



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0097684  
(43) 공개일자 2010년09월03일

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7012747

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년11월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년06월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2008/009548

(87) 국제공개번호 WO 2009/062690

국제공개일자 2009년05월22일

(30) 우선권주장

07021931.6 2007년11월12일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

우드라이 파마 게엠베하

독일 82152 마르틴스리트 프라운호퍼스트라체 22

(72) 발명자

헤트만 토레

독일 81243 뮌헨 암 슈타트파르크 38데

니뵈너 엔스

독일 81477 뮌헨 슈호쉬트라체 15

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 49 항

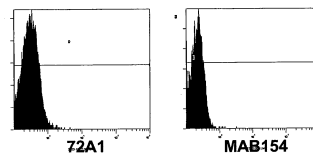
(54) A X L 항체

(57) 요약

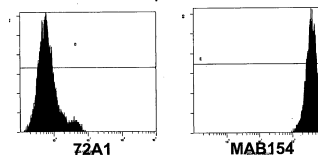
본 발명은 AXL 수용체 티로신 키나아제의 세포외 도메인에 결합하고 적어도 부분적으로 AXL 활성을 저해하는, 항체, 특히, 단일클론 항체에 관한 것이다.

대표도 - 도1

Rat1-Mock polyclonal



Rat1-Axl cl.2



(72) 발명자

**루에 옌스**

독일 82152 마르틴스리드 케플러베그 8

**비르츠 페터**

독일 82131 가우팅 부헨도르퍼 슈트라쎈 24

**겔레 케르스틴**

독일 82349 펜텐리드 쾨렌그룬트 6

**즈비크-발라쉬 에스테르**

독일 82131 가우팅 프윙킹스슈트라쎈 112

**로테 미케**

독일 82152 크라일링 엘리젠슈트라쎈 4

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

AXL의 세포외 도메인에 결합하고 AXL 활성을 적어도 부분적으로 저해하는 단일클론 항체.

### 청구항 2

제1항에 있어서, AXL-매개 신호 전달(signal transduction)을 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, AXL 인산화를 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 증식을 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 혈관형성을 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 이동을 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 전이를 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, AXL-매개 항-아포토시스를 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, AXL-매개 PI3K 신호전달을 감소시키고 및/또는 차단하는 것인 단일클론 항체.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 다중특이성(multispecific) 항체, 또는 이들의 단편인 것인 단일클론 항체.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 키메라 항체이고 서열번호 38, 39, 41, 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 37, 40으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체인 것인 단일클론 항체.

### 청구항 12

제10항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 인간화 항체이고, 서열번호 44, 46으로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열 또는 적어도 그의 가변 도메인 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 43, 45로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는

그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체인 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, Fv 단편, 디아바디(diabody), 또는 단쇄 항체(single chain antibody) 분자인 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1-타입, IgG2-타입, IgG3-타입 또는 IgG4-타입인 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 표지화(labeling) 기에 결합된 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 효과기(effector-group)에 결합된 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 스카폴드 단백질인 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는

- (a) 서열번호 16, 22, 28로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
  - (b) 서열번호 17, 23, 29로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
  - (c) 서열번호 18, 24, 30으로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 하나 이상의 중쇄 아미노산 서열, 및/또는
  - (d) 서열번호 13, 19, 25로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
  - (e) 서열번호 14, 20, 26으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
  - (f) 서열번호 15, 21, 27로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 하나 이상의 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나,
- 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체인 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는

- (a) 서열번호 16으로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
  - (b) 서열번호 17로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
  - (c) 서열번호 18로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
  - (d) 서열번호 13으로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
  - (e) 서열번호 14로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
  - (f) 서열번호 15로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,
- 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체인 것인 단일클론 항체.

## 청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는

- (a) 서열번호 22로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
  - (b) 서열번호 23으로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
  - (c) 서열번호 24로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
  - (d) 서열번호 19로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
  - (e) 서열번호 20으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
  - (f) 서열번호 21로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,
- 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체인 것인 단일클론 항체.

## 청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는

- (a) 서열번호 28로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
  - (b) 서열번호 29로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
  - (c) 서열번호 30으로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
  - (d) 서열번호 25로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
  - (e) 서열번호 26으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
  - (f) 서열번호 27로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,
- 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체인 것인 단일클론 항체.

## 청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 서열번호 8, 10, 12로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 7, 9, 11으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열, 적어도 그의 가변 도메인 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체인 것인 단일클론 항체.

## 청구항 23

하기로 구성된 군으로부터 선택된 단리된 핵산 분자:

- (a) 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 단일클론 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체를 코딩하는 핵산 서열,
- (b) 서열번호 1 내지 6, 31 내지 36으로 표시된 핵산 서열,
- (c) (a) 또는 (b)의 서열에 상보적인 핵산; 및
- (d) 엄격한(stringent) 조건 하에 (a), (b) 또는 (c)에 혼성화할 수 있는 핵산 서열.

## 청구항 24

제23항의 핵산 서열을 포함하는 벡터.

## 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 벡터는 발현 벡터이고, 상기 핵산 서열은 조절 서열(control sequence)에 작동가능하게 연결된 것인 벡터.

#### 청구항 26

제24항 또는 제25항의 벡터를 포함하는 숙주.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 인간, 박테리아, 동물, 균류(fungus), 양서류 또는 식물 세포인 것인 숙주.

#### 청구항 28

제26항에 있어서, 인간이 아닌 형질전환 동물인 것인 숙주.

#### 청구항 29

제26항, 제27항 또는 제28항의 숙주로부터 폴리펩티드를 수득하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체를 제조하는 방법.

#### 청구항 30

항-AXL-항체, 바람직하게는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 단일클론 항체, 제23항의 핵산 분자, 제24항 또는 제25항의 벡터, 제26항, 제27항 또는 제28항의 숙주, 또는 제29항의 방법에 의해 생성된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 아췌반트를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 추가적인 활성제를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 과다증식(hyperproliferative) 질환의 진단, 예방 또는 치료를 위한 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과다증식 질환은 AXL 발현, 과다발현 및/또는 과다활성과 연관된 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 35

제33항에 있어서, 상기 과다증식 질환은 유방암, 폐암, 및 기타 AXL 발현 또는 과다발현 암, 및 종양 전이 형성으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 36

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 과다증식 질환의 진단, 예방 또는 치료를 위한 것인 단일클론 항체.

#### 청구항 37

과다증식 질환의 진단, 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체의 용도.

#### 청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 과다증식 질환은 제34항 또는 제35항에 정의된 과다증식 질환인 것인 용도.

#### 청구항 39

시료를 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체와 접촉시키는 단계, 및 AXL의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, AXL의 발현과 연관된 상태를 진단하는 방법.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 상기 상태는 제34항 또는 제35항에 정의된 과다증식 질환인 것인 방법.

#### 청구항 41

AXL의 발현과 연관된 상태의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, AXL과 연관된 상태를 예방 또는 치료하는 방법.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 상태는 제34항 또는 제35항에 정의된 과다증식 질환인 것인 방법.

#### 청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 상기 환자는 포유동물 환자, 특히 인간 환자인 것인 방법.

#### 청구항 44

항-AXL-항체, 바람직하게는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체, 제23항에 따른 핵산 서열, 또는 제24항 또는 제25항에 따른 벡터를 포함하는 키트.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 추가적인 항신생물제(antineoplastic agent)를 더 포함하는 것인 키트.

#### 청구항 46

약물 내성 암의 치료용 약제학적 조성물의 제조를 위한 항-AXL 항체의 용도.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, 상기 항-AXL 항체는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체인 것인 용도.

#### 청구항 48

과다증식 질환의 치료를 위해 항신생물제와의 병용-투여(co-administratio)를 위한 약제의 제조에서 항-AXL 항체의 용도.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 상기 항-AXL 항체는 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 단일클론 항체인 것인 용도.

### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 AXL 수용체 티로신 키나아제의 세포외 도메인에 결합하고 적어도 부분적으로 AXL 활성을 저해하는, 항체, 특히, 단일클론 항체에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] AXL (Ark, UFO, Tyro-7) 수용체 티로신 키나아제는 키나아제의 Tyro-3 패밀리의 일원이고, 다른 일원들은 Mer (Eyk, Nyk, Tyro-12) 및 Sky (Rse, Tyro-3, Dtk, Etk, Brt, Tif)이다. AXL 수용체 티로신 키나아제는 항-응고 인자 단백질 S에 상동성인 70-kDa 단백질인 이종항원 친화성(heterophilic) 리간드 Gas6의 결합에 의해 활성화된다. 다른 수용체 티로신 키나아제와 대조적으로, AXL 티로신 인산화는 또한 동종항원 친화성(homophilic) 결합에 의해 유도될 수 있다. AXL 활성화는 PI-3-키나아제/Akt(Franke et al., Oncogene 22: 8983-8998, 2003)

및 Ras/Erk 및  $\beta$ -카테닌/TCF (Goruppi et al., Mol. Cell Biol. 21 : 902-915, 2001)와 같은 기타 주요 경로를 통한 신호전달을 초래한다.

[0003] AXL은 뇌, 심장, 골격근을 포함한 광범위한 정상 조직, 여러 다른 기관의 기관낭(organ capsule) 및 결합 조직, 및 단핵구에서 약하게 발현되나, 림프구에서는 발현되지 않는다. AXL에 의해 유도되는 Akt 인산화가 섬유모세포 (Goruppi et al., Mol Cell Biol 17: 4442-4453 1997), 내피세포 (Hasanbasic et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004), 혈관 평활근 세포(Melaragno et al., J. Mol. Cell Cardiol. 37: 881-887, 2004) 및 뉴런 (Allen et al., Mol. Endocrinol. 13: 191-201 1999)의 생존에서 개시되었다. 또한, AXL은 세포-부착 및 화학주성에서 역할을 수행한다. AXL 녹아웃은 혈소판 인테그린 IIb3의 감소된 활성화의 결과, 손상된 혈소판 응집체 안정화 및 혈전 형성(thrombus formation)을 보인다.

[0004] AXL 과다발현은 다양한 종류의 암, 예를 들면, 유방암 (Meric et al., Clin. Cancer Res. 8: 361-367, 2002; Berclaz et al., Ann. Oncol. 12: 819-824, 2001), 결장암 (Chen et al., Int. J. Cancer 83: 579-584, 1999; Craven et al., Int. J. Cancer 60: 791-797, 1995), 전립선암 (Jacob et al., Cancer Detect. Prev. 23: 325-332, 1999), 폐암 (Wimmel et al., Eur J Cancer 37: 2264-2274, 2001), 위암 (Wu et al., Anticancer Res 22: 1071-1078, 2002), 난소암 (Sun et al., Oncology 66: 450-457, 2004), 자궁내막암 (Sun et al., Ann. Oncol. 14: 898-906, 2003), 신장암 (Chung et al., DNA Cell Biol. 22: 533-540, 2003), 간세포 (hepatocellular)암 (Tsou et al., Genomics 50:331-340, 1998), 갑상선암 (Ito et al., Thyroid 12:971-975, 2002; Ito et al., Thyroid 9: 563-567, 1999), 및 식도암종(Nemoto et al., 1997), 또한, CML (Janssen et al., A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. Oncogene, 6: 2113-2120, 1991; Braunger et al., Oncogene 14:2619-2631 1997; O'Bryan et al., Mol Cell Biol 11 :5016-5031,1991), AML (Rochlitz et al., Leukemia 13: 1352-1358, 1999), 골육종 (Nakano et al., J. Biol. Chem. 270:5702-5705, 2003), 흑색종 (van Ginkel et al., Cancer Res 64:128-134, 2004) 및 두경부 편평세포암종(Green et al., Br J Cancer. 2006 94:1446-5, 2006)에서 입증되었다.

[0005] 또한, AXL은 비-침습성(non-invasive) 세포 대비 공격적 유방암 세포주에서 상향조절되는 전이-연관 유전자로 확인되었다. 인 비트로에서, 이동 및 침습을 위해 AXL 활성이 요구되는 것으로 발견되었고, 이 활성은 항체 처리에 의해 저해될 수 있다(W004008147). 유사하게, AXL의 우성 음성 버전(dominant negative version)의 발현 (Vajkoczy, P., et al., Proc. Natl. Acad. Science U.S.A. 103: 5799-5804. 2005) 또는 AXL의 siRNA 매개 하향조절(Holland et al., Cancer Res. 65: 9294-9303, 2005)을 통한 인 비보 AXL 활성의 제거(abrogation)가 마우스 이종이식 실험에서 피하 및 동소(orthotopic) 세포 증식을 방지했다.

[0006] 현재까지, AXL에 결합하고 생물학적 활성을 갖는 두 개의 항체가 개시되었다. 하나의 항체는 AXL 매개 세포 침습을 감소시킬 수 있고(W004008147), 나머지 다른 항체는 AXL/리간드 상호작용을 감소시키는 것으로 보고되었다. 그러나, 두 항체는 모두 다중클론 항체이어서 치료적 투여를 위해 부적합하다.

[0007] 따라서, AXL의 치료적 가능성을 고려할 때, AXL 매개 신호 전달(signal transduction)을 유효하게 특이적으로 차단하고 치료적 처리를 위해 적합한 단일클론 AXL 항체, 항체 단편, 또는 그의 유도체에 대한 높은 요구가 존재한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 따라서, 본 발명의 제1 양태(aspect)는 AXL, 특히, 인간 AXL의 세포외 도메인에 결합하고, 적어도 부분적으로 AXL 활성을 저해하는, 그의 단편 또는 유도체를 포함한, 단일클론 항체에 관한 것이다.

[0009] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 또한 AXL-매개 신호 전달을 감소 또는 차단하는 능력, AXL 인산화를 감소시키거나 또는 차단하는 능력, 세포 증식을 감소시키거나 또는 차단하는 능력, 혈관형성을 감소시키거나 또는 차단하는 능력, 세포 이동을 감소시키거나 또는 차단하는 능력, 종양 전이를 감소시키거나 또는 차단하는 능력, AXL 매개 PI3K 신호전달을 감소시키거나 또는 차단하는 능력, 및 AXL-매개 항-아포토시스를 감소시키거나 또는 차단하는 능력 중 하나 이상을 가져서, 예를 들면, 항신생물제(antineoplastic agent)에 의한 치료에 대한 세포의 감수성을 증가시킨다. 또한, 본 발명의 항체는 AXL, 특히, 인간 AXL에 대한 높은 특이성을 보일 수 있으며, 다른 Tyro-3 패밀리 일원들, 예를 들면, MER 및/또는 SKY 및/또는 포유동물 비-영장류 AXL, 예를 들면, 마우스 AXL을 유의성 있게 인식하지 않는다. 항체 특이성은 실시예에 기재된 바와 같이 교차-반응성(cross-



reactivity)의 측정에 의해 결정될 수 있다.

## 과제의 해결 수단

- [0010] 용어 "활성(activity)"은 세포의 표현형, 특히, 아폽토시스의 회피, 성장 신호의 자급자족(self sufficiency), 세포 증식, 조직 침습 및/또는 전이, 항-성장 신호에 대한 무감응(항-아폽토시스) 및/또는 지속적 혈관형성과 같은 암 표현형을 포함하나, 이에 한정되지 않는 세포의 표현형에 영향을 미치는, AXL의 생물학적 기능을 의미한다.
- [0011] 용어 "AXL 매개 신호 전달(AXL mediated signal transduction)"은 AXL와 제2 메신저 분자의 직접적 또는 간접적 상호작용에 의해 유발되는 제2 메신저 경로의 활성화를 의미한다.
- [0012] 용어 "AXL 인산화(AXL phosphorylation)"는 제2 AXL 단백질(트랜스인산화) 또는 단백질 키나아제 활성을 갖는 또 다른 단백질에 의한, 아미노산 잔기, 바람직하게는 티로신 잔기의 인산화를 의미한다.
- [0013] 용어 "세포 증식(cell proliferation)"은 인간 세포, 특히, 인간 암 세포이나, 이에 한정되지 않는 인간 세포의 증식(reproduction)에 기여하는 모든 AXL-관여 과정을 의미한다. 그들은 세포 DNA의 복제, 복제된 DNA의 두 개의 동일한 크기의 염색체 군으로의 분리, 및 전체 세포의 물리적 분리(세포질 분열이라 불림)에 기여하거나, 이를 초래하고, 바람직하게는 AXL 인산화 및/또는 AXL-매개 신호 전달을 포함한, AXL의 비-촉매(non-catalytic) 활성 또는 촉매 활성에 의해 촉진 또는 매개될 것이다.
- [0014] 용어 "혈관형성(angiogenesis)"은 기존의 혈관으로부터의 새로운 혈관의 성장, 특히, 새로운 종양 공급 혈관(tumor supplying vessel)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 새로운 혈관의 성장에 기여하는 모든 AXL-관여 과정을 의미한다. 이 과정들은 혈관 내피 세포의 증식, 생존, 이동 및 발아(sprouting), 혈관주위 세포(pericyte)의 유인(attraction) 및 이동, 및 혈관 안정화를 위한 기저막(basal membrane) 형성, 혈관 관류, 또는 간질 세포 또는 종양 세포에 의한 혈관형성 인자의 분비와 같은 다수의 세포 사건(cellular event)을 포함하고, 바람직하게는 AXL 인산화 및/또는 AXL-매개 신호 전달을 포함한, AXL의 비-촉매 활성 또는 촉매 활성에 의해 촉진 또는 매개될 것이다.
- [0015] 용어 "전이(metastasis)"는 원발성 종양으로부터 분산되고, 림프관 및/또는 혈관으로 침투하고, 혈류를 통해 순환하며 신체 내의 다른 부위의 정상 조직에 있는 원위 포커스(distant focus)에서 증식하도록(전이) 암세포를 지원하는 모든 AXL-관여 과정을 의미한다. 특히, 전이는 전이를 뒷받침하고 바람직하게는 AXL 인산화 및/또는 AXL-매개 신호 전달을 포함한, AXL의 비-촉매 활성 또는 촉매 활성에 의해 촉진 또는 매개하는 증식, 이동, 고정 비의존성(anchorage independence), 아폽토시스의 회피, 또는 혈관형성 인자의 분비와 같은 종양 세포의 세포 사건을 의미한다.
- [0016] 용어 "AXL 매개 항-아폽토시스(AXL mediated anti-apoptosis)"는 인간 세포, 바람직하게는 인간 암세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 인간 세포를 세포 예정사(programmed cell death)(아폽토시스)로부터 보호하는 모든 AXL-관여 프로세스를 의미한다. 특히, AXL 매개 항-아폽토시스는 인간 세포, 바람직하게는 인간 암세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는 인간 세포를 성장 인자 금단(withdrawl), 저산소증, 화학요법제 또는 방사선에 대한 노출, 또는 Fas/Apo-1 수용체-매개 신호전달의 개시를 통한 아폽토시스의 유도로부터 보호하고, 바람직하게는 AXL 인산화 및/또는 AXL-매개 신호 전달을 포함한, AXL의 비-촉매 활성 또는 촉매 활성에 의해 촉진 또는 매개하는 과정을 의미한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 AXL로의 결합 활성이  $KD = 10^{-5}$  M 이하, 바람직하게는  $KD = 10^{-7}$  M 이하, 및 가장 바람직하게는  $KD = 10^{-9}$  M 이하인 항체를 포함한다. AXL에 대한 본 발명의 항체의 결합 활성이  $KD = 10^{-5}$  M 이하인지 여부는 당해 분야에서 당업자에게 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 활성은 Biacore에 의한 표면 플라즈몬 공명, 및/또는 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), EIA (enzyme immunoassays), RIA (radioimmunoassays), 또는 형광 항체 기법, 예를 들면, FACS를 이용하여 결정될 수 있다.
- [0018] 제2양태에서, 상기 항체는 하나 이상의 항원 결합 부위, 예를 들면, 하나 또는 두 개의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 또한, 상기 항체는 바람직하게는 하나 이상의 면역글로불린 중쇄 사슬 및 하나 이상의 면역글로불린 경쇄를 포함한다. 면역글로불린 사슬은 가변 도메인 및 선택적으로 불변 도메인을 포함한다. 가변 도메인은 상보성 결정 영역(complementary determining region, CDR), 예를 들면, CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역, 및 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 용어 "상보성 결정 영역(complementary determining region, CDR)"은 당해 분야에서 잘 정의되어 있고(예를 들면, Harlow and Lane, "Antibodies, a Laboratory Manual", CSH Press, Cold

Spring Harbour, 1988 참조) 항원과 주로 접촉하는 항체의 가변 영역 내에 아미노산의 영역(stretch)을 의미한다.

- [0019] 본 발명의 또 다른 양태는
- [0020] (a) 서열번호 16, 22, 28로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
- [0021] (b) 서열번호 17, 23, 29로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
- [0022] (c) 서열번호 18, 24, 30으로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 하나 이상의 중쇄 아미노산 서열, 및/또는
- [0023] (d) 서열번호 13, 19, 25로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
- [0024] (e) 서열번호 14, 20, 26으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
- [0025] (f) 서열번호 15, 21, 27로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 하나 이상의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 AXL의 세포외 도메인에 결합하는 단편 또는 유도체를 포함한 항체, 또는
- [0026] AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체에 관한 것이다.
- [0027] 바람직한 구체예에서, 상기 항체는
- [0028] (a) 서열번호 16으로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
- [0029] (b) 서열번호 17로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
- [0030] (c) 서열번호 18로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
- [0031] (d) 서열번호 13으로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
- [0032] (e) 서열번호 14로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
- [0033] (f) 서열번호 15로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,
- [0034] 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체이다.
- [0035] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는
- [0036] (a) 서열번호 22로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
- [0037] (b) 서열번호 23으로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
- [0038] (c) 서열번호 24로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
- [0039] (d) 서열번호 19로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,
- [0040] (e) 서열번호 20으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
- [0041] (f) 서열번호 21로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체이다.
- [0042] 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는
- [0043] (a) 서열번호 28로 표시된 CDRH1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH1 서열,
- [0044] (b) 서열번호 29로 표시된 CDRH2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH2 서열, 및
- [0045] (c) 서열번호 30으로 표시된 CDRH3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRH3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함하는 중쇄, 및/또는
- [0046] (d) 서열번호 25로 표시된 CDRL1, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL1 서열,

- [0047] (e) 서열번호 26으로 표시된 CDRL2, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL2 서열, 및
- [0048] (f) 서열번호 27로 표시된 CDRL3, 또는 그와 1개 또는 2개의 아미노산이 상이한 CDRL3 서열로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,
- [0049] 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 단일클론 항체이다.
- [0050] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 서열번호 8, 10, 12로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 7, 9, 11으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열, 적어도 그의 가변 도메인 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체에 관한 것이다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된, 두 개의 폴리펩티드 서열 간의 "서열 동일성(sequence identity)"은 상기 서열 간에 동일한 아미노산의 비율을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 폴리펩티드 서열은 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다.
- [0052] 특정한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체는 11B7, 11D5, 10D12 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0053] 본 발명의 항체는 천연 및/또는 합성 기원의 항체, 예를 들면, 포유동물 기원의 항체일 수 있다. 바람직하게는, 존재하는 경우, 불변 도메인은 인간 불변 도메인이다. 가변 도메인은 바람직하게는 포유동물 가변 도메인, 예를 들면, 인간화 가변 도메인 또는 인간 가변 도메인이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체이다.
- [0054] 본 발명의 항체는 IgA-, IgD-, IgE, IgG- 또는 IgM-형일 수 있고, 바람직하게는 IgG1-, IgG2-, IgG3-, IgG4-, IgM1- 및 IgM2-형을 포함하나, 이에 한정되지 않는 IgG- 또는 IgM-형일 수 있다. 가장 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 인간 IgG1-, IgG2- 또는 IgG4-형일 수 있다.
- [0055] 앞서 검토된 바와 같이, 항체의 다수의 이소형이 있다. 생성되는 항체는 최초에 그와 같은 이소형을 가질 필요는 없으나, 생성된 항체가 이소형을 가질 수 있고, 당해 분야에서 잘 알려진 통상적인 분자 생물학 기법을 이용하여 적합한 발현 벡터 내에 분자 수준에서 클로닝된(molecularly cloned) V 영역 유전자, 클로닝된 불변 영역 유전자 또는 cDNA를 이용하고, 당해 분야에서 공지된 기법을 이용하여 숙주에서 발현시키는 것에 의해 이소형-전환이 수행될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0056] 용어 항체는 항체의 하나 이상의 항원 결합 부위를 갖는 "단편(fragment)" 또는 "유도체(derivative)"를 포함한다. 항체 단편은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 및 Fv 단편을 포함한다. 항체의 유도체는 단쇄 항체(single chain antibody), 나노바디(nanobody), 및 디아바디(diabody)를 포함한다. 항체의 유도체는 또한 AXL에 결합하는 항체-유사 결합 활성을 갖는 스카폴드 단백질을 포함할 것이다.
- [0057] 본 발명에서, 본 명세서에서 사용된 용어 "스카폴드 단백질(scaffold protein)"은 아미노산 삽입, 치환 또는 결실이 높은 정도로 허용가능한(tolerable) 노출된 표면 영역을 갖는 폴리펩티드 또는 단백질을 의미한다. 본 발명에 따라 이용될 수 있는 스카폴드 단백질의 예는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터 유래된 단백질 A, 피에리스 브라시카에(*Pieris brassicae*)로부터 유래된 빌린(bilin) 결합 단백질, 또는 기타 리포칼린, 안키린 반복 단백질(ankyrin repeat protein), 및 인간 피브로넥틴(Binz and Pluckthun, Curr Opin Biotechnol, 16: 459-69, 2005에서 검토됨)이다. 스카폴드 단백질의 공학은 친화도 기능을 안정적으로 폴딩된 단백질의 구조적 프레임워크 상에 또는 그 내부로 이식 또는 통합시키는 것으로 간주될 수 있다. 친화도 기능은 본 발명에 따른 단백질 결합 친화도를 의미한다. 스카폴드는 결합 특이성을 부여하는 아미노산 서열로부터 구조적으로 분리될 수 있다. 일반적으로, 그와 같은 인공적인 친화도 시약의 개발을 위해 적합한 것으로 보이는 단백질은 당해 기술 분야에서 알려진 기술인, 인 비트로에서 표시된 인공 스카폴드 라이브러리에서 결합제(binding agent)를 위한, 정제된 단백질 또는 세포 표면에 표시된 단백질인 AXL에 대한 패닝(panning)과 같은 합리적인, 또는 가장 흔하게는 조합적 단백질 공학(combinational protein engineering) 기법에 의해 수득될 수 있다(Skerra, J. Mol. Recog., Biochim Biophys Acta, 1482: 337-350, 2000; Binz and Pluckthun, Curr Opin Biotechnol, 16: 459-69, 2005). 또한, 항체 유사 결합 활성을 갖는 스카폴드 단백질은 수용체(acceptor) 폴리펩티드를 포함하는 스카폴드 도메인으로부터 유래될 수 있고, 상기 단백질은 상기 수용체 폴리펩티드를 포함하는 스카폴드 도메인에 공여체 폴리펩티드의 결합 특이성을 부여하기 위해 공여체 폴리펩티드의 결합 도메인에 이식될 수 있다. 삽입된 결합 도메인은 예를 들면, 항-AXL 항체의 하나 이상의 CDR, 바람직하게는 서열번호

13 내지 30의 군으로부터 선택된 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 삽입은 예를 들면, 폴리펩티드 합성, 아미노산을 코딩하는 핵산의 합성을 포함한 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 기법, 및 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 다양한 형태의 재조합 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0058] 앞서 표시된 바와 같이, 항체, 항체 단편, 또는 그의 유도체의 특이성은 CDR의 아미노산 서열에 존재한다. 항체의 가변 도메인(중쇄 VH 및 경쇄 VL)은 바람직하게는 4개의 상대적으로 보존된 프레임워크 영역, 또는 "FR"에 의해 플랭킹된, 종종 고가변 영역(hypervariable region)이라 불리는 3개의 상보성 결정 영역을 포함한다. 종종, 항체의 특이성은 VH 사슬의 CDR 또는 복수 개의 CDR과 같은 CDR에 의해 결정되거나, 주로 그에 의해 결정된다. 당해 기술 분야의 당업자는 전술된 CDR을 갖는 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체의 가변 도메인이 보다 개선된 특이성 및 생물학적 기능의 항체의 구축을 위해 이용될 수 있다는 것을 용이하게 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 전술된 가변 도메인의 하나 이상의 CDR을 포함하고, 첨부된 실시예에서 기재된 항체와 실질적으로 동일하거나, 유사하거나, 또는 개선된 결합 특성을 유리하게 갖는 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체를 포괄한다. 첨부된 서열 목록에 기재되고, 본 발명의 구체예에 의해 요구된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체로부터 출발하여, 당업자는 강화된 특이성 및/또는 친화도를 위해 최초로 확인된 단일클론 항체 또는 다른 항체로부터의 추가적인 CDR을 결합할 수 있다. CDR 이식(grafting)이 당해 분야에서 잘 알려져 있고, 또한, 최초의 특이성이 유지되는 한, 본 발명의 항체, 그의 단편 또는 유도체의 특이적 친화도 및 다른 특성을 조정(fine-tune)하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 항체, 단편 또는 유도체는 최초의 공여체 항체(donor antibody)의 두 개 이상, 보다 바람직하게는 세 개 이상, 훨씬 더 바람직하게는 네 개 이상 또는 다섯 개 이상 및 특히 바람직하게는 여섯 개의 CDR 모두를 포함하는 것이 유리하다. 본 발명의 또 다른 대안에서, 상이한 최초로 확인된 단일클론 항체로부터의 CDR이 새로운 항체에서 조합될 수 있다. 이 경우, 중쇄의 3개의 CDR이 동일한 항체로부터 유래되고, 경쇄의 3개의 CDR 모두는 상이한 항체(그러나, 모두 동일한 항체로부터 유래됨)로부터 유래되는 것이 바람직하다. 본 발명의 항체, 또는 그들의 상응하는 면역글로불린 사슬(들)은 단독으로, 또는 조합하여, 당해 분야에서 공지된 통상적인 기법, 예를 들면, 당해 분야에서 알려진 아미노산 결실(들), 삽입(들), 치환(들), 첨가(들), 및/또는 재조합(들) 및/또는 기타의 변형(들)을 이용하여, 더 변형될 수 있다. 면역글로불린 사슬의 아미노산 서열을 뒷받침하는 DNA 서열에 그와 같은 변형을 도입하는 방법이 당해 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다; 예를 들면, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. 참조.

[0059] 본 발명의 항체, 항체 단편, 또는 그의 유도체는 선택적으로 치료적 목적을 위해 탈면역화(deimmunize)될 수 있다. 탈면역화 항체는 T 헬퍼 림프구에 의해 인식될 수 있는 에피토프가 없거나 또는 상기 에피토프가 감소된 단백질이다. 상기 에피토프를 확인하는 방법의 예가 Tangri 등 (J Immunol. 174: 3187-96, 2005)에 제시된다. 탈면역화 항체 단편 또는 그의 유도체의 제조는 미국특허 제6,054,297호, 제5,886,152호 및 제5,877,293호에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0060] 일 구체예에서, 본 발명의 항체는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정한 종으로부터 유래되거나, 또는 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나, 또는 그와 상동성이고, 상기 사슬의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스로부터 유래된 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동성인 것인 "키메라(chimeric)" 항체 (면역글로불린), 및 원하는 생물학적 활성을 보이는 한, 그와 같은 항체의 단편을 포함한다(미국특허 제4,816,567호; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). 키메라 항체의 제조는 예를 들면, WO 89/09622에 기재된다.

[0061] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 38, 39, 41, 42로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 37, 40으로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인, 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 키메라 항체, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체에 관한 것이다.

[0062] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 인간화 항체 또는 완전한 인간 항체이다. 항체의 인간화 형태는 키메라화(chimerization) 또는 CDR 이식(CDR grafting)과 같은, 당해 기술 분야에서 공지된 방법에 따라 생성될 수 있다. 인간화 항체의 제조를 위한 대안적인 방법이 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있으며 예를 들면, EP-A1 0 239 400 및 W090/07861에 기재된다. 일반적으로, 인간화 항체는 인간이 아닌 출처로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이와 같은, 인간이 아닌 출처로부터의 아미노산 잔기(non-human amino acid residue)는 종종 "도입(import)" 가변 도메인으로부터 취해진, "도입" 잔기로 지칭된다. 인간화(humanization)는 예를



들면, 비-인간 기원의 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 대체하는 것에 의해, Winter 및 동료들의 방법(Jones et al., Nature, 321 :522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 그와 같은 "인간화(humanized)" 항체는 실질적으로 완전한(intact) 인간 가변 도메인보다 작은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 것인 키메라 항체이다(미국특허 제4,816,567호). 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 비-인간 항체의 유사한 부위로부터 유래된 잔기에 의해 치환된 것인 인간 항체이다.

[0063] 바람직하게는, 본 발명은 서열번호 44, 46로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄 아미노산 서열, 또는 적어도 그의 가변 도메인 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 및/또는 서열번호 43, 45로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄 아미노산 서열 또는 적어도 그의 가변 도메인 또는 그에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 인간화 항체, 또는 AXL의 세포외 도메인 상의 동일한 에피토프를 인식하는 항체를 의미한다.

[0064] 완전한 인간 항체를 생성하는 하나의 방법은 인간 중쇄 유전자좌(locus) 및 카파(kappa) 경쇄 유전자좌의 최대 1000 kb 이하 그보다 작은 생식 계열 배열 단편(germline configured fragment)을 포함하도록 조작된 마우스의 XenoMouse® 스트레인을 이용하는 것이다. Mendez 등 (Nature Genetics 15:146-156 1997), 및 Green and Jakobovits, (J. Exp. Med. 188:483-495, 1998)를 참조한다. XenoMouse® 스트레인은 AMGEN, Inc. (formerly ABGENIX, Fremont, CA)으로부터 이용가능하다.

[0065] 마우스의 XenoMouse® 스트레인의 제조가 1990년 1월 12일에 출원된 미국특허출원 제07/466,008호, 1990년 11월 8일에 출원된 미국특허출원 제07/610,515호, 1992년 7월 24일에 출원된 미국특허출원 제07/919,297호, 1992년 7월 30일에 출원된 미국특허출원 제07/922,649호, 1993년 3월 15일에 출원된 미국특허출원 제08/031,801호, 1993년 8월 27일에 출원된 미국특허출원 제08/112,848호, 1994년 4월 28일에 출원된 미국특허출원 제08/234,145호, 1995년 1월 20일에 출원된 미국특허출원 제08/376,279호, 1995년 4월 27일에 출원된 미국특허출원 제08/430,938호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/464,584호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/464,582호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/463,191호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/462,837호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/486,853호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/486,857호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/486,859호, 1995년 6월 5일에 출원된 미국특허출원 제08/462,513호, 1996년 10월 2일에 출원된 미국특허출원 제08/724,752호, 1996년 12월 3일에 출원된 미국특허출원 제08/759,620호, 2001년 11월 30일에 출원된 미국특허출원 공개 제2003/0093820호, 및 미국특허 제6,162,963호, 제6,150,584호, 제6,114,598호, 제6,075,181호, 및 제5,939,598호 및 일본특허 제3 068 180 B2호, 제3 068 506 B2호, 및 제3 068 507 B2호에서 검토되고 상술된다. 또한, 1996년 6월 12일에 등록 공고된 유럽특허 EP 0 463 151 B1, 1994년 2월 3일에 공개된 국제특허출원 공개 W09402602, 1996년 10월 31일에 공개된 국제특허출원 W09634096, 1998년 6월 11일에 공개된 W09824893, 2000년 12월 21일에 공개된 W00076310을 참조한다. 상기 인용된 특허, 특허출원 및 참조문헌 각각의 개시는 이에 의해 참조로 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0066] 대안적인 접근법에서, GenPharm International, Inc.를 포함한 다른 발명자들은 "미니로쿠스(minilocus)" 방법을 이용하였다. 미니로쿠스 방법에서, 외생 Ig 유전자좌가 Ig 유전자좌로부터의 조각(개별적인 유전자)의 포함을 통해 모방(mimick)된다. 따라서, 하나 이상의 VH 유전자, 하나 이상의 DH 유전자, 하나 이상의 JH 유전자, mu 불변 영역, 및 일반적으로, 제2 불변 영역(바람직하게는 감마 불변 영역)이 동물로의 삽입을 위한 구조물(construct)로 형성된다. 이 방법은 그 개시 전체가 이에 의해 참조로 본 명세서에 포함된, Surani 등에 의한 미국특허 제5,545,807호 및 각각 Lonberg 및 Kay에 의한 미국특허 제5,545,806호, 제5,625,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 제5,770,429호, 제5,789,650호, 제5,814,318호, 제5,877,397호, 제5,874,299호, 및 제6,255,458호, Krimpenfort 및 Berns에 의한 미국특허 제5,591,669호 및 제6,023,010호, Berns 등의한 미국특허 제5,612,205호, 제5,721,367호, 및 제5,789,215호, 및 Choi와 Dunn 및 GenPharm International에 의한 미국특허 제5,643,763호, 1990년 8월 29일에 출원된 미국특허출원 제07/574,748호, 1990년 8월 31일에 출원된 제07/575,962호, 1991년 12월 17일에 출원된 제07/810,279호, 1992년 3월 18일에 출원된 제07/853,408호, 1992년 6월 23일에 출원된 제07/904,068호, 1992년 12월 16일에 출원된 제07/990,860호, 1993년 4월 26일에 출원된 제08/053,131호, 1993년 7월 22일에 출원된 제08/096,762호, 1993년 11월 18일에 출원된 제08/155,301호, 1993년 12월 3일에 출원된 제08/161,739호, 1993년 12월 10일에 출원된 제08/165,699호, 1994

년 3월 9일에 출원된 제08/209,741호에 기재된다. 또한, 이에 의해 참조로 개시 전체가 본 명세서에 포함된, 유럽특허 제0 546 073 B1호, 국제특허출원 W09203918, W09222645, W09222647, W09222670, W09312227, W09400569, W09425585, W09614436, W09713852, 및 W09824884, 및 미국특허 제5,981,175호를 참조한다.

[0067] Kirin은 또한, 마이크로셀 융합을 통해, 염색체의 큰 조각, 또는 전체 염색체가 도입된 것인 마우스로부터 인간 항체의 생성을 입증했다. 이에 의해 참조로 그 교시가 본 명세서에 포함된 것인 유럽특허출원 제773 288호 및 제843 961호를 참조한다. 추가적으로, Kirin의 Tc 마우스와 Medarex의 미니로쿠스(Humab) 마우스의 교잡육종의 결과인, KMTM 마우스가 생성되었다. 이 마우스는 Kirin 마우스의 인간 IgH 트랜스염색체(transchromosome) 및 Genpharm 마우스의 카파 사슬 형질전환 유전자를 갖는다(Ishida et al., Cloning Stem Cells 4:91-102, 2002).

[0068] 인간 항체는 또한 인 비트로 방법에 의해 유래될 수 있다. 적합한 예는 파아지 표시(phage display)(CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (formerly Proliferon), Affimed) 리보솜 표시(ribosome display) (CAT), 효모 표시, 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0069] 치료적 목적을 위해, 항체가 치료적 효과기(effector), 예를 들면, 방사성활성 기 또는 세포독성 기에 접합될 수 있다.

[0070] 진단적 목적을 위해, 항체가 표지될 수 있다. 적합한 표지는 방사성 표지, 형광 표지, 또는 효소 표지를 포함한다.

[0071] 본 발명에 따라 이용되는 또 다른 항체는 소위 이종 항체(xenogenic antibody)이다. 마우스에서 인간 항체의 제조와 같은 이종 항체의 제조를 위한 일반적 원칙이 예를 들면, W09110741, W09402602, W09634096 및 W09633735에 기재된다.

[0072] 앞서 검토된 바와 같이, 본 발명의 항체는 완전한 항체 외에, 다양한 형태, 예를 들면, Fv, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 및 단쇄를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다; 예를 들면, W08809344를 참조한다.

[0073] 필요한 경우, 본 발명의 항체는 항체의 결합 특성을 변화시키기 위해 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 도메인에서 돌연변이될 수 있다. 예를 들면, AXL에 대한 항체의 Kd를 증가 또는 감소시키기 위해 또는 항체의 결합 특이성을 변화시키기 위해 하나 이상의 CDR 영역에서 돌연변이가 일어날 수 있다. 부위 특이적 돌연변이유발(site directed mutagenesis)의 기법이 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 전술된 Sambrook 등 및 Ausubel 등을 참조한다. 또한, AXL 항체의 가변 영역에 생식 계통 대비 변화된 것으로 알려진 아미노산 잔기에 돌연변이가 이루어질 수 있다. 또 다른 양태에서, 프레임워크 영역 중 하나 이상에 돌연변이가 도입될 수 있다. AXL 항체의 반감기를 증가시키기 위해 프레임워크 영역 또는 불변 도메인에서 돌연변이가 이루어질 수 있다. 예를 들면, W00009560을 참조한다. 항체의 면역원성을 변화시키거나, 또 다른 분자로의 공유 결합 또는 비-공유 결합을 위한 부위를 제공하기 위해, 또는 보체 고정(complement fixation)과 같은 특성을 변화시키기 위해 프레임워크 영역 또는 불변 도메인에 또한 돌연변이가 이루어질 수 있다. 하나의 돌연변이된 항체에서 각각의 프레임워크 영역, 불변 도메인 및 가변 영역에서 돌연변이가 이루어질 수 있다. 대안적으로, 하나의 돌연변이된 항체에서 프레임워크 영역, 가변 영역 또는 불변 영역 중 하나에서만 돌연변이가 이루어질 수 있다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 효과기 기능을 갖는 불변 도메인을 가질 수 있고, 이에 의해 세포 표면에 결합된 상기 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체를 갖는 AXL 발현 세포들은 면역계 기능에 의해 공격될 수 있다. 예를 들면, 상기 항체는 보체를 고정시키고 보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC)에 참여할 수 있다. 또한, 상기 항체는 단핵구 및 NK(natural killer) 세포와 같은 효과기 세포 상의 Fc 수용체에 결합할 수 있고, 항체-의존적 세포성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity)에 참여할 수 있다.

[0075] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 치유적 치료, 바람직하게는 과다증식 질환, 심혈관 질환, 특히, 즉상동맥 경화증 및 혈전증, 당뇨병 관련 질환, 특히, 사구체 비대증(glomerular hypertrophy) 또는 당뇨병성 신병증, 및 특히, AXL 발현, 과다발현 또는 과다활성과 연관되거나, 이를 동반하거나, 또는 이에 의해 유발된 질환의 치료에 적용될 수 있다. 상기 과다증식 질환은 바람직하게는, 암, 예를 들면, 유방암, 결장암, 폐암, 신장암, 여포성 림프종(follicular lymphoma), 골수성 백혈병, 피부암/흑색종, 교모세포종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 바렛식도(Barrett's esophagus) 및 식도암, 위암, 방광암, 경부암, 간암, 갑상선암, 및 두경부암, 또는 증식성(hyperplastic) 및 종양성(neoplastic) 질환, 또는 기타 AXL 발현 또는 과다발현 과다증식 질환과 같은 AXL 발

현, 과다발현, 과다활성과 연관되거나, 이를 동반하거나 또는 이에 의해 유발된 질환으로부터 선택된다.

- [0076] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 전술된 질병 중 하나의 치료를 위한 항종양제(antineoplastic agent)와의 병용-투여를 위해 이용될 수 있다.
- [0077] 본 명세서에서 사용된 병용-투여(co-administration)는 항종양제, 바람직하게는 아포토시스 유도성 항종양제와 함께 본 발명의 항체의 투여를 포함한다. 용어 병용-투여는 또한 단일 조성물의 형태 또는 둘 이상의 별개의 조성물의 형태로, 본 발명의 항체와 항종양제, 바람직하게는 아포토시스 유도성 항종양제의 투여를 포함한다. 병용-투여는 본 발명의 항체와 항종양제, 바람직하게는 아포토시스 유도성 항종양제를 동시에(즉, 같은 시간에) 또는 순차적으로(즉, 간격을 두고) 투여하는 것을 포함한다.
- [0078] 본 발명은 또한 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 전술된 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체를 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 예를 들면, 단독으로 또는 조합된 핵산 분자들을 포함하는 DNA, cDNA, RNA 또는 인공적으로 제조된 DNA 또는 RNA 또는 재조합에 의해 제조된 키메라 핵산 분자일 수 있다. 본 발명의 핵산 분자는 또한 전체 유전자 또는 그의 상당한 부분, 또는 그의 단편 및 유도체에 상응하는 게놈 DNA일 수 있다. 상기 뉴클레오타이드 서열은 천연 뉴클레오타이드 서열과 일치할 수 있거나, 또는 하나 또는 복수 개의 뉴클레오타이드 치환, 결실 또는 첨가를 포함할 수 있다. 본 발명의 특정한 바람직한 구체예에서, 핵산 분자는 cDNA 분자이다.
- [0079] 바람직하게는, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 단리된 핵산 분자에 관한 것이다:
- [0080] (a) 서열번호 7-12, 13-30, 37-42, 43-46의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열
- [0081] (b) 서열번호 1-6, 31-36으로 표시된 핵산 서열
- [0082] (c) (a) 또는 (b)의 서열에 상보적인 핵산; 및
- [0083] (d) 엄격한(stringent) 조건 하에 (a), (b), 또는 (c)에 혼성화될 수 있는 핵산 서열.
- [0084] 용어 "엄격한 조건 하에 혼성화하는(hybridizing under stringent conditions)"은 두 개의 핵산 단편이 예를 들면, Sambrook et al., "Expression of cloned genes in E. coli" in Molecular Cloning: A laboratory manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA에 기재된 바와 같은 표준화된 혼성화 조건 하에서 상호 간에 혼성화된다는 것을 의미한다. 그와 같은 조건은 예를 들면, 약 45℃에서 6.0xSSC에서의 혼성화 및 뒤이은, 50℃에서 0.2xSSC, 바람직하게는 65℃에서 2.0xSSC, 또는 50℃에서 0.2xSSC, 바람직하게는 65℃에서 0.2xSSC에 의한 세척이다.
- [0085] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 상기 벡터는 예를 들면, 파아지, 플라스미드, 바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 복제 적격(replication competent)이거나 또는 복제 결함(replication defective)일 수 있다. 후자의 경우, 바이러스 증식은 일반적으로 보완성 숙주 세포(complementing host cell)에서만 일어날 것이다.
- [0086] 본 발명의 핵산 분자는 숙주에서 증식을 위해 선택 마커를 포함하는 벡터에 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터가 인산칼슘 침전물 또는 염화 루비듐 침전물과 같은 침전물, 또는 하전된 지질(charged lipid) 또는 탄소-기반 클러스터, 예를 들면, 풀러렌(fulleren)과의 복합체로 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 벡터는 숙주 세포로의 적용 전에 적합한 패키징 세포 계통(packaging cell line)을 이용하여 인 비트로에서 패키징될 수 있다.
- [0087] 바람직하게는, 본 발명의 벡터는 핵산 분자가 원핵 및/또는 진핵 숙주 세포에서 전사 및 선택적으로 발현될 수 있게 하는 하나 이상의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터이다. 상기 핵산 분자의 발현은 핵산 분자의 전사, 바람직하게는 번역가능한 mRNA로의 전사를 포함한다. 진핵세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서의 발현을 보장하는 조절성 요소들이 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 그들은 일반적으로 전사의 개시를 보장하는 조절성 서열 및 선택적으로 전사의 종료 및 전사물의 안정화를 보장하는 폴리-A 신호 포함한다. 추가적인 조절성 요소들은 전사 인핸서 및 번역 인핸서를 포함할 수 있다. 원핵 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 가능한 조절성 요소들은 예를 들면, 대장균의 lac, trp 또는 tac 프로모터를 포함하고, 진핵 숙주 세포에서의 발현을 허용하는 조절성 요소의 예는 효모의 AOXI 또는 GAL1 프로모터, 또는 포유동물 및 기타 동물 세포의 CMV-, SV40-, RSV-프로모터 (Rous sarcoma virus), CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다. 전사의 개시를 담당하는 요소 외에, 그와 같은 조절 요소들은 또한 폴리뉴클레오타이드의 하류에 SV40-폴리-A 부위 또는 tk-폴리-A 부위와 같은, 전사 종료 신호를 포함할 수 있다. 이 배경에서, Okayama-Berg cDNA 발현

벡터 pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) 또는 pSPORT1 (GIBCO BRL)와 같은 적합한 발현 벡터가 당해 기술 분야에서 알려져 있다. 바람직하게는, 상기 벡터는 발현 벡터 및/또는 유전자 전달 또는 표적화 벡터이다. 레트로바이러스, 벡시니아 바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 또는 보바인 파필로마 바이러스(bovine papilloma virus)와 같은 바이러스로부터 유래된 발현 벡터가 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 표적화된 세포 집단으로의 전달을 위해 이용될 수 있다. 당해 기술 분야에서 당업자에게 잘 알려진 방법이 재조합 바이러스 벡터를 제조하기 위해 이용될 수 있다; 예를 들면, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Third Edition) N.Y. 및 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)에 기재된 기법들을 참조한다. 대안적으로, 본 발명의 핵산 분자가 표적 세포로의 전달을 위해 리포솜으로 재구성될 수 있다.

[0088] 본 발명은 또한 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주에 관한 것이다. 상기 숙주는 원핵 세포 또는 진핵 세포 또는 인간을 제외한 형질전환 동물일 수 있다. 숙주에 존재하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 숙주의 게놈 내로 통합될 수 있거나, 또는 염색체 외의 상태로 유지될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 핵산 분자가 돌연변이 유전자를 복구하거나 또는 상동성 재조합을 통해 돌연변이 유전자를 생성하기 위해, "유전자 표적화(gene targeting)" 및/또는 "유전자 치환(gene replacement)"을 위해 이용될 수 있는 것으로 이해될 것이다; 예를 들면, Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press를 참조한다.

[0089] 상기 숙주는 원핵 세포 또는 진핵 세포, 예를 들면, 박테리아 세포, 곤충 세포, 균류 세포, 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포, 또는 바람직하게는 인간 세포일 수 있다. 바람직한 균류 세포는 예를 들면, 사카로마이세스(Saccharomyces) 속의 세포, 특히, 사카로마이세스 세레비시애(S. cerevisiae) 종의 세포이다. 용어 "원핵(prokaryotic)"은 본 발명의 변이체 폴리펩티드의 발현을 위해 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환 또는 형질감염될 수 있는 모든 박테리아를 포함하도록 의도된다. 원핵 숙주는 그람 음성 박테리아 및 그람 양성 박테리아, 예를 들면, 대장균, 스태필로코쿠스 티피뮤리움(S. typhimurium), 세라티아 마르세센스(Serratia marcescens) 및 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)를 포함할 수 있다. 본 발명의 변이체 폴리펩티드의 돌연변이 형태를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 당해 기술 분야의 당업자에게 일반적으로 알려진 기법을 이용하여 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키기 위해 이용될 수 있다. 융합되고, 작동가능하게 연결된 유전자를 제조하고 이들을 박테리아 또는 동물 세포에서 발현시키는 방법이 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다(Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001, Third Edition)). 본 명세서에 기재된 유전적 구조물 및 방법은 예를 들면, 원핵 숙주에서 본 발명의 변이체 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체의 발현을 위해 이용될 수 있다. 일반적으로, 삽입된 핵산 분자의 효율적인 전사를 촉진하는 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터가 숙주와 함께 이용된다. 발현 벡터는 일반적으로, 복제 원점, 프로모터, 및 종료 서열(terminator), 및 형질전환된 세포의 표현형 선택을 제공할 수 있는 특정한 유전자를 포함한다. 형질전환된 원핵 숙주가 최적의 세포 성장을 달성하기 위해 당해 기술 분야에서 공지된 기법에 따라 발효기에서 증식되고 배양될 수 있다. 그 후, 본 발명의 항체, 항체 단편, 또는 그의 유도체가 배양 배지, 세포 용해물 또는 세포막 분획으로부터 분리될 수 있다. 미생물에 의해 또는 다른 방식에 의해 발현된 본 발명의 항체, 항체 단편, 또는 그의 유도체의 분리 및 정제가 통상적인 수단, 예를 들면, 제조용 크로마토그래피 분리(preparative chromatographic separation) 및 단일클론 항체 또는 다중클론 항체의 이용을 포함하는 것과 같은 면역학적 분리에 의해 수행될 수 있다.

[0090] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 숙주는 박테리아, 균류, 식물, 양서류, 또는 동물 세포이다. 바람직한 동물 세포는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포, BHK(baby hamster kidney) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 3T3 세포, NSO 세포 및 인간 세포, 예를 들면, Per.C6을 포함한 다수의 다른 세포 계통을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 동물 세포는 곤충 세포이다. 바람직한 곤충 세포는 SF9 세포 계통의 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0091] 본 발명의 보다 바람직한 구체예에서, 상기 숙주는 인간 세포 또는 인간 세포 계통이다. 상기 인간 세포는 인간 배아 신장 세포(HEK293, 293T, 293 freestyle)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 인간 세포 계통은 HeLa 세포, 인간 간세포 육종 세포(human hepatocellular carcinoma cell)(예를 들면, Hep G2), A549 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0092] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 제조하기 위해 이용될 수 있는 하나 이상의 본 발명의 핵산 분자를 포함하는 형질전환 비-인간(non-human) 동물을 제공한다. 항체는 염소, 소, 말, 돼지, 랫트, 마우스, 토끼, 햄스터 또는



기타 포유류의 젖, 혈액 또는 소변과 같은 조직 또는 체액에서 제조되고 그로부터 회수될 수 있다. 예를 들면, 미국특허 제5,827,690호; 제5,756,687호; 제5,750,172호; 및 제5,741,957호를 참조한다. 전술된 바와 같이, 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비-인간 형질전환 동물이 AXL 또는 그의 일부에 의해 면역화시키는 것에 의해 제조될 수 있다.

[0093] 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 합성을 가능하게 하는 조건 하에서 본 발명의 숙주를 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항체의 제조 방법에 관한 것이다.

[0094] 최적의 세포 성장을 달성하기 위해 당해 기술 분야에서 공지된 기법에 따라 형질전환된 세포가 발효기에서 증식되고 배양될 수 있다. 일단 발현되면, 본 발명의 전체 항체, 그들의 이량체(dimer), 개별적인 경쇄 및 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태가 암모늄 술페이트 침전, 친화도 컬럼, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함한, 당해 기술 분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다; Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982)를 참조한다. 본 발명의 항체 또는 그의 상응하는 면역글로불린 사슬(들)이 그 후 성장 배지, 세포 용해액 또는 세포막 분획으로부터 분리될 수 있다. 예를 들면, 미생물에 의해 발현된 본 발명의 항체 또는 면역글로불린 사슬의 분리 및 정제가 예를 들면, 제조용 크로마토그래피 분리 및 예를 들면, 본 발명의 항체의 불변 영역에 대한 단일클론 항체 또는 다중클론 항체의 이용을 포함하는 것과 같은 면역학적 분리와 같은 통상적인 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0095] 본 발명의 항체가 예를 들면, 약물 표적화 및 영상화(imaging) 적용을 위해 다른 모이어티에 더 결합될 수 있다는 것이 당해 기술 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 그와 같은 결합은 항체 또는 항원의 발현 후에 결합 부위로 화학적으로 수행될 수 있거나, 또는 결합 생성물이 DNA 수준에서 본 발명의 항체 또는 항원 내로 조작될 수 있다. 그 후, DNA가 적합한 숙주 시스템에서 발현되고, 발현된 단백질이 회수되고, 필요한 경우, 재생된다.

[0096] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 항체는 방사성 동위원소 또는 독성 화학요법제와 같은 효과기(effector)에 결합된다. 바람직하게는, 이 항체 접합물(conjugate)이 제거를 위해, AXL을 발현하는 세포, 예를 들면, 암세포의 표적화에 유용하다. 본 발명의 항체/항체 단편의 방사성 동위원소로의 연결은 예를 들면, 종양 치료에 장점을 제공한다. 화학요법 및 다른 형태의 암 치료와 달리, 방사성면역요법(radioimmunotherapy) 또는 방사성 동위원소-항체 조합의 투여는 암세포를 직접적으로 표적화하고, 주변의 정상, 건강 조직에 대해 손상을 최소화한다. 바람직한 방사성동위원소는 예를 들면,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ 를 포함한다.

[0097] 또한, 본 발명의 항체는 겔다나마이신(geldanamycin)(Mandler et al., J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51 (2000) 및 마이탄신(maytansin), 예를 들면, 마이탄시노이드 약물(maytansinoid drug), DM1 (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996) 및 오리스타틴(auristatin)-E 또는 모노메틸라우리스타틴-E (Doronina et al., Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003) or calicheamicin)와 같은 독성 화학요법제와 결합된 경우, 암을 치료하기 위해 이용될 수 있다; 산성 또는 환원성 조건 하에서 또는 특정한 프로테아제에 노출되면 약물을 방출하는 상이한 링커가 이 기술과 함께 이용된다. 본 발명의 항체는 당해 기술 분야에서 기재된 바와 같이 접합될 수 있다.

[0098] 본 발명은 또한 본 발명의 항체, 핵산 분자, 벡터, 숙주 또는 본 발명의 방법에 의해 수득된 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0099] 본 명세서에서 사용된 용어 "조성물(composition)"은 하나 이상의 본 발명의 화합물을 포함한다. 바람직하게는, 그와 같은 조성물은 약제학적 조성물 또는 진단용 조성물이다.

[0100] 상기 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 것이 바람직하다. 본 명세서에 개시된 약제학적 조성물은 AXL 발현, 그의 과다발현 또는 과다활성과 연관되거나, 이를 동반하거나 또는 이에 의해 유발되는 질병, 예를 들면, 과다증식 질환, 심혈관 질환, 특히, 죽상동맥경화증 및 혈전증, 당뇨병 관련 질환, 특히, 사구체 비대증 또는 당뇨병성 신병증의 치료를 위해 부분적으로 유용할 수 있다. 상기 질환은 암, 예를 들면, 유방암, 결장암, 폐암, 신장암, 여포성 림프종, 골수성 백혈병, 피부암/흑색종, 교모세포종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 바렛 식도 및 식도암, 위암, 방광암, 경부암, 간암, 갑상선암, 및 두경부암, 또는 증식성(hyperplastic) 및 종양성(neoplastic) 질환, 또는 기타 AXL 발현 또는 과다발현 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0101] 본 명세서에서 사용된 용어 "과다활성(hyperactivity)"은 음성 조절(negative regulation)의 부족 및/또는 기능부전에 의해 유발될 수 있는 비제어 AXL 신호전달을 의미한다. 예로서, 음성 조절은 단백질 탈인산화, 분해 및/또는 엔도사이토시스(endocytosis)를 포함한다. 또한, 비제어 AXL 신호전달은 체세포 또는 생식계통의 유전

적 변형의 결과일 수 있고, 이는 AXL 아미노산 서열의 변화를 초래한다.

[0102] 적합한 약제학적 담체, 부형제, 및/또는 희석제의 예가 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있고 인산염 완충 식염수 용액, 물, 유/수 에멀전(oil/water emulsion)과 같은 에멀전, 다양한 종류의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다. 그와 같은 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려진 통상적인 방법에 의해 제제화될 수 있다. 이 약제학적 조성물은 적합한 투여량으로 개체에게 투여될 수 있다. 적합한 조성물의 투여는 상이한 방법, 예를 들면, 정맥내 투여, 복막내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 국소 투여, 피내(intradermal) 투여, 비강내 투여 또는 기관지내 투여에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 예를 들면, 너와 같은 외부 또는 내부 표적 부위로의 바이올리스틱(biolistic) 전달에 의해, 표적 부위로 직접 투여될 수 있다. 투여 계획(dosage regimen)은 주치의 및 임상적 인자들에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 특정 환자에 대한 투여량은 환자의 크기, 체표면적, 연령, 투여대상 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 전반적 건강 및 동시에 투여되는 다른 약물을 포함한 다수의 인자들에 의존적이다. 단백질성 약제학적 활성 물질이 투여량 당 1  $\mu$ g 내지 100 mg/kg 체중의 양으로 존재할 수 있다; 그러나, 이 대표적인 범위 미만이거나 또는 이를 초과하는 투여량이 예상되며, 특히, 전술된 인자들을 고려할 때 그러하다. 투여 계획이 연속 주입인 경우, 분당 체중 킬로그램당 1 pg 내지 100 mg의 범위이어야 한다.

[0103] 주기적 평가에 의해 진행이 모니터링될 수 있다. 본 발명의 조성물은 국소로 또는 전신으로 투여될 수 있다. 비경구 투여용 제제는 멸균 수성 용액 또는 비-수성 용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올리에이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르이다. 수성 담체는 물, 알코올/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액, 예를 들면, 염수 및 완충 배지를 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로오스(Ringer's dextrose), 텍스트로오스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거(lactated Ringer's) 또는 고정유(fixing oil)를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양분 보충물(nutrient replenisher), 전해질 보충물(예를 들면, 링거 텍스트로오스에 기반한 보충물) 등을 포함한다. 또한 예를 들면, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 비활성 기체 등과 같은 보존제 및 기타 첨가제가 존재할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 의도된 용도에 따라 작용제를 더 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 추가적인 활성제, 예를 들면, 추가적인 항신생물제(antineoplastic agent), 소형 분자 억제제, 항-종양제, 또는 화학요법제를 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0104] 본 발명은 또한 항-AXL 항체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이고, 상기 항체는 바람직하게는 하나 이상의 추가적인 항신생물제와 조합된 본 발명의 항체이다. 상기 조합은 예를 들면, 비정상적 세포 증식을 억제하는데 효과적이다.

[0105] 다수의 항신생물제가 현재 당해 기술 분야에서 알려져 있다. 일반적으로, 상기 용어는 과다증식 질환의 예방, 경감 및/또는 치료를 수행할 수 있는 모든 작용제를 포함한다. 일 구체예에서, 상기 항신생물제는 항체 또는 면역조절제(immunomodulatory) 단백질을 포함하나, 이에 한정되지 않는 치료 단백질의 군으로부터 선택된다. 또 다른 구체예에서, 상기 항신생물제는 유사분열 억제제(mitotic inhibitor), 키나아제 억제제, 알킬화제, 항-대사산물, 인커칼레이팅 항생제(intercalating antibiotic), 성장 인자 억제제, 세포 주기 억제제, 효소, 토포이소머라아제 억제제, 히스톤 탈아세틸라아제 억제제(histone deacetylase inhibitor), 항-생존제(anti-survival agent), 생물학적 반응 조절제(biological response modifier), 항-호르몬, 예를 들면, 항-안드로겐, 및 항혈관형성제(antiangiogenesis agent)로 구성된 소형 분자 억제제 또는 화학요법제의 군으로부터 선택된다.

[0106] 본 명세서에서 제공된 항체와 조합되어 이용될 수 있는 항신생물제의 구체적 예는 예를 들면, 게피티니브(gefitinib), 라파티니브(lapatinib), 수니티니브(sunitinib), 페메트렉스드(pemetrexed), 베바시수마브(bevacizumab), 세톡시마브(cetuximab), 이마티니브(imatinib), 트라스투주마브(trastuzumab), 알렘투주마브(alemtuzumab), 리톡시마브(rituximab), 에를로티니브(erlotinib), 보르테조미브(bortezomib) 등을 포함한다. 본 명세서에 기재되고 본 명세서에서 청구된 조성물에서 사용되는 다른 특정한 항신생물제는 예를 들면, 카페시타빈(capecitabine), 다우노루비신(daunorubicin), 다우노마이신(daunomycin), 닥티노마이신(dactinomycin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 에소루비신(esorubicin), 블레오마이신(bleomycin), 마포스파미드(mafosfamide), 이포스파미드(ifosfamide), 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside), 비스-클로로에틸니트로스우레아(bis-chloroethylnitrosurea), 부숴판(busulfan), 미토마이신(mitomycin) C, 액티노마이신(actinomycin) D, 미트라마이신(mithramycin), 프레드니손, 히드록시프로게스테론, 테스토스테론, 타목시펜, 다카르바진(dacarbazine), 프로카르바진, 헥사메틸멜라민(hexamethylmelamine), 펜타메틸멜라민, 미톡산트론(mitoxantrone), 암사크린(amsacrine), 클로람부실(chlorambucil), 메틸시클로헥실니트로스우레아(methylcyclohexylnitrosurea), 질소 머스터드(nitrogen

mustard), 멜팔란(melphalan), 시클로포스파미드, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈(CA), 5-아자시티딘, 히드록시우레아, 데옥시코포르마이신(deoxycoformycin), 4-히드록시퍼옥시시클로포스포라미드(4-hydroxyperoxycyclophosphoramidate), 5-플루오로우라실(5-FU), 5-플루오로데옥시우리딘(5-FdR), 메토트렉세이트(MTX), 콜치신, 탁솔, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드, 트리메트렉세이트(trimetrexate), 테니포시드(teniposide), 시스플라틴 및 디에틸stil베스트롤(DES)과 같은 화학요법제를 포함한다. 전반적으로, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J.를 참조한다. 특히, 아폽토시스를 유도하는 항신생물제가 바람직하다.

- [0107] 기재된 AXL 항체와 함께 사용되는 경우, 그와 같은 항신생물제는 개별적으로(예를 들면, 5-FU와 항체), 순차적으로(예를 들면, 일정 기간 동안 5-FU 및 항체 사용 및 뒤이어 MTX와 항체), 또는 하나 이상의 그와 같은 항신생물제와 조합하여(예를 들면, 5-FU, MTX와 항체, 또는 5-FU, 방사선요법 및 항체) 이용될 수 있다.
- [0108] 용어 항신생물제는 또한 치료적 절차, 예를 들면, 방사선 조사 또는 방사선 요법을 포함할 수 있다.
- [0109] 본 발명의 약제학적 조성물은 인간 의약에서 이용될 수 있고, 수의학 목적으로도 이용될 수 있다.
- [0110] 추가적으로, 본 발명은 과다증식 질환, 심혈관 질환, 특히, 죽상동맥경화증 및 혈전증, 당뇨병 관련 질환, 특히, 사구체 비대증 또는 당뇨병성 신병증, 및 특히, AXL 발현, 과다발현 또는 과다활성과 연관되거나, 이를 동반하거나, 또는 이에 의해 유발된 질환의 진단, 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조에서 본 발명의 항체, 핵산 분자, 벡터, 또는 본 발명의 숙주 또는 본 발명의 방법에 의해 수득되는 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0111] 전술된 과다증식 질환은 종양 형성(neoplasia), 즉, 조직의 비정상적 및/또는 제어되지 않는 새로운 증식을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "조직의 제어되지 않는 새로운 증식(uncontrolled new growth of tissue)"은 성장 조절의 기능부전 및/또는 상실에 의존적일 수 있다. 과다증식 질환은 종양 질환 및/또는 암, 예를 들면, 전이성 암 또는 침습성 암을 포함한다.
- [0112] 본 발명의 용도의 바람직한 구체예에서, 상기 과다증식 질환은 특히, 유방암, 결장암, 폐암, 신장암, 여포성 림프종, 골수성 백혈병, 피부암/흑색종, 교모세포종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 바렛 식도 및 식도암, 위암, 방광암, 경부암, 간암, 갑상선암, 및 두경부암, 또는 증식성(hyperplastic) 및 종양성(neoplastic) 질환, 또는 기타 AXL 발현 또는 과다발현 과다증식 질환이다.
- [0113] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 전술된 질병 중 하나의 치료를 위해 항신생물제와 병용-투여하기 위한 약제의 제조를 위한, 항-AXL 항체, 바람직하게는 본 발명의 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0114] 추가적인 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명은 약물 내성 암의 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 항-AXL 항체의 용도에 관한 것이다. 특히 바람직한 구체예에서, 상기 항-AXL 항체는 제1항 내지 제22항에 정의된 바와 같은 단일클론 항체이다.
- [0115] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체, 핵산 분자, 벡터, 본 발명의 숙주, 또는 본 발명의 방법에 의해 수득된 항체 및 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0116] 본 발명의 진단용 조성물은 시료를 본 발명의 항체와 접촉시키는 단계, 및 상기 시료 중의 AXL의 존재 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 상이한 세포, 조직 또는 다른 적합한 시료에서 포유동물 AXL의 바람직하지 않은 발현, 과다발현 또는 과다활성의 검출에서 유용하다. 따라서, 본 발명의 진단용 조성물은 과다증식 질환의 발병 또는 질병 상태를 평가하기 위해 이용될 수 있다.
- [0117] 또한, AXL을 발현하는 암세포와 같은 악성종양 세포가 본 발명의 항체에 의해 표적화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체를 결합한 세포들은 보체 시스템(complement system)과 같은 면역계 기능에 의해 또는 세포-매개 세포 독성에 의해 공격받을 수 있고, 그에 의해 암세포의 수를 감소시키거나 또는 제거할 수 있다. 이와 같은 고려는 전이 및 재발성 종양의 치료에 동일하게 적용된다.
- [0118] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 표지화 그룹에 결합된다. 그와 같은 항체는 특히 진단 적용을 위해 적합하다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "표지화 그룹(labelling group)"은 검출가능한 마커, 예를 들면, 방사성표지 아미노산 또는 표지된(marked) 아비딘에 의해 검출될 수 있는 비오티닐 모이어티를 의미한다. 폴리펩티드 및 항체와 같은 당단백질을 표지화하는 다양한 방법들이 당해 분야에서 알려져 있고 본 발명의 실시에서 이용될 수 있다. 적합한 표지화 그룹의 예는 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 방사성 동위원소 또는 방

사성 핵종 (예를 들면,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), 형광 그룹(예를 들면, FITC, 로다민, 란타니드 포스포르(lanthanide phosphor)), 효소 그룹(예를 들면, 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase),  $\beta$ -갈락토시다아제, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제), 화학발광 그룹, 비오틴 그룹, 또는 이차 리포터에 의해 인식되는 소정의(predetermined) 폴리펩티드 에피토프(예를 들면, 루이신 지퍼 쌍(leucine zipper pair) 서열, 이차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그(epitope tag)).

- [0119] 일부 양태에서, 잠재적인 입체 방해(steric hindrance)를 감소시키기 위해 표지화 기(labeling group)가 다양한 길이의 스페이서 암(spacer arm)에 의해 결합되는 것이 바람직할 수 있다
- [0120] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 그들의 표면에 AXL을 갖는 것으로 의심되는 세포 또는 조직과 접촉시키는 단계를 포함하는, AXL 발현 세포의 존재에 대해 평가하는 방법에 관한 것이다. 시료 중의 AXL 발현을 검출하는 적합한 방법은 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 또는 IHC(Immunohistochemistry)일 수 있다.
- [0121] ELISA 분석법은 마이크로타이타 플레이트(microtiter plate) 포맷에서 수행될 수 있고, 예를 들면, 상기 마이크로타이타 플레이트의 웰에 AXL 항체가 흡착되어 있다. 웰을 세정하고 분석물의 비특이적 결합을 막기 위해 우유 단백질 또는 알부민과 같은 차단제(blocking agent)로 처리한다. 뒤이어, 상기 웰을 테스트 시료로 처리한다. 테스트 시료 또는 표준을 세정에 의해 제거한 후, 웰을 표지된, 예를 들면, 비오틴과의 접합에 의해 표지된 제2 AXL 항체로 처리한다. 과량의 제2 항체를 세정에 의해 제거한 후, 표지를 예를 들면, 아비딘-접합 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase, HRP) 및 적합한 발색(chromogenic) 기질에 의해 검출한다. 테스트 시료 중의 AXL 항원의 농도는 표준 시료로부터 작성된 표준 곡선과의 비교에 의해 결정한다.
- [0122] IHC의 경우, 파라핀-포매(paraffin-embedded) 조직이 이용될 수 있으며, 상기 조직을 예를 들면, 먼저 크실렌에서 파라핀을 제거시키고, 예를 들면, 에탄올로 탈수시키고, 증류수로 세정한다. 포르말린-고정 및 파라핀-포매에 의해 가려진 항원성 에피토프를 에피토프 탈마스킹(unmasking), 효소 처리 또는 사포닌에 의해 노출시킬 수 있다. 에피토프 탈마스킹을 위해, 파라핀 절편을 예를 들면, 2N HCl 용액(pH 1.0)과 같은 에피토프 복구 용액(epitope retrieval solution)에 넣고 스티머(steamer), 수조 또는 마이크로웨이브 오븐에서 20 내지 40분 동안 가열할 수 있다. 효소 처리의 경우, 조직 절편을 프로테이나아제 K, 트립신, 프로나아제(pronase), 펩신 등과 같은 상이한 효소 용액에서 37°C에서 10 내지 30분 동안 인큐베이션시킬 수 있다.
- [0123] 에피토프 복구 용액 또는 과량의 효소를 세정에 의해 제거한 후, 비특이적 상호작용을 막기 위해 조직 절편을 차단 완충액(blocking buffer)로 처리한다. 일차 AXL 항체를 적합한 농도로 첨가한다. 과량의 일차 항체를 세정에 의해 제거하고 절편을 실온에서 10분 동안 퍼옥시다아제 차단 용액에서 인큐베이션시킨다. 또 다른 세척 단계 후에, 조직 절편을 제2 표지 항체, 예를 들면, 효소의 고정물(anchor)로 작용할 수 있는 작용기(group)로 표지된 항체와 인큐베이션시킨다. 따라서, 예는 스트렙타비딘 결합된 호스래디쉬 퍼옥시다아제에 의해 인식되는 비오틴 표지된 이차 항체이다. 항체/효소 복합체의 검출은 적합한 발색성 기질과의 인큐베이션에 의해 달성된다.
- [0124] 추가적인 양태에서, 본 발명은 AXL 기능을 차단할 수 있는 본 발명의 항체를 조건 하에 그들의 표면에 AXL을 갖는 것으로 의심되는 세포 또는 조직과 접촉시키는 단계를 포함하는, AXL 기능을 차단하는 방법에 관한 것이다. 상기 접촉은 인 비트로 또는 인 비보일 수 있다.
- [0125] 본 발명은 또한, 치료를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 항체 또는 항체 단편 또는 그의 유도체의 적당한 투여량을 투여하는 단계를 포함하는, 과다증식 질환, 심혈관 질환, 특히, 죽상동맥경화증 및 혈전증, 당뇨병 관련 질환, 특히, 사구체 비대증 또는 당뇨병성 신병증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 과다증식 질환은 바람직하게는, 암, 예를 들면, 유방암, 결장암, 폐암, 신장암, 여포성 림프종, 골수성 백혈병, 피부암/흑색종, 교모세포종, 난소암, 전립선암, 췌장암, 바렛 식도 및 식도암, 위암, 방광암, 경부암, 간암, 갑상선암, 및 두경부암, 또는 증식성(hyperplastic) 및 종양성(neoplastic) 질환, 또는 기타 AXL 발현 또는 과다발현 과다증식 질환과 같은 AXL 발현, 과다발현, 과다활성과 연관되거나, 이를 동반하거나 또는 이에 의해 유발된 질환으로부터 선택된다.
- [0126] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 치료 대상 암은 약물 내성 암이다.
- [0127] 본 발명은 또한 본 발명의 항체가 포유동물에게 투여되고, 질병은 AXL의 발현 또는 활성의 비정상적 수준과 직접적으로 또는 간접적으로 상관되는 것인 질병의 치료 방법에 관한 것이다.



[0128] 마지막으로, 본 발명은 항-AXL 항체, 바람직하게는 본 발명의 항체, 항체 단편 또는 그의 유도체, 상기 성분을 코딩하는 핵산 분자 및/또는 본 발명의 벡터를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0129] 본 명세서에 개시된 화합물을 포함하는 모든 구체예가 약제의 제조를 위해 단일 화합물로 또는 조합되어 이용될 수 있다.

[0130] 또한, 본 발명은 하기의 실시예 및 첨부된 도면에 의해 설명될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0131] 도 1. Rat1-Mock 및 Rat1-AXL c1.2 섬유모세포에서 세포 표면 AXL의 유세포 분석(flow cytometry analysis). 각각 pLXSN 및 pLXSN-hAXL 이코트로픽(ecotrophic) 바이러스에 의한 Rat1 섬유모세포의 감염에 의해 생성된 다중클론성 Rat1-Mock 및 클론성 Rat1-AXL c1.2 세포를 수집하고, 3  $\mu$ g/ml의 마우스 대조군 항체 72A1 (좌측 패널) 또는 마우스 항-AXL MAB154 일차 항체(우측 패널) 및 PE-접합 항-마우스 이차 항체로 염색하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. Rat1-AXL c1.2 세포의 염색은 양의 1000배(three orders of magnitude)의 변화를 초래했고, 이 세포들의 표면에서 AXL 과다발현을 보여준다.

도 2. NIH3T3-Mock 및 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포에서 세포 표면 AXL의 유세포 분석. 각각 pLXSN 및 pLXSN-AXL 이코트로픽 바이러스에 의한 NIH3T3 섬유모세포의 감염에 의해 생성된 다중클론성 NIH3T3-Mock 및 클론성 NIH3T3-AXL c1.7 세포를 수집하고 3  $\mu$ g/ml의 마우스 대조군 항체 72A1 (좌측 패널) 또는 마우스 항-AXL MAB154 일차 항체(우측 패널) 및 PE-접합 항-마우스 이차 항체로 염색하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. NIH3T3-AXL c1.7 세포의 염색은 양의 100배의 변화를 초래했고, 이 세포들의 표면에서 AXL 과다발현을 보여준다.

도 3. 랫트-항 AXL 항체와 마우스 및 시노물구스 원숭이(cynomolgus monkey) AXL 및 인간 Mer 및 Sky의 교차-반응성(cross-reactivity)의 유세포 분석. HEK293T 섬유모세포를 pcDNA3, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer, 또는 pcDNA3-hSky에 의해 일시적으로 형질감염시켰다. 세포를 수집하고 10  $\mu$ g/ml 항-AXL 1D5, 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 또는 12B7 일차 항체 및/또는 PE-접합 당나귀 항-랫트 이차 항체로 염색시키거나, 또는 대조군의 경우, PE-접합 항-마우스 이차 항체로만 염색시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 마우스 AXL 및 인간 Mer과 Sky와 적당한(moderate) 교차-반응성을 보인 12B7을 제외하고, 항-AXL 항체 중 어느 것도 이 분자들과 교차-반응하지 않았다. 대조적으로, 모든 테스트된 항-AXL 항체는 시노물구스 원숭이 AXL과 교차-반응했다.

도 4. AXL 수용체 인산화에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 ELISA 실험. NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포 (A) 및 NCI-H292 폐암 세포(B)를 굶기고(starved), 10  $\mu$ g/ml의 마우스 대조군 항체 72A1 및 랫트 항-AXL 항체 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7, 또는 10D12와 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml mGas6의 존재 또는 부재 하에 처리하고, 용해시켰다. 용해물을 항-포스포-티로신 항체 4G10-코팅 Maxi-Sorp 96 웰 플레이트로 옮기고, 그 후, 세척하고, 형광 강도를 모으기 위해, 0.5  $\mu$ g/ml의 비오틴화 랫트 항-AXL 항체 12B7, AP-접합 스트렙타비딘 및 AttoPhos 기질 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 및 10D12는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 AXL 활성화를 차단 또는 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적(antagonistic) 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 기저(basal) AXL 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 AXL 활성화를 유의성있게 감소시키지 않으며, 따라서, 효능적(agonistic) 항-AXL 항체로 간주된다.

도 5. p42/p44 MAP-кина아제 인산화에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 ELISA 실험. CaSki 자궁경부암 세포를 굶기고, 10  $\mu$ g/ml의 이소형(isotypic) 대조군 항체 1D5 및 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 또는 2A1과 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml mGas6의 존재 또는 부재 하에 처리하고, 포르말데히드로 고정시켰다. 세포들을 세척하고, 퀀칭(quench)시키고, 흡광 강도(absorbance intensity)를 측정하기 위해 항-포스포-p44/p42 MAP 키나아제 (Thr202/Tyr204) 일차 항체, HRP-접합 항-토끼 이차 항체 및 테트라메틸벤지딘 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 랫트-항-AXL 항체 2A1은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이 기저 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 감소시키지 않으며, 따라서, 효능적 항-AXL 항체로 간주된다.

도 6. Akt-кина아제 인산화에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 ELISA 실험. NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포 (A) 및 CaLu-1 폐암 세포를 굶기고, 10  $\mu$ g/ml의 이소형 대조군 항체 1D5 및 랫트 항-AXL 항체 11D5,

11B7, 또는 2A1과 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml mGas6의 존재 또는 부재 하에 처리하고, 포름알데히드로 고정시켰다. 세포들을 세척하고, 퀴칭시키고, 흡광 강도를 측정하기 위해 항-포스포-Akt (Ser473) 일차 항체, HRP-접합 항-토끼 이차 항체 및 테트라메틸벤지딘 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 Akt-키나아제 활성화를 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 랫트 항-AXL 항체 2A1은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이 기저 p42/p44 MAP-키나아제 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 Akt-키나아제 활성화를 감소시키지 않으며, 따라서, 효능적 항-AXL 항체로 간주된다.

도 7. Akt-키나아제 인산화에 대한 랫트 및 키메라 항-AXL 항체의 효과를 비교하기 위한 ELISA 실험. NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포를 굵기고, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 및 1  $\mu$ g/ml의 랫트 항-AXL 항체 11B7 또는 키메라 항-AXL 항체 ch11B7, 및 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 및 10  $\mu$ g/ml의 랫트 항-AXL 항체 11D5 또는 키메라 항-AXL 항체 ch11D5와 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml mGas6의 존재 또는 부재하에 처리하고, 포름알데히드로 고정시켰다. 세포들을 세척하고, 퀴칭시키고, 흡광 강도를 측정하기 위해 항-포스포-Akt (Ser473) 일차 항체, HRP-접합 항-토끼 이차 항체 및 테트라메틸벤지딘 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 키메라 항-AXL 항체 ch11B7 및 랫트 항-AXL 항체 11D5 또는 키메라 항-AXL 항체 ch11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 Akt-키나아제 활성화를 유사한 정도까지 억제시킬 수 있었다. 따라서, 그들의 개별적인 랫트 대응물(counterpart)에 비해, 키메라 항-AXL 항체 ch11B7 및 ch11D5는 활성을 유지했다.

도 8. 랫트 항-AXL 항체의 결합 특성을 조사하기 위한 경쟁 ELISA 실험. 96 웰 Maxi-Sorp 플레이트를 1  $\mu$ g/ml 인간 AXL-ECD로 코팅하고 10  $\mu$ g/ml의 비오틴화되지 않은(unbiotinylated) 이소형 대조군 항체 1D5 또는 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, 또는 2A1과 전-인큐베이션시켰다. 0.5  $\mu$ g/ml의 비오틴화 이소형 대조군 항체 1D5 또는 비오틴화 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, 또는 2A1과의 인큐베이션, 및 AP-접합된 스트렙타비딘 및 AttoPhos 기질 용액의 첨가 후에, 결합된 비오틴화 항체를 측정하기 위해 형광을 모았다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 대조군 항체 1D5는 AXL-ECD에 결합하지 않았다. 길항적 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 및 10D12는 동일한 에피토프 또는 구조적으로 인접한 에피토프에 대해 상호 간에 경쟁했다. 효능적 항체 11D7 및 2A1은 상이한 에피토프를 인식하고 AXL-ECD로의 결합에 대해 길항적 항체와 경쟁하지 않는다.

도 9. 세포 이동 및 증식에 대한 랫트 및 키메라 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 상처 치료/스크래치 (scratch) 분석법.

합류점(confluence)까지 증식된 후, NCI-H292 폐암 세포를 굵기고 피펫 팁으로 상처를 입혔다. 10  $\mu$ g/ml의 이소형 대조군 항체 1D5, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 6E7, 또는 10D12, 키메라 항-AXL 항체 chn11D5 IgG2 및 chn11B7 IgG2, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7, 및 10  $\mu$ g/ml의 Erbitux 또는 5  $\mu$ M Sutent의 존재 하에, 세포들을 스크래칭된 투명 영역(area of clearing)에 재-분포되게 하였다(re-populate). 24 시간 후에, 세포들을 고정시키고 염색하고, 상처의 사진을 찍었다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 이소형 대조군 항체 1D5에 비해, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 6E7, 및 10D12, 또한 키메라 항-AXL 항체 chn11D5 IgG2 및 chn11B7 IgG2는 투명 영역의 재-분포(re-population)를 감소시켰고, 반면에, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 완전한 상처 봉합을 가져왔다.

도 10. 지향성 세포 이동(directed cell migration)에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 Boyden 챔버/트랜스웰(transwell) 분석법. 혈청을 공급하지 않은(serum starved) NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포를 10  $\mu$ g/ml의 랫트 항-AXL 항체 4A6, 11B7 또는 2A1과 전-인큐베이션시키고, 콜라겐 1-코팅된 FluoreBlock 삽입물(insert)의 상부에 플레이팅하고 하부 구획(lower compartment)에서 Gas6을 포함하거나 또는 포함하지 않는 무혈청 배지에 노출시켰다. 7시간 후에, 이동된(transmigrated) 세포들을 칼세인-AM으로 염색하고, 각 웰의 형광을 측정하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 길항적 항-AXL 항체 11B7은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 기저 이동 및 Gas6-유도 이동을 모두 감소시켰으나, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 리간드-유도 이동, 및 특히, 기저 이동을 증가시켰다. 항체 4A6은 지향성 세포 이동에 영향을 미치지 않았다.

도 11. Gas6-유도 세포 증식에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 AlamarBlue™ 분석법. 혈청을 공급하지 않은(serum-starved) NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포를 20  $\mu$ g/ml의 마우스 대조군 항체 72A1, 랫트 길항적 항-AXL 항체 11D5 및 11B7, 및 효능적 항-AXL 항체 2A1과 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml Gas6의 존재 또는 부재 하에 증식시켰다. 4일 후에, AlamarBlue™를 상기 세포에 첨가하고 흡광도를 측정하였다. 세부 사항은 본

문을 참조한다. 길항적 항-AXL 항체 11D5 및 11B7은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 Gas6-유도 증식을 억제했으나, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 리간드-유도 증식 및, 특히, 기저 증식을 증가시켰다.

도 12. Gas6-매개 항-아포토시스에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 카스파아제-3/7 분석법. 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포를 10  $\mu$ g/ml의 이소형 대조군 항체 1D5, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5, 또는 효능적 랫트 항-AXL 항체 11D7 및 2A1과 전-인큐베이션시키고, Gas6의 존재 또는 부재 하에 처리하였다. Apo-ONE 기질 용액을 첨가하고 카르파아제-3/7 활성을 측정하기 위해 형광을 수집하였다. 세포 사항은 본문을 참조한다. 이소형 대조군 항체 대비, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5는 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 Gas6-매개 항-아포토시스를 감소시키고, 따라서, 아포토시스를 유도했다. 대조적으로, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 Gas6의 존재 또는 부재 여부와 관계 없이, 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 항-아포토시스를 유도했고, 따라서, 아포토시스를 억제했다.

도 13. VEGF-A-유도 내피 세포 발아(sprouting)에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 구상체(spheroid)-기반 세포 혈관형성 분석법. HUVEC 구상체를 3D 콜라겐 겔에 임베딩시키고, 25 ng/ml VEGF-A로 자극하고, 표시된 농도의 길항적 항-AXL 항체 11B7 (A) 및 11D5 (B)로 24시간 동안 처리하였다. 데이터 포인트 당 10개의 무작위로 선택된 구상체의 누적 발아 길이의 평균  $\pm$  SEM을 분석하고(좌측 패널) 항체에 의한 상대적 억제율을 측정하였다(우측 패널). IC<sub>50</sub> 곡선의 맞춤(fitting) 및 IC<sub>50</sub> 값의 계산을 GraphPad Prism 4.03으로 수행하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5는 구상체-기반 혈관형성 분석법에서 투여량-의존적 방식으로 VEGF-A-자극 HUVEC 발아를 억제했다. 최고 농도의 11B7에 의한 처리는 HUVEC 발아를 기저 수준까지 감소시켰고, 최고 농도의 11D5에 의한 억제는 그만큼 효과적이지 않았다(좌측 패널). HUVEC 발아가 11B7 및 11D5에 대해 각각  $9.8 \times 10^{-8}$  M 및  $7.0 \times 10^{-7}$  M의 IC<sub>50</sub> 값으로 억제되었다(우측 패널).

도 14. 누드 마우스에서 인간 전립선 육종의 성장에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 동소 이종 이식(orthotopic xenograft) 모델. PC-3-LN 전립선 육종 세포를 NMR<sup>nu/nu</sup> 마우스의 전립선에 동소로(orthotopically) 이식하였다. 동물들을 무작위로 4개의 그룹으로 나누고 25 mg/kg의 이소형 대조군 항체 1D5 또는 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7, 및 40 mg/kg의 Sutent 또는 12.5 mg/kg Taxotere를 투여하였다. 처리 기간 동안, 동소에서 성장하는 PC-3-LN 종양의 성장 및 주변 전이(peripheral metastase)를 주당 1회씩 15일차, 23일차, 29일차, 및 34일차에 인 비보 생체발광 이미징(bioluminescence imaging)으로 모니터링하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 이소형 대조군 항체 1D5 대비, 길항적 랫트 항-AXL 11B7은 누드 마우스에서 PC-3-LN 전립선 종양의 전체 성장을 감소시켰다.

도 15. 누드 마우스에서 인간 전립선 육종 전이에 대한 랫트 항-AXL 항체의 효과를 조사하기 위한 동소 이종 이식 모델. PC-3-LN 전립선 육종 세포를 NMR<sup>nu/nu</sup> 마우스의 전립선에 동소로 이식하였다. 동물들을 무작위로 4개의 그룹으로 나누고 25 mg/kg의 이소형 대조군 항체 1D5 또는 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7, 및 40 mg/kg의 Sutent 또는 12.5 mg/kg Taxotere를 투여하였다. 부검 후에, 선택된 기관(간, 비장, 폐, 대퇴골, 및 요추의 일부)을 회수하고 생체발광 이미징을 통해 전이의 존재에 대해 분석하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 이소형 대조군 항체 1D5 대비, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7은 비장 전이의 발생을 감소시켰다. 주목할 만한 것은, 본 실험에서 11B7의 항-전이 효과가 Sutent의 효과보다 더 강했다는 것이다.

도 16. 상이한 인간 악성종양에서 AXL 발현의 면역조직화학적 분석. 각각 종양 조직 및 조화되는(matching) 비-악성종양 조직의 쌍으로 대표된, 17개의 인간 고형 종양을 면역조직화학에 의해 AXL의 발현에 대해 분석하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 결과가 요약되며(A), 1의 강도는 조사된 세포의 25% 이상에서의 약한 염색을 의미한다. 유방암 및 위의 반지세포 암종(signet ring cell carcinoma)에서 관찰된 가장 강력한 염색의 예가 표시된다(B).

도 17. Axl 인산화에 대한 랫트 및 키메라 항-Axl 항체의 효과를 비교하기 위한 ELISA 실험. CaSki 자궁경부암 세포를 굵기고, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml, 및 10  $\mu$ g/ml의 랫트 항-Axl 항체 11B7 (A) 또는 키메라 항-Axl 항체 ch11B7 (B)과 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml의 mGas6의 존재 또는 부재 하에 처리하고, 용해시켰다. 용해물을 항-포스포-티로신 항체 4G10-코팅 Maxi-Sorp 96 웰 플레이트로 옮겼다. 그 후, 플레이트를 세척하고 형광 강도를 모으기 위해, 0.5  $\mu$ g/ml의 비오틴화 랫트 항-Axl 항체 12B7, AP-접합 스트렙타비딘 및 AttoPhos 기질 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 자궁경부암 세포주 CaSki에서 상대적 Axl 인산화의 농도-의존적 감소에 의해 입증된 바와 같이, 본 발명의 랫트 항-Axl 항체 11B7 (A)

및 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7 (B)은 유사한 정도까지 수용체 티로신 키나아제 Ax1의 리간드-유도 활성화를 차단시킬 수 있었다.

도 18. Ax1 인산화에 대한 랫트 및 키메라 항-Ax1 항체의 효과를 비교하기 위한 ELISA 실험. CaSki 자궁경부암 세포를 굶기고, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml, 및 10  $\mu$ g/ml의 랫트 항-Ax1 항체 11B7 (A) 또는 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7 (B)과 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml의 mGas6의 존재 또는 부재 하에 처리하고, 포름알데히드로 고정시켰다. 세포들을 세척하고, 퀀칭시키고, 흡광 강도를 측정하기 위해 항-포스포-p44/p42 MAP 키나아제 (Thr202/Tyr204) 일차 항체, HRP-접합 항-토끼 이차 항체 및 테트라메틸벤지딘 용액과 인큐베이션시켰다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 본 발명의 랫트 항-Ax1 항체 11B7(A) 및 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7(B)는 상대적 p42/p44 MAP-키나아제 인산화의 농도-의존적 감소에 의해 나타난 바와 같이, CaSki 자궁경부암 세포에서 유사한 정도까지 p42/p44 MAP-키나아제의 Gas6-유도 활성화를 차단시킬 수 있었다.

도 19. 인간 난소암 세포에서 약물 내성을 극복하기 위한 랫트 항-AXL 항체 및 화학요법제의 조합 효과를 조사하기 위한 TUNEL 염색. 인간 NCI/ADR-RES 난소암 세포를 10  $\mu$ g/ml의 대조군 항체 또는 길항적 항-Ax1 항체 11B7과 전-인큐베이션시키고 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 또는 200  $\mu$ M의 최종 농도의 독소루비신과 함께 인큐베이션시켰다. 아포토시스를 시각화하고 결정하기 위해, 시판되는 키트를 적용하여, TUNEL 염색을 수행하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 세포가 대조군 항체 또는 길항적 항-Ax1 항체 11B7(상단)과 함께 인큐베이션되었는지 여부에 관계없이, 100  $\mu$ M의 독소루비신으로 처리된 NCI/ADR-RES 난소암 세포에서 TUNEL 염색이 관찰되지 않았고, 따라서, 아포토시스가 없었다. 그러나, 150  $\mu$ M의 독소루비신 농도에서, 대조군 항체와 함께 인큐베이션된 세포에서는 매우 약한 아포토시스만이 검출되었고, 길항적 항-Ax1 항체 11B7과의 공동-인큐베이션은 상당한 아포토시스의 유도를 가져왔다(중간). 또한, 200  $\mu$ M의 독소루비신의 존재 하에, 세포와 11B7의 공동-인큐베이션은 대조군 IgG 항체와 인큐베이션된 세포에 비해 유의성 있게 아포토시스를 증가시켰고(하단), 이는 다중 약물-내성(multi drug-resistant) 종양 세포를 화학요법제 및 본 발명의 길항적 항-Ax1 항체에 의해 함께 처리하는 것이 약물 내성을 극복하기 위해 적합할 수 있다는 것을 나타낸다.

도 20. 인간 흑색종 세포의 고정(anchorage)-비의존적 증식에 대한 랫트 항-AXL 항체 및 화학요법제의 조합 효과를 조사하기 위한 소프트 아가 분석법. 인간 C-8161 흑색종 세포를 미처리 상태로 유지시키거나 또는 2.5  $\mu$ g/ml의 최종 농도로 랫트 길항적 항-AXL 항체 11B7과 인큐베이션시켰다. 표시된 농도의 시스플라틴과 조합되어, 아가-임베딩된(agar-embedded) 세포들을 0.7% 하부 아가 층(bottom agar layer)의 상부에서 5일 동안 증식되게 하였다. MTT로 염색하여, 콜로니의 면적을 측정하였다. 세부 사항은 본문을 참조한다. 콜로니의 전체 면적을 반영하는 절대적 수치(A) 및 이 데이터에 기반하여 계산된 상대적 성장 억제(B)가 표시된다. 미처리 대조군 세포 대비, 시스플라틴과의 인큐베이션은 투여량-의존적 방식으로 콜로니 성장 지연을 초래했다. 30% 범위에서 11B7 단독의 억제 효과와 일관되게, 길항적 항-Ax1 항체 11B7과의 조합은 특히, 시스플라틴의 더 낮은 농도에서 C-8161 흑색종 세포의 소프트 아가 성장에 대한 시스플라틴의 유의성있게 강화된 억제 효과를 가져왔다.

또한, 본 발명은 하기의 실시예 및 첨부된 도면에 의해 설명될 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 일반적 주제

[0133] 수행된 실험 및 달성된 결과를 포함한, 하기의 실시예는 설명 목적으로만 제공되며 본 발명을 한정하는 것으로 해석되지 않는다.

### [0134] 실시예 1. 면역원인 AXL 과다발현 Rat1 섬유모세포 및 실험 모델 시스템인 AXL 과다발현 NIH3T3 섬유모세포의 생성

[0135] NCBI(the National Center for Biotechnology Information) 참조 번호(NM\_021913)에 따른 인간 수용체 티로신 키나아제 AXL 전사물 변이체에 대한 전장 코딩 서열을 제한효소 EcoRI 및 BamHI에 대한 플랭킹 인식 요소(flanking recognition element)를 통해 pLXSN으로 서브클로닝시켜, 레트로바이러스 발현 벡터 pLXSN-hAXL를 제조했다.

[0136] 인간 수용체 티로신 키나아제 AXL에 특이적으로 결합하는 항체의 생성을 위해, 레트로바이러스 유전자 전달에



의해 인간 AXL을 안정적으로 과발현하는 Rat1 섬유모세포를 제조했다. 요약하면,  $3 \times 10^5$ 개의 Phoenix-E 세포를 60 mm 배양 접시에 접종하고 인산칼슘 방법을 이용하여  $2 \mu\text{g/ml}$  pLXSN 벡터 또는 pLXSN-hAXL로 형질감염시켰다. 24시간 후에, 배지를 신선한 배지로 교체하고 상기 배지 중에 Phoenix-E 세포를 4시간 동안 인큐베이션시켰다. pLXSN 또는 pLXSN-hAXL 이코트로픽 바이러스를 방출하는 Phoenix-E 세포의 상층액을 수집하고 폴리브렌 (Polybrene) ( $4 \text{ mg/ml}$ ; Aldrich)의 존재 하에 3시간 동안 합류점 도달 전(subconfluent) Rat1 세포( $6 \text{ cm}$  디쉬당  $2 \times 10^5$ 개의 세포)의 인큐베이션을 위해 이용하였다. 동시에, Phoenix-E 세포를 신선한 배지와 함께 재-인큐베이션시키고, 추가적인 3시간 후에 Polybrene ( $4 \text{ mg/ml}$ ; Aldrich)의 존재 하에 Rat1 섬유모세포의 제2 감염을 위해 이용했다. 마찬가지로, 제3 감염 사이클을 수행했다. 배지를 교체한 후, G418에 의한 Rat1 세포의 선택을 개시하였다. 통상적으로, 21일 동안 선택 후 안정한 클론을 채취(pick)하였다.

[0137] 일련의(a panel) 안정한 클론을 증식시키고, FACS 분석에 의해 막-국제화(membrane-localized) 인간 AXL 발현을 정량하였다. 상술하면,  $1 \times 10^5$ 개의 세포들을 PBS 중의  $10 \text{ mM}$  EDTA에 의해 회수하고, FACS 완충액(PBS, 3% FCS, 0.4% 아지드(azide))으로 1회 세척하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트 상에 접종하였다. 세포들을  $1,000 \text{ rpm}$ 으로 3분 동안 스핀시켜서 상층액을 제거하고 마우스 항-AXL 일차 항체 MAB154 (R&D Systems,  $3 \mu\text{g/ml}$ )와 함께 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, FACS 완충액 중에 1:50으로 희석시킨 PE-접합 당나귀 항-마우스 이차 항체(Jackson)  $100 \mu\text{l/}$ 웰에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음 상에서 암기(dark)로 30분 동안 인큐베이션시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, Epics XL-MCL 유세포측정기(Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

[0138] 도 1은 pLXSN 공 벡터(empty vector)에 의해 안정적으로 감염된 다중클론성 Rat1-Mock 집단 및 pLXSN-hAXL에 의해 안정적으로 감염된 Rat1-AXL c1.2의 FACS 분석을 나타내며, 이 대표적 클론의 세포 표면 상에서 AXL 과다발현을 보여준다.

[0139] 추가적으로, 실험 목적을 위한 적합한 세포 모델 시스템을 생성하기 위해, AXL을 안정적으로 과발현하는 NIH3T3 섬유모세포를 Rat1에 대해 설명된 절차와 유사한 방법으로 생성하였다. 요약하면,  $3 \times 10^5$ 개의 Phoenix-E 세포를 60 mm 배양 접시에 접종하고, 인산칼슘 방법을 이용하여  $2 \mu\text{g/ml}$  pLXSN 벡터 또는 pLXSN-AXL cDNA에 의해 형질감염시켰다. 24시간 후에, 배지를 신선한 배지로 교체하고, 상기 배지 중에 Phoenix-E 세포를 4시간 동안 인큐베이션시켰다. pLXSN 또는 pLXSN-hAXL 이코트로픽 바이러스를 방출하는 Phoenix-E 세포의 상층액을 회수하고, Polybrene ( $4 \text{ mg/ml}$ ; Aldrich)의 존재 하에 3시간 동안 합류점 도달 이전의(subconfluent) NIH3T3 세포 ( $6 \text{ cm}$  디쉬당  $2 \times 10^5$ 개의 세포)의 인큐베이션을 위해 이용하였다. 동시에, Phoenix-E 세포들을 신선한 배지와 함께 재-인큐베이션시키고, 추가적인 3시간 후에, Polybrene ( $4 \text{ mg/ml}$ ; Aldrich)의 존재 하에 NIH3T3 섬유모세포의 제2 감염을 위해 이용하였다. 마찬가지로, 제3 감염 사이클을 수행하였다. 배지의 교체 후에, G418에 의한 NIH3T3 세포의 선택을 개시하였다. 통상적으로, 21일 동안 선택 후 안정한 클론을 채취하였다.

[0140] 일련의 안정한 클론을 증식시키고, FACS 분석에 의해 막-국제화 인간 AXL 발현을 정량하였다. 상술하면,  $1 \times 10^5$ 개의 세포들을 PBS 중의  $10 \text{ mM}$  EDTA에 의해 회수하고, FACS 완충액(PBS, 3% FCS, 0.4% 아지드)으로 1회 세척하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트 상에 접종하였다. 세포들을  $1,000 \text{ rpm}$ 으로 3분 동안 스핀시켜서 상층액을 제거하고 마우스 항-AXL 일차 항체 MAB154 (R&D Systems,  $3 \mu\text{g/ml}$ )와 함께 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, FACS 완충액 중에 1:50으로 희석시킨 PE-접합 당나귀 항-마우스 이차 항체(Jackson)  $100 \mu\text{l/}$ 웰에 재현탁시켰다. 세포 현탁액을 얼음 상에서 암기로 30분 동안 인큐베이션시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, Epics XL-MCL 유세포측정기(Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

[0141] 도 2는 pLXSN 공 벡터에 의해 안정적으로 감염된 다중클론성 NIH3T3-Mock 집단 및 pLXSN-hAXL에 의해 안정적으로 감염된 NIH3T3-AXL c1.7의 FACS 분석을 나타내며, 이 대표적 클론의 세포 표면 상에서 AXL 과다발현을 보여준다.

## [0142] 실시예 2. 랫트 항-AXL 단일클론 항체의 생성

[0143] 약  $10 \times 10^6$ 개의 동결된 Rat1-AXL c1.2 세포를 복막 내로(i.p.) 및 피하로 Lou/C 또는 Long Evans 랫트에 주사하는 것에 의해 단일클론성 랫트 항-AXL 항체를 생성시켰다. 8주 간격 후에, 최종 추가접종(boost)을 융합 3일 전

에 복막 내로 및 피하로 적용하였다. 표준 절차에 따라 골수종 세포주 P3X63-Ag8.653과 랫트 면역 비장 세포의 융합을 수행하여 105개의 하이브리도마를 생성하였다. 2주 후에, 하이브리도마로부터의 제1 상층액을 수집하고 NIH3T3-Mock 대조군 세포 대비 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포로의 결합에 대해 일차 FACS 스크린에서 테스트하였다. AXL 결합에 대해 양성인 클론들을 더 배양하였다. 이 클론들의 상층액 50 ml로부터, 항체를 정제하고 NIH3T3-Mock 대조군 세포 대비, NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포 상의 AXL로의 특이적 결합에 대해 재-분석하였다. NIH3T3-Mock 대조군 세포에 대해서는 아니나, NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포에 특이적으로 결합하는 정제된 항체를 Akt-키나아제 인산화 ELISA에서 더 테스트하고, 이소형을 결정하기 위한 ELISA를 수행하였다. 랫트 항체의 정제를 위해, 상층액을 5,000g에서 20분 동안 스펀시키고, 뒤이어 멸균 여과시켰다. 500  $\mu$ l의 단백질 G 세파로 오스 FF를 첨가하고 4°C에서 스피닝 휠(spinning wheel) 상에서 1시간 이상 동안 인큐베이션시켰다. 세파로오스를 스펀-다운시키고, 상층액을 버리고, 단백질 G 매트릭스를 시트레이트 완충액(100mM) pH 2.1을 이용한 단백질 용리 전에 PBS로 2회 세척하였다. 용리 분획에 1M Tris pH 8.0을 첨가하여 즉시 중성으로 재완충시키고, PBS에 대해 투석시켰다.

[0144] 테스트된 올리고클론 항체(oligoclonal antibody) 중에서, 91개는 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포에 특이적으로 결합하나, NIH3T3-Mock 대조군 세포에는 특이적으로 결합하지 않았고, 9개는 동일한 세포에서 Gas6-유도 Akt 인산화를 억제했으나, 71개는 Akt 인산화를 촉진했다. 4개의 길항적 항체(I11B7, I10D12, I6E7, 및 III11D5, 하기의 실시예에서 각각 11B7, 10D12, 6E7 및 11D5로 지칭됨), 2개의 효능적 항체(I11D7 및 III2A1; 하기의 실시예에서 각각 11D7 및 2A1으로 지칭됨) 및 1개의 대조군 항체(III1D5; 하기의 실시예에서 1D5로 지칭됨)를 동결 보존하고 서브클로닝하였다.

# 표 1

Nr.	클론	서브클래스	FACS 변화 NIH3T3- pLXSN 대조군	FACS 변화 NIH3T3-hAXL- C18
1	I 1B11	2a	0,8	53,8
2	I 1C8	IgM/2a	0,9	55,0
3	I 2F3	2a	0,8	52,4
4	I 6E7	2a	1,8	62,3
5	I 7E6	2a	0,8	47,1
6	I 7G1	G1	0,7	32,0
7	I 7G11	G1	3,5	8,8
8	I 8E5	G1	1	33,0
9	I 9H3	G1	0,5	40,4
10	I 10A10	IgM/2a	0,5	32,6
11	I 10D9	2a	0,7	47,4
12	I 10D12	G1	0,5	37,5
13	I 11B7	IgM/G1/2c	0,6	36,2

[0145]

14	I 11D7	IgM/2a	0,7	9,6
15	I 12B7	2a/2c	0,8	43,6
16	II 2B8	IgM/G1	0,6	2,5
17	II 2D4	2a	0,8	46,5
18	II 6A5	G1	0,6	13,1
19	II 8A8	2a	0,6	34,6
20	III 1A10	2a	1,4	54,5
21	III 1B1	2a	7,5	24,6
22	III 1B3	IgM/2a	1,1	53,3
23	III 1B6	2b	1,1	15,3
24	III 1B11	2b	1,1	11,1
25	III 1C3	2b	1,0	24,2
26	III 1C10	-	1,1	22,1
27	III 1D2	IgM/2b	3,0	26,6
28	III 11D5	2a	1,5	8,9
29	III 1D7	2b	1,0	17,3
30	III 1D11	-	1,1	10,9
31	III 1D12	2b	1,0	7,7
32	III 1E7	-	1,1	81,4
33	III 1E11	G1/2a	1,2	44,0
34	III 1F2	G1	1,2	42,2
35	III 1F3	2b	1,1	9,0
36	III 1G2	-	1,0	30,5
37	III 1G9	2a	1,3	89,2
38	III 1G11	-	1,1	54,7
39	III 1G12	-	1,1	59,4
40	III 1H4	IgM/2b	1,0	20,0
41	III 1H8	2a/2b	1,0	10,1
42	III 1H9	2b	0,9	13,6
43	III 2A1	2a	1,0	36,0
44	III 2A2	2b	1,0	10,5
45	III 2A4	2b	1,2	11,8
46	III 2B1	2b	0,9	16,0
47	III 2B6	2a/2b	1,0	39,7
48	III 2B8	2a	1,0	53,3
49	III 2B10	2b	1,1	10,6
50	III 2C12	2a/2b	1,0	11,2
51	III 2D1	2a/2b	1,0	42,0
52	III 2D3	2b	0,9	17,8
53	III 2D8	2a	1,4	109,7
54	III 2D12	2b	1,8	16,0
55	III 2E11	2b	1,0	14,8
56	III 2G4	-	1,0	8,5
57	III 2H7	-	1,0	91,2
58	III 3A1	2a	1,5	82,5
59	III 3A2	2b	1,0	7,4
60	III 3A3	IgM/G1	2,0	49,6
61	III 3B2	-	1,0	11,3
62	III 3B3	2b	0,8	12,4
63	III 3B4	IgM	1,2	98,0
64	III 3B5	IgM/2b	1,6	74,0
65	III 3B7	2b	1,8	13,4

[0146]

66	III 3B10	2a	1,1	70,6
67	III 3C3	-	1,3	45,7
68	III 3C4	-	1,4	15,2
69	III 3C10	2a	15,2	83,3
70	III 3C12	2b	1,2	41,8
71	III 3D2	2b	0,9	11,8
72	III 3D3	2a	1,0	54,5
73	III 3E1	-	1,2	49,7
74	III 3E3	2a/2b	1,3	16,0
75	III 3E5	2a	1,1	56,4
76	III 3F1	2b	1,0	9,8
77	III 3G1	2a	1,2	57,8
78	III 3G3	2a	1,1	45,7
79	III 3G6	2a	1,1	55,9
80	III 3H4	2b	1,0	43,3
81	III 3H5	2b	1,2	11,8
82	III 4A4	IgM	1,3	8,5
83	III 4A5	2a	1,9	32,8
84	III 4A6	2a	2,5	10,4
85	III 4B1	2b	1,9	10,2
86	III 4B5	2b	1,6	6,4
87	III 4B6	2a	1,9	56,8
88	III 4B9	IgM/2b/2c	1,7	16,6
89	III 4B11	2a	1,2	58,1
90	III 4C2	-	1,6	7,4
91	III 4C8	2a	12,8	21,3
92	III 4D1	-	1,6	7,9
93	III 4D9	-	1,1	31,2
94	III 4D10	2a	3,8	7,5
95	III 4E11	2b	1,5	7,6
96	III 4F6	-	1,2	5,5
97	III 4F8	2a	1,2	51,3
98	III 4F11	IgM	1,2	12,9
99	III 4F12	2a	1,1	52,6
100	III 4G2	2a	1,0	52,4
101	III 4G11	IgM/2b	1,1	8,9
102	III 4H4	2b	3,1	61,3
103	III 4H5	2a	2,7	20,0
104	III 4H10	IgM/2a	1,3	49,2
105	III 4H11	IgM	3,3	124,0

[0147]

[0148]

실시예 3. 마우스 AXL 또는 인간 AXL 패밀리의 다른 일원들, Mer 및 Sky와 교차-반응하지 않는 본 발명의 랫트 항-AXL 항체

[0149]

본 실시예는 본 발명의 랫트 항-AXL 항체와 마우스 및 시노물구스 원숭이 AXL 및 인간 AXL 패밀리의 다른 일원들, 인간 Mer 및 인간 Sky와의 교차-반응성을 다루었다. 마우스 및 원숭이 AXL 코딩 서열 및 인간 Mer 및 Sky를 pcDNA3에 서브클로닝한 후, 각각의 발현 구조물을 HEK293T 섬유모세포에 형질감염시켰다. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 이 단백질에 결합하는 능력을 FACS 분석에 의해 테스트하였다.

[0150]

### 3 A. 마우스 AXL의 클로닝

[0151]

본 연구에서, 마우스 AXL 발현 구조물 pcDNA3-mAXL을 제조하였다. 마우스 AXL의 전장 코딩 서열을 마우스 심장 cDNA(Ambion)를 주형으로 이용하고, 마우스 AXL의 NCBI(the National Center for Biotechnology Information) 참조번호 (NM\_009465)에 따른 적합한 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭시켰다. 이에 의해, 마우스 AXL을 코딩하는 전장 서열이 두 개의 중첩되는 PCR 단편, 5'-단편 및 3'-단편에 의해 포함(cover)되었다. 이 단편들의 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같았다:

[0152]

EcoRI 인식 서열을 갖는 5'-단편을 위한 정방향 프라이머 MOUSE1:

[0153]

5'- GCG AAT TCG CCA CCA TGG GCA GGG TCC CGC TGG CCT G- 3'

[0154]

5'-단편을 위한 역방향 프라이머 MOUSE2:

[0155]

5'- CAG CCG AGG TAT AGG CTG TCA CAG ACA CAG TCA G- 3'

[0156]

3'-단편을 위한 정방향 프라이머 MOUSE3:

[0157]

5'- GCA CCC TGT TAG GGT ACC GGC TGG CAT ATC- 3'

[0158]

NotI 인식 서열을 갖는 3'-단편을 위한 역방향 프라이머 MOUSE4:

[0159]

5'- ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGG CTC CGT CCT CCT GCC CTG- 3'

- [0160] 5'-단편을 EcoRI 및 BstEII로 처리하고, 3'-단편을 BstEII 및 NotI으로 처리하고, pcDNA3을 EcoRI 및 NotI으로 절단하였다. 분리되고 정제된 단편들의 3 인자 라이게이션(3 factor ligation)을 수행하고 DH5α 박테리아 세포 내로 형질감염시켰다. 단일 콜로니를 채취하고 암피실린의 존재 하에 배양하였다. 시판되는 플라스미드 정제 키트(Qiagen)를 이용하여, 마우스 AXL 발현 벡터 pcDNA3-mAXL를 정제하고, HEK293T 세포로의 후속 일시적 형질감염(transient transfection)을 위해 서열을 확인했다.
- [0161] **3 B. 시노물구스 원숭이 AXL의 클로닝**
- [0162] 본 연구에서, 시노물구스 원숭이 AXL 발현 구조물 pcDNA3-cyAXL을 제조하였다. 시노물구스 원숭이 AXL의 전장 코딩 서열을 시노물구스 원숭이 뇌 조직으로부터 제조된 cDNA를 주형으로 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭시켰다. 시노물구스 원숭이 AXL의 뉴클레오티드 서열이 이용가능하지 않았기 때문에, 인간 AXL에 대한 상당한 상동성을 가정하여 개별적인 프라이머를 설계하였다. 이에 의해, 시노물구스 원숭이 AXL을 코딩하는 전장 서열이 두 개의 중첩되는 PCR 단편, 5'-단편 및 3'-단편에 의해 포함(cover)되었다. 이 단편들의 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같았다:
- [0163] EcoRI 인식 서열을 갖는 5'-단편을 위한 정방향 프라이머 CYN01:
- [0164] 5'- CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGT GGC GGT GCC CCA G- 3'
- [0165] 5'-단편을 위한 역방향 프라이머 CYN02:
- [0166] 5'- CTC TGA CCT CGT GCA GAT GGC AAT CTT CAT C- 3'
- [0167] 3'-단편을 위한 정방향 프라이머 CYN03:
- [0168] 5'- GTG GCC GCT GCC TGT GTC CTC ATC- 3'
- [0169] NotI 인식 서열을 갖는 3'-단편을 위한 역방향 프라이머 CYN04:
- [0170] 5'. ATA AGA ATG C GG CCG CTC AGG CAC CAT CCT CCT GCC CTG - 3'
- [0171] 5'-단편을 EcoRI 및 DraIII로 처리하고, 3'-단편을 DraIII 및 NotI으로 처리하고, pcDNA3을 EcoRI 및 NotI으로 절단하였다. 분리되고 정제된 단편들의 3 인자 라이게이션을 수행하고 DH5α 박테리아 세포 내로 형질감염시켰다. 단일 콜로니를 채취하고 암피실린의 존재 하에 배양하였다. 시판되는 플라스미드 정제 키트(Qiagen)를 이용하여, 시노물구스 원숭이 AXL 발현 벡터 pcDNA3-cyAXL를 정제하고, HEK293T 세포로의 후속 일시적 형질감염을 위해 서열을 확인했다. 시노물구스 원숭이의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열은 하기와 같다:

[0172] 뉴클레오타이드 서열:

ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGGATGGGCAGGGTCCCGCTGGCCTGGTG  
 CTTGGCGCTGTGCGGCTGGGTGTGCATGGCCCCAGGGGCACACAGG  
 CTGAAGAAAGTCCTTTCTGTGGTAACCCAGGGAATATCACAGGTGCCC  
 GGGGACTCACGGGCACCCCTTCGGTGTGAGCTCCAGGTTAGGGAGAG  
 CCCCCGAGGTACACTGGCTTCGGGACGGACAGATCCTGGAGCTCGC  
 GGACAGTACCCAGACCCAGGTGCCCCCTGGGTGAAGATGAGCAGGATGA  
 CTGGATAGTGGTCAGCCAGCTCAGAATCGCCTCCCTACAGCTTTCCGAC  
 GCGGGACAGTACAGTGTTTGGTGGTCTGGGACATCAGAACTTCGTGT  
 CCCAGCCTGGCTACGTAGGGCTGGAGGGCTTACCTTACTTCCTGGAGG  
 AGCCTGAGGACAGGACTGTGGCCGCCAACCCCCCTTCAACCTGAGCT  
 GCCAAGCCCAGGGACCCCCAGAGCCCGTGGACCTACTCTGGCTCCAG  
 GATGCTGTCCCCCTGGCCACAGCTCCAGGTCATGGTCCCCAGCGCAAC  
 CTGCATGTTCCAGGGCTGAACAAGACATCCTCTTTCTCCTGCGAAGCCC  
 ATAACGCCAAGGGAGTCACCACATCCCGCACGGCCACCATCACAGTGC  
 TCCCCAGCAGCCCCGTAACCTCCATCTGGTCTCCCGCCAACCCACGG  
 AGCTGGAGGTGGCTTGGACTCCAGGCCTGAGCGGCATCTACCCCTGA  
 CCCACTGCACCCTGCAGGCTGTGCTGTGACAGATGGGATGGGCATCC  
 AGGCGGGAGAACCCAGACCCCCAGAGGAGCCCTCACCTTGCAAGCAT  
 CTGTGCCCCCCCCACCAGCTTCGGCTGGGCAGCCTCCATCCTCACACCC  
 CTTATCACATCCGTGTGGCATGCACCAGCAGCCAGGGCCCCCTCATCCT  
 GGACACACTGGCTTCCTGTGGAGACGCCGGAGGGAGTGCCCTGGGC  
 CCCCCTGAGAACATTAGTGCCACGCGGAATGGGAGCCAGGCCTTCGTG  
 CATTGGCAGGAGCCCCGGGCGCCCCCTGCAGGGTACCCTGTTAGGGTA  
 CCGGCTGGCGTATCAAGGCCAGGACACCCAGAGGTGCTAATGGACAT  
 AGGGCTAAGGCAAGAGGTGACCCTGGAGCTGCAGGGGGACGGGTCTG  
 TGTCCAATCTGACAGTGTGTGTGGCAGCCTACACTGCTGCTGGGGATG  
 GACCCTGGAGCCTCCAGTACCCCTGGAGGCCTGGCGCCAGGGCAA  
 GCACAGCCAGTCCACCAGCTGGTGAAGGAACTTCAGCTCCTGCCTTC  
 TCGTGGCCCTGGTGGTATATACTGCTAGGAGCAGTCGTGGCCGCTGCC  
 TGTGTCCTCATCTTGGCTCTCTTCCTTGTCCACCGGCGAAAGAAGGAGA  
 CCCGTTATGGAGAAGTGTTGAGCCAACAGTGGAAGAGGTGAACTGG  
 TAGTCAGGTACCGCGTGCAGCAAGTCCTACAGTCGCCGGACCACTGAAG

[0173]



CTACCTTGAACAGCCTGGGCATCAGTGAAGAGCTGAAGGAGAAGCTGC  
GGGATGTGATGGTGGACCGGCACAAGGTGGCCCTGGGGAAGACTCTG  
GGAGAAGGAGAGTTTGGAGCCGTGATGGAAGGCCAGCTCAACCAGGA  
CGACTCCATCCTCAAGGTGGCTGTGAAGACAATGAAGATTGCCATCTGC  
ACAAGGTCAGAGCTGGAGGATTTCTGAGTGAAGCAGTCTGCATGAAG  
GAATTCGACCATCCCAATGTCATGAGGCTCATCGGTGTCTGTTCCAGG  
GTTCTGAACGAGAGAGCTTTCCAGCACCTGTGGTCATCTTACCTTTTAT  
GAAGCATGGAGACCTACACAGCTTCCTCCTCTATTCCCGGCTTGGGGA  
CCAGCCAGTGTACCTGCCCACTCAGATGCTAGTGAAGTTCATGGCGGA  
CATCGCCAGTGGCATGGAATATCTGAGTACCAAGAGATTATACACCGG  
GACCTGGCGGCCAGGAAGTGCATGCTGAATGAGAACATGTCCGTGTGT  
GTGGCGGACTTCGGGCTCTCCAAGAAGATCTACAACGGGGACTACTAC  
CGCCAGGGACGTATCGCCAAGATGCCAGTCAAGTGGATTGCCATTGAG  
AGTCTAGCTGACCGTGTCTACACGAGCAAGAGTGATGTGTGGTCCTTC  
GGGGTGACAATGTGGGAGATTGCCACAAGAGGCCAAACCCCATATCCA  
GGCGTGGAGAACAGCGAGATTTATGACTATCTGCGCCAGGGAAATCGC  
CTGAAGCAGCCTGCGGACTGTCTGGATGGACTGTATGCCTTGATGTCTG  
CGGTGCTGGGAGCTAAATCCCCAGGACCGGCCAAGTTTACAGAGCTG  
CGGGAAGATTTGGAGAACACACTGAAGGCCTTGCCTCCTGCCAGGAG  
CCTGACGAAATCCTCTATGTCAACATGGATGAAGGTGGAGGTTATCCTG  
AACCTCCCGGCGCTGCTGGAGGAGCTGACCCCCAAGCCAGCTAGACC  
CTAAGGATTCCTGTAGCTGCCTCACTTCGGCTGAGGTCCATCCTGCTGG  
ACGCTATGTCCTCTGCCCTTCCACAGCCCCCTAGCCCCGCTCAGCCTGC  
TGATAGGGGCTCCCCAGCAGCCCCAGGGCAGGAGGATGGTGCC

아미노산 서열:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWVCMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGAR  
GLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIV  
VSQRLIASLQLSDAGQYQCLVFLGHQNFVSQPGYVGLPYFLEPEDRT  
VAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRNLHVPGLNK  
TSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAVTPGLS  
GIYPLTHCTLQAVLSDGDMGIQAGEPDPPEEPLTLQASVPPHQLRLGSLHP  
HTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFV  
HWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPVLMIDIGLRQEVTLQLQDGSVSN

LTVCVAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPGQAQPVHQLVKETSAPAFSWPW  
WYILLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVRYRVRK  
SYSRRTEATLNSLGISEELKEKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG  
QLNQDDSIKLVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCF  
QGSERESFPAPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPQMLVKFMADI  
ASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQG  
RIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEI  
YDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLK  
ALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQLDPKDSCSLTSA  
EVHPAGRYVLCPTAPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

### 3 C. 인간 Mer의 클로닝

본 연구에서, 인간 Mer 발현 구조물 pcDNA3-hMer을 제조하였다. 인간 Mer의 전장 코딩 서열을 벡터 pCMV6-XL4-human Mer (Origene #TC116132)의 EcoRI 및 XbaI에 의한 절단을 통해 수득하였다. pcDNA3을 동일한 제한효소에 의해 처리한 후, 두 단편을 라이게이션시켜 pcDNA3-hMer을 제조하였다. Kozak 공통 서열(consensus sequence)을 도입하기 위해, pcDNA3-hMer 중의 인간 Mer 코딩 서열의 5'-영역을 인간 Mer의 NCBI 참조 서열 (NM\_006343)에 따른 적합한 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 이 단편의 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같았

다:

[0178] EcoRI 인식 서열 및 Kozak 공통 서열을 갖는 정방향 프라이머 MER1:

[0179] 5'-CGG AAT TCG CCA CCA TGG GGC CGG CCC CGC TGC CGC-3'

[0180] 5'-단편을 위한 역방향 프라이머 MER2:

[0181] 5'-TCG GCT GCC ATT CTG GCC AAC TTC C-3'

[0182] PCR 산물 및 pcDNA3-hMer을 EcoRI 및 EcoRV로 처리하고 라이게이션시켜서 전장 인간 Mer 코딩 서열의 앞에 Kozak 공통 서열이 존재하는 것인 pcDNA3-Kozak-hMer을 제조하였다. DH5  $\alpha$  박테리아 세포에 형질전환시킨 후, 단일 콜로니를 채취하고 암피실린의 존재 하에 배양하였다. 시판되는 플라스미드 정제 키트(Qiagen)를 이용하여, pcDNA3-Kozak-hMer 발현 벡터를 정제하고, HEK293T 세포로의 후속 일시적 형질감염을 위해 서열을 확인했다.

### [0183] 3 D. 인간 Sky의 클로닝

[0184] 본 연구에서, 인간 Sky 발현 구조물 pcDNA3-hSky를 제조하였다. 인간 Sky의 전장 코딩 서열을 벡터 pCMV6-XL4-human Sky (Origene #MG1044\_A02)를 주형으로 이용하고, 인간 Sky의 NCBI 참조 서열 (NM\_006293)에 따른 적합한 프라이머에 의해 PCR 증폭하였다. 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같았다:

[0185] EcoRI 인식 서열을 갖는 정방향 프라이머 SKY1:

[0186] 5'-CGG AAT TCG CCA CCA TGG CGC TGA GGC GGA GC-3'

[0187] XhoI 인식 서열을 갖는 역방향 프라이머 SKY2:

[0188] 5'-GCC CTC GAG CTA ACA GCT ACT GTG TGG CAG TAG-3'

[0189] PCR 산물 및 pcDNA3을 EcoRI 및 XhoI로 처리하고 라이게이션시켜서 pcDNA3-hSky 발현 벡터를 제조하였다. DH5  $\alpha$  박테리아 세포에 형질전환시킨 후, 단일 콜로니를 채취하고 암피실린의 존재 하에 배양하였다. 단일 콜로니를 채취하고 암피실린의 존재 하에 배양하였다. 시판되는 플라스미드 정제 키트(Qiagen)를 이용하여, pcDNA3-hSky 발현 벡터를 정제하고, HEK293T 세포로의 후속 일시적 형질감염을 위해 서열을 확인했다.

### [0190] 3 E. 마우스 AXL, 시노물구스 원숭이 AXL, 인간 Mer, 및 인간 Sky의 형질감염 및 발현

[0191] 마우스 AXL, 시노물구스 원숭이 AXL, 인간 Mer 또는 인간 Sky의 일시적 발현을 위해, 인산칼슘 방법을 적용하여, HEK293T 세포를 pcDNA3 공 벡터, pcDNA3-hAXL, pcDNA3mAXL, pcDNA3-cyAXL, pcDNA3-hMer, 또는 pcDNA3-hSky로 일시적으로 형질감염시켰다. 요약하면, 형질감염 전에, 16 ml 배지 중의  $3 \times 10^6$  개의 HEK293T 세포를 15 cm 세포 조직배양 접시에 접종하고 7% CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 30시간 동안 배양하였다. 720  $\mu$ l의 ddH<sub>2</sub>O 중의 개별적인 발현 벡터 또는 공 벡터의 32  $\mu$ g DNA를 2.5 M CaCl<sub>2</sub> 및 2xBS (pH 6.96)와 혼합하고 실온에서 10분 동안 유지시켰다. 이에 의해 준비된 용액을 조심스럽게 세포 배양액에 첨가하고 3% CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 8시간 동안 배양하였다. 배지를 신선한 성장 배지로 교체하고 세포들을 7% CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

### [0192] 3 F. 랫트 항-AXL 항체를 교차-반응성에 대해 테스트하기 위한 FACS 분석

[0193] FACS 분석을 위해,  $2 \times 10^5$  개의 세포들을 PBS 중의 10 mM EDTA에 의해 회수하고, FACS 완충액(PBS, 3% FCS, 0.4% 아지드)으로 1회 세척하고, 96-웰 둥근 바닥 플레이트 상에 접종하였다. 세포들을 1,000 rpm으로 3분 동안 스핀시켜서 상층액을 제거하고 10  $\mu$ g/ml 이소형 대조군 항체 1D5 및 항-AXL 11D5, 11B7, 10D12, 6E7, 2A1, 11D7 및 12B7 일차 항체 용액 (100  $\mu$ l/웰)에 재현탁시켰다. 세포를 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 냉각된 FACS 완충액으로 2회 세척하고, FACS 완충액(100  $\mu$ l/웰) 중에 1:50으로 희석시킨 PE-접합 당나귀 항-마우스 이차 항체(Jackson)에 재현탁시키거나 또는 대조군의 경우, PE-접합 당나귀 항-마우스 이차 항체에 재현탁시켰다. 광(light)으로부터 보호하면서, 세포들을 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시키고, FACS 완충액으로 2회 세척



하고, Epics XL-MCL 유세포측정기(Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

[0194] 도 3은 본 실험의 대표적 결과를 보여준다. 마우스 AXL 및 인간 Mer 및 Sky와의 적당한(moderate) 교차-반응성을 보인 12B7을 제외하고, 다른 본 발명의 항-AXL 항체는 이 분자들과 교차-반응하지 않았다. 대조적으로, 본 발명의 테스트된 모든 랫트 항-AXL 항체는 시노몰구스 원숭이 AXL과 교차-반응했다.

[0195] **실시예 4. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 리간드-유도 AXL 인산화를 억제한다.**

[0196] 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 AXL의 리간드 Gas6-매개 활성화를 차단할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 ELISA 실험을 수행하였다. Gas6-매개 AXL 활성화를 증가된 수용체 티로신 인산화에 의해 검출하였다. 요약하면, 1일 차에, 웰 당  $3 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥(flat-bottom) 96-웰 플레이트 중의 정상 성장 배지에 접종하였다. 다음날, 세포들을 굵기기 위해 성장 배지를 무혈청 배지로 교체하고 밤새 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 또한, 밤새 4℃에서 블랙 Maxi-Sorp 96 웰 플레이트(Nunc)를 2  $\mu\text{g/ml}$  PBS의 마우스 항-포스포-티로신 항체 4G10으로 코팅시켰다. 3일 차에, 4G10 항체 용액을 제거하고, Maxi-Sorp 웰을 실온에서 4시간 이상 동안 PBS, 0.5% BSA에 의해 블로킹(blocking)시켰다. 동시에, 세포들을 37℃에서 1시간 동안 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 마우스 대조군 항체 72A1 및 랫트 항-AXL 항체 2A1, 11D7, 11D5, 11B7, 6E7, 및 10D12와 전-인큐베이션시키고 37℃에서 10분 동안 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 처리하였다. 그 후, 배지를 제거하고(flick out) 세포들을 얼음 상에서 포스포아제 및 프로테아제 억제제(10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오리드, 1 mM 오르토바나데이트, 1 mM NaF, 및 0.5% 아프로티닌)가 보충된 용해 완충액(50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% 글리세린, 및 1% Triton X-100)에서 30분 동안 용해시켰다. 또한, 블로킹 완충액을 제거하고, Maxi-Sorp 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.05% Tween 20)으로 6회 세척하고, 용해물을 옮기고, 밤새 4℃에서 인큐베이션시켰다. 4일 차에 플레이트를 세척 완충액으로 6회 세척한 후, 웰을 실온에서 2시간 동안 0.5  $\mu\text{g/ml}$  PBS의 비오틴화 랫트 항-AXL 항체 12B7과 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척 완충액으로 6회 세척하고 PBS 중에 1:4,000으로 희석된 AP-접합 스트렙타비딘(Cemicon #SA110)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 웰을 세척 완충액으로 6회 세척하고, AttoPhos 기질 용액(Roche #11681982)을 첨가하였다. Victor 플레이트 판독기(Perkin Elmer)를 이용하여, 430 nm의 여기 파장(excitation wavelength) 및 580 nm의 발광 파장에서 각 웰의 형광을 수집하였다.

[0197] 도 4는 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포 (A) 및 NCI-H292 폐암 세포 (B)에 대한 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 랫트 항-AXL 11B7, 11D5, 6E7, 및 10D12는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 AXL 활성화를 차단 또는 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이 기저 AXL 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 AXL 활성화를 유의성있게 감소시키지 않고, 따라서 효능적 항-AXL 항체로 간주된다. 동일한 패널의 항체들의 유사한 효과를 폐암 세포주 CaLu-1 및 CaLu-6, 유방암 세포주 Hs578T 및 MDA-MB-231, 전립선암 세포주 PC-3, 췌장암 세포주 PANC-1, 흑색종 세포주 C-8161, 난소암 세포주 SkOV-3 및 SkOV-8, 아교모세포종 SF-126, 자궁경부암 세포주 CaSki, 및 위암 세포주 Hs746T 및 MKN-1에서 관찰했다.

[0198] **실시예 5. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 리간드-유도 p42/p44 MAP-кина아제 인산화를 억제한다.**

[0199] 이어서, 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 p42/p44 MAP-кина아제의 리간드 Gas6-매개 활성화를 차단할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 ELISA 실험을 수행하였다. Gas6-매개 p42/p44 MAP-кина아제 활성화는 증가된 단백질 (Thr202/Tyr204) 인산화에 의해 검출되었다. 요약하면, 제1일에, 웰 당  $2 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 다음 날, 세포들을 36시간 동안 굵기기 위해 정상 성장 배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 그 후, 세포들을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 이소형 대조군 항체 1D5 및 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 및 2A1과 37℃에서 1시간 동안 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml Gas6(R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 37℃에서 10분 동안 처리하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS (pH 7.5) 중 4% 포름알데히드로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 포름알데히드 용액을 제거하고 세포들을 세척 완충액(PBS, 0.1% Tween 20)으로 2회 세척하였다. 세포들을 세척 완충액 중 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1%  $\text{NaN}_3$ 로 퀀칭시키고 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 퀀칭 용액을 제거하고, 세포들을 세척 완충액으로 2회 세척하고 PBS, 0.5% BSA로 4시간 동안 블로킹시켰다. PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA 중에 1:500으로 희석된 항-포스포-p42/p44 MAP 키나아제(Thr202/Tyr204) 일차 항체(다중클론

토끼; Cell Signaling #9101)를 4℃에서 밤새 첨가하였다. 4일 차에, 항체 용액을 제거하고 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후, PBS, 0.5% BSA 중에 1:2,500으로 희석된 HRP-접합 항-토끼 이차 항체 (Dianova #111-036-045)를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 각각 5분씩 세척 완충액으로 3회 및 PBS로 2회 세척하였다. 테트라메틸벤지딘(TMB, Calbiochem)을 첨가하고 620 nm에서 모니터링하였다. 반응을 100  $\mu$ l의 250 nM HCl의 첨가에 의해 중단시키고 Vmax 플레이트 판독기 (Thermo Lab Systems)를 이용하여 620 nm의 참조 파장으로, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0200] 도 5는 자궁경부암 세포주 CaSki에 대한 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 랫트 항-AXL 11B7 및 11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 2A1은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이 기저 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 p42/p44 MAP-кина아제 활성화를 감소시키지 않으며, 따라서 효능적 항-AXL 항체로 간주된다. 동일한 패널의 항체들의 유사한 효과를 유방암 세포주 Hs578T 및 폐암 세포주 NCI-H292에서 관찰했다.

[0201] **실시예 6. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 리간드-유도 Akt 인산화를 억제한다.**

[0202] 또한, 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 Akt-кина아제의 리간드 Gas6-매개 활성화를 차단할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 ELISA 실험을 수행하였다. Gas6-매개 Akt-кина아제 활성화는 증가된 단백질 (Ser473) 인산화에 의해 검출되었다. 요약하면, 제1일에, 웰 당  $2 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 다음 날, 세포들을 36시간 동안 굶기기 위해 정상 성장 배지를 저혈청 배지(NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 경우, DMEM, 0.5% FCS) 또는 무혈청 배지(암세포주의 경우)로 교체하였다. 그 후, 세포들을 10  $\mu$ g/ml의 이소형 대조군 항체 1D5 및 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 및 2A1과 37℃에서 1시간 동안 전-인큐베이션시키고, 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 37℃에서 10분 동안 처리하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS (pH 7.5) 중 4% 포름알데히드로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 포름알데히드 용액을 제거하고 세포들을 세척 완충액 (PBS, 0.1% Tween 20)으로 2회 세척하였다. 세포들을 세척 완충액 중 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>로 퀀칭시키고 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 퀀칭 용액을 제거하고, 세포들을 세척 완충액으로 2회 세척하고 PBS, 0.5% BSA로 4℃에서 4시간 동안 블로킹시켰다. PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA 중에 1:500으로 희석된 항-포스포-Akt (Ser473) 일차 항체(다중클론 토끼; Cell Signaling #9271)를 4℃에서 밤새 첨가하였다. 4일 차에, 항체 용액을 제거하고 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후, PBS, 0.5% BSA 중에 1:2,500으로 희석된 HRP-접합 항-토끼 이차 항체(Dianova #111-036-045)를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 각각 5분씩 세척 완충액으로 3회 및 PBS로 2회 세척하였다. 테트라메틸벤지딘(TMB, Calbiochem)을 첨가하고 620 nm에서 모니터링하였다. 반응을 100  $\mu$ l의 250 nM HCl의 첨가에 의해 중단시키고 Vmax 플레이트 판독기 (Thermo Lab Systems)를 이용하여 620 nm의 참조 파장으로, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0203] 도 6은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포 (A) 및 CaLa-1 폐암 세포 (B)에 대한 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 랫트 항-AXL 11B7 및 11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 리간드-매개 Akt-кина아제 활성화를 차단 또는 감소시킬 수 있었고, 따라서, 길항적 항-AXL 항체로 간주된다. 대조적으로, 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 2A1은 증가된 인산화에 의해 나타난 바와 같이 기저 Akt-кина아제 활성화를 촉진하고, 리간드-매개 Akt-кина아제 활성화를 감소시키지 않으며, 따라서 효능적 항-AXL 항체로 간주된다. 동일한 패널의 항체들의 유사한 효과를 폐암 세포주 NCI-H292, 유방암 세포주 Hs578T 및 MDA-MB-231, 전립선암 세포주 PC-3, 췌장암 세포주 PANC-1, 흑색종 세포주 C-8161, 난소암 세포주 SkOV-3 및 SkOV-8, 방광암 세포주 TCC-Sup, 및 섬유모세포주 HT1080에서 관찰했다.

[0204] **실시예 7. 본 발명의 랫트 및 키메라 항-AXL 항체는 인 비트로에서 유사한 정도까지 리간드-유도 Akt 인산화를 억제한다.**

[0205] 본 발명의 일부로서 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5의 키메라 유도체를 제조하였다(하기 참조). 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 및 상응하는 본 발명의 키메라 항-AXL 항체가 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포에서 유사한 정도까지 Akt-кина아제의 리간드 Gas6-매개 활성화를 차단할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, ELISA 실험을 수행하였다. 항체-매개 Akt-кина아제 억제를 감소된 단백질 (Ser473) 인산화에 의해 검출하였다. 요약하면, 제1일에, 웰 당

$2 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 다음 날, 세포들을 36시간 동안 굶기기 위해 정상 성장 배지를 저혈청 배지(DMEM, 0.5% FCS)로 교체하였다. 그 후, 세포들을 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 및 1  $\mu$ g/ml의 랫트 항-AXL 항체 11B7 또는 키메라 항-AXL 항체 ch11B7, 및 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 및 10  $\mu$ g/ml의 랫트 항-AXL 항체 11D5 또는 키메라 항-AXL 항체 ch11D5와 37°C에서 1시간 동안 전-인큐베이션시키고, 37°C에서 10분 동안 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 처리하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS (pH 7.5) 중 4% 포름알데히드로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 포름알데히드 용액을 제거하고 세포들을 세척 완충액(PBS, 0.1% Tween 20)으로 2회 세척하였다. 세포들을 세척 완충액 중 1%  $H_2O_2$ , 0.1%  $NaN_3$ 로 퀀칭시키고 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 퀀칭 용액을 제거하고, 세포들을 세척 완충액으로 2회 세척하고 PBS, 0.5% BSA로 4°C에서 4시간 동안 블로킹시켰다. PBS, 0.5% BSA, 5 mM EDTA 중에 1:500으로 희석된 항-포스포-Akt (Ser473) 일차 항체(다중클론 토끼; Cell Signaling #9271)를 4°C에서 밤새 첨가하였다. 4일 차에, 항체 용액을 제거하고 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후, PBS, 0.5% BSA 중에 1:2,500으로 희석된 HRP-접합 항-토끼 이차 항체(Dianova #111-036-045)를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 각각 5분씩 세척 완충액으로 3회 및 PBS로 2회 세척하였다. 테트라메틸벤지딘(TMB, Calbiochem)을 첨가하고 620 nm에서 모니터링하였다. 반응을 100  $\mu$ l의 250 mM HCl의 첨가에 의해 중단시키고 Vmax 플레이트 판독기 (Thermo Lab Systems)를 이용하여 620 nm의 참조 파장으로, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0206] 도 7은 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 키메라 항-AXL 항체 ch11B7 및 본 발명의 랫트 항-AXL 항체 11D5 및 키메라 항-AXL 항체 ch11D5는 감소된 인산화에 의해 나타난 바와 같이, 유사한 정도까지 리간드-매개 Akt-키나아제 활성화를 억제할 수 있었다는 것을 보여주었다. 따라서, 그들의 개별적인 랫트 대응물에 비해, 키메라 항-AXL 항체 ch11B7 및 ch11D5는 활성을 유지했다.

[0207] **실시예 8. 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체는 동일한 에피토프 또는 구조적으로 관련된 에피토프에 대해 상호 간에 경쟁하고 본 발명의 효능적 랫트 항-AXL 항체와 결합 부위를 공유하지 않는다.**

[0208] 본 발명의 항-AXL 항체가 AXL-ECD 도메인 상의 유사한 결합 에피토프에 대해 상호 간에 경쟁하는지 여부를 조사하였다. 따라서, 항-AXL 항체와 전-인큐베이션된 AXL-ECD 도메인-코팅된 플레이트로의 비오틀화 항-AXL 항체의 결합을 경쟁 ELISA에서 결정하였다. 요약하면, 30  $\mu$ g의 이소형 대조군 항체 1D5 및 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, 및 2A1을 제조사의 설명서에 따라 Sulfo-NHS-Biotin (Pierce #21217)으로 비오틀화시키고, Micro-BioSpin P6 컬럼 SSC (BIO-RAD #732-6200)를 이용하여 정제하였다. 1일 차에, 블랙 96-웰 Maxi-Sorp 플레이트(Nunc)를 4°C에서 밤새 PBS 중의 1  $\mu$ g/ml 인간 AXL-ECD(R&D Systems #154-AL) 100  $\mu$ l/웰로 코팅하였다. 2일 차에, 코팅된 Maxi-Sorp 플레이트를 실온에서 2시간 동안 블로킹 완충액(PBS, 1% BSA 0.05% TWEEN-20)(250  $\mu$ l/웰)으로 블로킹시키고, 뒤이어 블로킹 완충액 중의 10  $\mu$ g/ml의 PBS 또는 비오틀화되지 않은 이소형 대조군 항체 1D5 및 비오틀화되지 않은 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, 또는 2A1(100  $\mu$ l/웰)과 실온에서 전-인큐베이션시켰다. 세척 없이 항체 용액을 제거하고 PBS 또는 블로킹 완충액 중의 0.5  $\mu$ g/ml 비오틀화 이소형 대조군 항체 1D5 및 비오틀화 랫트 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 10D12, 11D7, 또는 2A1을 100  $\mu$ l/웰로 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 완충액(PBS, 0.1% TWEEN-20)으로 6회 세척 후, 블로킹 완충액 중에 1:4,000으로 희석된 AP-접합 스트렙타비딘 (Chemicon #SA110)을 80  $\mu$ l/웰로 첨가하고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션시키고, 세척 완충액으로 다시 6회 세척하고 최종적으로 PBS로 1회 세척하였다. 검출을 위해, 100  $\mu$ l/웰의 Attophos 기질 용액(Roche # 11681982)을 첨가하였다. Victor 플레이트 판독기(Perkin Elmer)를 이용하여, 430 nm의 여기 파장 및 580 nm의 발광 파장에서 각 웰의 형광을 수집하였다.

[0209] 도 8은 이 분석의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 길항적 항-AXL 항체 11B7, 11D5, 6E7, 및 10D12는 동일하거나 또는 구조적으로 인접한 에피토프에 대해 상호 간에 경쟁한다. 본 발명의 두 개의 효능적 항체 11D7 및 2A1은 개별적으로 상이한 에피토프를 인식하고 따라서, 상호 간에 배타적이지 않다. 또한, 11D7 및 2A1은 AXL-ECD로의 결합에 대해 길항적 항체와 경쟁하지 않는다. 대조군 항체 1D5는 AXL-ECD에 결합하지 않았다.

[0210] **도 9. 본 발명의 랫트 및 키메라 항-AXL 항체는 인 비트로에서 폐암 세포 이동 및 증식을 억제한다.**

[0211] 상이한 세포 및 배양 조건의 이동 및 증식 속도를 조사하기 위해, 수년 동안 인 비트로 상처 치유/스크래치(in

vitro wound healing/scratch) 분석법이 이용되고 있다. 이 분석법은 일반적으로 먼저 합류된(confluent) 세포 단일층을 배양하는 단계를 포함한다. 그 후, 작은 영역을 파괴하고, 예를 들면, 피펫 팁으로 상피 층을 통해 라인을 스크래칭하는 것에 의해 일군의 세포들이 파괴되거나 또는 전위된다. 그 후, 세포들이 이동해와서 손상된 영역을 채워가면서("치유(healing)") 개방된 갭을 시간의 경과에 따라 현미경으로 관찰한다. 요약하면,  $1.5 \times 10^6$  개의 NCI-H292 폐암 세포를 12 웰 디쉬의 각 웰에 접종하고 정상 배양 배지(RPMI, 10% FCS)에서 배양하였다. 8 시간 후에, 세포들을 PBS로 세정하고, 저혈청 배지(RPMI, 0.5% FCS)에서 밤새 24시간 동안 굼겼다. 멸균된 200  $\mu$ l 피펫 팁을 이용하여, 합류된 NCI-H292 세포 단일층을 통해 웰 당 3개의 균일한 상처를 스크래칭하였다. 세포들을 가볍게 PBS로 세정하고, 비교를 위해 첨가제를 포함하지 않는 저혈청 배지(RPMI, 0.5% FCS), 10  $\mu$ g/ml의 이소형 대조군 항체 1D5, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 6E7, 또는 10D12, 키메라 항-AXL 항체 chn11D5 IgG2 및 chn11B7 IgG2, 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7 및 10  $\mu$ g/ml의 Erbitux 또는 5  $\mu$ M Sutent와 인큐베이션시켰다. 세포들을 24시간 동안 투명 영역으로 이동될 수 있게 하고, PBS로 1회 세척하고, -20°C에서 냉각시킨(ice cold) 메탄올(100%)로 고정시켰다. 세포들을 크리스탈 바이올렛 (메탄올 중 0.5%)으로 염색하고, 물로 세정하고, 밤새 건조시킨 후, 상처의 사진을 촬영했다.

[0212] 도 9는 NCI-H292 폐암 세포에 대한 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 이소형 대조군 항체 대비, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11D5, 11B7, 6E7, 및 10D12, 및 본 발명의 키메라 항-AXL 항체 chn11D5 IgG2 및 chn11B7 IgG2는 스크래칭에 의해 형성된 투명 영역의 재-분포를 감소시켰으나, 본 발명의 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 상처의 완전한 봉합을 가져왔다. 동일한 패널의 항체에 의한 유사한 결과가 난소암 세포주 SkOv-3 또는 위암 세포주 MKN-1에서 관찰되었다.

[0213] **실시예 10. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 리간드 유도 이동을 억제한다.**

[0214] 본 발명의 항체가 세포 이동을 차단하는지 여부를 조사하기 위해, 횡단이동(transmigration) 실험을 수행하였다. 이 목적을 위해, 제1일차 오전에, NIH3T3-AXL c1.7 세포를 15 cm 디쉬 상에 정상 성장 배지 중에 접종하고, 세포들을 36시간 동안 굼기기 위해 저혈청 배지(DMEM, 0.5% FCS)로 교체하였다. 다음 날, FluoroBlock 96 웰 플레이트(Becton Dickinson #351164, 8  $\mu$ m 세공 크기)를 37°C에서 밤새 10  $\mu$ g 콜라겐 I/ml 0.1 M 아세트산으로 코팅시켰다. 3일 차에, 저혈청 배지(DMEM, 0.5% FCS)를 4시간 동안 무혈청 배지(DMEM, 0% FCS, 0.1% BSA)로 교체하였다. 세포들을 PBS 중의 10 mM EDTA에 의해 회수하고,  $4 \times 10^5$  개의 세포/ml의 세포 밀도 및 10  $\mu$ g/ml의 항체 농도에서 45분 동안 랫트 항-AXL 항체 4A6, 11B7 또는 2A1과 전-인큐베이션시켰다. 웰 당 50  $\mu$ l 세포 현탁액(20,000개의 세포)을 FluoroBlock 96-웰 플레이트의 상부 챔버(top chamber)에 배치하고, 400 ng/ml 마우스 Gas6 (R&D Systems)를 포함하거나 포함하지 않는 배지 (DMEM, 0%FCS, 0.1%BSA) 225  $\mu$ l를 하부 챔버(bottom chamber)에서 웰 당 이용하였다. 세포들을 37°C에서 7시간 동안 이동하도록 방치하고 그 후, 37°C에서 1시간 동안 PBS, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$  중의 4.2  $\mu$ M 칼세인-AM (Molecular Probes #C3099)으로 염색하였다. Victor 플레이트 판독기 (Perkin Elmer)를 이용하여, 각 웰의 형광을 530 nm의 파장에서 측정하였다.

[0215] 도 10은 본 발명의 길항적 항-AXL 항체 11B7은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 기저 이동 및 Gas6-유도 이동을 감소시켰고, 본 발명의 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 리간드-유도 이동 및, 특히, 기저 이동을 증가시켰다는 것을 보여준다. 항체 4A6은 세포 이동에 영향을 미치지 않았다.

[0216] **실시예 11. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 리간드-유도 증식을 억제한다.**

[0217] 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 Gas6-유도 세포 증식을 억제하는 능력을 결정하기 위해 인 비트로 실험을 수행하였다. 이 목적을 위해, 웰 당 2,500개의 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포를 밤새 96 웰 플레이트 상에서 FCS-함유 배지에 접종하였다. 다음 날, 세포들을 저혈청 배지(DMEM, 0.5% FCS)에서 10시간 동안 굼기고 뒤이어 37°C에서 1시간 동안 DMEM, 0.5% FCS 중의 20  $\mu$ g/ml의 마우스 대조군 항체 72A1, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11D5 및 11B7, 및 효능적 항체 2A1과 전-인큐베이션시켰다. 항체 용액에 직접 리간드를 첨가하는 것에 의해 400 ng/ml 마우스 Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 처리하였고, 그 후, 96 시간 동안 배양시켰다. AlamarBlue



<sup>TM</sup> (BIOSOURCE #DAL1100)를 첨가하고 암소에서 37℃에서 인큐베이션시켰다. 흡광도에서 30분 간격으로 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. AlamarBlue<sup>TM</sup>의 첨가 후 4시간 경과시 데이터를 취했다.

[0218] 도 11은 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 길항적 항-AXL 항체 11D5 및 11B7은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 Gas6-유도 증식을 차단하고, 본 발명의 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 리간드-유도 증식 및 기저 증식을 증가시켰다.

[0219] **실시예 12. 본 발명의 항-AXL 항체는 인 비트로에서 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 리간드-매개 항-아포토시스를 억제한다.**

[0220] 카스파아제의 활성화 및 아포토시스의 유도는 성장 호르몬 제거, 화학요법제 또는 방사선으로의 노출, 또는 Fas/Apo-1 수용체 매개 세포 사망 과정의 개시를 포함한 다양한 자극으로부터 유발될 수 있다. Gas6-AXL 상호작용이 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3 섬유모세포(Goruppi et al., 1996, Oncogene 12, 471-480) 또는 폐 내피 세포(Healy et al., 2001, Am. J. Physiol., 280, 1273-1281)를 포함한 다양한 종류의 세포의 아포토시스로부터의 보호에 관여된 것으로 입증되었다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 랫트 항-AXL 항체가 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 Gas6-매개 항-아포토시스를 방해하고, 따라서, 아포토시스를 유도하는지 여부를 조사하였다. 아포토시스율(apoptosis rate)은 세포 카스파아제-3/7 활성의 측정에 의해 결정하였다. 이 목적을 위해, NIH3T3-AXL c1.7 세포를 블랙 투명-바닥 96웰 플레이트에 웰 당  $1.5 \times 10^3$ 개의 세포의 세포 밀도로 접종하였다( $100 \mu\text{l}$ /웰). 다음 날, 세포들을 24시간 동안 밤새 고갈시키기 위해, 정상 성장 배지를 저혈청 배지(DMEM, 0.5% FCS)로 교체하였다. 다음 날, DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA 중의  $80 \mu\text{g/ml}$ 로 이소형 대조군 항체 1D5, 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5, 및 효능적 항-AXL 항체 11D7 및 2A1의 항체 용액을 제조하였다. 세포들을 PBS로 세척하고,  $60 \mu\text{l}$ 의 DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA로 뒤덮고,  $10 \mu\text{l}$ 의 개별적인 항체 용액을 첨가하였다. 37℃에서 1시간의 인큐베이션 후,  $3.2 \mu\text{g/ml}$  마우스 Gas6 (R&D Systems)를 포함하거나 또는 포함하지 않는 DMEM, 0% FCS, 0.01% BSA  $10 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 (항체 및 Gas6의 최종 농도는 각각  $10 \mu\text{g/ml}$  및  $400 \text{ ng/ml}$ 였음), 세포들을 다시 5시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 이후 단계들은 Apo-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega, G7791)에 대한 기술 설명서(technical bulletin)를 참조한다. 요약하면, 인큐베이터로부터 배양 플레이트를 꺼내고 실온에서 20분 동안 평형화시켰다.  $60 \mu\text{l}$ 의 Apo-ONE 기질 및 6 ml 완충액을 해동시키고, 조합하여 시료에 첨가하였다( $75 \mu\text{l}$ /웰). 웰의 내용물을 30초 동안 약하게 진탕시키고, 광으로부터 보호된 상태에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. Victor 플레이트 판독기(Perkin Elmer)를 이용하여, 485 nm의 여기 파장 및 530 nm의 발광 파장에서 각 웰의 형광을 측정하였다.

[0221] 도 12는 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 이소형 대조군 항체 대비, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5는 혈청을 공급하지 않은(serum-starved) NIH3T3-AXL c1.7 섬유모세포의 Gas6-유도 항-아포토시스를 감소시키고, 따라서, 아포토시스를 유도했다. 대조적으로, 본 발명의 효능적 랫트 항-AXL 항체 2A1 및 11D7은 Gas6의 존재 또는 부재 여부에 관계없이, 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-AXL c1.7 세포의 항-아포토시스를 강하게 유도하고, 그러므로 아포토시스를 억제했다.

[0222] **실시예 13. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인 비트로에서 구상체-기반 세포 혈관형성을 억제한다.**

[0223] AXL은 인 비트로에서 내피 세포 이동, 증식 및 튜브 형성을 포함한 여러 혈관형성 거동의 주요한 조절자이다(Holland et al., Cancer Res: 65, 9294-9303, 2005). 따라서, HUVEC-구상체의 VEGF-A-유도 혈관 발아에 대한 억제 효과에 대해 본 발명의 랫트 항-AXL 단일클론 항체 11B7 및 11D5를 테스트하였다. 본 실험은 최초로 공개된 프로토콜(Korff and Augustin: J Cell Sci 112: 3249-58, 1999)을 변형하여 수행하였다. 요약하면, 플라스틱 디쉬 상에 500개의 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)를 매달린 점적(hanging drop)으로 피펫팅하여 밤새 구상체 응집이 진행되게 하여, 기술된 바와 같이(Korff and Augustin: J Cell Biol 143: 1341-52, 1998) 구상체를 제조하였다. 그 후, 50개의 HUVEC 구상체를  $0.9 \text{ ml}$ 의 콜라겐 용액( $2 \text{ mg/ml}$ )에 접종하고 24 웰 플레이트의 개별적인 웰에 피펫팅하여 중합시켰다. 감소되는 농도의 랫트 항-AXL 항체 11B7 및 11D5 ( $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ,  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ )를 중합 전에 콜라겐 용액에 직접 혼합하고, 성장 인자 VEGF-A (최종 농도  $25 \text{ ng/ml}$ )는 중합된 겔의 위에 10-배 농축 용액의 희석액(10-fold concentrated working dilution)  $100 \mu\text{l}$ 를 피펫팅하는 것에 의해 30분 후에 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션시키고, 4% 파라

포름알데히드를 첨가하는 것에 의해 고정시켰다. HUVEC 구상체의 발아 강도(sprouting intensity)를 역상 현미경(inverted microscope) 및 디지털 이미징 소프트웨어 Analysis 3.2 (Soft imaging system, Munster, Germany)를 이용하여 구상체 당 누적 발아 길이를 결정하는 영상 분석 시스템에 의해 정량하였다. 10개의 무작위로 선택된 구상체의 누적 발아 길이의 평균을 개별적인 데이터 포인트로 분석하였다.

[0224] 도 13은 이 실험의 결과를 보여준다. 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7 (A) 및 11D5 (B)는 투여량-의존적 방식으로 구상체-기반 혈관형성 분석법에서 VEGF-A에 의해 촉진된 HUVEC 발아를 억제했다. 최고 농도의 11B7에 의한 처리는 HUVEC 발아를 기저 수준까지 감소시켰으나, 최고 농도의 11D5에 의한 억제는 그만큼 효과적이지는 않았다(좌측 패널). HUVEC 발아는 11B7 및 11D5에 의해 각각  $9.8 \times 10^{-8}$  M 및  $7.0 \times 10^{-7}$  M의 IC<sub>50</sub> 값으로 억제되었다(우측 패널).

[0225] **실시예 14. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 누드 마우스에서 인간 전립선 육종 성장을 감소시킨다.**

[0226] 치료 항체의 항-종양 효능은 종종 인간 이종이식 종양 연구에서 평가된다. 이 모델 시스템에서, 인간 종양은 면역억제(immunocompromised) 마우스에서 이종이식편으로 성장하고, 치료적 효능은 종양 성장 억제의 정도에 의해 측정된다. 본 연구의 목적은 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7이 누드 마우스에서 인간 전립선암세포의 종양 성장을 방해하는지 여부를 평가하는 것이었다. 요약하면, 0일 차에, 7-8주령의 수컷 NMRI<sup>-nu/nu</sup> 마우스 (대략적 체중: 순응(acclimatization) 후 30 g)를 2 l/분의 산소 유속으로 1.5-2.0 부피 퍼센트(volume percent)의 이소플루란으로 마취시키고, 25  $\mu$ l PBS 중의  $1 \times 10^6$  개의 PC-3-LN 세포를 전립선 내에 동소로(orthotopically) 이식하였다. PC-3-LN 세포는 루시페라아제-네오마이신 융합 단백질을 코딩하는 레트로바이러스에 의해 감염된 PC-3 전립선 육종 세포주로부터 유래된다. 따라서, 종양 성장의 개시 및 종양 성장 진행은 인 비보 생물발광 이미징(in vivo bioluminescence imaging)을 통해 측정가능했다. 이 목적을 위해, 루시페린을 마우스에 복막내로(i.p.) 주사하고 NightOWL LB 981 생물발광 이미징 시스템(Berthold Technologies, Germany)을 이용하여 주사 후 10분 경과시 발광을 측정하였다. 제1 처리 전에, 마우스를 랜덤화하고 각각 10마리로 구성된 처리군 전체에 걸쳐 출발 종양 체적(평균, 중위 및 표준편차)의 균일성을 보장하기 위해 통계적 검정을 수행하였다. 8일 차에, 모든 처리를 개시하고 34일 차까지 지속하고, 뒤이어 35일 차에 검사를 수행하였다. 25 mg/kg의 이소형 대조군 항체 1D5 및 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7을 그룹 1 및 2의 동물에 각각 주당 3회(월, 수, 금) 복막내로(i.p.) 투여하였다. 그룹 3의 동물에 경구로(p.o.) 1일 1회 40 mg/kg의 Sutent를 투여했다. 그룹 4의 동물에 각각 4일 간격으로 12.5 mg/kg의 Taxotere를 3회 정맥내(i.v.) 주사로 투여하였다. 처리 그룹의 개요가 하기에 제시된다.

**표 2**

[0227]

그룹	처리	적용		동물 수
		경로	투여 방법	
1D5	25 mg/kg	i.p.	주당 3회(월, 수, 금) 랜덤화 1일 후 개시 <sup>2)</sup>	10
11B7	25 mg/kg	i.p.	주당 3회(월, 수, 금) 랜덤화 1일 후 개시 <sup>2)</sup>	10
Sutant	40 mg/kg	p.o.	매일 랜덤화 1일 후 개시 <sup>2)</sup>	10
Taxotere	12.5 mg/kg	i.v.	4일 간격으로 3회 투여 랜덤화 1일 후 개시	10

[0228] 도 14는 이 실험의 결과를 보여준다. 이소형 대조군 항체 1D5에 비해, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7은 누드 마우스에서 PC-3-LN 전립선 종양의 전체 성장을 감소시켰다.

[0229] **실시예 15. 본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 인간 전립선 육종의 전이를 억제한다.**

[0230] "본 발명의 랫트 항-AXL 항체는 누드 마우스에서 인간 전립선 육종 성장을 감소시킨다(Rat anti-AXL antibodies

of the invention reduce human prostate carcinoma growth in nude mice)" 하에 기재된 것과 동일한 실험에서, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7의 항-전이 효과를 평가하기 위해 검시 후 PC-3-LN 종양 세포의 다른 기관으로의 재국재화(relocalization)(전이)를 분석하였다. 이 목적을 위해, 검시 후 선택된 기관(간, 비장, 폐, 대퇴골, 요추의 일부)을 수집하고, 균질화시키고, 루시페린으로 보충하였다. 뒤이어, NightOWL LB 981 생물발광 이미징 시스템 (Berthold Technologies, Germany)을 이용하여 발광을 측정하였다.

[0231] 도 15는 비장의 분석에 대한 이 실험의 결과를 보여준다. 이소형 대조군 항체 1D5 대비, 본 발명의 길항적 랫트 항-AXL 항체 11B7은 비장 전이의 발생을 감소시켰다. 주목되는 것은, 이 실험에서 본 발명의 11B7의 항-전이 효과가 Sutent의 항-전이 효과보다 더 강했다는 것이다. 유사한 관찰을 간, 폐, 대퇴골, 및 요추 전이에 대해 수득하였다.

[0232] **실시예 16. AXL은 인접한 정상 조직보다 종양에서 우세하게 발현된다.**

[0233] 본 연구에서, 17개의 상이한 인간 악성 종양에서의 AXL 발현을 조직 멀티어레이 포맷(tissue multiarray format)의 포르말린-고정 파라핀-포매 조직에서 면역조직화학적으로 분석하였다. 각 종양 종류에 대해, 종양 조직 및 조화된 비-악성 조직(matching non-malignant tissue)의 쌍을 조사하였다. 요약하면, 조직을 4% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)에서 16 내지 20시간 동안 고정시키고 파라핀에 포매하였다. 60-코어 조직 마이크로어레이(tissue microarray, TMA)의 구축을 위해, 병리학자가 각 경우의 1 펀치(punch)의 건강한 조직 및 1 펀치의 상응하는 종양 조직을 선택하였다. FDA 가이드라인에 따라 정상 대조군 조직 펀치(각 조직 종류별 3개)를 갖는 96-코어 TMA를 생성하였다. 각 펀치는 직경이 1.5 mm였다.

[0234] 마이크로톰으로, 선택된 조직 블록의 2-4  $\mu$ m 절편을 절제하고, 실란화 유리 슬라이드(Sigma) 상에 배치하고, 60 °C에서 30분 동안 및 38°C에서 밤새 건조시켰다. 크실렌 조(xylene bath)에서 5분 동안 2회씩 인큐베이션시키고, 5분 동안 아세톤에서 2회 인큐베이션시키고, 최종적으로 증류수 중에 5분 동안 인큐베이션시키는 것에 의해 파라핀을 제거하였다. 절편의 열 전-처리를 스티머(steamer)에서 10 mM 시트레이트 완충액, pH 6.0에서 30분 동안 수행하고, 뒤이어 증류수에서 세척하였다. 내인성 퍼옥시다아제(endogenous peroxidase)를 새로 제조된 메탄올 중 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액과 실온에서 20분 동안 인큐베이션시키고, 뒤이어 증류수 및 PBS로 각각 5분씩 세척하는 것에 의해 블로킹시켰다. 절편을 실온에서 60분 동안 다중클론 염소 항-인간 AXL 항체(Santa Cruz SC-1096)(TBST 중 1:20 희석)와 인큐베이션시켰다. TBST에서 3회의 세척 후에, 상기 절편을 실온에서 45분 동안 비오틴화 토끼 항-염소 이차 항체(Dianova, TBST 중 1:20 희석)와 인큐베이션시켰다. 전술된 바와 같이 세척한 후에, 절편을 실온에서 30분 동안 스트렙타비딘/HRP (DAKO, TBST 중 1:300 희석)와 인큐베이션시키고, 뒤이어 전술된 바와 같이 세척하였다. 실온에서 10분 동안 DAB 용액(DAKO; 기질 용액 중 1:50 희석)으로 염색을 수행하였다. 최종적으로, 상기 슬라이드를 물로 세정하고, Harris 헤마톡실린으로 대비염색(counterstain)시키고, 유리 슬라이드로 덮었다. 대조군 절편은 항-AXL 일차 항체 대신, 염소 IgG 대조군 항체(R&D)와 인큐베이션시켰다.

[0235] 도 16은 17개의 상이한 인간 고형 종양 및 상응하는 비-악성종양 조직(A)에서 AXL 발현에 대한 이 분석의 결과를 요약한다. 각 적응증에 대해 스크리닝된 모든 케이스 중에서, 여포성 림프종, 전립선암(단일 세포에 대한 경우 제외), 및 신장암에서 현저한 발현이 검출되지 않았다. 흑색종 및 메르켈 세포 종양(Merkel cell tumor)은 AXL의 매우 낮은 발현을 보였다. 약한 발현이 폐의 일부 종양, 주로 선암종에서 관찰되었다. 식도암 및 바렛 종양(Barret tumor), 난소암, 결장암 및 췌장암, 및 간암(간세포 육종)은 약 30%의 케이스에서 약한 염색을 보였다. 두경부암은 약 40%의 종양에서 약한 염색 내지 중간 염색((weak to moderate staining)을 보였다. 약한 염색 내지 중간 염색은 분석된 유방암, 자궁경부암, 방광암, 갑상선암 및 위암의 60% 내지 100%에서 검출되었다. 가장 강한 염색은 위의 반지세포 육종(signet ring cell carcinoma)(B)에서 관찰되었다. 비-악성종양 조직은 종종 백그라운드 대비 약한 염색을 보였던 신장의 세관(tubuli)을 제외하고는 특이적 염색을 보이지 않았다.

[0236] **실시예 17: 항-AXL 항체의 구조 및 특징**

[0237] **17 A. 랫트 항체 가변 도메인의 뉴클레오타이드 서열**

[0238] 랫트 항-AXL 항체 가변 도메인을 하이브리도마 세포로부터 클로닝하였다. RNA-Extraction kit RNeasy (RNeasy midi-kit, Qiagen)를 이용하여 RNA를 제조하였다. 항체 유전자를 코딩하는 cDNA를 제조사의 설명서에 따라

5'RACE 키트 (Invitrogen)를 이용하여 제조하였다.

[0239] 요약하면, 제1 가닥 cDNA를 유전자-특이적 GSP1-프라이머 및 Superscript™ II Reverse Transcriptase를 이용하여 총 RNA로부터 합성하였다. 제1 가닥 cDNA 합성 후에, 본래의 mRNA 주형을 RNase Mix에 의한 처리에 의해 제거하였다. 그 후, cDNA의 3'-말단에 호모폴리머 테일을 결합시켰다. Taq DNA 중합효소, cDNA 분자 내에 위치한 부위에 어닐링하는 네스티드(nested), 유전자-특이적 프라이머(GSP2) 및 상기 키트에 제공된 고정 프라이머(anchor primer)를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 증폭 후에, 5' RACE 산물을 서열결정을 위해 pLXSN-ESK 벡터에 클로닝시켰다. 클로닝을 촉진하기 위해, 고정 프라이머(Anchor Primer, AP)는 SalI 에 대한 인식 서열을 포함했고, GSP2 프라이머는 XhoI 부위를 포함했다.

[0240] GSP1 프라이머:

[0241] kappa\_GSP1: GATGGATGCATTGGTGCAGC

[0242] new\_kappa\_GSP1: ATAGATACAGTTGGTGCAGC

[0243] heavy\_GSP1: CAGGGTCACCATGGAGTTA

[0244] GSP2 프라이머:

[0245] XhoI-hGSP2: CCGCTCGAGCGGGCCAGTGGATAGACAGATGG

[0246] XhoI-kGSP2: CCGCTCGAGCGGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG

[0247] 랫트 항-AXL Mab 클로닝을 위한 GSP 프라이머의 이용:

[0248] 11B7: kappa GSP1; XhoI-kGSP2

[0249] heavy GSP1; XhoI-hGSP2

[0250] 10D12: kappa\_GSP1, new\_kappa\_GSP1; XhoI-kGSP2

[0251] heavy GSP1; XhoI-hGSP2

[0252] 11D5: new\_kappa\_GSP1; XhoI-kGSP2

[0253] heavy GSP1; XhoI-hGSP2

[0254] **17 B. 랫트 항-AXL 항체 가변 도메인의 아미노산 서열**

[0255] 랫트 항체 가변 도메인 서열을 pLXSN-ESK 벡터에 클로닝된 서열결정된 유전자로부터 번역하였다. 주어진 아미노산 서열은 가변 도메인의 1번 위치부터 시작된다. 항체의 그의 표적으로의 특이적 결합을 위해 요구되는 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR)은 Kabat (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, 1991)에 따라 정의된다. Kabat 정의는 가변 도메인 내 서열 가변성(sequence variability)에 기초한다. 항체의 항-AXL 특이적 CDR 영역이 서열번호 13 내지 30으로 열거된다. 개별적인 CDR은 하기 위치를 포함한다:

[0256] CDR-L1: 24-34

[0257] CDR-L2: 50-56

[0258] CDR-L3: 89-97

[0259] CDR-H1: 31-35b

[0260] CDR-H2: 50-65

[0261] CDR-H3: 95-102

[0262] **17 C 랫트 항체 발현 및 정제:**

[0263] 하이브리도마를 4.5g/L 글루코오스; 1% 글루타민, 1% 피루베이트, 1% Pen/Strep을 함유한 DMEM을 이용하여 37°C, 5-7% CO<sub>2</sub>에서 Celline CL 1000 생물반응기(bioreactor) (Integra Biosciences)에서 배양하였다. FCS 보충은 영양 구획(nutrient compartment)의 경우, 1 % FCS이고, 세포 구획의 경우, 5 % low IgG FCS이었다. 회수



및 배지 교환은 주당 2회 수행하였다. 세포 성장에 따라 세포 분리(cell splitting)를 1/1에서 1/3으로 수행하였다(1/1 → 1/3). 생산성을 SDS-PAGE 분석을 통해 주당 1회 테스트하였다. 상층액을 정제시까지 -20℃에서 보관하였다. 진행 중인 배양(running culture)의 마이코플라스마(mycoplasma) 테스트를 주당 1회 수행하였다.

[0264] Akta Explorer 100 System (GE-Healthcare)를 통해 단백질 A 또는 G 세파로오스 FF(GE-Healthcare)를 이용하여 항체를 정제하였다. 각 정제를 위해 컬럼을 개별적으로 충전시켰다. 컬럼 크기를 예상되는 생산성 및 각 회분(batch)의 규모(통상적으로 50 내지 500 mg)에 맞추었다. 단백질 함유 용액을 가능한 경우 얼음 또는 4℃에서 유지시켰다. 전 과정에서 멸균된 완충액 및 2차 증류수(double distilled water)를 이용하였다.

[0265] 상층액을 해동시키고, 50 mM TRIS pH 8.5로 완충시키고, 원심분리시키고, 0.22  $\mu$ m 막을 통해 여과시키고 컬럼에 적재하였다. 8 컬럼 부피(column volume, CV)의 50 mM PO<sub>4</sub>, pH8.5에 의해 세척한 후, 항체를 10 CV의 100 mM 글리신, pH 3.3 내에서 용리시켰다. 1/5 1M Tris pH 8.0 (4ml 용리물 분획 당 1 ml Tris)을 첨가하는 것에 의해 용리물 분획을 즉시 중성 pH까지 재완충시키고, 뒤이어 rSDS-PAGE에 의해 분석하였다. 순수한 항체를 함유한 분획을 모으고, 4℃에서 PBS에 대해 투석시키고, 멸균 여과시켰다.

[0266] 완충 시스템 요건은 각 항체의 개별적인 특징에 따라 조정된다. 특히, 랫트 IgG2a 항체 11D5를 ProteinG 4 FF 매트릭스(GE-Healthcare)에 결합시키고, 고염 조건 (2M NaCl) 하에 세척하였다. 랫트 항체 IgG1 11B7을 11D5에 따른 고염 조건 하에 rProteinA (GE-Healthcare)를 통해 정제하였다. 항체 용리를 pH 5.5에서 수행하였다. 랫트 항체 정제를 위한 유속은 증가된 결합 효율을 위해 낮게 유지시켜야 한다.

[0267] 제2 정제 단계로서, 이온교환 크로마토그래피(개별적인, 적합한 조건 하에) 또는 제조용 크기 배제 크로마토그래피(preparative size exclusion chromatography)(PBS, pH 7.4)가 이용될 수 있다.

[0268] 정제된 항체의 품질 관리를 위한 표준 프로토콜은 하기를 포함한다:

[0269] - rSDS-PAGE 겔 분석; 쿠마시(Coomassie) 또는 은 염색

[0270] - BCA 테스트(Pierce #23227 BCA Protein Assay Kit; 랫트 IgG 표준 #31233)

[0271] - 분석용 크기 배제(Superdex 200 Tricorn 10/300 GL, ~250 mg in 250  $\mu$ l; 0.5 ml/min, Akta Explorer 100)

[0272] - 내독소(endotoxin) 테스트(LAL, Cambrex QCL-1000®)

Chromogenic LAL Endpoint Assay # US50-648U)

[0273] - 세포 기반 활성 분석법(FACS 결합; pAkt; pAXL)

[0274] 정제된 항체는 무균 조건 하에 그들의 안정성에 따라 4℃ 또는 -20℃에서 PBS, pH 7.4 중에 보관한다.

#### [0275] 17 D. FACS 스캐차드(scatchard)에 의한 항체 친화도 결정

[0276] 인간 AXL 과다발현 NIH3T3 세포를 PBS 중의 10 mM EDTA와의 인큐베이션에 의해 회수하고 FACS 완충액(PBS pH 7.4, 3% FCS, 0.1% NaN<sub>3</sub>) ml 당 6백만개의 세포로 재현탁시켰다. 둥근-바닥 마이크로타이터 플레이트에, 100  $\mu$ l의 세포 현탁액을 FACS 완충액 중 40 내지 0.002  $\mu$ g/ml의 농도(266 내지 0.01 nM)의 항체 11B7, 11D5, ch11B7-IgG2 또는 ch11D5-IgG2를 함유한 100 $\mu$ l의 항체 용액에 첨가하였다. 얼음 상에서 2시간 동안 항체 결합을 진행시켰다. 그 후, 세포들을 웰 당 250  $\mu$ l FACS 완충액으로 2회 세척하고, FACS 완충액에 1:50으로 희석된 200 $\mu$ l의 이차 항체(항-랫트-PE; Jackson)에 재현탁시켰다. 45분의 인큐베이션 후에, 세포들을 다시 FACS 완충액에서 2회 세척하고, FACS 분석을 위해 500 ml PBS에 재현탁시켰다. Beckman-Coulter FACS FC500에서 분석을 수행하였다. 겉보기 친화도 상수(apparent affinity constant) K<sub>Dapp</sub>를 결정하기 위해, 평균 형광 값을 평균 형광과 상응하는 항체 농도([M])의 비에 대해 플롯팅하였다. 직선의 기울기 역수로부터 수득된 계산된 K<sub>Dapp</sub>가 하기에 열거된다:

표 3

[0277]

클론	K <sub>D</sub> 값(nM)
11B7	0.38
ch11B7-IgG2	0.6
11D5	0.81
Ch11D5-IgG2	0.9

[0278] **18. 랫트 항-AXL 항체의 키메라화:**

[0279] 인간 카파 경쇄 및 중쇄 IgG1/2 유전자를 지원자의 말초혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 하기에 기재된 바와 같이 클로닝하였다:

[0280] 전혈로부터 PBMC를 준비하였다. 혈액을 실온에서 10 U/ml 헤파린을 포함한 PBS/ 2 mM EDTA에, 1/2, 5 희석시키고, 정량 펌프(diaphragm)(35 ml/튜브)에 의해 15 ml Bicol1 용액[Biocol1 from Biochrom # L6115] 상에 적층시켰다. 시료를 실온에서 400xg로 30분 동안 원심분리시키고, 혈청(~ 15 ml)을 버렸다. PBMC를 포함하는 인터페이스를 파스퇴르 피펫(Pasteur pipette)을 이용하여 조심스럽게 회수했다. PBMC를 PBS/2 mM EDTA (1차 세척 100ml, 2차 세척 50 ml)로 2회 세척하고, 300xg에서 10분 동안 스피ن 다운시켰다. 세포 펠렛을 RPMI/ 10% FCS (25 ml)에 재현탁시키고  $5.5 \times 10^7$  개의 PBMC를 수득했다.

[0281] 제조사의 설명서에 따라, Qiagen (# 75142)의 RNeasy kit를 이용하여 PBMC로부터 RNA를 준비하였다. 정제된 RNA (30  $\mu$ g)를 분량씩 -80°C에 보관하였다.

[0282] 항체 IgG 감마 1과 2 및 카파 사슬에 대한 cDNA를 분리된 RNA로부터 하기의 프라이머를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 Superscript III Reverse Transkriptase (invitrogen # 18080 - 93)를 이용한 RT-PCR에 의해 제조하였다:

[0283] 1) RT-gamma: GCG TGT AGT GGT TGT GCA GAG

[0284] 2) RT-gamma2: GGG CTT GCC GGC CGT G

[0285] 3) RT-kappa: TGG AAC TGA GGA GCA GGT GG

[0286] 4) 5'B1p: AGA TAA GCT TTG CTC AGC GTC CAC CAA GGG CCC ATC GGT

[0287] 5) 3'Bam(GAG): AGA TGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G

[0288] 6) 5'Bsi: AGA TAA GCT TCG TAC GGT GGC TGC ACC ATC TGT CTT CAT

[0289] 7) 3'Bam(CTT): AGA TGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC TCT

[0290] 프라이머를 100  $\mu$ M로 용해시켰다. 각각 2pmol 올리고 RT $\gamma$  및 RT $\kappa$ 를 이용하고, 1  $\mu$ g RNA, 10 mM dNTP mix를 첨가하여 RT-PCR을 수행하고 65°C에서 5분 동안 가열하였다. 4 $\mu$ l의 제1 가닥 완충액, 1  $\mu$ l 0.1 M DTT, 1  $\mu$ l RNase 억제제(40 U/ $\mu$ l Fermentas # E00311) 및 2  $\mu$ l Superscript III RT를 첨가하고, 혼합하고, 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 뒤이어 70 °C에서 15분 동안의 열 불활성화 단계를 수행했다.

[0291] 2 $\mu$ l의 제1 가닥 반응액을 항체 불변 도메인의 이중가닥 DNA를 생성하기 위해 Taq 중합효소(Eurochrom # EME010001)를 이용한 제2 단계 PCR을 위해 이용하였다. 하기의 PCR 조건을 이용하여,  $\gamma$ -사슬을 증폭하기 위해 프라이머 5'B1p 및 3'Bam(GAG)를 이용하고,  $\kappa$ -사슬 불변 영역을 증폭하기 위해 5'Bsi 및 3'Bam(CTT)를 이용하였다:.

[0292]  $\kappa$ -사슬 증폭:

[0293] 94°C 120 초;

[0294] 94°C 30 초,

[0295] 55°C 30 초, 및

[0296] 72°C 45 초의 사이클 35회;

[0297] 72°C 10 분.

[0298]  $\gamma$ -사슬 증폭:

[0299] 94°C 120 초;

[0300] 94°C 30 초,

- [0301] 45℃ 30 초, 및
- [0302] 72℃ 60 초의 사이클 5회;
- [0303] 94 ℃ 30 초,
- [0304] 50 ℃ 30 초, 및
- [0305] 72 ℃ 60 초의 사이클 35회;
- [0306] 72℃ 10 분.
- [0307] PCR 산물을 TAE 완충된 2% 아가로오스 겔 상에서 분석하였다. 카파 경쇄에 대한 ~350 bp의 단일 밴드 및 중쇄  $\gamma$  1 및  $\gamma$  2에 대한 ~ 1000 bp의 단일 밴드를 확인했다. PCR 산물을 제조사의 설명서에 따라, Qiagen 겔 추출 키트 (QIAGEN, #28784)에 의해 정제하였다. PCR 단편을 pcDNA3 벡터 (Invitrogen)의 다중 클로닝 부위에 클로닝 하기 위해, pcDNA3 벡터 및 PCR 단편을 HindIII (5') 및 BamHI (3') 제한효소로 처리하였다. 제한효소 인식 부위는 PCR 프라이머 내에 코딩되었다. 제한효소로 처리된(digested) 단편을 Qiagen PCR 정제 키트 (QIAGEN, 28104)를 이용하여 정제하고,  $\gamma$  1,  $\gamma$  2 및  $\kappa$  사슬을 코딩하는 DNA를 16℃에서 밤새 T4 DNA 리가아제를 이용하여 pcDNA3 벡터에 라이게이션시켰다. 리가아제를 65℃에서 10분 동안 불활성화시켰다. 라이게이션된 DNA 플라스미드를 표준 프로토콜을 이용하여 직접  $\text{CaCl}_2$  적격(competent) 대장균에 형질전환시키고, 암피실린-함유 LB-플레이트에 플레이팅하였다. 37℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 단일 콜로니를 채취하고, 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ 에 현탁시키고, (5  $\mu\text{l}$  현탁된 세포, Taq 폴리머라아제,  $\gamma$  1/ $\gamma$  2에 대한 프라이머 5B1p 및 3Bam(GAG)  $\gamma$  1/ $\gamma$  2 and  $\kappa$  콜로니에 대한 5Bsi and 3Bam(CTT) 프라이머)PCR에 의해 개별적인 항체 사슬을 포함한다는 것을 확인했다:
- [0308] 94℃ 120 초;
- [0309] 94℃ 30 초,
- [0310] 55℃ 30 초, 및
- [0311] 72℃ 60 초의 사이클 35회;
- [0312] 72℃ 10 분.
- [0313] 시료를 1.5% 아가로오스 겔 상에서 PCR 산물에 대해 분석하였다. 항체 유전자 함유 콜로니를 선택하여 5 ml LB/암피실린 배지에 접종하였다. 37℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 대장균을 회수하고, Qiagen 미니프렙(miniprep) 키트(QIAGEN, # 12123)를 이용하여, DNA를 준비하였다. 대조군 처리물(control digest) (HindIII, BamHI)은 예상되는 크기에서 모든  $\kappa$  및  $\gamma$  사슬 유전자 삽입물을 보였다; Medigenomix에서 DNA 서열결정에 의해 서열을 확인했다.
- [0314] 랫트 가변 도메인을 pLXSN-ESK 벡터로부터 PCR에 의해 증폭하고, g1/g2 및  $\kappa$  pcDNA3 벡터에 클로닝하여 키메라 전장 항체를 생성했다. 가변 VL 도메인을 5' 말단에 HindIII 및 BsmI 부위를 포함하고, 3' 말단에 BsiWI 부위를 갖는, 하기의 프라이머를 이용하여 증폭시켰다:
- [0315] VL-11B7-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GGC TCC
- [0316] VL-11B7-3': AGA TCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TGC CTC
- [0317] VL-11D5-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA CAT CCA GAT GAC CCA GTC TCC ATC
- [0318] VL-11D5-3': AGA TCG TAC GTT TCA GCT TGG TCC CAG
- [0319] 가변VH 도메인을 5' 말단에 HindIII 및 BsmI 부위를 포함하고, 3' 말단에 B1pI 부위를 갖는, 하기의 프라이머를 이용하여 증폭시켰다:
- [0320] VH-11B7/11D5-5': AGA TAA GCT TGT GCA TTC CGA GGT GCA GCT TCA GGA GTC AGG
- [0321] VH-11B7/11D5-3': AGA TGC TGA GCT GAC AGT GAC CAT GAC TCC TTG GCC
- [0322] 경쇄를 위한 BsiWI 및 중쇄를 위한 B1pI은 가변 도메인 유전자의 3' 말단과 직접 융합을 가능하게 하기 위해, 불변 영역의 5' 말단에 단일 부위를 갖는다.
- [0323] pLNOH2 벡터 (Norderhaug et. al. J. Immunol. Methods 204, 1997; Neuberger EMBO J. 1983; 2 (8): 1373-

8,1983)로부터 유래된 리더 서열 서열번호 69에 융합된, 키메라 항체 사슬을 코딩하는 유전자의 재조합 발현을 위해 pCEP 벡터 시스템에 클로닝하였다. 경쇄 유전자를 NheI (5') 및 XhoI (3')에서 pCEP4 (Invitrogen)에 클로닝하고, 중쇄 유전자를 KpnI (5') 및 XhoI (3')에서 pCP-Pu (Kohfeld FEBS Vol 414; (3) 557ff, 1997)에 클로닝하였다.

[0324] 20x20 cm 플레이트에 접종된 HEK 293 세포를 일시적 발현을 위한 표준  $\text{CaPO}_4$  형질감염 방법을 이용하여 경쇄 및 중쇄 유전자를 코딩하는 각각의 플라스미드 1  $\mu\text{g}/\text{mF}$ 로 동시에 형질전환시켰다. 배양 조건은 5% low IgG FCS, 1% 피루베이트, 1% 글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM/F12 고 글루코오스 배지에서 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 였다. 24시간 후에, 형질감염 배지를 신선한 배지로 교체하였다. 약 3주 동안 2 내지 3일 간격으로 상층액을 수집하였다. 1 ml Hitrap rProtein A 컬럼(GE-Healthcare)을 이용하여 랫트 항체 정제에 대해 기재된 표준 완충액 조건(적재(loading): 50 mM Tris; pH=8.5, 세척: 50mM  $\text{PO}_4$ ; pH= 8.5, 용리: 100mM 글리신; pH 3,3)에서 약 600 ml의 상층액으로부터 키메라 항체를 정제하였다.

# [0325] 실시예 19. 랫트 항-AXL 항체 가변 도메인의 인간화

[0326] 키메라 항체의 랫트 가변 영역을 면역글로불린 도메인에 대한 BLAST 검색을 통해 단백질 수준에서 인간 항체 생식계통(germline) 서열에 비교하였다. 동일한 CDR 루프 길이도 갖는, V-유전자 내 가장 근접한 인간 대응물을 확인하였다. 연관된 D 및 J 세그먼트를 유사한 분석에서 랫트 서열에 대한 상동성에 따라 V-BASE 데이터베이스(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)로부터 선택하였다.

[0327] 11B7 및 11D5 항체의 랫트 가변 도메인에 대해, 하기의 조화되는(befitting) 인간 생식계통 서열(V1 D 및 J 세그먼트)을 발견하고 인간 프레임워크로 정의하였다:

[0328] VL11B7hum: V $\kappa$ 1-O12 + J $\kappa$ 1

[0329] VH11B7hum: VH4-59 + D4-4 (관독 프레임 3) + JH4

[0330] VL11D5hum: V $\kappa$ 1-L1 + J $\kappa$ 4

[0331] VH11D5hum: VH4-59 + D4-4 (관독 프레임 3) + JH4

[0332] 인간화 가변 도메인에 대한 리더 서열(leader sequence)은 선택된 바와 같은 연관된 생식계통 V-유전자 서열로부터 채택하였다. 항-AXL 항체 hum11B7 및 hum11D5의 최종 인간화 버전을 수득하기 위해, Kabat(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, 1991)에 따라 정의된 랫트 항-AXL 항체의 CDR 잔기들을 항-AXL 특이성을 위해 인간 생식계통 프레임워크에 이식시켰다.

[0333] 인간화 항-AXL 항체 hum11B7 및 hum11D5의 단백질 서열은 하기와 같다:

[0334] 단백질 서열을 DNA 서열로 역 번역하였다. DNA 서열을 Kazusa-Codon-Usage 데이터베이스를 이용하여 포유동물 세포에서의 재조합 발현을 위해 CODON 최적화시켰다. 결과적으로 수득된 인간화 항-AXL 항체에 대한 DNA 서열은 하기와 같다:

[0335] 인간화 항-AXL 항체를 코딩하는 최적화된 DNA 서열을 중첩 올리고뉴클레오타이드(overlapping oligonucleotide)에 근거한 PCR-방법에 의해 합성하였다.

[0336] 키메라 항체 구조물 pCEP4\_ch11B7k1의 플라스미드를 이용하여 VL-유전자를 pCEP4 벡터에 클로닝시켰다. 클로닝 부위는 상기 인간화 항체의 합성된 유전자에 이미 포함된 NheI (5') 및 BsiWI (3')였다. VH 유전자를 KpnI (5') 및 B1pI (3')을 제한효소 인식 부위로 이용하여 상응하는 키메라 중쇄 벡터 pCEP-PU\_ch11B7g1에 클로닝시켰다. 독일 마르틴스리에드(Martinsried)에 있는 Eurofins Medigenomix GmbH에서, DNA 최적화, 유전자 합성, 클로닝 및 서열 확인을 수행하였다.

[0337]

# [0338] 실시예 20. 본 발명의 랫트 및 키메라 항-Ax1 항체는 인 비트로에서 유사한 정도까지 리간드-유도 Ax1 인산화를 억제한다.

[0339] 랫트 항-Ax1 항체 11B7 및 11D5의 키메라 유도체를 본 발명의 일부로서 제조하였다(하기 참조). 본 발명의 랫트 항-Ax1 항체 및 본 발명의 상응하는 키메라 항-Ax1 항체가 인 비트로에서 유사한 정도까지 리간드 Gas6-매개

Ax1 활성화를 억제할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, CaSki 자궁경부암 세포에 대한 ELISA 실험을 수행하였다. Gas6-매개 Ax1 활성화를 증가된 수용체 티로신 인산화에 의해 검출하였다. 요약하면, 1일 차에, 웰 당  $3 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥 96-웰 플레이트에 담긴 정상 성장 배지에 접종하였다. 다음날, 세포들을 밤새 24시간 동안 굶기기 위해, 성장 배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 또한, 밤새, 블랙 Maxi-Sorp 96 웰 플레이트(Nunc)를 4℃에서 2  $\mu\text{g/ml}$  PBS의 마우스 항-포스포-티로신 항체 4G10으로 코팅하였다. 3일 차에, 상기 4G105 항체 용액을 제거하고, Maxi-Sorp 웰을 실온에서 4시간 이상 동안 PBS, 0.5% BSA로 블록킹시켰다. 동시에, 세포들을 37℃에서 1시간 동안, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 및 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 랫트 항-Ax1 항체 11B7 또는 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7과 인큐베이션시키고, 37℃에서 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 10분 동안 처리하였다. 그 후, 배지를 제거하고, 세포들을 포스페이트 및 프로테아제 억제제(10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오리드, 1 mM 오르토바나테이트, 1 mM NaF, 및 0.5% 아프로티닌)가 보충된 용해 완충액(50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% 글리세린, 및 1% Triton X-100)에서 얼음 상에서 30분 동안 용해시켰다. 한편, 블록킹 완충액을 제거하고, Maxi-Sorp 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.05% Tween 20)으로 6회 세척하고, 그 후, 용해물을 옮기고, 밤새 4℃에서 인큐베이션시켰다. 4일 차에, 플레이트를 용해 완충액으로 6회 세척한 후, 웰을 실온에서 2시간 동안 0.5  $\mu\text{g/ml}$  PBS의 비오틴화 랫트 항-Ax1 항체 12B7과 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척 완충액으로 6회 세척하고 PBS 중에 1:4,000으로 희석된 AP-접합 스트렙타비딘(Chemicon #SA110)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 웰을 세척 완충액으로 6회 세척하고, AttoPhos 기질 용액(Roche #11681982)을 첨가하였다. Victor 플레이트 판독기(Perkin Elmer)를 이용하여, 430 nm의 여기 파장(excitation wavelength) 및 580 nm의 발광 파장에서 각 웰의 형광을 수집하였다.

[0340]

도 17은 자궁경부암 세포주 CaSki에 대한 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 상대적 Ax1 인산화의 농도-의존적 감소에 의해 나타난 바와 같이, 본 발명의 랫트 항-Ax1 항체 11B7 (A) 및 본 발명의 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7 (B)는 유사한 정도까지 수용체 티로신 키나아제 Ax1의 리간드-의존적 활성화를 차단할 수 있었다. 동일한 실험 설정을 적용하여 유사한 결과가 흑색종 세포주 C-8161에서 관찰되었다.

[0341]

**실시예 21. 본 발명의 랫트 및 키메라 항-Ax1 항체는 인 비트로에서 유사한 정도까지 리간드-유도 p42/p44 MAP-키나아제 인산화를 억제한다.**

[0342]

본 발명의 랫트 항-Ax1 항체 및 본 발명의 상응하는 키메라 항-Ax1 항체가 CaSki 자궁경부암 세포에서 유사한 정도까지 p42/p44 MAP-키나아제의 Gas6-매개 활성화를 억제할 수 있는지 여부를 추가적으로 확인하기 위해, ELISA 실험을 수행하였다. 이때, Gas6-유도 p42/p44 MAP-키나아제 활성화는 증가된 단백질(Thr202/Tyr204) 인산화에 의해 검출하였다. 요약하면, 1일 차에, 웰 당  $2 \times 10^4$  개의 세포를 편평-바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다. 다음날, 세포들을 24시간 동안 굶기기 위해, 성장 배지를 무혈청 배지로 교체하였다. 그 후, 세포들을 37℃에서 50 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 750 ng/ml, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 및 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 랫트 항-Ax1 항체 11B7 또는 키메라 항-Ax1 항체 ch11B7와 1시간 동안 전-인큐베이션시키고, 37℃에서 10분 동안 400 ng/ml Gas6 (R&D Systems)의 존재 또는 부재 하에 처리하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS (pH 7.5) 중 4% 포름알데히드로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. 포름알데히드 용액을 제거하고 세포들을 세척 완충액(PBS, 0.1% Tween 20)으로 2회 세척하였다. 세포들을 세척 완충액 중 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1%  $\text{NaN}_3$ 로 퀀칭시키고 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 퀀칭 용액을 제거하고, 세포들을 세척 완충액으로 2회 세척하고 PBS, 0.5% BSA로 4℃에서 4시간 동안 블록킹시켰다. PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5 mM EDTA 중에 1:1000으로 희석된 항-포스포-p42/p44 MAP 키나아제(Thr202/Tyr204) 일차 항체(다중클론 토끼; Cell Signaling #9101)를 4℃에서 밤새 첨가하였다. 4일 차에, 항체 용액을 제거하고 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후, PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 5 mM EDTA 중에 1:2,500으로 희석된 HRP-접합 항-토끼 이차 항체(Dianova #111-036-045)를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 각각 5분씩 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 테트라메틸벤지딘(TMB, Calbiochem)을 첨가하고 620 nm에서 모니터링하였다. 반응을 100  $\mu\text{l}$ 의 250 nM HCl의 첨가에 의해 중단시키고 Vmax 플레이트 판독기 (Thermo Lab Systems)를 이용하여 620 nm의 참조 파장으로, 450 nm에서 흡광도를 판독하였다.

[0343]

도 18은 이 실험의 대표적 결과를 보여준다. 본 발명의 랫트 항-Ax1 11B7(A) 및 본 발명의 키메라 항-Ax1 항체 11B7(B)은 상대적 p42/p44 MAP-키나아제 인산화의 농도-의존적 감소에 의해 나타난 바와 같이, CaSki 자궁경부



암 세포에서 유사한 정도까지 p42/p44 MAP-키나아제의 Gas6-유도 인산화를 차단할 수 있었다.

[0344] **실시예 22. 본 발명의 랫트 항-Axl 항체는 인 비트로에서 약물 내성을 극복하기 위해 화학요법제와 상승적으로 작용한다.**

[0345] 본 발명의 랫트 항-Axl 항체가 혈청을 공급하지 않은 NIH3T3-Axl cl.7 섬유모세포의 Gas6-매개 항-아포토시스를 방해하는 것으로 입증되었기 때문에, 길항적 항-Axl 항체가 아포토시스의 유도에서 화학요법제와 상승적으로 작용하고, 그에 의해 약물 내성을 극복하는데 기여하는지의 문제가 제기되었다. 본 실시예에서, NCI/ADR-RES (최초 명칭 MCF-7/AdrR) 세포 -독소루비신(Fairchild et al., 1987, Cancer Research, 47, 5141-5148; Xu et al., 2002, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302, 963-971)을 포함한 여러 작용제에 대해 높은 수준의 내성을 보이는 난소암 세포주(Liscovitch and Ravid, 2007, Cancer Letters, 245, 350-352) -를 길항적 항-Axl 항체 11B7 및/또는 독소루비신과 인큐베이션시키고, TUNEL 염색에 의해 아포토시스 비율을 결정하였다. 요약하면, 정상 성장 배지 중의  $3 \times 10^4$  개의 NCI/ADR-RES 세포를 37°C에서 동일한 배지와 1시간 동안 전-인큐베이션시킨 8-웰 배양 슬라이드 (BD Falcon, cat# 354118)의 각 웰에 접종하였다. 다음날 아침, 정상 성장 배지를 제거하고, 세포들을 저혈청(0.5% FCS) 배지로 세척하고, 상기 저혈청 배지에서 배양하였다. 그날 저녁에, 이소형 대조군 항체 1D5 또는 길항적 항-Axl 항체 11B7을 각각 10 µg/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 3일 차 아침에, 100 µM, 150 µM, 또는 200 µM 최종 농도의 독소루비신을 첨가하고, 세포들을 37°C에서 인큐베이션시켰다. 24시간 후에, 세포들을 PBS로 1회 세척하고, 실온에서 PBS (pH 7.5) 중의 4% 포름알데히드로 20분 동안 고정시키고, 5분 동안 자연건조시키고, -20°C에 보관하였다. 시판되는 Fluorescein-FragEL™ 키트 (Oncogene, cat# QIA39, presently being distributed through Merck-Calbiochem)를 이용하여, 제조사의 설명서 (chapter 'Fluorescein-FragEL™ of cell preparations fixed on slides', page 10)에 따라 TUNEL 염색을 수행하였다. 형광 현미경을 적용하여, 세포들을 분석하고, 사진을 촬영하였다.

[0346] 도 19는 본 실험의 대표적 결과를 보여준다. 세포들이 대조군 항체 또는 길항적 항-Axl 항체 11B7과 함께 인큐베이션되었는지 여부에 관계없이, 100 µM의 독소루비신으로 처리된 NCI/ADR-RES 난소암 세포에서 NEL 염색이 관찰되지 않았고, 따라서, 아포토시스가 관찰되지 않았다(상단). 그러나, 150 µM의 독소루비신 농도에서, 대조군 항체와 함께 처리된 세포에서 매우 약한 아포토시스만이 관찰되었으나, 길항적 항-Axl 항체 11B7과의 동시-인큐베이션(co-incubation)은 아포토시스의 상당한 유도를 가져왔다(중간). 또한, 200 µM의 독소루비신의 존재 시, 세포와 11B7의 동시-인큐베이션은 대조군 IgG 항체와 인큐베이션된 세포에 비해 유의성 있게 아포토시스 비율을 증가시켜서(하단), 다중 약물-내성 세포를 화학요법제 및 본 발명의 길항적 항-Axl 항체로 병용-처리하는 것이 약물 내성을 극복하기 위해 적합할 수 있다는 것을 보여주었다.

[0347] **실시예 23. 본 발명의 랫트 항-Axl 항체는 인 비트로에서 고정-비의존적 콜로니 성장을 감소시키기 위해 화학요법제와 상승적으로 작용한다.**

[0348] 본 발명의 항-Axl 항체가 단독으로 또는 화학요법제와 조합되어 고정(anchorage)-비의존적 세포 성장을 억제할 수 있는 능력을 조사하기 위해 소프트 아가 분석법을 수행하였다. 소프트 아가 콜로니 형성(soft agar colony formation) 분석법은 형질전환된 세포만이 소프트 아가에서 성장할 수 있기 때문에, 형질전환된 세포를 테스트하는 표준 인 비트로 분석법이다.

[0349] 요약하면, 750 C-8161 흑색종 세포를 미처리 상태로 두거나 또는 37°C에서 30분 동안 IDMD 배지(Gibco) 중의 15 µg/ml의 길항적 랫트 항-Axl 항체 11B7과 전-인큐베이션시켰다. 그 후, 세포들을 Difco 아가 용액과 혼합하여 각각 아가, FCS, 및 11B7의 농도가 0.35%, 0.2%, 및 7.5 µg/ml인 50 µl의 탑 아가(top agar) 세포 현탁액을 생성했다. 이 세포 현탁액을 20% FCS를 함유한 0.7% 아가로오스 하부 층(bottom layer) 50 µl의 상부에 플레이팅하고, 최종적으로 0.2% FCS 및 부합되는 농도의 시스플라틴을 포함하는 공급층(feeding layer) 용액 50 µl로 뒤덮었다. 시료 당 총 150 µl에서, 11B7 및 시스플라틴의 최종 농도는 각각 2.5 µg/ml 및 1.5 µM, 1.0 µM, 0.75 µM, 0.5 µM, 또는 0.25 µM이었다. 5일 동안 콜로니를 형성시키고, 그 후, 37°C에서 3시간 동안 50 µl MTT (Sigma, PBS 중 1 mg/ml)로 염색하였다. HTS Bonit 콜로니 형성 소프트웨어(Lemnatec, Wuerselen)와 연결된 Scanalyzer HTS 카메라 시스템을 이용하여, 시스플라틴의 부재 또는 존재 하에, 길항적 랫트 항-Axl 항체 11B7의 효과를 3회 반복하여(triplicate) 분석하였다.

[0350] 도 20은 본 실험의 대표적 결과를 보여준다. 제시된 데이터는 콜로니의 전체 면적을 나타내며 측정된 절대 수치

(A) 및 시스플라틴 및/또는 길항적 랫트 항-Ax1 항체 11B7에 의해 발휘된 상대적 성장 억제(B)를 반영한다. 미처리 대조군 세포 대비, 시스플라틴과의 인큐베이션은 투여량-의존적 방식으로 콜로니 성장 지연을 초래했다. 30% 범위의 11B7 단독의 억제 효과와 일치하게, 길항적 항-Ax1 항체 11B7과의 조합은 특히, 시스플라틴의 보다 낮은 농도에서 C-8161 흑색종 세포의 소프트 아가 성장에 대한 시스플라틴의 유의성있게 강화된 억제 효과를 가져왔다.

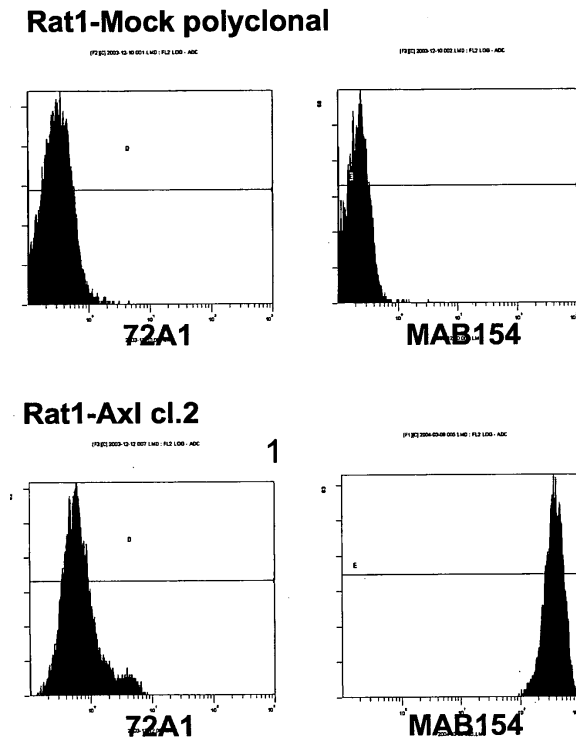
[0351] **실시예 24. 본 발명의 랫트 항-Ax1 항체는 종양-관련 현상을 감소시키기 위해 항-신생물제와 상승적으로 작용한다.**

[0352] 이전의 실시예에서, 난소암 세포주 NCI/ADR-RES와 같은 다중 약물-내성 암세포에서 아포토시스를 유도하고 약물 내성을 극복하는 것과 관련하여 독소루비신과 병용-투여된 본 발명의 길항적 항-Ax1 항체의 상승적 효과를 관찰하였다. 또한, 본 발명의 길항적 항-Ax1 항체와 시스플라틴의 고정-비의존적 콜로니 성장의 감소에서의 조합 효과가 흑색종 세포주 C-8161에서 검출되었다. 따라서, 암 세포 또는 암 질환을 앓는 환자가 방사선 조사 및/또는 하나 이상의 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 특히, 흑색종 세포 또는 흑색종을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 시스플라틴, 다카르바진, 테모졸로미드/테모달, 무포란/포테무스틴, 파클리탁셀, 또는 도세탁셀을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 또한, 난소암 세포 또는 난소암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 독소루비신, 시스플라틴, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 멜팔란, 알트레타민, 토포테칸, 이포스파미드, 에토포시드, 또는 5-플루오로우라실을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 추가적으로, 전립선암 세포 또는 전립선암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 미토잔트론, 독소루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 또는 빈블라스틴을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 또한, 위암(gastric/stomach cancer) 세포 또는 위암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 5-플루오로우라실, 미토마이신 C, 시스플라틴, 독소루비신, 메토타렉세이트, 에토포시드, 류코보린(leucovorin), 에피루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 또는 이리노테칸을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 또한, 유방암 세포 또는 유방암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 독소루비신, 에피루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 겐시타빈, 카페시타빈, 비노렐빈, 또는 트라스투주마브를 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 또한, 자궁경부암 세포 또는 자궁경부암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 시스플라틴, 이포스파미드, 이리노테칸, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 도세탁셀, 겐시타빈, 또는 토포테칸을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신생물제와 조합된 길항적 항-Ax1 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아포토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다. 마지막으로, 그러나 다른 종양 종류들을 배제하지 않으면서, 폐암 세포 또는 폐암을 앓는 환자가 방사선조사 및/또는 바람직하게는, 시스플라틴, 카르보플라틴, 독소루비신, 파클리탁셀, 도세탁셀, 에토포시드, 비노렐빈, 빈크리스틴, 이포스파미드, 겐시타빈,

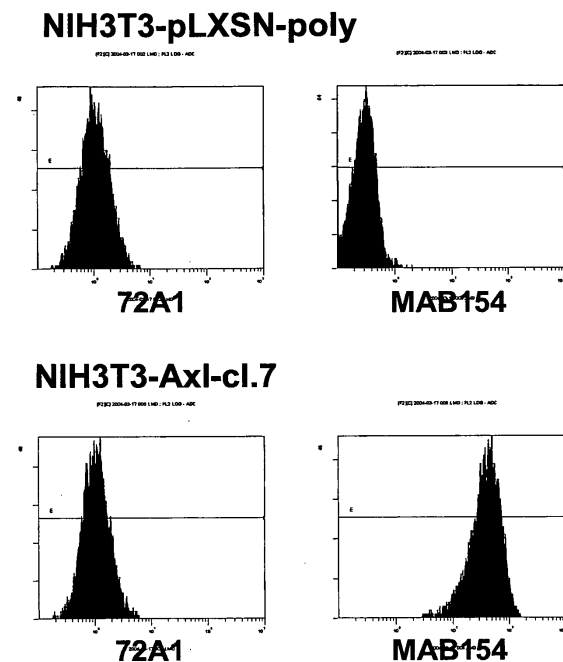
메토트렉세이트, 시클로포스파미드, 로무스틴, 또는 토포테칸을 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가적인 항-신 생물제와 조합된 길항적 항-Axl 항체에 의해 처리되는 경우, 종양 세포의 아폽토시스의 유도 및/또는 약물 내성의 극복, 종양 세포 생존 저해, 종양 세포 성장 및/또는 증식 억제, 종양 세포 이동, 확산 및 전이 감소, 또는 종양 혈관형성의 손상에서 상승적 효과가 기대된다.

## 도면

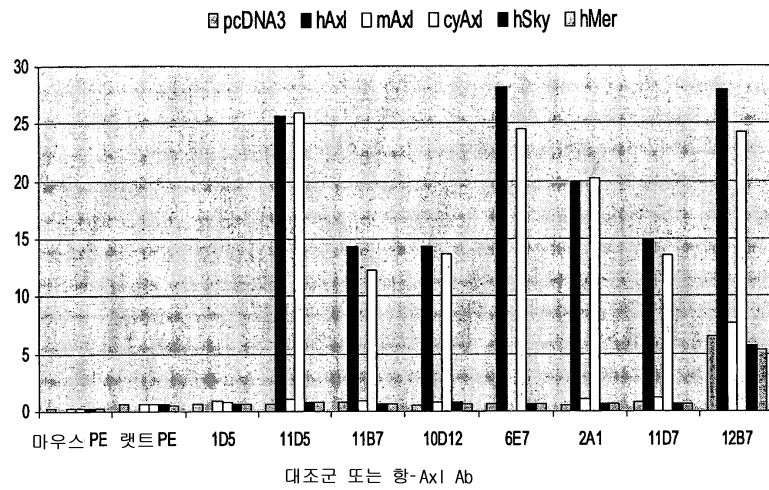
### 도면1



### 도면2

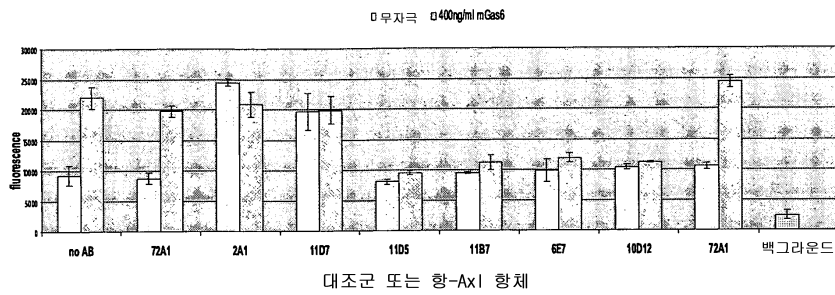


### 도면3

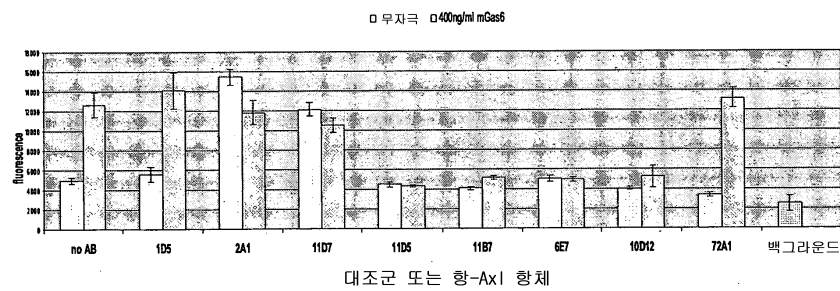


### 도면4

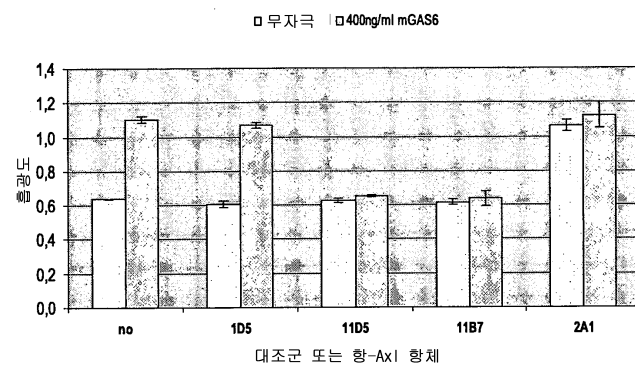
#### A NIH3T3-Axl cl.7



#### B NCI-H292



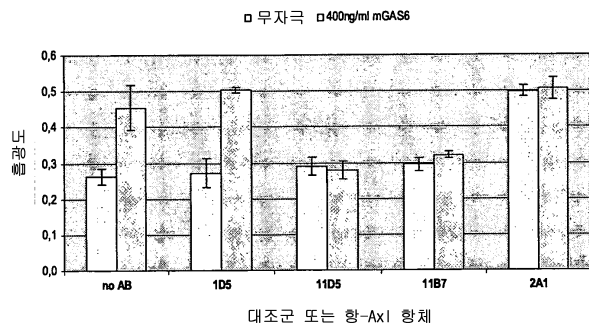
### 도면5



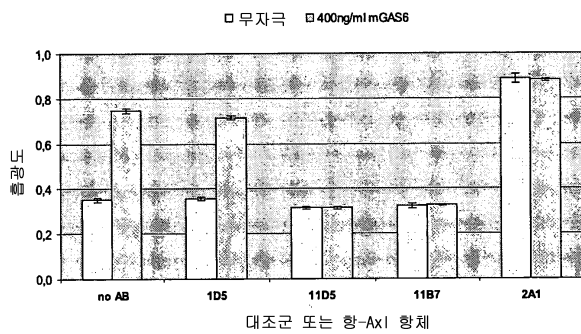


도면6

A NIH3T3-Axl cl.7

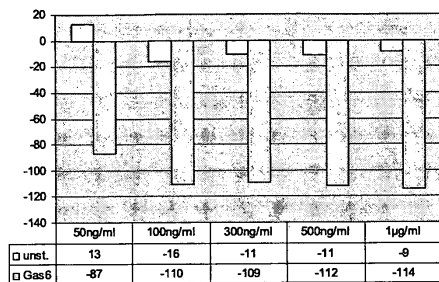


B CaLu-1

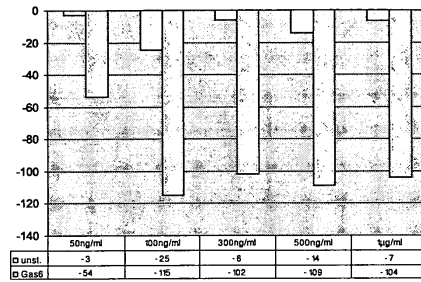


도면7

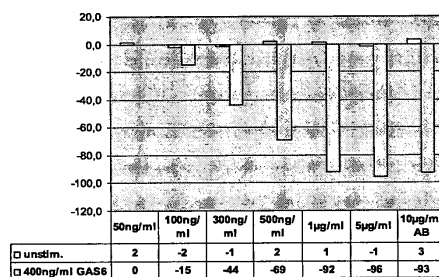
11B7 (rlgG2a)



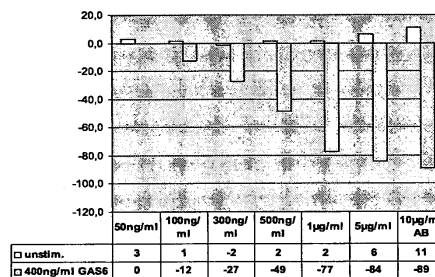
ch11B7 (hlgG2)



11D5 (rlgG2a)

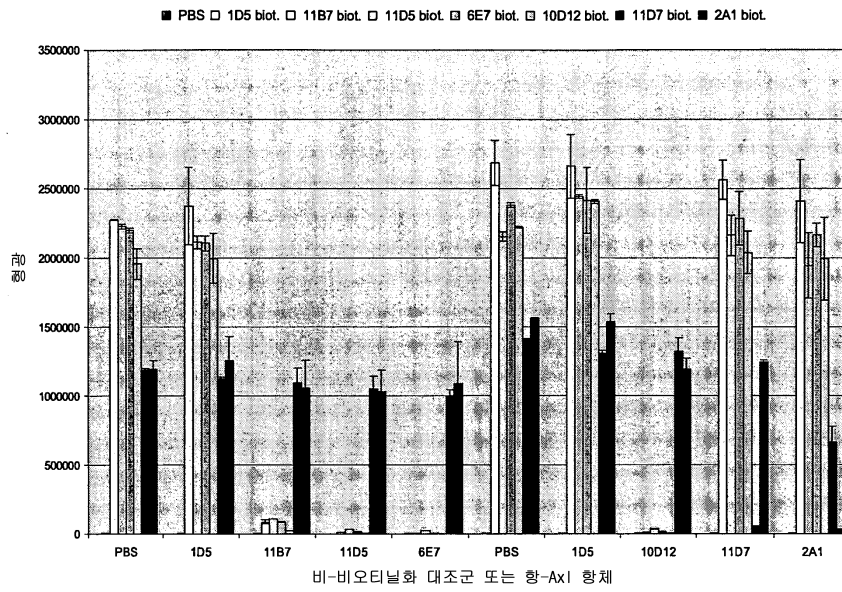


ch11D5 (hlgG2)

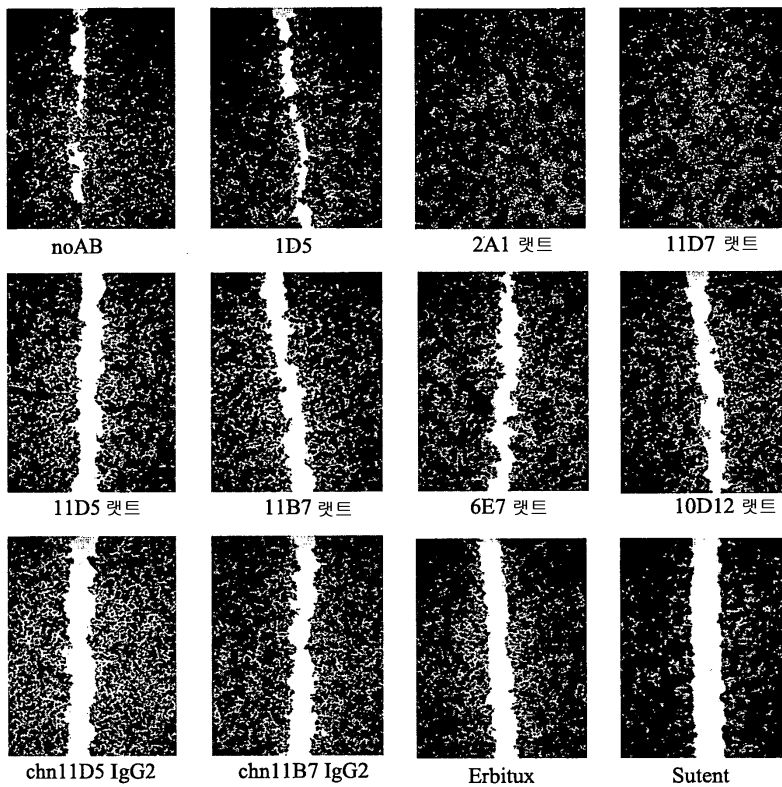




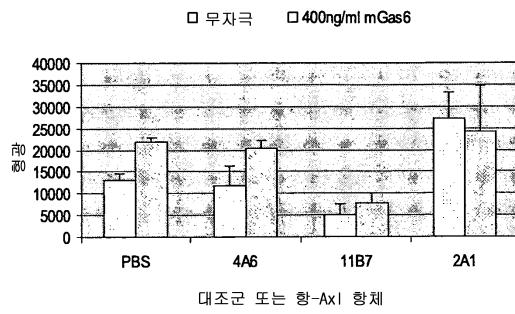
도면8



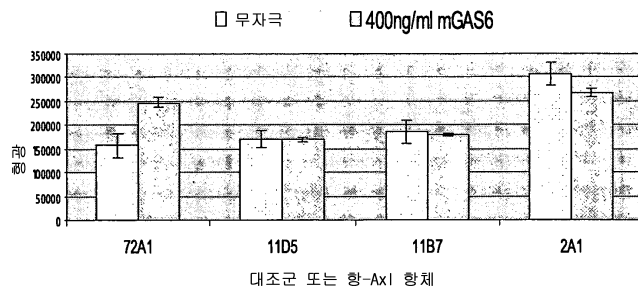
도면9



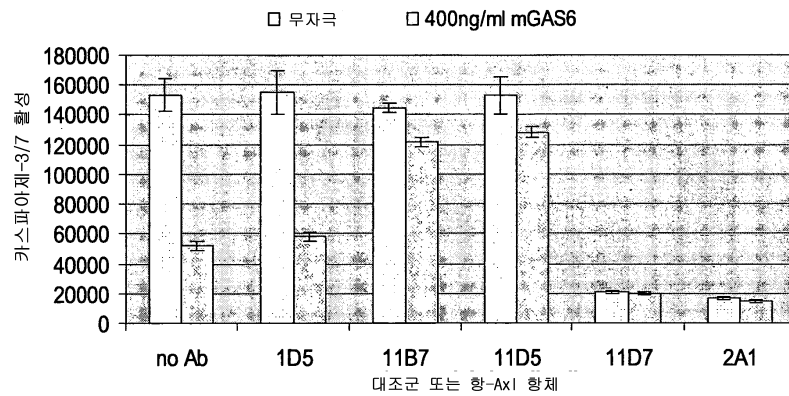
도면10



도면11

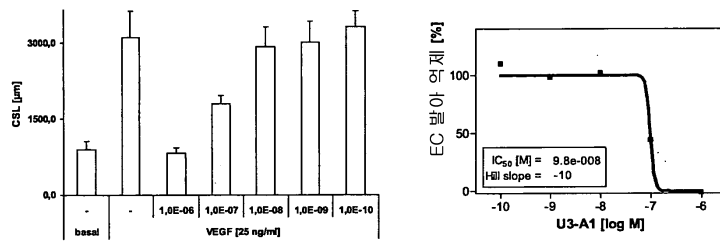


도면12

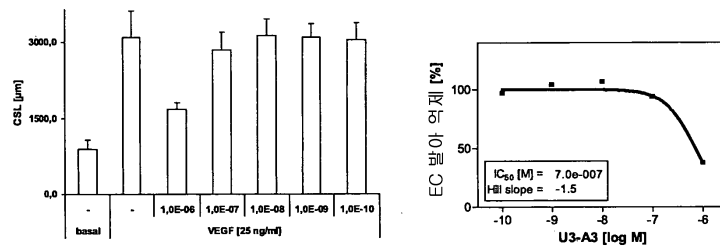


도면13

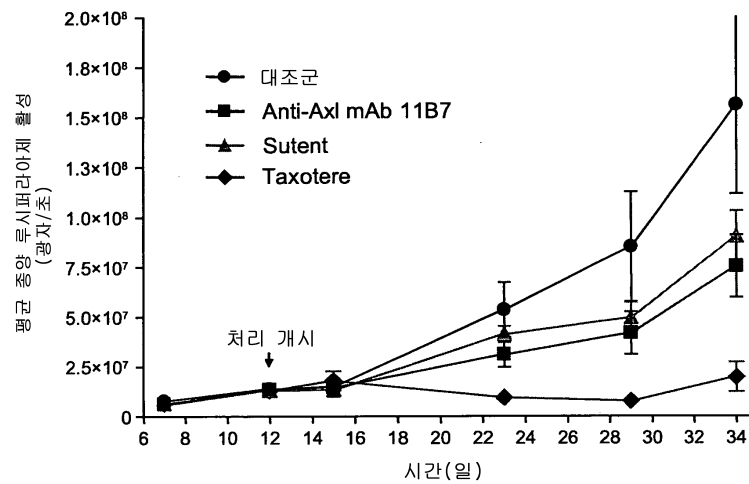
A 11B7



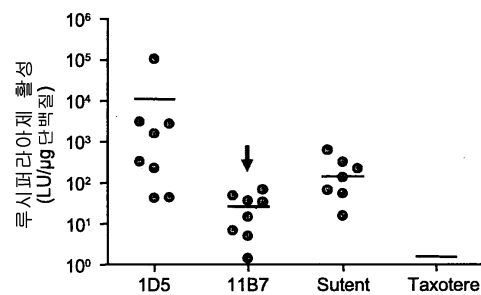
B 11D5



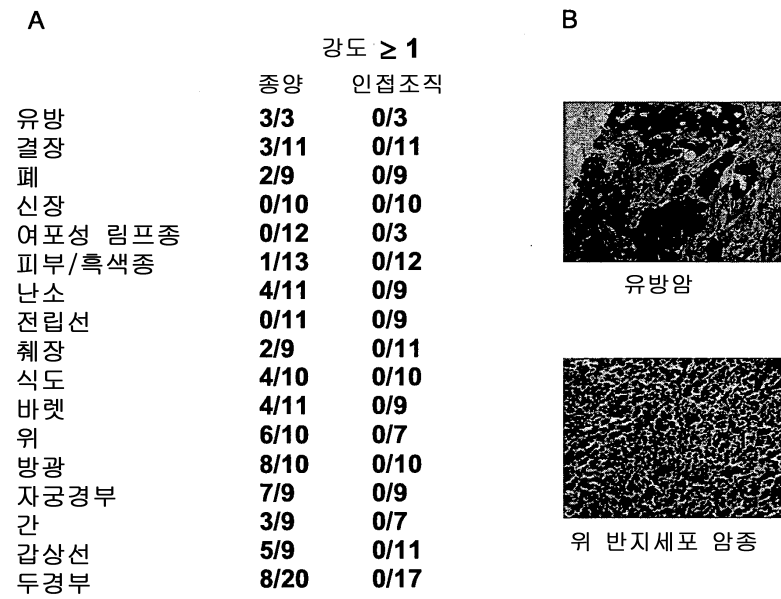
도면14



도면15

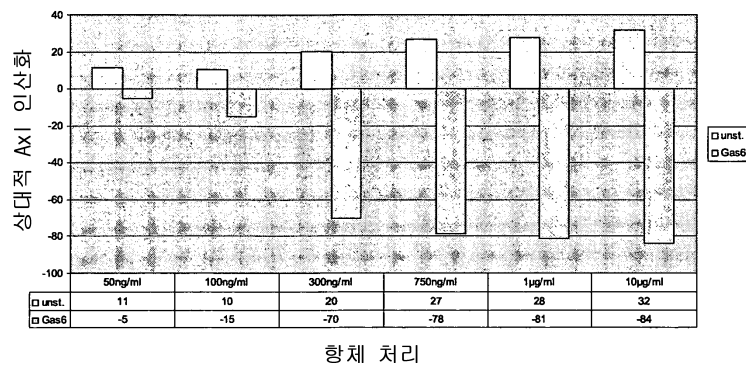


도면16

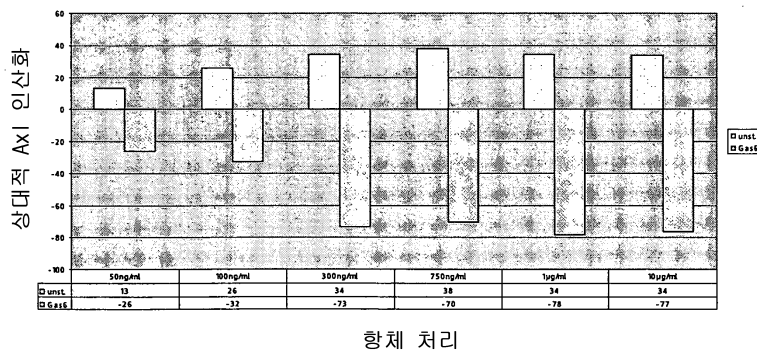


도면17

**A** 11B7 (rlgG1)

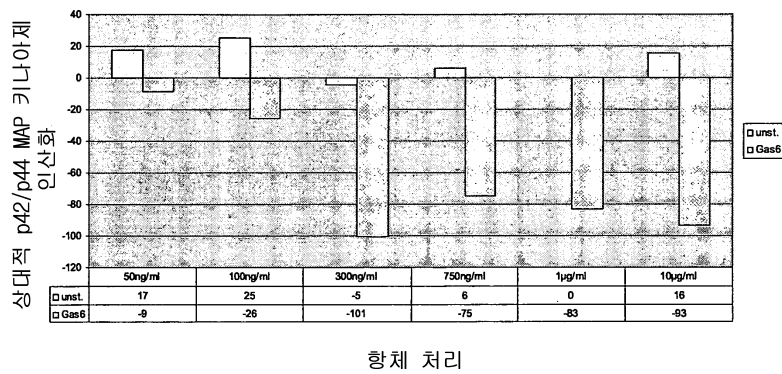


**B** ch11B7 (hlG1)

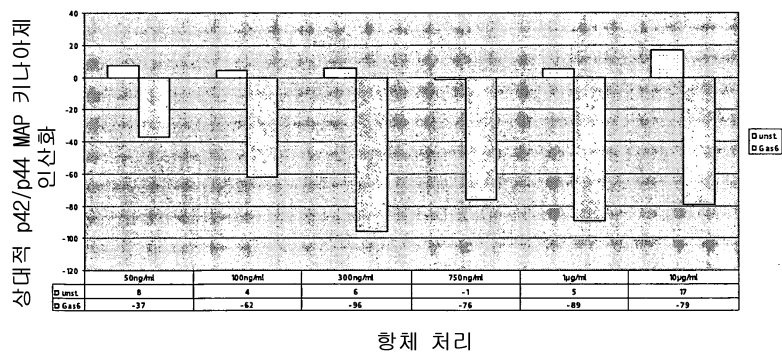


도면18

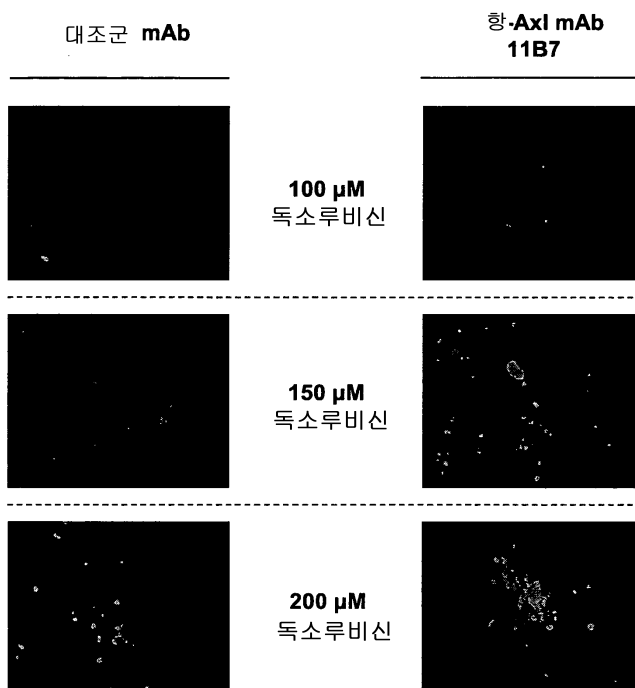
**A** 11B7 (rlgG1)



**B** ch11B7 (hlgG1)

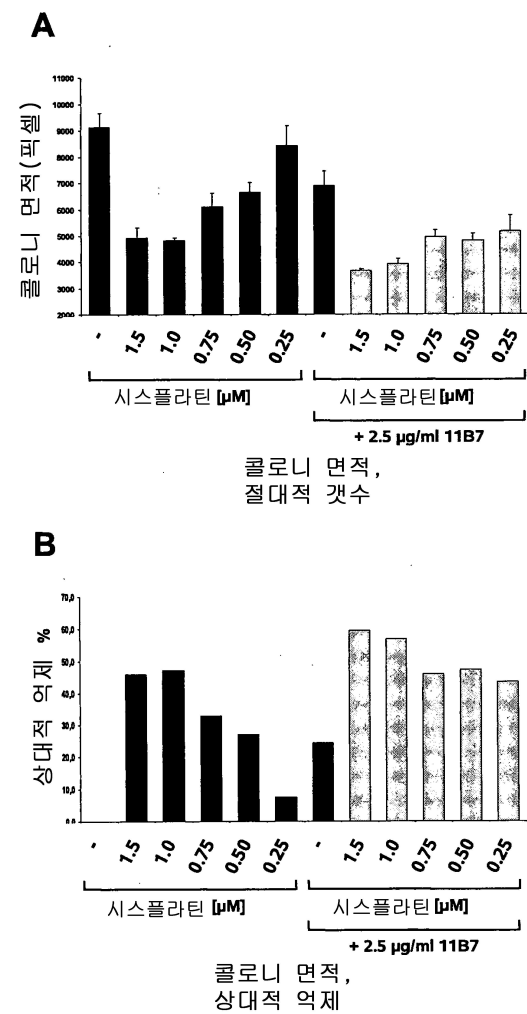


도면19





도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> U3 Pharma AG

<120> AXL antibodies

<130> 41800P WO

<140> PCT/EP2008/009548

<141> 2008-11-12

<160> 84

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-11B7-VLkappa-clone 33

<400> 1

gacatccaga tgaccaggc tccatcttcc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact	60
attacttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg	120
gggaaatctc ctaggccttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct	240
gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttgac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggagctgaa acgg	324

<210> 2

<211> 338

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-11B7-VH-clone 20

<400> 2

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc	60
actgttctgt cactggttac tccatcata gtaattactg gggctggatc cggaagtcc	120
caggagataa aatggagtgg atgggataca taacctacag tggtagcact agctacaacc	180
catctctcaa aagtcgaatc tccattacta gagacacatc gaagaatcag ttcttctctgc	240
agttgaactc tgtaacttct gaggacacag ccacatatta ctgtgctata acaacctttt	300
attactgggg ccaaggagtc atggtcactg tctctca	338

<210> 3

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-11D5-VLkappa-clone 10

<400> 3

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc atgtctacat ctctgggaga cagagtcact	60
attacttgcc gggcaagtca agacattgga aattatttaa gctggttcca acagaaagta	120
gggaaatctc ctaggcgtat gatttatggt gcaatcaagt tggcagttgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gaagtaggtc tggatcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct	240
gaagatatgg cgatctatta ctgtctacag tatatacagt ttccgctcac gttcggttct	300
gggaccaagc tggagctgaa acgg	324

<210> 4

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-11D5-VH-clone 66

<400> 4

gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc	60
acctgttctg tctactggta ttccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc	120
ccaggaaata aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat	180
ccatctctca aaagtcgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcttg	240
cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttt	300
gattactggg gccaaaggagt catggtcaca gtctcgtca	339

<210> 5

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-10D12-VLkappa-clone 8

<400> 5

gacatccaga tgaccaggc tccatcttc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact	60
attgcttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg	120
gggaaatctc ctaggcttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctcgga ccatcagcag cctggagtct	240
gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttgga gttcgggtgga	300
ggcaccaagc tggagctgaa acgg	324

<210> 6

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Rat-10D12-VH-clone 5

<400> 6

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaagc cctcacagtc actctccctc	60
acctgctctg tcaccggta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc	120

ccaggaaata aaatggagtg gatgggatac ataaccaaca gtggtggcac tgcctacaac 180

ccatctctca aaagtcaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcctg 240

caattgaact ctgtaattcc tgaggactca gccacatact tctgttcaag aaccccctgg 300

gactggggcc aaggagtcac ggtcacagtc tcctca 336

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AXL antibody amino acid sequence Rat-11B7-VLkappa-clone 33

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Met Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp

85 90 95

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

100 105

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AXL amino acid sequence Rat-11B7-VH-clone 20

<400> 8

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asp Lys Met Glu Trp Met  
35 40 45

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

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

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

Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AXL antibody amino acid sequence Rat-11D5-VLkappa-clone 10

<400> 9

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Val Gly Lys Ser Pro Arg Arg Met Ile  
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu



85

90

95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100

105

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AXL antibody amino acid sequence Rat-11D5-VH-clone 66

<400> 10

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

1

5

10

15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn

20

25

30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Lys Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> AXL antibody amino acid sequence Rat-10D12-VLkappa-clone 8

<400> 11

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

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

                  100                    105  
<210> 12  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> AXL antibody amino acid sequence      Rat-10D12-VH-clone 5  
<400> 12

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

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

100 105 110

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 light chain CDR 1

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 light chain CDR 2

<400> 14

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 light chain CDR 3

<400> 15

Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 heavy chain CDR 1

<400> 16

Ser Asn Tyr Trp Gly

1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 heavy chain CDR 2

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 heavy chain CDR 3

<400> 18

Thr Thr Phe Tyr Tyr

1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 light chain CDR 1

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 light chain CDR 2

<400> 20

Gly Ala Ile Lys Leu Ala Val

1 5

<210> 21

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 light chain CDR 3

<400> 21

Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 heavy chain CDR 1

<400> 22

Ser Asn Tyr Trp Gly

1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 heavy chain CDR 2

<400> 23

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

1 5 10 15

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 heavy chain CDR 3

<400> 24

Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 25

<211> 11



<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 light chain CDR 1

<400> 25

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 light chain CDR2

<400> 26

Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 light chain CDR3

<400> 27

Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 heavy chain CDR1

<400> 28

Ser Asn Tyr Trp Gly

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 heavy chain CDR2

<400> 29

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

1 5 10 15

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 10D12 heavy chain CDR3

<400> 30

Thr Pro Trp Asp

1

<210> 31

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ch11B7k

<400> 31

gacatccaga tgacccaggc tccatcttcc ctgcctgcat ctctgggaga cagagtcact 60

attacttgcc gggcaagcca agacattgga aattatttaa gatggttcca gcagaaaccg 120

gggaaatctc ctaggcttat gatttctggt gcaaccaact tggcagctgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct 240

gaagatatgg cagactatta ctgtctacag tctaaagagt ccccttggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 32

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ch11B7g1

<400> 32

gaggtgcagc ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc	60
acctgttctg tcaactggta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagtcc	120
ccaggagata aaatggagtg gatgggatac ataacctaca gtggtagcac tagctacaac	180
ccatctctca aaagtgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gtcttctctg	240
cagttgaact ctgttaactc tgaggacaca gccacatatt actgtgctat aacaaccttt	300
tattactggg gccaaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg	360
gtcttccccc tggcacccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc	420
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc	480
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc	540
gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac	600
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac	660
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc	720
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg	780
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagt	900
cgctctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagg caaggtctcc	960
aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1020
gaaccacagg tgtacacct gcccctatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	1080
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1200
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct	1320
ccgggtaaat ga	1332

<210> 33

<211> 1320

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ch11B7g2

<400> 33

gaggtgcagc ttccaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60  
 acctgttctg tccatgggta ctccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120  
 ccaggagata aaatggagtg gatgggatac ataacctaca gtggtagcac tagctacaac 180

ccatctctca aaagtgaat ctccattact agagacacat cgaagaatca gttcttcttg 240  
 cagttgaact ctgtaacttc tgaggacaca gccacatatt actgtgctat aacaaccttt 300  
 tattactggg gccaaaggag catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360  
 gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc 420  
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc 480  
 agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540  
 gtggtgaccg tgcctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac 600

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca 660  
 ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 720  
 gacacctca tgatctcccg gacctctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac 780  
 gaagacccc aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 840  
 acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcacggtt 900  
 gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaaggcctc 960  
 ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agcccccaga accacaggtg 1020

tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080  
 gtcaaaggct tctacccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140  
 aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1200  
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1260  
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1320

<210> 34  
 <211> 645  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> ch11D5k  
 <400> 34

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc atgtctacat ctctgggaga cagagtcacc 60

attacttgcc gggcaagtca agacattgga aattatttaa gctggttcca acagaaagta 120  
 gggaaatctc ctaggcgtat gatttatggt gcaatcaagt tggcagttgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gaagtaggtc tggatcagat tattctctga ccatcagcag cctggagtct 240  
 gaagatatgg cgatctatta ctgtctacag tatatacagt ttccgctcac gttegggtct 300  
 gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcac ctccccgcca 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645  
 <210> 35  
 <211> 1332  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> ch11D5g1  
 <400> 35  
 gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60  
 acctgttctg tcaactggta ttccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagtcc 120  
 ccaggaataa aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat 180  
  
 ccatctctca aaagtcgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcctg 240  
 cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttt 300  
 gattactggg gccaaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360  
 gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 420  
 ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 480  
 agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540  
 gtggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600  
  
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 660  
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 720  
 ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 780  
 gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840  
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 900  
 gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 960  
 aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020



gaaccacagg tgiacacct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1080  
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140  
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggtccttc 1200  
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260  
tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320  
ccgggtaaat ga 1332

<210> 36  
<211> 1320  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220>  
><223> ch11D5g2  
<400> 36

gaggtgcaac ttcaggagtc aggacctggc cttgtgaaac cctcacagtc actctccctc 60  
acctgttctg tcaactggta ttccatcact agtaattact ggggctggat ccggaagttc 120  
ccaggaaata aaatggagtg gattggacac ataaccaaca gtggtaacac tacctacaat 180  
ccatctctca aaagtgaat ctccattagt agagacacat cgaggaatca gttcttcctg 240  
cagttgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcaaa aggagcgttt 300  
gattactggg gccaaaggagt catggtcact gtcagctcag cgtccaccaa gggcccatcg 360  
gtcttcccc tggcgcctg ctccaggagc acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc 420

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc 480  
agcggcgtgc acacattccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540  
gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac 600  
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca 660  
ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccc aaacccaag 720  
gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac 780  
gaagacccc aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatccaag 840

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt 900  
gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaaggcctc 960  
ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg 1020  
tacacctgc ccccatccc ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080  
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140  
aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1200

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1260

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1320

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11B7 LC kappa

<400> 37

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Met Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Lys Glu Ser Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 38  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> 11B7-HCgamma1  
 <400> 38  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn  
 20 25 30  
 Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asp Lys Met Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu  
 65 70 75 80  
  
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Ile Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser  
 100 105 110  
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 115 120 125  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
 130 135 140  
  
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

	165		170		175
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	180		185		190
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	195		200		205
Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
	210		215		220
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
225		230		235	240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
	245		250		255
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
	260		265		270
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	275		280		285
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
	290		295		300
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
305		310		315	320
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
	325		330		335
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
	340		345		350
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
	355		360		365
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
	370		375		380
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
385		390		395	400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
	405		410		415

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 39  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Artificial  
<220><223> 11B7 HC gamma2  
<400> 39

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

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

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

130 135 140  
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
145 150 155 160  
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln  
180 185 190

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

Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



420                      425                      430  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435  
 <210> 40  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> 11D5 LC kappa  
 <400> 40  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly  
  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr  
 20                      25                      30  
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Val Gly Lys Ser Pro Arg Arg Met Ile  
 35                      40                      45  
 Tyr Gly Ala Ile Lys Leu Ala Val Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50                      55                      60  
 Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser  
  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Met Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ile Gln Phe Pro Leu  
 85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100                      105                      110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115                      120                      125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
  
 130                      135                      140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                      150                      155                      160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165                      170                      175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190  
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205  
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 41

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 HC gamma1

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn

20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415  
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

420 425 430  
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 42

<211> 439

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 11D5 HC gamma2

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asn

20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Met Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln  
180 185 190

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

Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

405 410 415

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

420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

<210> 43

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hum11B7-VLk

<400> 43

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

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

50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ala Gly Val Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 44

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hum11B7-VH



<400> 44

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Thr Thr Phe Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

115 120 125

Thr Val Ser Ser

130

<210> 45

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hum11D5-VH

<400> 45

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly His Ile Thr Asn Ser Gly Asn Thr Thr Tyr Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95  
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 115 120 125  
 Thr Val Ser Ser  
 130  
 <210> 46

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Hum11D5-VLk

<400> 46

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

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

Tyr Ile Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

	115	120	125
Lys			
<210>	47		
<211>	427		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Hum11B7-VLk		
<400>	47		
aattaaagc tagcaagctt gccaccatgg atatgctgt acctgcacag ctgttaggac	60		
tgcttctgct ctggcttagg ggagcaagat gcgacatcca gatgactcag agcccaagct	120		
ccttgtctgc cagtgtgggt gatagggatca ccataacctg tcgagcttca caggatatcg	180		
gcaactacct acgtgggtat cagcagaaac cgggcaaagc cccaaagctg ctgactctatg	240		
gcgccaccaa tctggctgct ggtgttcct ctcggttcag tgggtctgga tcaggcacag	300		
acttcacact caccatttcc agcctccaac cggaggactt tgcgacgtac tactgcttgc	360		
agtccaagga atccccctgg acatttgggc aagggaactaa ggtggagatt aagcgtacga	420		
attaaaa	427		
<210>	48		
<211>	429		
<212>	DNA		
<213>	Artificial		
<220><223>	Hum11B7-VH		
<400>	48		
aattaaggta ccaagcttgc caccatgaag cacctctggt tctttctcct gctagtggct	60		
gctcctcgct ggggtgttag ccaggttcag ttgcaggaat ctggaccagg actggicaaa	120		
ccctctgaga cactgtcact gacatgcact gtgtcagggt gctccatttc ctccaactat	180		
tggggctgga ttcggcaacc tccgggaaaa gggcttgagt ggataggcta catcacctat	240		
tctgggagta cctcctacaa tcccagtcct aagagcaggg tgactatcag cgtagacacc	300		
tccaagaacc agtttagcct caagctgagt tctgtgactg cagcggtatc agccgtctac	360		
tattgtgcca gaaccacgtt ctactattgg ggtcagggca cattagtcac cgtagctca	420		
gcgaattaa	429		

<210> 49

<211> 427

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hum11D5-VLk

<400> 49

aattaaaagc tagcaagctt gccaccatgg atatgcgct cttagcccaa ctactcggtc 60

tgcttctgtt gtgctttcca ggagccaggt gtgacatcca gatgacacag tcccctagta 120

gcctgtctgc gtctgtaggc gatcgagtga ccattacctg cagagcttcc caggatattg 180

gcaactatct gagctggttt cagcagaaac caggcaaagc acccaagagt ctcatctatg 240

gggccatcaa gctcgctgtt ggtgtgcctt cacggttttc cggatctggg tcaggcacag 300

acttcactct gaccatttcc agccttcaac cggaagactt cgcaacgtac tactgtctgc 360

agtacatcca gttccccttg actttcggtg gagggacaaa ggtggagata aagcgtacga 420

attaaaa 427

<210> 50

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Hum11D5-VH

<400> 50

aattaaggta ccaagcttgc caccatgaag catctgtggt tctttctgct gcttgtggct 60

gtctctaggt ggggtgtaag ccaggttcag ctccaggaat ctggtcccgg attggtgaaa 120

ccgagtgaga ctctatccct gacatgcacc gttagtggag gcagtatctc tagcaactat 180

tggggctgga ttcggcaacc acctggtgag ggccttgagt ggattgggca catcaccaac 240

tctgggaata ccacctaca tccctccctg aaatcacgcg tcacgataag cgtggacact 300

tccaagaacc agttctccct caagctctca agcgtcacag cagcggatac agccgtatac 360

tactgtgcaa gaggggcctt tgactattgg ggacagggca cattggtgac tgtcagctca 420

gcgaattaa 429

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer kappa\_GSP1

<400> 51

gatggatgca ttggtgcagc

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer new\_kappa\_GSP1

<400> 52

atagatacag ttggtgcagc

20

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer heavy\_GSP1

<400> 53

cagggtcacc atggagtta

19

<210> 54

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer XhoI-hGSP2

<400> 54

ccgctcgagc ggccgtttca gctccagctt gg

32

<210> 55

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer XhoI-hGSP2

<400> 55

ccgctcgagc gggccagtgg atagacagat gg

32

<210> 56

<211> 21

<212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer RT-gamma  
 <400> 56  
 gcgtgtagtg gttgtgcaga g 21  
 <210> 57  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer RT-gamma2  
 <400> 57  
 gggcttgccg gccgtg 16  
 <210> 58  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer RT-kappa  
 <400> 58  
 tggaactgag gagcaggtgg 20  
  
 <210> 59  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer 5' B1p  
 <400> 59  
 agataagctt tgetcagcgt ccaccaaggg cccatcgg 39  
 <210> 60  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer 3' Bam(GAG)  
 <400> 60  
 agatggatcc tcatttaccg ggagacaggg agag 34  
 <210> 61



<211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer 5' Bsi:  
 <400> 61  
 agataagctt cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcat 39

<210> 62  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer 3' Bam(CTT)  
 <400> 62  
 agatggatcc ctaacactct cccctgttga agctct 36

<210> 63  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer VL-11B7-5'  
 <400> 63  
 agataagctt gtgcattccg acatccagat gaccaggct cc 42

<210> 64  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer VL-11B7-3'  
 <400> 64  
 agatcgtacg tttcagctcc agcttggtgc ctc 33

<210> 65  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer VL-11D5-5'  
 <400> 65

agataagctt gtgcattccg acatccagat gaccagctt ccatc 45

<210> 66

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer VL-11D5-3'

<400> 66

agatcgtacg tttcagcttg gtcccag 27

<210> 67

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer VH-11B7/11D5-5'

<400> 67

agataagctt gtgcattccg aggtgcagct tcaggagtca gg 42

<210> 68

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer VH-11B7/11D5-3'

<400> 68

agatgctgag ctgacagtga ccatgactcc ttggcc 36

<210> 69

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer MOUSE1

<400> 69

gcgaattcgc caccatgggc aggtgccgc tggcctg 37

<210> 70

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer MOUSE2

<400> 70  
cagccgaggt ataggctgtc acagacacag tcag 34

<210> 71  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer MOUSE3  
<400> 71  
gcaccctgtt aggtaccgg ctggcatatc 30  
<210> 72  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer MOUSE4  
<400> 72  
ataagaatgc ggccgctcag gctccgtcct cctgccctg 39  
<210> 73  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer CYN01  
<400> 73  
aattcgccac catggcgtgg cggtgcccga g 31  
<210> 74  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial  
<220><223> primer CYN02  
<400> 74  
ctctgacctc gtgcagatgg caatcttcat c 31  
<210> 75  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer CYN03

<400> 75

gtggccgctg cctgtgtcct catc 24

<210> 76

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer CYN04

<400> 76

ataagaatgc ggccgctcag gcaccatcct cctgccctg 39

<210> 77

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer MER1

<400> 77

cggaattcgc caccatgggg ccggccccgc tgccgc 36

<210> 78

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> MER2

<400> 78

tcggttgcca ttctggccaa cttcc 25

<210> 79

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> primer SKY1

<400> 79

cggaattcgc caccatggcg ctgaggcgga gc 32

<210> 80

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> primer SKY2  
 <400> 80  
 gccctcgagc taacagctac tgtgtggcag tag 33  
 <210> 81  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220><223> leader sequence  
 <400> 81  
 atgggtgaca atgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtgcattc c 51  
 <210> 82  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220><223> leader sequence  
 <400> 82  
 Met Gly Asp Asn Asp Ile His Phe Ala Phe Leu Ser Thr Gly Val His  
 1 5 10 15  
 Ser  
 <210> 83  
 <211> 2682  
 <212> DNA  
 <213> Macaca fascicularis  
 <400> 83  
 atggcgtggc ggtgccccag gatgggcagg gtcccgtgg cctggtgctt ggcgctgtgc 60  
 ggctgggtgt gcatggcccc caggggcaca caggctgaag aaagtccttt cgtgggtaac 120  
 ccaggaata tcacaggtgc ccggggactc acgggcaccc ttcggtgtca gctccaggtt 180  
 cagggagagc cccccaggt acactggctt cgggacggac agatcctgga gtcgcggac 240  
 agtaccaga cccaggtgcc cctgggtgaa gatgagcagg atgactggat agtggtcagc 300

cagctcagaa tcgcctccct acagctttcc gacgcgggac agtaccagtg tttggtgttt 360

ctgggacatc agaacttcgt gtcccagcct ggctacgtag ggctggaggg cttaccttac 420

ttcctggagg agcctgagga caggactgtg gccgccaaca cccctttcaa cctgagctgc 480

caagcccagg gacccccaga gccctgggac ctactctggc tccaggatgc tgtccccctg 540

gccacagctc caggctcatgg tccccagcgc aacctgcatg ttccagggtc gaacaagaca 600

tcctctttct cctgcgaagc ccataacgcc aaggagtgca ccacatcccg cacggccacc 660

atcacagtgc tccccagca gcccgtaac ctccatctgg tctcccgcca acccacggag 720

ctggaggtgg cttggactcc aggcctgagc ggcatctacc ccctgacca ctgcaccctg 780

caggctgtgc tgcagacga tgggatgggc atccaggcgg gagaaccaga cccccagag 840

gagccccca ccttgcaagc atctgtgcc cccaccagc ttcggctggg cagcctccat 900

cctcacacc cttatcacat ccgtgtggca tgcaccagca gccaggggcc ctcacctgg 960

acacactggc ttctgtgga gacgccggag ggagtgtccc tgggcccccc tgagaacatt 1020

agtgccacgc ggaatgggag ccaggccttc gtgcattggc aggagccccg ggcgccctg 1080

cagggtacc tgtaggga cgggtggcg tatcaaggcc aggacacccc agaggtgcta 1140

atggacatag ggctaaggca agaggtgacc ctggagctgc agggggacgg gtctgtgtcc 1200

aatctgacag tgtgtgtggc agcctacact gctgctgggg atggaccctg gacccctcca 1260

gtacccttg aggctggcg ccagggcaa gcacagccag tccaccagct ggtgaaggaa 1320

acttcagctc ctgccttctc ttggccctgg tggatatata tgctaggagc agtcgtggcc 1380

gtgcctgtg tctcatctt ggctctcttc cttgtccacc ggcgaaagaa ggagaccctg 1440

tatggagaag tgctcagcc aacagtggaa agaggtgaac tggtagtcag gtaccgctg 1500

cgcaagtcct acagtcgcc gaccactgaa gctacctga acagcctggg catcagtga 1560

gagctgaagg agaagctgcg ggatgtgatg gtggaccggc acaaggtggc cctggggaag 1620

actctgggag aaggagagtt tggagccgtg atggaaggcc agctcaacca ggacgactcc 1680

atcctcaagg tggtgtgaa gacaatgaag attgccatct gcacaagtc agagctggag 1740

gatttcctga gtgaagcagt ctgcatgaag gaattcgacc atcccaatgt catgaggctc 1800

atcggtgtct gtttcaggg ttctgaacga gagagctttc cagcacctgt ggtcatctta 1860

cttttcatga agcatggaga cctacacagc ttctctctct attcccggt tggggaccag 1920

ccagtgtacc tgccactca gatgctagt aagttcatgg cggacatcgc cagtggcatg 1980

gaatatctga gtaccaagag attcatacac cgggacctgg cggccaggaa ctgcatgctg 2040



aatgagaaca tgtccgtgtg tgtggcggac ttcgggctct ccaagaagat ctacaacggg 2100  
gactactacc gccagggacg tatcgccaag atgccagtca agtggattgc cattgagagt 2160  
ctagctgacc gtgtctacac gagcaagagt gatgtgtggt ccttcggggt gacaatgtgg 2220  
gagattgccca caagaggcca aaccccatat ccaggcgtgg agaacagcga gatttatgac 2280  
tatctgcgcc agggaaatcg cctgaagcag cctgcggact gtctggatgg actgtatgcc 2340  
ttgatgtcgc ggtgctggga gctaaatccc caggaccggc caagttttac agagctgcgg 2400  
gaagatttgg agaacacact gaaggccttg cctcctgccc aggagcctga cgaaatctc 2460

tatgtcaaca tggatgaagg tggaggttat cctgaacctc ccggcgtgc tggaggagct 2520  
gaccccccaa cccagctaga ccctaaggat tctgtagct gcctcacttc ggctgaggtc 2580  
catcctgctg gacgctatgt cctctgccct tccacagccc ctagccccgc tcagcctgct 2640  
gataggggct ccccagcagc ccaggggcag gaggatggtg cc 2682

<210> 84

<211> 894

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 84

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys

1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Val Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala

20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp

85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ser Leu Gln Leu Ser Asp Ala

100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Asn Phe Val Ser

115 120 125

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

370                      375                      380  
 Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro  
  
                     405                      410                      415  
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln  
                     420                      425                      430  
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Thr Ser Ala Pro Ala Phe Ser Trp  
                     435                      440                      445  
 Pro Trp Trp Tyr Ile Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val  
                     450                      455                      460  
 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg  
  
 465                      470                      475                      480  
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val  
                     485                      490                      495  
 Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr  
                     500                      505                      510  
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp  
                     515                      520                      525  
 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu  
  
                     530                      535                      540  
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser  
 545                      550                      555                      560  
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg  
                     565                      570                      575  
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe  
                     580                      585                      590  
 Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser  
  
                     595                      600                      605  
 Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys  
                     610                      615                      620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln  
 625                      630                      635                      640  
 Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile  
                          645                      650                      655  
 Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp  
  
                          660                      665                      670  
 Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val  
                          675                      680                      685  
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg  
                          690                      695                      700  
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser  
 705                      710                      715                      720  
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly  
  
                          725                      730                      735  
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly  
                          740                      745                      750  
 Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu  
                          755                      760                      765  
 Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg  
                          770                      775                      780  
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg  
  
 785                      790                      795                      800  
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro  
                          805                      810                      815  
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu  
                          820                      825                      830  
 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Leu Asp Pro  
                          835                      840                      845  
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ser Ala Glu Val His Pro Ala Gly  
  
                          850                      855                      860  
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Ala Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala

865                      870                      875                      880  
Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala  
  
                                885                      890