



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0136551
 (43) 공개일자 2017년12월11일

- | | |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7031120
(22) 출원일자(국제) 2016년03월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년10월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/057164
(87) 국제공개번호 WO 2016/156545
국제공개일자 2016년10월06일
(30) 우선권주장
62/140,955 2015년03월31일 미국(US)
62/283,118 2015년08월21일 미국(US) | (71) 출원인
오블리크 세리퓨틱스 에이비
스웨덴 41346 예테보리 아르비드 발그렌스 바케 20
(72) 발명자
오르마르 오베
스웨덴 43650 호보스 호보스 파산스티그 11비
트르콜야 카롤리나
스웨덴 504 45 보로스 뎀데만스가탄 22
(74) 대리인
특허법인코리아나 |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **에피토프의 신규 선택 방법**

(57) 요약

본 발명은 항체용 에피토프의 특정한 신규 선택 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단백질에 대한 항체 (예를 들면 기능성 항체)의 생성 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 항원성 에피토프를 식별하는 단계 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및 (ii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 항원성 에피토프 및 상기 에피토프에 대한 항체를 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

단백질에 대한 항체의 생성 방법으로서,

(i) 적어도 하나의 프로테아제와 상기 단백질의 접촉에 의해 제한된(limited) 또는 제약된(restricted) 단백질 분해에 상기 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 상기 작용에 의해 상기 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 상기 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된(deconstructed) 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 항원성 에피토프를 식별하는 단계 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및

(ii) 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식(raising)하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

단백질에 대한 항체의 생성 방법으로서,

(i) 적어도 하나의 프로테아제와 상기 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 상기 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 상기 작용에 의해 상기 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 상기 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및

(ii) 상기 펩티드가 상기 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 상기 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 상기 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 상기 단백질의 영역에서 존재하는 상기 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 또는

상기 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 상기 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역을 선택하는 단계 및 상기 적어도 하나의 표적 영역에서 존재하는 상기 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 및

(iii) 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로테아제가 최대 8 또는 최대 7 또는 최대 5 표면 노출된 펩티드, 또는 상기 단백질분해적으로 소화된 물질의 샘플에서 상기 프로테아제의 상기 작용에 의해 상기 단백질로부터 절단분리된, 최대 8 또는 최대 7 또는 최대 5 고유 표면 노출된 펩티드를 초래하는 조건하에 사용되고, 임의로 다중 샘플이 임의로 상기 프로테아제의 상이한 기간 및/또는 상이한 농도에서 순서대로 또는 병렬로 실행되거나 실시되는, 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로테아제가 상기 프로테아제의 상기 작용에 의해 상기 단백질로부터 절단분리된 최대 8 또는 최대 7 또는 최대 5 표면 노출된 펩티드를 초래하는 조건하에 사용되는, 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로테아제의 상기 동력학 활성이 둔화되어 상기 표면 노출된 펩티드가 샘플에서 한번에 하나 또는 한번에 최대 일정 수, 예를 들어 한번에 최대 8 또는 최대 7 또는 최대 5로 절단분리되고, 임의로 다중 샘플이 순서대로 또는 병렬로 실행되거나 실시되는, 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 절단분리된 표면 노출된 펩티드가 상기 적어도 하나의 프로테아제와 접촉된 후 외관의 순서에 기반하여 등급화되고, 상기 프로테아제의 최저 농도에서 또는 먼저 절단분리되는 상기 표면 노출된 펩티드가 높은 등급으로 주어지고 상기 프로테아제의 최고 농도에서 또는 나중에 절단분리되는 상기 표면 노출된 펩티드가 낮은 등급으로 주어지고, 이들 사이에 절단분리되는 임의로 표면 노출된 펩티드가 그의 외관 순으로 등급화될 수 있는, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 방법이 항원성 에피토프 발달에 대하여 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드를 채집 (picking)하는 단계 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 방법이 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드를 채집하는 단계, 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 작제하는 단계 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 방법이 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드를 채집하는 단계, 상기 단백질의 정의된 생물학적 특성과 상기 표면 노출된-펩티드를 연관시키는 단계, 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 작제하는 단계 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 하나의 항에 있어서, 단일 프로테아제가 상기 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용되는, 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 하나의 항에 있어서, 다중 프로테아제가 상기 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용되는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 다중 프로테아제가 한번에 하나 순차적으로 사용되거나, 병렬로 사용되거나, 다중 프로테아제의 단일 콕테일에서 사용되는, 방법.

청구항 13

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 다중 프로테아제가 중첩성, 상보적, 또는 고유 표면 노출된 펩티드를 식별하는데 사용되는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 프로테아제가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법: 트립신, Arg-C 프로테이나제, Asp-N 엔도펩티다아제, 클로스트리파인, 글루타밀 엔도펩티다아제, Lys-C, Lys-N, 키모트립신, 프로테이나제 K, 서몰리신, 펩신, 카스파제 1, 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 4, 카스파제 5, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 카스파제 10, 엔테로키나제, 인자 Xa, 그란자임B, 중성구 엘라스타제, 프롤린-엔도펩티다아제, 포도상구균 펩티다아제 I, 및 트롬빈.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 프로테아제가 트립신인, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 세포로부터 유래된 프로테오리포솜에서 존재하는, 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 프로테오리포좀이 막 단백질의 고정상을 창출하기 위해 유동 세포에 고정되는, 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 용액에서 현탁되거나 표면-결합되는 단백질-함유 지질 소포내에 존재하는, 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 용액에서 현탁되거나 표면-결합되는 무손상 세포 내에 존재하는, 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 15 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 용액 내에 존재하는, 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 상기 인간 단백질체의 임의의 단백질인, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 막 결합된 단백질, 가용성 단백질, 세포외 단백질 또는 세포내 단백질인, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 막 또는 막 관련된 단백질인, 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 상기 TRP 상과내 이온 채널인, 방법.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 단백질이 TRPV1 또는 TRPV2인, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 23 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 흥분성 아미노산 수용체인, 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 단백질이 상기 NMDA 수용체 또는 G-단백질인, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 23 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 종양발생 단백질인, 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 단백질이 KRAS, NRAS 및 HRAS로 구성된 군으로부터 선택되는 종양발생 저분자량 GTPase인, 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 23 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질이 면역조절 단백질인, 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서, 상기 단백질이 PD1, PDL1, CD40, OX40, VISTA, LAG-3, TIM-3, GITR 및 CD20으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 31 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 절단분리된 펩티드가 질량 분광분석법으로 식별되는, 방법.

청구항 33

청구항 24에 있어서, 상기 절단분리된 펩티드가 LC-MS/MS로 식별되는, 방법.

청구항 34

청구항 2 내지 33 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 생물학적 기능이 표적 예컨대 리간드 또는 수용체에 결합하기 위한 상기 단백질의 능력, 상기 단백질의 효소 활성, 이온 채널 활성, 수송체 활성, 및 방출 예컨대 인슐린 방출 및 흡수 기작으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 34 중 어느 하나의 항에 있어서, 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계가 하이브리도마 기술, 파아지 디스플레이 기술에 의해, 또는 상기 항원성 에피토프로 동물의 면역화에 의해 수행되는, 방법.

청구항 36

청구항 1 내지 35 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항체가 단클론성 또는 다클론성인, 방법.

청구항 37

청구항 1 내지 36 중 어느 하나의 항에 따른 방법에 의해 생성된, 항체.

청구항 38

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프로서:

LLSQDSVAASTEK (서열 식별 번호:2);

LLSQDSVAASTEKTLR (서열 식별 번호:3); 및

QFSGSLKPEDAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:4),

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 39

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, TRPV1의 항원성 에피토프:

LLSQDSVAASTEKTLRLYDRRS (서열 식별 번호:5); 및

GRHWKNFALVPLLRE (서열 식별 번호:6).

청구항 40

LVENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:7)의 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프로서,

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산의 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 41

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프로서:

DGPTGARLLSQ (서열 식별 번호:8); 및

DAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:9),

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 42

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프로서:

SQDSVAASTEKTL (서열 식별 번호:10); 및

SGSLKPDAEVF (서열 식별 번호:11),

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 43

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프로서:

VSPVITIQRPGD (서열 식별 번호:12);

VSPVITIQRPGDGPTGA (서열 식별 번호:13);

LNLHDGQNTTIPLLL (서열 식별 번호:14);

YTDSYKQ (서열 식별 번호:15);

SLPSESTSH (서열 식별 번호:16);

EDPGNCEGVKR (서열 식별 번호:17);

DRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:18); 및

QSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:19),

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 44

하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV2의 항원성 에피토프로서:

FAPQIRVNLNRYKGTG (서열 식별 번호:20);

ASQDPNRFDRDR (서열 식별 번호:21);

LNLKDGVNACILPLL (서열 식별 번호:22);

CTDDYVRGH (서열 식별 번호:23);

LVENGANVHARACGRF (서열 식별 번호:24);

EDPSGAGVPR (서열 식별 번호:25); 및

GASEENYVPVQLQS (서열 식별 번호:26),

상기 실질적으로 상동성인 서열이 상기 소정의 아미노산 서열에 비교하여 1, 2 또는 3 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열이거나, 상기 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 또는 상기 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열인, 항원성 에피토프.

청구항 45

청구항 38 내지 44 중 어느 하나의 항에 따른 항원성 에피토프에 대한 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 비제한적으로, 항체 (예를 들면 기능성 항체) 생성에 이용된, 표적 단백질의 에피토프의 특정한 신규 선택 방법에 관한 것이다. 본 발명은 따라서 일부 측면에서 항체의 생성 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 전형적으로 항원성 에피토프의 식별 및 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식(raising)을 포함한다. 본 발명은 또한 항원성 에피토프 및 상기 항원성 에피토프를 결합하는 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항체 치료제는 휴미라, 아바스틴, 헤르셉틴을 포함한 몇 개의 단클론성 항체 (mAb) 요법으로 보여진 임상 성공, 및 예를 들면 PCSK9, 예컨대 알리로쿠맙(Alirocumab) 및 에볼로쿠맙(Evolocumab)을 표적한 신규한 콜레스테롤-저하 mAb 치료로 인해 훨씬 빠르게 성장하고 있다. 그러나, 현재 시장에서 모든 항체가, 그리고 진전된 병기 임상 개발에서 모두가 일반적으로 세포의 표적에 관한 것이고, 이들은 친화도 또는 결합 강도에 집중한 선별 플랫폼을 이용하여 일반적으로 발견 및 개발된다. 세포내로 작용하는 항체, 및 "어려운 표적", 즉 전통적 항체 발견 방법론이 실패한 표적으로 지향된 항체의 개발은, 그러나, 효율적인 항체를 발견 및 개발하기 위해 신규한 기술적 진전이 필요한, 벽찬 과제이다. 세포내로 작용하는 항체에 대하여, 올바른 표적 기관에서 세포에 대한 항체의 내재화를 위한 신규한 도구가 또한 필요하다. 더욱이, 전류 항체 발견 및 개발 플랫폼은 일반적으로 소정의 생물학적 시스템, 예컨대 의료 병태에서 특정한 항체의 작용을 예상할 수 있는 기능적, 약리적, 및 작용기전 관련요인이 부족하다.

[0003] 오늘날, 성공적인 항체 치료제의 개발 및 찾기를 향한 전략은 비제한적으로 전체 크기 단클론성 항체이다. 단백질 공학기술의 진전으로 인해, Fab 단편, ScFv 단편, 디아바디, 테트라바디, 단백질 콘주게이트로 작용화된 항체 단편, 뿐만 아니라 2개 항원에 결합한 이중특이적 단편을 포함하는 매우 다양한 조각된 항체 단편은 지난 이십 여년 동안 유래되었다. 이들 신규한 작제물은 고 특이성 및 친화도, 깊은 조직 침투, 고안정성 및 저독성을 가진 항체 및 항체-유래된 생물체제를 개발하기 위해 노력한 경우 훨씬 더 큰 도구상자를 제공한다. 그러나, 항체 요법을 이용한 주요 장애 중 하나는 여전히 남아있고 그것이 세포의 표적에 대한 그들의 일반적인 제약이다. 항체는 너무 크고 너무 극성이어서 세포막을 통해 진입하지 못한다. 추가로, 항체는 사이토졸의 환원성 환경에서 일반적으로 불안정하다. 세포내 표적을 접근하기 위해 상이한 수송 벡터 예를 들면 형질감염 시약 및 단백질 형질도입 도메인 (PTDs)으로 세포막을 거쳐 항체의 수송, 뿐만 아니라 표적 세포, 소위 인트라바디 내에 직접적으로 항체의 발현을 포함하여 몇 개의 기술이 개발되었다. 인트라바디는 세포내 이동조절 신호와 인트라바디의 유전적 서열의 융합에 의해 상이한 세포성 구획을 표적하도록 작제될 수 있다. 인트라바디를 암호화하는 유전 물질이 여전히 표적 세포에 전달될 필요가 있기 때문에 효율적인 전달 벡터에 대한 필요성은 그럼에도 불구하고 인트라바디 요법에서 결정적인 단계이다.

[0004] 하이브리도마 기술에 의한 단클론성 항체의 생산은 1975년에 최초로 개발되었다. 간단히, 포유동물은 그들의 면역 반응을 유발시키는, 관심 항원으로 주사된다. 동물 비장으로부터 비장세포는 그 다음 제거되고 나중에 불멸화된 골수종 세포와 융합된다. 세포는 단일 세포로 희석되고 다중-웰 플레이트에 분리된다. 하나의 세포가 각 별개의 콜로니를 생기게 하기 때문에, 단일 웰에서 생산된 항체는 단클론성일 것이다. 다음 단계는 항원에 결합을 위하여 최상의 후보자에 대한 모든 상이한 웰들을 선별하는 것이다.

[0005] 전체 크기 항체에 비교하여 더 작은 항체 단편의 엄청난 이점은, 이들이 상이한 발현 시스템, 예를 들면 *에스케리치아 콜라이*, 효모 및 포유동물 세포에서 생산될 수 있고, 하이브리도마 기술을 이용한 생산에 더 이상 제한

되지 않는다는 것이다. 이는 항체 특성을 유전자 상으로 조절하기 위해 많은 가능성 및 저비용으로 대규모 생산을 가능하게 한다. 항체 단편은, 큰 항체 라이브러리를 창출하는데 사용될 수 있는, 요망된 항원에 대해 선별되는, 섬유상 박테리오파지, 소위 파아지 디스플레이의 표면에 표시될 수 있다. 선별 절차는 항원에 결합하는 항체 후보자를 평가한다. 제1 사이클에서 불특정 결합으로 인해 몇 개의 사이클에서 종종 반복된다. 선별 사이클 동안 조건은 특정 환경에 대하여 최상의 적합한 후보자를 찾기 위해 변화될 수 있고, 예를 들면 더욱 안정적인 항체는 가혹한 환경을 이용함으로써 선택될 수 있다. 초고친화도를 가진 항체를 선택하는 또 다른 방법은 상기 조건 동안 결합할 수 있는 그 항체들만 남아있도록 항원의 초저농도로 선별을 수행하는 것이다. 몇 개의 회사가 그들 자신의 선별 기술을 개발하였고, 종종 큰 항체 라이브러리를 갖는다, 참조 예를 들면 Regeneron (regeneron.com) 또는 Alligator bioscience (alligatorscience.se).

발명의 내용

- [0006] 요약
- [0007] 하나의 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0008] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 항원성 에피토프를 식별하는 단계 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및
- [0009] (ii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식(raising)하는 단계.
- [0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0011] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0012] (ii) 펩티드가 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 단백질의 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 또는
- [0013] 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역을 선택하는 단계 및 상기 적어도 하나의 표적 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 및
- [0014] (iii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 항원성 에피토프의 식별 방법을 제공한다:
- [0016] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0017] (ii) 펩티드가 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 단백질의 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 또는
- [0018] 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역을 선택하는 단계 및 상기 적어도 하나의 표적 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계.
- [0019] 본 발명은 상기 아미노산 서열이 양호하게 노출되고, 기능적으로 관련되는, 적어도 이들이 양호하게 노출되는 단백질에서 아미노산 서열의 검출 및 식별 방법에 관한 것이다. 우리가 "열점"으로서 지칭하는 이들 아미노산 서열은, 따라서, 항체 표적화, 발견, 및 개발을 가이드하는 항원성 에피토프로서 이용될 수 있다. 더욱이, 이들 아미노산 서열은 단백질분해 소화 이후 그들의 외관에 기반하여, 그리고 이미 공지된 생물정보 데이터로부터 또는 기능적/약리적 시험으로부터 기능적 관련성에 기반하여 등급화될 수 있다. 따라서, 단백질분해 소화에서 비롯한 몇 개의 아미노산 서열의 목록으로부터, (기능적 및 구조적 논의에 기반된) 최상의 적당한 아미노산 서열은 항

원성 에피토프 발견 및 개발을 위하여 뽑힐 수 있다. 단백질분해 소화는 제한 조건하에 수행되며, 즉 프로테아제 또는 몇 개의 프로테아제의 활성은 아주 낮아서 단 하나 또는 몇 개의 표면 노출된 펩티드가 표적 단백질로부터 한번에 절단분리된다. 프로테아제는 따라서 표적 단백질에 항체 결합용 약물성 탐침으로서 사용된다.

- [0020] 한 구현예에서, 항체는 약리적으로 활성이다. 또 다른 구현예에서, 항체는 약리적으로 활성이고 치료 용법으로 개발된다. 더 구체적으로, 상기 방법은 표적 단백질의 열점 에피토프를 드러내기 위한 단백질 도구를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 한 측면에서, 단백질은 프로테아제 작용을 통해 소화, 해체 및/또는 절단되고 모든 양호하게 노출된 아미노산 서열은 항원성 에피토프 생성에 사용되고, 상기 항원성 에피토프에 기반하여 개발된 항체는 제약 산업에서 사용된 항체 발견에서 관례적으로 효력, 효능, 약리적 프로파일링, 및 다른 시험에 시도된다.
- [0022] 본 발명의 한 측면에서, 단백질은 단백질의 기능적으로 중요한 영역을 기술하기 위해 소화된, 해체된 및/또는 절단된 단백질에 관한 기능적 검정에 의해 병렬로 탐침검사되고 프로테아제 작용을 통해 소화, 해체 및/또는 절단된다. 관련된 단백질은 때때로 본원에서 표적 단백질로 언급된다.
- [0023] 한 구현예에서, 표적 단백질의 소화, 해체 및/또는 절단은 항체 생성용 에피토프 선택을 가이드하도록 표적 단백질의 기능적으로 중요한 영역을 기술하기 위한 기능적 검정에 의해 병렬로 수행된다.
- [0024] 한 구현예에서, 소화, 해체 및/또는 절단, 및 소화, 해체 및/또는 절단된 단백질 및 원상태 표적 단백질의 기능적 검정은 항체 생성용 에피토프 선택을 가이드하도록 표적 단백질의 기능적으로 중요한 영역을 기술하기 위해 단백질 기능에 대한 달리 공지된 사실 및 다른 생물정보와 조합된다.
- [0025] 한 구현예에서, 단일 프로테아제는 표적 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 다중 프로테아제는, 순차적으로 한번에 하나 또는 병렬로, 표적 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용될 수 있다. 그와 같은 프로테아제는 비제한적으로 Arg-C 프로테이나제, Asp-N 엔도펩티다아제, 클로 스트리파인, 글루타밀 엔도펩티다아제, Lys-C, Lys-N, 트립신, 키모트립신, 프로테이나제 K 및 서볼리신으로 예시된다. 몇 개의 프로테아제에 의해 쉽게 소화되는 영역은 단백질의 노출된 영역에 위치되어야 하고 단일 프로테아제에 의해 단지 소화되는 영역은 더욱 숨겨진 영역에서 위치될 가능성이 있다. 대안적으로, 프로테아제는 고유 절단 특이성 또는/및 물리화학 특성 또는/및 구조적 특징을 가져서 다른 프로테아제가 할 수 없는 표적 단백질상에 표면 노출된 펩티드를 식별할 수 있다. 따라서, 다중 프로테아제의 용법은 바람직하고, 각각의 상이한 프로테아제는 항원성 에피토프로서 표면 노출된 펩티드 적합성에 대한 상보적 또는 고유 정보를 수득할 수 있다.
- [0026] 구현예는 약리적 연구에 사용될 수 있는 약리적으로 활성 항체의 신속한 및 정확한 개발용 신규한 방법론/기술을 가능하게 하고, 예를 들면 이들은 예를 들면 세포 또는 시험관내 검정에서 생물학적 화합물 검출용 도구로서 사용될 수 있다. 더욱 중요하게는, 상기 항체는 인간 및 동물내 의료 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 구현예는 가용성 또는 막 결합된, 세포외 또는 세포내 모든 단백질에 적용될 수 있다. 구현예는 더욱이 단백질 기능의 신규한 근본적인 이해를 수득하는데 활용될 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체를 제공한다.
- [0028] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 식별된 항원성 에피토프를 제공한다.
- [0029] 본 발명은 또한 본 발명의 항원성 에피토프에 대한 항체를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 분명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 구현예는, 이의 추가 목적 및 이점과 함께, 하기인, 수반되는 도면들과 함께 합쳐져서 하기 설명을 참조하여 가장 잘 이해될 수 있다:

도 1

실온에서 5 µg/ml 트립신으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드, n=6. A: TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 펩티드는 0.5 분 (자홍색), 5 분 (오렌지색), 및 15 분 (청색) 후 검출되었다 B: TRPV1의 도식적 묘사에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 펩티드는 0.5 분 (자홍색), 5 분 (오렌지색), 및 15 분 (청색) 후 검출되었다. C: 어느 시점에 이들이 식별되었는지를 보여주는, 5 µg/ml 트립신으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 소화된 검출된 펩티드의 바 도식(bar plot).

도 2

5 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 또는 40 $\mu\text{g/ml}$ 트립신 (Tr)에 대한 5 분 노출 후 TRPV1로부터 소화된 펩티드 및 그들의 제거 이후 전류 반응의 변화. A-C: 유동 세포 (cyan) 내에 소화된 펩티드 및 밤새 완전한 소화 이후 유동 세포 내에 소화된 펩티드를 보여주는, TRPV1로부터 소화된 펩티드의 위치 (황색). D: 1 μM 캡사이신 (Cap)으로 활성화된 다음, 완충제 또는 트립신에 5 분 노출 및 캡사이신으로 추가의 활성화 경우 TRPV1의 대표적인 미량의 뒤 집어진 기록. 최상부부터 최하부까지: 완충제, 5 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 및 40 $\mu\text{g/ml}$ 트립신 각각에 대한 5 분 노출. 미량은 단지 도면 제시 목적을 위하여 100 Hz에서 디지털 방식으로 여과되었다.

도 3

완충제 n=11, 또는 항체 n=6으로 치료 이후 캡사이신으로 제1 활성화에 대하여 적분의 백분율로서 산출된, 캡사이신으로 제2 활성화에 대하여 전류 미량 시간 적분을 보여주는 TRPV1 기능의 전기생리적 패치 클램프 기록. 데이터는 평균 \pm 표준오차(SEM)로서 나타낸다.

도 4

hTRPV1의 표면 모델에서 시각화된, OTV1, 펩티드 aa96-117에 대한 항원 결정인자의 위치 (적색). A: 각각의 모노머가 교대 청색 및 보라색으로 착색되는 TRPV1의 측면도. B: 각각의 모노머가 교대 청색 및 보라색으로 착색되는 TRPV1의 상면도.

도 5

hTRPV1의 표면 모델에서 시각화된, OTV2, 펩티드 aa785-799에 대한 항원 결정인자의 위치 (적색). A: 2개의 모노머가 보기 목적으로 생략된 TRPV1의 측면도. B: 각각의 모노머가 교대 청색 및 보라색으로 착색되는 TRPV1의 하면도.

도 6

TRPV1로 (A) 및 TRPV1 없이 (B) 고정된 세포내 OTV1 (좌측) 및 OTV2 (우측)의 국재화. OTV1 및 OTV2는 염소 항-토끼 Alexa 488 2차 항체를 이용하여 시각화되었다. 세포를 교차하는 라인 절편 (흑색)를 따른 강도 값은 각각의 이미지 밑에 주어진다. 상이한 레이저 셋팅은 OTV1 및 OTV2에 대하여 사용되었고 항체 사이 비교되지 않아야 한다.

도 7

항체로 치료 이후 TRPV1 기능의 전기생리적 패치 클램프 기록. A: 완충제 (n=11) 또는 OTV1 (n=6)로 치료 이후, 캡사이신으로 제1 활성화에 대하여 적분의 백분율로서 산출된, 캡사이신으로 제2 활성화에 대하여 전류 미량 시간-적분. B: 칼모듈린 (n=11) 단독 또는 칼모듈린 및 OTV2로 치료 이후, 캡사이신으로 제1 활성화에 대하여 적분의 백분율로서 산출된, 칼모듈린 (CaM) 및 OTV2의 존재하에 캡사이신으로 제2 활성화에 대하여 전류 미량 시간-적분. OTV2를 이용한 치료는 틱-초음파처리의 15 분 이내 측정 (n=4) 및 틱-초음파처리의 30 분 이내 측정 (n=7)으로 분리된다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(SEM)로서 나타낸다.

도 8

A: 무칼슘 PBS내 OTV1로 전기천공 이후 TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수. 최상부: OTV1 (n=11) 및 대조군 (n=11)에 대한 형광 강도. 최하부: OTV1 및 대조군에 대하여 대응하는 형광 강도율. B: 50 μM Ca^{2+} 의 존재하에 OTV2로 전기천공 이후 TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수. 최상부: OTV2 (n=9) 및 대조군 (n=7)에 대한 형광 강도. 최하부: OTV2 (녹색) 및 대조군 (적색)에 대하여 대응하는 형광 강도율. 데이터는 평균 \pm 표준오차(SEM)로서 나타낸다.

도 9

형광으로, 전기천공을 통한 항체의 내재화의 검증. 세포는 전기천공되었고, 고정되었고, 투과되었고 염소 항토끼 Alexa 488 2차 항체로 인큐베이션되었다. 형광 강도는 공초점 현미경검사로 측정되었다. 강도는 OTV1 또는 OTV2에 적용된 전기천공된 및 비-전기천공된 세포, 뿐만 아니라 2차 항체에 단지 적용된 세포 사이 비교된다. 상이한 레이저 셋팅은 OTV1과 OTV2 사이 사용되었고 강도 값의 비교는 실시되지 않아야 한다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(SEM)로서 나타낸다.

도 10

트립신으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드. TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 실험적 세부사항은 실시예 3에서 주어진다. 먼저 소화된 펩티드는 흑색으로 보여진다. 나중에 소화된 펩티드는 회색으로 보여진다.

도 11

Asp-N으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드. TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 실험적 세부사항은 실시예 3에서 주어진다. 먼저 소화된 펩티드는 흑색으로 보여진다. 나중에 소화된 펩티드는 회색으로 보여진다.

도 12

키모트립신으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드. TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 실험적 세부사항은 실시예 3에서 주어진다. 먼저 소화된 펩티드는 흑색으로 보여진다. 나중에 소화된 펩티드는 회색으로 보여진다.

도 13

펩신으로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드. TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 실험적 세부사항은 실시예 3에서 주어진다. 먼저 소화된 펩티드는 흑색으로 보여진다. 나중에 소화된 펩티드는 회색으로 보여진다.

도 14

프로테이나제 K로 제한된 단백질분해 이후 TRPV1로부터 검출된 펩티드. TRPV1의 3D-모델에서 보여진 검출된 펩티드의 위치. 실험적 세부사항은 실시예 3에서 주어진다. 먼저 소화된 펩티드는 흑색으로 보여진다. 나중에 소화된 펩티드는 회색으로 보여진다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명의 전술한 및 다른 측면은 본원에서 제공된 설명 및 방법론에 관하여 이제 더 상세히 기재될 것이다. 본 발명이 상이한 형태로 형체화될 수 있다는 것이 인정되어야 하고 본원에서 제시된 구현예에 제한된 것으로서 해석되지 않아야 한다. 오히려, 이들 구현예는 제공되어 이로써 본 개시내용이 철저하고 완전할 것이고, 당해 분야의 숙련가에 본 발명의 범위를 전체로 전달할 것이다.
- [0033] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서, 맥락이 명확히 달리 지시하지 않는 한 단수 형태는 또한 복수를 포함한다. 본원에서 기재된 것에 유사한 또는 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있어도, 적합한 방법 및 물질은 아래에 기재되어 있다. 본원에서 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허, 및 다른 참조는 참고로 편입된다. 본원에서 인용된 참조는 청구된 발명에 대한 선행기술인 것으로 인정되지 않는다. 충돌의 경우에서, 정의를 포함한, 본 명세서는 제어할 것이다. 또한, 물질, 방법, 및 예는 단지 예시적이고 제한되는 것으로 의도되지 않는다.
- [0034] 본원에서 본 발명의 설명에서 사용된 용어는 단지 특정한 구현예 기재의 목적을 위한 것이고 본 발명을 제한되는 의도는 아니다. 본 발명의 구현예의 설명에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a," "an" 및 "the")는, 맥락이 명확히 달리 지시하지 않는 한, 또한 복수 형태를 포함하는 의도이다. 또한, 본원에서 사용된 바와 같이, "및/또는"은 하나 이상의 관련된 열거된 항목의 임의의 및 모든 가능한 조합을 지칭하고 포함한다. 더욱이, 용어 "약"은, 측정가능한 값 예컨대 화합물, 용량, 시간, 온도, 등등의 양을 참조한 경우 본원에서 사용된 바와 같이, 지정된 양의 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0.5 %, 또는 심지어 0.1 %의 변동을 포함하는 의미이다. 범위 (예를 들면 x 내지 y 범위)가 이용되는 경우 측정가능한 값이 약 x 내지 약 y 범위, 또는 그간의 임의의 범위, 예컨대 약 x1 내지 약 y1, 등인 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어들 "포함하다" 및/또는 "포함하는"이 언급된 특징, 정수, 단계, 작업, 요소, 및/또는 성분의 존재를 명기하지만, 하나 이상의 다른 특징, 정수, 단계, 작업, 요소, 성분, 및/또는 이들의 그룹의 존재 또는 부가를 배제하지 않는 것이 추가로 이해될 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 설명에서 사용된 기술 및 과학 용어들을 포함한, 모든 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0035] 하나의 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:

- [0036] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 항원성 에피토프를 식별하는 단계 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및
- [0037] (ii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0039] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0040] (ii) 펩티드가 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 단백질의 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 또는
- [0041] 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역을 선택하는 단계 및 상기 적어도 하나의 표적 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 및
- [0042] (iii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0043] 대안적으로 보면, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0044] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0045] (ii) 상기 단백질에 대한 기능적 중요성(functional importance)인, 또는 기능적 중요성인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 갖는 절단분리되는 표면 노출된 펩티드의 식별에 의한 항원성 에피토프를 식별하는 단계, 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및
- [0046] (iii) 상기 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0047] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0048] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 표면 노출된 펩티드를 식별하는 단계; 및
- [0049] (ii) 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드에 기반된 선형 또는 형태적 항원성 에피토프를 작제하는 단계; 및
- [0050] (iii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0051] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:
- [0052] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 표면 노출된 펩티드를 식별하는 단계; 및
- [0053] (ii) 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거된 경우, 상기 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 표면 노출된 펩티드를 식별하는 단계; 또는
- [0054] 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터와 상기 표면 노출된 펩티드의 상관관계에 기반된 (i)의 식별된 표면 노출된 펩티드의 적어도 하나를 선택하는 단계; 및
- [0055] (iii) 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드에 기반된 선형 또는 형태적 항원성 에피토프를 작제하는 단계; 및
- [0056] (iv) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 단백질에 대한 항체의 생성 방법을 제공한다:

- [0058] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성함으로써 상기 단백질내 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 및
- [0059] (ii) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0060] 본 발명에 있어서 항체의 생성 방법은, 또 다른 측면에서, 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 생산 방법으로서 대안적으로 보일 수 있다. 본원에서 기재된 항체의 생성 방법의 예시적인 및 바람직한 구현에는 또한, *필요한 부분만 약간 수정하여*, 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 생산 방법에 적용한다.
- [0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 항원성 에피토프의 식별 방법을 제공한다:
- [0062] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0063] (ii) 펩티드가 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 단백질의 생물학적 기능의 부족, 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는 단백질의 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계; 또는
- [0064] 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역을 선택하는 단계 및 상기 적어도 하나의 표적 영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프 식별에 의하여 항원성 에피토프를 식별하는 단계.
- [0065] 임의로, 상기 방법은 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식 단계를 추가로 포함한다.
- [0066] 대안적으로 보면, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 항원성 에피토프의 식별 방법을 제공한다:
- [0067] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계; 및
- [0068] (ii) 상기 단백질에 대한 기능적 중요성인, 또는 기능적 중요성인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 갖는 절단 분리되는 표면 노출된 펩티드의 식별에 의한 항원성 에피토프를 식별하는 단계, 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계.
- [0069] 임의로, 상기 방법은 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식 단계를 추가로 포함한다.
- [0070] 단백질 내에 표면 노출된 기능적으로 활성 에피토프에 대한 상세한 지식은 효율적인 항체의 개발 및 항체 후보자의 양 저하에 의한 정교한 선별 절차에 대한 필요성 감소를 도울 수 있다. 단백질의 표면 위상기하학을 평가하기 위한 가능한 방법은, 제한된 및 제어된 단백질분해를 수행함으로써, 단백질의 가장 가요성 및 표면 노출된 부분만을 소화시키기 위해 프로테아제의 활성을 제약하는 것이다. 그 아이디어는 프로테아제 활성의 동력학을 둔화시켜 펩티드가 한번에 하나, 또는 한번에 최대 일정 수 절단분리된다. 절단분리된 펩티드는 그 다음 프로테아제 유발 이후 외관의 순서에 기반하여 등급화될 수 있다. 단백질에서 절단분리되는 펩티드는 먼저 단백질에 의해 양호하게 노출되고, 프로테아제에 의해 쉽게 접근될 수 있다. 우리는 이들 펩티드에 높은 등급을 주었고, 우리는 프로테아제에 의해 쉽게 절단분리된 펩티드가 항체에 의해 또한 쉽게 기술적으로 인식되는 것을 강조한다. 나중에 절단분리되는 펩티드는 우리가 낮은 등급을 주고, 이들 사이 모든 펩티드는 프로테아제 유발 이후 시간이 지나 외관에 기반된 높은 내지 낮은 스코어로 주어진다. 따라서, 상기 방법은 아미노산 서열 기반되고, 우리가 서열을 알기 때문에 우리는 항체가 상기 표적 단백질에 결합할 곳을 구체적으로 안다. 제2 단계에서, 단백질에서 표적화되는 특이적 아미노산 서열을 알기 때문에, 우리는 절단된 단백질의 공개된 데이터 또는 다른 공지된 생물정보 데이터 또는 약리적 연구로부터 상기 아미노산 서열의 기능적 유의성을 조사할 수 있다. 아미노산 서열이 기능적 중요성, 예를 들면 결합 부위, 조절 부위, 구조적으로 중요한 부위, 채널 영역 등등을 갖는 공지된 아미노산 서열과 부합하거나 터치하거나 중첩하면, 상기 펩티드는 높은 스코어로 주어지고 항원성 에피토프 및 차후의 항체 개발을 위한 양호한 후보자로 판단된다. 이는, 구체적으로, 예를 들면 저온, 저농도 및/또는 짧은 소화 시간을 이용하여 프로테아제의 활성을 제어함으로써 달성될 수 있다. 제한된 단백질분해가 공지된 구조를 가진 단백질상에 수행된 경우, 주로 3개의 구조적 결정인자가 단백질 분해 활성이 발생하는 곳에 영향을 갖는 것으로서 기술적으로 인식되었다. 이들은 가요성, 표면 노출 및 국부 상호작용의 수를 포함한다. 펩티드 쇠

가 프로테아제 내에 활성 부위에 진입하기 위해, 가요성 및 국소로 펼쳐지는 단백질의 능력이 요구된다. 표면 노출은, 표면에서 영역이 더욱 쉽게 펼쳐지는 경향이 있고 뿐만 아니라 더 적은 입체 장애를 부과하는 경향이 있다는 사실로 인해, 절단 부위가 단백질분해에 대하여 더욱 공산이 크도록 한다. 수소 결합 및 이황화 가교의 면에서 국부 상호작용의 양은 또한 중요하다. 더 적은 국부 상호작용이 단백질분해를 선호한다. 이들 구조적 결정인자의 모든 3개는 단백질 내에 보통 연관된다. 그러므로, 제한된 단백질분해는 단백질 쇠가 국소로 펼칠 수 있는 소정의 표면 노출된 영역을 주로 절단할 것이다. 미공지된 상세한 구조로 단백질내 표면 노출된 영역을 측정하기 위한 방법으로서 사용되었다.

- [0071] 지질-기반된 단백질 고정화 (LPI) 기술은 가요성 화학이 막 단백질상에 수행되는 것을 가능하게 한다. 세포로부터 프로테오리포솜을 유래함으로써 그리고 유동 세포 내에 이들을 고정시킴으로써, 몇 개의 라운드의 용액 및, 예를 들면 효소에 의한 상이한 유형의 화학 조절에 적용될 수 있는, 막 단백질의 고정상은 창출된다. 단백질 특성규명을 위한 순차적인 트립신 소화 프로토콜은 개발되었고, 여기서 프로테오리포솜의 단계적인 효소 소화에서 비롯한 펩티드는 탠덤 질량 분광분석법 (LC-MS/MS) [1-3]을 이용한 액체 크로마토그래피로 분석된다.
- [0072] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 단백질은 프로테오리포솜 (의 예를 들면 지질 이중층)에서 (예를 들면 세포 예를 들어 인간 세포로부터 유래된 프로테오리포솜에서) 존재하는 단백질 (예를 들면 막 단백질)이다. 따라서, 일부 구현예에서, 제한된 단백질분해는 프로테오리포솜에서 수행된다. 프로테오리포솜은 단백질을 포함한 지질 소포이다. 프로테오리포솜은 정제된 막 단백질 및 지질로부터 재구성될 수 있거나 (예를 들면 수포형성을 통해) 세포막으로부터 또는 세포의 용해를 통해 직접적으로 유래될 수 있다. 바람직하게는, 프로테오리포솜은 용해된 세포의 세포막으로부터 유래된다 (제조된다). 프로테오리포솜은 관심있는 임의의 세포 유형으로부터 수득될 수 있다. 편리한 세포 유형은 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.
- [0073] 프로테오리포솜의 제조 방법은 당해 기술에 공지되어 있고 임의의 이들 (예를 들면 Jansson 등 *Anal. Chem.*, 2012, 84:5582-5588에 기재된 방법)은 사용될 수 있다. 프로테오리포솜의 예시적인 및 바람직한 제조 방법은 본원에서 실시예에서 기재된다. 전형적으로, 약 50nm 내지 약 150nm의 직경을 갖는 프로테오리포솜이 바람직하다.
- [0074] 그와 같은 방식으로 (예를 들면 실시예에서 참조된 방법을 이용하여) 제조된 프로테오리포솜이 프로테오리포솜의 외부에서 막 단백질의 세포내 부분 (또는 도메인)을 나타낼 수 있음에 따라 용해된 세포의 세포막으로부터 유래된 (상기로부터 제조된) 프로테오리포솜의 이용은 바람직하고, 따라서 프로테아제에 달리 접근불가능할 단백질의 일부의 단백질분해 절단 (및 따라서 항원성 에피토프 식별)을 이용가능하게 한다.
- [0075] 하나의 측면에서, 우리는 잠재적인 에피토프 후보자를 생성하기 위해 LPI 미세유체 플랫폼 [1, 4]을 이용함으로써 표적화된 항체 기술을 개발하였다. 이는 선별-기반 방법론 보다는 기전-기반 방법론이다. 간단히, LPI 기술은 가요성 화학, 예컨대 제한된 단백질분해를 막 단백질상에서 수행되는 것을 가능하게 한다. 세포로부터 프로테오리포솜의 유래 및 유동 세포 내에 이들의 고정화에 의해, 막 단백질의 고정상은 창출된다. 단백질 특성규명용 순차적인 소화 프로토콜은 개발되었고, 여기서 프로테오리포솜의 단계적인 효소 소화에서 비롯한 펩티드는 LC-MS/MS로 분석된다. LPI 유동 세포 내에 동력학적으로 제어된 소화로부터 생성된, 그와 같은 펩티드는 표적 단백질 내에 노출된 및 접근가능한 영역, 항체 결합에 접근가능함의 잠재력을 갖는 영역을 설명한다. 이들 잠재적인 에피토프는, 탁월한 결합 특징 및 생물학적 효능 둘 모두를 가진 항체를 수득할 에피토프를 찾기 위해, 공지된 기능성 데이터에 대해 추가로 연관된다. 마지막으로, 선택된 에피토프/펩티드는 항체를 생산하기 위해 숙주 동물을 면역화하는데 사용될 수 있다. 제한된 단백질분해 소화를 수행하기 위한 다른 방법 및 기술이 당해 기술에 공지되어 있고, 예를 들면 가용성 단백질에 사용될 수 있다는 것이 언급되어야 한다.
- [0076] 본 발명의 일부 구현예에서, 단백질 (예를 들면 막 단백질)은 단백질의 고정상을 창출하기 위해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 앞서 (예를 들면 고정 지지체상에) 고정된다. 따라서, 일부 구현예에서 단백질은 표면-결합된다.
- [0077] 일부 구현예에서, 단백질 (예를 들면 막 단백질)은 프로테오리포솜 (예를 들면 세포로부터 유래된 프로테오리포솜)에서 존재하고 (또는 프로테오리포솜상에 나타나고) 상기 프로테오리포솜은 단백질의 고정상을 창출하기 위해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 앞서 (예를 들면 고정 지지체상에) 고정된다.
- [0078] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 단백질은 세포로부터 유래된 프로테오리포솜에 존재하고, 여기서 상기 프로테오리포솜은 막 단백질의 고정상을 창출하기 위해 유동 세포에서 고정된다. 적합한 유동 세포, 예를 들어, Jansson 등 (*Anal. Chem.*, 2012, 84:5582-5588)에 의해 기재된 유동 세포는 당해 기술에 공지되어 있다.
- [0079] 일부 구현예에서, 단백질 (예를 들면 막 단백질)은 프로테오리포솜 (예를 들면 세포로부터 유래된 프로테오리포

좁)에서 존재하고 (또는 프로테오리포좀상에 나타나고) 상기 프로테오리포좀은 현탁제 내이다 (예를 들면 용액에서 현탁된다).

- [0080] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 표면-결합되는 또는 현탁제 내인 (예를 들면 용액에서 현탁되는) 단백질-함유 지질 소포 내이다 (소포상에 나타난다).
- [0081] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 그의 기능성 또는 천연 형태가 보존되는 정도로 임의의 적절한 독립체의 일부, 예를 들면 지질 이중층 또는 막의 또는 스캐폴드 또는 입자상의 일부일 수 있거나, 또는 독립체 상에 나타낼 수 있다.
- [0082] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 입자, 예컨대 나노입자, 또는 표면-결합되거나 현탁제 내인 (예를 들면 용액에서 현탁되는) 임의의 다른 콜로이드성 입자 내이다 (또는 입자상에 나타난다).
- [0083] 일부 구현예에서, 상기 단백질은, 표면-결합되거나 현탁제 내인 (예를 들면 용액에서 현탁되는), 스캐폴드 또는 다른 화학 독립체 예컨대 케이징 화합물 내이다 (또는 화합물상에 나타난다).
- [0084] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 표면-결합되거나 현탁제 내인 (예를 들면 용액에서 현탁되는) 무손상 세포 (생물학적 세포 예를 들면 인간 세포) 내이다 (또는 세포상에 나타난다).
- [0085] 프로테오리포좀내 단백질 맥락 "내"에서, 단백질 함유 소포 또는 무손상 세포는 프로테오리포좀의 외부까지 확장하는 (그리고 따라서 외부까지 노출되는) 단백질, 단백질 함유 지질 소포 또는 세포를 포함한다.
- [0086] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 용액 내이다. 용액은 정제된 단백질의 용액일 수 있거나 단백질의 혼합물을 함유할 수 있다.
- [0087] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들면 CHO 세포)는, 예를 들어 조절가능 (예를 들면 테트라사이클린 조절가능) 발현 시스템을 통해, 단백질을 과발현시킨다. 일부 구현예에서, 상기 세포로부터 유래된 프로테오리포좀이 사용된다.
- [0088] 우리는 상기 이온 채널의 기능 조절의 능력을 갖는 생물학적 활성 항체의 개발을 위하여 잠재적인 에피토프를 찾을 목적으로 일과성 수용체 전위 바닐로이드 1 (TRPV1) 이온 채널의 제한된 단백질분해로부터 생성된 펩티드를 조사하였다. TRPV1은 2개의 상이한 프로테아제로 제한된 단백질분해에 적용되고 소화된 펩티드는 기능성 데이터와 연관되었다. 우리는, 상기 정보를 이용하여, 인간 TRPV1 (hTRPV1) 이온 채널의 세포내측에서 작용하는, 2개의 다클론성 항체, OTV1 및 OTV2를 개발하였다. 양쪽 항체는 약리적으로 활성이고 그의 표적화된 에피토프 영역은 소화 (또는 표면 노출 (제한된 단백질분해 이후 고도로 등급화된 펩티드))의 그들의 용이성 뿐만 아니라 기능적 중요성에 기반하여 선택되었다. OTV1은 효능제 캡사이신으로 자극된 경우 단백질의 강한 억제 작용을 표시한다. OTV2는, TRPV1을 통한 칼슘 유입에 의해 유발되는 공정인, TRPV1의 칼모듈린/ Ca^{2+} 의존적 탈감작을 방해한다. OTV1 및 OTV2의 효능은 모두 뒤집어진 패치 클램프로 연구되었고, 여기서 TRPV1의 세포내측은 항체 용액에 그리고 항체가 살아 있는 세포 내부에서 전기천공된 후 TRPV1-매개된 형광 흡수 검정으로 노출될 수 있었다.
- [0089] 패치 클램프 실험에 적합한 빠른 용액 교환을 위하여 개방-용적 미세유체 유동 세포와 조합으로 LPI 유동 세포를 이용하는 방법은 이전에 기재되었다. 이의 장점은 세포막이 뒤집어질 수 있고, 이온 채널의 세포내 도메인이 직접적으로 추궁될 수 있다는 것이다. 상기 접근법에서 제한된 및 제어된 단백질분해를 이용하여 연관된 구조적 및 기능성 데이터를 수득할 수 있다. TRPV1은, 통각성 1차 감각 뉴런에서 발현되는, 양이온 채널이다. 상세한 결정 구조는 전장 단백질로 이용불가능하지만, N-말단의 안키린 반복 도메인 (ARD)은 랫트 TRPV1에 대하여 성공적으로 결정화되었다. TRPV1에서 제한된 단백질분해를 수행하는 경우 단시간 규모로 소화된 펩티드는 공지된 기능적으로 활성 영역에 비교되었다. 검출된 펩티드의 세번째는 기능적으로 중요한 것으로 제안된 잔기를 함유하였다.
- [0090] 현장의 조사에서 기재된 바와 같이 TRPV1 표면 위상기하학의 선별은 유동 세포 내에 TRPV1을 함유한 프로테오리포좀의 고정화 및 제한된 트립신 단백질분해 [1, 4]에 이들의 추가 노출에 의해 수행되었다. 트립신의 활성은 실온에서 상이한 소화 시간의 이용에 의해 제어되었다. 순차적인 프로토콜은 누적 인큐베이션 시간과 함께 사용되었고 소화된 펩티드는 LC-MS/MS로 검출되었다. 펩티드의 수 증가는 경시적으로 검출되었고, 접근가능한 및 쉽게 소화된 단백질의 영역, 또한 더욱 단단한 영역을 강조하였다. 이는 도 1에서 실증된다. LPI 유동 세포에서 TRPV1의 제한된 단백질분해 이후 절단분리된 펩티드로서 LC-MS/MS로 관측된 몇 개의 영역은 칼모듈린, ATP 및 PIP2에 대하여 공지된 상호작용 부위와 연관한다.

- [0091] 우리는 트립신 소화 [4]로 상이한 구조적 절편의 제거 이후 TRPV1의 관능성을 또한 시험하였다. TRPV1 이온 채널의 활성화는 뒤집어진 패치-클램프 기록 및 유동 세포 소화로 시험된 다음 단백질 분석으로는 화학 절단의 구조적 효과를 평가하였다. 우리는 뒤집어진 패치-클램프 기록 배치구성을 사용하였고, TRPV1의 세포내 일부를 트립신에 노출되도록 그리고 트립신 농도 증가와 함께 전류 반응의 감소가 결정되도록 하였다 (도 2).
- [0092] 우리는 이온 채널 TRPV1이 동일한 실험 조건하에 2개의 상이한 미세유체 유동 세포내 제한된 및 제어된 트립신 단백질분해에 노출될 수 있다는 것을 입증한다. 일 사례에서, 패치-클램프 기록은, 개방-용적 미세유체 디바이스에서 채널 기능 동력학에 관한 정보를 수득한, 약리적 연구에 대하여 수행되었다. 상기 설계는 패치-클램프 피펫 및 세포 패치를 과용해 채널에 접근하도록 허용한다. 또 다른 사례에서, 폐쇄된-용적 등가 유동 세포는 샘플의 희석 유발 없이 이온 채널로부터 펩티드를 소화분리하는데 사용되었다. 절단분리된 펩티드는 LC-MS/MS로 식별되었다. 2개의 실험으로부터 데이터는 그 다음 비교되었고 구조-기능 관계는 평가될 수 있었다. 상기 방법론적 접근법을 이용하여 우리는 TRPV1의 고도로 가요성 영역 뿐만 아니라 그의 효능제 캡사이신으로 활성화 동안 기능성 채널 특성에 영향을 주는 핵심 영역을 식별하였다.
- [0093] 이러한 유형의 방법론은 또한 다른 단백질 (즉 비-TRPV1 단백질)에 사용될 수 있다.
- [0094] hTRPV1의 아미노산 서열은 아래 제시된다 (서열 식별 번호:1).
- [0095] MKKWSSTDLGAAADPLQKDTCPDPLDGPNSRPPPAKPQLSTAKSRTRFLFGKGDSEEAFPVDCPHEEGELDSCPTITVSPVITIQRPGDGPTGARLLSQDSV
AASTEKTLRLRYDRRSIFEAVAQNNCQDLESLLLFLQKSKKHLTDNEFKDPETGKTCLLKAMLNLDHGQNTTIPLLLEIARQTDLSKELVNASYTDSSYKGGQT
ALHIAIERNNMALVTLLVENGADVQAAAHGDFFKTKGRPGFYFGEPLSLAACTNLQGIKVFLLQNSWQTADI SARDSVGNVTLHALVEVADNTADNTKFKV
TSMYNEILMLGAKLHPTLKLLEELTNKKGMTPLALAAAGTGKIGVLAYILQREIQEPECRHLSRKFTWAYGPHVHSSLYDLSCIDTCEKNSVLEVIAYSSSETP
NRHDMMLVEPLNRLQDKWDRFVKRIFYFNFLVYCLYMIIFTMAAYYRPVDGLPPFKMEKTGDYFRVTGEILSVLGGVYFFFRGIQYFLQRRPSMKTFLVDS
YSEMLFFLQSLFMLATVVLYFSLHKEYVASMVFSLALGWTNMLYYTRGFQMGIVAVMIKMLLRDLCRFMFVYIVFLFGFSTAVVTLIEDGKNDLSPSEST
SHRWRGPACRPPDSSYNSLYSTCLELKFKFTIGMGDLEFTENYDFKAVFIILLAYVILTYILLNMLIALMGETVNKIAQESKNIWKLQRAITILDTEKSF
KCMRKAFRSGKLLQVGYTPDGKDDYRWCFRVDEVNWTWNTNNGIINEDPGNCEGVKRTLSFSLRSSRVSGRHWKNFALVPLLREASARDRQSAQPEEVYLR
QFSGSLKPEDAEVFKSPAASGEK
- [0096] 본 발명은 따라서 특이적 에피토프의 기능성 연구, 또는 신규한 항체에 대하여, 그의 원상태 지질 환경에 있는 표적 막 단백질에 대하여 추정 결합 부위의 평가를 가능하게 한다.
- [0097] 본 발명에 있어서, 항원성 에피토프는 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리된 표면 노출된 펩티드에 전형적으로 기반된다. 대안적으로 보면, 표면 노출된 펩티드는 항원성 에피토프를 생성하는데 전형적으로 사용된다.
- [0098] 이와 관련하여, 항원성 에피토프는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함할 수 있다. 항원성 에피토프는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열로 구성될 수 있다. 항원성 에피토프는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 중첩시킬 수 있다.
- [0099] 표면 노출된 펩티드에 "실질적으로 상동성"인 아미노산 서열은 소정의 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 1, 2, 또는 3 아미노산 치환 (바람직하게는 1 또는 2, 더 바람직하게는 1) 을 갖는 서열을 갖는 서열들, 또는 상기를 포함하는 서열들을 포함한다.
- [0100] 표면 노출된 펩티드에 "실질적으로 상동성"인 아미노산 서열은 표면 노출된 펩티드의 적어도 5 또는 적어도 6 연속 아미노산을 포함하는 (또는 상기로 구성되는) (또는 표면 노출된 펩티드의 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 15, 적어도 20 또는 적어도 25) 연속 아미노산을 포함하는 또는 상기로 구성되는) 서열을 포함한다. 6 아미노산은 기술적으로 인식되거나 항체에 의해 결합되는 펩티드/단백질 서열의 전형적인 길이이다.
- [0101] 표면 노출된 펩티드에 "실질적으로 상동성"인 아미노산 서열은 소정의 표면 노출된 펩티드 서열에 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는 서열들, 또는 상기를 포함하는 서열들을 포함한다. 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%의 서열 동일성이 바람직하다.
- [0102] 항원성 에피토프는 표면 노출된 펩티드의 연신된 버전, 또는 표면 노출된 펩티드에 실질적으로 상동성인 아미노

산 서열의 연신된 버전을 포함할 수 있다 (또는 상기로 구성될 수 있다). 예를 들어, 하나 이상의 추가의 아미노산 (예를 들면 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8 또는 at 9, 적어도 10, 적어도 15 또는 적어도 20 아미노산)은 표면 노출된 펩티드 서열 (또는 이에 실질적으로 상동성인 서열)의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 존재할 수 있다.

- [0103] 항원성 에피토프는 표면 노출된 펩티드의 절단된 버전, 또는 표면 노출된 펩티드에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열의 절단된 버전을 포함할 수 있다 (또는 상기로 구성될 수 있다). 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 (예를 들면 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8 또는 9, 적어도 10)은 표면 노출된 펩티드 서열 (또는 이에 실질적으로 상동성인 서열)의 한쪽 말단 또는 양쪽 말단에서 부재일 수 있다.
- [0104] 항원성 에피토프는, 예를 들면 표면 노출된 펩티드가 공간내 서로 가까이 배치되는 하나 또는 몇 개의 표면 노출된 펩티드에 실질적으로 상동성인, 환식 펩티드일 수 있다.
- [0105] 항원성 에피토프는 적어도 5, 또는 적어도 6 또는 적어도 7 아미노산 길이, 예를 들어 6 내지 10, 6 내지 12, 6 내지 15, 6 내지 20, 6 내지 25, 6 내지 30, 6 내지 40, 6 내지 50, 6 내지 60, 또는 6 내지 75 아미노산 길이 일 수 있다. 항원성 에피토프는, 예를 들어, 5 내지 7 또는 5 내지 8 또는 5 내지 9 (예를 들면 7 내지 9 아미노산) 길이일 수 있다.
- [0106] 상동성 (예를 들면 서열 동일성)은 임의의 편리한 방법에 의해 평가될 수 있다. 그러나, 서열 사이 상동성 (예를 들면 동일성)의 정도 결정을 위하여, 서열의 다중 정렬을 작성하는 컴퓨터 프로그램, 예를 들면 Clustal W (Thompson, Higgins, Gibson, *Nucleic acids Res.*, 22:4673-4680, 1994)는 유용하다. 요망하는 경우, Clustal W 알고리즘은 BLOSUM 62 평점 매트릭스 (Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992) 및 10의 갭 개방 패널티 및 0.1의 갭 연장 패널티와 함께 사용될 수 있어서, 최고차 매치는 서열 중 하나의 총 길이의 적어도 50%가 정렬에서 관여되는 2개 서열 사이 획득된다. 서열을 정렬하는데 사용될 수 있는 다른 방법은 Smith and Waterman (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981)에 의해 개정된 바와 같이 Needleman and Wunsch (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970)의 정렬 방법이며서 최고차 매치는 2개 서열 사이 획득되고 동일한 아미노산의 수는 2개 서열 사이 결정된다. 2개 아미노산 서열 사이 백분을 동일성을 산출하기 위한 다른 방법은 일반적으로 기술 인식되고, 예를 들어, Carillo and Lipton (Carillo and Lipton, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988)에 의해 기재된 것 및 Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects에 기재된 것을 포함한다.
- [0107] 일반적으로, 컴퓨터 프로그램은 상기 산출에 이용될 것이다. ALIGN (Myers and Miller, *CABIOS*, 4:11-17, 1988), FASTA (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988; Pearson, *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990) 및 겹핑된 BLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997), BLASTP, BLASTN, 또는 GCG (Devereux, Haeberli, Smithies, *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984) 같은, 서열의 쌍을 비교 및 정렬하는 프로그램은 이러한 목적을 위해 또한 유용하다. 더욱이, 유럽 생물정보 연구소에서 달리(Dali) 서버는 단백질 서열의 구조-기반된 정렬을 제공한다 (Holm, *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995; Holm, *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993; Holm, *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998).
- [0108] 본 발명에 있어서 항원성 에피토프는 선형 에피토프 또는 형태적 에피토프일 수 있다.
- [0109] 일부 구현예에서, 본 발명에 있어서 항원성 에피토프는 환화된 에피토프일 수 있다.
- [0110] 번역화에 사용된 선형 항원성 에피토프 제조를 위하여 사용된 통상 기술은 Fmoc SPPS (고상 펩티드 합성)이다. SPPS에서, 작은 다공성 비드는 펩티드 쇄가 세정-커플링-세정의 반복된 사이클을 이용하여 빌딩될 수 있는 기능성 링커로 처리된다. 합성된 펩티드는 그 다음 화학 절단을 이용하여 비드로부터 방출된다. 환식 펩티드의 합성을 위하여, 통상 방법은 (가교가 2개 시스템에 의해 형성된 가교인) 이황화 가교의 형성에 의해, 또는 가교가 전형적인 펩티드 결합으로 구성되는 "헤드-대-테일" 가교의 형성에 의해 환화를 이용한다. 환식 펩티드는 고형 지지체상에서 형성될 수 있다. 형태적 에피토프에 대한 항체는 전체 단백질 또는 단백질의 더 큰 부분을 이용하여 통상적으로 상승된다.
- [0111] 제한된 또는 제약된 단백질분해는 완료하지 않은 단백질의 단백질분해 소화를 포함한다. 따라서, 제한된 또는 제약된 단백질분해를 통해 소정의 단백질은 단지 부분적으로 소화될 수 있다 (또는 부분적으로 해체 또는 부분적으로 절단될 수 있다). 제한된 또는 제약된 단백질분해는 부분적인 단백질분해로서 고려될 수 있다. 소정의 단백질이 소정의 프로테아제에 대하여 특정 수의 잠재적인 절단 지점 (즉 절단용 소정의 프로테아제에 의해 인식

가능한 부위)을 갖는다면, 제한된 또는 제약된 단백질분해 하에 프로테아제는 그 절단 부위의 서브세트에서만 절단할 수 있다.

- [0112] 제한된 또는 제약된 단백질분해는 또한 제한 조건 하에 실시된 단백질분해를 포함하여 이로써 프로테아제 활성의 동력학은 펩티드가 단백질로부터 한번에 하나, 또는 최대 한번에 몇개 절단분리되는 정도로 둔화된다. 일부 구현예에서 상기 적어도 하나의 프로테아제의 동력학 활성은 상당히 둔화되어 상기 표면 노출된 펩티드가 한번에 하나 또는 최대 한번에 몇개, 예를 들어 한번에 최대 8 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8) (예를 들면 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들면 샘플에서 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드), 또는 한번에 최대 7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7) (예를 들면 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들면 샘플에서 최대 7 펩티드 또는 최대 7 고유 펩티드), 또는 한번에 최대 5 (1, 2, 3, 4 또는 5) (예를 들면 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들면 샘플에서 최대 5 펩티드 또는 최대 5 고유 펩티드) 절단분리된다. 일부 상기 구현예에서, 단백질분해 반응은 단백질이 소정의 프로테아제에 의해 절단분리될 수 있는 펩티드에서 소모되도록 완료할 수 있다.
- [0113] 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 전형적으로, 제한된 또는 제약된 단백질분해는 프로테아제에 의해 절단된 단백질의 단지 가장 가요성 및/또는 표면 노출된 부분을 초래한다.
- [0114] 본 발명의 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 프로테아제는 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 최대 8 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 표면 노출된 펩티드) (예를 들면 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들면 샘플에서 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드)를 초래하는 조건 하에 사용된다.
- [0115] 바람직한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 프로테아제는 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 7 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 표면 노출된 펩티드) 또는 최대 5 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 1, 2, 3, 4 또는 5 표면 노출된 펩티드) (예를 들면 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들면 샘플에서 최대 7 또는 최대 5 펩티드 또는 최대 7 또는 최대 5 고유 펩티드)를 초래하는 조건 하에 사용된다.
- [0116] 본 발명에 있어서 제한된 또는 제약된 단백질분해는 전형적으로 프로테아제 활성의 감소, 예를 들어 펩티드가 한번에 하나, 또는 최대 한번에 몇개 단백질로부터 절단분리되는 정도로 프로테아제 활성의 동력학의 둔화에 의해 달성될 수 있다. 일부 구현예에서 상기 적어도 하나의 프로테아제의 동력학 활성은 상당히 둔화되어 상기 표면 노출된 펩티드가 한번에 하나 또는 최대 한번에 몇개, 예를 들면 상기에 기재된 바와 같이, 예를 들어 한번에 최대 8 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8), 또는 한번에 가장 7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7), 또는 한번에 최대 5 (1, 2, 3, 4 또는 5) 절단분리된다.
- [0117] 임의의 적당한 조건은 프로테아제에 의해 절단된 단백질의 단지 가장 가요성 및/또는 표면 표면 노출된 부분을 초래하기 위해, 예를 들어 프로테아제에 의해 절단분리된 최대 8 표면 노출된 펩티드, 또는 최대 7 표면 노출된 펩티드, 또는 최대 5 표면 노출된 펩티드를 초래하기 위해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 사용될 수 있다. 제한된 또는 제약된 단백질분해로 이어지는 조건은 소화 반응의 온도 및/또는 프로테아제의 농도 및/또는 소화 반응 및/또는 완충제 조건의 지속시간을 다양화함으로써 확립될 수 있다. 특정한 조건 하에 펩티드로부터 절단분리된 펩티드의 수는 당해 분야의 숙련가에 의해 (예를 들면 질량 분광분석법 또는 단백질 화학 또는 생화학에 의해) 결정될 수 있다. 제한된 또는 제약된 단백질분해에 대하여 적절한 조건의 적합한 확립 방식은 또한 본원에서 다른 곳에 기재된다. 적절한 제한된 또는 제약된 단백질분해 조건은 상이한 단백질에 대하여 또는 상이한 프로테아제에 대하여 또는 사용된 단백질 및 프로테아제의 특별한 조합에 대하여 확립될 수 있다. 제한된 또는 제약된 단백질분해에 대하여 특히 바람직한 조건은 본원에서 실시예에 기재된다. 제한된 또는 제약된 단백질분해에 사용된 조건은 전형적으로 단백질의 원상태 배치구성 (원상태의 형태)를 변경하지 않는다 (또는 상당히 변경하지 않는다). 단백질의 보조인자는, 비필연적으로, 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 존재할 수 있다.
- [0118] 제한된 또는 제약된 단백질분해에 대하여 적절한 조건은 프로테아제 및/또는 단백질에 따라 상이할 수 있지만 일반적으로 문제의 프로테아제에 대하여 차선인 조건이어서, 예를 들면 프로테아제 활성의 동력학은 상당히 둔화되거나 감소된다.
- [0119] (예를 들면 최적의 단백질분해 활성보다 더 낮은 또는 상당히 더 낮은) 프로테아제의 낮은 단백질분해 활성을 부여하는 (또는 제공하는) 조건은 일반적으로 사용된다. 상기 조건은, 비제한적으로, 프로테아제의 저농도 및/또는 문제의 프로테아제에 대하여 차선 및/또는 문제의 프로테아제에 대하여 비-표준 또는 차선 완충제인 작업 온도

및/또는 단백질과 프로테아제에 대하여 짧은 접촉 (인큐베이션) 시간의 이용을 포함한다.

- [0120] 일부 구현예에서, (예를 들면 트립신을 이용하거나 예를 들면 예를 들어 37℃ 이상의 최적의 작업 온도로 프로테아제를 이용하는) 제한된 또는 제약된 단백질분해는 실온 (예를 들면 약 20℃ 또는 17-23℃)에서 수행된다.
- [0121] 일부 구현예에서, 제한된 또는 제약된 단백질분해는 적어도 2℃, 적어도 5℃, 적어도 10℃, 또는 적어도 20℃ 초과 또는 미만, 또는 상당히 초과 또는 미만인 온도에서 수행되고, (바람직하게는 미만인) 프로테아제의 최적의 작업 온도가 사용된다.
- [0122] 일부 구현예에서, 최대 5 μg/ml 프로테아제 (예를 들면 트립신)의 농도가 제한된 또는 제약된 단백질분해에 사용된다. 일부 구현예에서, 제한된 단백질분해 반응은 최대 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 1 시간 또는 5 시간 또는 미만 동안 진행하도록 허용되고, 더 짧은 인큐베이션 시간이 일반적으로 바람직하다. 일부 상기 구현예에서, 제한된 단백질분해는 실온에서 수행된다. 따라서, 일부 구현예에서, 제한된 단백질분해는 실온에서 최대 약 5 분 (예를 들면 약 5 분) 동안 최대 5 μg/ml 프로테아제 (예를 들면 약 5 μg/ml 프로테아제)의 농도로 수행된다.
- [0123] 일부 구현예에서, 단백질분해 소화 반응은 포름산 또는 암모니아수를 이용하여 중단될 수 있다. 예를 들어, 트립신, Asp-N, 프로테이나제 K 및 키모트립신은 포름산을 이용하여 중단될 수 있고 펩신은 암모니아수를 이용하여 중단될 수 있다.
- [0124] 본 발명의 일부 구현예에서, 절단분리된 표면 노출된 펩티드는 상기 적어도 하나의 프로테아제와 접촉된 후 외관의 순서에 기반하여 등급화되고, 여기서 최초 (또는 초기) 절단분리되고 최초 (또는 초기) 샘플링 지점에서 검출되는 상기 표면 노출된 펩티드는 높은 등급으로 주어지고 후기 절단분리되고 차후의 샘플링 지점에서 검출되는 표면 노출된 펩티드는 낮은 등급으로 주어진다. 빠르게 표적 단백질에서 떨어지는, 또한 기능적 유의성을 갖는, 고도로-등급화된 펩티드는 전형적으로 에피토프 개발, 면역화 및 차후의 항체 생성에 사용될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 바와 같이 낮은 (덜 가혹한) 단백질분해 활성의 조건 (예를 들면 프로테아제의 (더) 낮은 농도, 인큐베이션의 (더) 낮은 온도, 및/또는 인큐베이션의 (더) 짧은 시간, 일반적으로 쉽게 소화된 펩티드) 하에 절단분리되는 표면 노출된 펩티드는 높은 등급으로 주어지고 본원에서 기재된 바와 같이 높은 (더 가혹한) 단백질분해 활성의 조건 (예를 들면 프로테아제의 (더) 높은 농도, 인큐베이션의 (더) 높은 온도, 및/또는 인큐베이션의 (더) 긴 시간, 일반적으로 덜 쉽게 소화된 펩티드) 하에 절단분리되는 표면 노출된 펩티드는 낮은 등급으로 주어진다.
- [0126] 일부 구현예에서, 단백질분해적으로 소화된 물질의 다중 샘플 (또는 단백질분해 소화 반응으로부터 용출물)은 제한된 또는 제약된 단백질분해 반응 동안 (예를 들면 순차적으로) 취득될 수 있고/있거나 다중 샘플 (예를 들면 다중 제한된 또는 제약된 단백질분해 반응)은 개별적으로 가공 (또는 실시)될 수 있다 (예를 들면 병렬로 가공 또는 실시될 수 있다).
- [0127] 일부 구현예에서, 단백질분해적으로 소화된 물질의 다중 샘플 (또는 단백질분해 소화 반응으로부터 용출물)은 단백질의 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 시간 간격 (예를 들면 1 분, 2.5 분 또는 5 분 간격)에서 취득된다 (또는 수득된다). 일부 상기 구현예에서, 프로테아제 및/또는 (전형적으로 "및") 프로테아제 농도 (및/또는 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이 단백질분해에 효과를 줄 수 있는 다른 조건)은 각각의 샘플에 대하여 (또는 샘플에서) 일정할 수 있고, 샘플은 프로테아제와 접촉 (또는 인큐베이션)의 시간 (또는 지속기간)에 기반하여 다양하다. 일부 상기 구현예에서, 샘플은 순서대로 수득될 수 있다 (순차적인 소화).
- [0128] 일부 구현예에서, 다중 샘플 (예를 들면 다중 제한된 또는 제약된 소화 반응)은, 예를 들어 본원에서 다른 곳에 논의된 바와 같이, 단백질의 제한된 또는 제약된 단백질분해에 대하여 상이한 단백질분해 조건 또는 단백질분해 활성을 갖는 각각의 샘플로, 개별적으로 가공 (또는 실시)되고, 예를 들면 상이한 프로테아제 및/또는 상이한 프로테아제 농도 및/또는 인큐베이션의 상이한 온도 및/또는 상이한 시간은 상이한 샘플에서 사용될 수 있다. 일부 상기 구현예에서, 프로테아제와 접촉 (또는 인큐베이션)의 시간 (또는 지속기간)은 전형적으로 (및 바람직하게는) 각각의 샘플에 대하여 (또는 샘플에서) 일정하다. 일부 상기 구현예에서, 샘플은 병렬로 가공(또는 실시)될 수 있다.
- [0129] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 표면 노출된 펩티드의 수는 프로테아제의 일정한 농도에서 시간에 의해 제어되고 몇 개의 샘플은 경시적으로 실행되거나, 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 표면 노출된 펩티드의 수는 일정한 시간에 프로테아제의 농도에 의해 제어되고, 몇 개의 샘플은 프로테아제의 몇 개의 상이한 농도에서 실행 (또는 실시)될 수 있거나, 상기 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 표면 노출된 펩티드의 수는 상기 프로테아제의 시간 및

농도 모두에 의해 제어된다.

[0130] 각각의 샘플 (또는 바람직한 샘플)은 바람직하게는 단백질로부터 절단분리된 하나 또는 몇개의 펩티드 (예를 들면 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드)를 함유할 수 있다. 따라서, 단백질로부터 절단분리된 하나 또는 몇개의 펩티드 (예를 들면 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드)는 각각의 샘플에서 검출될 수 있다. 고유 펩티드는 이전의 샘플에서 존재하지 않거나 약한 (또는 덜 가혹한) 단백질분해 조건을 갖는 샘플에서 존재하지 않는 (예를 들면 이전의 샘플에서 또는 더 약한 단백질분해 조건을 가진 샘플에서 존재하는 펩티드와 구별되거나 상이한) 펩티드이다. 따라서, 최대 8 고유 펩티드를 함유하는 샘플은 8 초과 상이한 펩티드를 함유할 수 있지만, 하나 이상의 이들 펩티드는 이전의 샘플에서 또는 더 약한 단백질분해 조건을 가진 샘플에서 검출될 수 있었다 (그리고 따라서 하나 이상의 이들 펩티드는 비-고유 펩티드일 수 있다).

[0131] 이상적으로, 및 바람직하게는, 각각의 샘플은 단일 절단분리된 펩티드만을 함유할 것이다. 예를 들어, 단일 절단분리된 펩티드는 제1 샘플 (또는 샘플링 지점)에서 검출될 수 있고 단일 절단분리된 펩티드는 하나 이상의 차후의 샘플 (또는 샘플링 지점)에서 검출될 수 있다. 다른 예에서, 다중 절단분리된 펩티드 (예를 들면 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드)는 제1 및/또는 차후의 샘플 (샘플링 지점)에서 검출될 수 있다. 하나 또는 몇개의 절단분리된 펩티드 / 샘플 (예를 들면 최대 8 펩티드 또는 최대 8 고유 펩티드 / 샘플)을 수득하는 조건은 짧은 샘플링 간격, 상이한 프로테아제 농도, 상이한 완충제 조성물, 상이한 온도, 상이한 염 농도, 또는 프로테아제 억제제 (또는 이들의 조합)을 이용함으로써 확립될 수 있다. 절단분리된 펩티드는 이들이 나타나는 샘플 (샘플링 지점)에 기반하여 등급화될 수 있다. 예를 들어, 단 하나의 펩티드 / 샘플링 지점의 검출을 초래하는 조건 하에, 실행된 제1 샘플에서 펩티드는 최고 등급으로 주어지고, 실행된 제2 샘플에서 펩티드는 2 등급 등으로 주어진다. 그에 의한 조건을 이용하여 단지 단일 절단분리된 펩티드는 각각의 샘플링 지점에서 검출되고, 개별적인 펩티드의 등급화는 가능하다. 그에 의한 조건을 이용하여 다중 절단분리된 펩티드는 각각의 샘플링 지점에서 검출되고, 펩티드의 그룹의 등급화는 가능하다.

[0132] 일부 구현예에서, 더 높은 등급화된 표면 노출된 펩티드 (절단분리된 펩티드)는 바람직하다. 일부 구현예에서, 본 발명에 있어서 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 높은 등급 펩티드)는 실행된 제1 샘플에서 검출되는 (또는 샘플에서 존재하는) 절단분리된 펩티드이다. 일부 구현예에서, 본 발명에 있어서 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 높은 등급화된 펩티드)는 단백질의 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 실행된 샘플(들)에서 외관의 그의 정도에 관하여 최상부 8 등급화된 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드) 중 하나인 또는 최상부 8 등급화된 펩티드 (예를 들면 최상부 7 등급화된, 또는 최상부 5 등급화된) 펩티드 (예를 들면 최상부 8, 최상부 7 또는 최상부 5 등급화된 고유 펩티드) 중 하나를 함유하는 샘플에 존재하는 절단분리된 펩티드이다. 상기 펩티드는 실행된 제1 샘플에서 검출될 수 있거나 (또는 샘플에서 존재할 수 있거나), 하나 이상의 그 뒤에 실행된 샘플에서 존재할 수 있다.

[0133] 최초 (또는 초기) 단백질로부터 절단분리되는 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서의 것 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 것)은 전형적으로 양호하게 노출되는 (예를 들면 표면 노출되는) 및 따라서 프로테아제에 의해 쉽게 접근되는 것이다. 상기 최초 (또는 초기) 소화된 펩티드는 높은 등급으로 주어진다 (예를 들면 최초 보이는 펩티드는 1 등급으로 주어지고, 두번째는 2 등급 등으로 주어진다). 후기에 (예를 들면 초기 펩티드 보다 후기 샘플링 지점에서) 단백질로부터 절단분리되는 펩티드는 전형적으로 양호하게 노출되지 않는 및 따라서 프로테아제에 의해 쉽게 접근되지 않는 것이다. 상기 후기 소화된 펩티드는 더 낮은 등급으로 주어진다. 본 발명에서, 높은 등급을 갖는 펩티드는 전형적으로 바람직하다.

[0134] 일부 구현예에서, 단백질의 표면에서 가장 노출되는 아미노산 서열을 갖는 절단분리된 펩티드 (표면 노출된 펩티드)는 항원성 에피토프 개발에 바람직하다.

[0135] 일부 구현예에서, 펩티드 (절단분리된 펩티드)는, 단백질에 대해, 그들의 기능적 중요성, 또는 예상된 기능적 중요성에 기반하여 등급화될 수 있다. 전형적으로, 단백질에 대해, 기능적으로 중요한, 또는 기능적 중요성인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 갖는 그들 펩티드는 기능적 중요성이 아닌, 또는 기능적 중요성인 것으로 예상되지 않는 것보다 더 높은 등급으로 주어진다. 일부 구현예에서, 더 높이 등급화된 펩티드가 바람직하다.

[0136] 일부 구현예에서, 단백질에 대해, 기능적으로 중요한, 또는 기능적으로 중요한 것으로 예상되는 (예를 들면 기능적 중요성으로 높은 등급을 갖는) 및 표면 노출에 기반된 높은 등급을 추가로 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된

바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 것)은 항원성 에피토프 개발에 바람직하다 (또는 다르게 말하면 항원성 에피토프를 기초로 하는 바람직한 펩티드이다).

- [0137] 일부 구현예에서, 단백질에 대해, 기능적으로 중요한, 또는 기능적으로 중요한 것으로 예상되는 (예를 들면 기능적 중요성으로 높은 등급을 갖는), 그러나 표면 노출에 기반된 높은 등급을 추가로 갖지 않는 아미노산 서열을 갖는 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드가 아닌 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 것)은 항원성 에피토프 개발에 사용될 수 있다.
- [0138] 일부 구현예에서, 단백질에 대해, 기능적으로 중요하지 않은, 또는 기능적으로 중요한 것으로 예상되지 않는 (예를 들면 기능적 중요성으로 낮은 등급을 갖는) 그러나 표면 노출에 기반된 높은 등급을 갖는 아미노산 서열을 갖는 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 것)은 항원성 에피토프 개발에 사용될 수 있다.
- [0139] 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는, 절단분리된 펩티드의 아미노산 서열의, 기능적 중요성, 또는 예상된 기능적 중요성과 무관하게, 상기에 기재된 바와 같이 상기 단백질로부터 최초 (또는 초기) 절단분리되는 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된, 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 펩티드)에 기반된다.
- [0140] 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는, 단백질에 대해, 기능적으로 중요한, 또는 기능적 중요성인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 추가로 갖는 이들 펩티드의, 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반하여, 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 표면 노출된 펩티드에 기반된다. 이들 펩티드는 (상기에 기재된 바와 같이) 외관 단독의 정도에 기반된 절대적인 최상부 등급화된 8 펩티드의 세트와 필연적으로 동일하지 않다 (그러나 동일할 수 있다).
- [0141] 일부 구현예에서, 단백질에 대해 기능적으로 중요한, 또는 기능적으로 중요한 것으로 예상되는 단백질에 관한 관심 영역은 식별 또는 선택되고, 항원성 에피토프는, 관심 상기 영역으로부터 절단분리된 아미노산 서열을 추가로 갖는 이들 펩티드의, 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반하여, 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 표면 노출된 펩티드에 기반된다. 이들 펩티드는 (상기에 기재된 바와 같이) 외관 단독의 정도에 기반된 절대적인 최상부 등급화된 8 펩티드의 세트와 필연적으로 동일하지 않다 (그러나 동일할 수 있다).
- [0142] 일부 구현예에서, 항체 생성에 대하여 항원성 에피토프는 제한된 단백질분해 동안 프로테아제의 작용에 의해 상기 단백질로부터 최초 (또는 초기) 절단분리된 펩티드 (표면 노출된 펩티드) (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 펩티드)의 아미노산 서열에 기반되고 따라서 높은 등급을 갖는다.
- [0143] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 항원성 에피토프 개발을 위하여 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 펩티드)의 채집 및 상기 표면 노출된 펩티드에 기반되는 (또는 펩티드로부터 개발되는) 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식을 포함한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 펩티드)의 채집, 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프의 작제 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 약식을 포함한다.
- [0145] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 높은 등급을 갖는 표면 노출된 펩티드 (예를 들면 상기에 기재된 바와 같이 실행된 제1 샘플 (제1 샘플링 지점)에서 펩티드 또는 상기에 기재된 바와 같이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 외관의 순서에 기반된 최상부 8 펩티드 (예를 들면 최상부 8 등급화된 고유 펩티드)에서 등급화되는 펩티드)의 채집, 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프의 작제 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 약식을 포함한다.

드)의 채집 및 단백질의 정의된 생물학적 특성 (또는 생물학적 기능)과 이의 연관, 상기 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프의 작제 및 상기 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식을 포함한다. 단백질의 정의된 생물학적 특성 (또는 기능)과 연관하는 아미노산 서열을 갖는 펩티드가 전형적으로 바람직하다.

[0146] 절단분리된 펩티드 (표면 노출된 펩티드)의 식별을 위한 임의의 수단이 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 절단분리된 펩티드는 질량 분광분석법을 이용하여 식별된다. 일부 구현예에서, 질량 분광분석법과 조합으로 액체 크로마토그래피가 사용된다. 바람직하게는, 절단분리된 펩티드 (표면 노출된 펩티드)는 LC-MS/MS (액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광분석법)으로 식별된다. 예시적인 및 바람직한 질량 분광분석법 방법론은 실시예에서 기재된다. 탠덤 질량-스펙트럼은, 예를 들면 실시예에서 기재된 바와 같이, 적절한 데이터베이스에 대한 MASCOT (Matrix Science, London, UK)에 의해 검색될 수 있다.

[0147] 소화된, 해체된 또는 절단된 단백질은 본원에서 언급된 바와 같이 프로테아제에 의해 그의 길이를 따라 하나 이상의 부위에서 절단된 단백질이다. 상기 단백질해 절단은 단백질로부터 절단분리된 (즉 단백질로부터 방출된) 하나 이상의 펩티드 (표면 노출된 펩티드)를 초래한다. 따라서, 표면 노출된 펩티드는 프로테아제의 작용에 의해 단백질로부터 절단분리된 펩티드이다. 용어 "표면 노출된"은, 전형적으로, 진장 단백질 (즉 미절단된 단백질)의 문맥에서, 절단분리된 (방출된) 펩티드 서열에 대응하는 단백질의 부분이 프로테아제에 양호하게 노출되고 접근가능하다는 사실을 반영한다.

[0148] 본 발명은 치료 항체 발견용 신규한 방법, 및 인간 TRPV1 단백질에 관한 신규한 약리적으로 활성 항체를 제공한다.

[0149] 본 발명은 양호하게 노출되는 단백질에 관한 에피토프의 검출 방법 및 따라서 항체 표적화용 가이드로서 이용될 수 있다.

[0150] 본 발명의 일부 방법은 상기 단백질에 대해 기능적 중요성 (예를 들면 생물학적 중요성)인, 또는 상기인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 갖는 절단분리되는 표면 노출된 펩티드의 식별에 의한 항원성 에피토프의 식별 단계, 및 그와 같은 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프의 생성 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체는 그와 같은 항원성 에피토프에 대해 양식된다.

[0151] 상기 단백질로부터 절단분리되는 표면 노출된 펩티드가 상기 단백질에 기능적 중요성인, 또는 상기인 것으로 예상되는 아미노산 서열을 갖는지의 여부 식별은 임의의 적당한 수단에 의해 실시될 수 있고 당해 분야의 숙련가는 쉽게 이를 할 수 있을 것이다.

[0152] 예를 들어, 일부 구현예에서, 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 소화, 해체 또는 절단되는 단백질은 그의 기능 또는 기능적 활성 (예를 들면 생물학적 기능)이 변경되었는지를 평가하기 위해 기능적 검정에서 시험된다. 이는 제한된 또는 제약된 단백질분해에 적용되지 않은 단백질의 기능적 활성의 수준 (제한된 또는 제약된 단백질분해에 적용되지 않은 단백질의 기능적 활성의 수준은 대조군 수준으로서 고려될 수 있다)과 소화된, 해체된 또는 절단된 단백질의 기능적 활성의 수준 비교에 의해 실시될 수 있다. 단백질의 생물학적 기능이 제한된 또는 제약된 단백질분해 이후 (또는 동안) 변경되면, 이는 절단분리된 펩티드(들) (표면 노출된 펩티드(들))이 단백질에 기능적 관련성인 (예를 들면 생물학적 중요성인) 단백질의 영역으로부터 절단분리되는 (방출되는) 것을 나타낸다. 따라서, 절단분리된 표면 노출된 펩티드는 단백질에 대해 표면 노출된 펩티드 기능적 중요성을 평가하기 위한 기능적 데이터와 연관될 수 있다. 절단분리된 펩티드(들)은, 예를 들면 평행한 실험에서, 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이 (예를 들면 LC-MS/MS에 의해), 식별될 수 있다 (예를 들면 절단분리된 펩티드(들)의 서열(들)은 식별될 수 있다). 단백질로부터 펩티드 (표면 노출된 펩티드)의 절단분리가 단백질의 기능적 활성의 변경을 초래하면, 이는 표면 노출된 펩티드가 본 발명에서 항원성 에피토프 생성에 특히 유용할 수 있다는 것을 나타낸다. 대안적으로 보면, 그와 같은 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프는 항체 생성에 특히 유용할 수 있고 바람직할 수 있다.

[0153] 하나의 구현예에서 단백질은 TRPV1이고 TRPV1에 대해 절단분리된 펩티드의 기능적 중요성을 결정하는 검정은 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이 뒤집어진 패치-클램프 검정이다.

[0154] "변경된" 기능 또는 기능적 활성 혹은 기능 또는 기능적 활성"의 변경"은 임의의 측정가능한 변경, 바람직하게는 상당한 변경, 더 바람직하게는 통계적으로 상당한 변경일 수 있다. "변경된" 기능 또는 "기능의 변경"은 기능의 증가 또는 감소일 수 있다. 기능의 예시적인 변경은 $\geq 2\%$, $\geq 3\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 25\%$, $\geq 50\%$, $\geq 75\%$, $\geq 100\%$, $\geq 200\%$, $\geq 300\%$, $\geq 400\%$, $\geq 500\%$, $\geq 600\%$, $\geq 700\%$, $\geq 800\%$, $\geq 900\%$, $\geq 1000\%$, $\geq 2000\%$, $\geq 5000\%$, 또는 $\geq 10,000\%$ 의 변경이다. 변경은 전형적으로 기능 또는 기능적 활성의 적절한 대조군 수준과 비교에서, 예를

들어 제한된 또는 제약된 단백질분해에 적용되지 않은 동등 단백질의 기능 또는 기능적 활성의 비교에서 평가된 바와 같다.

- [0155] 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는, 단백질로부터 절단분리되는 경우, 단백질의 기능 또는 기능적 활성의 변경을 초래하는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열에 기반된다.
- [0156] 일부 구현예에서, 표면 노출된 펩티드 서열이 기능적 중요성 (예를 들면 생물학적 중요성)인지 여부는 생물정보 수단에 의해 및/또는 단백질의 기능적으로 중요한 영역에 대해 이미 공지되는 (예를 들면 학술 문헌에서) 다른 정보의 이용에 의해 예상 또는 결정된다. 따라서, 절단분리된 표면 노출된 펩티드는 단백질에 대해 절단분리된 펩티드의 기능적 중요성을 예상 또는 결정하기 위해 단백질의 기능적으로 중요한 영역에 대해 공지되는 데이터와 연관될 수 있다. 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열이 기능적 중요성인 것으로 공지되면 (또는 예상되면), 이는 표면 노출된 펩티드가 본 발명의 항원성 에피토프 생성에 특히 유용할 수 있다는 것을 나타낸다. 대안적으로 보면, 그와 같은 표면 노출된 펩티드에 기반된 항원성 에피토프는 항체 생성에 특히 유용할 수 있고 바람직할 수 있다.
- [0157] 따라서, 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는 기능적으로 중요한 것으로 공지되는 (또는 예상되는) 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열에 기반되고, 예를 들면 단백질의 기능적으로 중요한 영역에 대해 이미 공지되는 (예를 들면 학술 문헌에서) 다른 정보에 기반되고/되거나 생물정보 분석에 기반된다.
- [0158] 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는 TRPV1의 칼모듈린 결합 서열 또는 TRPV1의 캡사이신 결합 부위와 연관하는 (또는 상기에 대응하는) 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열에 기반되는 TRPV1의 항원성 에피토프이다.
- [0159] 일부 구현예에서, 표면 노출된 펩티드의 기능적 중요성을 결정하기 위한 기능적 검정은 단백질의 기능적으로 중요한 영역에 대해 이미 공지되는 (예를 들면 학술 문헌에서) 다른 정보의 이용에 의해 및/또는 생물정보 수단에 의해 표면 노출된 펩티드의 기능적 중요성의 예상 또는 결정에 더하여 수행된다.
- [0160] "생물정보 수단", "생물정보 분석", "생물정보 데이터" 및 "생물정보"는, 비제한적으로, 데이터베이스 검색 (예를 들면 BLAST 검색), 구조적 모델링, 또는 이에 의해 획득된 구조적 생물학 및 데이터/정보를 포함한다.
- [0161] 기능 (예를 들면 생물학적 기능)은 문제의 단백질에 대하여 임의의 생물학적 또는 생리적으로 관련된 기능을 포함할 수 있다. 기능 (예를 들면 생물학적 기능)은, 비제한적으로 표적 (예컨대 리간드 또는 수용체) 또는 다른 결합 파트너 예를 들면 보조인자에 결합하기 위한 단백질의 능력, 신호전달 활성화, 단백질의 효소 활성화, 및 이온 채널 활성화, 수송체 활성화, 방출 예를 들면 인슐린 방출 및 흡수 기작, 등을 포함한다. 따라서, 단백질의 기능적으로 관련된 또는 기능적으로 중요한 영역은, 비제한적으로, 표적 (예컨대 리간드 또는 수용체) 또는 다른 결합 파트너 예를 들면 보조인자에 결합하기 위한 단백질의 능력을 부여하는 영역, 신호전달 활성을 부여하는 영역, 단백질의 효소 활성을 갖는 영역, 이온 채널 활성을 부여하는 영역, 수송체 활성을 부여하는 영역 및 분자 (예를 들면 인슐린)의 방출 및 흡수를 부여하는 영역을 포함한다.
- [0162] 하나의 구현예에서, 본 발명의 방법은 하나 이상의 프로테아제에 의해 (예를 들면 상기 하나 이상의 프로테아제의 공지된 인식 서열(들)에 기반된 단백질에서 절단 지점을 식별할 수 있는 컴퓨터 프로그램의 이용에 의해) 단백질로부터 절단분리될 수 있는 추정 펩티드 (예를 들면 모든 추정 펩티드)의 세트의 인실리코 생성의 단계, 및 임의로 (예를 들면 서열 데이터베이스 예를 들어 BLAST 검색 또는 다른 문헌에서) 이전에 기재된 펩티드를 제거하기 위해 추정 펩티드의 상기 인실리코 생성된 세트의 필터링 이으로써 추정 펩티드의 여과된 목록의 획득, 단백질의 제한된 또는 제약된 단백질분해에 의해 식별된 펩티드의 목록과 추정 펩티드의 상기 여과된 목록의 비교, 단백질의 제한된 또는 제약된 단백질분해에 의해 식별된 펩티드의 상기 여과된 목록 및 상기 목록 둘 모두에 공통인 펩티드의 식별, 양쪽 목록에 공통인 펩티드에 기반된 항원성 에피토프의 식별 (또는 작제), 및 임의로 상기 항원성 에피토프에 대해 항체의 양식을 추가로 포함한다.
- [0163] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 항원성 에피토프의 식별 방법을 제공한다:
- [0164] (i) 적어도 하나의 프로테아제와 제1 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 제1 단백질을 노출시켜 상기 프로테아제의 작용에 의해 제1 단백질로부터 절단분리되는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 제1 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 단계;
- [0165] (ii) 제1 단백질로부터 절단분리되는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열과 동일한 또는 실질적으로 상동성인 제2 단백질의 영역 (또는 일부 또는 부분)의 아미노산 서열을 식별하는 단계; 및
- [0166] (iii) 제1 단백질로부터 절단분리되는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열과 동일한 또는 실질적으로 상동성인

상기 제2 단백질의 상기 영역 (또는 일부 또는 부분)의 아미노산 서열에 기반된 항원성 에피토프를 생성하는 단계; 및 임의로

- [0167] (iv) 항원성 에피토프에 대한 항체를 양식하는 단계.
- [0168] 실질적으로 상동성인 서열의 예시적인 유형은 본원에서 다른 곳에 논의된다. 그와 같은 방법은 상이한 단백질 (제1 단백질)상에 수행된 제한된 또는 제약된 단백질분해에 기반된 단백질 (제2 단백질)에 대하여 항원성 에피토프 생성을 용이하게 할 수 있다. 이는 제1 및 제2 단백질이 동일한 단백질 계열이거나 달리 관련되는 경우 특히 유용할 수 있고, 예를 들어 TRPV1상에 수행된 제한된 또는 제약된 단백질분해는 TRPV2 항원성 에피토프를 식별하는데 사용될 수 있다. 제2 단백질에 관한 실질적으로 상동성 단백질의 결정 (또는 식별)은 임의의 적당한 수단 (예를 들면 컴퓨터 프로그램)을 이용하여 실시될 수 있고 숙련된 사람은 이들에 익숙할 것이다. 순전히 예로써, EMBL-EBI에 의해 제공된 엠보스 니들(EMBOSS Needle) 프로그램은 적합한 컴퓨터 프로그램이다. 엠보스 니들은 2개 입력 서열을 판독하고 그들의 최적의 전면적인 서열 정렬, 그들의 전장을 따라 2개 서열의 (갭을 포함한) 최적의 정렬을 찾기 위한 니들만-운쉬(Needleman-Wunsch) 정렬 알고리즘을 이용한 컴퓨터조작을 작성한다.
- [0169] 본 발명의 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는 또 다른 단백질(들)로 보존되는 아미노산 서열 (예를 들면 진화론적으로 보존된 서열 또는 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열과 동일한 또는 실질적으로 상동성인 서열)을 갖는 표면 노출된 펩티드에 기반되지 않는다. 이는 상기 항원성 에피토프에 대해 상승된 항체의 교차-반응성 (또는 비-특이적 결합)을 최소화할 수 있다. 다르게 말하자면, 고유 아미노산 서열 (또는 다른 단백질에서 발견되지 않은 서열)에 기반된 항원성 에피토프는 일부 구현예에서 사용될 수 있다
- [0170] 본 발명은 기능적으로 관련되는 단백질에 관한 에피토프의 검출 방법에 관한 것이고 따라서 항체 표적화용 가이드로서 이용될 수 있다. 더 구체적으로, 상기 방법은 표적 단백질의 열점 에피토프를 드러내기 위한 단백질 도구를 포함한다. 잠재적으로 항체의 생산에서 항원로서 사용될 수 있는 이들 에피토프는 본원에서 항원성 에피토프로 표시된다.
- [0171] 본 발명의 한 측면에서, 단백질은 프로테아제 작용을 통해 소화, 해체 및/또는 절단되고 단백질의 기능적으로 중요한 영역(들)을 기술하기 위해 소화, 해체 및/또는 절단된 단백질에 관한 하나 이상의 기능적 검정에 의해 병렬로 탐침검사된다.
- [0172] 한 구현예에서 단백질의 소화, 해체 및/또는 절단은 항체 생성용 에피토프 선택을 가이드하는 단백질의 기능적으로 중요한 영역을 기술하기 위한 기능적 검정(들)에 의해 병렬로 수행될 수 있다.
- [0173] 한 구현예에서, 단일 프로테아제는 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 다중 프로테아제는, 순차적으로 한번에 하나 또는 병렬로, 표적 단백질을 소화, 해체 및/또는 절단하는데 사용될 수 있다. 그와 같은 프로테아제는 비제한적으로 Arg-C 프로테이나제, Asp-N 엔도펩티다아제, 클로스트리파인, 글루타밀 엔도펩티다아제, Lys-C, Lys-N, 트립신, 키모트립신, 프로테이나제 K 및 서물리신으로 예시된다. 몇 개의 프로테아제에 의해 쉽게 소화되는 영역은 단백질의 노출된 영역에서 위치되어야 하고 단일 프로테아제에 의해 단지 소화되는 영역은 더욱 숨겨진 영역에서 아마 위치한다. 대안적으로, 프로테아제는 고유 절단 특이성 또는/및 물리화학 특성 또는/및 구조적 특징을 가져서 다른 프로테아제가 할 수 없는 표적 단백질 상에 표면 노출된 펩티드를 식별할 수 있다. 따라서, 다중 프로테아제의 용법이 바람직하고, 각각의 상이한 프로테아제는 항원성 에피토프로서 표면 노출된 펩티드 적합성에 대해 상보적 또는 고유 정보를 획득할 수 있다.
- [0174] 다중 프로테아제의 순차적인 용도는 상이한 프로테아제가 잇따라 단백질로 인큐베이션되는 것, 즉 하나의 프로테아제가 인큐베이션되고, 나중 시점에서 또 다른 것, 및 임의로 나중 시점(들)에서 하나 이상의 다른 상이한 프로테아제가 뒤따르는 것을 의미한다.
- [0175] 단일 프로테아제의 순차적인 용도는 동일한 프로테아제 (예를 들면 프로테아제의 동일한 농도)가 단백질로 몇 번, 예를 들면 몇 개의 상이한 (순차적인) 시점에서 인큐베이션되는 것 또는 몇 개의 샘플이 단백질분해 소화 반응으로부터 경시적으로 실행되는 것을 의미하고, 반응에서 생성된 신규한 또는 고유 펩티드의 외관은 검출되고 경시적으로 뒤따른다.
- [0176] 병렬 용도는 다중 분리된, 단일-프로테아제 소화 반응이, 각각 상이한 프로테아제로, 또는 동일한 프로테아제로 그러나, 예를 들어 본원에서 다른 곳에 기재된 바와 같이 상이한 단백질분해 조건 예를 들면 상이한 프로테아제 농도 및/또는 온도 및/또는 시점으로 수행되는 것을 의미한다.
- [0177] 다중 프로테아제는 중첩, 상보적 또는 고유 표면 노출된 펩티드를 식별하기 위해 사용될 수 있다. 상기 맥락에

서 "중첩"은 하나의 프로테아제로 제한된 또는 제약된 단백질분해를 통해 식별된 표면 노출된 펩티드가 하나 이상의 다른 (즉 상이한) 프로테아제로 제한된 또는 제약된 단백질분해를 통해 식별된 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열과 (부분적으로 또는 완전히) 중첩하는 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. 상기 맥락에서, "상보적"은 하나의 프로테아제로 제한된 또는 제약된 단백질분해를 통해 식별된 표면 노출된 펩티드가, 전체 단백질 서열 (즉 제한된 또는 제약된 단백질분해 이전 전체 단백질 서열)의 문맥에서, 하나 이상의 다른 (즉 상이한) 프로테아제로 제한된 또는 제약된 단백질분해를 통해 식별된 표면 노출된 펩티드의 아미노산 서열 옆에 또는 가까이 놓이는 (또는 심지어 상기와 부분적으로 중첩하는) 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. "고유" 표면 노출된 펩티드는 시험된 프로테아제의 하나 또는 몇 개 (소수)로 제한된 또는 제약된 단백질분해 이후 단지 식별되는 표면 노출된 펩티드이다.

- [0178] 이론에 의한 구속됨 없이, 1 초과 프로테아제에 의해 절단되는 단백질의 영역이 단백질의 양호하게 노출된 (예를 들면 표면 노출된) 영역에서 될 것 같고 따라서 1 초과 프로테아제에 의해 절단되는 단백질의 영역으로부터 표면 노출된 펩티드는 항원성 에피토프를 기초로 하는 특히 유용한 표면 노출된 펩티드를 나타낼 수 있다.
- [0179] 다중 프로테아제 이용은, 비제한적으로, 2, 3, 4, 5 프로테아제 이용을 포함한다.
- [0180] 본 발명의 방법의 일부 구현예에서, 프로테아제는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: 트립신, Arg-C 프로테이나제, Asp-N 엔도펩티다아제, 클로스트리파인, 글루타밀 엔도펩티다아제, Lys-C, Lys-N, 키모트립신, 프로테이나제 K, 서폴리신, 켈신, 카스파제 1, 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 4, 카스파제 5, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 카스파제 10, 엔테로키나제, 인자 Xa, 그란자임B, 중성구 엘라스타제, 프롤린-엔도펩티다아제, 포도상구균 펩티다아제 I, 및 트롬빈.
- [0181] 일부 바람직한 구현예에서, 프로테아제는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: 트립신, Asp-N 엔도펩티다아제, 키모트립신, 켈신 및 프로테이나제 K. 바람직한 구현예에서, 프로테아제는 트립신이다.
- [0182] 본 발명의 더욱 또 다른 측면에서 몇 개의 프로테아제의 콕테일은 하나 또는 몇 개의 프로테아제의 일정한 또는 가변 농도로 차차 이격된 단일, 또는 다중 과제에서 함께 사용된다. 따라서, 일부 구현예에서 다중 프로테아제의 단일 콕테일 (혼합물)이 사용된다.
- [0183] 다중 프로테아제가 사용되면 등급-정돈된 목록은 각각의 개별적인 프로테아제에 대하여 생성될 수 있다.
- [0184] 상기 방법은 단백질 기능의 신규한 근본적인 이해, 및 인간 및/또는 동물내 의료 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있는 약리적으로 활성 항체의 신속한 및 정확한 개발용 신규한 방법론/기술을 수득할 것이다. 본 방법은 가용성 또는 막 결합된, 세포외 또는 세포내인 모든 단백질에 일반화될 수 있다.
- [0185] 제안된 방법에 의해 생성된 에피토프의 목록은 바람직하게는 확장된 생물정보학 데이터 및 기능적 검정(들)에 비해 분류된다. 본 방법은 바람직하게는 양쪽 실험, 및 생물정보 정보로부터 입력 데이터를 이용한다. 한 구현예에서, 막, 및 막-관련된 단백질에 집중할 것이다. 그와 같은 단백질은 비제한적으로 인간 침해수용체 TRPV1, TRP 상과에서 다른 이온 채널, 뿐만 아니라 NMDA 수용체를 포함한 일부 흥분성 아미노산 수용체, 및 G-단백질로 예시된다. 이들 단백질 (예를 들면 이온 채널)은 이들이, 예를 들어, 패치 클램프를 이용하여 상세한 방식으로 직접적으로 연구될 수 있다는 이점을 갖는다. 관심 단백질의 다른 클래스는, 종양발생 저분자량 GTPases KRAS, NRAS 및 HRAS를 포함하는, 종양발생 단백질에 관련된다. KRAS는 췌장 암종, 결장 암종, 및 폐 암종을 포함하는 몇 개의 전이성 악성종양에서 핵심 단백질이다. GTPase 활성화는 예를 들면 GTP의 방사선동위원소 라벨링 그 다음 GDP에 대한 GTP 가수분해 이후 자유 32P의 측정 또는 풀-다운 검정 그 다음 웨스턴 블랏에 의해 연구될 수 있다. 더욱 다른 흥미로운 단백질 클래스는 단지 몇 개의 예로서 암 요법내 면역조절에 관여된 면역조절 단백질 예컨대 PD1, PDL1, CD 40이다.
- [0186] 본 발명에 있어서 "단백질"은 임의의 단백질일 수 있다.
- [0187] 본 발명의 일부 구현예에서, 단백질은 막 결합된 단백질, 가용성 (예를 들면 순환) 단백질, 세포외 단백질 또는 세포내 단백질이다.
- [0188] 일부 구현예에서, 단백질은 막 또는 막 관련된 단백질이다.
- [0189] 일부 구현예에서, 단백질은 이온 채널, 예를 들면 TRP 상과에서 이온 채널 (예를 들면 TRPV1 또는 TRPV2)이다. 바람직한 구현예에서, 단백질은 TRPV1이다.
- [0190] 일부 구현예에서, 단백질은 흥분성 아미노산 수용체이다. 일부 상기 구현예에서 단백질은 NMDA 수용체 또는 G-

단백질이다.

- [0191] 일부 구현예에서, 단백질은 종양발생 단백질이다. 일부 상기 구현예에서 단백질은 KRAS, NRAS 및 HRAS로 구성된 군으로부터 선택된 종양발생 저분자량 GTPase이다.
- [0192] 일부 구현예에서, 단백질은 면역조절 단백질이다. 일부 상기 구현예에서 단백질은 PD1, PDL1, CD40, OX40, VISTA, LAG-3, TIM-3, GITR 및 CD20으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0193] 일부 구현예에서, 단백질은 인간 단백질체의 임의의 단백질이다. 다르게 말하자면, 인간 단백질이 바람직하다.
- [0194] 이들 표적에 대한 단일, 또는 다중프로테아제 제한된 소화 프로토콜의 용법은 열점 에피토프에 관련된 신규한 항체의 발견으로 이어질 것이다. 상이한 프로테아제는 상이한 절단분리된 펩티드를 생산할 것이다. 한 구현예에서, 막 단백질은 해체되고 상기 하나 하나 절단의 효과는 단백질 기능에 관한 효과에 대하여 탐침검사된다. 특정 프로테아제로 단지 관측된 희귀 점은 또한 식별될 것이다. 식별된 데이터는 그 다음, 문체의 단백질의 기능적으로 중요한 영역을 인지하기 위해, 관장된 생물정보 데이터에 대해 및 또한 절단된 단백질의 기능적 검정으로로부터 분석될 것이다.
- [0195] 구현예의 한 측면은 단백질에서 항원성 에피토프의 식별 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 적어도 하나의 프로테아제에 단백질 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 또한 단백질의 적어도 하나의 생물학적 기능을 시험, 체크 또는 증명하는 기능적 검정에서 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 탐침검사하는 것을 포함한다. 상기 방법은 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 펩티드로서 단백질에서 및 기능적 검정에 기반하여 결정된 바와 같이 단백질의 생물학적 기능 발휘에 관여된 단백질의 영역에 존재하는 항원성 에피토프를 식별하는 것을 추가로 포함한다.
- [0196] 한 구현예에서, 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질의 노출은 i) 선택된 온도 또는 온도 범위에서, ii) (단백질의 농도에 비해) 적어도 하나의 프로테아제의 선택된 농도 또는 농도 범위에서 및/또는 ii) 선택된 지속 기간 동안 적어도 하나의 프로테아제에 단백질의 접촉을 포함한다. 이는 이어서 적어도 하나의 프로테아제가 단백질의 표면 노출된 영역을 절단하게 하지만 단백질의 비-가요성 및/또는 내부 영역은 아니다.
- [0197] 적어도 하나의 프로테아제에 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질의 노출은 단백질이 온화한 단백질분해에 노출되는 것을 암시한다. 그 결과, 단백질의 특히 표면 노출된 및 가요성 펩티드 부분(들)은 적어도 하나의 프로테아제의 작용에 의해 아미노산 서열로부터 절단분리될 것이다. 단백질분해에서 사용된 온도, 농도 및/또는 지속기간은 전형적으로 특정한 프로테아제(들) 및 전류 단백질에 좌우된다. 따라서, 한 구현예에서 후보자 단백질분해 조건의 세트는 적합한 온도, 프로테아제의 농도 및/또는 소화하는데 사용된 지속 기간, 및 단백질을 해체 또는 절단하는 및 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드를 얻는 완충제 조건을 선택 또는 식별하기 위해 먼저 시험된다. 예를 들면, 단백질분해는, 단백질 및 프로테아제(들)의 통용 조합을 위하여 가장 적절한 단백질분해 조건을 식별하기 위해 도 1에 나타난 바와 같이, 상이한 완충제 조건을 포함하여, 다중, 즉 적어도 2개의, 상이한 반응 온도에서, (단백질의 농도에 비해) 다중 상이한 프로테아제 농도에서 및/또는 다중 상이한 반응 지속기간에서 수행될 수 있다.
- [0198] 적합한 프로테아제 조건은, 예를 들면, 하나 또는 최대 N 표면 노출된 펩티드로 단백질의 소화, 해체 또는 절단을 초래하는 온도, 농도 및/또는 지속기간이다. 파라미터 N의 전형적인 값은 7, 바람직하게는 6 또는 5, 더 바람직하게는 4 또는 3 또는 더욱더 바람직하게는 2 또는 1이다.
- [0199] 한 구현예에서, 기능적 검정은 단백질의 적어도 하나의 생물학적 기능을 시험, 체크 또는 증명한다. 상기 생물학적 기능의 비-제한적인 예는 표적, 예컨대 리간드 또는 수용체에 결합하는 단백질의 능력; 단백질의 효소 활성; 이온 채널 활성; 등을 포함한다.
- [0200] 한 구현예에서, 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질의 노출은 다중 프로테아제에 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질분해에 단백질을 노출시켜 다중 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 다중 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 것을 포함한다. 특정한 구현예에서, 단백질은 연속으로, 즉 잇따라 다중 프로테아제에 접촉된다. 또 다른 특정한 구현예에서, 단백질은 병렬로 다중 프로테아제에 접촉된다.
- [0201] 한 구현예에서, 항원성 에피토프의 식별은 영역이 제한된 또는 제약된 단백질분해 동안 단백질로부터 절단분리되거나 제거되는 경우 단백질의 생물학적 기능의 부족을 초래하거나 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래하는

영역에서 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 에피토프의 식별을 포함한다.

- [0202] 한 구현예에서, 상기 방법은 또한 단백질의 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 공지된 데이터에 기반된 단백질 내에 적어도 하나의 표적 영역의 선택을 포함한다. 그와 같은 경우에, 항원성 에피토프의 식별은 적어도 하나의 표적 영역 중에서 단백질의 영역에 존재하는 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 펩티드의 식별을 포함한다.
- [0203] 상기 구현예에서, 생물학적 기능의 생물정보학 및/또는 다른 공지된 데이터는 항원성 에피토프 선택을 가이드하는데 사용된다. 이는 선택된 표적 영역(들) 중 하나에 존재하는 표면 노출된 펩티드만이 항원성 에피토프의 식별 또는 선택 경우 후보자로서 사용되는 것을 의미한다. 따라서, 후보자의 수는 임의의 생물학적 기능이 부족하다고 공지된 및/또는 단백질의 생물학적 기능 발휘에 관여되지 않는다고 공지된 영역에 존재하는 표면 노출된 펩티드 제거 또는 생략에 의해 감소될 수 있다.
- [0204] 구현예의 또 다른 측면은 단백질에서 항원성 에피토프의 상기에 기재된 식별 방법에 따라 식별된 항원성 에피토프에 관한 것이다.
- [0205] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0206] LLSQDSVAASTEK (서열 식별 번호:2);
- [0207] LLSQDSVAASTEKTLR (서열 식별 번호:3); 및
- [0208] QFSGSLKPDAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:4).
- [0209] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0210] LLSQDSVAASTEKTLRLYDRRS (서열 식별 번호:5); 및
- [0211] GRHWKNFALVPLLRE (서열 식별 번호:6).
- [0212] 하나의 구현예에서, 본 발명은 LVENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:7)의 아미노산 서열, 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다.
- [0213] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0214] DGPTGARLLSQ (서열 식별 번호:8); 및
- [0215] DAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:9).
- [0216] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0217] SQDSVAASTEKTL (서열 식별 번호:10); 및
- [0218] SGSLKPDAEVF (서열 식별 번호:11).
- [0219] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0220] VSPVITIQRPGD (서열 식별 번호:12);
- [0221] VSPVITIQRPGDGPTGA (서열 식별 번호:13);
- [0222] LNLHDGQNTTIPLLL (서열 식별 번호:14);
- [0223] YTDSYKGG (서열 식별 번호:15)
- [0224] SLPSESTSH (서열 식별 번호:16)
- [0225] EDPGNCEGVKR (서열 식별 번호:17)
- [0226] DRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:18); 및

- [0227] QSAQPEEVYLR(서열 식별 번호:19).
- [0228] 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에서 실시예 3에 각각의 표 2, 3, 4, 5, 및 6에서 두번째 제목 (이중 별표(*)로 마킹된 제목)으로 제시된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 TRPV1의 항원성 에피토프를 제공한다. 더 높은 단백질해 활성 (또는 더 가혹한 또는 더 강력한 단백질해 조건)을 이용하여 소화된, 상기 펩티드는 일반적으로 더 낮은 단백질해 활성 (또는 덜 가혹한 또는 더 약한 단백질해 조건) (예를 들면 각각의 표 2, 3, 4, 5, 및 6에서 첫번째 제목 (단일 별표 (*)로 마킹된 제목)으로 제시된 바와 같은 예를 들면 단시간 및/또는 더 낮은 농도)를 이용하여 소화된 펩티드 보다 덜 바람직하지만, 이들이 단백질의 기능적 중요성이면, 또는 상기인 것으로 예상되면 특히 흥미로울 수 있다. 표 2, 3, 4, 5 및 6에서 두번째 제목 (**)으로 제시된 펩티드는 후기에 소화되는 펩티드로 고려될 수 있고 표 2, 3, 4, 5 및 6에서 첫번째 제목 (*)으로 제시된 펩티드는 최초 소화되는 펩티드로 고려될 수 있다.
- [0229] TRPV1의 상기 항원성 에피토프의 문맥에서, 상기 실질적으로 상동성인 서열은 소정의 아미노산 서열에 비교된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 (바람직하게는 1, 2 또는 3) 아미노산 치환 또는 결실을 함유하는 서열일 수 있거나, 소정의 아미노산 서열에 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 서열이거나, 소정의 아미노산 서열의 적어도 6 연속 아미노산을 갖는 서열이다. "실질적으로 상동성" 서열의 다른 예는 표면 노출된 펩티드에 "실질적으로 상동성"인 아미노산 서열에 관련하여 본원에서 다른 곳에 기재되고 "실질적으로 상동성" 서열의 이들 예는 또한 상기 언급된 특이적 펩티드 서열에 적용가능하다. 상기 언급된 특이적 펩티드 서열은 표면 노출된 펩티드 서열이다.
- [0230] 일부 구현예에서, 본 발명은 상기 언급된 펩티드 서열 (또는 이에 실질적으로 상동성인 서열)의 연신된, 절단된 또는 환식 버전을 포함하는 (또는 상기로 구성되는) 항원성 에피토프를 제공한다. 펩티드의 연신된, 절단된 및 환식 버전은 연신된, 절단된 및 환식 표면 노출된 펩티드의 문맥에서 본원에서 다른 곳에 논의되고 그 논의는 상기 언급된 펩티드 서열에 또한 적용가능하다. 상기 언급된 특이적 펩티드 서열은 표면 노출된 펩티드 서열이다.
- [0231] 하나의 구현예에서, 본 발명은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 이에 실질적으로 상동성인 서열을 포함하는 (상기로 구성되는) TRPV2의 항원성 에피토프를 제공한다:
- [0232] FAPQIRVNLNRYKGTG (서열 식별 번호:20);
- [0233] ASQPDPNRFDRDR (서열 식별 번호:21)
- [0234] LNLKDGVNACILPLL (서열 식별 번호:22)
- [0235] CTDDYYRGH (서열 식별 번호:23)
- [0236] LVENGANVHARACGRF (서열 식별 번호:24)
- [0237] EDPSGAGVPR (서열 식별 번호:25); 및
- [0238] GASEENYVPVQLLQS (서열 식별 번호:26).
- [0239] 예시적인 실질적으로 상동성인 서열은 본원에서 다른 곳에 논의된다.
- [0240] 구현예의 추가 측면은 항체의 생산에 사용되도록 구성된 콘주게이트에 관한 것이다. 콘주게이트는 펩티드 담체에 커플링된 또는 상기와 혼합된 상기에서 정의된 바와 같이 적어도 하나의 항원성 에피토프를 포함한다.
- [0241] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원성 에피토프를 포함하는, 또는 본 발명에 의해 식별된 (또는 생산된) 콘주게이트를 제공한다. 콘주게이트는 항원성 에피토프 및 임의의 상이한 독립체 (즉 항원성 에피토프와 상이한 임의의 독립체), 예를 들어 라벨 또는 펩티드 담체를 포함할 수 있다. 콘주게이트는 전형적으로 항원성 에피토프 및 펩티드 담체를 포함하고, 여기서 상기 항원성 에피토프는 상기 펩티드 담체에 커플링되거나, 상기와 혼합된다.
- [0242] 한 구현예에서, 펩티드 담체는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) 및 난백알부민으로 구성된 군으로부터 선택된다. 커플링은, 예를 들면, 공유결합 또는 이황화 가교일 수 있다. 하나의 구현예에서 키홀 림펫 헤모시아닌은 바람직한 펩티드 담체이다. 일부 구현예에서, 항원성 에피토프는 그의 N- 또는 C- 말단 (바람직하게는 N-말단)에서 시스테인 잔기와 함께 제공될 수 있다. 그와 같은 시스테인 잔기는 펩티드 담체 (예를 들면 KLH)에 항원성 에피토프의 커플링을 용이하게 할 수 있다.
- [0243] 구현예의 더욱 또 다른 측면은 구체적으로 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 생산을 위하여 상기에 따른 항

원성 에피토프 및/또는 콘주게이트의 용도에 관한 것이다.

- [0244] 구현예의 추가 또 다른 측면은 구체적으로 단백질에 결합하는 항체의 생산 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기에 따라 항원성 에피토프 및/또는 콘주게이트에 대한 항체의 양식 및 항체의 단리를 포함한다. 항체의 단리는 생성된 또는 생산된 세포 (예를 들면 숙주세포)로부터 및/또는 성장 배지/상청액으로부터 항체의 단리를 포함할 수 있다.
- [0245] 특정한 구현예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 프로테아제에 단백질의 접촉에 의해 제한된 또는 제약된 단백질 분해에 단백질을 노출시켜 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 및 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전을 형성하는 것을 포함한다. 상기 방법은 또한 단백질의 적어도 하나의 생물학적 기능을 시험, 체크 또는 증명하는 기능적 검정에서 단백질의 적어도 하나의 소화된, 해체된 또는 절단된 버전의 탐침검사를 포함한다. 상기 방법은 적어도 하나의 표면 노출된 펩티드 중에서 표면 노출된 펩티드로서 단백질에서 및 기능적 검정에 기반하여 결정된 바와 같이 단백질의 생물학적 기능 발휘에 관여된 단백질의 영역에서 존재하는 항원성 에피토프의 식별을 추가로 포함한다. 상기 방법은 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식 및 항체의 단리를 추가로 포함한다.
- [0246] 항원성 에피토프에 대한 항체의 양식은, 예를 들면, 이전에 본원에서 기재된 바와 같이, 하이브리도마 기술, 파아지-디스플레이 기술, 등을 포함하는 당해 기술에서 공지된 기술에 따라 수행될 수 있다.
- [0247] 구현예의 추가 측면은 항원성 에피토프에 대한 항체 및/또는 상기에 따른 콘주게이트에 관한 것이다. 항체는 구체적으로 단백질에 결합한다.
- [0248] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 (또는 생산된) 항체를 제공한다.
- [0249] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원성 에피토프에 대한 항체를 제공한다. 대안적으로 보면, 본 발명은 본 발명의 항원성 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 대안적으로 보면, 본 발명은 구체적으로 본 발명의 항원성 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다.
- [0250] 예로써, 본 발명은 LLSQDSVAASTEKTLRLYDRRS (서열 식별 번호:5) 및 GRHWKNFALVPLLRE (서열 식별 번호:6)으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 (또는 상기로 구성되는) 항원성 에피토프에 대한 항체를 제공한다. 하나의 구현예에서, 아미노산 서열 LLSQDSVAASTEKTLRLYDRRS (서열 식별 번호:5)를 포함하는 (또는 상기로 구성되는) 항원성 에피토프에 대한 항체는, 바람직하게는 항체 OTV1에 대하여 실시예 섹션에서 기재된 하나 이상의 기능적 특성을 갖는 TRPV1에 대한 길항적 (억제) 항체이다. 상기 에피토프는 TRPV1의 N-말단 세포내 도메인에서 위치한 아미노산 서열에 대응한다. 하나의 구현예에서, 아미노산 서열 GRHWKNFALVPLLRE (서열 식별 번호:6)을 포함하는 (또는 상기로 구성되는) 항원성 에피토프에 대한 항체는, 바람직하게는 항체 OTV2에 대하여 실시예 섹션에서 기재된 하나 이상의 기능적 특성을 갖는 TRPV1에 대한 작용적 항체이다. 상기 에피토프는 TRPV1의 C-말단 세포내 도메인에서 위치한 아미노산 서열에 대응한다.
- [0251] 일부 구현예에서, 항체는 세포내 TRPV1 에피토프 (또는 도메인)에 반대될 수 있다. 일부 상기 구현예에서, 항체는 세포내 TRPV1 에피토프 (또는 도메인)에 대한 길항적 (억제성) 항체일 수 있다. 다른 상기 구현예에서, 항체는 세포내 TRPV1 에피토프 (또는 도메인)에 대한 작용적 항체일 수 있다.
- [0252] 한 구현예에서, 단백질에 항체의 결합은 단백질의 생물학적 기능의 부족 또는 상당히 변경된 생물학적 기능을 초래한다.
- [0253] 따라서, 항체는 기능성 항체, 예를 들면 작용적 항체 또는 길항적 항체 (예를 들면 TRPV1 또는 TRPV2에 대한 길항적 또는 작용적 항체)일 수 있다. 길항적 항체는 단백질에 결합할 수 있고 단백질의 기능을 억제 또는 감소할 수 있다. 작용적 항체는 단백질에 결합할 수 있고 단백질의 기능을 강화 또는 증가시킬 수 있다. TRPV1 또는 TRPV2 (또는 임의의 다른 이온 채널)의 경우에서 관련된 기능은 이온 수송 활성일 수 있다. 예를 들어, 캡사이신 또는 칼모듈린 결합을 차단 (감소) 또는 향상 (증가)시키는 항체의 능력은 평가될 수 있다. 상기 능력을 가진 항체는 본 발명의 바람직한 구현예를 형성한다.
- [0254] 구현예의 관련된 측면은 약제로서 사용을 위하여 상기에 따른 항체를 정의한다.
- [0255] 항원성 에피토프에 대한 항체 및/또는 콘주게이트는 구현예에 따른 하나 이상의 항원성 에피토프 및/또는 하나 이상의 콘주게이트로 동물의 면역화에 의해 획득될 수 있다. 면역화된 동물은 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 양, 비-인간 영장류, 염소, 말 및 가금을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0256] 구현예에 따른 항체는 또한 구현예에 따른 하나 이상의 항원성 에피토프 및/또는 하나 이상의 콘주게이트를 이용하여 시험관내 면역화 방법에 의해 수득될 수 있다.
- [0257] 본 발명에 따른 항체는 다클론성 항체 또는 단클론성 항체일 수 있다.
- [0258] 항체는 리간드, 항체의 하나 이상의 단편, 예컨대 Fab (단편 항원 결합) 단편, F(ab)'2 단편 (2 Fab를 함유하는 단편), ScFv 단편 (단일-쇄 가변 단편), 디아바디, 테트라바디, 또는 온전한 항체일 수 있다.
- [0259] 본 발명의 항체는, 예를 들어 그의 원상태의 형태로 (예를 들면 세포내에 또는 세포상에) 단백질의 전장 버전에 관한 것에 대한 단백질의 전장 버전에 전형적으로 결합 (예를 들면 특이적으로 결합)할 수 있다.
- [0260] 일부 구현예에서, 항체는 본원에서 다른 곳에 기재된 단백질 (또는 단백질의 유형) 중 하나에 대한 항체이다.
- [0261] 항체 및 항원성 에피토프는 단리 또는 정제될 수 있다. 용어 "단리된" 또는 "정제된"은 본 맥락에서 사용된 바와 같이 그의 천연 환경으로부터 단리된, 상기로부터 정제된, 또는 실질적으로 상기가 없는, 예를 들면, (사실상 이들이 자연적으로 발생하면) 유기체로부터 단리된 또는 상기로부터 정제된 경우 상기 분자를 지칭하거나, 기술 과정에 의해 생산된 경우 상기 분자를 지칭한다, 즉, 재조합 및 합성으로 생산된 분자를 포함한다. 따라서, 용어 "단리된" 또는 "정제된"은 전형적으로 유래되는 공급원으로부터 세포성 물질 또는 다른 단백질이 실질적으로 없는 항체 또는 항원성 에피토프를 지칭한다. 일부 구현예에서, 상기 단리된 또는 정제된 분자는 재조합 기술에 의해 생산된 경우 배양 배지, 또는 화학적으로 합성된 경우 화학 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다.
- [0262] 그들의 표적 단백질에 관한 본 발명에 의해 생성된 항체의 기능적 효과는 평가될 수 있고, 숙련된 사람은, 예를 들면 표적 단백질의 성질에 기반하여 사용에 적합한 검정을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 항체가 TRPV1 (또는 임의의 다른 이온 채널)에 대한 항체이면, 항체의 기능적 효과는 예를 들면 본원에서 실시예 2에 기재된 전기생리학 및/또는 YO-PRO 흡수 검정을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0263] 본 발명의 방법은 그 다음 다양한 다운스트림 용도로 단리, 생산 또는 제조될 수 있는 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 추가 측면은 항체의 생산 또는 제조 및/또는 단리 방법을 제공한다.
- [0264] 하나 이상의 항체가 본 발명의 방법을 이용하여 생성된, 생산된, 선택된, 식별된, 단리된 및/또는 정제된 경우, 이들 항체, 또는 이들의 성분, 단편, 변이체, 또는 유도체는 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제로 제조될 수 있고 요망하는 경우 제형화될 수 있다. 상기 제조된 분자, 또는 이들의 성분, 단편, 변이체, 또는 유도체는 또한 본 발명에 의해 포함된다. 대안적으로, 이들 분자는 상기 항체를 암호화한 핵산의 형태를 취할 수 있고, 상기 핵산은 이어서 적절한 발현 벡터 속에 편입될 수 있고/있거나 적합한 숙주세포에 함유될 수 있다. 따라서, 상기 항체를 암호화한 핵산 분자, 또는 상기 핵산 분자를 함유하는 발현 벡터는 본 발명의 추가 측면을 형성한다.
- [0265] 일단 특정한 항체, 또는 이의 성분, 단편, 변이체, 또는 유도체가 본 발명에 따라 생성되거나 생산되면, 항체를 암호화한 발현 벡터는 적절한 숙주세포 또는 시스템의 발현 및, 적절한 경우, 숙주세포 또는 시스템으로부터 또는 이의 성장 배지 또는 상청액으로부터 항체의 단리에 의해 분자의 충분한 양을 생산하는데 쉽게 사용될 수 있다 (또는 사용에 적용될 수 있다). 다클론성 항체에 대하여, 항체는 면역화된 동물의 혈청으로부터 단리 또는 정제될 수 있다.
- [0266] 따라서, 본 발명의 더욱 추가 측면은 상기에 기재된 바와 같이 본 발명의 방법에 따른 항체의 생성 또는 생산 단계, 상기 항체, 또는 이의 성분, 단편, 변이체, 또는 유도체의 제조 또는 생산 단계 및 임의로 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제로 상기 제조된 항체의 제형화 단계를 포함하는 항체의 생산 또는 제조 방법을 제공한다.
- [0267] 항체의 상기 변이체 또는 유도체는 펩티드 등가물, 비-펩티드 합성 골격을 가진 분자 및 최초 식별된 폴리펩티드로부터 유래된 또는 상기와 관련된 폴리펩티드를 포함하고 여기서 아미노산 서열은 대안적으로 또는 추가로, 예를 들면 탈당화 또는 당화에 의해 화학적으로 변형된 아미노산의 첨가 또는 아미노산으로 치환을 포함할 수 있는 단일 또는 다중 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실에 의해 변형되었다. 편리하게, 상기 유도체 또는 변이체는 이들이 유래되는 최초 폴리펩티드에 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0268] 본 발명이 항체의 생성에 관한 것임에 따라, 상기 변이체 또는 유도체는 추가로 항체 분자의 하나의 포맷의 또 다른 포맷으로의 전환 (예를 들면 Fab에서 scFv로 또는 그 반대로의 전환, 또는 본원에서 다른 곳에 기재된 항

체 분자의 임의의 포맷 사이의 전환, 예를 들면 본원에서 기재된 바와 같이 임의의 다른 유형의 항체 단편으로의 전환), 또는 항체 분자의 항체 분자의 특정한 부류로의 전환 (예를 들면 치료적 항체에 특히 적합한, 항체 분자의 IgG 또는 이의 서브클래스, 예를 들면 IgG1 또는 IgG3으로의 전환) 또는 임의의 항체의 키메라성 버전의 형성 또는 인간화를 포함한다.

[0269] 상기 변이체 또는 유도체는 추가로 예를 들어 상기 항체의 다운스트림 적용에서 유용할 수 있는 추가 기능적 성분을 갖는 항체의 관련을 포함한다. 예를 들어 항체는 바다에서 특정한 부위에 이들을 표적하는 성분, 또는 예를 들어 이미지형성 또는 다른 진단 적용에서 유용한 검출가능한 모이어티, 또는 면역접합체의 형태로 적재물 예컨대 방사선-동위원소, 독소 또는 화학치료제와 관련될 수 있다.

[0270] 명확히, 상기 성분, 단편, 변이체, 또는 유도체 결합 파트너 분자 또는 표적 독립체를 위한 주요 요건은 이들이 결합 능력에 관하여 그들의 최초 기능적 활성을 보유하거나 개선된 기능적 활성을 갖는다는 것이다.

[0271] 본 발명의 방법을 이용하여 생성된 또는 생산된 또는 제조된 항체 분자는 표적 독립체에 특이적인 항체 (예를 들어 특정한 항원에 특이적인 항체)가 요구되는 임의의 방법에서 사용될 수 있다. 따라서, 항체는 분자 도구로서 사용될 수 있고 본 발명의 추가 측면은 본 명세서에서 정의된 바와 같이 상기 항체를 포함하는 시약을 제공한다. 또한, 상기 분자는 생체내 치료 또는 예방적 적용, 생체내 또는 시험관내 진단 또는 이미지형성 적용, 또는 시험관내 검정에 사용될 수 있다.

[0272] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 아래 실시예로부터 분명하다. 제공된 실시예는 본 발명의 실시에서 유용한 상이한 성분 및 방법론을 예시한다. 실시예는 청구된 발명을 제한하지 않는다. 본 개시내용에 기반하여 숙련가는 본 발명의 실시에서 유용한 다른 성분 및 방법론을 식별 및 사용할 수 있다.

[0273] **실시예**

[0274] **실시예 1**

[0275] 이 실시예에서 우리는, 제안된 발명에 기반하여 및 방법을 포함하여, 우리가 인간 TRPV1 이온 채널의 세포내 측에서 다클론성 항체-OTV1-작용을 발견하였고 개발한 성공적인 접근법을 기재한다. 항체는 약리적으로 활성이고, 효능제 캡사이신으로 자극된 경우 단백질에 강한 억제 작용을 나타낸다. 알고 있는 한, 이는 TRPV1의 세포내 도메인을 표적하는 억제 항체가 발견된 처음이다. 이는 개념이 작업의 높은 개연성을 갖는다는 것, 그리고 훨씬 더 풍부한 다중프로테아제 데이터셋으로부터 기원하는 에피토프의 개시 매트릭스가 이용가능하면 더욱더 나은 및 최적화된 항체가 식별될 수 있다는 것을 입증한다. 항체는 제한된 단백질분해 및 생물정보 분석으로부터 수많은 히트 밖으로 선택되었다. 항체는 먼저 선택되었고 효능의 강한 증거를 보여주었다. 이는 상당한 진전이고, 약리적으로 활성 항체에 의해 표적화될 수 있는 고유 에피토프를 직접적으로 초래함에 따라 선별 단계가 필요 없기 때문에 전류 항체 식별 노력에 상보적이다.

[0276] 표적화된 에피토프 영역은 LPI 미세유체 플랫폼에서 최적화된 프로토콜을 이용하여 표적 단백질의 제한된 소화 에 기반하여 선택되었고, 추가로 최적화되었다. 다클론성 항체는 표적 펩티드 에피토프를 시스테인-잔기로 변경함으로써 생성되었고 이를 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 연결한다. 특이적 항체의 생산은 특이적 무병원체 (SPF) 토끼의 면역화 그 다음 연결된 특이적 펩티드와 KLH의 주사에 의해 수행되었다. 항체는 정제되었고 표준 프로토콜에 따라 ELISA 시험에 적용되었다. 선형 에피토프에 대한 항체 역가는 ELISA로 수행되어, 0.25 µg/ml의 농도를 초래하였다. 원상태 TRPV1에 대한 항체의 효능은 뒤집어진 패치 클램프로 연구되었고, 여기서 TRPV1의 세포내 측은 항체 용액에 노출될 수 있다. 뒤집어진 기록은 패치 클램프 기록용 미세유체 디바이스 (Dynaflow, Celectricon AB, Goeteborg, Sweden)를 이용하여 수행되었다. 전류 진폭은, 항체와 무관하게, 몇 개의 이온 채널을 함유한, 패치를 캡사이신에 노출시킴으로써 측정되었다. 대조군은 30 s 동안 1 µM 캡사이신 그 다음 70 s 동안 완충제에 노출되었고 그 다음 다시 30 s 동안 1 µM 캡사이신에 노출되었다. 항체 처리된 패치는 30 s 동안 1 µM 캡사이신 그 다음 70 s 동안 0.14 mg/ml 항체 및 그 다음 30 s 동안 0.14 mg/ml 항체와 함께 1 µM 캡사이신에 노출되었다. 전체 측정을 위하여, 항체를 이용한 활성은, 탈감작 또는 강화작용의 임의의 효과를 배제하기 위해, 단지 완충제에 노출 이후 활성과 비교되었다. 전류-시간 적분 면적은 산출되었고 제2 및 제1 전류에 대한 적분 면적 사이 비는 산출되었고 처리 사이 비교되었다. 전류 반응에서 50 % 감소는 단지 완충제에 비교된 항체로 처리된 세포에 대하여 관측되었다 (도 3). 통계적 유의도는 스튜던트 T-시험 (p>0.05)으로 산출되었다.

[0277] **실시예 2**

[0278] 치료 mAb 시장은 빠르게 성장하고 2020년에 약 1250억 USD 가치인 것으로 예상된다. 신규한 mAbs는 조절 승인을

계속해서 달성하고 있고, 현재, 면역기반된 mAbs 예컨대 PD1 억제제는 이들이 특정 유형의 어려운 전이암에서 결과를 상당히 개선하고 있기 때문에 자주 논의된다. 그러나, 치료 목적으로 신규한 항체의 발견은 선별에 크게 의존하고, 맹목적으로 실시된다. 친화도에 집중하고, 양호한 결합 특징을 보여주는 항체의 서브세트는 생물학적 효과에 대하여 그 뒤에 시험된다. 결합 상호작용 주위 세부사항, 항원 결정인자, 및 작용 기전은 미궁지로 남아 있다.

[0279] 우리는 미세유체공학 접근법 및 질량 분광분석법을 이용하여 제한된 단백질 분해 동역학 과제에 기반된 항원 에피토프를 선택하는 방법을 제시한다. 단백질 분해 단계는 매우 서서히 실시되어, 프로테아제 유발 이후, 항원은 한번에 하나 또는 몇개의 펩티드를 절취한다. 최초로 떨어지는 펩티드는 pAb 또는 mAb에 쉽게 접근가능하고, 따라서 도달하기 더욱 어려운 단백질의 영역에 있는 후기에 떨어지는 펩티드보다 양호하다. 이들 펩티드는 그 다음 관찰된 생물정보 데이터를 이용하여 서열-기반된 기능적 유의성으로 등급-정돈되고 교차-연관된다. 표적 단백질을 빠르게 떨어뜨리는, 또한 기능적 유의성을 갖는, 고도로-등급화된 펩티드는 에피토프 개발, 면역화 및 차후의 항체 생성에 사용된다. 또한, 절단된 단백질은 약리적 시험에 사용될 수 있다. 상기 방법은 서열-기반된 정보에 의존하고, 항체 발견에 대한 약리적, 작용기전 기반 접근법이고, 세포내, 순환, 및 세포외 표적 모두에 대하여 사용될 수 있다. 우리는 2개의 항체, 칼모둘린-결합 서열을 활성화-어드레싱하는 하나, 및 인간 TRPV1 이온 채널의 세포내 영역의 N-말단에서 캡사이신 결합 부위를 어드레싱하는, 활성화하는 하나를 개발하기 위해 상기 방법을 사용하였다.

[0280] 치료 항체를 개발하는 경우 2개의 중요한 파라미터는 결합 친화도 및 생물학적 효능이다. 항체는 대략 150 kDa의 큰 단백질이고 단백질 표면상에 위치한 항원성 부위에 주로 결합한다. 원상태 단백질 구조의 표면의 부근에서 아미노산의 국제화는 이들 부위의 식별 및 예측을 가이드할 수 있다. 우리는 단백질의 표면-노출 및 가요성을 탐침검사하기 위해 제한된 단백질분해를 사용하였다. 프로테아제의 활성이 온도, 농도 및/또는 소화 시간의 제어에 의해 제한되는 방법이다. 국소로 펼칠 수 있는 그리고 프로테아제를 축적할 수 있는 단지 가요성 영역, 표면 노출된 영역 및 몇개의 국부 상호작용 예컨대 수소 결합 및 이황화 가교를 가진 영역은 상기 조건하에 소화될 것이다. 우리는 구조적 정보의 회수를 최대화하기 위해 일렬로 몇 개의 프로테아제를 사용하였다. 몇 개의 프로테아제에 의해 쉽게 소화되는 영역은 단백질의 가장 노출된, 가장 접근가능한 영역에서 위치할 수 있고 추가 항체 개발에 고 적합성일 수 있다. 단일 프로테아제에 의해 단지 소화되는 영역은 단백질의 숨겨진 영역에서 유사하게 위치하고 덜 접근가능하다. 이들 영역을 소화 및 달성할 수 있는, 프로테아제의 이화학적 특성은 잠재적으로 그와 같은 경우에 항체 개발을 가이드할 수 있다. 우리는 파라미터가 단백질분해를 제한하는데 사용된 것에 의존하는 그들의 소화의 용이성에 기반하여 소화된 펩티드를 등급화하였다. 그것은 이들이 소화된 시점일 수 있었고, 여기서 그 농도 또는 온도는 사용되었다. 각각의 프로테아제로부터 소화된 펩티드는 그 다음, 단백질의 가장 접근가능한 영역에서 기원하는 이들 펩티드를 찾기 위해, 서로 연관되었다.

[0281] 종래의 항체 개발 동안, 생물학적 효능은 양성 결합이 항체와 항원 사이 식별된 후 일반적으로 시험된다. 우리는 항체 개발이 모든 가능한 항원성 부위를 표적하는 항체의 창출 보다는 생물학적 활성 부위내 또는 상기의 부근에서 접근가능한 부위상에 면역화의 집중에 의해 초기 기계론적인 유도된 접근법으로부터 유익할 것이라고 믿는다. 이는 선별 절차 뿐만 아니라 생물학적 활성 부위에서 떨어진 영역에 높은 결합 친화도를 갖는 항체 최적화의 위험을 최소화한다. 우리는 표적 단백질에 대하여 기능적 중요성을 또한 가졌던 접근가능한 에피토프를 찾기 원했다. 이는 생물정보학 데이터와 제한된 단백질분해로부터 등급화된 펩티드의 비교에 의해 실시되었다.

[0282] 우리는 모델 단백질로서 인간 TRPV1 이온 채널을 이용하여 우리의 기전 유도된 접근법을 실증하였다. TRPV1은 독특한 자극 예컨대 낮은 pH, 고온 ($T > 42^{\circ}\text{C}$), 캡사이신, 및 몇 개의 염증성 매개체에 감수성인 이온 채널이다. TRPV1 이온 채널은 사랑채 형태로 배열되는 말초 신경계의 통각성 뉴런에 주로 위치한다. 각각의 그의 4개 모노머는 원형질막의 세포내 측을 대면하는 N- 및 C-말단 둘 모두와 6개 막관통 영역으로 구성된다. 기공 영역은 5번째 및 6번째 막관통 영역으로 구성된다. TRPV1의 세포내 일부는 열 활성화, 감각 및 탈감작에 중요한 많은 조절 영역을 유지한다.

[0283] *에피토프 생성*

[0284] TRPV1을 함유하는 프로테오리포솜은 CHO 세포로부터 유래되었고, 트립신 및 Asp-N을 개별적으로 이용하여, LPI 유동 세포 내에 제한된 단백질분해에 적용되었다. 프로테아제의 활성은 단지 몇개의 펩티드가 실온 및 저농도의 사용에 의해 소화된 정도로 제한되었다. 소화된 펩티드는 그 다음 탠덤 질량 분광분석법을 이용한 액체 크로마토그래피 (LC-MS/MS)로 검출되었다. 3개 펩티드는 트립신으로 단백질분해 이후 그리고 1개 펩티드는 Asp-N으로 단백질분해 이후 검출되었다. 펩티드는 표 1에서 열거된 바와 같이 기능적으로 중요한 영역과 연관된 몇 개의

펩티드 및 공지된 기능성 데이터와 비교되었다. OTV1 및 OTV2 각각으로 명명된, aa96-117 및 aa785-799인, 2개 펩티드는 추가 항체 개발을 위하여 선택되었다. TRPV1 구조 내에 에피토프의 가시화는 도 4 및 5에서 보여질 수 있다. OTV1에 대한 펩티드 서열은 캡사이신 또는 양성자를 이용한 활성화에 중요한 것으로 보여진 arg115 (rTRPV1에 대하여 arg114)를 포함한다. 모든 프로테아제는 상기 아미노산의 부근에서 영역을 소화하였고, 이것이 3차 단백질 구조에서 노출된 영역이라는 가능성을 증가시켰다. OTV2에 대한 펩티드 서열은 칼모듈린 결합 부위 aa786-aa798 (rTRPV1에 대하여 aa785-aa797)을 포함하고 단지 트립신에 의해 소화되었다. TRPV1의 그 부분에서, Asp 및 Cys의 N-말단측에서 절단하는, Asp-N에 대한 소화 부위는 없다. aa96-117 및 aa785-799의 합성 펩티드는 삿갓조개 해모시아닌 (KLH)에 연결되었고 토끼의 면역화 그 다음 KLH 연결된 펩티드의 주사에 의해 다 클론성 항체를 생산하는데 추가로 사용되었다. 생산된 항체는 냉동 동안 및 용액내 경시적으로 응집하는 경향을 보여준다. 새롭게 해동된 항체는, 그 결과, 이용에 앞서 팀-초음파처리되었고, 전체 실험은 팀-초음파처리의 30 분 이내 수행되었다.

표 1 – Asp-N 및 트립신으로 소화된 펩티드 및 그들의 생물학적 관련성

Asp-N			트립신			상호작용
서열	개시	중단	서열	개시	중단	
DSVAASTEKTLRLY	100	113	LLSQDSVAASTEK	96	108	캡사이신
			NFALVPLLR	790	798	칼모듈린
			QSAQPEEVYLR	806	816	

[0285]

[0286]

면역세포화학

[0287]

면역세포화학은 TRPV1 발현 CHO 세포 내에 항체 분포를 시각화하기 위해 수행되었다 (도 6). 비-유도 세포는 불특정 결합에 대하여 대조군으로서 작용하였다. 세포는 고정되었고 OTV1 또는 OTV2 그 다음 염소 항토끼 Alexa 488 2차 항체로 염색되었다. 유도 세포에서 단지 가시적이었던 원형질막에서 맑은 염색은 OTV1 및 OTV2에 대하여 관측되었다. 2차 항체의 비특이적 결합은 무시할만하였다 (데이터 도시되지 않음).

[0288]

전기생리학

[0289]

캡사이신 유도된 TRPV1 활성화에 관한 OTV1의 기능적 효과 뿐만 아니라 칼모듈린/Ca²⁺ 의존적 탈감작에 관한 OTV2의 효과는 뒤집어진 패치 클램프 기록을 이용하여 평가되었다. 몇 개의 이온 채널을 함유하는, 막 패치는 CHO 세포로부터 절개되었고, TRPV1의 세포내 영역에 항체 노출을 가능하게 하였다. OTV1에 대하여, TRPV1은 캡사이신으로 활성화되었고, 그 다음 OTV1로 처리되었고, 그 다음 OTV1의 존재 하에 캡사이신으로 활성화되었다. 대조군은 캡사이신으로 활성화되었고, 완충제로 처리되었고 다시 캡사이신으로 활성화되었다. 캡사이신 매개된 전류내 50 % 감소는 단지 완충제로 처리와 OTV1로 처리를 비교한 경우 관측되었다 (도 7). OTV2는 칼모듈린/Ca²⁺ 의존적 탈감작을 방해하는 그의 능력에 대하여 시험되었다. TRPV1은 캡사이신으로 활성화되었고, 그 다음 칼모듈린, Ca²⁺ 및 OTV2로 처리되었고, 그 다음 칼모듈린, Ca²⁺ 및 OTV2의 존재 하에 캡사이신으로 활성화되었다. 대조군은 캡사이신으로 활성화되었고, 칼모듈린 및 Ca²⁺로 처리되었고 칼모듈린 및 Ca²⁺의 존재 하에 캡사이신으로 활성화되었다. 칼모듈린은 칼슘의 존재 하에 TRPV1을 탈감작한다. OTV2로 처리는 상기 효과를 45 %로 감소시켰다 (도 7).

[0290]

TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수 측정

[0291]

전체의 세포 내에 항체의 효능은 전달 방법으로서 전기천공을 이용하여, 그 다음 레이저 스캐닝 공초점 현미경 검사를 이용한 TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수의 측정에 의해 시험되었다. 세포는 OTV1, OTV2 또는 완충제의 존재 하에 Neon 형질감염 시스템 (Life Technologies)을 이용하여 전기천공되었다. OTV1 또는 완충제로 전기천공된 세포는 칼슘 킬레이터를 함유한 PBS내 YO-PRO 및 캡사이신에 적용되었다. TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수로 인한 형광의 세포내 증가는 그 뒤에 모니터링되었다. OTV1 처리된 세포에 대하여 흡수율의 60 % 감소는 활성화의 초기 12 s 동안 관측될 수 있었고 OTV1 처리된 세포에 대하여 최고 흡수율은 대조군에 대하여 8 s와 비교된 20 s 이후 관측되었다 (도 8). OTV2 또는 완충제로 전기천공된 세포는 적용된 칼슘에 의해 유발된 내인성 칼모듈린을 통해 탈감작에 의존하여, 칼슘을 함유한 PBS내 YO-PRO 및 캡사이신에 적용되었다. 흡수율의 80 % 증가는 OTV2 처리된 세포에 대하여 활성화의 15 s 후 관측될 수 있었다. 전기천공을 이용한 항체의 내재화는 면역세포화학을

이용하여 입증되었다 (도 9).

[0292] 우리는 표적 단백질의 기능적으로 중요한 영역에서 및/또는 상기 영역의 부근에서 노출된 및 접근가능한 항원성 부위를 위치하는 항체 생성용 미세유체 방법을 개발하였다. 접근가능한 영역은, 동력학적으로 제한된 단백질분해를 이용하여, LPI 유동 세포 내에 탐침검사된다. 표적 단백질은 그의 원상태로 유지되고 반면에 그의 환경의 복잡성은, 예를 들면 보조인자가 존재하도록 함으로써 주의하여 제어될 수 있다. 이는 정제된 단백질을 이용한 결합 검정에 비교된 항원성 부위의 접근성의 더 나은 이해를 수득한다. 상기 방법은 세제의 필요 없이 결합 검정에서 달리 정화 및 이용하기 어려운 막관통 표적에 양호하게 어울린다. 모든 세포내 및 세포의 도메인은 상기 접근법을 이용하여 표적화될 수 있다.

[0293] 항원성 부위의 위치 뿐만 아니라 그의 생물학적 기능의 지식은 다른 단백질과 불특정 결합 및 교차-반응성의 예측 및 평가에 매우 중요하다. 매우 보존된 영역에서 위치한 에피토프는 교차-반응성을 최소화하기 위해 잠재적인 에피토프 후보자의 분석으로부터 제외될 수 있었다.

[0294] 본 명세서에서 개발된 항체는 전체 단백질을 이용한 면역화에서 비롯되지 않아도 다클론성이다. 우리의 방법은 하이브리도마 및 차후의 선별 절차를 이용한 단클론성 항체의 생산을 위하여 종래의 프로토콜과 양립가능하다. 몇 개의 유망한 에피토프 후보자에 대하여 생물학적 효능을 실험적으로 유효하게 하는 제1 단계로서 다클론성 항체의 이용 그 다음 최상의 에피토프/에피토프들을 이용한 단클론성 항체의 생산, 및 높은 결합 친화도를 위한 선별 절차가 2개의 계의 최상을 조합한다.

[0295] *항체 내재화의 검증*

[0296] 전기천공으로 항체의 내재화는 면역세포화학으로 전기천공 이후 24 시간에 입증되었다. 세포는 PBS내 0.14 mg/ml OTV1 또는 0.27 mg/ml OTV2의 존재 하에 전기천공되었다. 전기천공된 세포는 그 다음 유리 바닥 접시 (Willco wells)에서 24시간 동안 배양되었다. 2개의 상이한 대조군이 제조되었다. 그 하나의 세트는 전기천공되지 않았지만 달리 동등하게 처리되었고 동일한 항체 용액에 적용되었고, 그 또 다른 세트는 OTV1 및 OTV2에 적용되지 않았다. 후자는 2차 항체의 불특정 결합을 정량화하는데 사용되었다. 배양의 24 시간 후, 세포는 고착 동안 달리 세포에 진입할 수 있는 임의의 잔류 항체를 제거하기 위해 PBS로 주의하여 세정되었다. 세포는 그 다음 고정되었고 이미지-iT® 고착/투과화 키트 (Invitrogen)를 이용하여 투과되었다. 고정된 및 투과된 세포는 염소 항-토끼 Alexa 488 2차 항체 (Invitrogen)로 30분 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 세포는 최종 세정 단계 이후 시각화되었고 형광 강도는 전기천공된 세포, 비전기천공된 세포 및 단지 2차 항체에 적용된 세포 사이 비교되었다 (도 9). 전기천공된 및 비전기천공된 세포 사이 강도 값의 분명한 차이는 관측되었다. 통계적인 분석은 스튜던트 T-시험으로 수행되었고 $p < 0.05$ 는 통계적으로 상당한 것으로 고려되었다. 낮은 수준의 1차 항체는 고착 및 투과화 동안 진입한 유사하게 잔류 항체인 비전기천공된 세포에서 발견되었다.

[0297] 우리는 본 명세서에서 미세유체공학 및 제한된 단백질분해의 조합을 이용하는 고친화도, 생물학적 활성 항체의 생성 방법을 제시하였다. 상기 방법은 인간 TRPV1 이온 채널을 이용하여 입증되었고 2개 항체는 개발되었다. 모든 항체는 그들의 각 에피토프 영역의 기능적 중요성에 기반된 TRPV1 반응의 예상된 변경을 야기하였다.

[0298] **물질 및 방법**

[0299] *화학물질*

[0300] 세포 배양 배지 (글루타민을 가진 DMEM/Ham's F12), 우태 혈청, 및 아큐타제(Accutase)는 PAA로부터 구매되었다. 제오신, Na₄BAPTA, K₄BAPTA 및 염소 항 토끼 Alexa 488 2차 항체는 Invitrogen으로부터 구매되었다. 서열분석 등급 변형된 트립신 및 서열분석 등급 Asp-N은 Promega로부터 구매되었다. 모든 다른 화학물질은 Sigma로부터 구매되었다. 하기 완충제가 사용되었다: A: 300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, B: 20 mM NH₄HCO₃, pH 8.0. C: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ 10 mM HEPES, 10 mM D-글루코오스, 10 mM Na₄BAPTA pH 7.4, D: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM K₄BAPTA pH 7.2, E: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.2. F: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.4. G: 120 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM K₄BAPTA pH 8.0

[0301] *세포 배양*

[0302] 테트라사이클린 조절된 발현 시스템 (T-REx)을 가진 부착 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포는 유리 슬라이드와 무관하게 배양 플라스크 또는 배양 접시내 10 % 우태 혈청, 제오신 (350 μg/ml), 및 블라스티사이드 (5 μ

g/ml)으로 보강된 배지 (글루타민을 가진 DMEM/F12)내 배양되었다. 이용 이전 18-24 시간에, 세포는 인간 TRPV1의 발현을 유도하기 위해 10 % 우태 혈청 및 독시사이클린 (1 $\mu\text{g/ml}$)으로 보강된 배지 (글루타민을 가진 DMEM/F12)내 인큐베이션되었다. 세포주는 마이코플라스마 감염에 대하여 일상적으로 시험되었다.

[0303] 프로테오리포솜 제제

[0304] 프로테오리포솜은 다른 곳에 [1] 이전과 같이 완충제 A에서 제조되었다. 각각의 프로테오리포솜 제제는 몇 개의 상이한 배양 플라스크로부터 기원하였다.

[0305] 소화 프로토콜

[0306] 유동 세포 내에서 단일 소화는 다른 곳에 [1] 기재된 바와 같이 수행되었다. 5 $\mu\text{g/ml}$ 트립신 및 5 $\mu\text{g/ml}$ Asp-N은 완충제 G 및 B, 각각에 용해되었다. 각각의 프로테아제로 유동 세포 내에서 소화는 실온에서 5 분 동안 수행되었다. 용출물에서 추가 소화는 12 %의 최종 농도로 포름산의 첨가에 의해 억제되었다.

[0307] 탠덤 질량 분광분석법을 이용한 액체 크로마토그래피

[0308] CHO-프로테오리포솜의 소화로부터 펩티드 샘플은, 이전에 기재된 바와 같이 [1], 스웨덴, 예테보리 소재 고텐버그 대학(Gothenburg University)내 프로테오믹스 코어 시설에서 분석되었다. 전체 탠덤 질량 스펙트럼은 트립신을 이용한 소화에 대하여 UniProtKB 방출 2013_04, (인간, [호모사피엔스]) 및 Asp-N을 이용한 소화에 대하여 방출 2015_06 (인간, [호모사피엔스])에 대한 MASCOT (Matrix Science, London, UK)에 의해 검색되었다. 열 단백체 디스커버(Thermo Proteome Discoverer) v. 1.3 (Thermo Scientific)은 MS/MS 기반 펩티드 및 단백질 식별을 유효화하는데 사용되었다. 펩티드 수준에 관한 0.01의 위발견율은 역전된 데이터베이스의 검색에 의해 이용 및 결정되었다.

[0309] 항체 개발

[0310] N-말단측상의 추가의 시스테인 잔기를 포함하는, hTRPV1의 아미노산 서열과 관련하여aa96-117 및 aa785-799의 합성 펩티드는 합성 및 정제되었다. 펩티드는 그 다음 시스테인 잔기에 의해 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH)에 연결되었고 그 다음 특이적 무병원체 (SPF) 토끼의 면역화 이어서 KLH 연결된 펩티드의 주사에 의해 다클론성 항체를 생산하는데 사용되었다. 항체는 정제되었고 ELISA 시험에 적용되었다. 양쪽 합성 펩티드 및 다클론성 항체의 생성은 Innovagen AB (Lund, Sweden)에 의해 수행되었다.

[0311] 항체는 새롭게 해동된 채 팁-초음파처리의 30 분 내에 사용되었다. 항체는, Sonics & Materials Inc. (Newtown, CT, USA)로부터 비브라 셀(Vibra Cell) VCX 600을 이용하여, 1 분의 휴지로 공간을 두는, 14 % 진폭에서 3회 초음파처리되었다. 총 초음파처리 시간은 탐침에 의한 가열을 감소시키기 위해 0.5 s 펄스 시간 및 0.5 s 휴지 시간을 가진 40 s이었다.

[0312] 전기생리학

[0313] 역전(Inside-out) 기록은 HEKA EPC10 (Heka Elektronik, Germany) 패치 클램프 증폭기와 함께 패치 클램프 기록 (Dynaflow, Celectricon AB, Goeteborg, Sweden)용 미세유체 디바이스를 이용하여 수행되었다. 배쓰 및 피펫 용액은 완충제 C를 함유하였다. 패치는 +60 mV에서 고정되었고 전류 신호는 20 kHz의 샘플링 빈도 및 5 kHz에서 여과된 낮은 통과로 기록되었다.

[0314] OTV1에 대하여, 전류 진폭은, 항체와 무관하게, 캡사이신에, 몇 개의 이온 채널을 함유하는, 패치를 노출시킴으로써 측정되었다. 대조군은 30 s 동안 완충제 D내 1 μM 캡사이신에, 그 다음 70 s 동안 완충제 D 및 그 다음 다시 30 s 동안 완충제 D내 1 μM 캡사이신에 노출되었다. OTV1 처리된 패치는 30 s 동안 완충제 D내 1 μM 캡사이신에, 그 다음 70 s 동안 완충제 D내 0.14 mg/ml 항체 및 그 다음 30 s 동안 완충제 D내 0.14 mg/ml 항체와 함께 1 μM 캡사이신에 노출되었다. OTV2에 대하여, 전류 진폭은, 항체 및 칼모듈린/ Ca^{2+} 와 무관하게, 캡사이신에 패치를 노출시킴으로써 측정되었다. 대조군은 30 s 동안 완충제 E내 1 μM 캡사이신에 노출되었고, 그 다음 70 s 동안 완충제 E내 0.5 μM 칼모듈린 및 50 μM Ca^{2+} 에 노출 및 그 다음 다시 30 s 동안 완충제 E내 1 μM 캡사이신에 노출되었다. 항체 처리된 패치는 30 s 동안 완충제 E내 1 μM 캡사이신, 그 다음 70 s 동안 완충제 E내 0.14 mg/ml 항체, 0.5 μM 칼모듈린 및 50 μM Ca^{2+} 및 그 다음 30 s 동안 완충제 E내 0.14 mg/ml 항체, 0.5 μM 칼모듈린 및 50 μM Ca^{2+} 와 함께 1 μM 캡사이신에 노출되었다. 처리 이후 밀봉 저항으로 주로 시프트한 측정은 추가 분석으로부터 제외되었다.

- [0315] *데이터 분석 전기생리학*
- [0316] 전체 측정에 대하여, 항체 처리 이후 활성은, 재발성 활성화에서 비롯한 탈감작 또는 강화작용의 임의의 효과를 배제하기 위해, 단지 완충제에 노출 이후 활성과 비교되었다. 전류 미량을 함유한 데이터에 대하여, 전류-시간 적분 면적은 OTV1에 대하여 적용과 제거 사이 그리고 OTV2에 대하여 전체 활성화 (10s 후)와 제거 사이 캡사이신을 이용한 각각의 활성화를 위한 Fitmaster (HEKA Elektronik, Germany) 및 Matlab (Mathworks, MA, USA)를 이용하여 산출되었다. 제2 및 제1 전류에 대한 적분 면적 사이 비는 산출되었고 처리 사이 비교되었다. OTV2에 대하여, 데이터 포인트는 효과의 시간 의존적 감소로 인해 2개 카테고리 (팁 초음파처리 이후 <15 분 및 팁-초음파처리 이후 < 30 분)로 그룹화되었다.
- [0317] 통계적인 분석은 해당하는 경우 던넛 후-hoc 시험 및 스튜던트 T-시험과 조합으로 변동의 일방식 분석으로 수행되었다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의미한 것으로 고려되었다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(SEM)로 나타낸다.
- [0318] *전기천공*
- [0319] 세포질 항체 전달은 Neon 형질감염 시스템 (Life Technologies)을 이용하여 수행되었다. 부착 CHO 세포는 아큐타제를 이용하여 탈착되었고 완충제 F로 세정되었다. 105 세포는 펠렛화되었고 어느 한쪽의 완충제 F, 완충제 F 내 0.14 mg/ml OTV1 또는 완충제 F내 0.27 mg/ml OTV2에서 재현탁되었다. 10 μ l의 세포/항체 현탁제는 네온 피켓 팁을 이용하여 피켓팅되었고 시스템 피켓 스테이션에서 전기천공에 적용되었다. 항체 전달 [5]에 최적화된 프로토콜은 이용되었고, 여기서 세포는 10 ms 동안 및 3 펄스로 1550 V에 노출되었다. 전기천공된 세포는 유리 바닥 접시 (Willco wells)에 이동되었다.
- [0320] *이미지형성*
- [0321] 면역세포화학 및 TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수를 통한 항체 국재화는 형광 현미경사진으로부터 관심 영역 (ROI) 측정을 이용하여 측정되었다. 현미경사진은 ThorImageLS 소프트웨어 (Thorlabs Inc, New Jersey, U.S.A.)에 Galvo:Resonant 스캐너 및 고-감수성 GaAsP PMTs 기록이 구비된, Thorlabs CLS 시스템을 이용하여 형성되었다. 스캐너 유니트는 오일 액침 63 \times NA 1.47 Leica HCX PL APO 대물 렌즈가 구비된 Leica DMIRB 현미경상에 실장되었다. 형광 검출은, Coherent Sapphire 488 LP 레이저 (Coherent Inc., CA, U.S.A.)를 이용하여 488 nm에 여기하는, 단일 세포로부터 측정되었고 방출은 500-550 nm 사이 수집되었다. ROI 데이터는 이미지 J 및 Matlab (Mathworks, MA, U.S.A.)를 이용하여 분석되었다.
- [0322] *면역세포화학*
- [0323] 세포는 유리 바닥 접시 (Willco wells)상에 배양되었고 TRPV1 발현은 이용 이전 18-24 시간에 일부 접시에서 유도되었다. 세포 발현 TRPV1 및 비-유도 세포를 함유하는 양쪽 접시는 완충제 F로 세정되었고 그 다음 고정되었고 이미지-iT[®] 고착/투과화 키트 (Invitrogen)를 이용하여 고정 및 투과되었다. 고정 및 투과된 세포는 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 완충제 F내 25 μ g/ml 항체에 적용되었고, 그 다음 완충제 F로 세정된 다음 실온에서 30분 동안 염소 항-토끼 Alexa 488 2차 항체로 인큐베이션되었다. 세포는 최종 세정 단계 이후 시각화되었고 항체 분포는 유도와 비-유도 세포 사이 비교되었다.
- [0324] *TRPV1 매개된 YO-PRO 흡수*
- [0325] 10 μ l의 전기천공된 세포를 함유하는 유리 바닥 접시는 현미경에 실장되었다. 기록은 0.5 Hz의 속도로 개시되었다. OTV1에 대하여 완충제 F내 캡사이신, YO-PRO 및 K4BAPTA를 함유하는 20 μ l 액적은 탈착을 최소화하기 위해 전기천공된 세포상에 주의하여 피켓팅되어, 1 μ M 캡사이신, 1 μ M YO-PRO 및 10 mM K₄BAPTA의 최종 농도를 유발하였다. OTV2에 대하여 완충제 F내 캡사이신, YO-PRO 및 Ca²⁺를 함유하는 20 μ l 액적은 1 μ M 캡사이신, 1 μ M YO-PRO 및 50 μ M Ca²⁺의 최종 농도를 유발하는 전기천공된 세포상에 유사하게 피켓팅된다.
- [0326] 상기 기재된 구현에는 본 발명의 몇개 예시적인 예로서 이해된다. 본 발명의 범위에서 이탈 없이 구현에 다양한 변형, 조합 및 변화가 실시될 수 있다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다. 특히, 상이한 구현예에서 상이한 부분 용액은, 기술적으로 가능한 경우, 다른 배치구성으로 조합될 수 있다.
- [0327] 참조문헌
- [0328] 1 Jansson, E. T.; et. al., *Anal. Chem.* 2012, 84: 5582-5588

- [0329] 2 국제 출원 번호 WO 2006/068619
- [0330] 3 유럽 특허 출원 번호 EP 2174908
- [0331] 4 Trkulja, C. L., 등, *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136: 14875-14882
- [0332] 5 Freund, G. 등, *MAbs*, 2013, 5: 518-522
- [0333] **실시예 3**
- [0334] **다중 프로테아제를 이용하는, CHO 세포에서 발현된 이온 채널 TRPV1의 질량 분광분석법 및 제한된 소화에 의한 펩티드 식별**
- [0335] 본 실시예는 TRPV1로부터 펩티드의 프로테아제-특이적 세트를 식별하기 위해 병렬로 다중 프로테아제의 용도를 기재한다. 이 실시예에서 사용된 프로테아제는 트립신, Asp-N, 펩신, 프로테이나제 K 및 키모트립신이다. 서로 비교된 경우, 펩티드의 프로테아제-특이적 세트는 중첩성, 상보적, 또는 특유일 수 있다. 상이한 단백분해 활성은 상이한 프로테아제 농도를 이용함으로써 그리고 상이한 인큐베이션 시간 이용에 의한 몇개 예에서 달성되었다.
- [0336] **물질 및 방법**
- [0337] **세포 배양**
- [0338] 간단히 말해서, CHO 세포는 Trkulja 등 (*J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 14875-14882)에 따라 배양되었다. 간단히 말해서, 테트라사이클린-조절된 발현 시스템 (T-REx)을 가진 부착 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포는 T175 또는 T500 배양 플라스크 (Nunc)에서 또는 유리 접시 상에 10% FBS, 제오신 (350 $\mu\text{g/mL}$), 및 블라스티사이드인 (5 $\mu\text{g/mL}$)으로 보강된 배지 (글루타민을 가진 DMEM/F12)에 배양되었다. 이용 이전 (18-24 h), 세포는 인간 TRPV1의 발현을 유도하기 위해 10% FBS 및 독시사이클린 (1 $\mu\text{g/mL}$)으로 보강된 배지 (글루타민을 가진 DMEM/F12)에 인큐베이션되었다. 세포주는 마이크로플라스마 감염에 일상적으로 시험되었다. 세포 수확 이후, 세포는 -80 도에서 냉동 및 저장되었다. 세포는 아래에 기재된 바와 같이 추가 가공되었다.
- [0339] **세포 용해 및 균질화**
- [0340] 세포 현탁제는 3 분 동안 580xg로 원심분리되었다. 상청액은 폐기되었고 튜브는 4 mL의 빙랭 PBS로 주의하여 채워졌다. 세포 펠렛은 주의하여 재현탁되었고 그 다음 튜브는 빙랭 PBS로 최대 14 ml 토핑되었다. 세포 현탁제는 다시 3 분 동안 580xg로 원심분리되었고, 그 절차는 2회 반복되었다.
- [0341] 세포 펠렛 (~800 μl 용적)은 대략 6 mL의 세포용해 완충제 (10 mM NaHCO₃, pH 7.4)에 재현탁되었고 10 분 동안 빙상에서 유지되었다.
- [0342] 세포용해 완충제내 세포는 그 다음, 각각의 세포 현탁제에 대하여 하나인, 다운스(Dounce) 균질기 (7 ml)에 이동되었다. 세포는 그 다음 20 스트로크를 이용하는 빠박한 막자로 균질화에 적용되었다. 균질화 이후, 용해된 세포는 3 분 동안 580xg, 원심분리 단계에 적용되었다. 상청액은 수집되었고 세포 펠렛은 폐기되었다. 상청액은 3 분 동안 580xg, 제2 원심분리 단계에 적용되었고 세포 펠렛 (소형)은 폐기되었다.
- [0343] 상청액은 풀링되었고 베크만 원심관 (50 ml)에 이동되었고 세포용해 완충제는 최대 20 ml 첨가되었다. 상청액은 10 분 동안 7300xg에서 원심분리되어 미토콘드리아 및 세포 잔해를 제거하였다. 상청액은 2개의 팔콘 튜브 (10 ml 각각)로 분할되었고 추가 가공을 위하여 -80 냉동고에서 냉동되었다.
- [0344] **초원심분리**
- [0345] 상청액은 얼음에서 해동되었고 2개의 베크만 투명 초원심분리 튜브 (Beckman Coulter, 품목 번호 344057)에 이동되었다. 튜브는 빙랭 완충제 (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8)으로 토핑되었고 SW55 Ti 회전자 (Beckman Coulter)를 이용하여 45 분 동안 100,000xg (32900 rpm)에서 원심분리 이전 주의하여 균형을 맞춰졌다. 상청액은 폐기되었고 펠렛은 빙랭 완충제 (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8)에서 재현탁되었고 튜브는 다시 동일한 빙랭 완충제로 토핑되었다. 45 분 동안 100,000xg (32900 rpm)에서 주의 깊은 밸런싱 및 원심분리 이후, 상청액은 폐기되었고 펠렛은 빙랭 완충제 (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8)에서, 대략 800 μl / 펠렛으로 재현탁되었다. 전체로 대략 1.6 ml의 막 제제는 -80 도에서 수집 및 냉동되었다.
- [0346] **팁초음파처리**

- [0347] 냉동된 막 제제는 얼음에서 해동되었고 초음파발생장치 (Vibracell)를 이용하여 빙랭 원뿔형 바이알에서 초음파 처리 이전 함께 풀링되었다. 막 제제는 빙랭 완충제 (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8)으로 4 ml로 먼저 희석되었고 15% 진폭, 0.5 제2 펄스/휴지 사이클을 이용하는 30 초의 초음파처리에 적용되었다. 원뿔형 바이알 및 막 제제는 그 다음 얼음에서 몇 분 동안 냉각되었고 그 다음 30 초 동안 15% 진폭, 0.5 제2 펄스/휴지를 이용하는 또 다른 사이클은 막 제제에 적용되었고 이는 다시 반복되었다. 수득한 막 제제 (프로테오리포솜)는 -80 도로 310 μ l 분취액에 냉동되었다.
- [0348] *프로테아제*
- [0349] 전체 프로테아제는 Promega로부터 구매되었다. 전체 용액은 Fisher Scientific으로부터 LC-MS 등급 물을 이용하여 제조되었다.
- [0350] Cat. No. V1621
- [0351] Asp-N, 서열분석 등급, 2 μ g
- [0352] Cat. No. V1959
- [0353] 펩신, 250 mg
- [0354] Cat. No. V3021
- [0355] 프로테이나제 K, 100 mg
- [0356] Cat. No. V1062
- [0357] 키모트립신, 서열분석 등급, 25 μ g
- [0358] Cat. No. V5111
- [0359] 서열분석 등급 변형된 트립신, 20 μ g
- [0360] **트립신**
- [0361] 트립신은 100 mM 중탄산암모늄, Ambic, pH 8에 용해되었다
- [0362] **Asp-N**
- [0363] Asp-N은 100 mM 중탄산암모늄, Ambic, pH 8에 용해되었다
- [0364] **펩신**
- [0365] 펩신은 100 mM 중탄산암모늄, Ambic, pH 8에 용해되었다
- [0366] **프로테이나제 K**
- [0367] 프로테이나제 K는 100 mM 중탄산암모늄, Ambic, pH 8에 용해되었다
- [0368] **키모트립신**
- [0369] 키모트립신은 100 mM 트리스-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8에 용해되었다.
- [0370] *LPI 가공*
- [0371] 실험은 소화용 LPI HexaLane-칩을 이용하여 수행되었다. 각각의 칩 내에서 하나의 레인은 하나의 소화액에 사용되었다. 간단히 말해서, 프로테오리포솜의 분취액은 실온으로 해동되었고, 100 μ l 피펫을 이용하여 레인 속에 수작업으로 주사되었고 1시간 동안 고정되었다.
- [0372] 레인의 세정은 또한 100 μ l 피펫을 이용하여 수작업으로 수행되었다. 각각의 웰들은 200 μ l 세정 완충제로 세정되었다 (소화 완충제과 동일, 100 mM Ambic pH 8이 세정 완충제로서 사용된 펩신 소화 프로토콜 제외. 이는 장시간 동안 유동 세포에서 낮은 pH를 피하기 위해 실시되었다). 레인은 그 다음 100 μ l 피펫을 이용하여 4 x 100 μ l의 세정 완충제로 세정되었다.
- [0373] 그 다음 프로테아제는 레인 속에 주사되었고 아래 상세에 따라 인큐베이션되었다. 소화 이후 펩티드는 200 μ l의 소화 완충제 (2 x 100 μ l)을 이용하여 레인으로부터 용출되었다. 4 μ l의 포름산 첨가에 의해, 프로테아제

활성은 수득한 펩티드 용액을 약 pH 2로 산성화시킴으로써 중단되었다. 이는 펩신을 제외한 전체 샘플에 대하여 실시되었고, 여기서 16 μ l의 암모니아 용액 (25%)은 용액을 염기성 (pH 9)으로 만들기 위해 대신 첨가되었다.

- [0374] 하기 소화 조건이, 각 레인에 하나씩, 수행되었다:
- [0375] 트립신:
- [0376] 2.5 분 동안 0.5 μ g/ml
- [0377] 5 분 동안 0.5 μ g/ml
- [0378] 5 분 동안 2 μ g/ml
- [0379] 5 분 동안 5 μ g/ml
- [0380] 5 분 동안 10 μ g/ml
- [0381] 5 분 동안 20 μ g/ml
- [0382] Asp-N
- [0383] 5 분 동안 20 μ g/ml
- [0384] 24시간 동안 2 μ g/ml
- [0385] 키모트립신
- [0386] 5 분 동안 5 μ g/ml
- [0387] 5 분 동안 10 μ g/ml
- [0388] 5 분 동안 20 μ g/ml
- [0389] 프로테이나제-K
- [0390] 5 분 동안 5 μ g/ml
- [0391] 5 분 동안 10 μ g/ml
- [0392] 5 분 동안 20 μ g/ml
- [0393] 펩신
- [0394] 5 분 동안 2 μ g/ml
- [0395] 5 분 동안 5 μ g/ml
- [0396] 5 분 동안 10 μ g/ml
- [0397] 5 분 동안 20 μ g/ml
- [0398] 샘플은 표지되었고 -80 °C에서 냉동되었다.
- [0399] MS 분석
- [0400] 트립신 펩티드는 제조자 지침에 따라 PepClean C18 스핀 칼럼 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)에서 탈염되었고, 건조되었고 3% 구배 등급 아세토니트릴 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)내 0.1% 포름산 (Sigma Aldrich, St Louis, MO)의 15 마이크로-리터로 재구성되었다. 2 마이크로-리터 샘플 주사는 Easy-nLC 자동시료주입기 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)로 실시되었고 접속된 Q Exactive 혼성 질량 분광분석기 (Thermo Fisher Scientific)로 분석되었다. 펩티드는 전치칼럼 (45 x 0.075 mm i.d.)에서 포획되었고 역상 칼럼, 200 x 0.075 mm에서 분리되었고, 3 μ m Reprosil-Pur C18-AQ 입자 (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany)로 인하우스 패키징되었다. 나노LC (액체 크로마토그래피) 구배는, 0.2% 포름산내 7% 아세토니트릴 (ACN)에서 시작하여, 200 nl/분으로 실시되었고, 25 분 동안 27% ACN으로 증가되었고, 그 다음 5 분 동안 40%로 그리고 마지막으로 5 분 동안 80% ACN으로 증가되었고 10 분 동안 80% ACN에서 유지되었다.
- [0401] 이온은 창출되었고 데이터-의존적 양이온 방식으로 1.8 kV의 전압 및 320 섭씨 온도의 모세관 온도하에 질량 분광분석기 속에 분무되었다. 전체 스캔 (MS1) 스펙트럼은 최대 250 ms에서 1e6의 AGC 표적 값일 때까지 70,000의

해상도에서 m/z 범위 400-1,600, 전하 범위 2-6에 걸쳐 오비트랩(Orbitrap)에서 획득되었다. MS/MS 스펙트럼은 110 ms의 주사 시간 동안 1e5의 AGC 표적 값일 때까지 2 Da의 전구체 단리 윈도우를 이용하는 35,000의 해상도에서 10개의 가장 풍부한 모 이온에 대하여 m/z 110으로부터 30%에서 더 높은 에너지 충돌 해리 (HCD)를 이용하여 획득되었다. MS/MS에 대하여 선택 이후 30 s 동안 동적 배제는 가능한 많은 전구체의 검출을 허용할 수 있게 되었다.

[0402] **결과의 요약**

[0403] 도 10은 트립신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 TRPV1의 3D 모델상의 위치를 보여준다. 트립신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 서열은 아래 표 2에서 보여진다. 2.5 분 동안 0.5 µg/ml 트립신으로 소화된 펩티드는 먼저 보여졌다. 5 분 동안 0.5 µg/ml 트립신, 5 분 동안 2 µg/ml 트립신, 5 분 동안 5 µg/ml 트립신, 5분 동안 10 µg/ml 트립신 및 5분 동안 20 µg/ml 트립신 각각으로 소화된 펩티드는 제시 목적으로 풀링되었고 두 번째로 보여진다.

표 2

2.5 분 동안 0.5 µg/ml 트립신으로 소화된 펩티드 (*)		
개시	중단	서열
96	108	LLSQDSVAASTEK (서열 식별 번호:2)
96	111	LLSQDSVAASTEKTLR (서열 식별 번호:3)
817	839	QFSGSLKPDAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:4)
5 분 동안 0.5 µg/ml 트립신, 5 분 동안 2 µg/ml 트립신, 5 분 동안 5 µg/ml 트립신, 5 분 동안 10 µg/ml 트립신 및 5 분 동안 20 µg/ml 트립신으로 소화된 펩티드. (**)		
개시	중단	서열
4	18	WSSTDLGAAADPLQK (서열 식별 번호:27)
96	108	LLSQDSVAASTEK (서열 식별 번호:28)
96	111	LLSQDSVAASTEKTLR (서열 식별 번호:29)
162	182	AMLNLHDGQNTTIPLLEIAR (서열 식별 번호:30)
183	201	QTDSLKELVNASYTDSEYK (서열 식별 번호:31)
202	212	GQTALHIAIER (서열 식별 번호:32)
214	239	NMALVTLLEVENGADVQAAAHGDFFKK (서열 식별 번호:33)
267	281	FLLQNSWQTADISAR (서열 식별 번호:34)
282	304	DSVGNTVLHALVEVADNTADNTK (서열 식별 번호:35)
320	332	LHPTLKEELTNK (서열 식별 번호:36)
333	346	KGMTPLALAAGTGK (서열 식별 번호:37)
334	346	GMTPLALAAGTGK (서열 식별 번호:38)
347	356	IGVLAYILQR (서열 식별 번호:39)
703	711	AITILDTEK (서열 식별 번호:40)
773	779	TLSFSLR (서열 식별 번호:41)
790	798	NFALVPLLR (서열 식별 번호:42)
799	816	EASARDRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:43)
804	816	DRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:44)
806	816	QSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:45)
817	831	QFSGSLKPDAEVFK (서열 식별 번호:46)
817	839	QFSGSLKPDAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:47)

[0404]

[0405] 도 11은 Asp-N에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 TRPV1의 3D 모델상의 위치를 보여준다. Asp-N에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 서열은 아래 표 3에서 보여진다. 5분 동안 20 µg/ml Asp-N으로

소화된 펩티드는 먼저 보여진다. 24시간 동안 2 µg/ml Asp-N으로 소화된 펩티드는 두 번째로 보여진다.

표 3

5 분 동안 20 µg/ml Asp-N 으로 소화된 펩티드 (*)		
개시	중단	서열
89	99	DGPTGARLLSQ (서열 식별 번호:8)
826	839	DAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:9)
24 시간 동안 2 µg/ml Asp-N 으로 소화된 펩티드 (**)		
개시	중단	서열
89	99	DGPTGARLLSQ (서열 식별 번호:48)
100	113	DSVAASTEKTLRLY (서열 식별 번호:49)
168	184	DGQNTTIPLLLLEIARQT (서열 식별 번호:50)
185	196	DSLKELVNASYT (서열 식별 번호:51)
282	296	DSVGNTVLHALVEVA (서열 식별 번호:52)
826	839	DAEVFKSPAASGEK (서열 식별 번호:53)

[0406]

[0407]

도 12는 키모트립신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 TRPV1의 3D 모델상의 위치를 보여준다. 키모트립신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 서열은 아래 표 4에서 보여진다. 5분 동안 5 µg/ml 키모트립신으로 소화된 펩티드는 먼저 보여진다. 5분 동안 10 µg/ml 키모트립신 및 5분 동안 20 µg/ml 키모트립신 각각으로 소화된 펩티드는 제시 목적으로 풀링되었고 두 번째로 보여진다.

표 4

5 분 동안 5 µg/ml 키모트립신으로 소화된 펩티드 (*)			
개시	중단	서열	
98	110	SQDSVAASTEKTL (서열 식별 번호:10)	
819	830	SGSLKPDAEVF (서열 식별 번호:11)	
5 분 동안 10 µg/ml 키모트립신 및 5 분 동안 20 µg/ml 키모트립신으로 소화된 펩티드 (**)			
개시	중단	서열	
97	110	LSQDSVAASTEKTL (서열 식별 번호:54)	
98	110	SQDSVAASTEKTL (서열 식별 번호:55)	
98	113	SQDSVAASTEKTLRLY (서열 식별 번호:56)	
165	176	NLHDGQNTTIPL (서열 식별 번호:57)	
221	237	LVENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:58)	
274	289	QTADISARDSVGNTVL (서열 식별 번호:59)	
290	305	HALVEVADNTADNTKF (서열 식별 번호:60)	
341	352	AAGTGKIGVLAY (서열 식별 번호:61)	
819	830	SGSLKPDAEVF (서열 식별 번호:62)	

[0408]

[0409]

도 13은 펩신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 TRPV1의 3D 모델상의 위치를 보여준다. 펩신에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 서열은 아래 표 5에서 보여진다. 5분 동안 2 µg/ml 펩신으로 소화된 펩티드가 먼저 보여진다. 5분 동안 5 µg/ml 펩신, 5분 동안 10 µg/ml 펩신 및 5분 동안 20 µg/ml 펩신 각각으로 소화된 펩티드는 제시 목적으로 풀링되었고 두 번째로 보여진다.

표 5

5 분 동안 2 µg/ml 펩신으로 소화된 펩티드 (*)		
개시	중단	서열
221	236	LVENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:7)
5 분 동안 5 µg/ml 펩신, 5 분 동안 10 µg/ml 펩신 및 5 분 동안 20 µg/ml 펩신으로 소화된 펩티드 (**)		
개시	중단	서열
50	59	FGKGDSEEF (서열 식별 번호:63)
167	177	HDGQNTTIPLL (서열 식별 번호:64)
221	236	LVENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:65)
222	235	VENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:66)
222	236	VENGADVQAAAHGDF (서열 식별 번호:67)
290	305	HALVEVADNTADNTKF (서열 식별 번호:68)
293	305	VEVADNTADNTKF (서열 식별 번호:69)
398	414	EVIAYSSSETPNRHDML (서열 식별 번호:70)

[0410]

[0411]

도 14는 프로테이나제 K에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 TRPV1의 3D 모델상의 위치를 보여준다. 프로테이나제 K에 의해 제한된 단백질분해 이후 검출된 펩티드의 서열은 아래 표 6에서 보여진다. 5 분 동안 5 µg/ml 프로테이나제 K로 소화된 펩티드가 먼저 보여진다. 5 분 동안 10 µg/ml 프로테이나제 K, 및 5분 동안 20 µg/ml 프로테이나제 K 각각으로 소화된 펩티드는 제시 목적으로 풀링되었고 두 번째로 보여진다.

표 6

5 분 동안 5 µg/ml 프로테아제 K 로 소화된 펩티드 (*)		
개시	중단	서열
78	89	VSPVITIQRPGD (서열 식별 번호:12)
78	94	VSPVITIQRPGDGPTGA (서열 식별 번호:13)
164	178	LNLHDGQNTTIPLLL (서열 식별 번호:14)
195	203	YTDSYYKGQ (서열 식별 번호:15)
606	614	SLPSESTSH (서열 식별 번호:16)
762	772	EDPGNCEGVKR (서열 식별 번호:17)
804	816	DRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:18)
806	816	QSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:19)
5 분 동안 10 µg/ml 프로테아제 K, 및 5 분 동안 20 µg/ml 프로테아제 K 로 소화된 펩티드 (**)		
개시	중단	서열
78	94	VSPVITIQRPGDGPTGA (서열 식별 번호:71)
84	95	IQRPGDGPTGAR (서열 식별 번호:72)
86	97	RPGDGPTGARLL (서열 식별 번호:73)
164	178	LNLHDGQNTTIPLLL (서열 식별 번호:74)
708	715	DTEKSFLK (서열 식별 번호:75)
762	772	EDPGNCEGVKR (서열 식별 번호:76)
762	773	EDPGNCEGVKRT (서열 식별 번호:77)
762	774	EDPGNCEGVKRTL (서열 식별 번호:78)
801	816	SARDRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:79)
804	816	DRQSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:80)
806	816	QSAQPEEVYLR (서열 식별 번호:81)

[0412]

[0413]

[0414]

[0415]

[0416]

표 2, 3, 4, 5 및 6에서 용어들 "개시" 및 "정지"는 TRPV1 서열에서 아미노산 잔기의 위치를 지칭한다.
 데이터의 평가 동안 0.01의 Mascot 유의성 역치는 결과 필터 (펩티드) 하에 설정되었다.
 트립신은 증가된 프로테아제 농도로 증가된 수의 펩티드 및 증가된 신뢰도를 생산하였다.
 펩신 및 키모트립신 둘 모두는 낮은 및 더 높은 농도 둘 모두에서 수많은 펩티드를 발생시켰다.

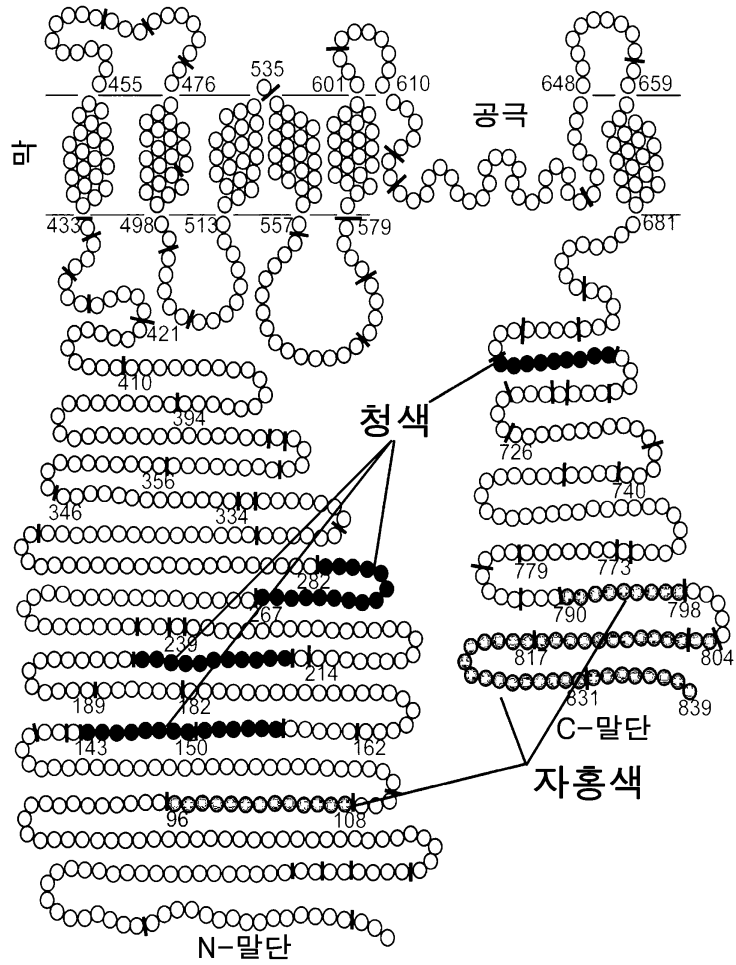
도면

도면1a



도면1b

(계속)

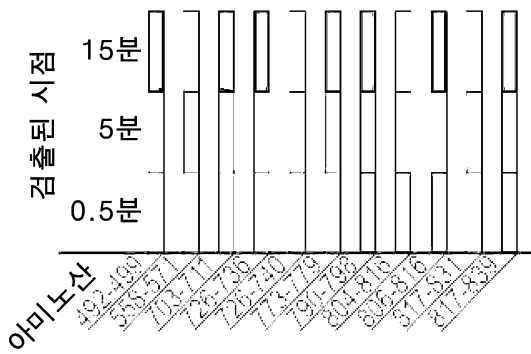


도면1c

(계속)



막투과성 영역 및
C-말단으로부터 소화된 펩티드



도면2a



도면2b



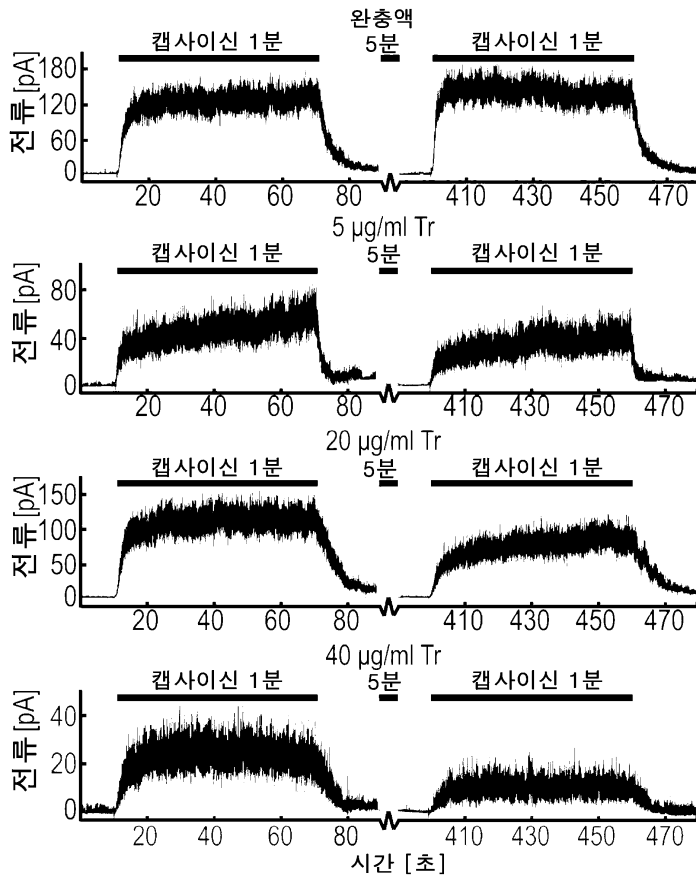
도면2c

(계속)

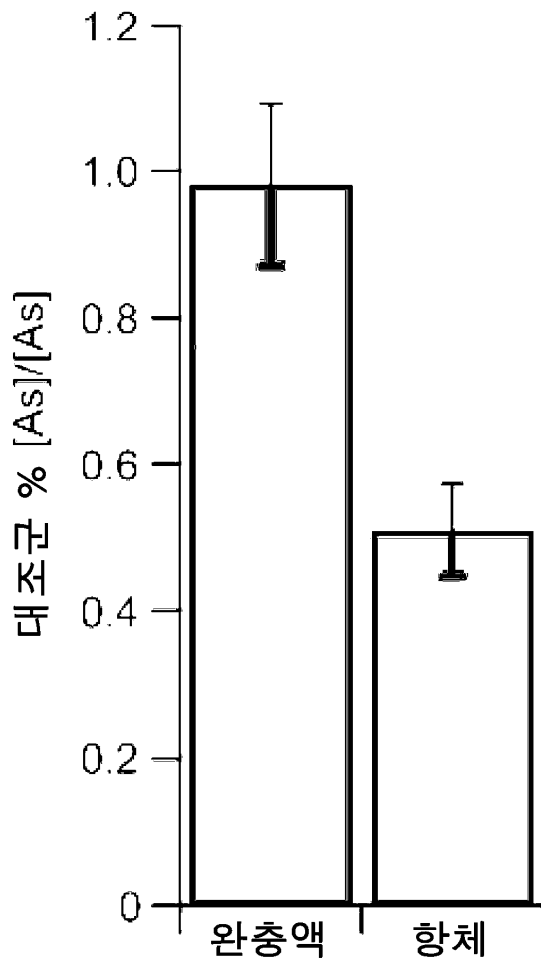


도면2d

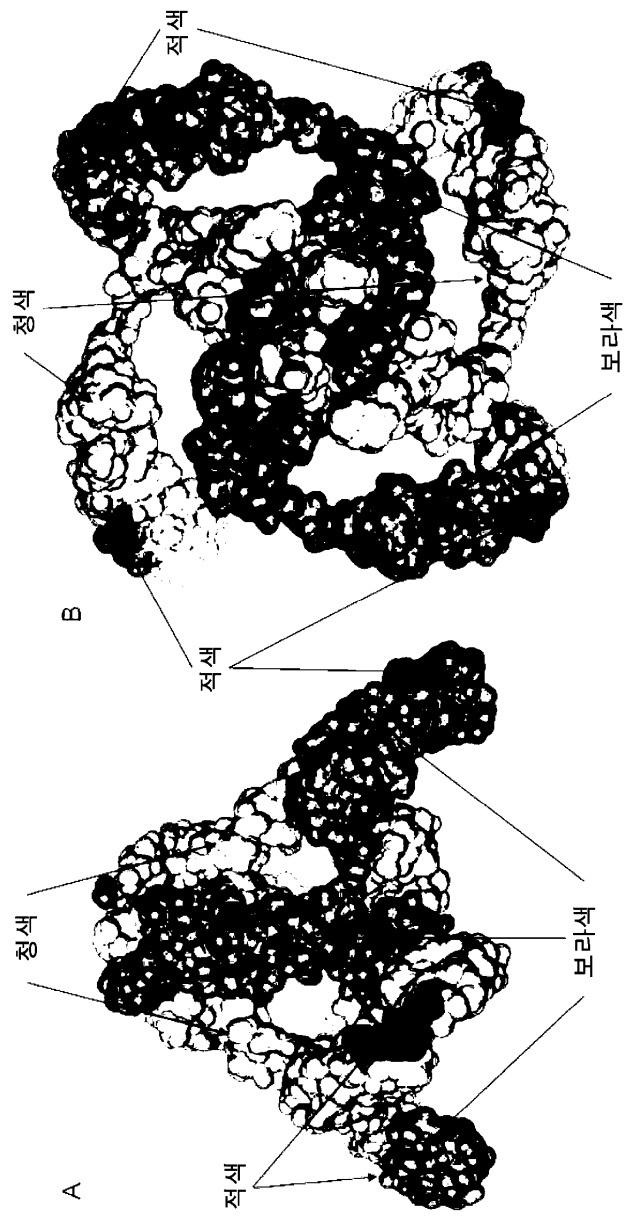
(계속)



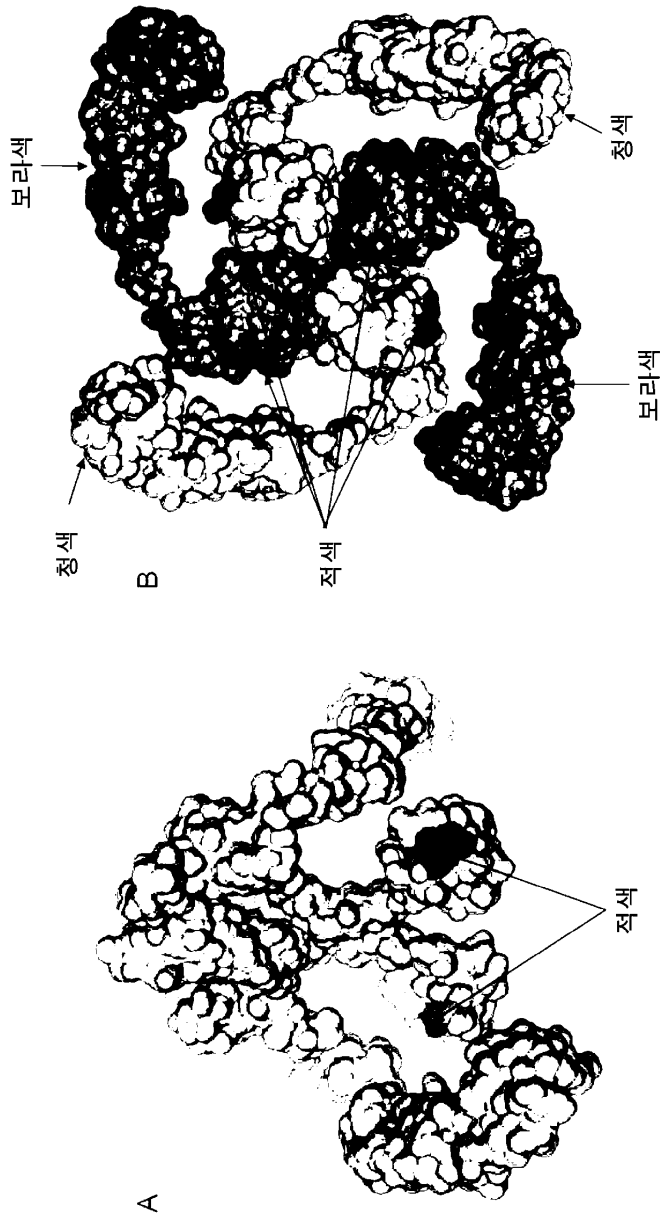
도면3



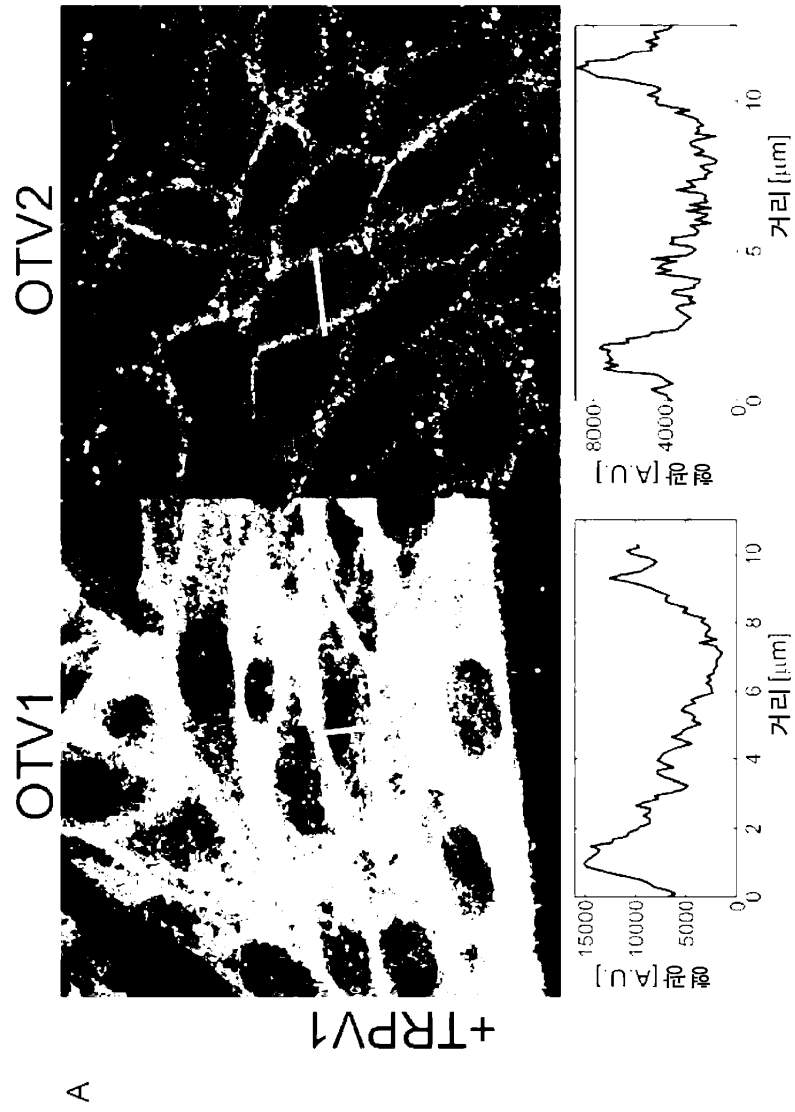
도면4



도면5

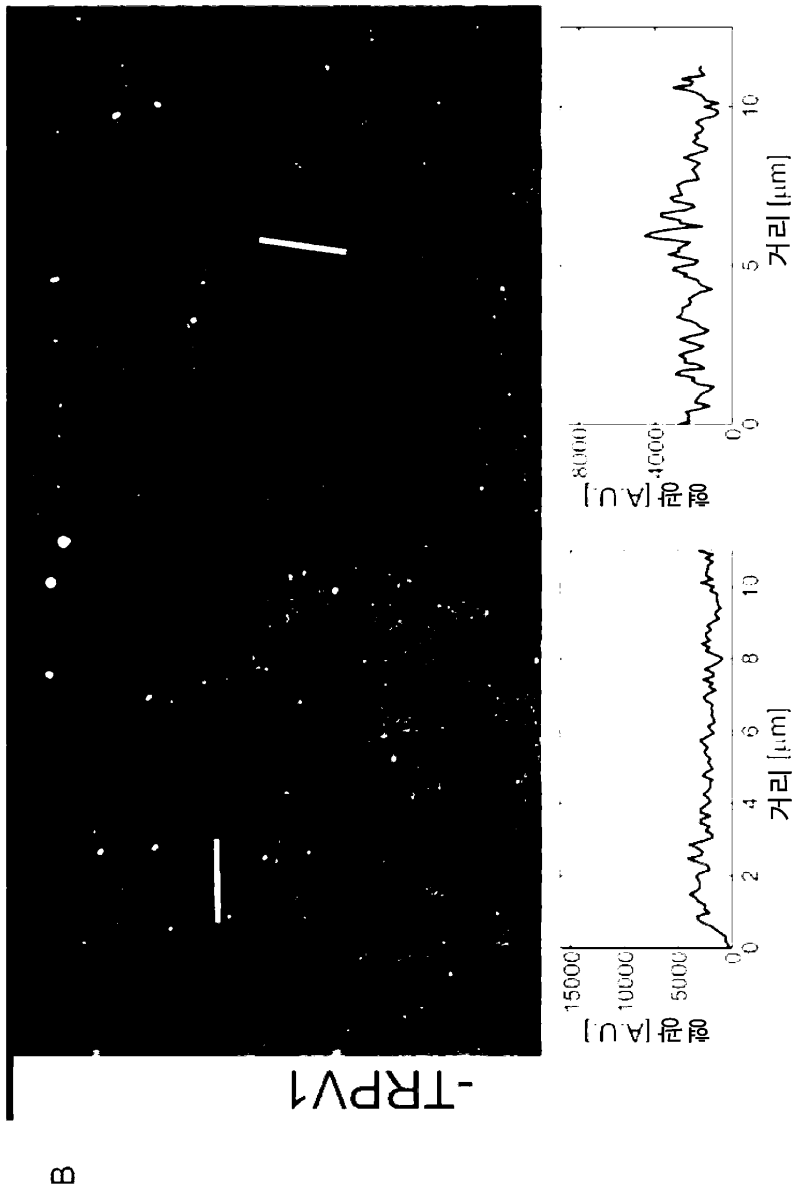


도면6a

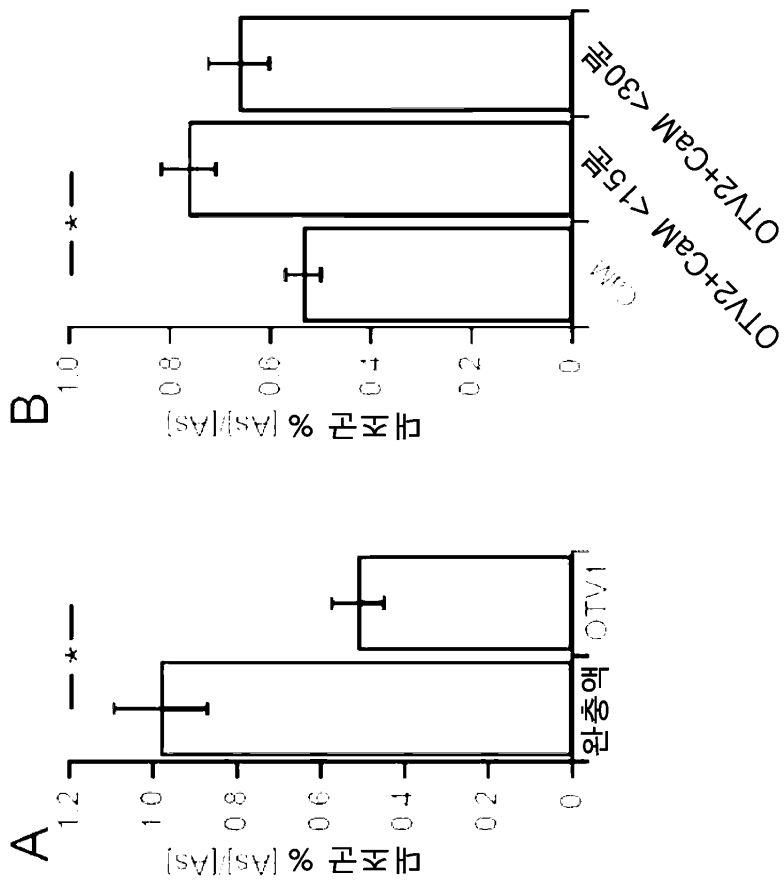


도면6b

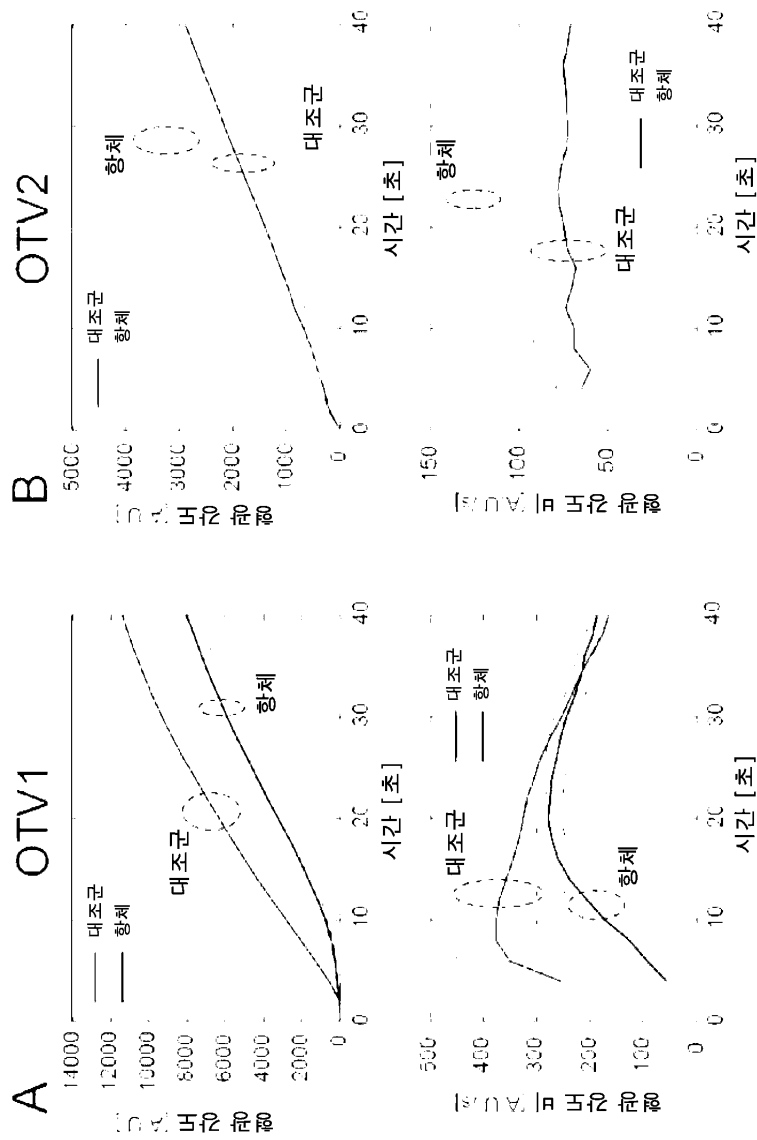
(계속)



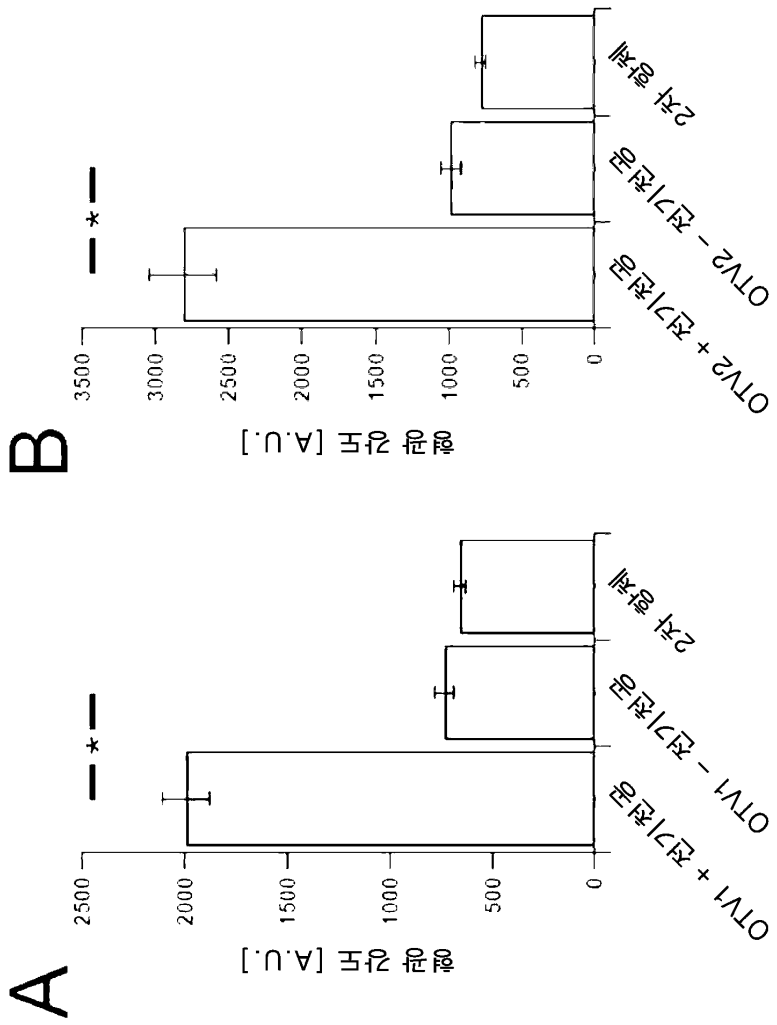
도면7



도면8



도면9



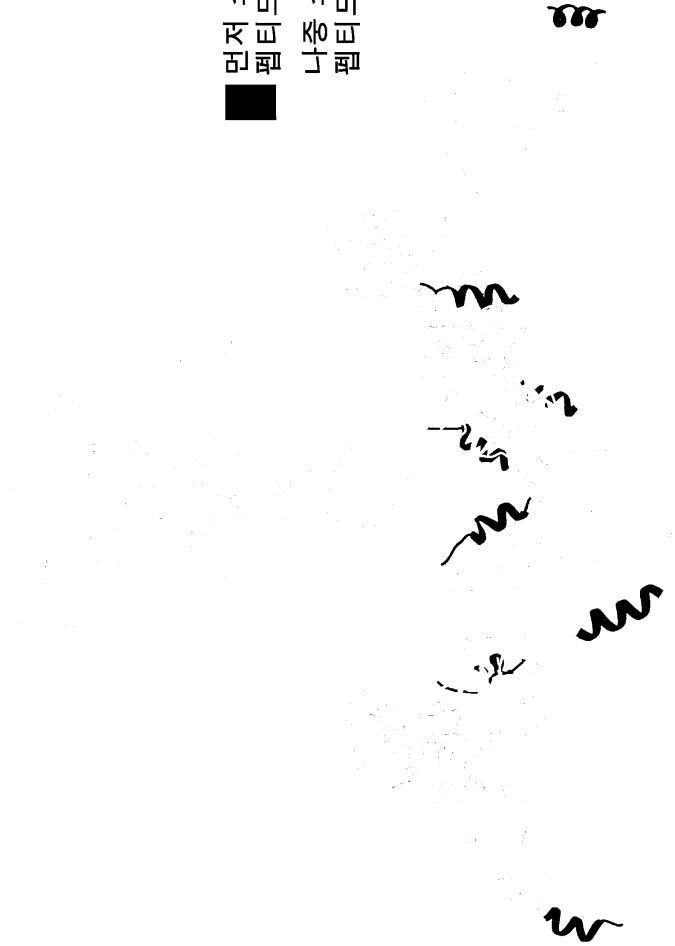
도면10

■ 먼저 소화된 펩티드, 트립신
나중 소화된 펩티드, 트립신



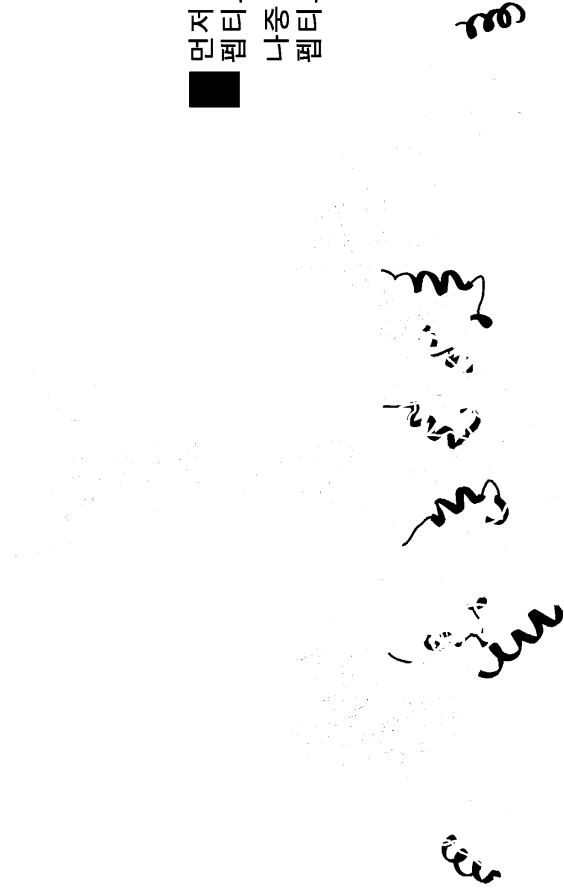
도면11

■ 먼저 소화된
펠티드, Asp-N
나중 소화된
펠티드, Asp-N



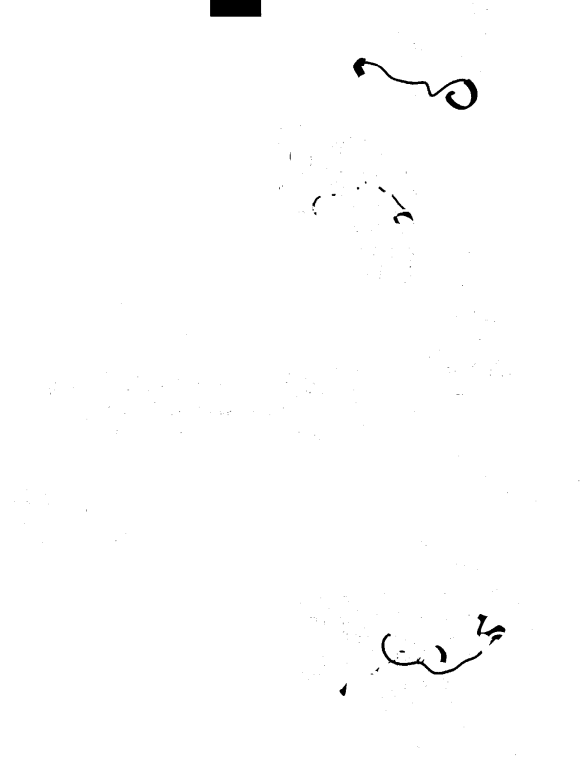
도면12

■ 먼저 소화된
펠티드, 키모트립신
나중 소화된
펠티드, 키모트립신

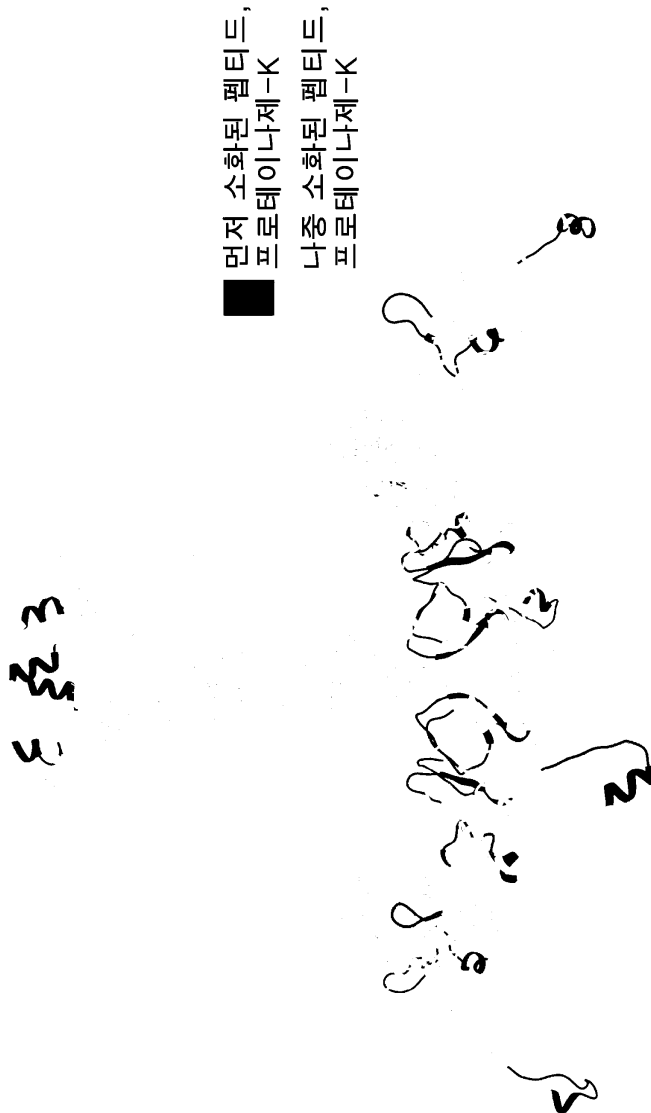


도면13

■ 먼저 소화된
펠티드, 펠신
나중 소화된
펠티드, 펠신



도면14



서열목록

- <110> Oblique Therapeutics AB
- <120> New methods for epitope selection
- <130> 69.15.127827
- <150> US 62/140,955
- <151> 2015-03-31
- <150> US 62/283,118
- <151> 2015-08-21
- <160> 81
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 839
- <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Lys Lys Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Gln Lys Asp Thr Cys Pro Asp Pro Leu Asp Gly Asp Pro Asn Ser Arg
 20 25 30
 Pro Pro Pro Ala Lys Pro Gln Leu Ser Thr Ala Lys Ser Arg Thr Arg
 35 40 45
 Leu Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe Pro Val Asp Cys Pro
 50 55 60
 His Glu Glu Gly Glu Leu Asp Ser Cys Pro Thr Ile Thr Val Ser Pro
 65 70 75 80
 Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu
 85 90 95
 Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg Leu
 100 105 110
 Tyr Asp Arg Arg Ser Ile Phe Glu Ala Val Ala Gln Asn Asn Cys Gln
 115 120 125
 Asp Leu Glu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Gln Lys Ser Lys Lys His Leu
 130 135 140
 Thr Asp Asn Glu Phe Lys Asp Pro Glu Thr Gly Lys Thr Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Lys Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu
 165 170 175
 Leu Leu Glu Ile Ala Arg Gln Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Val Asn
 180 185 190
 Ala Ser Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln Thr Ala Leu His Ile
 195 200 205
 Ala Ile Glu Arg Arg Asn Met Ala Leu Val Thr Leu Leu Val Glu Asn
 210 215 220
 Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe Phe Lys Lys Thr

Ser Val Leu Gly Gly Val Tyr Phe Phe Phe Arg Gly Ile Gln Tyr Phe
 485 490 495

Leu Gln Arg Arg Pro Ser Met Lys Thr Leu Phe Val Asp Ser Tyr Ser
 500 505 510

Glu Met Leu Phe Phe Leu Gln Ser Leu Phe Met Leu Ala Thr Val Val
 515 520 525

Leu Tyr Phe Ser His Leu Lys Glu Tyr Val Ala Ser Met Val Phe Ser
 530 535 540

Leu Ala Leu Gly Trp Thr Asn Met Leu Tyr Tyr Thr Arg Gly Phe Gln
 545 550 555 560

Gln Met Gly Ile Tyr Ala Val Met Ile Glu Lys Met Ile Leu Arg Asp
 565 570 575

Leu Cys Arg Phe Met Phe Val Tyr Ile Val Phe Leu Phe Gly Phe Ser
 580 585 590

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

Ser Glu Ser Thr Ser His Arg Trp Arg Gly Pro Ala Cys Arg Pro Pro
 610 615 620

Asp Ser Ser Tyr Asn Ser Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Glu Leu Phe Lys
 625 630 635 640

Phe Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Phe Thr Glu Asn Tyr Asp Phe
 645 650 655

Lys Ala Val Phe Ile Ile Leu Leu Leu Ala Tyr Val Ile Leu Thr Tyr
 660 665 670

Ile Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu Thr Val Asn
 675 680 685

Lys Ile Ala Gln Glu Ser Lys Asn Ile Trp Lys Leu Gln Arg Ala Ile
 690 695 700

Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys Cys Met Arg Lys Ala
 705 710 715 720

Phe Arg Ser Gly Lys Leu Leu Gln Val Gly Tyr Thr Pro Asp Gly Lys
 725 730 735

Asp Asp Tyr Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Asn Trp Thr Thr

740 745 750

Trp Asn Thr Asn Val Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu

755 760 765

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

770 775 780

Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu Ala

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys

835

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 2

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

1 5 10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 3

Leu Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg

1 5 10 15

<210> 4

<211> 23

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 4
 Gln Phe Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 5
 Leu Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asp Arg Arg Ser
 20

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 6
 Gly Arg His Trp Lys Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg Glu
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213>

> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 7

Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe

1 5 10 15

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 8

Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu Leu Ser Gln

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 9

Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys

1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 12
 Val Ser Pro Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 13
 Val Ser Pro Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly
 1 5 10 15

Ala

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 14
 Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 15
 Tyr Thr Asp Ser Tyr Tyr Lys Gly Gln
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 16
 Ser Leu Pro Ser Glu Ser Thr Ser His
 1 5

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 17
 Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg
 1 5 10

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 18
 Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 19
 Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg
 1 5 10

<210> 20

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 20
 Phe Ala Pro Gln Ile Arg Val Asn Leu Asn Tyr Arg Lys Gly Thr Gly
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 21
 Ala Ser Gln Pro Asp Pro Asn Arg Phe Asp Arg Asp Arg
 1 5 10

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 22
 Leu Asn Leu Lys Asp Gly Val Asn Ala Cys Ile Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 23

Cys Thr Asp Asp Tyr Tyr Arg Gly His
 1 5
 <210> 24
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 24
 Leu Val Glu Asn Gly Ala Asn Val His Ala Arg Ala Cys Gly Arg Phe
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 25
 Glu Asp Pro Ser Gly Ala Gly Val Pro Arg
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 26
 Gly Ala Ser Glu Glu Asn Tyr Val Pro Val Gln Leu Leu Gln Ser
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 27
 Trp Ser Ser Thr Asp Leu Gly Ala Ala Ala Asp Pro Leu Gln Lys
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 29

Leu Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu Arg

1 5 10 15

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 30

Ala Met Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu Leu

1 5 10 15

Leu Glu Ile Ala Arg

20

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Tyr Tyr Lys

<210> 32

<211

> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 32

Gly Gln Thr Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg

1 5 10

<210> 33

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 33

Asn Met Ala Leu Val Thr Leu Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln

1 5 10 15

Ala Ala Ala His Gly Asp Phe Phe Lys Lys

20 25

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 35

Asp Ser Val Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp

1 5 10 15

Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys

20

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 36

Leu His Pro Thr Leu Lys Leu Glu Glu Leu Thr Asn Lys

1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 37

Lys Gly Met Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys

1 5 10

<210> 38

<211>

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 38

Gly Met Thr Pro Leu Ala Leu Ala Ala Gly Thr Gly Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 39

Ile Gly Val Leu Ala Tyr Ile Leu Gln Arg

1 5 10
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 40
 Ala Ile Thr Ile Leu Asp Thr Glu Lys

1 5
 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 41
 Thr Leu Ser Phe Ser Leu Arg

1 5
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 42
 Asn Phe Ala Leu Val Pro Leu Leu Arg

1 5
 <210> 43
 <211> 18
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 43

Glu Ala Ser Ala Arg Asp Arg Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr
 1 5 10 15

Leu Arg

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 44

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

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 45

Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg

1 5 10

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 46

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

1 5 10 15

<210> 47

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 47

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

1 5 10 15
 Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys

20

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 48

Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu Leu Ser Gln

1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 49

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

1 5 10

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 50

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

1 5 10 15

Thr

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 51
 Asp Ser Leu Lys Glu Leu Val Asn Ala Ser Tyr Thr
 1 5 10

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 52
 Asp Ser Val Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Glu Val Ala
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 53
 Asp Ala Glu Val Phe Lys Ser Pro Ala Ala Ser Gly Glu Lys
 1 5 10

<210> 54
 <211> 14
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 54
 Leu Ser Gln Asp Ser Val Ala Ala Ser Thr Glu Lys Thr Leu
 1 5 10

<210> 55
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 55

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

1 5 10

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide sequence

<400> 56

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

1 5 10 15

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 57

Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu

1 5 10

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 58

Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe

1 5 10 15

Phe

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 59
 Gln Thr Ala Asp Ile Ser Ala Arg Asp Ser Val Gly Asn Thr Val Leu
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 60
 His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys Phe
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 61
 Ala Ala Gly Thr Gly Lys Ile Gly Val Leu Ala Tyr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence

<400> 62
 Ser Gly Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Val Phe
 1 5 10

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence
 <400> 63

Phe Gly Lys Gly Asp Ser Glu Glu Ala Phe

1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 64

His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu Leu

1 5 10

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 65

Leu Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe

1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 66

Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe

1 5 10 15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 67

Val Glu Asn Gly Ala Asp Val Gln Ala Ala Ala His Gly Asp Phe

1 5 10 15

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 68

His Ala Leu Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys Phe

1 5 10 15

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 69

Val Glu Val Ala Asp Asn Thr Ala Asp Asn Thr Lys Phe

1 5 10

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 70

Glu Val Ile Ala Tyr Ser Ser Ser Glu Thr Pro Asn Arg His Asp Met

1 5 10 15

Leu

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 71

Val Ser Pro Val Ile Thr Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly

1 5 10 15

Ala

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 72

Ile Gln Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg

1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 73

Arg Pro Gly Asp Gly Pro Thr Gly Ala Arg Leu Leu

1 5 10

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 74

Leu Asn Leu His Asp Gly Gln Asn Thr Thr Ile Pro Leu Leu Leu

1 5 10 15

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 75
 Asp Thr Glu Lys Ser Phe Leu Lys
 1 5
 <210> 76
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 76
 Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg
 1 5 10
 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 77
 Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg Thr
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 78
 Glu Asp Pro Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Arg Thr Leu
 1 5 10
 <210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide sequence
 <400> 79

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

1 5 10 15

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400> 80

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

1 5 10

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide sequence

<400>

> 81

Gln Ser Ala Gln Pro Glu Glu Val Tyr Leu Arg

1 5 10