독요법) 또는 하나 이상의 추가적 치료 제제와 병용으로(예컨대, 병용 요법) 투여될 경우, 항체를 사용한 치료가 부재한 개인의 자가반응성 B 세포의 숫자와 비교하여, 개인의 자가반응성 B 세포(자가항체를 생산하는 B 세포)의 숫자를 최소한 약 5%, 최소한 약 10%, 최소한 약 15%, 최소한 약 20%, 최소한 약 25%, 최소한 약 30%, 최소한 약 40%, 최소한 약 50%, 최소한 약 60%, 최소한 약 70%, 최소한 약 80%, 최소한 약 90% 또는 그 이상으로 감소시키는 데 효과적인 양이다.

병용 요법

일부 구현예에서, B 세포-매개 자가면역 질환을 치료하는 연구대상 방법은 연구대상 항체 및, 하나 이상의 추가적 치료 제제를 투여하는 것을 수반한다. 적절한 추가적 치료 제제는, 비제한적으로, 면역억제 제제, 항-염증 제제 등을 포함한다.

치료에 적합한 개체

다양한 개체가 연구대상 방법을 사용한 치료를 받기에 적합하다. 적합한 개체는 모든 개인, 예컨대 B 세포 악성종양을 가진 인간; B 세포 악성종양 진단을 받은 인간; B 세포 악성종양이 있었던 적이 있고, B 세포 악성종양이 재발할 위험이 있는 인간; B 세포 악성종양 때문에 연구대상 항-CD22 항체 이외의 다른 제제로 치료를 받았으나(예를 들어, 항암제 치료를 받은 경우) 상기 제제에 반응이 없었던 인간; 또는 B 세포 악성종양 때문에 연구대상 항-CD22 항체 이외의 다른 제제로 치료를 받아서(예를 들어, 항암제 치료를 받은 경우), 처음에는 상기 제제에 반응이 있었으나 차후에 반응이 중단된(예컨대, 재발된) 인간을 포함한다.

연구대상 방법을 사용하여 B 세포-매개 자가면역 장애에 대한 치료를 받기에 적합한 개체는 모든 개인, 예컨대 B 세포-매개 자가면역 장애를 가진 인간; B 세포-매개 자가면역 장애를 진단받은 인간; B 세포-매개 자가면역 장애를 가진 적이 있고 B 세포-매개 자가면역 장애가 재발할 위험이 있는 인간; 연구대상 항-CD22 항체 이외의 제제로 B 세포-매개 자가면역 장애에 대해 치료받은 적이 있으나(예를 들어, 면역억제제로 치료받은 적이 있는 인간) 상기 제제에 반응이 없었던 인간; 또는 연구대상 항-CD22 항체 이외의 제제로 B 세포-매개 자가면역 장애에 대해 치료받은 적이 있는데(예를 들어, 면역억제제로 치료받은 적이 있음), 처음에는 상기 제제에 반응이 있었으나 차후에 반응이 중단된(예컨대, 재발된) 인간을 포함한다.

검출 방법

본 개시는 연구대상 항체의 사용을 수반하는 다양한 검출 방법을 제공한다. 검출 방법은 진단 방법, 예상(prognostic) 방법 및 모니터링 방법을 포함한다. 연구대상 검출 방법은 일반적으로 CD22 양성 세포, 예를 들어, B 세포, 예컨대 암 B 세포의 검출을 수반한다.

일부 구현예에서, 연구대상 방법은 진단 방법, 즉, 개인이 예를 들어 B 세포 악성종양을 가지고 있는가를 결정하기 위한 것이다.

일부 구현예에서, 연구대상 방법은 모니터링 방법, 예를 들어, B 세포 악성종양을 가진 것으로 진단이 난 바 있고, 상기 장애에 대해 치료를 받는 중인 개인은 치료에 대한 반응 및/또는 장애의 진행/퇴보에 대해 모니터링된다.

일부 경우에, 연구대상 검출 방법은 본 개시의 검출가능하게 표지된 항-CD22 항체를 개인에게 투여하는 단계; 및 개인 내 조직에 항체의 결합을 검출하는 단계를 수반한다. 검출은, 예를 들어, 자기공명촬영 또는 기타 다른 적절한 촬영 기법에 의해 달성될 수 있다.

다른 경우에, 연구대상 검출 방법은 본 개시의 검출가능하게 표지된 항-CD22 항체를 개인에게서 획득된 생체 시료와 접촉시키는 단계; 및 생체 시료에서 분자에 항체 결합을 검출하는 단계를 포함한다.

항-CD22 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 간접적 표지는 검출가능 표지를 포함하는 2차 항체를 포함하는데, 여기서 2차 항체가 연구대상 항-CD22 항체에 결합한다. 다른 간접적 표지는 바이오틴을 포함하는데, 여기서 바이오티닐화된 항-CD22 항체는 검출가능 표지를 포함하는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 사용하여 검출될 수 있다.

적절한 검출가능 표지는 분광분석적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단에 의해 검출가능한 모든 구성물을 포함한다. 적절한 표지는, 비제한적으로, 자석 비드(예컨대, Dynabeads™), 형광 염료(예를 들어, 플루오레세인이소티오시안산염, 텍사스 레드, 로다민, 초록 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 황색 형광 단백질 등), 방사성 표지(예를 들어, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C 또는 ³²P), 효소(예를 들어, 겨자무과산화효소, 알칼린 포스파타아제, 루시페라아제 및 효소-연결 면역흡착검사(ELISA)에 일반적으로 사용되는 것들) 및 콜로이드성 골드 또는 착색 유리 또는 플라스틱(예컨대 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 라텍스 등) 비드와 같은 표색계 표지를 포함한다.

일부 구현예에서, 연구대상 항체는 조영제 또는 방사선동위원소를 포함하는데, 상기 조영제 또는 방사선동위원소는 영상촬영 시, 예를 들어, 인간에게 실행되는 영상촬영 절차에 사용하기에 적합한 것이다. 표지의 비제한적인 예에는 ¹²³¹I(요오드), ¹⁸F(플루오린), ⁹⁹Tc(테크네튬), ¹¹¹In(인듐) 및 ⁶⁷Ga(갈륨)과 같은 방사선동위원소, 및 가돌리늄(Gd), 디스프로슘 및 철과 같은 조영제가 포함된다. 방사성 Gd 동위원소(¹⁵³Gd) 또한 인간 이외의 포유류의 영상촬영 과정에 적절하다. 연구대상 항체는 표준 기법들을 사용하여 표지될 수 있다. 예를 들어, 연구대상 항체는 클로르아민 T 또는 1,3,4,6-테트라클로로-3α,6α-테페닐글리코우릴을 사용하여 요오드화될 수 있다. 플루오르화의 경우, 플루오린이 플루오르화 이온 치환 반응에 의해 합성 중에 연구대상 항체에 첨가된다. 이와 같은 방사선동위원소를 사용한 단백질 합성에 대해서, Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) 및 Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16(2):209-244 (1999) 참조. 연구대상 항체는 또한 표준 기법을 통해 조영제로 표지될 수 있다. 예를 들어, 연구대상 항체는 Gd 디에틸렌 트리아민 펜타아세트산(GdDTPA) 또는 Gd 테트라아자시클로도데카네테트라아세틱(GdDOTA)과 같은 저분자 Gd 킬레이터를 상기 항체에 접합시킴으로써 Gd로 표지될 수 있다. Caravan 등, Chem. Rev. 99:2293-2352 (1999) 및 Lauffer 등, J. Magn. Reson. Imaging, 3:11-16 (1985) 참조. 연구대상 항체는, 예를 들어 폴리라이신-Gd 킬레이터를 상기 항체에 접합시킴으로써 Gd로 표지될 수 있다. 예를 들어, Curtet 등, Invest. Radiol., 33(10):752-761 (1998) 참조. 대안적으로, 연구대상 항체는 Gd 킬레이터 지질을 포함하는 상자성체 중합 리포솜을 아비딘 및 바이오티닐화된 항체로 배양함으로써 Gd로 표지될 수 있다. 예를 들어, Sipkins 등, Nature Med., 4:623-626 (1998) 참조.

연구대상 항체에 연결될 수 있는 적절한 형광 단백질은, 비제한적으로, 예를 들어, U.S. Patent No. 6,066,476; 6,020,192; 5,985,577; 5,976,796; 5,968,750; 5,968,738; 5,958,713; 5,919,445; 5,874,304에 기술된 Aequoria victoria에서 유래된 초록 형광 단백질 또는 이것의 돌연변이체 또는 유도체; 예를 들어, 개선했던 GFP (이와 같은 GFP는 많은 경우, Clontech, Inc. 등에서 구매가 가능함); 적색 형광 단백질; 황색 형광 단백질; 예를 들어, Matz 등 (1999) Nature Biotechnol. 17:969-973에 기술된 Anthozoan 중에서 유래된 다양한 형광 및 착색 단백질을 포함한다.

키트

본 개시는 연구대상 항체를 포함하는 키트(예를 들어, 테스트 키트)를 제공한다. 연구대상 키트는 연구대상 검출 방법을 실행하는 데 유용하다.

연구대상 키트는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 연구대상 항체, 상기 항체를 인코딩하는 핵산, 또는 연구대상 핵산을 포함하는 세포. 연구대상 키트에서의 연구대상 항체는 인간화될 수 있다. 연구대상 키트는 항체의 표지를 위한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 연구대상 키트의 항체는 검출가능 표지를 포함한다.

상기 키트의 다른 선택적 구성성분은 하기를 포함한다: 완충용액; 프로테아제 억제제; 검출가능 표지 등. 연구

대상 키트가 연구대상 핵산을 포함할 경우, 상기 핵산은 또한 규제 부위, 다중 클로닝 부위, 프라이머 사이트 등을 포함할 수 있다. 상기 키트의 다양한 구성성분이 별도의 용기들에 존재할 수 있고, 또는 원할 경우, 양립 가능한 구성성분들끼리 단일 용기에 사전-조합될 수도 있다.

상기 구성성분들 이외에도, 연구대상 키트는 상기 키트의 구성성분들을 사용하여 연구대상 방법을 실천하기 위한 지시사항을 포함한다. 연구대상 방법을 실행하기 위한 지시사항은 일반적으로 적절한 기록 매체에 기록되어 있다. 예를 들어, 상기 지시사항은 종이 또는 플라스틱과 같은 기질 상에 인쇄될 수 있다. 이와 마찬가지로, 지시사항은 키트의 용기 또는 키트의 구성성분의 용기에 붙은 표지에, 포장 삽입부로서 키트에 존재할 수 있다(즉, 포장 또는 속포장과 관련). 다른 구현예에서, 지시사항은 적절한 컴퓨터 관독이 가능한 보관 매체, 예컨대 CD-ROM, DVD, 디스켓 등에 존재하는 전자 보관 데이터파일로 존재한다. 또 다른 구현예에서는, 실질적인 지시사항이 키트에 존재하지 않지만, 원격 공급원에서, 예컨대 인터넷을 통해, 지시사항을 획득하는 방법이 제공된다. 이와 같은 구현예의 예는 지시사항을 열람할 수 있고 지시사항이 다운로드될 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 지시사항과 마찬가지로, 지시사항을 획득하는 방법 역시 적절한 기질에 기록되어 있다.

실시예

하기 실시예들은 당해기술의 숙련가들에게 본 발명의 제조 및 사용 방법에 대한 완전한 개시 및 기술을 제공하기 위해 제시된 것으로, 발명가들이 그들의 발명으로 여기는 것의 범위를 제한하기 위한 것이 아니며, 하기 실험들이 실행된 실험의 전부이거나 또는 유일함을 나타내려는 것도 아니다. 사용된 숫자들(예컨대, 수량, 온도 등)과 관련하여 정확성을 확보하기 위해 노력하였으나, 일부 실험상의 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는 한, 파트(part)는 중량 기준 파트이고, 분자량은 평균 분자량의 중량이고, 온도는 섭씨를 나타내며, 압력은 대기압 또는 그 근처 기압이다. 표준 약어가 사용되는데, 예를 들어, bp는 염기쌍(들)이고; kb는 킬로베이스; pl은 피코리터; s 또는 sec은 초(시간)이고; min은 분(시간)이고; h 또는 hr는 시간이고; aa는 아미노산(들)이고; kb는 킬로베이스(들)이고; bp는 염기쌍(들)이고; nt는 뉴클레오타이드(들)이고; i.m.은 근육내를 뜻하고; i.p는 복강내를 뜻하며; s.c는 피하를 뜻한다.

본 실시예에서 언급된 구매가능 시료들은, 달리 지시되지 않는 한, 제조업체의 지시에 따라 사용하였다. 하기 실시예에서 그리고 본 명세서를 통틀어 ECACC 수납 번호에 의해 식별된 세포의 공급처는 European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, England이다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적/과학적 용어들은 본 발명이 속한 당해기술의 숙련가에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예시적 방법 및 물질들이 하기에 기술되지만, 본원에 기술된 것들과 유사하거나 또는 동등한 방법 및 물질들 또한 본 발명의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있다. 물질, 방법 및 실시예들은 묘사를 위한 것일뿐, 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

실시예 1 - 키메라 항체의 생성

마우스 RFB4 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄 가변(V) 영역 서열(Campana, et al (1985) J. Immunol., 134, 134, 1524-1530. Mansfield et al (1997) Blood, 90, 2020-2026)을 합성하여 pANT 항체 발현 벡터(도 1)에 서브클론(subclone)하고, 중쇄 및 경쇄 V 영역은 각각 pANT17 및 pANT13에 클론하였다. 중쇄 V 영역 유전자를 인간 $\gamma 1$ 중쇄 유전자(G1m3 (G1m(f)) 동종이인자형(allotype)을 갖는 틀에서 MluI 및 HindIII 부위를 통해 pANT17에 클론하고, 경쇄 V 영역 유전자를 인간 카파 경쇄 불변 영역 유전자(Km3 동종이인자형)를 갖는 틀에서 BssHII 및 BamHI 부위를 통해 pANT13에 클론하였다. 중쇄 및 경쇄 유전자 모두의 전사는 CMV I/E 프로모터의 통제 하에 이루어졌고(US5168062 및 US5385839, University of Iowa), pANT17 플라스미드는 SV40 프로모터의 통제 하에 돌연변이체 *dhfr* 꼬마유전자(Simonsen & Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499) 및 진핵 세포에서의 선택을 위한 폴리A 서열을 함유하였다. pANT17 및 pANT13 모두 원핵 선택을 위한 β -락타마아제(Ap^R) 유전자 및 원핵 세포에서의 증식을 위한 복제의 pMB1 복제기점을 함유하였다. 모든 플라스미드를 대장균 DH5 알파(Invitrogen Cat. No. 18265-017)에서 증식시켰다.

중쇄 및 경쇄 발현 구성물들을 차후에 인산칼슘-기본 형질주입에 의해 HEK293 c18 세포에 일시적으로 공동-형질주입하거나 또는 전기 천공법에 의해 NS0 세포에 안정적으로 형질주입하였다. HEK293 c18 또는 NS0 세포에서 분리된 수득된 키메라 RFB4 항체를 세포 배양액 상청액에서 단백질 A 크로마토그래피로 정제하였고, PD-10 컬럼(GE Healthcare Cat. No. 17-0851-01)을 사용하여 인산염-완충 생리식염수(PBS)에 탈염(desalt)하였다. 각각의 개별 항체의 아미노산 조성물을 근거로 분자 흡광 계수를 사용하여 280nm에서의 UV 흡광도로 농도를 측정하였다.

실시예 2 - 인간화 항체의 생성

EP1844074 (Antitope Ltd)에 기술된 방법을 사용하여 인간화 항체를 생성하였다. 상기 항체의 CD22 결합 특성에 중요할 수 있는 중요한 골격 구조 아미노산(‘구속하는 잔기’)를 확인하기 위해, Swiss PDB를 사용하여 마우스 RFB4 V 영역의 구조 모형을 제작하고 분석하였다. 인간 V 영역 서열의 데이터베이스를 사용하여 인간화 항체의 설계에 사용되는 구속하는 잔기들 각각을 함유하는 인간 V 영역 서열들의 단편을 식별하였다. 설계된 인간화 항체 서열에 RFB4 CDR 서열을 존속시켰다. Fothergill 등(WO9859244, assignee Eclagen Ltd)에 기술된 가상실험 분석(*in silico* analysis)에 의한 비-생식계열 주요조직 적합 복합체(MHC) 클래스 II 펩티드 결합의 예측을 위해, 그리고 또한 ("The Immune Epitope Database and Analysis Resource" ([http://www\(dot\)immunepitope\(dot\)org/](http://www(dot)immunepitope(dot)org/))를 비롯한 데이터베이스를 사용하여 알려진 CD4⁺ T-세포 에피토프를 위해, 선호하는 V 영역 서열 세트를 설계 및 분석하였다. 예측된 비-생식계열 MHC 클래스 II 결합 펩티드 또는 T 세포 에피토프 데이터베이스에 반하는 유의미한 검색결과를 V 영역 서열들을 제거하였다. 이로써 감소된 V 영역 서열의 세트를 획득하였다. 그리고 나서, 선택된 중쇄 및 경쇄 V 영역 서열들을 조합하여 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 생산하였다. 인간화 RFB4 항체 생산에 사용하기 위해 6개의 중쇄 및 4개의 경쇄 서열(VH1을 VH6로, 그리고 VK1을 VK4로 각각 지정함)을 선택하였다. VH 서열 VH3(서열번호:3), VH4(서열번호:4) 및 VH5(서열번호:5), VH6(서열번호:6)을 포함하는 중쇄를 VL 서열 VK1(서열번호:7), VK2(서열번호:8) 및 VK4(서열번호:9)를 포함하는 경쇄와 짝을 이루었다.

인간화 VH를 인코딩하는 DNA 및 VK 변이체를 합성하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 발현 벡터 pANT17 및 pANT13(도 1)에 서브클론하였다. 인간화 VH 및 VK 사슬의 모든 조합들을 HEK293 c18 세포에 일시적으로 형질주입하고, 단백질을 크로마토그래피로 배양액 상청액에서 항체를 정제하고, 이어서 실시예 1에 기술된 바와 같이 탈염하였다.

실시예 3 - 인간화 항체의 분석

양친 키메라 항체와 비교하여, 경쟁 효소-연결 면역흡착검사(ELISA)로, HEK-유도 RFB4 인간화 변이체의 CD22 항원 결합을 분석하였다. 양친 RFB4 키메라 항체를 Biotin TagTM Micro Biotinylation 키트 (시그마-Aldrich)를 사용하여 바이오티닐화하였다. 96-웰 MaxiSorp 플레이트(Nunc)를 4° C에서 Dulbecco's PBS(PAA Laboratories, Yeovil, UK) 중의 1.0 µg/ml CD22-Fc(R&D Systems Cat. No. 1968SL) (최종 부피 60 µl)로 밤새 도포해두었다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 Dulbecco의 PBS-2% BSA로 블로킹하였다. 플레이트를 세척 완충용액(Dulbecco's-PBS 중 0.05% Tween20)으로 3회 세척하였다. 다양한 농도의 시험용 인간화 항체를 바이오티닐화된 양친 키메라 항체와 사전혼합(최종 농도 0.04 µg/ml)한 후, CD22-Fc 플레이트에 첨가하였다(최종 부피 60 µl). 모든 시료를 2중으로 시험하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 배양시키고, 세척 완충용액으로 3회 세척하였다. Streptavidin 겨자무과산화효소(HRP)(시그마-Aldrich)의 1/1000 희석액 60 µl를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 세척 완충용액으로 3회 세척하고, 3,3',5,5'-테트라메티벤지딘(TMB) 기질(Invitrogen) 60 µl를 첨가하고, 색이 발현되도록 실온의 암실에서 배양하였다. 50 µl의 3M HCl을 첨가하여 상기 반응을 중지시켰다. Dynex 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 플레이트를 판독하였다.

도 2에 나타낸 바와 같이, 모든 선두 인간화 RFB4 변이체는 양친 키메라 항체와 유사한 경쟁적 결합 프로파일을 나타내었다. 키메라 RFB4 및 인간화 RFB4 항체의 IC₅₀을, 야생형 RFB4 IgG1 항체와 대비하여, 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구성물	키메라 RFB4 IgG1 대비 IC ₅₀
키메라 RFB4	1.0
VH3/VK1	0.8
VH3/VK2	1.0
VH3/VK4	1.1
VH4/VK1	0.9
VH4/VK2	1.1
VH4/VK4	1.0
VH5/VK1	0.9
VH5/VK2	1.0
VH5/VK4	1.0
VH6/VK1	0.9
VH6/VK2	1.0
VH6/VK4	1.0

실시예 4 - CD4+ T 세포 반응의 분석

영국 국립 Blood Transfusion Service(Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK)에서 획득한 (채혈 24시간 이내의 혈액에서) 건강한 공동체 공여체 백혈구 연충에서, Addenbrooke's 병원 지역 연구 윤리위원회에서 받은 승인에 따라, 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하였다. Lymphoprep(Axis-shield, Dundee, UK) 밀도 원심분리로 백혈구연충에서 PBMC를 분리하고, CD⁸+ RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, London, UK)를 사용하여 CD8⁺ T 세포를 고갈시켰다. 조직-유형별 키트(Biotest, Solihull, UK)를 기반으로 HLA 단일-특이적-프라이머 폴리머라아제 연쇄 반응(SSP-PCR)을 사용하여 HLA-DR 단상형을 식별함으로써 공여체를 특징지었다. '복제력'조절 항원(Keyhole Limpet Haemocyanin(KLH), Pierce (Perbio), Cramlington, UK) 및, 인플루엔자 A 및 Epstein Barr 바이러스에서 유도된 조절 펩티드에 대한 T 세포 반응 역시 측정하였다. 그리고 나서 PBMC를 동결하고, 필요할 때까지 액체 질소에 보관하였다.

키메라 및 선두 VH4/VK1, VH5/VK1, VH6/VK4 인간화 항체를 단백질 A 크로마토그래피로 일시적으로 형질주입된 HEK293 c18 세포주에서 정제하고, 이어서 1x PBS 중의 26/60 Superdex S200 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 단량체 피크 분획(Monomeric peak fractions)을 수집하고, 정량화한 후, Endosafe®-PTS™ (Charles River, Margate, UK) 시스템을 사용하여 모든 제제물질에 대한 내독소 수준을 분석하였다.

세계 인구에서 발견되는 HLA-DR 동종이인자형의 개수 및 빈도수를 가장 잘 나타내기 위해 20개 공여체 집단을 선택하였다. 세계 인구에서 발견되는 동종이인자형과 대비하여 상기 집단에서 발견되는 동종이인자형의 분석 결과, 모든 주요HLA-DR 대립유전자(세계 인구에서 >5%의 빈도로 발견되는 개별 동종이인자형)가 잘 재현됨을 보여주었다. 각 공여체의 PBMCs를 AIM-V® 배양액(Invitrogen, Paisley, UK)에서 소생시켜, 세척한 후, AIM-V®에서 4~6x10⁶ PBMC/ml로 재현탁하였다. 각 공여체에 대해, 24-웰 플레이트의 적절한 웰들에 증식 세포 스톡(stock) 1 ml를 첨가하여 벌크 배양액을 조성하였다. 각각의 희석된 시료 0.5 ml와 함께 배양액 0.5ml를 PBMC에 첨가하여, 시료의 최종 농도를 시료당 50 µg/ml로 만들었다. 각 공여체에 대해, 복제력 대조군(100 µg/ml KLH로 배양된 세포) 및 배양액 전용 웰을 또한 포함시켰다. 총 8일 동안 37° C에서 5% CO₂로 배양액을 배양하였다. 5일, 6일, 7일 및 8일에, 각 웰의 세포를 부드럽게 재현탁시키고, 3 x 100 µl의 분액(aliquots)을 둥근 바닥 96-웰 플레이트의 각 웰에 옮겨 담았다. 상기 배양액은 100µl AIM-V® 배양액 중의 0.75 µCi [³H]-티미딘(Perkin Elmer®, Beaconsfield, UK)로 적용하고, TomTec Mach III 세포 수확기를 사용하여 필터 매트(Perkin Elmer®) 상에서 수확하기 전에 18시간 동안 배양하였다. 각 웰에 대한 분당 계수(cpm)를 1450 Microbeta Wallac Trilux Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer®) 상에서, 시차, 저백그라운드(low background) 계수로, Meltilex™(Perkin Elmer®) 섬광 계수로 측정하였다.

증식 분석을 위해, 2 이상(SI ≥ 2.0)인 자극 지수(SI)의 실험 한계점이 사전에 성립되었고, 여기서 이 한계점 이상의 증식 반응을 유도하는 시료는 양성으로 간주하였다(포함되는 경우, 경계선 SIs ≥ 1.90이 강조된다). 증식 데이터 세트(n=3)의 경우, 양성 반응을 통계학 및 실험 한계점으로 규정하였다:

- 1) 쌍을 이루지 않은 두 시료 스튜던트 t-검사를 사용해 배양액 대조군 웰에 대한 테스트 웰의 cpm을 비교한 반응 유의도($p < 0.05$)
- 2) SI는 2 이상($SI \geq 2.0$).
- 3) 기본 cpm > 150cpm

뿐만 아니라, 복제 배양액에서 얻은 원자료의 CVs 및 SDs를 계산함으로써, 분석 내 변화(intra-assay variation)를 평가하였다.

도 3a~d는 테스트 항체에 대한 건강한 공여체 T 세포 증식 반응을 묘사한다. 벌크 배양액에서 유래된 PBMC를 시료채취하고, 3개의 테스트 시료와의 배양 후 5일, 6일, 7일 및 8일에 증식에 대한 평가를 하였다. 쌍을 이루지 않은, 두 시료 스튜던트 t-테스트를 사용하여 유의미한, 점선으로 표시된, $SI \geq 2.0$ ($p < 0.05$)의 증식 반응을 양성으로 간주하였다.

데이터는 도 3a~d에 나타내었고, 하기 표 3에 요약하였다. 도 3a~d는 시간 경과에 따른 테스트 항체 각각에 대한 공여체 SI 반응을 묘사한다. 완전히 인간화된 항-CD22 항체(VH4/VK1, VH5/VK1, VH6/VK4)는 증식 분석의 어떤 공여체에서도 $SI \geq 2.0$, $p < 0.05$ 를 사용하는 양성 반응을 유도하지 못한 반면, 키메라 항-CD22 항체는 25%의 공여체에서 양성 T 세포 증식 반응을 유도하였다. 도 3a: 키메라 항체; 도 3b: VH4/VK1; 도 3c: VH5/VK1; 도 3d: VH6/VK4.

표 3

	항-CD22				
	키메라	VH4/VK1	VH5/VK1	VH6/VK4	KLH
공여체 1	P				
공여체 2					
공여체 3					P*
공여체 4					
공여체 5					
공여체 6					
공여체 7	P				P
공여체 8					P
공여체 9					P
공여체 10					
공여체 11					P
공여체 12					P
공여체 13					P
공여체 14					P
공여체 15					P
공여체 16	P				P
공여체 17					P
공여체 18	P				P
공여체 19	P				P
공여체 20					P
증식률%	25	0	0	0	70

표 3. 건강한 공여체 증식의 요약. 5일~8일까지($SI \geq 2.0$, 유의함 $p < 0.05$) 시간 경과에 따른($SI \geq 2.0$, 유의함 $p < 0.05$) 양성 증식("P")반응. 증식(P*)에 대한 경계 반응(유의함 $p < 0.05$, $SI \geq 1.90$ 인 경우)이 보인다. 공여체 집단에서 반응의 총 빈도가 퍼센트로 나타나 있다.

실시예 5 - 내면화의 분석

~ 0.5×10^6 세포/mL로 증식된 Raji 세포를 1회 테스트마다 $0.35 \sim 0.5 \times 10^6$ 개 세포로 사용하였다. 세포를 인산염 완충용액 생리식염수 + 1% 태아 송아지 혈청(FCS; 완충용액 A)에 $100 \mu\text{L}/\text{tube}$ 로 재현탁시켰다. 대조군은 4°C 에만 노출시킨 세포 또는 4°C 및 37°C 모두에 노출시킨 세포를 포함(이들 세포는 항체 없이 또는 2차 항체만 가지고 배양하였다)하였다. 1차 항체를 $1 \mu\text{g}/\text{tube}$ 첨가하고 세포를 30분 동안 얼음에서 배양하였다. 그리고

나서, 1 mL 완충용액 A를 첨가하여 세포를 세척하고, 원심분리에 의해 세포를 부드럽게 펠렛화하고, 상청액을 제거하였다. 총 2회 세척으로 상기 단계를 반복하였다. 37° C에 노출할 세포를 37° C RPMI + 10% 태아 송아지 혈청(FCS), 2 mM 글루타아민에 재현탁시키고, 37° C에서 5% CO₂로 45분 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 얼음처럼 차가운 1 mL 완충용액 A로 1회 세척하였다. 2차 항체(플루오레세인-접합 염소 항-인간 Fc; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) 완충용액 A에 1:100 희석으로 첨가하고, 세포를 30분 동안 얼음 위에서 배양하였다. 마침내, 세포를 얼음처럼 차가운 완충용액 A로 2회 세척하고 300 µL 완충용액 A에 재현탁시켰다. 세포를 4° C의 암실에 보관하고, 18시간 이내에 FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 Becton Dickinson FACSCanto 상의 유세포분석기로 분석하였다.

데이터를 하기와 같이 분석하였다: FL1 채널(플루오레세인 검출을 위해 사용) 상의 2차 항체의 평균 형광 강도(MFI)를 1차 항체가 포함되었을 때 생성된 시그널의 MFI에서 차감하였다. 그리고 나서, 수득된 값을 현재의 실험을 위한 MFI 시그널로 명명했다. 4° C에 고정된 세포의 MFI 값은 세포 표면에 항체의 결합을 나타내었다. 37° C에 노출된 세포의 MFI 값은 CD22-Ab 복합체의 내면화 이후 세포 표면에 잔존하는 항체에 의해 생성된 시그널을 나타내었다. 4° C에서 그리고 37° C에서의 MFI 값의 차이는 결합된 항체의 내면화에 상응한다(도 4). 상이한 날에 수행한 실험들 사이에서의 비교를 허용하기 위해, 가끔식 결합 및 내면화 값을 야생형 항체, RFB4에 정규화하였다.

실시예 6 - CD22 결합 친화도 분석

인간 CD22를 R&D Systems(huCD22-Fc 형태, 카탈로그 # 1968-SL-050) 또는 Sino Biological Inc (His 태그가 있는 huCD22, 카탈로그 # 11958-H08H) 둘 중 한 곳에서 획득하고, LC-바이오틴을 사용하여 Lys로 바이오틴화하였다. ForteBio 기구를 사용하여 huCD22에 변이체 12~20의 결합을 측정하였다. StreptAvidin 유도된 ForteBio 바이오센서에 바이오틴화된 huCD22 분자를 로딩하였다. 관심대상 항체의 농도를 A₂₈₀으로 확인하고, 로딩된 바이오센서를 항체 각각의 증가 농도에 노출시켰다. pH 7.25의 4~5개 농도에서 huCD22에 대한 운동 결합 및 해리 속도를 측정하고, K_d's를 측정하였다(도 5).

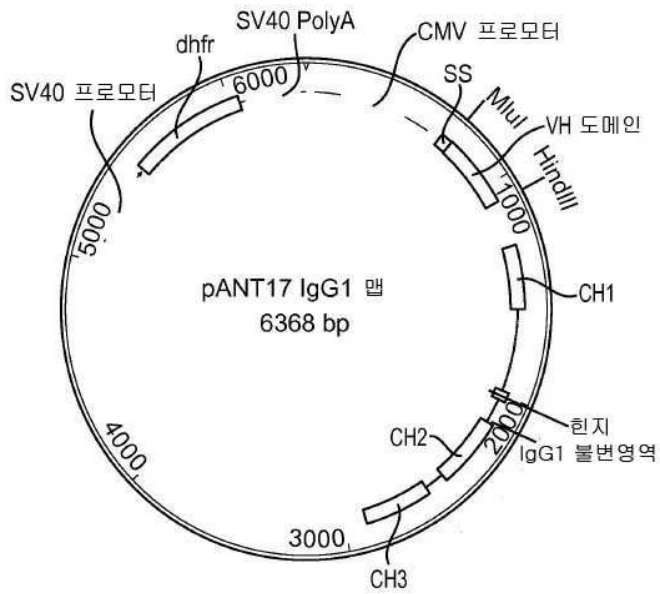
실시예 7 - 응집 분석

RFB4 변이체의 응집 정도를 측정하기 위해, 크기-배제 고성능 액체 크로마토그래피(Tosoh #08541 G300 SW_{XL} 7.8mmx30cm; 이동상 25mM 인산나트륨 완충용액, 300 mM NaCl, pH 6.8; 0.8mL/min; 220nm 및 280nm에서의 모니터 흡광도)를 사용하여 항체 20 µg을 분석하였다. 결과는 도 6a~6d에 나타내었다.

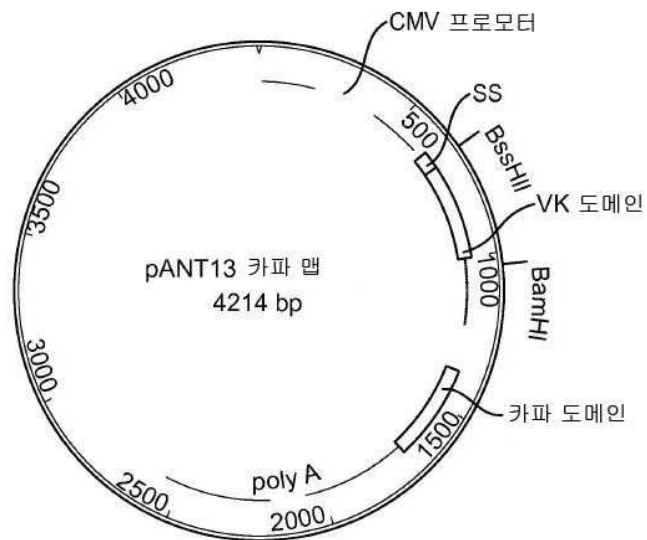
본 발명은 이것의 특정 구현예를 언급하며 기술되었으나, 다양한 변화가 이루어질 수 있고 본 발명의 원칙과 범위를 벗어나지 않으면서 등가물들이 치환될 수 있음이 당해기술의 숙련가에 의해 이해되어야 한다. 뿐만 아니라, 특정 상황, 물질, 문제의 조성물, 과정, 과정 단계(들)을 본 발명의 목적, 원칙 및 범위에 맞추기 위해 여러 변형이 이루어질 수 있다. 이와 같은 모든 변형은 첨부된 청구항의 범위내에 있도록 의도된다.

도면

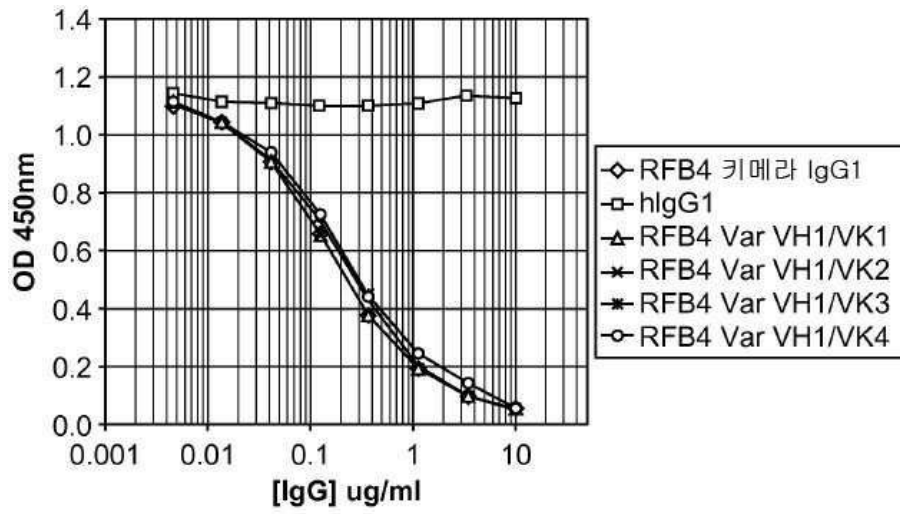
도면1a



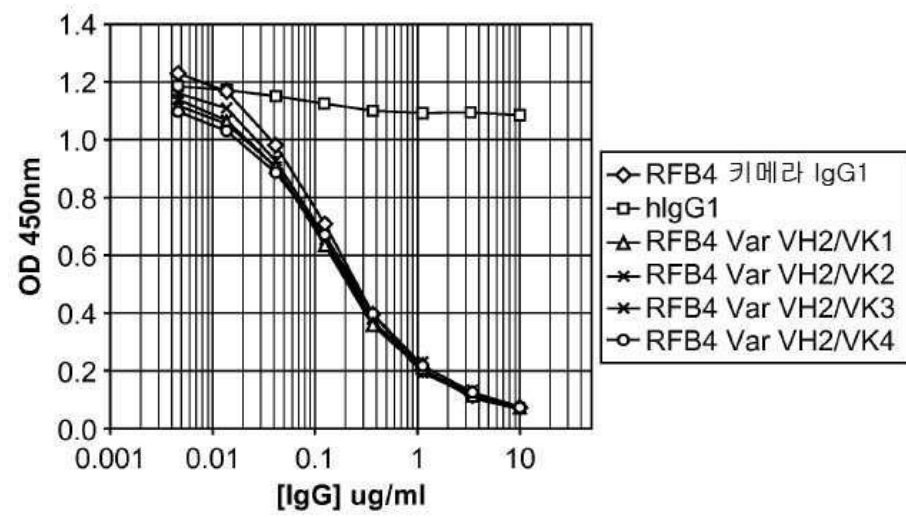
도면1b



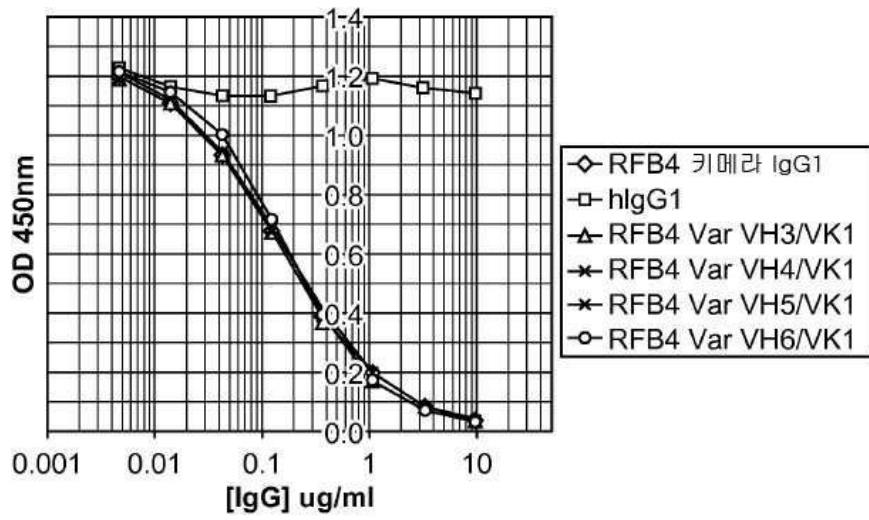
도면2a



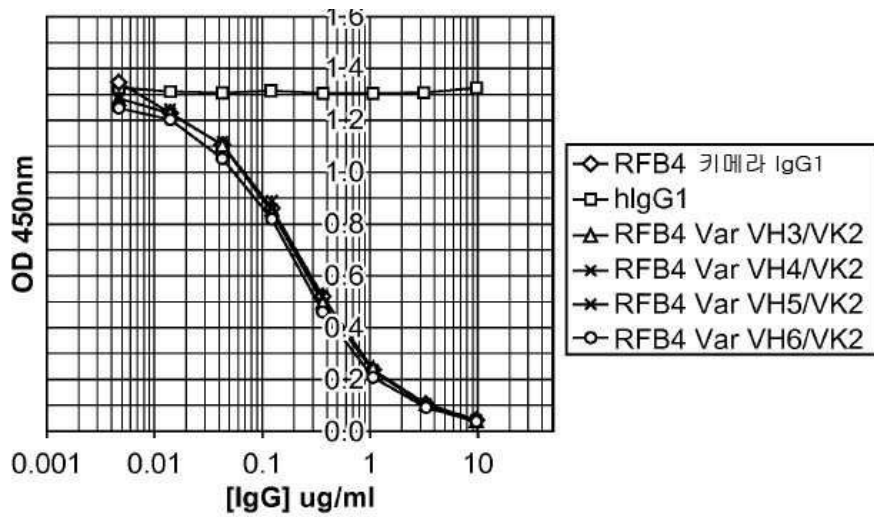
도면2b



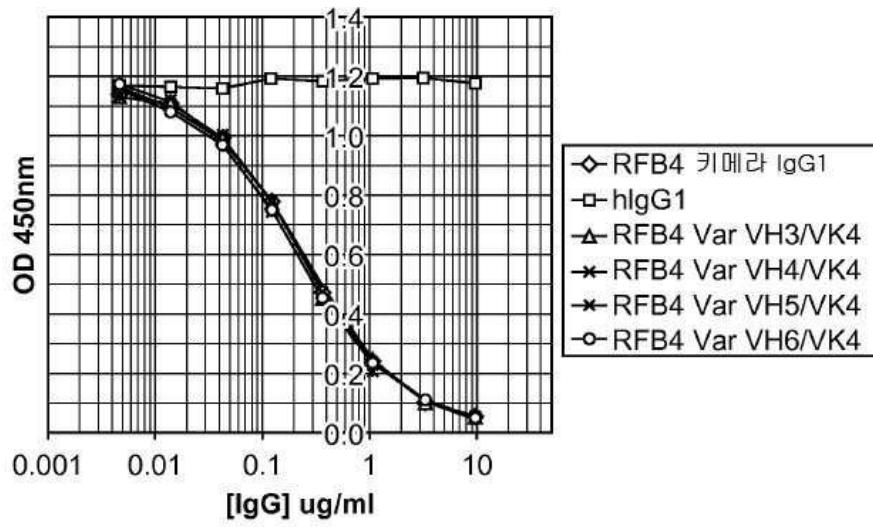
도면2c



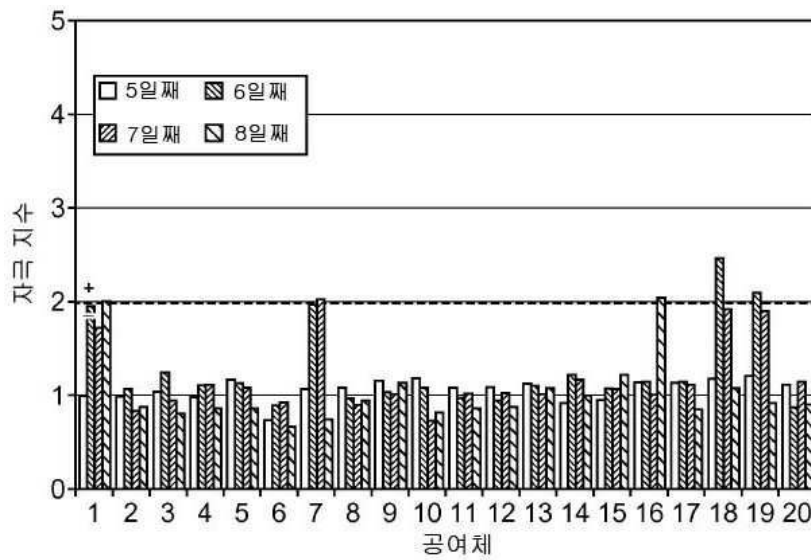
도면2d



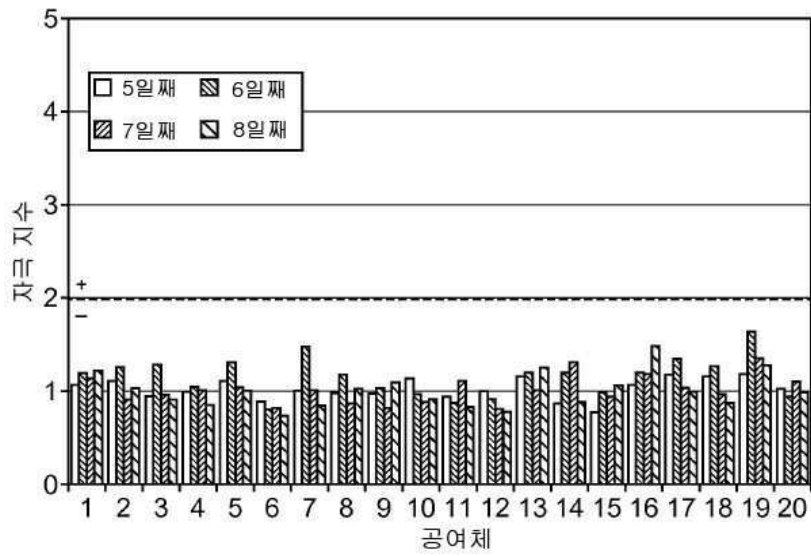
도면2e



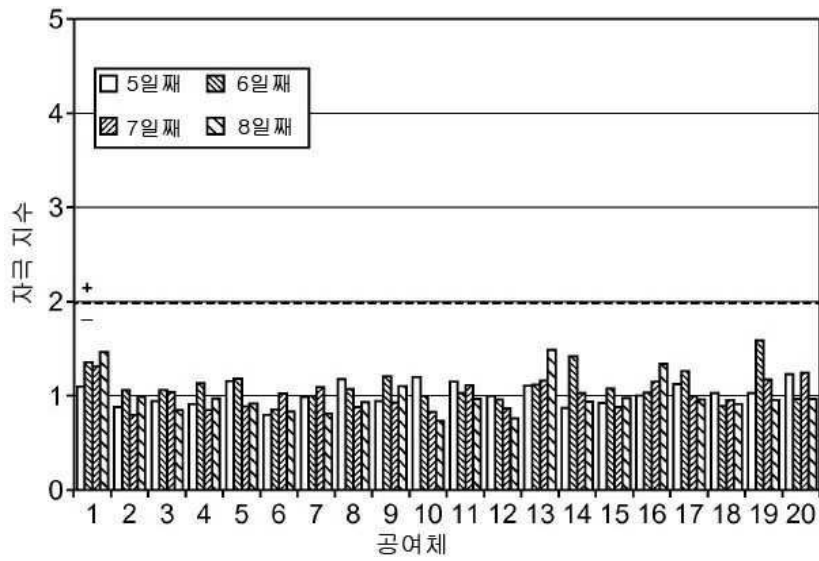
도면3a



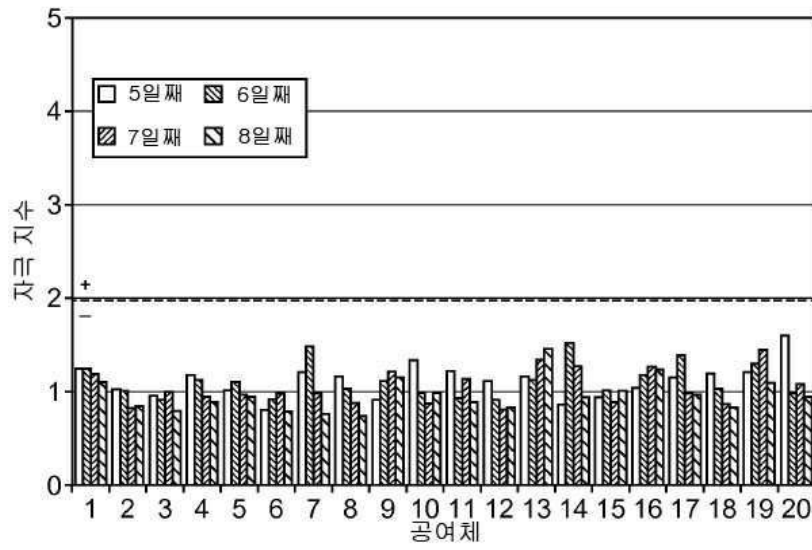
도면3b



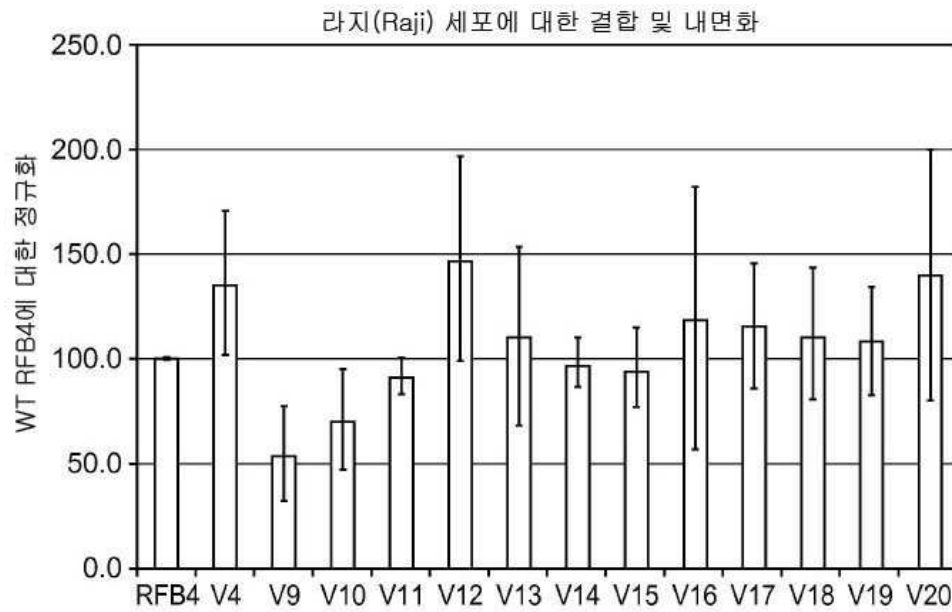
도면3c



도면3d



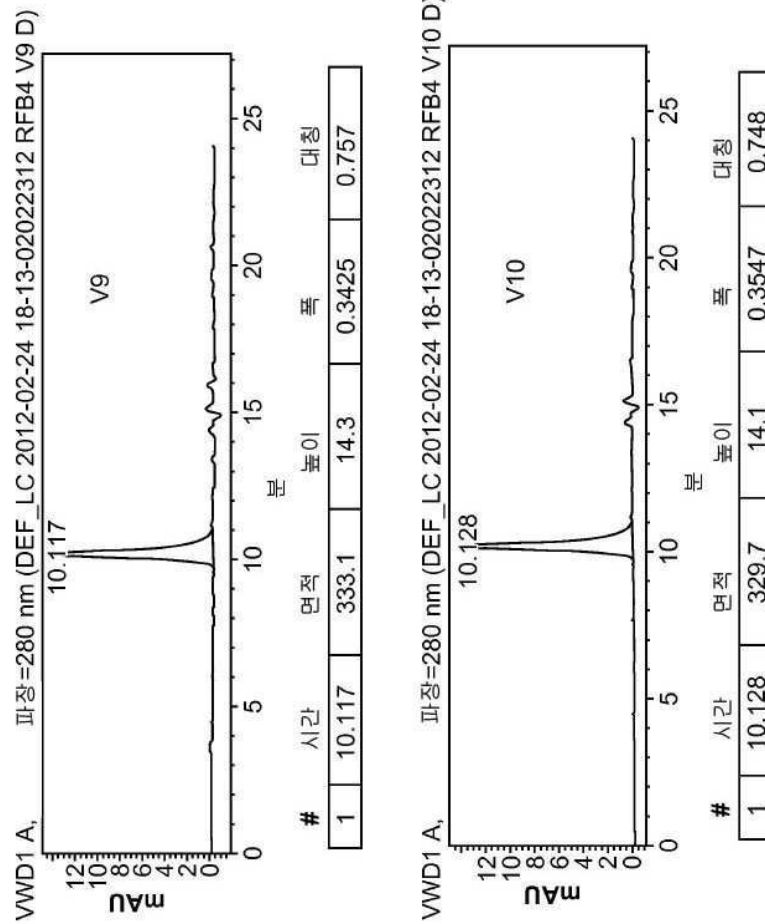
도면4



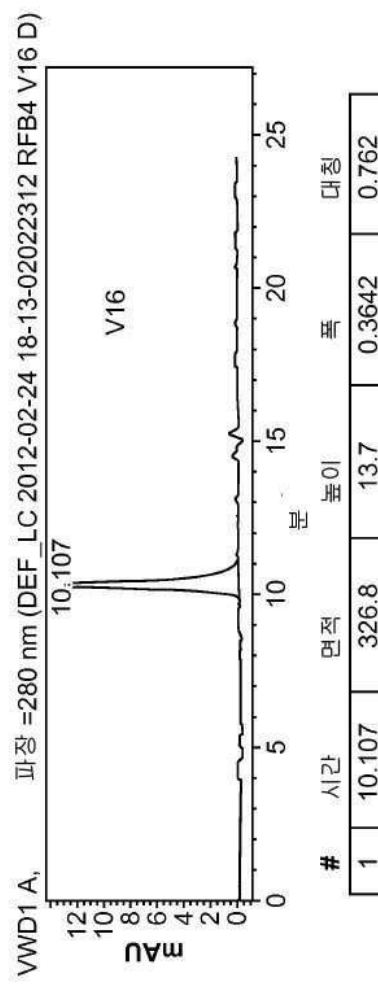
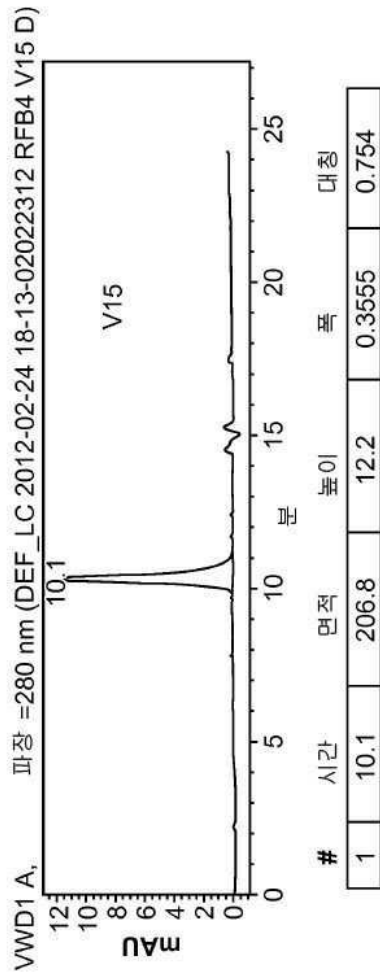
도면5

	Kon	Koff	Kd
V12	4.93E+05	9.85E-05	2.00E-10
V13	3.38E+05	1.32E-04	3.90E-10
V14	3.92E+05	2.40E-04	6.14E-10
V15	4.31E+05	2.15E-04	4.97E-10
V16	3.68E+05	1.73E-04	4.71E-10
V17	3.39E+05	2.52E-04	7.42E-10
V18	3.26E+05	1.87E-04	5.72E-10
V19	3.63E+05	2.01E-04	5.53E-10
V20	4.01E+05	2.76E-04	6.89E-10

도면6a

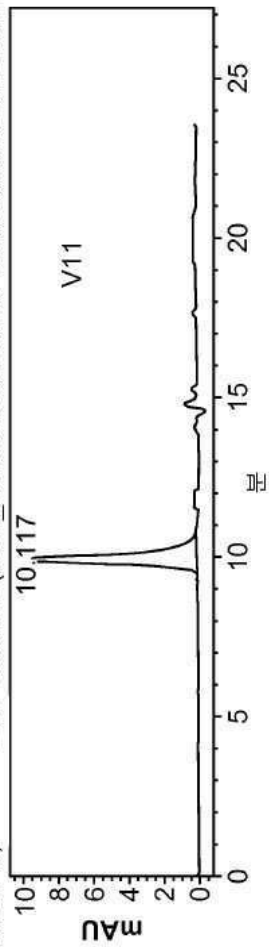


도면6b



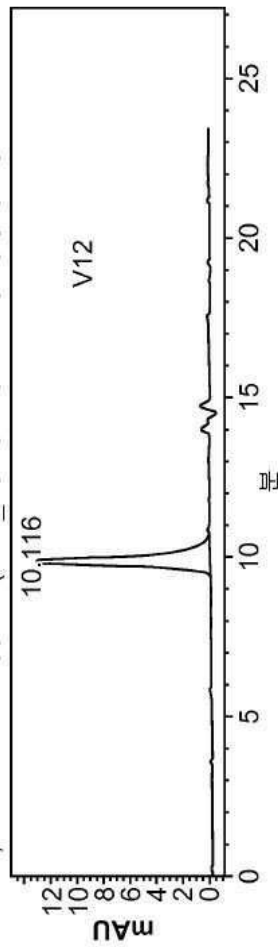
도면6c

VWD1 A, 파장=280 nm (DEF_LC 2012-02-24 18-13-02022312 RFB4 V11 D)



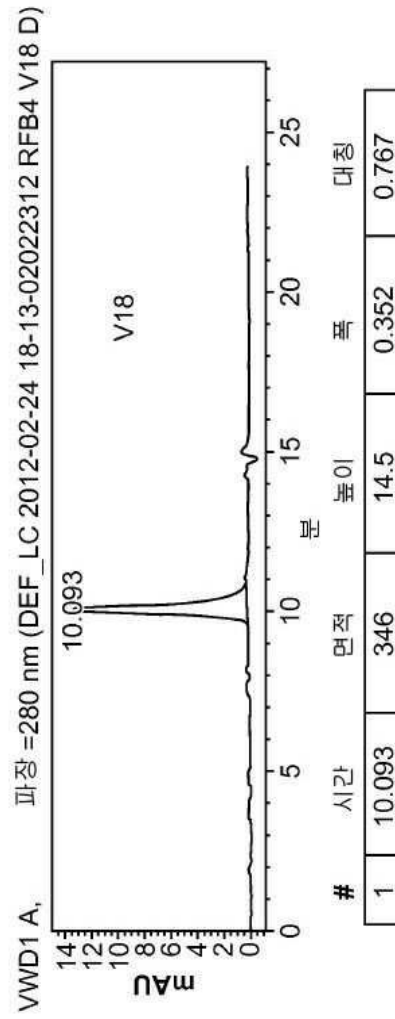
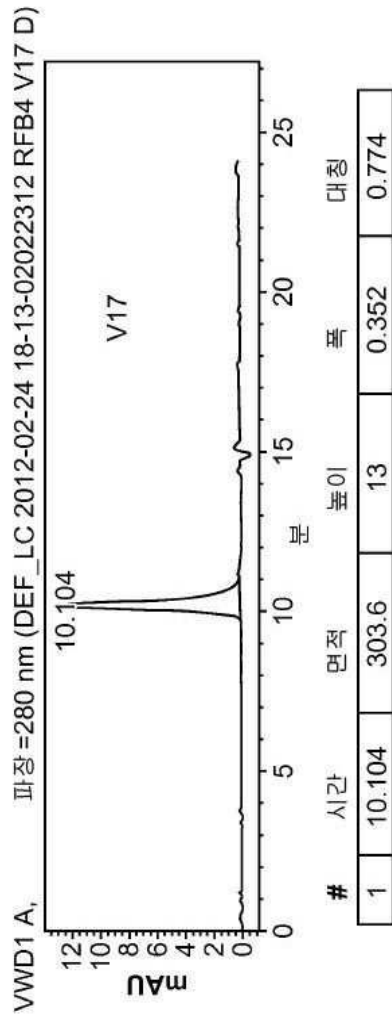
#	시간	면적	높이	폭	대칭
1	10.117	234.2	10.1	0.3328	0.759

VWD1 A, 파장=280 nm (DEF_LC 2012-02-24 18-13-02022312 RFB4 V12 D)



#	시간	면적	높이	폭	대칭
1	10.116	331.2	14	0.3584	0.756

도면6d



도면7a

가변 영역의 서열

중쇄 가변 영역

VH3

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDIVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFYWGQGLTVTVSS (서열번호:3)

VH4

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFYWGQGLTVTVSS (서열번호:4)

VH5

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFYWGQGLTVTVSS (서열번호:5)

VH6

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFYWGQGLTVTVSS (서열번호:6)

도면7b

가변 영역의 서열

경계 가변 영역

VK1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTTSILHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:7)

VK2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTTSILHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:8)

VK4

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTTSILHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:9)

도면8a

변이체 9 (VH3/VK1)

VH3
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAISSGGGTYYPDYTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVSS (서열번호:3)
VK1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:7)

변이체 10 (VH3/VK2)

VH3
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAISSGGGTYYPDYTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVSS (서열번호:3)
VK2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:8)

변이체 11 (VH3/VK4)

VH3
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAISSGGGTYYPDYTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVSS (서열번호:3)
VK4
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:9)

도면8b

변이체 12 (VH4/VK1)

VH4
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS (서열번호:4)
VK1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNLYLNWYQQKPGKAVKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:7)

변이체 13 (VH4/VK2)

VH4
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS (서열번호:4)
VK2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNLYLNWYQQKPGKAVKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:8)

변이체 14 (VH4/VK4)

VH4
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVTVSS (서열번호:4)
VK4
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNLYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:9)

도면8c

변이체 15 (VH5/VK1)

VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIISGGGTTYYPDTV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIWGGTGLVTVSS (서열번호:5)
VK1
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:7)

변이체 16 (VH5/VK2)

VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIISGGGTTYYPDTV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIWGGTGLVTVSS (서열번호:5)
VK2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:8)

변이체 17 (VH5/VK4)

VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIISGGGTTYYPDTV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIWGGTGLVTVSS (서열번호:5)
VK4
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:9)

도면8d

변이체 18 (VH6/VK1)

VH6

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAISSGGGTTYYPDTVKGFRFTISRDNAKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVTSS (서열번호:6)

VK1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:7)

변이체 19 (VH6/VK2)

VH6

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAISSGGGTTYYPDTVKGFRFTISRDNAKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLTVTSS (서열번호:6)

VK2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호:8)

도면8e

변이체 20 (VH6/VK4)

VH6

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVROAPGKGLEWVAAYISSGGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYCCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGTLLVTSS (서열번호 :6)

VK4

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (서열번호 :9)

도면9a

동형제 2	MHLLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKWWFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
동형제 4	MHLLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKWWFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
동형제 1	MHLLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKWWFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
동형제 3	MHLLGPWLLLLLVLEYLAFSDSSKWWFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60

동형제 2	NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCNTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
동형제 4	NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCNTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
동형제 1	NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCNTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
동형제 3	NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCNTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120

동형제 2	MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPIHQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEG	180
동형제 4	MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPIHQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEG	180
동형제 1	MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPIHQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEG	180
동형제 3	MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPIHQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEG	180

동형제 2	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPOWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
동형제 4	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPOWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
동형제 1	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPOWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
동형제 3	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPOWSHHGKIIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240

동형제 2	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNREVT	300
동형제 4	-----	
동형제 1	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNREVT	300
동형제 3	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNREVT	300

도면9b

동정제 2	-----	328
동정제 4	-----	
동정제 1	-----	360
동정제 3	-----	360
동정제 2	-----	332
동정제 4	-----	243
동정제 1	-----	420
동정제 3	-----	420
동정제 2	-----	392
동정제 4	-----	303
동정제 1	-----	480
동정제 3	-----	480
동정제 2	-----	452
동정제 4	-----	363
동정제 1	-----	540
동정제 3	-----	540
동정제 2	-----	512
동정제 4	-----	423
동정제 1	-----	600
동정제 3	-----	600
동정제 2	-----	572
동정제 4	-----	483
동정제 1	-----	660
동정제 3	-----	660

도면9c

동형체 2	GTNSVGKGRSPLSTLTVYYS	632
동형체 4	PETIGRRVAVGLGSCLA	543
동형체 1	ILILAIICGLKQRRWKRT	720
동형체 3	QSQG	720

동형체 2	LQENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	692
동형체 4	SEGPHSLGCYNPMMEDGISYTT	603
동형체 1	TLRFPENNIPTGTDAES	780
동형체 3	*****	746

동형체 2	SEMQRPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENV	752
동형체 4	IPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV	663
동형체 1	*****	840
동형체 3	*****	751

동형체 2	DYVILKH	759
동형체 4	DYVILKH	670
동형체 1	DYVILK-	846
동형체 3	*****	

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Rabuka, David

Holgate, Robert G. E.

Carr, Francis J.

<120> ANTIBODY SPECIFIC FOR CD22 AND METHODS OF USE THEREOF

<130> RDWD-004WO
 <150> US 61/673,630
 <151> 2012-07-19
 <160> 38
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <
 220><221> misc_feature
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Xaa Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(44)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (80)..(80)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Xaa

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 5

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

 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 6

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr 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 Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 7

Asp 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 Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 8

Asp 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 Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

100

105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 9

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 Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 10

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 12

Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 13

His His His His His

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 14

His His His His His His

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 15

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 16

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 19

Arg Tyr Ile Arg Ser

1 5

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 20

Phe His His Thr

1

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 21

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg

1 5 10 15

Ala

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 22

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 24

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 26

Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 27

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 28

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 29

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is C or S.

<400> 30

Leu Xaa Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 31

Leu Cys Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 32

Leu Ser Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> The G at this position is a 2 formylglycine.

<400> 33

Leu Gly Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> The G at this position is a 2 formylglycine residue having a covalently attached moiety.

<400> 34

Leu Gly Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 35

<211> 759

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu

1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu

20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala

35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp

115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His

130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr

145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp

165 170 175

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

180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro

195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala

210 215 220
 Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 225 230 235 240
 Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg

 245 250 255
 Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
 260 265 270
 Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
 275 280 285
 Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
 290 295 300
 Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser

 305 310 315 320
 Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr
 325 330 335
 Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu
 340 345 350
 Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp
 355 360 365
 Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile

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

 435 440 445
 Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys
 450 455 460

Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser
465					470					475					480
Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala
				485					490					495	
Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met
				500				505					510		
Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys
		515					520				525				
Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Trp	Phe	Asp	Trp
	530					535					540				
Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro
545				550						555				560	
Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser
				565					570				575		
Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser
		580							585				590		
Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu
		595						600					605		
Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp
	610					615					620				
Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln
625				630						635					640
Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu
				645						650				655	
Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile
			660						665				670		
Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly
		675							680				685		
Asp	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp
	690						695					700			
Thr	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu

705 710 715 720
 Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu
 725 730 735
 Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
 740 745 750
 Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 755

<210> 36

<211> 670

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

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

115 120 125
 Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
 130 135 140
 Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
 165 170 175
 Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
 180 185 190
 Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
 195 200 205
 Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
 210 215 220
 Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg
 245 250 255
 Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro
 260 265 270
 Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
 275 280 285
 Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr
 290 295 300
 Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val
 305 310 315 320
 Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile
 325 330 335
 Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys
 340 345 350
 Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys
 355 360 365
 Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile
 370 375 380
 Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile
 385 390 395 400
 Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro

405 410 415
 Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly
 420 425 430
 Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser

 435 440 445
 His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser
 450 455 460
 Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr
 465 470 475 480
 Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser
 485 490 495
 Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala

 500 505 510
 Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
 515 520 525
 Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu
 530 535 540
 Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys Val
 545 550 555 560
 Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr Asn

 565 570 575
 Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu
 580 585 590
 Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg
 595 600 605
 Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys
 610 615 620
 Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp

 625 630 635 640
 Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg
 645 650 655

Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
660 665 670

<210> 37
<211> 846
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

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

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
165 170 175

Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro

195	200	205
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala		
210	215	220
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
225	230	235
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg		
	245	250
		255
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro		
260	265	270
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys		
275	280	285
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser		
290	295	300
Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser		
305	310	315
		320
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val		
	325	330
		335
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu		
340	345	350
Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His		
355	360	365
Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro		
370	375	380
Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn		
385	390	395
		400
Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln		
405	410	415
Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile		
420	425	430
Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn		
435	440	445

Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu
450 455 460

Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
465 470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
485 490 495

Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys
500 505 510

Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
515 520 525

Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu
530 535 540

Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser
545 550 555 560

Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
565 570 575

Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala
580 585 590

Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu
595 600 605

Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val
610 615 620

Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His
625 630 635 640

Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala
645 650 655

Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
660 665 670

Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val
675 680 685

Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys

690 695 700
 Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
 705 710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
 725 730 735
 Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
 740 745 750
 Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro
 755 760 765
 Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
 770 775 780

Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
 785 790 795 800
 Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
 805 810 815
 Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
 820 825 830
 Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys
 835 840 845

<210> 38

<211> 751

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

50	55	60	
Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr			
65	70	75	80
Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly			
85	90	95	
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn			
100	105	110	
Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp			
115	120	125	
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His			
130	135	140	
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr			
145	150	155	160
Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp			
165	170	175	
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser			
180	185	190	
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro			
195	200	205	
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala			
210	215	220	
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His			
225	230	235	240
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg			
245	250	255	
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro			
260	265	270	
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys			
275	280	285	
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser			
290	295	300	

Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser

305 310 315 320

Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val

325 330 335

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu

340 345 350

Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His

355 360 365

Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro

370 375 380

Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn

385 390 395 400

Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln

405 410 415

Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile

420 425 430

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn

435 440 445

Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu

450 455 460

Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr

465 470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro

485 490 495

Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys

500 505 510

Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln

515 520 525

Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu

530 535 540

Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser

545 550 555 560
Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser

565 570 575
Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala

580 585 590
Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu

595 600 605
Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val

610 615 620
Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His

625 630 635 640
Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala

645 650 655
Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu

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

675 680 685
Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys

690 695 700
Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly

705 710 715 720
Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys

725 730 735
Arg Cys Arg Val Leu Arg Asp Ala Glu Thr Ser Pro Gly Leu Arg

740 745 750