



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0097691
(43) 공개일자 2010년09월03일

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7012975

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년11월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년06월11일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/083265

(87) 국제공개번호 WO 2009/064805

국제공개일자 2009년05월22일

(30) 우선권주장

60/987,353 2007년11월12일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

테라클론 사이언시스, 아이엔씨.

미합중국, 더블유에이 98104, 시애틀, 수트 300,
콜롬비아 스트리트 1124, 시애틀 라이프 사이언시
스 빌딩

(72) 발명자

그란디아 안드레아 지

미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 300 콜럼비아
스트리트 1124

킹 고든

미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 300 콜럼비아
스트리트 1124

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 강승옥

전체 청구항 수 : 총 41 항

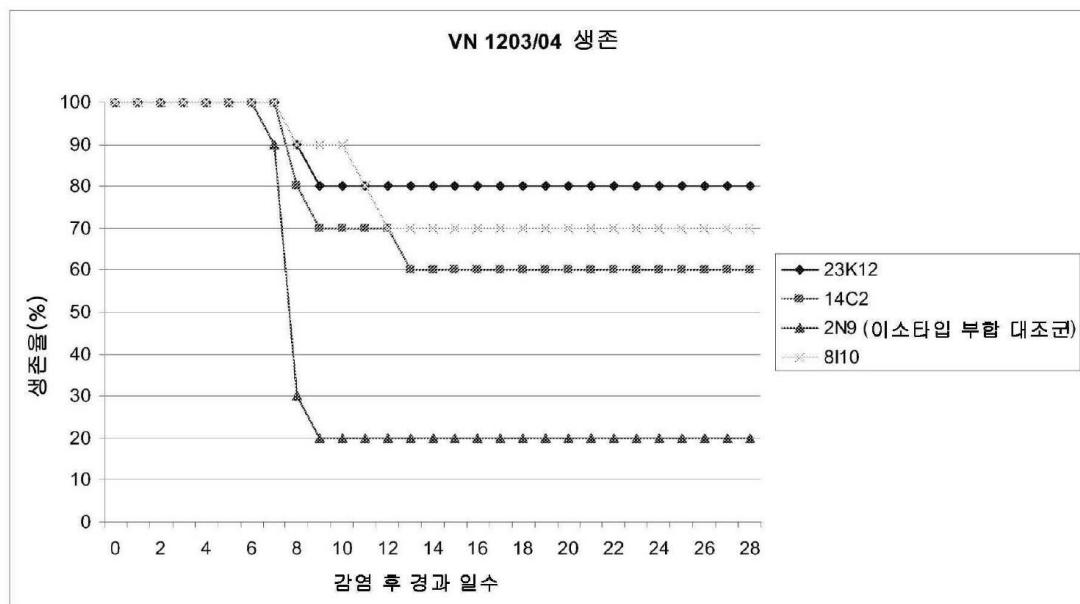
(54) 인플루엔자의 치료 및 진단을 위한 조성물 및 방법

(57) 요 약

본 발명은 M2 동종사량체의 임체구조 결정자에 결합하는 신규 인간 항-인플루엔자 항체, 및 관련 조성물 및 방법을 제공한다. 이 항체는 인플루엔자 감염의 진단 및 치료에 사용된다.

대 표 도

고병원성 예방 생체내 연구



(72) 발명자

콕스 토마스

미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 300 콜럼비아
스트리트 1124

올슨 올레

미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 300 콜럼비아
스트리트 1124

미첨 제니퍼

미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 300 콜럼비아
스트리트 1124

(30) 우선권주장

60/987,355 2007년11월12일 미국(US)

61/053,840 2008년05월16일 미국(US)

61/095,208 2008년09월08일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 폴리펩티드의 세포외 도메인 내의 에피토프에 결합하는 특성;
- b) 인플루엔자 A 감염 세포에 결합하는 특성; 및
- c) 인플루엔자 A 바이러스에 결합하는 특성

을 가지는, 단리된 완전 인간 단클론성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 공여체로부터의 B 세포에서 단리된 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 에피토프가 비선형인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 에피토프가 M2e 폴리펩티드의 아미노 말단 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 에피토프가 M2e 폴리펩티드의 2번, 5번 및 6번 위치의 아미노산을 포함하고, 여기서 아미노산 위치 번호는 서열 번호 1에 따른 것인 항체.

청구항 6

제4항에 있어서,

- a) 2번 위치의 아미노산이 세린이고;
- b) 5번 위치의 아미노산이 트레오닌이며;
- c) 6번 위치의 아미노산이 글루탐산인 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 에피토프가 아미노산 서열 SLLTEV(서열 번호 42)를 전적으로 또는 부분적으로 포함하는 것인 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 8I10, 21B15 또는 23K12인 항체.

청구항 9

8I10, 21B15 또는 23K12와 동일한 에피토프에 결합하는 항체.

청구항 10

CDR1 및 CDR2를 포함하는 가변 중쇄(V_H) 영역을 포함하고,

상기 영역은 인간 IGHV4 또는 IGHV3 V_H 생식계열 서열, 또는 상기 V_H 생식계열 유전자 서열과 상동성인 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인,

단리된 완전 인간 단클론성 항-M2e 항체 또는 이의 단편.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 생식계열 서열과 상동성인 상기 핵산 서열은 상기 생식계열 서열과 90% 이상 상동성인 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 인간 IGHK1 V_L 생식계열 유전자 서열, 또는 상기 V_L 생식계열 유전자 서열과 상동성인 핵산 서열에 의해 코딩되는 가변 경쇄(VL) 영역을 추가로 포함하는 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, IGHV1 V_L 생식계열 서열과 상동성인 상기 핵산 서열이 상기 IGHV1 V_L 생식계열 서열과 90% 이상 상동성인 핵산.

청구항 14

NYYWS(서열 번호 72), FIYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74), ASCGGYCILD(서열 번호 76), SNYMS(서열 번호 103), VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105) 및 CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 중쇄, 및 RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61), QQSYSPPLT(서열 번호 63), RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94) 및 QQSYSMPA(서열 번호 96)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 경쇄를 가지는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 15

NYYWS(서열 번호 72), FIYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74), ASCGGYCILD(서열 번호 76), SNYMS(서열 번호 103), VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105) 및 CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 중쇄를 가지고, M2e에 결합하는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 16

RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61), QQSYSPPLT(서열 번호 63), RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94) 및 QQSYSMPA(서열 번호 96)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 경쇄를 가지고, M2e에 결합하는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 17

NYYWS(서열 번호 72), FIYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74) 및 ASCGGYCILD(서열 번호 76)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 중쇄, 및 RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61), 및 QQSYSPPLT(서열 번호 63)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 경쇄를 가지는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 18

NYYWS(서열 번호 72)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; FIYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역; ASCGGYCILD(서열 번호 76)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 영역; RASQNIYKYLN(서열 번호 59)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 영역; AASGLQS(서열 번호 61)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 영역; QQSYSPPLT(서열 번호 63)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 영역을 포함하는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 19

SNYMS(서열 번호 103), VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105) 및 CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107)의 아미노산 서열들로

이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 중쇄, 및 RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94) 및 QQSYSMPA(서열 번호 96)의 아미노산 서열들로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 3개의 CDR을 갖는 경쇄를 가지는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 20

SNYMS(서열 번호 103)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역; CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107)의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역; RTSQSISSYLN(서열 번호 92)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 영역; AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 영역; 및 QQSYSMPA(서열 번호 96)의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 영역을 포함하는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 21

- (a) 서열 번호 72 또는 103의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 영역;
- (b) 서열 번호 74 또는 105의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 영역; 및
- (c) 서열 번호 76 또는 107의 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 영역

을 포함하고, M2e에 결합하는, 단리된 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체 또는 이의 단편.

청구항 22

제21항에 있어서,

- (a) 서열 번호 59 또는 92의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR1 영역;
- (b) 서열 번호 61 또는 94의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR2 영역; 및
- (c) 서열 번호 63 또는 96의 아미노산 서열을 포함하는 V_L CDR3 영역

을 추가로 포함하는 항체.

청구항 23

- a) 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열, 또는
- b) 서열 번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 및 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 서열

을 포함하는, 단리된 완전 인간 단클론성 항-매트릭스 2 엑토도메인(M2e) 항체.

청구항 24

제1항의 항체를 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 항바이러스 약물, 바이러스 침투 억제제 또는 바이러스 부착 억제제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항바이러스 약물이 뉴라미니다제 억제제, HA 억제제, 시알산 억제제 또는 M2 이온 통로 억제제인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 M2 이온 통로 억제제가 아만타딘 또는 리만타딘인 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 억제제가 자나미비르 또는 오셀타미비르 인산염인 조성물.

청구항 29

제24항에 있어서, 제2 항-인플루엔자 A 항체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 30

제1항에 있어서, 치료제 또는 검출 가능한 표지에 작동적으로 연결된 항체.

청구항 31

환자에게 제24항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서의 면역 반응을 자극하는 방법.

청구항 32

대상에게 제24항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상에서의 인플루엔자 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 항바이러스 약물, 바이러스 침투 억제제 또는 바이러스 부착 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항바이러스 약물이 뉴라미니다제 억제제, HA 억제제, 시알산 억제제 또는 M2 이온 통로 억제제인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 M2 이온 통로 억제제가 아만타딘 또는 리만타딘인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 뉴라미니다제 억제제가 자나미비르 또는 오셀타미비르 인산염인 방법.

청구항 37

제32항에 있어서, 제2 항-인플루엔자 A 항체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제32항에 있어서, 상기 항체를 인플루엔자 바이러스에 노출되기 전 또는 후에 투여하는 것인 방법.

청구항 39

제32항에 있어서, 상기 항체를 바이러스 소거를 촉진하거나 인플루엔자 A 감염 세포를 제거하는 데 충분한 용량으로 투여하는 것인 방법.

청구항 40

(a) 환자로부터 입수한 생물학적 샘플을 제1항에 따른 항체와 접촉시키는 단계;

(b) 생물학적 샘플에 결합하는 항체의 양을 검출하는 단계; 및

(c) 생물학적 샘플에 결합하는 항체의 양을 대조 값과 비교하고, 이로부터 환자 내 인플루엔자 바이러스의 존재를 결정하는 단계

를 포함하는, 환자 내 인플루엔자 바이러스 감염의 존재를 결정하는 방법.

청구항 41

제1항에 따른 항체를 포함하는 진단 키트.

명세서

기술 분야

[관련 출원]

[0002] 본원은, 가특허출원인 2007년 11월 12일에 출원된 USSN 60/987,353, 2007년 11월 12일에 출원된 USSN 60/987,355, 2008년 5월 16일에 출원된 USSN 61/053,840 및 2008년 9월 8일에 출원된 USSN 61/095,208의 이익을 주장하고, 이들 내용은 전문이 본원에 참조 인용된다.

[0003] [기술 분야]

[0004] 본 발명은 일반적으로 인플루엔자 감염의 치료, 진단 및 모니터링에 관한 것이다. 본 발명은 더욱 구체적으로 인플루엔자 매트릭스 2 단백질에 특이적인 항체의 동정 방법, 및 상기 항체의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 상기 항체는 인플루엔자의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물, 및 인플루엔자 감염의 진단 및 모니터링을 위한 약학적 조성물에 유용하다.

배경 기술

[0005] 인플루엔자 바이러스는 미국에서 매년 인구 중 5 내지 20%를 감염시켜, 30,000 내지 50,000명의 사망을 초래한다. 인플루엔자 백신이 감염 예방을 위한 일차적 방법이나, 4가지 항바이러스 약물, 즉 아만타딘(amantadine), 리만타딘(rimantadine), 오셀타미비르(oseltamivir) 및 자나미비르(zanamivir)도 또한 미국에서 이용 가능하다. 2005년 12월 이후에는, 바이러스의 M2 단백질에서의 아미노산 치환으로부터 비롯되는 아만타딘 및 리만타딘에 대한 바이러스 내성의 증가로 인해, 단지 오셀타미비르(타미플루(TAMIFLU)™)만이 인플루엔자 A의 치료를 위해 권장된다.

[0006] 인플루엔자 A 바이러스 감염에 의해 유발되는 질병은 그것의 주기적 성질을 특징으로 한다. 항원 소변이(drift) 및 대변이(shift)로 인해 매년 상이한 A 균주들이 나타난다. 이에 더하여, 전체 인구에 침투하는 고병원성 균주의 위협은 풀루 감염에 대한 신규 치료법의 필요성을 강조하였다. 우세한 분율의 중화 항체가 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 단백질의 다형(general population) 영역에 지정된다. 따라서, 상기 중화 MAb는 단지 한 개의 균주 또는 소수개의 균주만을 표적으로 할 것이다. 최근에는 비교적 비변이체인 매트릭스 2(M2) 단백질에 초점을 두었다. 잠재적으로, M2에 대한 중화 MAb는 모든 인플루엔자 A 균주에 대한 적당한 요법일 것이다.

[0007] M2 단백질은 이온 통로를 형성하는 동종사량체 내에서 발견되고, 세포 침투 시에 바이러스의 탈각(uncoating)을 돋는 것으로 생각된다. 감염 후, M2는 세포 표면에서 풍부하게 발견될 수 있다. 그것은 후속하여 비리온 외피에 도입되고, 거기에서 총 외피 단백질의 약 2%만을 구성한다. M2 세포외 도메인(M2e)은 짧고, 세포 외측에 아미노 말단 2-24 아미노산이 나타난다. 지금까지의 항-M2 MAb는 상기 선형 서열쪽으로 지정되어 왔다. 따라서, 그것은 천연(native) M2 상의 입체구조 결정자를 포함한 세포내 발현 M2에 대한 목적하는 결합 성질을 나타내지 않을 수 있다.

[0008] 그러므로, 당업계에 오랫동안 세포 발현 M2 및 천연 M2에 대한 입체구조 결정자에 결합하는 신규 항체에 대한 필요가 있어 왔다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 M2e에 대해 특이적으로 유도된 완전 인간 단클론성 항체를 제공한다. 임의적으로, 항체는 인간 공여 체로부터의 B 세포에서 단리된다. 예시적 단클론성 항체에는 본원에 기재된 8i10, 21B15 및 23K12가 포함된다. 대안적으로, 단클론성 항체는 8i10, 21B15 및 23K12와 동일한 에피토프에 결합하는 항체이다. 본원에서 각기 칭해지는 항체는 huM2e 항체이다. huM2e 항체는 하기 특성을 중 하나 이상을 가진다: a) 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 2 엑토도메인(matrix 2 ectodomain: M2e) 폴리펩티드의 세포외 도메인 내의 에피토프에 결합함; b) 인플루엔자 A 감염 세포에 결합함; 또는 c) 인플루엔자 A 바이러스에 결합함.

[0010] huM2e 항체가 결합하는 에피토프는 M2 폴리펩티드의 비선형 에피토프이다. 바람직하게, 에피토프는 M2e 폴리펩티드의 아미노 말단 영역을 포함한다. 더욱 바람직하게, 에피토프는 전적으로 또는 부분적으로 아미노산 서열 SLLTEV(서열 번호 42)를 포함한다. 가장 바람직하게, 에피토프는 서열 번호 1에 따라 넘버링할 때, M2e 폴리펩티드의 2번, 5번 및 6번 위치의 아미노산을 포함한다. 2번 위치의 아미노산은 세린이고; 5번 위치의 아미노산은 트레오닌이며; 6번 위치의 아미노산은 글루탐산이다.

[0011] huM2e 항체는 서열 번호 44 또는 50의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 가변부 및 서열 번호 46 또는 52의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변부를 포함한다. 바람직하게, 3개의 중쇄 CDR은 NYYWS(서열 번호 72), FIYYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74), ASCSGGYCILD(서열 번호 76), SNYMS(서열 번호 103), VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105), CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107)(카밧(Kabat) 방법에 의해 결정됨) 또는 ASCSGGYCILD(서열 번호 76), CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107), GSSISN(서열 번호 109), FIYGGNTK(서열 번호 110), GSSISN(서열 번호 111), GFTVSSN(서열 번호 112), VIYSGGSTY(서열 번호 113)(초티아(Chothia) 방법에 의해 결정됨)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% 또는 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 3개의 CDR을 갖는 경쇄는 RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61), QQSYSPPLT(서열 번호 63), RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94), QQSYSPMPA(서열 번호 96)(카밧 방법에 의해 결정됨) 또는 RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61), QQSYSPPLT(서열 번호 63), RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94), QQSYSPMPA(서열 번호 96)(초티아 방법에 의해 결정됨)의 아미노산 서열과 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 항체는 M2e에 결합한다.

[0012] M2e 항체의 중쇄는 예를 들어, IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자와 같은 생식계열 V(가변) 유전자로부터 유래된다.

[0013] 본 발명의 M2e 항체는 인간 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 가변 중쇄(V_H) 영역을 포함한다. IgHV4 생식계열 유전자 서열은, 예를 들어 수탁 번호(Accession number) L10088, M29812, M95114, X56360 및 M95117에 나와 있다. IgHV3 생식계열 유전자 서열은, 예를 들어 수탁 번호 X92218, X70208, Z27504, M99679 및 AB019437에 나와 있다. 본 발명의 M2e 항체는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 80% 상동성을 가지는 핵산 서열에 의해 코딩되는 V_H 영역을 포함한다. 바람직하게, 핵산 서열은 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다. M2e 항체의 V_H 영역은 IgHV4 또는 IgHV3 V_H 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩되는 V_H 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성을 가진다. 바람직하게, M2e 항체의 V_H 영역의 아미노산 서열은 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다.

[0014] 본 발명의 M2e 항체는 또한 인간 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩되는 가변 경쇄(V_L) 영역을 포함한다. 인간 IgKV1 V_L 생식계열 유전자 서열이, 예를 들어 수탁 번호 X59315, X59312, X59318, J00248 및 Y14865에 나와 있다. 대안적으로, M2e 항체는 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 80% 상동성을 가지는 핵산 서열에 의해 코딩되는 V_L 영역을 포함한다. 바람직하게, 핵산 서열은 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다. M2e 항체의 V_L 영역은 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩되는 V_L 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성을 가진다. 바람직하게, M2e 항체의 V_L 영역의 아미노산 서열은 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩되는 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 huM2e 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 각종 측면들에서, 조성물은 항바이러스 약물, 바이러스 침투 억제제 또는 바이러스 부착 억제제를 추가로 포함한다. 항바이러스 약물은 예를 들어 뉴라미니다제 억제제, HA 억제제, 시알산 억제제 또는 M2 이온 통로 억제제이다. M2 이온 통로 억제제는 예를 들어 아만타딘 또는 리만타딘이다. 뉴라미니다제 억제제는 예를 들어 자나미비르, 또는 오셀타미비르 인산염이다. 다른 한 측면에서, 조성물은 제2 항-인플루엔자 A 항체를 추가로 포함한다.

[0016] 다른 한 측면에서, 본 발명에 따른 huM2e 항체는 치료제 또는 검출 가능한 표지에 작동적으로 연결된다.

[0017] 부가적으로, 본 발명은 huM2e 항체를 대상에게 투여함으로써, 면역 반응을 자극하거나, 인플루엔자 바이러스 감염의 증상을 치료, 예방 또는 경감시키는 방법을 제공한다.

[0018] 임의적으로, 대상에게 인플루엔자 바이러스 항체, 항바이러스 약물, 예컨대 뉴라미니다제 억제제, HA 억제제, 시알산 억제제 또는 M2 이온 통로 억제제, 바이러스 침투 억제제 또는 바이러스 부착 억제제를 포함하나 이에 국한되지 않는 제2 작용제를 추가 투여한다. M2 이온 통로 억제제는 예를 들어 아만타딘 또는 리만타딘이다. 뉴라미니다제 억제제는 예를 들어 자나미비르 또는 오셀타미비르 인산염이다. 대상은 예를 들어 자가면역 질병 또는 염증성 장애와 같은 인플루엔자 바이러스 감염을 앓고 있거나 그러한 감염의 발병에 취약하다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스에 노출하기 전 및/또는 후에 본 발명의 huM2e 항체를 대상에게 투여하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 huM2e 항체는 거부 인플루엔자 감염을 치료 또는 예방하기 위해 사용된다. huM2e 항체는 바이러스 소거를 촉진하거나 인플루엔자 A 감염 세포를 제거하는 데 충분한 용량으로 투여된다.

[0020] 환자로부터 입수한 생물학적 샘플을 huM2e 항체와 접촉시키고; 생물학적 샘플에 결합하는 항체의 양을 검출하며; 생물학적 샘플에 결합하는 항체의 양과 대조 값을 비교함으로써, 환자 내 인플루엔자 바이러스 감염의 존재를 결정하는 방법도 또한 본 발명에 포함된다.

[0021] 본 발명은 또한 huM2e 항체를 포함하는 진단 키트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 다른 특성 및 이점은 이하의 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위에 의해 명백해지며 그것에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 유리 M2 웨티드의 존재 또는 부재 하에서의, M2 발현 작제물 또는 대조 백터로 형질감염된 293-HEK 세포에 대한 3개의 본 발명의 항체 및 대조 hu14C2 항체의 결합을 도시한다.

도 2a 및 2b는 인플루엔자 A/푸에르토리코/8/32에 대한 인간 단클론성 항체 결합을 도시하는 그래프이다.

도 3a는 M2 변이체의 세포와 도메인의 아미노산 서열을 도시하는 도표이다.

도 3b 및 3c는 도 3a에 도시된 M2 변이체에 대한 인간 단클론성 항-인플루엔자 항체의 결합을 도시하는 막대 도표이다.

도 4a 및 4b는 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발로 처리되는 M2 웨티드에 대한 인간 단클론성 항-인플루엔자 항체의 결합을 도시하는 막대 도표이다.

도 5는 CHO 세포주 DG44에서 안정하게 발현된 인플루엔자 균주 A/HK/483/1997 서열을 나타내는 M2 단백질에 대한 MAb 8i10 및 23K12의 결합을 도시하는 일련의 막대 도표이다.

도 6a는 변이체 M2 웨티드에 대한 항-M2 항체의 교차반응성 결합을 도시하는 도표이다.

도 6b는 절단된(truncated) M2 웨티드에 대한 M2 항체의 결합 활성을 도시하는 도표이다.

도 7은 인간 항-인플루엔자 단클론성 항체로 처리된 인플루엔자 감염 마우스의 생존율을 도시하는 그래프이다.

도 8은 항-M2 항체가 M2e의 N 말단 내 매우 보존된 영역에 결합함을 도시하는 도면이다.

도 9은 ELISA에서 조(crude) 상등액으로부터의 항-M2 rHMAb 클론은 인플루엔자에 결합하였으나, 반면 대조 항-M2e MAb 14C2는 바이러스에 쉽게 결합하지 않았음을 도시하는 그래프이다.

도 10은 인플루엔자에 감염된 세포에 결합된 항-M2 rHMAb를 도시하는 일련의 사진들이다. MDCK 세포는 인플루엔자 A/PR/8/32로 감염되었거나 감염되지 않았고, 조 상등액으로부터의 Ab 결합을 24시간 후에 테스트하였다. FMAT 플레이트 스캐너로부터 데이터를 수집하였다.

도 11은 인플루엔자 서브타입 H3N2, HK483 및 VN1203 M2 단백질로 형질감염된 세포에 결합된 조 상등액으로부터의 항-M2 rHMAb 클론을 도시하는 그래프이다. 인플루엔자 균주 H3N2, HK483 및 VN1203에 상응하는 전장 M2 cDNA를 코딩하는 플라스미드뿐만 아니라 모의체(mock) 플라스미드 대조군을 293 세포 내로 일시적으로 형질감염시켰다. 14C2, 8i10, 23K12 및 21B15 MAb를 형질감염물질의 결합에 대해 테스트하였고, AF647 접합 항-인간 IgG 2차 항체로 검출하였다. FACS 분석 후에 결합된 특이적 mAB의 평균 형광도 강도가 도시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 매트릭스 2(M2) 폴리펩티드의 세포외 도메인에 대해 특이적인 완전 인간 단클론성 항체를 제공한다. 본원에서 항체는 각기 huM2e 항체로 칭해진다.

[0025] M2는 인플루엔자 바이러스 및 바이러스 감염 세포의 표면 상에서의 동종사량체로서 존재하는 96 아미노산 막획 단 단백질이다. M2는 인플루엔자 A 균주에 걸쳐 매우 보존된 23 아미노산 엑토도메인(M2e)을 함유한다. 1918년 유행병 균주 이후에 아미노산 변화가 거의 일어나지 않았기 때문에, M2e가 인플루엔자 치료를 위한 선호 표적이다. 종래 연구에서, M2 엑토도메인(M2e)에 대해 특이적인 단클론성 항체는 M2e의 선형 서열에 상응하는 펩티드를 이용한 면역화 시에 유래되었다. 이와 대조적으로, 본 발명은 전장 M2가 세포주 내 발현되도록 하여 세포 발현 M2e에 결합한 인간 항체의 동정을 가능하게 하는 신규 방법을 제공한다. huM2e 항체는 M2로 형질감염된 세포 상의 입체구조 결정자뿐만 아니라, 인플루엔자 감염 세포 또는 바이러스 그 자체 상의 천연 M2에 결합하는 것으로 나타났다. huM2e 항체는 선형 M2e 펩티드에는 결합하지 않았으나, 이 또한 세포주 내로의 cDNA 형질감염 시에 발현되는 수가지 천연 M2 변이체에는 결합한다. 따라서, 본 발명은 매우 광범위한 인플루엔자 A 바이러스 균주들에 대한 신규 특이성을 나타내는 인간 단클론성 항체가 동정되고 생성되도록 하였다. 이 항체는 인플루엔자 A 감염을 동정하기 위해 진단용으로 사용되고, 인플루엔자 A 감염의 치료를 위해 치료용으로 사용되어도 된다.

[0026] 본 발명의 huM2e 항체는 하기 특성을 중 하나 이상을 가진다: huM2e 항체는 a) 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 2(M2) 폴리펩티드의 세포외 도메인 내의 에피토프; b) 인플루엔자 A 감염 세포; 및/또는 c) 인플루엔자 A 바이러스(즉, 비리온)에 결합한다. 본 발명의 huM2e 항체는 ADCC와 같은 면역 이팩터 메카니즘을 통해 인플루엔자 감염 세포를 제거하고, 인플루엔자 비리온의 결합에 의해 직접적 바이러스 소거를 촉진한다. 본 발명의 huM2e 항체는 M2e 폴리펩티드의 아미노 말단 영역에 결합한다. 바람직하게, 본 발명의 huM2e 항체는 N 말단 메티오닌 잔기가 부재하는 M2e 폴리펩티드의 아미노 말단 영역에 결합한다. 예시적 M2e 서열에는 하기 표 I에 열거된 당해 서열들이 포함된다.

[0027]

[표 1]

유형	명칭	하위유형	M2E 서열	서열 번호
A	브레빅 미션. 1. 1918	H1N1	MSLLTEVETPTRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 1
A	포트 몬마우스. 1. 1947	H1N1	MSLLTEVETPTKIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 2
A.	싱가포르. 02. 2005	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 3
A	위스콘신. 10. 98	H1N1	MSLLTEVETPIRNGWECKCNDSSD	서열 번호 4
A	위스콘신. 301. 1976	H1N1	MSLLTEVETPIRSEWGCRNDSSD	서열 번호 5
A	파나마. 1. 66	H2N2	MSLPEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 6
A	뉴욕. 321. 1999	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSN	서열 번호 7
A	카라카스. 1. 71	H3N2	MSLLTEVETPIRKNEWGCRCNDSSD	서열 번호 8
A	타이완. 3. 71	H3N2	MSLFLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 9
A	우한. 359. 95	H3N2	MSLPLTEVETPIRSEWGCRNDSSD	서열 번호 10
A	홍콩. 1144. 99	H3N2	MSLPLPEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 11
A	홍콩. 1180. 99	H3N2	MSLLPEVETPIRNGWGCRNDSSD	서열 번호 12
A	홍콩. 1774. 99	H3N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCNGSSD	서열 번호 13
A	뉴욕. 217. 02	H1N2	MSLLTEVETPIRNEWEYRCNDSSD	서열 번호 14
A	뉴욕. 300. 2003	H1N2	MSLLTEVETPIRNEWEYRCSDSSD	서열 번호 15
A	데지. 스페인. 54008. 20	H3N2	MSLLTEVETPTRNGWECRYSDSSD	서열 번호 16
A	광자우. 333. 99	H9N2	MSLFLTEVETLTRNGWECKCSDSSD	서열 번호 17
A	홍콩. 1073. 99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGWECKCRDSSD	서열 번호 18
A	홍콩. 1. 68	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 19
A	데지. 홍콩. 126. 1982	H3N2	MSLLTEVETPIRSEWGCRNDSGD	서열 번호 20
A	뉴욕. 703. 1995	H3N2	MSLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD	서열 번호 21
A	데지. 케벡. 192. 81	H1N1	MSLPLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD	서열 번호 22
A	푸에르토리코. 8. 34	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	서열 번호 23
A	홍콩. 485. 97	H5N1	MSLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD	서열 번호 24
A	홍콩. 542. 97	H5N1	MSLLTEVETLTKNGWGCRCSDSSD	서열 번호 25
A	오골제. 산터우. 1826. 2004	H9N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD	서열 번호 26
A	닭. 타이완. 0305. 04	H6N1	MSLLTEVETHTRNGWECKCSDSSD	서열 번호 27
A	퀴일. 아르카사스. 16309-7. 94	H7N3NSA	MSLLTEVKTPTRNGWECKCSDSSD	서열 번호 28
A	홍콩. 486. 97	H5N1	MSLLTEVETLTRNGWGCRCSDSSD	서열 번호 29
A	닭. 펜실베니아. 13552-1. 98	H7N2NSB	MSLLTEVETPTRDGWECKCSDSSD	서열 번호 30
A	닭. 헤이룽장. 48. 01	H9N2	MSLLTEVETPTRNGWGCRCSDSSD	서열 번호 31
A	데지. 한국. S5. 2005	H1N2	MSLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD	서열 번호 32
A	홍콩. 1073. 99	H9N2	MSLLTEVETLTRNGWECKCSDSSD	서열 번호 33
A	위스콘신. 3523. 88	H1N1	MSLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSD	서열 번호 34
A	X-31 백신 규주	H3N2	MSLFLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD	서열 번호 35
A	닭. 로스黠. 8. 1934	H7N1	MSLLTEVETPTRNGWECRNDSSD	서열 번호 36
A	환경. 뉴욕. 16326-1. 2005	H7N2	MSLLTEVETPIRKGWECNCSDSSD	서열 번호 37
A	인도네시아. 560H. 2006	H5N1	MSLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD	서열 번호 38
A	닭. 홍콩. SF1. 03	H9N2	MSLLTGVETHTRNGWGCKCSDSSD	서열 번호 39
A	닭. 홍콩. YU427. 03	H9N2	MSLLPEVETHTRNGWGCRCSDSSD	서열 번호 40

[0028]

[0029] 한 실시양태에서, 본 발명의 huM2e 항체는 서열 번호 1에 따라 넘버링할 때, M2e의 1번 위치 내지 7번 위치로부터의 아미노산 잔기를 전적으로 또는 부분적으로 포함하는 M2e에 결합한다. 예를 들어, 본 발명의 huM2e 항체는 아미노산 서열 SLLTEVET(서열 번호 41)에 전적으로 또는 부분적으로 결합한다. 가장 바람직하게, 본 발명의 huM2e 항체는 아미노산 서열 SLLTEV(서열 번호 42)에 전적으로 또는 부분적으로 결합한다. 바람직하게, 본 발명의 huM2e 항체는 M2e 단백질의 비선형 에피토프에 결합한다. 예를 들어, huM2e 항체는 폴리펩티드 서열 번호 1에 따라 넘버링할 때, M2e의 2번, 5번 및 6번 위치의 에피토프에 결합하는데, 이때 a) 2번 위치의 아미노산은 세린이고; b) 5번 위치의 아미노산은 트레오닌이며; c) 6번 위치의 아미노산은 글루탐산이다. 이 에피토프에 결합하는 예시적 huM2e 단클론성 항체는 본원에 기재된 8I10, 21B15 또는 23K12 항체이다.

[0030]

8I10 항체는 서열 번호 43에 후술되는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 영역(서열 번호 44), 및 서열 번호 45에 나와 있는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 영역(서열 번호 46)을 포함한다.

[0031]

이하 서열들에서, 초티아(Chotia), C. 등(문헌 [1989, Nature, 342:877-883])에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산은 밀줄 쳐 있고, 카밧(Kabat) E.A. 등(문헌 [1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Heath and Human Services])에 의해 정의된 CDR을 포함하는 아미노산은 진한 글씨로 강조되어 있다.

[0032]

8I10 항체의 중쇄 CDR는 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다: NYYWS(서열 번호 72), FIYYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74) 및 ASCSGGGYCLD(서열 번호 76). 8I10 항체의 경쇄 CDR은 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다:

RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61) 및 QQSYPPLT(서열 번호 63).

[0033] 8I10 항체의 중쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: GSSISN(서열 번호 109), FIYYGGNTK(서열 번호 110) 및 ASCSGGYCILD(서열 번호 76). 8I10 항체의 경쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61) 및 QQSYPPLT(서열 번호 63).

[0034] >8I10 VH 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 43)

CAGGTGCAATTGCAAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCGGAGACCCCTGTCCCTCAC
CTGCACTGTCTCTGGTCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAG
GGAAGGGACTGGAGTGGATTGGTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCTCC
CTCAAGAGCCCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAG
CTCTGTGACCGCTCGGAATCGGCCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTGTAGTGGTGGTT
ACTGTATCCTTGACTACTGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCG

[0035]

>8I10 VH 아미노산 서열: (서열 번호 44)

카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	G	S	S	I	S	N	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	S	P	G
K	G	L	E	W	I	G	F	I	Y	Y	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	Q	D	T	S	K	S	Q	V	S	L	T	M	S	S
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	S	G	G	Y	C
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S							

[0038]

>8I10 VL 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 45)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGGCGAGTCAGAACATTTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACCCAGGGA
AAGCCCCCTAAGGGCCTGATCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT
AGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCACAGTCTGCAACCTGAAGATT
TGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTCGGCGGAGGGACCAGGG
TGGAGATCAAAC

[0040]

>8I10 VL 아미노산 서열: (서열 번호 46)

카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	R	A	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	W	Y	Q	Q	R	P	G	K
A	P	K	G	L	I	S	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	S	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	R	V	E
I	K																			

[0043]

21B15 항체는 서열 번호 47에 후술되는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 영역(서열 번호 44), 및 서열 번호 48에 나와 있는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 영역(서열 번호 46)을 포함한다.

[0045]

초티아 등(1989)에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산은 밑줄 쳐 있고, 카밧 등(1991)에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산은 진한 글씨로 강조되어 있다.

[0046]

21B15 항체의 중쇄 CDR은 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다: NYWWS(서열 번호 72), FIYYGGNTKYNPSLKS(서열 번호 74) 및 ASCSGGYCILD(서열 번호 76). 21B15 항체의 경쇄 CDR은 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다: RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61) 및 QQSYPPLT(서열 번호 63).

[0047]

21B15 항체의 중쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: GSSISN(서열 번호 111), FIYYGGNTK(서열 번호 110) 및 ASCSGGYCILD(서열 번호 76). 21B15 항체의 경쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: RASQNIYKYLN(서열 번호 59), AASGLQS(서열 번호 61) 및 QQSYPPLT(서열 번호 63).

[0048] >21B15 VH 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 47)

CAGGTGCAATTGCAAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCAC
CTGCACTGTCTGGTTCGTCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAG
GGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCCTCC
CTCAAGAGGCCGCGTACCATATACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGAG
CTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTGTAGTGGTGGTT
ACTGTATCCTTGACTACTGGGCCAGGAAACCTGGTCACCGTCTCG

[0049]

>21B15 VH 아미노산 서열: (서열 번호 44)

[0051] 카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
C	T	V	S	G	S	S	I	S	N	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	S	P	G
K	G	L	E	W	I	G	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	G	G	N	T	K	Y	N	P	S	L
K	S	R	V	T	I	S	Q	D	T	S	K	S	Q	V	S	L	T	M	S	S
V	T	A	A	E	S	A	V	Y	F	C	A	R	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	S	G	G	Y	C
<u>I</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S							

[0052]

>21B15 VL 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 48)

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGA
AAGCCCCTAAGGGCCTGATCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTT
AGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAAGTCTGCAACCTGAAGATT
TGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCACTTCCGGCGGAGGGACCAGGG
TGGATATCAAAC

[0054]

>21B15 VL 아미노산 서열: (서열 번호 46)

[0056] 카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

D	I	Q	V	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	W	Y	Q	Q	R	P	G	K
A	P	K	G	L	I	S	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	S	G	V	P	S	R	F	S
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	S	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	R	V	D

[0057]

23K12 항체는 서열 번호 49에 후술되는 핵산 서열에 의해 코딩된 중쇄 가변 영역(서열 번호 50), 및 서열 번호 51에 나와 있는 핵산 서열에 의해 코딩된 경쇄 가변 영역(서열 번호 52)을 포함한다.

[0059]

초티아 등(1989)에 의해 정의된 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산은 밑줄 쳐 있고, 카밧 등(1991)에 의해 정의된 CDR을 포함하는 아미노산은 진한 글씨로 강조되어 있다.

[0060]

23K12항체의 중쇄 CDR은 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다: SNYMS(서열 번호 103), VIYSGGSTYYADSVK(서열 번호 105) 및 CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107). 23K12항체의 경쇄 CDR은 카밧 정의에 따른 하기 서열을 가진다: RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94) 및 QQSYSMPA(서열 번호 96).

[0061]

23K12 항체의 중쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: GFTVSSN(서열 번호 112), VIYSGGSTY(서열 번호 113) 및 CLSRMRGYGLDV(서열 번호 107). 23K12 항체의 경쇄 CDR은 초티아 정의에 따른 하기 서열을 가진다: RTSQSISSYLN(서열 번호 92), AASSLQSGVPSRF(서열 번호 94) 및 QQSYSMPA(서열 번호 96).

[0062]

>23K12 VH 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 49)

GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGAATCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTGGTCCGCCAGGCTCCAG
GGAAGGGCTGGAGTGGGCTCAGTTATTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCC
GTGAAGGGCAGATTCTCCTCTCCAGAGACAACACTCCAAGAACACAGTGTCTCAAATGAA
CAGCCTGAGAGCCGAGGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGGATGCGGG
GTTACGGTTAGACGTCTGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCG

[0063]

[0064] >23K12 VH 아미노산 서열: (서열 번호 50)

[0065] 카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	I	S
C	A	A	S	G	F	T	V	S	S	N	Y	M	S	W	V	R	Q	A	P	G
K	G	L	E	W	V	S	V	I	Y	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V
K	G	R	F	S	F	S	R	D	N	S	K	N	T	V	F	L	Q	M	N	S
L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	C	L	S	R	M	R	G	Y
<u>G</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S							

[0066]

[0067] >23K12 VL 뉴클레오티드 서열: (서열 번호 51)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCATCTGTTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 AAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGTCCCATCAAGGTTC
 AGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTT
 TGCAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTGGCCAGGGGACCAAGCTGG

[0068]

AGATCAAA

[0069] >23K12 VL 아미노산 서열: (서열 번호 52)

[0070]

카밧 진한 글씨, 초티아 밑줄 쳐짐

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I
T	C	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>K</u>
A	P	K	L	L	I	Y	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>S</u>
G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L	Q	P	E	D	F	A
T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>P</u>	<u>A</u>	F	G	Q	G	T	K	L	E	I

[0071]

K

본 발명의 huM2e 항체에는 또한 서열 번호 44 또는 49의 아미노산 서열과 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 중쇄 가변 아미노산 서열 및/또는 서열 번호 46 또는 52의 아미노산 서열과 적어도 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% 또는 그 이상 동일한 경쇄 가변 아미노산을 포함하는 항체도 포함된다.

[0073]

대안적으로, 단클론성 항체는 8I10, 21B15 또는 23K12와 동일한 에피토프에 결합하는 항체이다.

[0074]

M2e 항체의 중쇄는 예를 들어, IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자와 같은 생식계열 V(가변) 유전자로부터 유래된다.

[0075]

본 발명의 M2e 항체는 인간 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 가변 중쇄(V_H) 영역을 포함한다. IgHV4 생식계열 유전자 서열은 예를 들어, 수탁 번호 L10088, M29812, M95114, X56360 및 M95117에 나와 있다. IgHV3 생식계열 유전자 서열은 예를 들어, 수탁 번호 X92218, X70208, Z27504, M99679 및 AB019437에 나와 있다. 본 발명의 M2e 항체는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 80% 상동성을 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 V_H 영역을 포함한다. 바람직하게, 핵산 서열은 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다. M2e 항체의 V_H 영역은 IgHV4 또는 IgHV3 V_H 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 V_H 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성을 가진다. 바람직하게, M2e 항체의 V_H 영역의 아미노산 서열은 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgHV4 또는 IgHV3 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다.

[0076]

본 발명의 M2e 항체는 또한 인간 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 가변 경쇄(V_L) 영역을 포함한다. 인간 IgKV1 V_L 생식계열 유전자 서열은 예를 들어, 수탁 번호 X59315, X59312, X59318, J00248 및 Y14865에 나와 있다. 대안적으로, M2e 항체는 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 80% 상동성을 가지는 핵산 서열에 의해 코딩된 V_L 영역을 포함한다. 바람직하게, 핵산 서열은 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgKV1 생식계열 유전자 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다. M2e 항체의 V_L 영역은 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 V_L 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성을

가진다. 바람직하게, M2e 항체의 V_L 영역의 아미노산 서열은 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열과 적어도 90%, 95%, 96%, 97% 상동성을 가지고, 더욱 바람직하게는 IgKV1 생식계열 유전자 서열에 의해 코딩된 서열과 적어도 98%, 99% 상동성을 가진다.

[0077] 달리 정의되지 않은 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학 용어 및 기술 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가진다. 또한, 문맥상 다른 의미를 요하지 않는다면, 단수로 나타낸 용어는 복수 용어를 포함하며, 복수 용어는 단수 용어를 포함한다. 일반적으로 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 및 단백질 및 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 화학, 및 하이브리드화와 관련하여 사용된 명명법 및 이러한 것들의 기법은 당업계에서 공지되어 있고 통상적으로 이용되는 것들이다. 표준 기법은 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들어, 전기천공, 리포택션)을 위해 사용된다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조업자의 설명서에 따라서, 또는 당업계에서 통상적으로 실시하는 대로 혹은 본원에 기재된 대로 수행된다. 본 발명의 수행은, 구체적으로 상반되게 명시되지 않는 한, 당 기술 범위 내 바이러스학, 면역학, 미생물학, 분자생물학 및 재조합 DNA 기법의 통상적 방법을 이용할 것이며, 이를 상당수가 예시적 목적으로 이하에 기재되어 있다. 그러한 기법들은 문헌들에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989)]; 문헌 [Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)]; 문헌 [DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.)]; 문헌 [Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984)]; 문헌 [Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985)]; 문헌 [Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984)]; 문헌 [Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986)]; 문헌 [Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)]를 참조한다.

[0078] 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 약학 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 이들의 실험 절차 및 기법은 당업계에 공지되어 있고 통상적으로 이용되고 있는 것들이다. 화학 합성, 화학 분석, 약제 제조, 제형 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기법이 이용된다.

[0079] 하기 정의들이 본 발명을 이해하는 데 유용하다:

[0080] 본원에 사용되는 용어 "항체"(Ab)는 목적 생물학적 활성을 나타내는 한, 단클론성 항체, 다클론성 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 항체 단편이 포함된다. 용어 "면역글로불린"(Ig)은 본원에서의 "항체"와 상호 혼용된다.

[0081] "단리된 항체"는 그것의 자연 환경의 구성요소로부터 분리 및/또는 회수된 것이다. 그것의 자연 환경의 오염 성분은 항체를 위한 진단 또는 치료 용도를 저해하는 물질이고, 이에는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비 단백질성 용질이 포함될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 결정 시에 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과의 항체로, (2) 스파닝 컵(spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 동종성으로 정제될 것이다. 단리된 항체는 그 항체의 자연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 인시츄(*in situ*) 항체를 포함한다. 그러나, 일반적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 정제될 것이다.

[0082] 기본 4개 사슬의 항체 단위는 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 구성되는 이종사량체성 당단백질이다. IgM 항체는 J 사슬로 불리는 부가적 폴리펩티드와 함께 기본 이종사량체 단위 중 5로 구성되고, 이에 따라 10개의 항원 결합 부위를 가지며, 한편 분비된 IgA 항체는 중합하여 J 사슬과 함께 기본 4개 사슬 단위 중 2 내지 5개를 포함하는 다가 접합체를 형성할 수 있다. IgG의 경우, 4개 사슬 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각 L 사슬은 하나의 이황화물 공유 결합에 의해 H 사슬에 연결되고, 한편 2개의 H 사슬은 H 사슬 이소타입에 따라 하나 이상의 이황화물 결합에 의해 상호 간에 연결된다. 각 H 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 떨어져 있는 사슬내 이황화물 가교를 가진다. 각 H 사슬은 N 말단에 가변 도메인(V_H), 및 그에 이어 각각의 α 및 γ 사슬에 대한 3개의 불변 도메인(C_H)을 가지고, 이에 이어 μ 및 ϵ 이소타입에 대한 4개의 C_H 도메인을 가진다. 각 L 사슬은 N 말단에 가변 도메인(V_L)을 가지고, 이에 이어 다른 말단에 불변 도메인(C_L)을 가진다. V_L 은 V_H 과 나란히 배열되고, C_L 은 중쇄(C_H1)의 제1 불변 도메인과 나란히 배열된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이에 계면을 형성하는 것으로 판단된다. V_H 및 V_L 의 쌍 형성은 함께 단일 항원 결합 부위를 형성한다. 상이한 부류의 항체의 구조 및 성질에 대해, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th

edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6]을 참조한다.

[0083] 임의의 척추동물 종으로부터의 L 사슬은 자체의 불변 도메인(C_L)의 아미노산 서열에 따라 2개의 명확히 구분되는 유형, 즉 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나에 배정될 수 있다. 자체의 중쇄(C_H)의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 상이한 부류 또는 이소타입으로 배정될 수 있다. 5가지 부류의 면역글로불린, 즉 알파(α), 델타(δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)로 표시되는 중쇄를 각기 가지는, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있다. γ 및 α 부류는 C_H 서열 및 기능에 있어 비교적 작은 차이에 기초하여 하위부류로 추가 분류되는 바, 예를 들어 인간은 하기 하위부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2.

[0084] 용어 "가변"은 항체들 간에 가변 도메인의 일부 세그먼트가 광위적으로 상이하다는 사실을 가리킨다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그것의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 한정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110개 아미노산 구간에 걸쳐 균일하게 분포되어 있지 않다. 그 대신에, 가변 영역은 각기 9 내지 12개 아미노산 길이로 된 "초가변 영역"이라고 불리는 극한 가변성의 보다 짧은 영역에 의해 분리된 15 내지 30개 아미노산의 프레임워크 영역(FR)이라고 불리는 비교적 불변성인 신장물으로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결을 형성하며 어떤 경우에는 β -시트 구조의 일부를 이루는 3개의 초가변 영역에 의해 연결되는, 주로 β -시트 형태를 채택하는 4개의 FR을 포함한다. 각 사슬 내의 초가변 영역은 FR 영역에 의해 서로 매우 근접하게 유지되고, 다른 사슬의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합함에 있어 직접 관여하지 않지만, 항체 의존적 세포의 세포 독성에 있어서의 항체의 관여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0085] 본원에 사용되는 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기(예를 들어, 카밧 넘버링 시스템(문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)])에 따라 넘버링 할 때, V_L 에서의 대략 약 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 V_H 에서의 대략 약 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3)); 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기(예를 들어, 초티아 넘버링 시스템(문헌 [Clothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)])에 따라 넘버링 할 때, V_L 에서의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 및 V_H 에서의 26-32(H1), 52-56(H2) 및 95-101(H3)); 및/또는 "초가변 루프"/CDR로부터의 잔기(예를 들어, IMGT 넘버링 시스템(문헌 [Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)])에 따라 넘버링 할 때, V_L 에서의 잔기 27-38(L1), 56-65(L2) 및 105-120(L3), 및 V_H 에서의 27-38(H1), 56-65(H2) 및 105-120(H3)). 임의적으로, 항체는 AHo(문헌 [Honneger, A. 및 Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001)])에 따라 넘버링 할 때, V_L 에서의 28, 36(L1), 63, 74-75(L2) 및 123(L3), 및 V_H 에서의 28, 36(H1), 63, 74-75(H2) 및 123(H3) 중 하나 이상에 대칭 삽입물을 가진다.

[0086] "생식계열 핵산 잔기"란 불변 또는 가변 영역을 코딩하는 생식계열 유전자에서 천연 발생하는 핵산 잔기를 의미한다. "생식계열 유전자"는 배세포(즉, 난자가 되어질 세포 또는 정자 내 세포)에서 발견되는 DNA이다. "생식계열 돌연변이"는 단세포 단계에서 배세포 또는 접합자에서 발생하는 특정 DNA에서의 유전적 변화를 가리키고, 자손에게 전달될 때 그러한 돌연변이는 신체의 모든 세포 내에 도입된다. 생식계열 돌연변이는 단체 세포에서 습득되는 체세포 돌연변이와 상반된다. 일부 경우에서, 가변 영역을 코딩하는 생식계열 DNA 서열 내 뉴클레오티드는 돌연변이되어(즉, 체세포 돌연변이), 상이한 뉴클레오티드로 교체된다.

[0087] 본원에서 사용되는 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종성인 항체의 집단으로부터 얻은 항체, 즉 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연발생적 돌연변이를 제외하고는 동일한, 한 집단을 이루는 개별 항체를 가리킨다. 단클론성 항체는 단일 항원 부위에 대해 유도되는, 매우 특이적인 항체이다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자(에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 제제와 대조적으로, 각 단클론성 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다. 단클론성 항체는 그것의 특이성에 부가하여, 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "단클론성"은 임의의 특별한 방법에 의한 항체 생성을 요구하는 것으로 간주되지 않도록 한다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 단클론성 항체는 먼저 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 하이브리도마 방법으로 제조될 수 있거나, 또는 세균, 진핵생물 동물 또는 식물 세포

에서 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,576호 참조)을 이용하여 제조할 수 있다. "단클론성 항체"는 또한 예를 들어, 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기법을 이용하여 과지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0088] 본원의 단클론성 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내 서열과 동일하거나 그 서열에 상응하는 상동성을 가지는 "키메라" 항체를 포함하고, 한편 사슬(들)의 나머지는 목적 생물학적 활성을 나타내는 한, 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류뿐만 아니라 그러한 항체의 단편에 속하는 항체 내 서열과 동일하거나 그 서열에 상응하는 상동성을 가진다(미국 특허 제4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본 발명은 인간 항체로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열을 제공한다. 따라서, 본원의 일차 관심 대상인 키메라 항체에는 하나 이상의 인간 항원 결합 서열(예를 들어, CDR)을 가지고 인간의 항체로부터 유래된 하나 이상의 서열, 예를 들어 FR 또는 C 영역 서열을 가지는 항체가 포함된다. 또한, 본원의 일차 관심 대상인 키메라 항체에는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류로부터 유래된 하나의 항체 부류 또는 하위부류의 인간 가변 도메인 항원 결합 서열 및 또 다른 서열, 예를 들어 FR 또는 C 영역 서열을 포함하는 항체들이 포함된다. 본원의 관심 대상 키메라 항체에는 또한 본원에 기재된 것들과 관련되거나 상이한 종, 예컨대 인간외 영장류(예를 들어, 구세계 원숭이(Old World Monkey), 꼬리없는 원숭이(Ape) 등)으로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열을 가지는 것들이 포함된다. 키메라 항체는 또한 영장류화 및 인간화 항체를 포함한다.

[0089] 또한, 키메라 항체는 수령자 항체 또는 공여자 항체 내에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개량하기 위해 가해진다. 추가 상세 내용에 대해, 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; 문헌 [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 문헌 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0090] "인간화 항체"는 일반적으로 인간외 공급원으로부터 하나 이상의 아미노산 잔기가 자체 내부에 도입되는 인간 항체인 것으로 간주된다. 이 인간외 아미노산 잔기는 종종 전형적으로 "임포트" 가변 도메인으로부터 얻어지는 "임포트(import)" 잔기로 칭해진다. 인간화는 통상적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 임포트 초가변 영역 서열로 치환함으로써 원터(Winter) 및 그의 동료 연구원의 방법(문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986)]; 문헌 [Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988)]; 문헌 [Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행된다. 따라서, 그러한 "인간화" 항체는 온전한 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적은 부분이 인간외 종 유래의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체(미국 특허 제4,816,567호)이다.

[0091] "인간 항체"는 인간에 의해 자연적으로 생성되는 항체 내에 존재하는 서열만을 가지는 항체이다. 그러나, 본원에 사용되는 인간 항체는 본원에 기재된 상기 변형 및 변이체 서열을 포함한, 천연 발생의 인간 항체 내 발견되지 않는 잔기 또는 변형도 포함할 수 있다. 이는 전형적으로 항체 성능을 추가 개량하거나 증진하기 위해 가해진다.

[0092] "온전한" 항체는 항원 결합 부위뿐만 아니라 C₁ 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게, 온전한 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 가진다.

[0093] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부, 바람직하게는 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체(미국 특허 제5,641,870호; 문헌 [Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062(1995)] 참조); 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0094] 항체의 "작용성 단편 또는 유사체"란 어구는 전장 항체에 있어 공통된 정성적 생물학적 활성을 가지는 화합물이다. 예를 들어, 항-IgE 항체의 작용성 단편 또는 유사체는 고친화성 수용체, Fc_εRI에 결합하는 능력을 가지는 분자의 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시키기 위한 방식으로 IgE 면역글로불린에 결합할 수 있는 것이다.

[0095] 항체를 파파인(papain)으로 분해하면 2개의 동일한 항원 결합 단편, 즉 단일 항원 결합 부위가 있는 각 "Fab" 단편, 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하여 명명된 나머지 "Fc" 단편이 생성된다. Fab 단편은 H 사슬(V_H)의 가변 영역 도메인 및 하나의 중쇄(C_H1)의 제1 불변 도메인과 함께 전체 L 사슬로 구성된다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 단기인데, 즉 그것은 단일 항원 결합 부위를 가진다. 항체를 펩신 처리하면, 이가 항원 결합 활성

을 가지는 2개 이황화물 결합 Fab 단편에 대체로 상응하고 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 단일개의 큰 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다. Fab' 단편은 항체 헌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C_{H1} 도메인의 카르복시 말단에 부가적 잔기를 거의 가지고 있지 않는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'을 지칭한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 쌍 사이에 헌지 시스테인을 가지고 있는 Fab' 단편의 쌍으로 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 알려져 있다.

[0096] "Fc" 단편은 이황화물에 의해 함께 고정되는 양 H 사슬의 카르복시 말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내 서열에 의해 결정되고, 그 영역도 또한 일부 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체(FcR)에 의해 인식되는 부분이다.

[0097] "Fv"는 완전 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 단단하게 비공유결합된 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 이량체로 구성된다. 이들의 풀딩으로부터, 2개의 도메인이 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여하는 6개의 초가변 루프(각기 H 사슬 및 L 사슬로부터의 3개 루프)를 발생시킨다. 그러나, 단일 가변 도메인(또는 항원에 특이적인 단지 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)이라도 전체 결합 부위보다 친화성은 낮지만 항원을 인식하여 그것에 결합하는 능력을 가진다.

[0098] "sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 사슬에 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게, sFv 폴리펩티드는 Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합에 필요한 구조를 형성하도록 하는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커도 추가로 포함한다. sFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; 문헌 [Borrebaeck 1995, 이하 상기와 동일함]을 참조한다,

[0099] 용어 "디아바디"는 V 도메인의 사슬 내가 아닌 사슬 간 쌍 형성이 달성되어, 이가 단편, 즉 2개의 항원 결합 부위를 가지는 단편을 수득하도록 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 간의 짧은 링커(약 5 내지 10개 잔기)로 sFv 단편(선행 단락 참조)을 작제함으로써 제조되는 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중 특이적 디아바디는 두 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 사슬 상에 존재하는 2개의 "크로스오버(crossover)" sFv 단편의 이종 이량체이다. 디아바디는 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161 및 문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 충분히 기재되어 있다.

[0100] "내재화하는" 항체는 포유동물 세포(예를 들어, 세포 표면 폴리펩티드 또는 수용체) 상의 항원에 결합할 때 세포에 의해 흡수되는(즉, 들어가는) 항체이다. 내재화 항체에는 물론 항체 단편, 인간 또는 키메라 항체, 및 항체 접합체가 포함될 것이다. 일부 치료 용도를 위해, 생체내 내재화가 고려된다. 내재화된 항체 분자의 수는 세포를 사멸시키거나, 세포의 성장, 특히 감염 세포를 억제하는 데 충분하거나 적당할 것이다. 항체 또는 항체 접합체의 강도에 따라, 일부 예에서, 세포 내로의 단일 항체 분자의 흡수는 항체가 결합하는 표적 세포를 사멸시키는 데 충분하다. 예를 들어, 일부 독소는 사멸에 있어 매우 강력하여, 항체에 접합된 독소의 한 분자의 내재화가 감염 세포를 사멸시키는 데 충분하다.

[0101] 본원에 사용되는 항체는, 그것이 항원과 검출 가능한 수준으로 반응하는 경우, 바람직하게는 약 10^4 M^{-1} 이상 또는 10^5 M^{-1} 이상, 약 10^6 M^{-1} 이상, 약 10^7 M^{-1} 이상, 또는 10^8 M^{-1} 이상의 K_a의 친화도 상수로 반응하는 경우, 항원에 "면역특이적", 항원에 "특이적", 또는 항원에 "특이적으로 결합"한다고 말해진다. 항체의 그 동족 항원에 대한 친화도는 또한 해리 상수 K_D로 통상 표시되고, 일부 실시양태들에서, HuM2e 항체는 10^{-4} M 이하, 약 10^{-5} M 이하, 약 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 또는 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합할 경우, M2e에 특이적으로 결합하는 것이다. 항체의 결합도는 통상적 기법, 예를 들어 문헌 [Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))]에 기재된 기법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0102] 항체가 그것의 항원, 세포 또는 조직으로 결합하는 성질은 일반적으로 예를 들어 면역형광 기반의 검정, 예컨대 면역조직화학법(IHC) 및/또는 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 포함한 면역검출법을 이용하여 결정되고 평가될 수 있다.

[0103] 지정된 항체의 "생물학적 특성"을 가지는 항체는 다른 항체와 구분되도록 하는 본 항체의 생물학적 특성을 중 하나 이상을 가지는 그 항체이다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 지정된 항체의 생물학적 특성을 가지는 항체는 지정된 항체에 의해 결합된 것과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 지정된 항체와 공통된 이펙터 기능을 가질 것이다.

[0104] 용어 "길항자" 항체는 가장 광위적인 의미로 사용되고, 이에는 해당 항체가 특이적으로 결합하는 에피토프, 폴리펩티드, 또는 세포의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화하는 항체가 포함된다. 길항자 항체의 동정 방법은 후보물질 길항자 항체에 의해 특이적으로 결합된 폴리펩티드 또는 세포를 후보물질 길항자 항체와 접촉시키는 단계, 및 폴리펩티드 또는 세포와 정상적으로 관련된 하나 이상의 생물학적 활성의 검출 가능한 변화를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0105] "감염 세포의 성장을 억제하는 항체" 또는 "성장 억제성" 항체는 항체에 의해 결합된 M2e 에피토프를 발현하거나 발현할 수 있는 감염 세포에 결합하여 그것의 상당한 성장 억제를 초래하는 항체이다. 바람직한 성장 억제성 항체는, 전형적으로 테스트 항체로 처리하지 않은 감염 세포인 적절한 대조군에 비해, 감염 세포의 성장을 20% 초과, 바람직하게는 약 20% 내지 약 50%, 더욱 더 바람직하게는 50% 초과(예를 들어, 약 50% 내지 약 100%)만큼 억제한다. 성장 억제는 세포 배양액 내 약 0.1 내지 30 μ g/ml 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정될 수 있고, 여기서 성장 억제는 항체에 감염 세포를 노출한 후 1 내지 10일에 결정된다. 생체내 감염 세포의 성장 억제는 당업계에 알려진 각종 방식으로 결정될 수 있다. 항체는, 약 1 μ g/kg 내지 약 100 mg/kg 체중으로 그 항체를 투여할 경우, 항체를 처음 투여한지 약 5일 내지 3개월 내에, 바람직하게는 약 5일 내지 30일 내에 감염 세포의 백분율 또는 감염 세포의 총수를 감소시키게 될 경우, 생체내 성장 억제성인 것이다.

[0106] "아폽토시스를 유도하는" 항체는 아넥신(annexin) V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 형질내세망의 확장, 세포 단편화, 및/또는 막 소낭의 형성에 의해 결정 시, 프로그래밍된 세포 사멸을 유도하는 항체(아폽토시스체로 불림)이다. 바람직하게, 세포는 감염 세포이다. 아폽토시스와 관련된 세포내 이벤트를 평가하기 위해, 각종 방법들이 이용 가능하다. 예를 들어, 포스파티딜 세린(PS) 위치이동은 아넥신 결합에 의해 측정될 수 있고; DNA 단편화는 DNA 래더링(laddering)을 통해 평가될 수 있으며; DNA 단편화를 통한 핵/염색질 축합은 하이포디플로이드(hypodiploid) 세포 내 임의의 증가에 의해 평가될 수 있다. 바람직하게, 아폽토시스를 유도하는 항체는 아넥신 결합 검정에 있어서 비처리 세포에 비해 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배의 아넥신 결합 유도를 초래하는 항체이다.

[0107] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 이는 항체 이소타입에 따라 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예에는, C1q 결합 및 보체의 존성 세포 독성; Fc 수용체 결합; 항체 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화가 포함된다.

[0108] "항체 의존성 세포 매개 세포 독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)" 및 "ADCC"는, 특정 세포 독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합되어진, 분비된 Ig가 상기 세포 독성 이펙터 세포가 항원을 가지는 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 세포독소로 표적 세포를 사멸시키도록 하는 한 형태의 세포 독성을 지칭한다. 항체는 세포 독성 세포에 "닿아(arm)", 그러한 사멸을 행할 것이 요구된다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 제464면 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 측정법이 수행될 수 있다. 그러한 검정에 측정법에 유용한 이펙터 세포에는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포가 포함된다. 대안적으로 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성을 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA), 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서, 생체내 평가될 수 있다.

[0109] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 게다가, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하는 수용체이고, 이에는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체 및 이들 수용체의 대립형질 변이체와 택일적으로 스플라이싱된 형태가 포함된다. Fc γ RII 수용체에는 Fc γ RIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")가 포함되는데, 이들은 세포질 도메인에서 일차적으로 구별되는 유사한 아미노산 서열을 보유한다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그것의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신 기재 활성화 모티프(ITAM)를 보유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신 기재 억제 모티프(ITIM)를 보유한다(문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol.,

15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; 문헌 [Capel et al, Immunomethods, 4:25-34 (1994)]; 및 문헌 [de Haas et al, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 이후 확인될 것들을 비롯한 기타 FcR은 또한 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 그 용어에는 모계 IgG가 태아로 전달되도록 하는 신생아 수용체, FcRn이 포함된다(문헌 [Guyer et al, J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 문헌 [Kim et al, J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0110] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예에는 PBMC, NK 세포, 단핵구, 세포 독성 T 세포 및 호중구가 포함되고; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0111] "보체 의존성 세포 독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 통상적 보체 경로의 활성화는 항체의 동족 항원에 결합된 그 항체에의 보체계(C1q)의 첫 번째 성분의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정이 수행될 수 있다.

[0112] 용어 "인플루엔자 A" 및 "인플루엔자바이러스 A"는 오르토마이소비리다에(Orthomyxoviridae)계 바이러스의 속을 지칭한다. 인플루엔자바이러스 A에는 단 하나의 종, 즉 새, 인간, 돼지 및 말에서 인플루엔자를 유발하는 인플루엔자 A 바이러스만이 포함된다. 모든 서브타입의 인플루엔자 A 바이러스의 균주가 야생형 새로부터 단리되었으나, 질병이 공통된 것은 아니다. 인플루엔자 A 바이러스의 일부 단리물은 가축 가금뿐만 아니라 드물게는 인간에서도 심각한 질병을 유발한다.

[0113] 감염 치료 목적상의 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원용, 스포츠용 또는 애완용 동물, 예컨대 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 비롯한 임의의 포유동물을 지칭한다. 바람직하게, 동물은 인간이다.

[0114] "처치하는 것" 또는 "처치" 또는 "경감"은, 표적으로 하는 병리학적 상태 또는 장애를 예방하거나 감속(경감)시키는 것을 목적으로 하는 치료 처치 및 예방이나 방지 조치를 모두 지칭한다. 처치를 필요로 하는 자들에는 이미 장애를 가지고 있는 자들뿐만 아니라 장애를 가지기 쉽거나 장애를 예방하고자 하는 자도 포함된다. 대상 또는 포유동물은, 본 발명의 방법에 따른 치료량의 항체를 투입한 후, 환자가 하기 증상 중 하나 이상이 관찰가능하고/하거나 측정가능한 정도로 감소되거나 부재함을 나타낼 경우, 성공적으로 "치료된" 것이다: 감염 세포의 수 감소 또는 감염 세포의 부재; 감염된 총 세포의 백분율 감소; 및/또는 어느 정도로의, 특정 감염과 관련된 증상들 중 하나 이상의 경감; 발병율 및 치사율 감소, 및 삶의 질 문제의 향상. 성공적인 치료 및 질병 개선을 평가하기 위한 상기 변수들은 의사에게 자명한 통상의 절차에 의해 용이하게 측정가능하다.

[0115] 용어 "치료 유효량"은 대상 또는 포유동물에서의 질병 또는 장애를 "처치"하는 데 유효한 항체 또는 약물의 양을 지칭한다. "처치하는 것"에 대한 선행 단락을 참조한다

[0116] "만성" 투여란 연장된 시간 동안 초기 치료 효과(활성)를 유지하기 위해, 급성 방식과 반대되는 연속 방식으로 작용제(들)를 투여하는 것을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단은 없이 연속적으로 행해지지 않고, 본래 순환적인 처치이다.

[0117] 하나 이상의 추가 치료제"와 조합되는" 투여에는 동시(동시발생) 및 임의의 순서의 연속 투여가 포함된다.

[0118] 본원에서 사용되는 "담체"는 사용되는 투약량 및 농도에서 노출되는 세포 또는 포유동물에 무독성인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 생리학상 허용가능한 담체는 종종 pH 완충 수용액이다. 생리학적으로 허용가능한 담체의 예에는 완충액, 예컨대 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 아스코르브산을 비롯한 산화방지제; 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐파리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알코올, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 짹이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온계 계면활성제, 예를 들어 트윈(TWEEN)TM, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 플루로닉스(PLURONICS)TM가 포함된다.

[0119] 본원에 사용된 "세포 독성제"는 세포의 기능을 억제하고/하거나 세포를 파괴시키는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴,

빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 인터칼레이팅제, 효소 및 이의 단편, 예컨대 핵분해 효소, 항생제, 및 독소, 예컨대 소분자 독소, 또는 세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소, 및 이의 단편 및/또는 변이체, 및 이하 개시되는 각종 항종양 또는 항암제를 포함하는 것으로 한다. 다른 세포 독성제가 이하 기재된다.

[0120] 본원에 사용되는 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 성장 억제제의 예에는 세포 주기 진행을 차단하는 작용제, 예컨대 G1기 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제가 포함된다. 통상적 M기 차단제에는 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 비노렐빈 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이 소미라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 포함된다. G1을 저지하는 상기 작용제는 또한 S기 정지에도 작용하는데, 이에는 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라(arac)-C가 있다. 추가 정보는 Murakami 등의 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, 제목: "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" (W B Saunders: Philadelphia, 1995), 특히 제13면]에서 찾아볼 수 있다. 탁산(파클리탁셀 및 도세탁셀)은 모두 주목 나무에서 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목 나무로부터 유래된 도세탁셀(탁소테레(TAXOTERE)™, 통발랑 로라(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀의 반합성 유사체(탁솔(TAXOL)®, 브리스톨-마이어 스퀴브(Bristol-Myers Squibb))이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미소관의 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미소관을 안정화시키며, 이로써 세포 내 유사분열의 억제가 초래된다.

[0121] 본원에 사용되는 "표지"란 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 접합되어 "표지된" 항체를 생성시키는 검출 가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체로 검출될 수 있거나(예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에는 검출 가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수 있다.

[0122] 본원에 사용되는 용어 "에피토프 태깅된"이란 "태그 폴리펩티드"에 융합된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 만들어질 수 있을 정도의 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 가지나, 융합되는 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 태그 폴리펩티드는 또한 바람직하게 매우 독특해서, 자신에 대한 항체가 다른 에피토프와는 실질적으로 교차반응하지 않는 것이 바람직하다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기를 가지며, 통상은 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기(바람직하게는, 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 가진다.

[0123] "소분자"는 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 본원에서 정의된다.

[0124] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA, DNA 또는 혼합 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 혼용된다. 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 발현하거나 폴리펩티드를 발현하도록 적합화될 수 있는 게놈 서열, 게놈의 및 플라스미드 서열, 및 보다 작은 조작된 유전자 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0125] "단리된 핵산"은 다른 게놈 DNA 서열뿐만 아니라, 천연 서열을 본래 동반하는 리보솜 및 중합효소와 같은 단백질 또는 차체로부터 실질적으로 분리된 핵산이다. 이 용어는 천연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하고, 이에는 재조합 또는 클로닝 DNA 단리물, 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체가 포함된다. 실질적으로 순수한 핵산에는 단리된 형태의 핵산이 포함된다. 물론, 이는 본래 단리된 핵산을 지칭하고, 사람의 손에 의해 단리된 핵산에 나중에 부가되는 유전자 또는 서열을 배제하지 않는다.

[0126] 용어 "폴리펩티드"는 통상적인 의미, 즉 아미노산의 서열로서 사용된다. 폴리펩티드는 특정 길이의 생성물로 국한되지 않는다. 펩티드, 올리고펩티드 및 단백질이 폴리펩티드의 정의 내에 포함되며, 본 용어는 특별한 언급이 없는 한, 본원에서 상호 혼용될 수 있다. 상기 용어는 또한, 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어 당화, 아세틸화, 인산화 등뿐만 아니라 천연 발생 및 비천연 발생의 당해 분야에 공지된 다른 변형들을 베제하거나 지칭하지 않는다. 폴리펩티드는 전체 단백질, 또는 이의 부분서열일 수 있다. 본 발명의 내용 내의 특정의 관심 폴리펩티드는 CDR을 포함하고 항원 또는 인플루엔자 A 감염 세포를 결합할 수 있는 아미노산 부분서열이다.

[0127] "단리된 폴리펩티드"는 그것의 자연 환경의 구성요소로부터 동정되어 분리되고/되거나 회수된 폴리펩티드이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 (1) 로우리 방법에 의해 결정 시에 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과의 폴리펩티드로, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N 말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 수득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 동종성으로 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티

드의 자연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 인시츄 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상 단리된 폴리펩티드는 하나 이상의 정제 단계에 의해 정제될 것이다.

[0128] "천연 서열" 폴리뉴클레오티드는 자연에서 유래된 폴리뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드이다. "천연 서열" 폴리펩티드는 천연으로부터(예를 들어, 임의의 종으로부터) 유래된 폴리펩티드(예를 들어, 항체)와 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드이다. 그러한 천연 서열 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0129] 본원에 사용되는 용어 폴리뉴클레오티드 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 있어 본원에 구체적으로 개시된 폴리뉴클레오티드와 전형적으로 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 그러한 변이체는 천연 발생되거나, 예를 들어 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열 중 하나 이상을 변형시키고 본원에 기재된 바와 같이 코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가함으로써, 또한/또는 당업계에 공지된 각종 기법들 중 임의의 기법을 이용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다.

[0130] 본원에 사용되는 용어 폴리펩티드 "변이체"는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입에 있어 본원에 구체적으로 개시된 폴리펩티드와 전형적으로 상이한 폴리펩티드이다. 그러한 변이체는 천연 발생되거나, 예를 들어 본 발명의 상기 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 변형시키고, 본원에 기재된 바와 같이 코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 평가하고/하거나, 당업계에 공지된 각종 기법들 중 임의의 기법을 이용함으로써 합성적으로 생성될 수 있다.

[0131] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에 변형을 가할 수 있고, 이에도 목적 특성을 가지는 변이체 또는 유도체 폴리펩티드를 코딩하는 작용성 문자가 수득된다. 폴리펩티드의 아미노산 서열을 본 발명의 폴리펩티드의 균등하거나 심지어 향상된 변이체 또는 일부를 생성시키도록 변경하는 것이 요망될 경우, 당업자는 전형적으로 코딩 DNA 서열의 코돈 중 하나 이상을 변화시킬 것이다.

[0132] 예를 들어, 특정 아미노산은 다른 폴리펩티드(예를 들어, 항원) 또는 세포에 결합하는 능력을 상당히 손실시키지 않으면서 단백질 구조에 있어 다른 아미노산에 치환될 수 있다. 생물학적 작용 활성을 한정하는 것이 그것의 결합능 및 단백질의 성질이기 때문에, 단백질 서열 및 물론 그것의 밑줄 쳐진 DNA 코딩 서열에 특정 아미노산 서열 치환이 가해질 수 있고, 그럼에도 불구하고 유사 성질을 가지는 단백질이 수득된다. 이에 따라, 개시된 조성물의 웨პ티드 서열, 또는 그것의 생물학적 유용성 또는 활성을 상당히 손실시키지 않으면서 상기 웨პ티드를 코딩하는 상응하는 DNA 서열에 각종 변화를 가할 수 있는 것으로 고려된다.

[0133] 많은 예들에서, 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 보존적 치환을 포함할 것이다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 성질을 가지는 또 다른 아미노산에 치환되어, 웨პ티드 화학 분야의 당업자가 폴리펩티드의 2차 구조 및 수치 특성이 실질적으로 변화되지 않을 것으로 하는 치환이다.

[0134] 상기 변화를 수행하는 데 있어서, 아미노산의 수치 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질 상에 상호작용적인 생물학적 기능을 부여하는 데 있어서 수치 아미노산 지수의 중요성은 일반적으로 당해 분야에서 이해되고 있다(문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 아미노산의 상대적인 수치 특성이 결과적으로 단백질의 2차 구조에 영향을 미치며, 이로써 단백질의 다른 문자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호 작용을 정의하게 된다는 것이 인정되고 있다. 각 아미노산에는 이의 소수성 및 전하 특성에 기초하여 수치 지수가 배정되었다(문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 이러한 값은 이소루신(+4.5); 발린(+4.2); 루신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 리신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5)이 포함된다.

[0135] 특정 아미노산은 유사한 수치 지수 또는 득점을 가지는 다른 아미노산으로 치환되어 유사한 생물학적 활성을 가지는 단백질을 수득할 수 있으며, 즉 생물학적 기능성 면에서 등가인 단백질을 수득할 수 있는 것으로 당업계에 알려져 있다. 상기 변화를 수행하는 데 있어서, 수치 지수가 ± 2 범위내인 아미노산의 치환이 바람직하며, ± 1 내인 것이 특히 바람직하며, ± 0.5 내인 것이 보다 더 특히 바람직하다. 또한, 유사 아미노산의 치환은 친수성에 기초하여 효과적으로 수행할 수 있는 것으로 당업계에서 이해되고 있다. 미국 특허 제4,554,101호는 단백질의 가장 큰 국부적 평균 친수성은 이의 인접하는 아미노산들의 친수성에 의해 영향을 받기 때문에, 단백질의 생물학적 특성과 상관관계가 있음을 언급하고 있다.

[0136] 미국 특허 제4,554,101호에 상세히 설명되는 바와 같이, 하기 친수성 값이 아미노산 잔기들에 할당되었다: 아르기닌(+3.0); 리신(+3.0); 아스파르테이트(+3.0 \pm 1); 글루타메이트(+3.0 \pm 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2);

글루타민(+0.2); 글리신(0); 트레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5±1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루신(-1.8); 이소루신(-1.8); 티로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4). 아미노산은 유사한 친수성 값을 가지는 다른 아미노산으로 치환되어 여전히 생물학적 등가물, 특히 면역학적으로 등가 단백질을 수득할 수 있는 것으로 이해된다. 상기 변화에서, 친수성이 ±2내인 아미노산의 치환이 바람직하며, ±1내인 것이 특히 바람직하며, ±0.5인 것이 보다 더 특히 바람직하다.

[0137] 그러므로, 상기 요약된 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환체의 상대적인 유사성, 예를 들어 이의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초한다. 다양한 전술한 특성들을 고려한 예시적인 치환은 당업자에게 공지되어져 있으며, 아르기닌 및 리신; 글루타메이트 및 아스파르테이트; 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 루신 및 이소루신을 포함한다.

[0138] 아미노산 치환은 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양쪽성 특성에서의 유사성에 기초하여 추가로 수행될 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하며, 양으로 하전된 아미노산은 리신 및 아르기닌을 포함하며; 유사한 친수성 값을 가지는 하전되지 않은 극성 헤드 군을 가지는 아미노산은 루신, 이소루신 및 발린; 글리신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 및 세린, 트레오닌, 페닐알라닌 및 티로신을 포함한다. 보존적인 변화를 나타낼 수 있는 다른 아미노산 군은 (1) ala, pro, gly, glu, asp, gin, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 및 (5) phe, tyr, trp, his를 포함한다. 변이체는 또한 혹은 대안적으로 비보존적인 변화를 포함할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 5개 이하의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가에 의해 천연 서열과는 상이하다. 변이체는 또한 (혹은 대안적으로) 예를 들어, 폴리펩티드의 면역원성, 2차 구조 및 소수성 성질에 최소한의 영향을 미치는 아미노산의 결실 또는 부가에 의해 변형될 수 있다.

[0139] 폴리펩티드는 번역과 동시에 또는 번역 후에 단백질의 수송을 지시하는, 단백질의 N 말단에서 신호 (또는 리더) 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 또한 폴리펩티드(예를 들어, 폴리-His)의 합성, 정제 또는 동정의 용이성을 위해서, 또는 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 증강시키기 위해서 링커 또는 다른 서열에 접합시킬 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 면역글로불린 Fc 영역에 접합될 수 있다.

[0140] 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 비교하는 경우, 두 서열에서 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 하기 기술되는 바와 같이, 최대 상응하도록 배열시킨 경우에 동일한 경우, 두 개의 서열은 "동일"한 것으로 말해진다. 두 개의 서열 사이에서 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국부적 영역을 확인하고 비교하기 위한 비교창 상에서 서열을 비교함으로써 수행된다. 본원에서 사용된 바와 같은 "비교창"은 두 개의 서열을 최적으로 배열한 후, 서열을 동일한 수의 인접 위치의 기준 서열과 비교할 수 있는, 적어도 약 20개의 인접 위치, 통상은 30 내지 약 75개, 40 내지 약 50개 인접 위치의 세그먼트를 지칭한다.

[0141] 비교를 위한 서열의 최적 배열은 디풀트 변수를 사용하는 생물정보학 소프트웨어의 레이저진(Lasergene) 스위트에서 메갈라인(Megalign) 프로그램(DNA스타 인코포레이티드(DNASTAR, Inc.), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 프로그램은 하기 문헌들에서 기술된 수 개의 배열도를 구현한다: 문헌 [Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358]; 문헌 [Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 *Methods in Enzymology* vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA]; 문헌 [Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:1151-153]; 문헌 [Myers, E.W. and Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105]; 문헌 [Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425]; 문헌 [Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) *Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy*, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. and Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730].

[0142] 대안적으로, 비교를 위한 서열의 최적 배열은 문헌 [Smith and Waterman (1981) *Add. APL. Math* 2:482]의 국부적 동일성 알고리즘에 의해, 문헌 [Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443]의 동일성 배열 알고리즘에 의해, 문헌 [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444]의 유사성 조사 방법에 의해, 상기 알고리즘의 컴퓨터화된 수단(위스콘신 제네티스 소프트웨어 팩키지 중 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 및 TFASTA, 제네티스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)(GCG)(미국 위스콘신주 매디슨 575 사이언스 드라이브 소재))에 의해, 또는 조사에 의해서 수행될 수 있다.

[0143] 서열 동일성 및 서열 유사성의 백분율을 측정하는 데 적합한 알고리즘의 한 바람직한 예는 문헌 [Altschul et

al. (1977) *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402] 및 문헌 [Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]에서 각기 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 및 BLAST 2.0은 예를 들어, 본원에 기술된 변수들을 사용하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 대한 서열 동일성(%)을 결정할 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 입수 가능하다.

[0144] 한 예시적인 예에서, 누적 득점은 뉴클레오티드에 있어서, 변수 M(부합 잔기쌍에 대한 보상 득점; 항상 >0) 및 N(비부합 잔기에 대한 폐널티 득점; 항상 <0)을 사용하여 산출할 수 있다. 각각의 방향에서 워드 적중의 신장은, 누적 배열 득점이 이의 최대 달성치로부터 X 양만큼 감소될 때; 하나 이상의 음(-) 득점 잔기 배열의 축적으로 인해, 누적 득점이 0 또는 그 이하로 도달할 때; 또는 서열의 두 말단 중 하나에 도달할 때, 중단된다. BLAST 알고리즘 변수 W, T 및 X는 배열의 감수성 및 속도를 결정한다. BLASTIN 프로그램(뉴클레오티드 서열용)은 디폴트로서 11의 워드 길이(W), 10의 기대치(E) 및 BLOSUM62 득점 매트릭스(문헌 [Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915] 참조) 배열, 50의 (B), 10의 기대치(E), M=5, N=-4 및 두 쇄의 비교를 이용한다.

[0145] 아미노산 서열에 있어서, 득점 매트릭스를 사용하여 누적 득점을 계산할 수 있다. 각각의 방향에서 워드 적중의 신장은, 누적 배열 득점이 이의 최대 달성치로부터 X 양만큼 감소될 때; 하나 이상의 음(-) 득점 잔기 배열의 축적으로 인해, 누적 득점이 0 또는 그 이하로 도달할 때; 또는 서열의 두 말단 중 하나에 도달할 때, 중단된다. BLAST 알고리즘 변수 W, T 및 X는 배열의 감수성 및 속도를 결정한다.

[0146] 한 접근법에서, "서열 동일성의 백분율"은 적어도 20개 위치의 비교창 상에서 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 결정되며, 이때 비교창 내의 폴리펩티드의 위치는 두 개의 서열의 최적 배열에 대해서 기준 서열(이는 부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여, 20% 이하, 일반적으로 5 내지 15%, 또는 10 내지 12%의 부가 또는 결실(예를 들어, 캡)을 포함할 수 있다. 백분율은 동일한 아미노산 잔기가 부합된 위치의 수를 산출하기 위해서 두 개의 서열 모두에서 발생하는 위치의 수를 결정하고, 부합된 위치를 기준 서열 내 위치의 총 수(즉, 창 크기)로 나누고 서열 동일성 백분율을 산출하기 위해서 100으로 곱하여 산출된다.

[0147] "상동성"은 서열을 배열하고, 필요에 따라 캡을 도입하여 최대 상동성 백분율을 달성한 후, 비-변이체 서열과 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열 변이체 내 잔기의 백분율을 지칭한다. 특정 실시양태들에서, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 변이체는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 상동성을 가진다.

[0148] "벡터"에는 셔틀 및 발현 벡터가 포함된다. 전형적으로, 플라스미드 작제물은 또한 세균에서의 플라스미드의 복제 및 선택 각각을 위한 복제 기점(예를 들어, ColE1 복제 기점) 및 선택가능한 마커(예를 들어, 암피실린 또는 테트라사이클린 내성)를 포함할 것이다. "발현 벡터"는 세균 세포 또는 진핵세포 내, 본 발명의 항체 단편을 포함한 항체의 발현을 위한 필요 대조 서열 또는 조절 요소를 포함하는 벡터를 지칭한다. 적당한 벡터가 이하에 개시되어 있다.

[0149] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태(영문 "a", "an" 및 "the"에 해당)는 내용이 다른 경우를 명백히 나타내지 않는 한, 복수 표현을 포함한다.

[0150] 본 발명은 실시예 1에 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열 및 실시예 1 및 2에 나와 있는 아미노산 서열, 및 이의 단편 및 변이체에 의해 코딩된 상기 폴리펩티드를 포함한, 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 HuM2e 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 본원에서 8i10, 21B15 또는 23K12로 표시되는 항체이다. 이들 항체는 동일한 세포 유형의 비감염 대조 세포에 비해, 인플루엔자 A 감염 세포에 우선적으로 결합하거나 특이적으로 결합한다.

[0151] 특정 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 M2 단백질에 결합한다. 일부 실시양태들에서, 본 발명은 천연 입체구조로만 존재하는, 즉 세포 내 발현되는 M2e 내의 에피토프에 결합하는 HuM2e 항체를 제공한다. 특정 실시양태들에서, 이들 항체는 단리된 M2e 폴리펩티드, 예를 들어 23개 아미노산 잔기 M2e 단편에 특이적으로 결합하지 못한다. 이들 항체는 M2 웨პ티드의 비선형(즉, 입체구조) 에피토프(들)를 인식하는 것으로 이해된다.

[0152] M2 단백질 내, 특히 M2e 내 상기 특정 입체구조 에피토프는 대상 내의 인플루엔자 감염의 발병을 예방하기 위한 백신으로 사용될 수 있다.

[0153] 당업자에 의해 이해되어지는 바와 같이, 본원의 항체 및 그것의 제조 및 사용 방법에 관한 일반 설명은 개별 항

체 폴리펩티드 구성요소 및 항체 단편에도 적용된다.

[0154] 본 발명의 항체는 다클론성 또는 단클론성 항체일 수 있다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, 상기 항체는 단클론성이다. 특정 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 완전 인간 항체이다. 다클론성 및 단클론성 항체의 생성 방법은 당업예에 알려져 있고, 일반적으로 예를 들어 미국 특허 제6,824,780호에 기재되어 있다. 전형적으로, 본 발명의 항체는 이하 추가 기재되는 바와 같이, 당업계에서 이용 가능한 백터 및 방법을 이용하여, 재조합 방식으로 생성된다. 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수 있다(미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).

[0155] 인간 항체는 또한 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 모든 범주의 인간 항체를 생성시킬 수 있는 유전자도 입 동물(예를 들어, 마우스)에서 생성될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이체 마우스 내 항체 중쇄 결합 영역(J_H) 유전자의 동종 결실이 내인성 항체 생성의 완전 억제를 초래하는 것으로 기재되었다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이의 상기 생식계열 돌연변이체 마우스 내로의 전달로써, 항원 챌린지 시에 인간 항체가 생성된다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; 문헌 [Jakobovits et al, Nature, 362:255-258 (1993)]; 문헌 [Bruggemann et al, Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,591,669호(이들 모두 젠팜(GenPharm) 출원); 미국 특허 제5,545,807호; 및 WO 97/17852를 참조한다. 상기 동물들은 본 발명의 폴리펩티드를 포함한 인간 항체를 생성시키도록 유전 조작될 수 있다.

[0156] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 인간 공급원 및 인간외 공급원 모두로부터 유래된 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 특정 실시양태들에서, 이들 키메라 항체는 인간화 또는 영장류화™된 것이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체 내 유사 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

[0157] 본 발명의 문맥에서, 키메라 항체는 또한 인간 초가변 영역 또는 하나 이상의 CDR을 가지나 서열 중 하나 이상의 다른 영역이 인간외 동물로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 완전 인간 항체를 포함한다.

[0158] 키메라 항체의 제조에 사용하기 위한 경 및 중 인간외 서열의 선택은, 항체가 인간 치료 용도를 위한 것일 때 항원성 및 인간 항-인간의 항체 반응을 감소시키는 데 중요하다. 또한, 키메라 항체가 항원에 대한 높은 결합성 및 다른 바람직한 생물학적 성질을 보유하는 것도 중요하다. 이 목적을 달성하기 위해, 한 바람직한 방법에 따라, 키메라 항체는 모 인간 및 인간외 서열의 3-차원 모델을 이용하여 모 서열 및 각종 개념적 키메라 생성물의 분석 방법에 의해 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델이 통상 이용 가능하고, 당업자에게 자명하다. 선택된 후보물질 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 예시하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 이들 표시의 조사는 후보물질 면역글로불린 서열의 작용화에 있어의 잔기의 가능한 역할 분석, 즉 후보물질 면역글로불린이 그것의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 식으로, FR 잔기는 목적 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성이 달성되도록 수령자 및 임포트 서열로부터 선택되어 조합될 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미침에 있어 직접적으로 또한 가장 실질적으로 관련된다.

[0159] 상기에 언급된 바와 같이, 항체 (또는 면역글로불린)는 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에서의 차이에 따라, 5가지 상이한 부류로 나뉘어질 수 있다. 소정의 부류 내의 모든 면역글로불린들은 매우 유사한 중쇄 불변 영역을 가진다. 이 차이는 서열 연구 또는 더욱 통상적으로는 혈청학적 수단에 의해(즉 이들 차이에 지정된 항체 사용에 의해) 검출될 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 임의의 부류일 수 있고, 이에 따라 감마, 뮤, 알파, 베타 또는 엡실론 중쇄를 가질 수 있다. 감마 사슬은 감마 1, 감마 2, 감마 3 또는 감마 4일 수 있고; 알파 사슬은 알파 1 또는 알파 2일 수 있다.

[0160] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 IgG이다. IgG는 면역글로불린 분자의 모든 기능을 수행할 수 있기 때문에 가장 다목적용인 면역글로불린으로 간주된다. IgG는 혈청 내 주요 Ig이고, 태반을 가로지르는 유리한 부류의 Ig이다. IgG는 또한 보체를 고정하나, IgG4 하위부류는 그러하지 않다. 대식세포, 단핵구, PMN 및 일부 림프구는 IgG의 Fc 영역에 대한 Fc 수용체를 가진다. 모든 하위부류들이 동등하게 잘 결합하는 것은 아니며; IgG2 및 IgG4는 Fc 수용체에 결합하지 않는다. PMN, 단핵구 및 대식세포 상의 Fc 수용체에 대한 결합의 결과는, 세포가 이제 항원을 더 잘 내재화할 수 있다는 것이다. IgG는 식세포작용을 증진시키는 옵소닌이다. 다른 유형의 세포 상의 Fc 수용체에 대한 IgG의 결합은 다른 기능의 활성화를 초래한다. 본 발명의 항체는 임의의 IgG 하위부류의 것일 수 있다.

[0161] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 IgE이다. IgE는 항원과 상호작용하기 전에도 호염기구 및 비만 세포 상의 Fc 수용체에 매우 강하게 결합하기 때문에, 가장 드문 혈청 Ig이다. 비만 세포 상의 호염기구에의 결합 결과로서, IgE는 알레르기 반응에 관여한다. 세포 상의 IgE에의 알레르겐의 결합은 알레르기 증상을 초래하는 각종 약리학적 매개자의 방출을 초래한다. IgE는 또한 기생충성 구충병에서 기능을 한다. 호산성 백혈구는 IgE에 대한 Fc 수용체를 가지고, IgE-코팅 구충에의 호산성 백혈구의 결합은 기생충의 사멸을 초래한다. IgE는 보체를 고정하지 않는다.

[0162] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 항체 및 이의 단편은 카파 또는 람다인 가변 경쇄를 포함한다. 람다 사슬은 예를 들어 람다 1, 람다 2, 람다 3 및 람다 4를 비롯한 서브타입 중 임의의 것일 수 있다.

[0163] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 포함하는 항체 단편을 추가로 제공한다. 특정 환경에서, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 이용하는 것에 이점이 있다. 예를 들어, 보다 작은 크기의 단편은 급속 소거를 가능하게 하고, 특정 조직, 예컨대 고체 종양에의 접근이 향상되도록 할 수 있다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단쇄 항체; 및 항체 단편로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함된다.

[0164] 항체 단편의 생성을 위한 각종 방법들이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백분해 절단을 통해 유래되었다(예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992)]; 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 *E. coli*에서 발현되고 그로부터 분비될 수 있어, 다양한 상기 단편을 용이하게 생성시킬 수 있다. Fab'-SH 단편은 *E. coli*로부터 직접적으로 회수되고 화학적으로 커플링되어, F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다(문헌 [Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)]). 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 구조(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 증가된 생체내 반감기를 가지는 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기법이 당업자에게 명백할 것이다.

[0165] 다른 실시양태에서, 선택되는 항체는 단쇄 Fv 단편(scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 제5,587,458호를 참조한다). Fv 및 sFv는 불변 영역이 없는 비변형 조합 부위를 가지는 유일의 종이다. 따라서, 이들은 생체내 사용 중에 감소된 비특이적 결합에 적당하다. sFv 융합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 융합을 생성하도록 작제될 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 이하 상기와 동일함]을 참조한다. 항체 단편은 또한 예를 들어, 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같은 예를 들어 "선형 항체"일 수 있다. 그러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0166] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 이중특이적 또는 다중특이적이다. 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 가지는 항체이다. 예시적 이중특이적 항체는 단일 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 기타 그러한 항체는 제1 항원 결합 부위를 제2 항원에 대한 결합 부위와 조합할 수 있다. 대안적으로, 항-M2e 팔은 백혈구 상의 촉발 분자, 예컨대 T-세포 수용체 분자(예를 들어, CD3), 또는 IgG에 대한 Fc 수용체(Fc γ R), 예컨대 Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) 및 Fc γ RIII(CD 16)와 결합하는 팔과 조합되어, 감염 세포에 대한 세포내 방어 메카니즘에 초점을 두고 국부화할 수 있다. 이중특이적 항체를 또한 사용하여, 세포 독성을 감염 세포에 국부화할 수 있다. 이 항체는 M2e 결합 팔 및 세포 독성제(예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 사슬, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 팔을 가진다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)로서 제조될 수 있다. WO 96/16673은 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc γ RIII 항체를 기재하고 있고, 미국 특허 제5,837,234호는 이중특이적 항-ErbB2/항-Fc γ RI 항체를 개시한다. 이중특이적 항-ErbB2/Fc α 항체가 WO98/02463에 나와 있다. 미국 특허 제5,821,337호는 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시한다.

[0167] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이중 특이적 항체의 통상적인 재조합 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄-중쇄 쌍의 동시발현에 기초하며, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 가진다(문헌 [Millstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 배열로 인해, 이들 하이브리도마(쿼드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생성시키며, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 가진다. 통상 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는, 올바른 분자의 정체는 번거롭고, 생성물 수율도 낮다. 유사한 방법이 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-

3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0168] 한 상이한 접근법에 따라, 목적 결합 특이성을 가지는 항체 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게, 융합은 헌지, C_H2 및 C_H3 영역 중 적어도 일부를 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인과 함께 이루어진다. 융합 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역(C_H1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합 및 필요한 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 분리된 발현 벡터에 삽입하여, 적당한 숙주 세포 내로 동시형질감염시킨다. 이는 작제물에 사용되는 3개의 폴리펩티드 사슬 내 동일하지 않은 비율이 목적 이중특이적 항체의 최적 수율을 제공하는 실시양태에서, 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 분율을 조절함에 있어 보다 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 사슬의 발현이 높은 수율을 초래할 때, 또는 비율이 목적 사슬 조합의 수율에 유의적 영향을 미치지 않을 때, 2개 또는 3개 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터 내로 삽입하는 것이 가능하다.

[0169] 이 접근법의 한 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 팔에 있는 제1 결합 특이성을 가지는 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 한 팔에 있는 (제2 결합 특이성을 제공하는) 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 단지 절반에서의 면역글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 상기 비대칭구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합으로부터의 목적 이중특이적 화합물의 분리를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 이 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생산하기 위한 보다 상세한 내용은 예를 들어, 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymmology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0170] 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 또 다른 접근법에 따라, 한 쌍의 항체 분자들 간의 계면을 조작하여, 재조합 세포 배양액으로부터 회수된 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 계면은 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 치환된다. 동일하거나 유사한 크기 내지 큰 측쇄(들)의 상보성 "공동 (cavity)"은, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환함으로써, 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종 생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0171] 이중특이적 항체에는 가교 항체 또는 "이종접합" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이종접합 형태의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 표적 면역계 세포를 원치 않는 세포를 표적으로 하는 항체(미국 특허 제4,676,980호) 및 HIV 감염의 치료를 위한 항체(WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089)가 제안되었다. 이종접합 항체는 임의의 통상적 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 각종 가교 기법과 함께 당업계에 공지되어 있고, 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0172] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기법도 또한 문헌에 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결기를 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]는 온전한 항체를 단백질 분해 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성시키는 절차를 기재하고 있다. 이 단편은 디티올 착화제, 아비산 나트륨의 존재 하에서 환원되어 부근 디티올을 안정화하고, 분자간 이황화물 형성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환되어, 동물 양의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어, 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용될 수 있다.

[0173] 최근 진전은 E. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였고, 상기 단편은 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 생성시킬 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)]은 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생성을 기재하고 있다. 각 Fab' 단편을 E. 콜라이로부터 별도로 분비시키고, 시험관내 화학적 커플링시켜, 이중특이적 항체를 생성시켰다. 이에 따라 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체 및 정상 인간 T 세포를 과다발현하는 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 암 종양 표적에 대한 인간 세포 독성 림프구의 세포용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0174] 재조합 세포 배양액으로부터 이중특이적 항체 단편을 직접적으로 제조하고 단리하기 위한 각종 기법들도 또한 기재되었다. 예를 들어, 루신 지퍼를 사용하여 이중 특이적 항체를 제조하였다 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 루신 지퍼 펩티드를 2종의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결하였다. 항체 동종이량체의 헌지 영역을 환원시켜 단량체를 형성한 다음, 재산화시켜 항체 이종이량체를 형성시켰다. 이 방법은 또한 항체 동종이량체를 생산하기 위해 이용될 수 있다. 문헌

[Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 대안적 메카니즘을 제공하였다. 단편은 링커에 의해 V_L 에 연결된 V_H 을 포함하는데, 이는 너무 짧아서 동일 쇄에 존재하는 두 도메인이 쌍을 형성할 수 없다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 다른 단편의 상보적인 V_H 및 V_L 도메인과 쌍을 이루게 되며, 이로써 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단체 Fv(sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 방법이 보고되었다([문헌 (Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994)] 참조]0.

[0175] 2가 초과의 결합가를 가지는 항체도 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. 문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)]. 다가 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 이가 항체보다 더 빨리 내재화 (및/또는 대사)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 가지는 다가 항체(예를 들어, 4가 항체)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 헌지 영역을 포함한다(또는 이들로 구성된다). 이러한 경우, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역에 대해 아미노 말단에 있는 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원의 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다(또는 이들로 구성된다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드 사슬(바람직하게는 2개의 폴리펩티드 사슬)을 포함하고, 여기서 폴리펩티드 사슬(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ (여기서, $VD1$ 은 제1가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이며, Fc 는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내며, n 은 0 또는 1임)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 $VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc$ 영역 사슬; 또는 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 영역 사슬을 포함할 수 있다. 본원의 다가 항체는 바람직하게 적어도 2개(바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 여기서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의적으로는 C_L 도메인을 추가로 포함한다.

[0176] 본 발명의 항체는 단체 항체를 추가로 포함한다.

[0177] 특정 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 내재화 항체이다.

[0178] 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 성질을 향상시키는 것이 바람직할 수 있다. 적절한 뉴클레오티드 변화를, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 사슬에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 항체의 아미노산 서열 변이체가 제조될 수 있다. 그러한 변형에는 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실, 및/또는 그 잔기로의 삽입 및/또는 그 잔기의 치환이 포함된다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 행하여 최종 항체에 도달할 수 있으며, 다만 최종 작제물은 목적 특성을 가진다. 아미노산 변화는 또한 항체의 번역후 공정을 변경시킬 수 있는데, 예컨대 당화 부위의 수 및 위치를 변화시킬 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드에 대한 상기 기재된 임의의 변동 및 변형도 본 발명의 항체에 포함된다.

[0179] 돌연변이 유발에 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 데 유용한 방법은, 문헌 [Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]에 기재된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발(alanine scanning mutagenesis)"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군(예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu)를 확인하여, 중성 또는 음하전 아미노산(가장 바람직하게 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환하여, PSCA 항원과의 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 이어서, 치환에 대한 작용성 감도를 나타내는 상기 아미노산 위치를, 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가 변이체 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 예정되더라도, 돌연변이 자체의 성질은 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 표적 코돈 또는 영역에 도입하고, 발현된 항-항체 변이체를 목적 활성에 대해 스크리닝한다.

[0180] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기 길이 내지 100개 이상의 잔기를 가지는 폴리펩티드의 길이의 범위를 가지는 길이 범위를 아미노 말단 및/또는 카르복실 말단 융합뿐만 아니라, 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예에는 세포 독성 폴리펩티드에 융합된 항체 또는 N 말단 메티오닐 잔기를 가지는 항체가 포함된다. 항체의 다른 삽입 변이체에는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소(예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C 말단 융합이 포함된다.

[0181] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이 변이체는 항체 분자 내 적어도 하나의 아미노산 잔기가

상이한 잔기로 치환된다. 치환 돌연변이 유발에 있어 가장 큰 관심 부위에는 초가변 영역이 포함되나, FR 변경도 또한 고려된다. 보존적 및 비보존적 치환이 고려된다.

[0182] (a) 시트 또는 나선 입체구조로서의, 예를 들어 치환 부위 내 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지함에 있어 그 영향에 있어 상당히 차이가 있는 치환을 선택함으로써, 항체의 생물학적 성질의 실질적 변형이 달성된다.

[0183] 항체의 적절한 입체구조를 유지하는 것에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기도 또한 일반적으로 세린으로 치환되어, 분자의 산화 안정성을 향상시키고 이상 가교를 방지할 수 있다. 역으로, 시스테인 결합(들)을 항체에 부가하여, (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우) 그 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0184] 한 유형의 치환 변이체는 모 항체의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가 개발을 위한 생성된 변이체(들)는 그 변이체가 생성하도록 하는 기원인 모항체에 비해 향상된 생물학적 성질을 가질 것이다. 상기와 같은 치환 변이체를 생성시키는 한 편리한 방법은 파지 표시를 이용한 친화성 성숙을 수반한다. 간략히 말해, 각 입자 내에 팩키징된 M13의 유전자 III 생성물로의 융합체로서 섬유성 파지 입자로부터 단가 방식으로 표시되도록, 수가지 초가변 영역 부위(예를 들어, 6-7 부위)를 돌연변이한다. 이어서, 파지 표시된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보물질 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행하여, 항원 결합에 유의적으로 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 항체와 항원 또는 감염 세포 간의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 작체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 그러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기는 본원에 명시된 기법에 따른 치환을 위한 후보물질이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 추가 개발을 위해 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 성질을 가지는 항체를 선택할 수 있다.

[0185] 항체의 또 다른 유형의 아미노산 변이체는 항체의 본래의 당화 패턴을 변경한다. 변경한다는 것은 항체 내 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분의 결실 및/또는 항체 내 존재하지 않는 하나 이상의 당화 부위의 부가를 의미한다.

[0186] 항체의 당화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된 것이다. N-연결된 것이란 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분을 부착시키는 것을 가리킨다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 부분을 효소에 의해 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내 상기 트리펩티드 서열들 중 어느 하나의 존재는 잠재적 당화 부위를 발생시킨다. O-연결된 당화란 당류 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중 하나를 히드록시아미노산에, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 가리키나, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시시리신도 또한 사용될 수 있다.

[0187] 항체에 당화 부위를 부가함은, (N-연결된 당화 부위의 경우) 상기 기재된 트리펩티드 서열 중 하나 이상을 가지도록 아미노산을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 변경은 또한 (O-연결된 당화 부위의 경우) 원래의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 부가하거나 그 잔기에 의해 치환함으로써 행해질 수도 있다.

[0188] 이펙터 기능에 대해 본 발명의 항체를 변형시켜, 예를 들어 항체의 항원 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC) 및/또는 보체 의존성 세포 독성(CDC)을 증진시킨다. 이는 항체의 Fc 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역 내에 도입함으로써, 상기 영역 내에 사슬내 이황화물 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이와 같이 생성된 동종이량체 항체는 내재화 능력이 향상되고/되거나 보체 매개 세포 사멸 및 항체 의존성 세포내 세포 독성(ADCC)이 증가시킬 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 문헌 [Shopes, B. J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)]를 참조한다. 문헌 [Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 이종이작용성 가교 결합제를 사용하여 항암 활성이 증진된 동종이량체 항체도 또한 제조될 수 있다. 대안적으로, 이종 Fc 영역을 가지는 항체를 조작하여, 보체 세포용해성 및 ADCC 성능이 증진된 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)]를 참조한다.

[0189] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이, 구조 수용체 결합 에피토프를 항체(특히 항체 단편)에 도입할 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 원인이 되는 IgG 분자(예를 들어, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0190] 본 발명의 항체는 또한 예를 들어 정제 또는 진단 용도에 사용하기 위해, 에피토프 태그 또는 표지를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 발명은 또한 세포 독성제 또는 성장 억제제와 같은 항암제에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체를 이용한 치료에 관한 것이다. 그러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제가 상기 기재되었다.

[0191] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신(calicheamicin), 메이탄시노이드(maytansinoid), 트리코텐(trichothene) 및 CC 1065, 및 독소 활성을 가지는 이들 독소의 유도체의 접합체도 또한 본원에서 고려된다.

[0192] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체(전장 또는 단편)는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다. 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신을 먼저 동아프리카 관목 메이테누스 테라타(Maytenus serrata)로부터 단리하였다(미국 특허 제3,896,111호). 후속하여, 일부 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성시키는 것으로 밝혀졌다(미국 특허 제4,151,042호). 합성 메이탄시놀, 및 이의 유도체 및 유사체가 예를 들어 미국 특허 제4,137,230호; 제4,248,870호; 제4,256,746호; 제4,260,608호; 제4,265,814호; 제4,294,757호; 제4,307,016호; 제4,308,268호; 제4,308,269호; 제4,309,428호; 제4,313,946호; 제4,315,929호; 제4,317,821호; 제4,322,348호; 제4,331,598호; 제4,361,650호; 제4,364,866호; 제4,424,219호; 제4,450,254호; 제4,362,663호; 및 제4,371,533호에 개시되어 있다.

[0193] 자체의 치료 지수를 향상시키기 위해, 메이탄신 및 메이탄시노이드를 종양 세포 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 접합시켰다. 메이탄시노이드를 포함한 면역접합체 및 이의 치료 용도가 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호, 제5,416,064호 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]은 인간 결/직장 암에 대해 지정된 단클론성 항체 C242에 연결된 메이탄시노이드 지정된 DM1을 포함하는 면역접합체를 기재하였다. 접합체는 배양된 결장암에 대해 높은 세포 독성을 가지는 것으로 나타났고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다.

[0194] 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의적으로 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결함으로써, 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하였다. 항체 분자당 평균 3-4개 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도를 저해하지 않으면서 표적 세포의 세포 독성을 증진시킴에 있어 효능을 나타냈으나, 독소/항체의 심지어 하나의 분자도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포 독성을 증진시키는 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있고, 알려진 기법에 의해 합성되거나 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 및 상기 언급된 기타 특허 및 비특허 발행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 각종 메이탄시놀 에스테르와 같은 메이탄시놀 분자의 다른 위치에서 또는 방향족 환에서 변형된 메이탄시놀 유사체이다.

[0195] 예를 들어 미국 특허 제5,208,020호 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 및 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에 개시된 것들을 비롯한, 항체 접합체의 제조를 위한 많은 연결기들이 당업계에 알려져 있다. 연결기에는 상기 특허들에 개시된 바와 같은 이황화물기, 티오에테르기, 산 불안정성 기, 광불안정성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불활성 기가 포함되고, 이황화물 및 티오에테르기가 바람직하다.

[0196] 각종 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체(예컨대, 디메틸 아디프이미레이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-динит로벤젠)을 사용하여, 면역접합체를 제조할 수 있다. 특히 바람직한 커플링제에는 이황화물 연결기를 제공하는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)(문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]]) 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP)가 포함된다. 예를 들어, 리신 면역독소가 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098(1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)이 항체에 레디오뉴클레오티드를 접합시키기 위한 한 예시적 키레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포 독성 약물의 방출을 촉진하는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커(문헌 [Cancer Research 52:127-131(1992)]; 미국 특허 제5,208,020호)가 사용될 수 있다.

[0197] 또 다른 관심 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신계 항생제는 피코몰 이하 단위의 농도로 이중 가닥 DNA 파쇄물을 생성시킬 수 있다. 칼리케아미신계의 접합체 제조에 대

해, 미국 특허 제5,712,374호, 제5,714,586호, 제5,739,116호, 제5,767,285호, 제5,770,701호, 제5,770,710호, 제5,773,001호, 제5,877,296호(이들 모두 아메리칸 시안아미드 컴퍼니(American Cyanamid Company) 출원)를 참조한다. 항체가 접합될 수 있는 것인 또 다른 약물은 항엽산제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA 모두는 세포내 작용 부위를 가지고, 세포막을 용이하게 가로지르지 못한다. 그러므로, 항체 매개 내재화를 통한 상기 작용제의 세포 흡수는 그 세포 독성 영향을 크기 증진시킨다.

[0198] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 작용제의 예에는 BCNU, 스트렙토조이신, 빙크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 제5,053,394호, 제5,770,710호에 기재된 LL-E33288 착체로 집합적으로 알려진 작용제 계열뿐만 아니라, 에스페라미신(esperamicin)(미국 특허 제5,877,296호)가 포함된다.

[0199] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 이의 단편에는 예를 들어 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의) 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우라이츠 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다. 예를 들어 WO 93/21232를 참조한다.

[0200] 본 발명은 항체와 핵 세포용해 활성을 가지는 화합물(예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 테옥시리보뉴클레아제; DNase) 간에 형성된 면역접합체를 포함한다.

[0201] 감염 세포의 선택적 파괴를 위해, 항체는 고방사성 원자를 포함한다. 각종 방사성 동위원소는 방사성 접합 항-PSCA 항체의 생성을 위해 이용 가능하다. 그 예에는 At^{211} , 1^{131} , 1^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Rc^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} , 및 Lu 의 방사성 동위원소가 포함된다. 접합체가 진단을 위해 사용될 때, 그것은 신티그래프 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I^{123} , 또는 핵자기공명(NMR) 영상화(자기 공명 영상화, mr i로도 알려짐)를 위한 스핀 표지, 예컨대 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 블로-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철이 포함된다.

[0202] 방사성 표지 또는 기타 표지가 알려진 방식으로 접합체에 도입된다. 예를 들어, 웨티드는 생합성되거나, 예를 들어 수소대신에 불소-19를 수반한 적합한 아미노산 전구체를 이용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수 있다. tc^{99m} 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지가 웨티드 내 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이 트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 인도젠(IODOGEN) 방법(문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 이용하여, 요오드-123을 도입할 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 기타 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0203] 대안적으로, 항체 및 세포 독성제를 포함하는 융합 단백질이 예를 들어 재조합 기법 또는 웨티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 접합체의 목적 성질을 파괴하지 않는 링커 웨티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되거나 서로 인접한 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0204] 본 발명의 항체는 또한, 프로드러그(예를 들어, 웨티드 화학요법제, WO81/01145 참조)를 활성 항암 약물(예를 들어 WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호 참조)로 전환시키는 프로드러그 활성화 효소에 항체를 접합시킴으로써, 항체 의존성 효소 매개 프로드러그 치료(ADET)에도 사용된다.

[0205] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분에는 프로드러그를 그것의 더욱 활성인 세포 독성 형태로 전환시키도록 하는 방식으로 프로드러그에 대해 작용할 수 있는 임의의 효소가 포함된다. 본 발명의 방법에 유용한 효소에는 인산염-포함 프로드러그를 유리 형태로 전환시키는 데 유용한 알칼리성 포스파타제; 황산염 함유의 프로드러그를 유리 형태로 전환시키는 데 유용한 아릴술파타제; 비-독성 5-플루오로시토신을 항암제, 5-플루오로우라실로 전환시키는 데 유용한 시토신 데아미나제; 웨티드 함유의 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 써몰리신, 섭틸리신, 카르복시웨티다제, 카텝신(예컨대, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 보유하는 프로드러그를 전환시키는 데 유용한 D-알라닐카르복시웨티다제; 당화된 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 β -갈اكت오시다제와 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도화된 약물을 유리 약물로 전환시키는 데 유용한 β -락타마제; 및 아민 질소에서 폐녹시아세틸 또는 폐녹시아세틸 기로 유도화된 약물을 유리 약물로 각기 전환시키는 데 유용한 폐니실린 아미다제, 예를 들어 폐니실린 V 아미다제 또는 폐니실린 G 아미다제가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 대안적으로, 당업계에서 "항체효소(abzyme)"로도 알려져 있는, 효소 활성을 가지는 항체가 본 발명의 프로드러그를 유리 활성 약물로

전환시키는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)] 참조). 항체-항체 효소 접합체는 항체 효소를 감염 세포 집단에 전달하기 위해 본원에 기재된 바대로 제조될 수 있다.

[0206] 본 발명의 효소는 상기 논의된 이종이작용성 가교결합 시약의 사용과 같은 당업계에 공지된 기법에 의해 항체에 공유결합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적 활성인 부분에 결합된, 본 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 공지된 재조합 DNA 기법을 이용하여 제작할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger et al, *Nature*, 312:604-608 (1984)] 참조).

[0207] 항체의 기타 변형도 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 각종 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 중 하나에 연결될 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 각각 콜로이드성 약물을 전달 시스템(예를 들어, 리포좀, 일부민 마이크로스피어, 마이크로유화액, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀젼 중에, 예를 들어 코아세르베이션 (coacervation) 기법 또는 계면 중합(예를 들어, 각기 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐)에 의해 제조된 마이크로캡슐 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0208] 본원에서 개시된 항체는 또한 면역리포좀으로도 제형된다. "리포좀"은 약물을 포유동물에 전달하는 데 유용한 각종 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 소낭이다. 리포좀의 성분은 생물막의 지질 배치와 유사한, 이종종 형성으로 통상 배치된다. 항체를 포함하는 리포좀은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 문헌 [Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985)]; 문헌 [Hwang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980)]; 미국 특허 제4,485,045호 및 동 제4,544,545호, 및 1997년 10월 23일에 공개된 WO 97/38731에 기재된 방법으로 제조된다. 순환 시간이 증진된 리포좀이 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

[0209] 특히 유용한 리포좀은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG 유도화 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 생성될 수 있다. 정해진 공극 크기의 필터를 통해 리포좀을 밀어내어 소정의 직경을 가지는 리포좀을 수득한다. 이황화물-상호교환 반응을 통해, 문헌 [Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 리포좀에 접합시킬 수 있다. 화학요법제는 임의적으로 리포좀 내에 포함된다. 문헌 [Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.*, 81(19)1484 (1989)]를 참조한다.

[0210] 본 발명의 항체 또는 이의 단편은 각종 생물학적 또는 작용성 특성 중 임의의 것을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 이들 항체는 인플루엔자 A 특이적 또는 M2 단백질 특이적 항체이며, 이는 이들이 정상 대조 세포에 비해, 인플루엔자 A 또는 이의 M2 단백질에 각기 특이적으로 결합하거나 우선적으로 결합함을 가리킨다. 특정 실시양태들에서, 항체는 HuM2e 항체이며, 이는 그것이 정상 대조 세포에 비해, M2e 단백질, 바람직하게는 바이러스 상에 존재하거나 M2 단백질이 세포 내에서 발현될 때에만 존재하는 M2e 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합함을 가리킨다.

[0211] 특정 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 그 항체가 특이적으로 또는 우선적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 세포의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나 억제하는 길항자 항체이다. 다른 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 그 항체가 결합하는 감염 세포의 성장을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나 억제하는 성장 억제 성 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 아폽토시스를 유도한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체 의존성 세포 매개 세포 독성 또는 보체 의존성 세포 독성을 유도하거나 촉진한다.

[0212] 인플루엔자 바이러스에 대해 특이적인 항체를 동정하고 생성시키는 방법

[0213] 본 발명은 실시예 4에 예시된 바와 같은, HuM2e 항체를 동정하는 신규 방법을 제공한다. 이 방법은 감염제에 의해 세포 표면 상에 발현된 다른 폴리펩티드, 또는 심지어는 감염제 그 자체의 표면 상에 발현된 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 동정하도록 용이하게 적합화될 수 있다.

[0214] 일반적으로, 정 방법은 감염제로 감염되었거나 감염제에 대해 백신접종된 환자로부터의 혈청 샘플을 수득하는 단계를 포함한다. 이어서, 이 혈청 샘플을 스크리닝하여, 예를 들어, 비감염 세포가 아닌 감염된 세포의 표면 상에 특이적으로 발현된 폴리펩티드와 같은, 감염제와 결합된 특정 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 포함하는 것들을 동정한다. 특정 실시양태들에서, 샘플을, 감염 세포의 표면 상에 발현된 폴리펩티드를 발현하는 발현 벡터로 형질감염된 세포와 접촉시킴으로써, 혈청 샘플을 스크리닝한다.

[0215] 일단 환자가 관심 감염제 폴리펩티드에 대해 특이적인 항체를 포함하는 혈청을 가진 것으로 확인되면, 동일한

환자로부터 입수한 단핵구 및/또는 B 세포를 사용하여, 본원에 기재되어 있거나 당업계에서 이용 가능한 임의의 방법을 이용하여, 항체를 생성하는 세포 또는 이의 클론을 동정한다. 일단 항체를 생성하는 B 세포가 동정되면, 항체의 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 cDNA를 보존된 항체 서열에 대해 특이적인 표준 RT-PCR 벡터 및 프라이머를 이용하여 클로닝하고, 관심 감염체 폴리펩티드에 대해 특이적인 단클론성 항체의 재조합 생성에 사용되는 발현 벡터 내에 서브클로닝될 수 있다.

[0216] 한 실시양태에서, 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 또는 M2 단백질을 발현하는 세포를 인플루엔자 A에 감염된 환자로부터 입수한 생물학적 샘플과 접촉시키는 단계; 세포에 결합하는 생물학적 샘플 내 항체의 양을 결정하는 단계; 및 구해진 양을 대조값과 비교하는 단계(여기서, 구해진 값이 대조값보다 적어도 2배 더 큰 경우, 인플루엔자 A-감염 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 가리킴)를 포함하는 인플루엔자 A-감염 세포에 특이적으로 결합하는 항체를 동정하는 방법을 제공한다. 각종 실시양태들에서, M2 단백질을 발현하는 세포는 인플루엔자 A 바이러스로 감염된 세포, 또는 M2 단백질을 발현한 폴리뉴클레오티드로 형질감염된 세포이다. 대안적으로, 세포는 M2e 도메인, 및 단백질이 세포와 결합된 상태로 남도록 하기에 충분한 부가 M2 서열을 포함하는 M2 단백질의 일부를 발현할 수 있고, M2e 도메인은 전장 M2 단백질 내에 존재할 때와 동일한 방식으로 세포 표면 상에 제시된다. 본원에 기재된 방법을 비롯한, M2 발현 벡터를 제조하고 적절한 세포를 형질감염시키는 방법이 공개적으로 입수 가능한 M2 서열의 측면에서 용이하게 달성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Macken et al., 2001, "The value of a database in surveillance and vaccine selection" in Options for the control of influenza IV. A.D.M.E., Osterhaus & Hampson (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, pp. 103-106]에 기재된 인플루엔자 서열 데이터베이스(ISD)(flu.lanl.gov on the World Wide Web), 및 게놈 연구 위원회(The Institute for Genomic Research)(TIGR)의 미생물 시퀀싱 센터(Microbial Sequencing Center)(MSC)(tigr.org/msc/infl_a_virus.shtml on the World Wide Web)를 참조한다.

[0217] 상기 기재된 M2e 발현 세포 또는 바이러스를 사용하여, 표준 생물학적 기법을 이용하여 M2 폴리펩티드를 발현하는 세포에 우선적으로 결합하는 항체의 존재에 대해, 인플루엔자 A로 감염된 환자로부터 입수한 생물학적 샘플을 스크리닝한다. 예를 들어, 일부 실시양태들에서, 항체를 표지화할 수 있고, 세포와 결합된 표지의 존재를 예를 들어 FMAT 또는 FACS 분석을 이용하여 검출할 수 있다. 특정 실시양태들에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 기관지세척액, 또는 침이다. 본 발명의 방법은 고효율 기법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0218] 이어서, 동정된 인간 항체를 추가로 특징 분석할 수 있다. 예를 들어, 항체의 결합에 필수적이거나 충분한 M2e 단백질 내의 특정 입체구조 에피토프를 예를 들어 발현된 M2e 폴리펩티드의 부위 지정 돌연변이 유발을 이용하여 결정할 수 있다. 이 방법은 세포 표면 상에 발현된 임의의 단백질에 결합하는 인간 항체를 동정하기 위해 용이하게 적합화될 수 있다. 또한, 이들 방법은 재조합 M2e를 발현하거나 바이러스로 감염된 세포와 반대로, 바이러스 그 자체에 대한 항체의 결합을 결정하기 위해 적합화될 수 있다.

[0219] 항체, 이의 가변 영역, 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 HuM2e 항체의 재조합 생성을 위해 발현 벡터에 서브클로닝될 수 있다. 한 실시양태에서, 이는 동정된 HuM2e 항체를 포함하는 혈청으로부터의 환자의 단핵구 세포를 수득하고; 단핵구 세포로부터 B 세포 클론을 생성시키며; B 세포가 항체 생성 형질 세포가 되도록 유도하고; 형질 세포에 의해 생성된 상등액을 스크리닝하여, 그것이 HuM2e 항체를 함유하는지를 결정함으로써 달성된다. 일단 HuM2e 항체를 생성하는 B 세포가 동정되면, 역전사 중합효소 사슬 반응(RT-PCR)을 수행하여, HuM2e 항체의 가변 영역 또는 이의 일부를 코딩하는 DNA를 클로닝한다. 이어서, 이 서열을 인간 HuM2e 항체의 재조합 생성에 적합한 발현 벡터 내로 서브클로닝한다. M2e 폴리펩티드를 발현하는 세포에 결합하는 재조합 항체의 능력을 결정함으로써, 결합 특이성을 확인할 수 있다.

[0220] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태들에서, 말초혈 또는 림프절로부터 단리된 B 세포는 예를 들어 그것이 CD19 양성인 것에 기초하여 분류하고, 예를 들어 웰당, 단세포 특이도 정도로 낮게, 예를 들어 96, 384 또는 1536 웰 형태로 플레이팅한다. 세포를 항체 생성 세포, 예를 들어 형질 세포 내로 분화되도록 유도하고, 배양 상등액을 수거하여, 예를 들어 FMAT 또는 FACS 분석을 이용하여, 세포의 표면 상의 감염체 폴리펩티드를 발현하는 그 세포에의 결합에 대해 테스트한다. 이어서, 양성 웰에 전세포 RT-PCR을 수행하여, 클론성 딸 형질 세포에 의해 발현된 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시킨다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 이의 일부를 코딩하는 생성되는 PCR 생성물을 재조합 발현을 위해 인간 항체 발현 벡터 내로 서브클로닝한다. 이어서, 생성되는 재조합 항체를 그것의 원래의 결합 특이성에 대해 테스트하고, 감염체의 단리물의 각종 균주에 걸친 광범위 특이성에 대해 추가 테스트할 수 있다.

[0221] 따라서, 한 실시양태에서, HuM2e 항체의 동정 방법을 이하와 같이 수행한다. 첫 번째로, 전장 또는 대략 전장

M2 cDNA를 M2 단백질 발현을 위해 세포주 내로 형질감염시킨다. 두 번째로, 개별 인간 혈장 또는 혈청 샘플을 세포로 발현된 M2에 결합하는 항체에 대해 테스트한다. 또한 마지막으로, 혈장 양성 또는 혈청 양성 개체로부터 유래된 MAb는 동일 세포로 발현된 M2에 결합함을 그 특징으로 한다. MAb의 미세 특이성의 추가 정의가 이 시점에서 수행될 수 있다.

[0222] 이 방법은 (a) 선형 M2e 펩티드 내 에피토프 (b) M2e의 다중 변이체 내 통상적 에피토프, (c) M2 동종사량체의 입체구조 결정자, 및 (d) M2 동종사량체의 다중 변이체의 통상적 입체구조 결정자에 대해 특이적인 항체를 비롯한 각종 상이한 HuM2e 항체들을 동정하기 위해 수행될 수 있다. 마지막 부류가 특히 바람직한데, 이는 그 특이도가 아마도 인플루엔자의 모든 A 균주에 대해 특이적이기 때문이다.

[0223] 본 발명의 HuM2e 항체 또는 이의 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 인간 항체 폴리펩티드의 보존 영역에 대해 특이적인 프라이머를 이용한 중합효소 사슬 반응에 의한 증폭을 비롯한, 당업계에서 이용 가능하고 본원에 기재된 방법에 따라, HuM2e 항체를 발현하는 세포로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 WO 92/02551; 미국 특허 제5,627,052호; 또는 문헌 [Babcock et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48 (1996)]에 기재된 분자생물학 기법에 따라 B 세포로부터 클로닝될 수 있다. 일부 실시양태들에서, HuM2e 항체를 발현하는 클론성 딸 형질 세포에 의해 발현되는 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 양 영역 모두 또는 일부를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 서브클로닝하고 시퀀싱한다. 코딩된 폴리펩티드의 서열은 폴리뉴클레오티드 서열로부터 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 발현 백터 내에 서브클로닝하여, 당업계에 알려져 있고 본원에 기재된 절차를 이용하여, 본 발명의 항체 및 폴리펩티드를 제조함에 의해 생성시킬 수 있다.

[0224] 항체 (또는 이의 단편)의 M2e 또는 감염 세포 또는 조직에의 결합 성질을 일반적으로, 예를 들어 면역형광 기반의 검정, 예컨대 면역-면역화학(IHC) 및/또는 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 비롯한 면역검출 방법을 이용하여 결정하고 평가할 수 있다. 면역검정 방법은 인플루엔자 A의 하나 이상의 특정 균주로부터의 M2e에 특이적으로 결합하여 정상 대조 세포를 인식하거나 그것과 교차반응하는지를 결정하기 위한 대조군 및 절차를 포함할 수 있다.

[0225] 감염체 또는 이의 폴리펩티드에 대한 항체, 예를 들어 M2를 생성하는 환자를 확인하기 위해 혈청을 예비스크리닝한 후, 본 발명의 방법은 전형적으로 환자 또는 대상으로부터 이전에 입수한 생물학적 샘플로부터의 B 세포의 단리 또는 정제를 포함한다. 환자 또는 대상은 특정 질병 또는 감염을 현재 또는 이전에 진단되었거나 의심되거나 가질 수 있고, 혹은 환자 또는 대상은 유리 또는 특정 질병 또는 감염을 가진 것으로 간주될 수 있다. 전형적으로, 환자 또는 대상은 포유동물이고, 특정 실시양태들에서는 인간이다. 생물학적 샘플은 림프절 또는 림프절 조직, 늑막삼출액, 말초혈, 복수액, 종양 조직 또는 뇌척수액(CSF)을 포함하나 이들에 국한되지 않는 B 세포를 포함하는 임의의 샘플일 수 있다. 각종 실시양태들에서, B 세포는 다른 유형의 생물학적 샘플, 예컨대 특정 질병 또는 감염에 의해 영향을 받은 생물학적 샘플로부터 단리된다. 그러나, B 세포를 포함하는 임의의 생물학적 샘플을 본 발명의 임의의 실시양태를 위해 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0226] 일단 단리하면, 예를 들어 세포 증식 또는 형질구, 형질모세포 또는 형질 세포로의 발달을 지지하는 조건 하에서 B 세포를 배양함으로써, B 세포는 항체를 생성하도록 유도된다. 이어서, 항체를 전형적으로는 고효율 기법을 통해, 스크리닝하여, 표적 항원, 예를 들어 특정 조직, 세포, 감염체, 또는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 동정한다. 일부 실시양태들에서, 특이적 항원, 예를 들어 항체에 의해 결합된 세포 표면 폴리펩티드가 알려져 있지 않으나, 다른 실시양태에서는 항체에 의해 특이적으로 결합된 항원이 알려져 있다.

[0227] 본 발명에 따라, B 세포는 당업계에 알려져 있고 이용 가능한 임의의 수단에 의해 생물학적 샘플, 예를 들어 종양, 조직, 말초혈 또는 림프구 샘플로부터 단리될 수 있다. B 세포는 전형적으로 B 세포 특이적 마커, 예를 들어 CD19, CD138, 및/또는 표면 IgG의 그 표면 상에서의 존재에 기초하여 FACS에 의해 분리된다. 그러나, 예를 들어, CD19 자기 비드 또는 IgG 특이적 자기 비드를 이용한 칼럼 정제, 및 그에 이은 칼럼으로부터의 용출과 같은 당업계에 알려진 기타 방법도 이용 가능하다. 그러나, 임의의 마커를 이용한 B 세포의 자기 단리로써 특정 B 세포가 손실될 수 있다. 그러므로, 일부 실시양태들에서, 단리된 세포를 분류하지 않고, 그 대신에 종양으로부터 단리된 파이콜로 정제된 단핵 세포를 웰당 적절하거나 목적 특이도 수로 직접 플레이팅한다.

[0228] 감염체에 특이적인 항체를 생성하는 B 세포를 동정하기 위해, B 세포를 전형적으로 낮은 밀도(예를 들어, 웰당 단세포 특이도, 웰당 1-10개 세포, 웰당 10-100개 세포, 웰당 1 내지 100개 세포, 웰당 10개 미만의 세포, 또는 웰당 100개 미만의 세포)로 다중웰 또는 마이크로터터 플레이트에, 예를 들어 96, 384, 또는 1536 웰 형태로 플레이팅한다. B 세포를 초기에 웰당 1개 초과의 세포의 밀도로 플레이팅하면, 본 발명의 방법은 단세포 특이도가

달성될 때까지 항원 특이적 세포를 생성하는 것으로 확인된 웰 내에 세포를 후속하여 희석함으로써, 항원 특이적 항체를 생산하는 B 세포의 동정을 촉진하는 단계를 포함할 수 있다. 세포 상등액 또는 이의 일부 및/또는 세포를 항체 폴리뉴클레오티드의 향후 테스트 및 이후 회수를 위해 냉동 및 저장할 수 있다.

[0229] 일부 실시양태들에서, B 세포를 B 세포에 의한 항체 생성에 바람직한 조건 하에 배양한다. 예를 들어, B 세포를 B 세포 증식 및 분화에 바람직한 조건 하에 배양하여, 항체 생성 형질모세포, 형질구 또는 형질 세포를 생성시킬 수 있다. 특정 실시양태들에서, B 세포를 B 세포 미토겐, 예컨대 지다당류(LPS) 또는 CD40 리간드의 존재 하에서 배양한다. 한 특정 실시양태에서, B 세포를 이와 함께 피드 세포 및/또는 기타 B 세포 활성화제, 예컨대 CD40 리간드를 함께 배양함으로써 항체 생성 세포로 분화시킨다.

[0230] 세포 배양액 상등액 또는 이로부터 얻은 항체를 본원에 기재된 방법을 비롯한 당업계에서 이용 가능한 통상의 방법을 이용하여, 표적 항원에 결합하는 능력에 대해 테스트할 수 있다. 특정 실시양태들에서, 배양액 상등액을 고효율 방법을 이용하여 표적 항원에 결합하는 항체의 존재에 대해 테스트한다. 예를 들어, B 세포를 다중웰 마이크로티터 디쉬에서 배양하여, 다중 세포 상등액을 샘플링함과 동시에 표적 항원에 결합하는 항체의 존재에 대해 테스트하기 위해 로봇 플레이트 핸들러를 사용할 수 있다. 특정 실시양태들에서, 항원이 비드(예를 들어, 상자성 또는 라텍스 비드)에 결합하여, 항체/항원 착체의 포착을 용이하게 한다. 다른 실시양태에서, 항원 및 항체를 (상이한 표지로) 형광 표지하고, FACS 분석을 수행하여, 표적 항원에 결합하는 항체의 존재를 확인한다. 한 실시양태에서, 항체 결합은 FMAT™ 분석 및 기기장치(어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem)(미국 캘리포니아주 포스터시티 소재)를 이용하여 결정된다. FMAT™은 생세포 또는 비드를 이용하여 비방사성 검정을 혼합 및 판독하는, 고효율 스크리닝을 위한 형광 마크로-공초점 플랫폼이다.

[0231] 대조 샘플(예를 들어, 비감염 세포 또는 다른 감염제과 같은 생물학적 샘플)과 대비하여 특정 표적 항원(예를 들어, 감염된 조직 또는 세포, 또는 감염제과 같은 생물학적 샘플)에의 항체의 결합을 비교함과 관련하여, 각종 실시양태들에서, 항체는 대조 샘플에 결합하는 양과 비교하여, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배 더 많은 항체가 특정 표적 항원에 결합하는 경우, 특정 표적 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 고려된다.

[0232] 항체 사슬, 이의 가변 영역, 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 당업계에서 이용 가능한 임의의 수단을 이용하여 세포로부터 단리할 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드를 중합효소 사슬 반응(PCR), 예를 들어 당업계에서 이용 가능한 통상의 절차를 이용하여 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 보체를 코딩하는 중쇄 또는 경쇄에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 역전사-PCR(RT-PCR)을 이용하여 단리한다. 한 실시양태에서, 양성 웰에 전세포 RT-PCR을 수행하여, 클론성 딸 형질 세포에 의해 발현되는 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시킨다. 이 PCR 생성물을 시퀀싱할 수 있다.

[0233] 이어서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 일부를 코딩하는 생성된 PCR 생성물을 인간 항체 발현 백터 내로 서브클로닝하여, 당업계의 통상적 절차에 따라 재조합 발현시킨다(예를 들어 미국 특허 제7,112,439호 참조). 본원에 기재된 바와 같은, 종양 특이적 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산 분자를 핵산 절제, 결찰, 형질전환 및 형질감염을 위한 각종 공지된 절차들 중 임의의 절차에 따라 증식 및 발현시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항체 단편의 발현은 원핵생물 숙주 세포, 예컨대 *에체리키아 콜라이*(*Escherichia coli*)에서 바람직할 수 있다(예를 들어, 문헌 [Pluckthun et al, *Methods Enzymol.* 178:497-515 (1989)] 참조). 일부 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 발현은 효모(예를 들어, *사카로마이세스 세레비시아*(*Saccharomyces cerevisiae*), *스키조사카로마이세스 품베*(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 *피치아 파스토리스*(*Pichia pastoris*)); 동물 세포(포유동물 세포 포함); 또는 식물 세포를 비롯한 진핵생물 숙주 세포에서 바람직할 수 있다. 적합한 동물 세포의 예에는 골수종, COS, CHO, 또는 하이브리도마 세포가 포함된다. 식물 세포의 예에는 토마토, 옥수수, 대두 및 쌀 세포가 포함된다. 당업자에게 알려지고 본 개시내용에 기초하는 방법에 의해, 핵산 백터를 특정 숙주 시스템에서 외래 서열을 발현하도록 고안한 후, 종양 특이적 항체 (또는 이의 단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 삽입할 수 있다. 특정 숙주에 따라 제어 요소가 달라질 것이다.

[0234] 가변 및/또는 불변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 복제가능한 발현 백터를 제조하고 사용하여, 적절한 세포주, 예를 들어 비생성 골수종 세포주, 예컨대 마우스 NSO 선 또는 세균, 예컨대 항체 생성이 일어날 수 있는 *E. 콜라이*를 형질전환할 수 있다. 효율적 전사 및 번역을 수득하기 위해, 각 백터 내의 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 조절 서열, 특히 가변 도메인 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 및 리더 서열을 포함하여야 한다. 이러한 식으로 항체를 생성하는 구체적 방법이 일반적으로 공지되어 있고 통상적으로 이용된다. 예를 들어, 분자생물학 절차가 Sambrook 등의 문헌 [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd

ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989]에 기재되어 있고; 또한 문헌 [Sambrook et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)]도 참조한다. 필요한 것은 아니라, 일부 실시양태들에서, 재조합 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 영역을 시퀀싱할 수 있다. DNA 시퀀싱을 Sanger 등의 문헌 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463 (1977)] 및 [Amersham international plc sequencing handbook] 및 이의 수정본에 따라 수행할 수 있다.

[0235] 특정 실시양태들에서, 생성된 재조합 항체 또는 이의 단편을 이어서 그것의 원래의 특이도를 확인하도록 테스트하고, 예를 들어 관련 감염체를 이용하여 광범위 특이도에 대해 추가 테스트할 수 있다. 특정 실시양태들에서, 본원에 기재된 방법에 따라 동정되거나 생성된 항체를 항체 의존성 세포내 세포 독성(ADCC) 또는 아폽토시스에 의한 세포 사멸 및/또는 그것의 내재화 능력에 대해 테스트한다.

폴리뉴클레오티드

[0237] 다른 측면에서, 본 발명은 폴리뉴클레오티드 조성물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 이 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드, 예를 들어 인플루엔자 A, M2, 또는 M2e에 결합하는 항체의 가변 사슬의 영역을 코딩한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥(코딩 또는 앤티센스) 또는 이중 가닥 DNA(제놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자이다. RNA 분자에는 인스트론을 포함하고 1대1 방식으로 DNA 분자에 상응하는 HnRNA 분자, 및 인스트론을 포함하지 않는 mRNA 분자가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 대안적으로 또는 부가적으로, 코딩 또는 비코딩 서열은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 내에 존재한다. 또한, 대안적으로 또는 부가적으로, 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 다른 분자 및/또는 지지재에 연결된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 생물학적 샘플 내 인플루엔자 A 항체의 존재를 검출하기 위한 하이브리드화 검정 및 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 생성에 사용된다.

[0238] 그러므로, 본 발명의 또 다른 측면에 따라, 실시예 1에 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 일부 또는 모두, 실시예 1에 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 보체, 및 실시예 1에 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열의 축퇴 변이체를 포함하는 폴리뉴클레오티드 조성물이 제공된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 본원에 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열은 실시예 1 또는 2에 나와 있는 서열을 가지는 폴리펩티드를 비롯한 대조군 비감염 세포에 비해, 인플루엔자 A-감염 세포에 우선적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드를 코딩한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 임의의 폴리펩티드를 코딩하는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0239] 다른 관련 실시양태들에서, 본 발명은 도 1에 나와 있는 서열과 실질적 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드 변이체, 예를 들어 본원에 기재된 방법(예를 들어, 표준 변수를 이용한 BLAST 분석)을 이용하여 결정할 때 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여 적어도 70% 서열 동일성, 바람직하게 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드 변이체를 제공한다. 당업자는 이러한 값들이 코돈 축퇴성, 아미노산 유사성, 판독 프레임 위치화 등을 고려하여, 두 개의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 단백질의 상응하는 동일성을 결정하기 위해 적합하게 조정될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0240] 전형적으로, 폴리뉴클레오티드 변이체는, 바람직하게는 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드의 면역원성이 본원에서 구체적으로 나와 있는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드와 비교하여 실질적으로 감소되지 않도록, 하나 이상의 치환, 부가, 결실 및/또는 삽입을 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 서열 중 하나 이상과 동일하거나 상보적인 서열의 각종 길이의 인접 신장물을 포함하는 폴리뉴클레오티드 단편을 제공한다. 예를 들어, 본 발명에 의해 본원에 제시된 서열 중 하나 이상의 적어도 약 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 또는 1000, 또는 그 이상의 연속적인 뉴클레오티드뿐만 아니라 상기 길이의 모든 중간체 길이를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본원에서 사용되는 "중간체 길이"란 16, 17, 18, 19 등; 21, 22, 23 등; 30, 31, 32 등; 50, 51, 52, 53 등; 100, 101, 102, 103 등; 150, 151, 152, 153 등과 같은 인용된 값; 및 200 내지 500; 500 내지 1000 사이의 모든 정수 등을 포함하는 값 사이의 임의의 길이를 의미한다.

[0241] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 단편, 또는 이의 상보적인 서열에 중간 정도 내지 높은 염격한 조건 하에서 하이브리드화할 수 있는 폴리뉴클레오티드 조성물이 제공된다. 하이브리드화 기술은 분자생물학 분야에 공지되어져 있다. 예시를 위해서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드와 다른 폴리뉴클레오티드의 하이브리드화를 테스트하기 위한 적합한 중간 정도의 염격한 조건은 5× SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0)의 용액 내 예비세정; 50°C 내지 60°C에서 5× SSC 중 하룻밤 동안의 하이브리드화; 그에 이은 65°C에서 각각 0.1% SDS를 함유하는 2×, 0.5× 및 0.2× SSC를 사용하여 20분 동안 2회 세정하는 것을 포함한다. 당업자는 하이브리드화의 염격성이 하이브리드화 용액의 염 함량 및/또는 하이브리드화 수행 온도를 변

화시키는 등의 방법으로써 용이하게 조절될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 적합한 높은 업격성의 하이브리드화 조건은 하이브리드화 온도를 승온시키는 것, 예를 들어 60 내지 65°C 또는 65 내지 70°C로 승온시키는 것을 제외하고는, 상기 기재된 조건들을 포함한다.

[0242] 바람직한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체 또는 단편에 의해 코딩되는 폴리펩티드는 천연 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드와 동일한 결합 특이도를 가진다(즉, 동일한 에피토프 또는 인플루엔자 A 균주에 특이적으로 또는 우선적으로 결합한다). 일부 바람직한 실시양태에서, 상기 기재된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 변이체, 단편 및 하이브리드화 서열은 본원에 구체적으로 나와 있는 폴리펩티드 서열에 대해 적어도 약 50%, 바람직하게 적어도 약 70%, 및 더욱 바람직하게 적어도 약 90%의 결합 활성 수준을 가지는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0243] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편은 그 자체의 코딩 서열의 길이에 관계없이, 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 부가적인 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 다른 코딩 세그먼트 등과 같은 다른 DNA 서열과 조합되어, 이들의 전체적인 길이가 상당히 다양화될 수 있다. 거의 모든 임의의 길이의 핵산 단편이 이용될 수 있으며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서의 제조 및 사용의 용이성에 의해서 제한된다. 예를 들어, 약 10,000, 약 5000, 약 3000, 약 2,000, 약 1,000, 약 500, 약 200, 약 100, 약 50개 염기쌍 길이의 전체 길이(모든 중간체 길이 포함)를 가지는 예시적인 폴리뉴클레오티드 세그먼트가 본 발명의 다수 이행에 포함된다.

[0244] 당업자는 유전자 코드의 축퇴성으로 인해, 본원에 기술된 폴리펩티드를 코딩하는 수 많은 핵산 서열이 존재한다는 것을 인식할 것이다. 이를 폴리뉴클레오티드 중 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오티드 서열과 최소한의 상동성을 가진다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하나, 코돈 용도의 차이로 인해 다양한 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 의해 구체적으로 고려된다. 또한, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자의 대립형질이 본 발명의 범주 내에 포함된다. 대립형질은 뉴클레오티드의 결실, 부가 및/또는 치환과 같은 하나 이상의 돌연변이의 결과로서 변형된 내인성 유전자이다. 생성되는 mRNA 및 단백질은 변경된 구조 또는 기능을 가질 수도 있지만, 반드시 가질 필요가 있는 것은 아니다. 대립형질은 표준 기법(예컨대, 하이브리드화, 증폭 및/또는 데이터베이스 서열 비교)을 사용하여 확인할 수 있다.

[0245] 본 발명의 일부 실시양태에서, 코딩된 폴리펩티드의 하나 이상의 성질, 예컨대 그것의 결합 특이도 또는 결합 강도를 변경하기 위해, 개시된 폴리뉴클레오티드 서열의 돌연변이 유발을 수행한다. 돌연변이 유발 기법이 당업계에 공지되어 있고, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드 모두의 변이체를 생성시키기 위해 광범위하게 사용된다. 돌연변이 유발 접근법, 예컨대 부위 특이적 돌연변이 유발을 이용하여, 본원에 기재된 폴리펩티드의 변이체 및/또는 유도체를 제조한다. 이 접근법에 의해, 폴리펩티드 서열 내 특정 변형들이 이를 코딩하는 기본적인 폴리뉴클레오티드의 돌연변이 유발을 통해서 행해질 수 있다. 이 기법은, 예를 들어 전술한 고려사항 하나 이상을 반영하여 폴리뉴클레오티드 내로 하나 이상의 뉴클레오티드 서열 변화를 도입시킴으로써 서열 변이체를 제조하고 테스트하는 직접적인 방법을 제공한다.

[0246] 부위 특이적인 돌연변이 유발은 목적하는 돌연변이의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 특정 올리고뉴클레오티드뿐만 아니라, 결실 접합부 양쪽에서 신장되는 안정한 이합체를 형성하도록 충분한 크기 및 서열 복합성의 프라이머 서열을 제공하기 위한 충분한 수의 인접하는 뉴클레오티드의 사용을 통해 돌연변이체를 생성시키는 것을 가능하게 한다. 돌연변이는 선택된 폴리뉴클레오티드 서열에 사용되어, 폴리뉴클레오티드 그 자체의 성질을 향상, 변경, 감소, 변형 또는 기타 방식으로 변화시키고/시키거나 코딩된 폴리펩티드의 성질, 활성, 조성, 안정성 또는 일차 서열을 변경시킬 수 있다.

[0247] 본 발명의 다른 실시양태에서, 본원에서 제공된 폴리뉴클레오티드 서열은 핵산 하이브리드화를 위한 프로브 또는 프라이머, 예를 들어 PCR 프라이머로서 유리하게 사용될 수 있다. 그러한 핵산 프로브가 관심 서열에 특이적으로 하이브리드화하도록 하는 능력으로 인해, 상기 프로브가 소정의 샘플 내 상보성 서열의 존재가 검출 가능하다. 그러나, 다른 용도, 예컨대 돌연변이 종 프라이머 또는 다른 유전 작제물의 제조에서 사용되는 프라이머의 제조를 위한 서열 정보의 사용도 또한 본 발명에 포함된다. 이에 따라, 본원에 개시된 15개 뉴클레오티드 길이의 인접 서열과 동일한 서열을 가지거나 그 인접 서열과 상보적인 적어도 약 15개 뉴클레오티드 길이의 인접 서열의 서열 영역을 포함하는 본 발명의 핵산 단편이 특히 유용하다. 인접 동일하거나 상보적인 보다 긴 서열, 예를 들어 전장 서열 및 그 사이의 모든 길이를 포함하는 약 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000개 길이의 서열(모든 중간체 길이 포함)도 또한 일부 실시양태에 포함된다.

[0248] 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열과 동일하거나 상보적인 10 내지 14, 15 내지 20, 30, 50, 또는 심지어

100 내지 200개 정도의 뉴클레오티드(중간체 길이도 또한 포함)의 인접 뉴클레오티드 신장물로 이루어진 서열 영역을 가지는 폴리뉴클레오티드 분자가 예를 들어, 서던 및 노던 블롯팅에서 사용하기 위한 하이브리드화 프로브 및/또는 예를 들어 중합효소 사슬 반응(PCR)에 사용하기 위한 프라이머로서 특히 고려된다. 단편의 전체 크기뿐만 아니라 상보성 신장물(들)의 크기는 궁극적으로 특정 핵산 단편의 의도된 용도 또는 적용에 따른다. 보다 작은 단편이 일반적으로 하이브리드화 실시양태에 사용되고, 이때 인접 상보성 영역의 길이는 약 15 내지 약 100개의 뉴클레오티드 정도로 다양할 수 있지만, 보다 큰 인접 상보적 신장물이 검출하고자 하는 상보성 서열의 길이에 따라서 사용될 수 있다.

[0249] 약 15 내지 25개 뉴클레오티드 길이의 하이브리드화 프로브의 사용으로 안정함과 동시에 선택적인 이합체 분자를 형성시키는 것이 가능하다. 12개 초과 염기 길이의 신장물 이상의 인접 상보성 서열을 가지는 분자가 일반적으로 하이브리드의 안정성과 선택성을 증가시키는 데 바람직하며, 이로써 수득되는 특정 하이브리드 분자의 품질 및 수준을 개선시킨다. 일반적으로, 15 내지 25개의 인접 뉴클레오티드, 또는 필요한 경우에는 보다 긴 유전자-상보성 신장물을 가지는 핵산 분자가 바람직하다.

[0250] 하이브리드화 프로브는 본원에 개시된 서열 중 임의의 서열의 임의의 일부분으로부터 선택된다. 다만 필요한 것은 프로브 또는 프라이머로 사용하고자 하는, 본원에 나와 있는 서열, 또는 약 15 내지 25개 뉴클레오티드 내지 전체 길이의 서열을 포함하는 길이의 서열의 임의의 연속적 서열을 검토하는 것이다. 프로브 및 프라이머 서열의 선택은 다양한 인자들에 의해 좌우된다. 예를 들어, 전체 서열의 말단쪽으로부터의 프라이머를 사용하고자 해도 된다.

[0251] 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 단편 또는 변이체는 예를 들어 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 통상 실시되는 바와 같이, 화학적 방법에 의해 단편을 직접적으로 합성함으로써 용이하게 제조된다. 또한, 단편은 미국 특허 제4,683,202호의 PCR™ 기술 같은 핵산 재생 기술을 적용함으로써, 또한 선택된 서열을 재조합 생성을 위해 재조합 벡터 내로 도입함으로써, 또한 분자생물학 분야의 숙련자에게 일반적으로 알려진 재조합 DNA 기법에 의해 수득된다.

벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0253] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포뿐만 아니라 본 발명의 폴리펩티드의 생성을 위한 재조합 기법을 제공한다. 본 발명의 벡터는 예를 들어 폴리펩티드, 파지, 코스미드 및 미니 염색체를 포함한, 임의의 유형의 세포 또는 유기체에서 복제가능한 것들이 포함된다. 각종 실시양태들에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 폴리뉴클레오티드의 종식 또는 복제에 적합한 벡터, 또는 본 발명의 폴리펩티드의 발현에 적합한 벡터이다. 그러한 벡터는 당업계에 알려져 있고 상업적으로 이용 가능하다.

[0254] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성되어, 이의 전체 또는 일부가 조합되어, 예를 들어 폴리뉴클레오티드를 적절한 제한 부위 및 제한 효소를 이용하여 선형화 벡터 내에 서브클로닝하는 것을 비롯한, 통상의 분자 및 세포 생물학 기법을 이용하여, 삽입된다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 각 가닥에 상보적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 중합효소 사슬 반응에 의해 증폭된다. 이 프라이머는 또한 벡터 내로의 서브클로닝을 촉진하기 위한 제한 효소 절단 부위를 포함한다. 복제가능한 벡터 성분에는 일반적으로 하기의 것들 중 하나 이상이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 및 하나 이상의 마커 또는 선택가능한 유전자.

[0255] 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위해서, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 작용성 등가물을 적절한 발현 벡터, 즉 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소들을 함유하는 벡터 내로 삽입시킬 수 있다. 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 관심 폴리펩티드를 코딩하는 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 요소를 포함하는 발현 벡터를 작제한다. 이 방법에는 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전 재조합이 포함된다. 그러한 기법은 예를 들어, 문헌 [in Sambrook, J., et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.] 및 문헌 [Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.]에 기재되어 있다.

[0256] 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하고 발현하기 위해, 각종 발현 벡터/숙주 시스템을 사용할 수 있다. 이에는 미생물, 예를 들어 재조합 박테리오파지, 폴리펩티드, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바클로바이러스)로 감염된 곤충 세포계; 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 세균 발현 벡터(예를 들어, Ti 또는 pBR322 폴리펩티드)로 형질전환된 식물 세포계; 또는 동물 세포계가 포함되나, 이들에 국

한되지 않는다. 한 실시양태에서, 관심 단클론성 항체를 발현하는 유전자의 가변 영역은 뉴클레오티드 프라이머를 이용하여 하이브리도마 세포로부터 증폭된다. 이 프라이머는 당업자에 의해 합성되거나, 마우스 및 인간 가변 영역 증폭용 프라이머를 판매하는 상업적으로 입수 가능한 출처(예를 들어, 스트라타젠(Stratagene)(미국 캘리포니아주 라졸라 소재))로부터 구매가능하다. 프라이머를 사용하여, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 증폭시키고, 이를 이어서 이뮤노캡(ImmunoZAP)TM H 또는 이뮤노캡TM L(스트라타젠)과 같은 벡터 내로 삽입한다. 이어서, 이 벡터를 발현을 위해 *E. coli*, 효모 또는 포유동물 기재 시스템에 도입한다. 이를 방법을 이용하여 V_H 및 V_L 도메인의 융합체를 포함하는 다량의 단쇄 단백질을 생성시킨다(문헌 [Bird et al, *Science* 242:423-426 (1988)]을 참조한다).

[0257] 발현 벡터 내에 존재하는 "조절 요소" 또는 "조절 서열"은 전사 및 번역을 수행하도록 숙주 세포내 단백질과 상호작용하는, 벡터의 비번역 영역, 예를 들어 인핸서, 프로모터, 5' 및 3' 비번역 영역이다. 그러한 요소는 그 강도 및 특이성에 있어 다양할 수 있다. 이용하는 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 구성 프로모터 및 유도성 프로모터를 비롯한, 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용된다.

[0258] 원핵생물 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터의 예에는 포아(phoA) 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터가 포함된다. 그러나, 기타 알려진 세균 프로모터가 적합하다. 세균 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동적으로 연결된 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열을 포함한다. PBLUESCRIPT 파지미드(스트라타젠, 미국 캘리포니아주 라졸라 소재) 또는 PSPORT1 플라스미드(기브코(Gibco) BRL, 미국 매릴랜드주 게이터버그 소재) 등의 하이브리드 lacZ 프로모터와 같은 유도성 프로모터가 사용된다.

[0259] 진핵생물에 대해 각종 프로모터 서열들이 알려져 있고, 임의의 것이 본 발명에 따라 사용된다. 실질적으로 모든 진핵생물 유전자가 전사가 개시되는 부위에서 대략 25 내지 30개 염기 상향류에 위치한 AT 풍부 영역을 가진다. 많은 유전자의 전사 개시로부터 70 내지 80개 유전자 상향류에 있는 또 다른 서열이 CNCAAT 영역(여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는, 코딩 서열의 3' 말단에 대해 폴리 A 테일을 부가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 이를 서열 모두는 적절하게 진핵생물 발현 벡터 내로 삽입된다.

[0260] 포유동물 세포 시스템에서, 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터의 프로모터가 일반적으로 바람직하다. 포유동물 숙주 세포 내 벡터로부터의 폴리펩티드 발현은 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계우(fowlpox) 바이러스, 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 싸이토메갈로바이러스(CMV), 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 및 가장 바람직하게는 원숭이 바이러스40(SV40)의 게놈으로부터 수득된 프로모터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 및 열 충격 프로모터에 의해 조절되는데, 단 상기 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용적이다. 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 다중 카페를 포함하는 세포주를 생성하는 것이 필요한 경우, SV40 또는 EBV 기반의 벡터가 적절한 선택가능한 마커와 함께 유리하게 사용될 수 있다. 적합한 발현 벡터의 한 예는 CMV 프로모터를 포함하는 pcDNA-3.1(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)이다.

[0261] 다수의 바이러스 기재 발현 시스템들이 폴리펩티드의 포유동물 발현을 위해 이용 가능하다. 예를 들어, 아데노바이러스를 발현 벡터로 사용하는 경우, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 후기 프로모터 및 삼합체 리더 서열로 이루어진 아데노바이러스 전사/번역 복합체 내로 연결시킬 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 E1 또는 E3 영역내로의 삽입을 사용하여, 감염된 숙주 세포 내에서 폴리펩티드를 발현시킬 수 있는 생육성 바이러스를 수득할 수 있다(문헌 [Logan, J. and Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659]). 또한, 전사 인핸서, 예컨대 라우스 육종 바이러스(RSV) 인핸서를 사용하여 포유동물 숙주 세포 내 발현을 증가시킬 수 있다.

[0262] 세균 시스템에서, 다수의 발현 벡터들 중 임의의 하나를 발현된 폴리펩티드에 의도된 용도에 따라서 선택할 수 있다. 예를 들어, 다량이 요망되는 경우, 용이하게 정제된 융합 단백질의 높은 수준의 발현을 지시하는 벡터가 사용된다. 그러한 벡터에는 다작용성 *E. coli* 클로닝 및 발현 벡터, 예를 들어 관심 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 β -갈라토시다제의 아미노 말단 Met 및 후속하는 7개 잔기에 대한 서열과 함께 동일 프레임 내에서 벡터내로 연결되어, 하이브리드 단백질이 생성될 수 있는 BLUESCRIPT(스트라타젠); pIN 벡터(문헌 [Van Heeke, G. and S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509]) 등이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. pGEX 벡터(프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)를 또한 사용하여, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)와 함께 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시킨다. 일반적으로, 상기 융합 단백질은 가용성이며, 글루타티온-아가로오스 비드에 흡착시킨 후 유리 글루타티온의 존재하에서 용출시킴으로써 용해된 세포로부터 용이하게 정

제될 수 있다. 상기 시스템에서 제조된 단백질은 헤파린, 트롬빈, 또는 인자 XA 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계하여, 클로닝된 관심 폴리펩티드가 GST 부분으로부터 자유자재로 방출될 수 있도록 한다.

[0263] 효모, 사카로마이세스 세레비시아에서, 구성 프로모터 또는 유도성 프로모터를 함유하는 다수의 벡터, 예컨대 알파 인자, 알코올 옥시다제 및 PGH가 사용될 수 있다. 효모 숙주와 함께 사용하기에 적합한 다른 프로모터 서열의 예에는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 기타 해당 효소, 예컨대 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 테하이드로케나제, 핵소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소미라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소미라제, 포스포글루코스 이소미라제 및 글루코키나제를 위한 프로모터가 포함된다. 검토를 위해, 문헌 참조[Ausubel et al.(이하 상기와 동일함) 및 Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544]. 배양 조건에 의해 조절되는 전사의 추가의 이점을 가지는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터로는 알코올 테하이드로케나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사 관련 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 테하이드로케나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 작용하는 효소에 대한 프로모터 영역이 있다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 더욱 기재되어 있다. 효모 인핸서가 또한 유리하게도 효모 프로모터와 함께 사용된다.

[0264] 식물 발현 벡터가 사용되는 경우, 폴리펩티드 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터들 중 임의의 것에 의해 유도된다. 예를 들어, CaMV의 35S 및 19S 프로모터와 같은 바이러스 프로모터가 단독으로 또는 TMV로부터의 오메가리더 서열과 조합하여 사용된다(문헌 [Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311]). 대안적으로, RUBISCO의 작은 서브유니트 또는 열 충격 프로모터와 같은 식물 프로모터가 사용된다(문헌 [Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680]; 문헌 [Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843]; 및 문헌 [Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105]). 이러한 작제물은 직접적인 DNA 형질전환 또는 병원체 매개된 형질감염에 의해서 식물 세포 내로 도입될 수 있다. 상기 기법은 일반적으로 이용 가능한 수 많은 개관들에서 기재되어 있다(예를 들어, 문헌 [Hobbs, S. or Murry, L.E. in *McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196] 참조).

[0265] 곤충 시스템도 또한 관심 폴리펩티드를 발현시키는 데 사용된다. 예를 들어, 한 가지 그러한 시스템에서, 아우토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병 바이러스(AcNPV)를 벡터로 사용하여, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포 또는 트리코플러시아 라르바에(*Trichoplusia larvae*)에서 외래 유전자를 발현시킨다. 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 바이러스의 비필수 영역, 예를 들어 폴리헤드린 유전자 내로 클로닝하고, 폴리헤드린 프로모터의 조절 하에 위치시킨다. 폴리펩티드 코딩 서열의 성공적인 삽입은 폴리헤드린 유전자를 불활성화시키고 재조합 바이러스 결합 피복 단백질을 생성시킨다. 재조합 바이러스는 예를 들어, *S. 프루기페르다* 세포 또는 트리코플러시아 라르바에를 감염시키는 데 사용할 수 있으며, 이때 관심 폴리펩티드가 발현된다(문헌 [Engelhard, E.K. et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3224-3227]).

[0266] 특정 개시 신호를 또한 사용하여, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 서열의 보다 효율적인 번역을 달성한다. 상기 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열들을 포함한다. 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 이의 개시 코돈, 및 상향류 서열이 적합한 발현 벡터 내로 삽입되는 경우, 어떠한 부가적인 전사 또는 번역 조절 신호도 필요하지 않을 수 있다. 그러나, 단지 코딩 서열 또는 이의 일부만이 삽입되는 경우, ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 조절 신호가 제공된다. 또한, 개시 코돈은 삽입된 폴리뉴클레오티드의 올바른 번역을 보장하기 위해서 올바른 판독프레임 내에 존재한다. 외인성 번역 요소 및 개시 코돈은 천연 및 합성 모두의 다양한 기원의 것이다.

[0267] 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 벡터 내에 인핸서 서열을 삽입함으로써 증가된다. 예를 들어 글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -페토단백질 및 인슐린을 코딩하는 유전자에서 동정된 것들을 비롯한 많은 인핸서 서열들이 알려져 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵세포 바이러스로부터 유래한 인핸서가 사용된다. 그 예에는 복제 개시점의 후반측의 SV40 인핸서(bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 조기 프로모터 인핸서, 복제 개시점의 후반측의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서가 포함된다. 인핸서는 폴리펩티드 코딩 서열에 대해 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내에 스플라이싱되나, 프로모터로부터 5' 부위에 위치하는 것이 바람직하다.

[0268] 진핵생물 숙주세포(효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 생물로부터 유래한 다핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전형적으로 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 포함한다. 그러한 서열은 통상적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 경우에 따라서는 3' 비번역 영역으로부터 입수 가능하다. 이들 영역은 항-PSCA 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 단편을 포함한다. 한 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닌 영역이다. WO94/11026 및 그 문헌 내에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0269]

본원의 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주세포는 원핵세포, 효모, 식물 또는 고등 진핵세포이다. 이러한 목적을 위해 적합한 원핵세포의 예에는 진정세균, 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 생물, 예를 들어 예컨대 에쉐리키아, 예를 들어 *E. coli*, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*)와 같은 장내세균(*Enterobacteriaceae*)뿐만 아니라, 바실러스(*Bacillus*), 예를 들어 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*(예를 들어, 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710에 개시된 *B. licheniformis* 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예를 들어 *P. aeruginosa* 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)가 포함된다. 한 바람직한 *E. coli* 클로닝 숙주는 *E. coli* 294(ATCC 31,446)이나, *E. coli* B, *E. coli* X1776(ATCC 31,537) 및 *E. coli* W3110(ATCC 27,325)과 같은 다른 균주들도 적합하다. 이 예들은 단지 예시적인 것으로서 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0270]

사카로마이세스 세레비시아 또는 일반 베이커 호모가 하등 진핵생물 숙주 미생물들 중 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 스키조사카로마이세스 품종; 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어 *K. lactis*, *K. fragilis*(ATCC 12,424), *K. bulgaricus*(ATCC 16,045), *K. wickeramii*(ATCC 24,178), *K. waltii*(ATCC 56,500), *K. drosophilae*(ATCC 36,906), *K. thermotolerans* 및 *K. marxianus*; 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코데르마 레에시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*); 쉬와니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 쉬와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 섬유상 진균, 예컨대 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라듐(*Tolypocladium*) 및 아스퍼길러스(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 *A. nidulans* 및 *A. niger*)가 통상 이용 가능하고 본원에 사용된다.

[0271]

일부 실시양태들에서, 숙주 세포 균주는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 바람직한 방식으로 발현된 단백질을 가공하는 이의 능력을 가지는 것으로 선택된다. 폴리펩티드의 그러한 변형에는 아세틸화, 카르복실화, 당화, 인산화, 지질화 및 아실화가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 단백질의 "프리프로(propro)" 형태를 절단하는 번역후 가공을 또한 사용하여 정확한 삽입, 폴딩 및/또는 기능을 촉진시킬 수 있다. 상기 번역 후 활성에 대한 특정 세포 기관 및 특징적인 메카니즘을 가지는 CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 및 WI38 같은 상이한 숙주 세포를 선택하여 외래 단백질의 올바른 변형 및 가공을 확실히 한다.

[0272]

항체 또는 이의 단편의 발현을 위해 구체적으로 적합화된 방법 및 시약도 또한 당업계에 알려져 있고 이용 가능하고, 이들의 예에는 예를 들어 미국 특허 제4816567호 및 제6331415호에 기재된 것들이 포함된다. 각종 실시양태들에서, 항체 중쇄 및 경쇄, 또는 이의 단편은 동일하거나 별도의 발현 벡터로부터 발현된다. 한 실시양태에서, 양 사슬 모두는 동일 세포 내에서 발현되고, 이로써 작용성 항체 또는 이의 단편의 형성이 촉진된다.

[0273]

전장 항체, 항체 단편, 및 항체 융합 단백질은 세균 내에서 생성되며, 특히 당화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때, 예컨대 치료적 항체가 세포 독성제(예를 들어, 독소)에 접합되고 면역접합체가 그 자체만으로 감염 세포 파괴에 있어 효과를 나타낼 때 사용된다. 세균 내 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들어 미국 특허 제5,648,237호, 제5,789,199호 및 제5,840,523호를 참조하며, 상기 문헌은 번역 개시 영역(TIR) 및 발현 및 분비 최적화를 위한 신호 서열을 기재하고 있다. 발현 후, 항체를 가용성 분획에서 *E. coli* 세포 페이스트로부터 단리하고, 예를 들어 이소타입에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제할 수 있다. 예를 들어 CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하는 데 사용된 것과 유사한 방법을 이용하여 최종 정제를 수행할 수 있다.

[0274]

당화 폴리펩티드 및 항체의 발현에 적합한 숙주세포는 다세포 생물로부터 유래한다. 무척추동물 세포의 예에는 식물 세포 및 곤충 세포가 포함된다. 다수의 바클로바이러스 균주 및 변이체, 및 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에데스 아에기브티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에데스 알보피시우스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*)(초파리) 및 봄비스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 각종 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포니아 NPV의 L-1 변이체 및 봄비스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용 가능하고, 그러한 바이러스는 본 발명에 따라 본원의 바이러스로서, 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 사용된다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페츄니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양액도 또한 숙주로서 사용된다.

[0275] 배양액(조직 배양액) 내 척추동물 세포에서의 항체 폴리펩티드 및 이의 단편의 증식 방법도 본 발명에 포함된다. 본 발명의 방법에 사용되는 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 세포 또는 혼탁 배양액에서 배양하기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, 문헌 [Urlaub et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포(TM4, 문헌 [Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL 51); TR1 세포(문헌 [Mather et al, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)이다.

[0276] 숙주 세포는 폴리펩티드 생성을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되어, 프로모터 유도, 형질전환체 선택 또는 목적 서열을 코딩하는 유전자의 증폭을 위해 적절한 통상적 변형 영양 배지에서 배양한다.

[0277] 재조합 단백질의 장기간 고수율 생성을 위해, 안정한 발현이 일반적으로 바람직하다. 예를 들어, 관심 폴리뉴클레오티드를 안정하게 발현하는 세포주를 바이러스 복제 기점 및/또는 내인성 발현 요소 및 동일 또는 다른 벡터상의 선택가능한 마커 유전자를 포함하는 발현 벡터를 이용하여 형질전환된다. 벡터의 도입 후, 세포를 선택 배지로 옮기기 전에 풍부 배지 내에서 1 내지 2일 동안 성장시킨다. 선택가능한 마커의 목적은 내선택성을 부여하는 것이고, 그것의 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포가 성장하여 회수되도록 한다. 안정하게 형질전환된 세포의 내성 클론은 세포 유형에 적절한 조직 배양 기법을 이용하여 증식된다.

[0278] 복수개의 선택 시스템을 사용하여, 형질전환된 세포주를 회수할 수 있다. 이에는 각각 tk⁻ 또는 aprt⁻ 세포에서 사용할 수 있는 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제(문헌 [Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32]) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(문헌 [Lowy, I. et al. (1990) *Cell* 22:817-23]) 유전자가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 또한, 항대사산물, 항생제 또는 제초제 내성이 선택 기초로서 사용될 수 있으며; 예를 들어 각각 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr(문헌 [Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70]); 아미노글리코사이드, 네오마이신 및 G-418에 내성을 부여하는 npt(문헌 [Colbere-Garapin, F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14]); 및 클로렐루론 및 포스피노트리신 아세틸트랜스퍼라제에 내성을 부여하는 als 또는 pat가 있다(문헌 [Murry, 이하 상기와 동일함]). 부가적인 선택가능한 유전자가 기재되었다. 예를 들어, trpB는 세포가 트립토판 대신에 인돌을 사용할 수 있게 하고, hisD는 세포가 히스티딘 대신에 히스티놀을 사용할 수 있게 한다(문헌 [Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51]). 안토시아닌, 베타-글루쿠로니다제 및 이의 기질 GUS, 및 루시퍼라제 및 이의 기질 루시페린과 같은 마커와 함께 가시적인 마커의 사용이 인기를 얻었고, 형질전환체의 동정뿐만 아니라 특정 벡터 시스템에 기인할 수 있는 일시적이거나 안정한 단백질 발현량을 정량화하는데 광범위하게 사용되고 있다(문헌 [Rhodes, C.A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131]).

[0279] 마커 유전자 발현의 존재/부재가 관심 유전자가 또한 존재한다는 것을 제시하지만, 이의 존재 및 발현을 확인한다. 예를 들어, 폴리펩티드를 코딩하는 서열이 마커 유전자 서열 내로 삽입되는 경우, 서열을 포함하는 재조합 세포는 마커 유전자 기능의 부재로서 확인될 것이다. 대안적으로, 마커 유전자는 단일 프로모터의 조절 하에 폴리펩티드 코딩 서열과 텐덤 배치된다. 유도 또는 선택에 대응한 마커 유전자의 발현은 통상 텐덤 유전자의 발현도 또한 나타낸다. 대안적으로, 목적 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고 발현하는 숙주 세포를 당업자에게 알려진 각종 절차로 확인한다. 이러한 절차에는 예를 들어, 핵산 또는 단백질의 검출 및/또는 정량화를 위한 막, 용액, 또는 침 기재 기술을 포함하는, DNA-DNA, DNA-RNA 하이브리드화 및 단백질 생체분석법 또는 면역분석 기술이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0280] 생성물에 특이적인 디클론성 또는 단클론성 항체를 사용하여, 폴리뉴클레오티드 코딩된 생성물의 발현을 검출하고 측정하기 위한 다양한 프로토콜이 당해 분야에 알려져 있다. 이의 비제한적 예에는 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 방사성면역분석법(RIA) 및 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)이 포함된다. 제시된 폴리펩티드 상의 두 개의 비방해성 애피토프에 대해서 단클론성 항체를 사용하는 2부위 단클론성 기재 면역분석법이 일부 용도들에서 바람직하나, 경쟁 결합 검정법도 또한 사용될 수 있다. 이러한 검정법 및 다른 검정들은 특히 문헌 [hampton, R. et al. (1990; *Serological Methods, Laboratory Manual*, APS Press, St Paul. Minn.)]; 및 문헌 [Maddox, D.E. et al. (1983; *J. Exp. Med.* 158:1211-1216)]에 기재되어 있다.

[0281] 각종 표지 및 접합 기법들이 당업자들에 의해 알려져 있고, 각종 핵산 및 아미노산 검정법에 사용된다. 표지된 하이브리드화, 또는 폴리뉴클레오티드와 관련된 서열을 검출하기 위한 PCR 프로브의 생성 수단에는 표지된 뉴클레오티드를 사용하는 올리고표지화, 넉 번역, 말단 표지화 또는 PCR 증폭이 포함된다. 대안적으로, 서열 또는 이의 임의의 일부를 mRNA 프로브의 생성을 위해 벡터 내로 클로닝한다. 상기 벡터는 당업계에 알려져 있고, 상업적으로 이용 가능하며, 이를 사용하여 T7, T3 또는 SP6 같은 적합한 RNA 폴리머라제 및 표지된 뉴클레오티드를 부가시켜 시험관내에서 RNA 프로브를 합성할 수 있다. 이 절차들은 각종 상업적으로 이용 가능한 키트를 사용하여 수행된다. 사용되는 적합한 리포터 분자 또는 표지에는 방사성 핵종, 효소, 형광체, 화학발광체, 또는 발색제뿐만 아니라 기질, 보조인자, 억제제, 자기성 입자 등이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0282] 재조합 세포에 의해 생성되는 폴리펩티드는 사용되는 서열 및/또는 벡터에 따라 분비되거나 세포 내에 포함된다. 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 원핵생물 또는 진핵생물 세포막을 통해 코딩된 폴리펩티드의 분비를 지시하는 신호 서열을 포함하도록 설계된다.

[0283] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 폴리펩티드가 가용성 단백질의 정제를 촉진하는 폴리펩티드 도메인을 추가로 포함하는 융합 폴리펩티드로서 생성된다. 상기 정제 촉진 도메인에는 고정화 금속 상에서 정제를 가능하게 하는 히스티딘-트립토판 모듈 같은 금속 칼레이트화 웨터드, 고정된 면역글로불린 상에서 정제를 가능하게 하는 단백질 A 도메인, 및 FLAGS 신장/친화도 정제 시스템(암젠(Amgen), 미국 위싱턴주 시애틀 소재)에서 사용되는 도메인이 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 정제 도메인과 코딩된 폴리펩티드 사이의 인자 XA 또는 엔테로키나제에 특이적인 것과 같은 절단 가능한 링커 서열(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)을 포함시켜 정제를 촉진한다. 한 예시적 발현 벡터는 관심 폴리펩티드과 티오레독신 또는 엔테로키나제 절단 부위에 앞서 6개 히스티딘 잔기를 코딩하는 핵산을 함유하는 융합 단백질이 발현되도록 한다. 히스티딘 잔기는 문헌 [Porath, J. et al., 1992, *Prot. Exp. Prif.* 3:263-281]에 기재된 바와 같은 IMIAC(고정화 금속 이온 친화도 크로마토그래피) 상에서의 정제를 촉진시키는 반면, 엔테로키나제 절단 부위는 융합 단백질로부터 목적 폴리펩티드를 정제하는 수단을 제공한다. 융합 단백질을 생성시키는 데 사용되는 벡터에 대한 논의는 문헌 [Kroll, D.J. et al., (1993; *DNA Cell Biol.* 12:441-453)]에 제공되어 있다.

[0284] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 폴리펩티드는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N 말단에 특정 절단 부위를 가지는 신호 서열 또는 기타 폴리펩티드일 수 있는 이종성 폴리펩티드와 융합된다. 선택된 이종성 신호 서열은 바람직하게 숙주 세포에 의해 인식되고 가공된(즉, 신호 웨티아제에 의해 절단된) 것이다. 원핵생물 숙주 세포의 경우, 신호 서열이 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, 1pp, 또는 열안정성 내독소 II 리더로 된 군에서 선택된다. 효모 분비의 경우, 신호 서열이 예를 들어 효모 인버타제 리더, α 인자 리더(사카로마이세스 및 클루베로마이세스 α 인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, C. 알비坎스 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호로부터 선택된다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용 가능하다.

[0285] 재조합 기법을 이용하여, 폴리펩티드 또는 항체가 세포내, 세포막 공간에 생산되거나, 매질 내로 직접 분비된다. 폴리펩티드 또는 항체가 제1 단계로서 세포내 생성되는 경우, 숙주 세포 또는 용해된 단편과 같은 입상 파편이 예를 들어 원심분리 또는 초여과에 의해 제거된다. 문헌 [Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]은 E. 콜라이의 세포막 공간에 분비된 항체를 단리하기 위한 절차를 기재하고 있다. 간략히 말해, 세포 페이스트를 약 30분간에 걸쳐 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸су포닐풀루오라이드(PMSF)의 존재 하에 해동한다. 세포 파편을 원심분리에 의해 제거한다. 폴리펩티드 또는 항체가 매질 내로 분비되는 경우, 그려한 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pelllicon) 초여과 장치를 이용하여 농축한다. 임의적으로, PMSF와 같은 프로테아제 억제제를 상기 단계들 중 임의의 단계에 포함시켜, 단백질 분해를 억제하고, 항생제를 포함시켜 우발적 오염물질의 성장을 방지한다.

[0286] 세포로부터 제조된 폴리펩티드 또는 항체 조성물을, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하고, 이때 친화도 크로마토그래피가 바람직한 정제 기법이다. 단백질 A의 친화도 리간드로서 적합성(suitability)은 항체 변이체 내에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소타입에 좌우된다. 단백질 A는 인간 γ_1 , γ_2 또는 γ_4 중쇄에 기초한 항체를 정제하는 데 사용된다(문헌 [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입과 인간 γ_3 에 권장된다(문헌 [Guss et al., *EMBO J.*, 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 빈번히는 아가로스이나, 다른 매트릭스도 이용 가능하다. 조절 세공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은

기계적으로 안정한 매트릭스는 아가로즈로 달성될 수 있는 것보다 빠른 유속 및 짧은 처리 시간이 가능하다. 항체가 C₄₃ 도메인을 포함하는 경우에, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지(J.T. 베이커(J.T. Baker)(미국 뉴저지주 필립스버그))가 정제에 유용하다. 이온 교환 칼럼 상에서 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 세파로스(SEPHAROSE)™ 크로마토그래피, 크로마토포카싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전과 같은 다른 단백질 정제 기법도 또한 회수할 폴리펩티드 또는 항체에 따라 이용 가능하다. 임의의 예비 정제 단계(들)에 이어서, 관심 폴리펩티드 또는 항체와 오염물질을 포함하는 혼합물에, 바람직하게 낮은 염 농도(예를 들어, 약 0 내지 0.25 M 염)로 수행되는, 약 2.5 내지 4.5의 pH의 용리 완충액을 이용하는 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행한다.

[0287] 약학적 조성물

본 발명은 또한 목적하는 순도의 본 발명의 폴리펩티드, 항체 또는 조절제와 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함하는 약학적 제제를 포함한다(문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]). 일부 실시양태들에서, 약학적 제제는 예를 들어 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 저장 중의 폴리펩티드 또는 항체의 안정성을 증진시키기 위해 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용하는 투여량 및 농도에서 수령자에게 비독성이고, 이에는 예를 들어 아세트산염, 트리스, 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 산화방지제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 칼레이트화제; 트레할로스 및 염화나트륨과 같은 강장제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 폴리소르베이트와 같은 계면활성제; 나트륨과 같은 염 형성 짹이온; 금속착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 트윈(TWEEN)™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제가 포함된다. 일부 실시양태들에서, 치료적 제제는 바람직하게 5 내지 200 mg/ml, 바람직하게는 10 내지 100 mg/ml의 농도로 폴리펩티드 또는 항체를 포함한다.

본원의 제제는 특정 증상, 예를 들어 치료하는 감염을 치료하는 데 적합하거나, 원치 않는 부작용을 방지하는 데 적합한 하나 이상의 부가적 치료제를 함유한다. 바람직하게, 부가적 치료제는 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체에 상보적인 활성을 가지고, 양자는 서로 부정적 영향을 미치지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 또는 항체에 부가하여, 부가적 또는 제2 항체, 항바이러스제, 항감염제 및/또는 심장보호제를 제제에 첨가한다. 그러한 분자는 적합하게도 의도하는 목적에 유효한 양으로 약학적 제제 내에 존재한다.

활성 성분, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드 및 항체와 기타 치료제는 또한 예를 들어 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀젼 중에, 예를 들어 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 제조된 마이크로캡슐에 봉입된다. 그러한 기법은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. ed. (1980)]에 개시되어 있다.

서방형 제제가 제조된다. 서방형 제제의 적합한 예에는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스로서, 예를 들어 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태인 매트릭스가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 서방형 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔(예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™(락트산-글리콜산 공중합체 및 루프롤라이드 아세테이트로 이루어진 주입가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다.

생체내 투여에 사용되는 제제는 바람직하게 무균성이다. 이는 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0293] 진단 용도

본 발명의 항체 및 이의 단편, 및 치료 조성물은 정상 대조 세포 및 조직에 비해, 감염 세포 또는 조직에 특이

적으로 결합하거나 우선적으로 결합한다. 따라서, 이 인플루엔자 A 항체는 본원에 기재된 각종 진단 및 예후 방법들 중 임의의 방법을 이용하여, 환자, 생물학적 샘플, 또는 세포 접단 내의 감염 세포 또는 조직을 검출하는데 사용된다. 항-M2e 특이적 항체의 감염 세포 검출 능력은 그것의 결합 특이도에 의존하며, 그것은 상이한 환자 및/또는 인플루엔자 A의 상이한 균주로 감염된 환자로부터 입수한 감염 세포 또는 조직에 결합하는 능력을 테스트함으로써 용이하게 결정된다. 진단 방법은 일반적으로 예를 들어, 혈액, 혈청, 침, 뇨, 객담, 세포 면봉 샘플 또는 조직 생검으로부터 입수한 생물학적 샘플과 같은 환자로부터 입수한 생물학적 샘플을 인플루엔자 A, 예를 들어 HuM2e 항체와 접촉시키고, 항체가 대조 샘플 및 소정의 컷-오프(cut-off) 값에 비해 상기 샘플에 우선적으로 결합하는지의 여부를 결정함으로써, 감염 세포의 존재를 나타내는 것을 수반한다. 특정 실시양태들에서, HuM2e 항체는 적절한 대조 정상 세포 또는 조직 샘플에 비해 감염 세포에 적어도 2배, 3배 또는 5배 더 결합한다. 소정의 컷-오프 값은, 예를 들어 테스트하는 생물학적 샘플의 진단 검정을 수행하는 데 사용되는 동일 조건 하에서 수가지 상이한 적절한 대조 샘플에 결합하는 HuM2e 항체의 양의 평균을 구함으로써 결정된다.

[0295] 결합된 항체는 본원에 기재되고 당업계에 알려져 있는 절차를 이용하여 검출된다. 일부 실시양태들에서, 본 발명의 진단 방법은 검출 가능한 표지, 예를 들어 형광단에 접합된 HuM2e 항체를 이용하여 수행되어, 결합된 항체의 검출을 촉진한다. 그러나, 이는 또한 HuM2e 항체의 2차 검출 방법을 이용하여 수행된다. 이에는 예를 들어 RIA, ELISA, 석출, 교착(agglutination), 보체 고정 및 면역 형광이 포함된다.

[0296] 일부 절차에서, HuM2e 항체는 표지화된다. 표지는 직접적으로 검출된다. 직접적으로 검출되는 예시적 표지에는 방사성표지 및 형광색소가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다. 대안적으로 또는 부가적으로, 표지는 검출되도록 반응하거나 유도화되어야 하는 부분, 예컨대 효소이다. 동위원소 표지의 비제한적 예는 ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P 및 ³⁵S이다. 사용되는 형광 물질에는 예를 들어 플루오레신 및 이의 유도체, 로다민 및 이의 유도체, 아우라민, 단실, 웜벨리페론, 루시페리아, 2,3-디히드로프탈라진디온, 호스래디쉬 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 리소자임 및 글루코슨-6-포스페이트 데히드로게나제가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0297] 효소 표지는 현재 이용되는 색채계, 분광계, 형광분광측색 또는 기체정량 기법 중 임의의 기법에 의해 검출된다. 이를 절차에 사용되는 많은 효소가 알려져 있고, 본 발명의 방법에 의해 이용된다. 이의 비제한적 예는 페옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -글루쿠로니아제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 옥시다제 플러스 페옥시다제, 갈락토스 옥시다제 플러스 페옥시다제 및 산 포스파타제이다.

[0298] 항체는 공기 방법에 의해 상기 표지로 태깅된다. 예를 들어, 알데히드, 카르보디이미드, 디말레이이미드, 이미데이트, 숙신이미드, 비드-디아조타이즈드 벤자린 등과 같은 커플링제를 사용하여, 항체를 상기 기재된 형광, 화학발광성, 및 효소 표지로 태깅한다. 효소는 전형적으로 카르보디이미드, 페리오레이트, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드 등과 같은 가교 분자를 이용하여 항체와 조합된다. 각종 표지화 기법이 문헌 [Morrison, Methods in Enzymology 32b, 103 (1974)], 문헌 [Syvanen et al, J. Biol. Chem. 248, 3762 (1973)] 및 문헌 [Bolton and Hunter, Biochem J. 133, 529(1973)]에 기재되어 있다.

[0299] 본 발명의 HuM2e 항체는 인플루엔자 A 감염을 가진 환자와 인플루엔자 A 감염을 가지지 않는 환자를 구별하여, 본원에 제공된 대표적 검정법으로 환자가 감염되었는지의 여부를 결정할 수 있다. 한 방법에 따라, 생물학적 샘플은 인플루엔자 A 감염을 가진 것으로 의심되거나 가지고 있는 것으로 알려진 환자로부터 입수한다. 바람직한 실시양태에서, 생물학적 샘플은 환자로부터의 세포를 포함한다. 샘플을 HuM2e 항체와, 예를 들어 HuM2e 항체가 샘플 내 존재하는 감염 세포에 결합하도록 충분한 시간 및 조건 하에 접촉시킨다. 예를 들어, 샘플을 10초, 30초, 1분, 5분, 10분, 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 24시간, 3일 또는 이들 시간 사이의 임의의 시점 동안 HuM2e 항체와 접촉시킨다. 결합된 HuM2e 항체의 양을 결정하여, 예를 들어 소정의 값 또는 정상 조직 샘플로부터 결정된 값일 수 있는 대조 값과 비교한다. 대조 샘플에 비해 환자 샘플에 결합된 항체의 양이 증가함은 환자 샘플 내 감염 세포의 존재를 가리킨다.

[0300] 한 관련 방법에서, 환자로부터 입수한 생물학적 샘플을 HuM2e 항체와, 그 항체가 감염 세포에 결합하도록 충분한 시간 및 조건 하에 접촉시킨다. 이어서, 결합된 항체를 검출하고, 결합된 항체의 존재는 샘플이 감염 세포를 포함함을 가리킨다. 이 실시양태는 HuM2e 항체가 검출 가능한 수준에서 정상 세포에 결합하지 않을 때 특히 유용하다. 상이한 HuM2e 항체는 상이한 결합 및 특이성 특성을 가진다. 이들 특성에 따라, 특정 HuM2e 항체를 사용하여, 인플루엔자 A의 하나 이상의 균주의 존재를 검출한다. 예를 들어, 일부 항체는 인플루엔자 바이러스의 단지 하나 또는 수가지 균주에 특이적으로 결합하는 반면, 다른 항체는 인플루엔자 바이러스의 상이한 균주들의 모두 또는 대부분에 결합한다. 인플루엔자 A의 단지 하나의 균주에 대해 특이적인 항체만을 사용하여, 감염의

균주를 동정한다.

[0301] 일부 실시양태들에서, 감염 세포에 결합하는 항체는 바람직하게 검출되는 감염 환자 중 적어도 약 20%에서 감염의 존재를 가리키는 신호를 생성하고, 더욱 바람직하게는 환자 중 적어도 약 30%에서 감염의 존재를 가리키는 신호를 생성한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 항체는 검출하는 감염이 없는 개체 중 적어도 약 90%에서 감염의 부재를 가리키는 음성 신호를 생성한다. 각 항체는 상기 기준을 만족하나; 감도를 향상시키기 위해 본 발명의 항체가 조합하여 사용된다.

[0302] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 사용한 진단 및 예후 검정을 수행하는 데 유용한 키트를 포함한다. 본 발명의 키트는 표지화 또는 비표지화 형태의 본 발명의 HuM2e 항체를 포함하는 적합한 용기를 포함한다. 부가적으로, 항체가 직접 결합 검정법에 적합한 표지화 형태로 공급될 때, 키트는 적절한 간접 검정법을 수행하기 위한 시약을 추가로 포함한다. 예를 들어, 키트는 표지의 성질에 따라, 효소 기질 또는 유도화제를 포함한 하나 이상의 적합한 용기를 포함한다. 조절 샘플 및/또는 설명서도 또한 포함된다.

[0303] 치료/예방 용도

[0304] 수동 면역은 바이러스 질병의 예방 및 치료를 위해 효과적이고 안전한 방법인 것으로 입증되었다. (각기 본원에 참조 인용되는, 문헌 [Keller et al., Clin. Microbiol. Rev. 13:602-14 (2000)]; 문헌 [Casadevall, Nat. Biotechnol. 20:114 (2002)]; 문헌 [Shibata et al., Nat. Med. 5:204-10 (1999)]; 및 문헌 [Igarashi et al., Nat. Med. 5:211-16 (1999)]를 참조한다). 인간 단클론성 항체를 이용한 수동 면역은 인플루엔자의 긴급 예방 및 치료를 위한 중간 처치법을 제공한다.

[0305] 본 발명의 HuM2e 항체 및 이의 단편, 및 치료 조성물은 정상 대조 비감염 세포 및 조직에 비해 감염 세포에 특이적으로 결합하거나 우선적으로 결합한다. 따라서, 이들 HuM2e 항체는 환자, 생물학적 샘플, 또는 세포 집단 내 감염 세포 또는 조직을 선택적으로 표적으로 하기 위해 사용된다. 이들 항체의 감염 특이적 결합 성질의 측면에서, 본 발명은 감염 세포의 성장을 제어(예를 들어, 억제)하는 방법, 감염 세포를 사멸시키는 방법, 및 감염 세포의 아폽토시스를 유도하는 방법을 제공한다. 이 방법은 감염 세포를 본 발명의 HuM2e 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 방법은 시험관내, 체외 및 생체내 수행된다.

[0306] 각종 실시양태들에서, 본 발명의 항체는 본래 치료적으로 활성이다. 대안적으로 또는 부가적으로, 본 발명의 항체는 항체에 의해 결합되거나 접촉된 감염 세포를 치료하는 데 사용되는 세포 독성제 또는 성장 억제제, 예를 들어 방사성 동위원소 또는 독소에 접합된다.

[0307] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 HuM2e 항체를 인플루엔자 A 감염이 진단되었거나 인플루엔자 A 감염의 발병 위험에 처해 있거나 인플루엔자 A 감염을 가진 것으로 의심되는 환자에게 제공하는 단계를 포함하는, 환자에서의 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 감염의 제1 라인 치료, 속행 치료, 또는 재발 또는 불응성 감염의 치료에 사용된다. 본 발명의 항체를 이용한 치료는 독립적 치료법이다. 대안적으로, 본 발명의 항체를 이용한 치료는 하나 이상의 부가적 치료제도 또한 환자 치료에 사용되는, 조합 치료 계획의 한 구성요소 또는 단계이다.

[0308] 인플루엔자 바이러스 관련 질병 또는 장애의 위험에 처한 대상에는 감염자와 접촉한 환자나 다른 방식으로 인플루엔자 바이러스에 노출된 환자가 포함된다. 예방제의 투여는 인플루엔자 바이러스 관련 질병 또는 장애의 증상적 특성이 나타나기 전에 일어날 수 있고, 이에 따라 질병 또는 장애는 예방되거나, 대안적으로 그 진행이 지연된다.

[0309] 각종 측면들에서, huM2e는 대상의 감염과 실질적으로 동시에 또는 후에 투여되는데, 즉 이는 치료적 처치이다. 또 다른 측면에서, 항체는 치료 이익을 제공한다. 각종 측면들에서, 치료 이익에는 인플루엔자 감염, 바이러스 역가, 바이러스 복제, 또는 하나 이상의 인플루엔자 균주의 바이러스 단백질의 양의 하나 이상의 증상 또는 합병증의 진전, 심각도, 빈도, 기간 또는 확률을 감소시키거나 저감시키는 것이 포함되고, 또 다른 측면에서, 치료 이익에는 대상의 인플루엔자 감염으로부터의 회복을 재촉하거나 가속화하는 것이 포함된다.

[0310] 대상에서의 인플루엔자 바이러스 역가, 바이러스 복제, 바이러스 증식, 또는 인플루엔자 바이러스 단백질의 양의 증가를 방지하는 방법도 또한 제공된다. 한 실시양태에서, 그 방법은 대상에서의 인플루엔자 바이러스 역가, 바이러스 복제, 또는 하나 이상의 인플루엔자 균주 또는 단리물의 인플루엔자 바이러스 단백질의 양의 증가를 방지하는 데 유효한 양의 huM2e 항체를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0311] 대상을 하나 이상의 인플루엔자 균주/단리물 또는 서브타입에 의한 감염으로부터 보호하거나 그러한 감염에 대

한 대상의 감수성(susceptibility)을 감소시키는 방법, 즉 예방적 방법도 부가적으로 제공된다. 한 실시양태에서, 그 방법은 하나 이상의 인플루엔자 균주/단리물 또는 서브타입에 의한 감염으로부터 대상을 보호하거나 그러한 감염에 대한 대상의 감수성을 감소시키는 데 유효한 양의, 보호 인플루엔자 M2에 특이적으로 결합하는 huM2e 항체를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0312] 임의적으로, 대상에는 인플루엔자 바이러스 항체, 항바이러스 약물, 예컨대 뉴라미니다제 억제제, HA 억제제, 시알산 억제제 또는 M2 이온 통로 억제제, 바이러스 침투 억제제 또는 바이러스 부착 억제제를 포함하나 이들에 국한되지 않는 제2 작용제가 투여된다. M2 이온 통로 억제제는 예를 들어 아만타딘 또는 리만타딘이다. 뉴라미니다제 억제제는 예를 들어 자나미비르 또는 오셀타미비르 인산염이다.

[0313] 감소되거나 저감될 수 있는 인플루엔자 감염의 증상 또는 합병증에는 예를 들어 오한, 고열, 기침, 인후염, 비충혈, 부비강충혈, 비(nasal) 감염, 부비강 감염, 몸살, 두통, 피로, 폐렴, 기관지염, 중이염, 귓병 또는 사망이 포함된다.

[0314] 인간 및 인간외 환자의 생체내 치료를 위해, 환자에게 통상 본 발명의 HuM2e 항체를 포함하는 약학적 제제를 투여하거나 제공한다. 생체내 치료를 위해 사용될 때, 본 발명의 항체는 치료 유효량(즉, 환자의 바이러스 부하를 제거하거나 감소시키는 양)으로 환자에게 투여된다. 항체는 알려진 방법에 따라, 예컨대 정맥내 투여에 따라, 예를 들어 볼루스로서 또는 장기간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액내, 척추강내, 경구, 국부 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여된다. 항체는 비경구로, 가능한 경우에는 표적 세포 부위에 투여되거나 정맥내 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다. 본 발명의 치료 조성물은 전신, 비경구 또는 국소로 환자 또는 대상에게 투여된다.

[0315] 비경구 투여를 위해, 항체는 약학적으로 허용가능한 비경구 비허클과 결부된 단위 투약량 주사용 형태(용액, 혼탁액, 유화액)로 제형된다. 그러한 비허클의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민이다. 고정 오일 및 올레산에틸과 같은 비수성 비허클도 또한 사용된다. 리포좀이 담체로서 사용된다. 비허클은 등장성 및 화학안정성을 증진시키는 물질, 예를 들어 완충액 및 보존제와 같은 첨가제를 소량으로 함유한다. 항체는 전형적으로 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 상기 비허클 내에 제형된다.

[0316] 용량 및 투여 계획은 의사에 의해 용이하게 결정되는 각종 인자들, 예컨대 감염의 성질, 및 항체(사용될 경우)에 접합된 특정 세포 독성제 또는 성장 억제제의 특성, 예를 들어 그것의 치료 지수, 환자, 및 환자의 병력에 따라 달라진다. 일반적으로, 치료 유효량의 항체를 환자에게 투여한다. 특정 실시양태들에서, 투여되는 항체의 양은 환자의 체중 기준 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 감염의 유형 및 심각도에 따라, 예를 들어 하나 이상의 분리 투여에 의해 또는 연속 주입에 의해, 항체의 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 체중(예를 들어, 약 0.1 내지 15 mg/kg/투약)이 투여를 위한 초기 후보물질 투약량이다. 이 치료의 진행은 통상적 방법 및 검정법에 의해, 또한 의사 또는 기타 당업자에게 알려진 기준에 기초하여 용이하게 모니터링된다.

[0317] 한 특정 실시양태에서, 세포 독성제에 접합된 항체를 포함한 면역접합체가 환자에게 투여된다. 바람직하게, 면역접합체는 세포에 의해 내재화되고, 이에 따라 면역접합체가 결합하고 있는 세포를 사멸함에 있어서의 면역접합체의 치료 효능이 증가하게 된다. 한 실시양태에서, 세포 독성제는 감염 세포 내 핵산을 표적으로 하거나 간섭한다. 그러한 세포 독성제의 예가 상기 기재되어 있고, 이에는 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보노클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제가 포함되나, 이들에 국한되지 않는다.

[0318] 기타 치료 계획이 본 발명의 HuM2e 항체의 투여와 조합된다. 조합 투여에는 분리된 제제 또는 단일 약학적 제제를 이용한 동시투여, 및 임의 순서의 연속 투여가 포함되고, 이때 바람직하게 양자 (또는 모두의) 활성제가 그 것의 생물학적 활성을 동시에 나타내는 기간이 있다. 바람직하게 그러한 병용 요법은 상승효과적 치료 효과를 치료한다.

[0319] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 항체의 투여를 감염제와 결부된 또 다른 항원에 대해 지정된 또 다른 항체의 투여와 조합하는 것이 바람직하다.

[0320] 항체 단백질을 환자에게 투여하는 것과 별도로, 본 발명은 유전자 요법에 의한 항체 투여 방법을 제공한다. 항체를 코딩하는 핵산의 상기 투여는 "치료 유효량의 항체 투여"라는 표현에 포함된다. 예를 들어, 세포내 항체를 생성시키기 위한 유전자요법의 용도에 관한 PCT 특허 출원 공보 W096/07321을 참조한다.

[0321] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-M2e 항체를 사용하여, 결합된 항원의 구조, 예를 들어 상기 구조를 가지거나 모방하는 백신을 개발하는 데 사용되는 구조를 갖는 입체구조 애피토프의 구조를, 예를 들어 화학적 모델링

및 SAR 방법을 통해 결정한다. 이어서, 그러한 백신을 사용하여, 인플루엔자 A 감염을 예방할 수 있다.

[0322] 본 명세서에 언급되고/되거나 출원 데이터 시트어(Sheetare)에 열거된 상기 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비특허 발행물은 모두 본원에 참조 인용된다.

[0323] [실시예]

[0324] 실시예 1: 재조합 M2e 단백질을 발현하는 세포를 이용하는 인간 혈장 내에 존재하는 M2e 특이적 항체의 스크리닝 및 특징 분석

[0325] M2에 대해 특이적이고 인플루엔자 A 감염 세포 및 인플루엔자 바이러스 그 자체에 결합할 수 있는 완전 인간 단클론성 항체를 이하 기재된 바와 같이 환자 혈청 내에서 동정하였다.

[0326] 세포주 내 M2의 발현

[0327] 인플루엔자 서브타입 H3N2에서 발견되는 유래 M2 서열에 상응하는 M2 전장 cDNA를 포함하는 발현 작제물을 293 세포에 형질감염시켰다.

[0328] 하기 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 53에 의해 M2 cDNA를 코딩한다:

```
ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAAACGAATGGGGTGAGATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTT
GTTGTTGCCAAGTATCATTGGATCCTGCACCTGATATTGGATTCTTGATCGCTTTTCAAATGCATTAT
CGTCTCTTAAACACGGTCTGAAAAGAGGGCTTCTACGGAAGGAGTACAGAGTCTATGAGGGAAATATCGAAAG
GAACAGCAGAGTGCTGTGGATGCTGACGATAGTCATTTGTCAACATAGAGCTGGAG
```

[0329]

[0330] MAb 14C2에 특이적인 항-M2e 웨티드를 이용하여 M2의 세포 표면 발현을 확인하였다. A/홍콩/483/1997(HK483) 및 A/베트남/1203/2004(VN1203)으로부터의 M2의 2개의 다른 변이체를 후속 분석을 위해 사용하였고, M2e에서의 각종 아미노산 치환에 의해 14C2 결합을 폐지할 수 있기 때문에, 이들의 변이체의 발현은 본 발명의 M2e 특이적 단클론성 항체를 이용하여 결정하였다.

[0331] 말초혈에서의 항체의 스크리닝

[0332] 120개 초파의 개별 혈장 샘플을 M2에 결합한 항체에 대해 테스트하였다. 이들 중 어느 것도 M2e 웨티드에 대한 특이적 결합을 나타내지 않았다. 그러나, 혈장 샘플 중 10%가 293-M2 H3N2 세포주에 특이적으로 결합한 항체를 포함하였다. 이는, 항체가 M2 동종사량체의 입체구조 결정자에 결합하고, M2 동종사량체의 다른 변이체의 입체구조 결정자에 결합하는 것으로 분류될 수 있고; 이들은 선형 M2e 웨티드에는 특이적일 수 없음을 가리킨다.

[0333] 항-M2 MAb의 특징 분석

[0334] 이 공정을 통해 동정된 인간 MAb는 M2 동종사량체 상의 입체구조 에피토프에 결합하는 것으로 입증되었다. 그것은 원래의 293-M2 형질감염체뿐만 아니라 2개의 다른 세포 발현 M2 변이체에 결합하였다. M2e 웨티드에 결합하는 것에 부가하여 14C2 MAb는 M2 변이체 서열에 더욱 민감한 것으로 입증되었다. 또한, 14C2는 인플루엔자 비리온에 용이하게 결합하지 않으나, 입체구조 특이적 항-M2 MAb는 용이하게 결합하였다.

[0335] 이 결과는, 본 발명의 방법이 M2의 특이적 면역의 필요없이 인플루엔자에 대한 정상 인간 면역 반응으로부터의 M2 MAb이 동정되도록 한다. 이 완전 인간 MAb가 면역요법을 위해 사용될 때, 마우스 항체를 인간화하는 환자에 의해 더욱 내인성을 가지는 잠재능을 가진다. 선형 M2e 웨티드에 결합하는 14C2 및 제미니 바이오사이언시스 (Gemini Biosciences) MAb에 부가적으로 또한 그와 대조적으로, 본 발명의 MAb는 M2의 입체구조 에피토프에 결합하고, A 균주 인플루엔자에 감염된 세포뿐만 아니라, 바이러스 그 자체에 대해서도 특이적이다. 본 발명의 MAb의 또 다른 이점은, 그것들이 각기 테스트한 M2 변이체 모두에 결합한다는 것으로서, 이는 그것들이 특정 선형 아미노산 서열로 제한되지 않음을 가리킨다.

[0336] 실시예 2: M2 특이적 항체의 동정

[0337] 실시예 1에 기재된 인간 혈청에서 동정된 MAb 중 3개를 발현하는 단핵 또는 B 세포를 클론성 집단에 희석하여, 항체를 생성시키도록 유도하였다. 항체 함유의 상등액을 인플루엔자 균주 인플루엔자 서브타입 H3N2로부터의 전장 M2E 단백질로 안정하게 형질감염된 293 FT 세포에의 결합에 대해 스크리닝하였다. 양성 염색/결합을 나타낸 상등액을 인플루엔자 균주 인플루엔자 서브타입 H3N2로부터의 전장 M2E 단백질로 안정하게 형질감염된 293 FT 세포에 대해, 또한 대조군으로서 벡터 단독으로 형질감염된 세포에 대해 다시 스크리닝하였다.

[0338] 이어서, 항체의 가변 영역을 양성 결합을 나타낸 상등액을 갖는 B 세포 웰로부터의 구조 클로닝하였다. 293 FT

세포 중에서 일시적 형질감염을 수행하여, 상기 항체를 재구성하고 생성시켰다. 재구성된 항체 상등액을 상기 상세히 기재된 바와 같은 전장 M2E 단백질로 안정하게 형질감염된 293 FT 세포에의 결합에 대해 스크리닝하여, 구조된 M2E 항체를 동정하였다. 3가지 상이한 항체, 즉 8i10, 21B15 및 23K12를 동정하였다. 4번째의 부가적 항체 클론, 4C2를 구조 스크린에 의해 단리하였다. 그러나, 그것은 독특하지 않았고, 그것은 클론 8i10과 상이한 공여체로부터 나온 것이라해도 클론 8i10과 완전히 동일한 서열을 가졌다.

[0339] 이들 항체의 카파 및 감마 가변 영역의 서열이 이하에 제공되어 있다.

[0340] 클론 8i10:

[0341] 항-M2 클론 8i10의 카파 LC 가변 영역을 BsiWI 단편에 Hind III로서 클로닝하였고(이하 참조), 하기 폴리뉴클레오티드 서열, 및 서열 번호 54(상부) 및 서열 번호 55(하부)에 의해 코딩한다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
 TTCGAAGGTGGTACCTGTACTCCAGGAGCGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCCAC
 CCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAGGAGACAGAGTCACCA
 GGTCTACACTGTAGGTCTAGGGTCAAGGGTAGGAGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTCAGTGGT
 TCACTTGCCGGCGAGTCAGAACATTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCC
 AGTGAACGGCCCGCTCAGTCTGTAAATGTCATAAAATTAAACCATACTGCTCTGGTCCCTTCGGG
 CTAAGGGCCTGATCTCTGTCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
 GATTCCCGGACTAGAGACGACGTAGGCCAACGTTTCAACCCAGGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTA
 CTGGGACAGATTCACTCTCACCATCACCAAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGAACACTTACTACTGTCAAC
 GACCCGTCTAAAGTGAGACTGGTAGTGGTAGACCTGGACTTCTAAACGTTGAATGATGACAGTTG

BsiWI

AGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAACGTACG
 TCTCAATGTCAGGGGAGAGTGAAGGCCGCTCCCTGGTCCACCTCTAGTTGCATGC

[0342] [0343] 8i10 카파 LC 가변 영역의 번역은 이하와 같은 바, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 54, 상부) 및 아미노산 서열(아래, 서열 번호 56에 상응함)이다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTG
 M D M R V L A Q L L G L L L W L R G
 CCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAGGAGACAGAGTCACCA
 A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 TCACTTGCCGGCGAGTCAGAACATTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCC
 I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
 CTAAGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
 P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
 CTGGGACAGATTCACTCTCACCATCACCAAGTCTGCAACCTGAAGATTTCGAACACTTACTACTGTCAAC
 S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q
 BsiWI
 AGAGTTACAGTCCCCCTCTCACTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAACGTACG
 Q S Y S P P L T F G G G T R V E I K R T

[0344] [0345] 특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 8i10 카파 LC 가변 영역의 아미노산 서열은 이하와 같다(CDR 서열은 카밧 방법에 따라 정의됨):

<u>M D M R V L A Q L L G L L L W L R G A R C</u>	VK 리더 (서열 번호 57)
<u>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C</u>	FR1 (서열 번호 58)
<u>R A S Q N I Y K Y L N</u>	CDR1 (서열 번호 59)
<u>W Y Q Q R P G K A P K G L I S</u>	FR2 (서열 번호 60)
<u>A A S G L Q S</u>	CDR2 (서열 번호 61)
<u>G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C</u>	FR3 (서열 번호 62)
<u>Q Q S Y S P P L T</u>	CDR3 (서열 번호 63)
<u>F G G G T R V E I K</u>	FR4 (서열 번호 64)
<u>R T</u>	카파 불변 영역의 개시

[0346] [0347] 이하는 카파 LC 불변 영역을 이미 함유한 발현 벡터 pcDNA3.1 내로 클로닝된 8i10의 카파 LC 가변 영역의 한 예이다(상부 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 65에 상응하고, 하부 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 66에 상응하며, 아미노산 서열은 상기 나타낸 서열 번호 56에 상응함). 흑색 염기는 pcDNA3.1 벡터 서열을 나타내고, 청색 염기는 클로닝된 항체 서열을 나타낸다. 본원에 기재된 항체가 또한 발현 벡터 pCEP4 내로 클로닝되었다.

NheI (894) PmeI (900) HindIII (910)

TCGAAATTAAACGACTCACTATAGGGAGACCAAGCTGGCTAGGGTTAACCTAAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTC
AGCTTAAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGTCACCGATGCCAATTGAAATTGAAAGGTGGTACCTGTACTCCAGGAG
■ M D M R V L

GCTCAGCTCCTGGGCTCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCGAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCT
CGAGTCGAGGACCCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCACCGTCTACACTGTAGGTACTGGTCTAGA
■ A Q L L G L L L W L R G A R C D I Q M T Q S
CCATCCTCCCTGCTGATCTGTAGGAGACAGACTCACCATCTGGCTAGTGAACGGCCGAGTCAGAACATTAA
■ P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q N I Y
GGTAGGAGGGACAGCTAGACATCTCTGTAGTGAACGGCCGCTAGTGTAAATG
■ K Y L N W Y Q Q R P G K A P K G L I S A A S G
TTGCAAAGTGGGCTCCATCAAGGCTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACACTCACCATCAC
AACGTTTCACCCCAGGGTAGTTCAAGTCACCGTACACTAGACCTGTCTAAAGTGAAGAGTGGTAGTGG
■ L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T
AGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTGTCAACAGAGTTACAGTCCCCCTCTCAATTGCGC
TCAGACGTTGGACTTCTAAACGTTGAATGATGACAGTTGTCTCAATGTCAGGGGAGAGTGAAGGCC
■ S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S P P L T F G

BsiWI

GGAGGGACCAGGGTGGAGATCAAACgtacggctgtcaccatgtctatctccgcattgtatggcgttgaatctgg
■ CCTCCCTGCTCCACCTCTAGTTGCAATGccacggacgtggtagcagaactgaaaggccgttagactacttcaacttttagacc
■ G G T R V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
hu 카파 불변

ACTGCTCTGTGTGTGCTGATAACTTATCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAGGTGATAACGCCCTCAATCGGGTAACCTCC
TTGACGGAGACACACAGGAGACTTATGAAAGATGGCTCTCCGGTTATGTACCTTCACCTTACCTTGGGGAGGTTAGGCCATGAGGG
■ T A S V C L L N F Y P R E A K V Q W K V D D N A L Q S G N S
AGGAGAGTGTACAGAGCAGGAGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACAGAGAACACAAAGTC
TCCTCTCACAGTGTCTGCTCTGCTGCTGAGTGTGGAGTCGTGGACTGCGACTGTCTGCTGATGTCCTGTTGTTAG
■ Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V

Drall (1641)
XbaI (1636) ApaI (1642)

TACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGTGCTGCGCTCACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGTAGGGCTTAGAGGGCCCGTTAAA
ATGCGGACGCTTCAGTGGTAGTCCCGGACTCGAGCGGGAGTGTCTCGAAGTGTGCCCCCTCTCACAATCTCCAGATCTCCGGGCAAATT
Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

[0348]

[0349]

8i10 감마 HC 가변 영역을 Xho1 단편에 Hind III로서 클로닝하였고, 하기 폴리뉴클레오티드 서열, 및 서열 번호 67(상부) 및 서열 번호 68(하부)에 의해 코딩된다.

HindIII

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCTCCTGGTGGCAGCTCCAGCTGGGT
TTCGAAGGTGGTACTTGTGGACACCAAGAAGGAAGAGGACCCGTCAGGGTCACCCA
CCTGCTCCAGGTGCAATTGCAAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
GGACAGGGTCCACGTTAACGTCCTCAGCCGGTCTGACCACCTCGGAAGCCTCTGGGAC
TCCCTCACCTGCACTGTCTGGTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGG
AGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCC
AGTCCCCAGGGAGGGACTGGAGTGGATTGGTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTA
TCAGGGGTCCTCCCTGACCTCACCTAACCAAATAGATAATGCCACCTTGTGGTTCAT
CAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAGACACTTCAAGAGTCAGGTCTCC
GTTAGGGAGGGAGTTCTCGCGCAGTGGTATAGTGTCTGTAAGGTTCTCAGTCCAGAGG
CTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGGCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTT
GACTGCTACTCGAGACACTGGCGACGCCCTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAA

XbaI

GTAGTGGTGGTTACTGTATCCTGACTACTGGGCCAGGGAAACCTGGTACCGTCTCGAG
CATCACCAACATGACATAGGAACACTGATGACCCGGTCCCTGGGACCGAGTGGCAGAGCTC

[0350]

[0351]

8i10 감마 HC의 번역이 이하와 같이, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 67, 상부) 및 아미노산 서열(아래, 서열 번호 69에 상응함)이다:

HindIII

AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCTCCTGGTGGCAGCTCCAGCTGGTC
M K H L W F F L L L V A A P S W V
CTGTCCCAGGTGCAATTGCAAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCC
L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
TCCCTCACCTGCACTGTCTGGTCGTCCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGG
S L T C T V S G S S I S N Y W S W I R
CAGTCCCCAGGGAGGGACTGGAGTGGATTGGGTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAG
Q S P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K
TACAATCCCTCCCTCAAGAGCCGCGTCACCATATCACAGACACTTCAAGAGTCAGGT
Y N P S L K S R V T I S Q D T S K S Q V
TCCCTGACGATGAGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGGCGTCTATTCTGTGCGAGAGCG
S L T M S S V T A A E S A V Y F C A R A

XbaI

TCTTGTAGTGGTGGTTACTGTATCCTGACTACTGGGCCAGGGAAACCTGGTACCGTC
S C S G G Y C I L D Y W G Q G T L V T V

TCGAG
S

[0352]

[0353]

특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 8i10 감마 HC의 아미노산 서열이 이하와 같다(CDR 서열은 카밧 방법에 따라 정의됨):

M K H L W F F L L L V A A P S W V L S
Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G S S I S
N Y Y W S
W I R Q S P G K G L E W I G
F I Y Y G G N T K Y N P S L K S
R V T I S Q D T S K S Q V S L T M S S V T A A E S A V Y F C A R
A S C S G G Y C I L D
Y W G Q G T L V T V S

VH 리더 (서열 번호 70)
FR1 (서열 번호 71)
CDR1 (서열 번호 72)
FR2 (서열 번호 73)
CDR2 (서열 번호 74)
FR3 (서열 번호 75)
CDR3 (서열 번호 76)
FR4 (서열 번호 77)

[0354]

[0355]

이하는 감마 HC 불변 영역을 이미 함유한 발현 벡터 pcDNA3.1 내로 클로닝된 8i10의 감마 HC 가변 영역의 한 예이다(상부 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 78에 상응하고, 하부 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호 79에 상응하며, 아미노산 서열은 상기 나타낸 서열 번호 69에 상응함). 흑색 염기는 pcDNA3.1 벡터 서열을 나타내고, 청색 염기는 클로닝된 항체 서열을 나타낸다.

[0356]

[0357]

감마 HC의 프레임워크 4(FR4) 영역은 정상적으로 2개의 세린(SS)을 말단으로 하여, 완전 프레임워크 4 영역은 W G Q G T L V T V S S(서열 번호 80)이 되게 된다. 수용 Xho 1 부위, 및 벡터 내 Xho1 부위의 하향류에 있는 하나의 부가적 염기에서는, 감마 HC 가변 영역이 클로닝된 감마 HC 불변 영역이 프레임워크 4의 상기 최종 아미노산을 코딩하는 최종 염기를 공급한다. 그러나 본래의 1 벡터는 Xho1 부위(CTCGAG, 서열 번호 81)가 생성될 때

침묵 돌연변이를 위해 조정하지 않았고, Xho1 부위의 하향류에 있는 "A" 뉴클레오티드를 함유하도록 하여, 프레임워크 4의 말단에서의 아미노산 변화, 즉 모든 작용 감마 HC 클론에 존재하는 세린의 아르기닌으로(S에서 R로)의 치환을 유발하였다. 따라서, 완전 프레임워크 4 영역은 W G Q G T L V T V S R(서열 번호 82)으로 판독된다. Xho 1 부위의 기재 하향류가 "C" 뉴클레오티드인 향후 작제물이 생성될 것이다. 따라서, 대안적 실시양태에 서의 감마 HC 가변 영역 서열의 클로닝에 사용되는 Xho1 부위의 생성은 침묵 돌연변이이고, 프레임워크 4 아미노산 서열을 그것의 적절한 W G Q G T L V T V S S(서열 번호 80)로 복원시킨다. 이는 본원에 기재된 모든 M2 감마 HC 클론에 적용된다.

[0358] 클론 21B15:

[0359] 항-M2 클론 21B15의 카파 LC 가변 영역을 BsiW1 단편에 Hind III로서 클로닝하였고, 하기 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 83 및 서열 번호 84에 의해 코딩한다:

HindIII
AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGC
TTCGAAGGTGGTACCTGACTCTCCAGGAGCGAGTCGAGGGACCCCGAGGAGCATGAGACCGAGGGCTCACG
CAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
GTCTACACTGTAGGTCCACTGGGTCAAGAGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCTAGTGTAG
ACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACACAGGGAAAGCCCTA
TGAACGGCGCGCTCAGTCTGTAAATGTTCAAAATTAAACCATACTGCTCTGGTCCCTTCGGGGAT
AGGGCCTGATCTCTGCTGCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG
TCCCGGACTAGAGACGACGTAGGCCAACGTTTCAACCCAGGGTAGTTCCAAGTCACCGTCACCTAGACC
GACAGATTCACTCTCACCATCACCAAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGT
CTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTGGTCAGCAGTGGACTCTAAACGTTGAATGATGACAGTTGTCTCA

BsiWI

TACAGTCCCCCTCTACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACG
ATGTCAGGGGGAGAGTGAAAGCCGCCTCCCTGGTCCCACCTATAGTTGCATGC

[0360] [0361] 21B15 카파 LC 가변 영역의 번역은 이하와 같은 바, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 83, 상부) 및 아미노산 서열(아래, 서열 번호 56에 상응함)이다:

HindIII
AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGGT
M D M R V L A Q L L G L L L W L R G A R C
GCCAGATGTGACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
A R C D I Q V T Q S P S S L S A S V G D R V T
ATCACTTGCCGCGCGAGTCAGAACATTACAAGTATTAAATTGGTATCAGCAGAGACACAGGGAAAGCC
I T C R A S Q N I Y K Y L N W Y Q Q R P G K A
CCTAAGGGCCTGATCTCTGTCATCCGGGTTGCAAAGTGGGGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGA
P K G L I S A A S G L Q S G V P S R F S G S G
TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAA
S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C Q
BsiWI
CAGAGTTACAGTCCCCCTCTACTTTCGGCGGAGGGACCAGGGTGGATATCAAACGTACG
Q S Y S P P L T F G G G T R V D I K R T

[0362]

[0363] 특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 21B15 카파 LC 가변 영역의 아미노산 서열은 이하와 같다(CDR 서열은 카밧방법에 따라 정의됨):

<u>M D M R V L A Q L L G L L L W L R G A R C</u>	VK 리더 (서열 번호 57)
<u>D I Q V T Q S P S S L A S V G D R V T I C</u>	FR1 (서열 번호 58)
<u>R A S Q N I Y K Y L N</u>	CDR1 (서열 번호 59)
<u>W Y Q Q R P G K A P K G L I S</u>	FR2 (서열 번호 60)
<u>A A S G L Q S</u>	CDR2 (서열 번호 61)
<u>G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C</u>	FR3 (서열 번호 62)
<u>Q Q S Y S P P L T</u>	CDR3 (서열 번호 63)
<u>F G G G T R V D I K</u>	FR4 (서열 번호 64)
<u>R T</u>	카파 불변 영역의 개시

[0364]

[0365] 다양한 영역에 걸쳐 연장된 카파 LC 가변 영역을 클로닝하는 데 사용된 프라이머는 그 설계에 유동(wobble) 염기를 가졌다. 따라서, 프레임워크 4 영역에 D 또는 E 아미노산이 발생될 수 있다. 일부 경우에서, 구조된 항체 내 상기 위치의 아미노산은 B 세포에서 생성된 원래의 모 아미노산이 아닐 수 있다. 대부분의 카파 LC에서, 위치는 E이다. 상기 클론(21B15)에서 보면, 프레임워크 4(D I K R T)(서열 번호 84) 내 D가 관찰되었다. 그러나, 주위 아미노산에서 보면, 이는 프라이머의 결과로서 발생되었을 수 있고, 인공물일 수 있다. B 세포로부터의 천

연 항체는 이 위치에 E를 가졌을 수 있다.

[0366] 21B15 감마 HC 가변 영역을 *Xba*1 단편에 Hind III로서 클로닝하였고, 하기 폴리뉴클레오티드 서열 및 서열 번호 85(상부) 및 서열 번호 86(하부)에 의해 코딩한다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCTGGTGGCAGCTCCAGCTGGTCC
 TTGCAAGGTGGTACTTGTGGACACCAAGAAGGAAAGGACCACCGTCGAGGGTCGACCCAGG
 TGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCGGAGACCCCTGTCCC
 ACAGGGTCCACGTTAACGTCTCAGCCGGTCCTGACCACCTCGGAAGCCTCTGGGACAGGG
 TCACCTGCACTGTCTCGGTTCTGTCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCC
 AGTGGACGTGACAGAGACCAAGCAGGTAGTCATTAATGATGACCTCGACCTAGGCCGTAGGG
 CAGGGAAAGGGACTGGAGTGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCC
 GTCCCTTCCCTGACCTCACCTAACCCAAATAGATAATGCCACCTTGTGGTCATGTTAGGGA
 CCCTCAAGAGCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATGA
 GGGAGTTCTCGCGCAGTGGTATAGTGGTCTGTGAAGGTTCTCAGTCCAGAGGGACTGCTACT
 GCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTT
 CGAGACACTGGCGACGCCTAGCCGGCAGATAAAGACACGCTCTCGCAGAACATCACCAACAA
 XbaI
 ACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCGAG
 TGACATAGGAACGTGATGACCCGGTCCCTGGGACCAGTGGCAGAGCTC

[0367] [0368] 21B15 감마 HC의 번역은 이하와 같은 바, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 87, 상부) 및 아미노산 서열(아래, 서열 번호 69에 상응함)이다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTCCTCTGGTGGCAGCTCCAGCTGGTCC
 M K H L W F F L L V A A P S W V
 CTGTCCCAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCC
 L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S
 CTCACCTGCACTGTCTCGGTTCTGTCATCAGTAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCC
 L T C T V S G S S I S N Y Y W S W I R Q S
 CCAGGGAAAGGGACTGGAGTGATTGGGTTTATCTATTACGGTGGAAACACCAAGTACAATCCC
 P G K G L E W I G F I Y Y G G N T K Y N P
 TCCCTCAAGAGCGCGTCACCATATCACAAGACACTTCCAAGAGTCAGGTCTCCCTGACGATG
 S L K S R V T I S Q D T S K S Q V S L T M
 AGCTCTGTGACCGCTGCGGAATCGGCCGTCTATTCTGTGCGAGAGCGTCTTGTAGTGGTGGTT
 S S V T A A E S A V Y F C A R A S C S G G
 XbaI
 TACTGTATCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCGAG
 Y C I L D Y W G Q G T L V T V S

[0369] [0370] 특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 21B15 감마 HC의 아미노산 서열은 이하와 같다(CDR 서열은 카밧 방법에 따라 정의됨):

<u>M K H L W F F L L L V A A P S W V L S</u>	VH 리더 (서열 번호 70)
<u>Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G S S I S</u>	FR1 (서열 번호 71)
<u>N Y Y W S</u>	CDR1 (서열 번호 72)
<u>W I R Q S P G K G L E W I G</u>	FR2 (서열 번호 73)
<u>F I Y Y G G N T K Y N P S L K S</u>	CDR2 (서열 번호 74)
<u>R V T I S Q D T S K S Q V S L T M S S V T A A E S A V Y F C A R</u>	FR3 (서열 번호 75)
<u>A S C S G G Y C I L D</u>	CDR3 (서열 번호 76)
<u>Y W G Q G T L V T V S</u>	FR4 (서열 번호 77)

[0371] [0372] 클론 23K12:

[0373] 항-M2 클론 23K12의 카파 LC 가변 영역을 *Bsi*W1 단편에 Hind III로서 클로닝하였고(하기 참조), 하기 폴리뉴클레오티드 서열, 서열 번호 88(상부) 및 서열 번호 89(하부)에 의해 코딩한다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCGAGG
 TTGAAAGGTGGTACCTGTACTCCCAGGAGCAGTCGAGGACCCGAGGACGATGAGACCGAGGCTCC
 TGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCGATCTGTAGGAGACAGAGTC
 ACGGTCTACACTGTAGGTCTACTGGGTAGGAGGGACAGACGTAGACATCCTCTGTCAG
 ACCATCACTTGGCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 TGGTAGTGAACGGCTGTTAGTCTCGTAACTCGTCAAATTAACCATAGTCGTCCTTGGTCCCT
 AAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGACATCCAGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG
 TTGGGGATTGAGGACTAGAGATAACGACGTAGGTCAAACGTTCACCCAGGGTAGTTCCAAGTCACC
 CAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACCTAC
 GTCACCTAGACCCCTGCTAAAGTGAGAGTGGTAGTCGCCAGCGTGGACTTCTAAACGTTGGATG

BsrWI

TACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
 ATGACAGTTGTCTCAATGTACGGACGGAAACCGGTCCCCTGGTCGACCTCTAGTTGCATGC

[0374]

[0375]

23K12 카파 LC 가변 영역의 번역은 이하와 같은 바, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 90, 상부) 및 아미노산 서열(아래, 서열 번호 91에 상응함)이다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCGAGG
 M D M R V L A Q L L G L L L W L R G
 T G C C A G A T G T G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C C T C C T G T C G A T C T G T A G G A G A C A G A G T C
 A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V
 ACCATCACTTGGCGGACAAGTCAGAGCATTAGCAGCAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 T I T C R T S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G
 AAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGACATCCAGTGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG
 K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G
 CAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACCTAC
 S G S G T D F T L T I S G L Q P E D F A T Y
 BsrWI
 TACTGTCAACAGAGTTACAGTATGCCTGCCTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACG
 Y C Q Q S Y S M P A F G Q G T K L E I K R T

[0376]

[0377]

특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 23K12 카파 LC 가변 영역의 아미노산 서열은 이하와 같다(CDR 서열은 카밧 방법에 따라 정의됨):

M D M R V L A Q L L G L L L W L R G A R C
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
R A S Q N I Y K Y L N
W Y Q Q R P G K A P K G L I S
A A S G L Q S
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I T S L Q P E D F A T Y Y C
Q Q S Y S P P L T
F G G G T R V E I K
R I

VK 리더 (서열 번호 57)
 FR1 (서열 번호 58)
 CDR1 (서열 번호 92)
 FR2 (서열 번호 93)
 CDR2 (서열 번호 94)
 FR3 (서열 번호 95)
 CDR3 (서열 번호 96)
 FR4 (서열 번호 114)
 카파 불변 영역의 개시

[0378]

[0379]

23K12 감마 HC 가변 영역을 Xho1 단편에 Hind III로서 클로닝하였고, 하기 폴리뉴클레오티드 서열, 서열 번호 97(상부) 및 서열 번호 98(하부)에 의해 코딩한다:

HindIII
 AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGCTGTGCTGGGTTTCCCTGTTGCTATTTAAAAGGTGTCCAGT
 TTGAAAGGTGGTACCTCAACCCCGACACGACCCAAAAGGAACAACGATAAAATTTCCACAGGTCA
 GTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAAATCTCCT
 CACTCCACGTGACCACCTCAGACCCCCCTCGAACCGGTGGACCCCCCAGGGACTCTTAGAGGA
 GTGCAGCCTCTGGATTCAACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGG
 CACGGTGGAGACCTAAGTGGCAGTCATCGTTGATGTACTCAACCCAGGGTCCGCCAGGGTTACGG
 GGCTGGAGTGGTCTCAGTTATAGTGGTAGCACATACTACGCAACTCCGTGAAGGGCA
 CCGACCTCACCCAGAGTCATAAAATATCACCAACCATCGTGTATGCGTCTGAGGCACCTCCGT
 GATTCTCCTCTCCAGAGACAACACTCCAAGAACACAGTGGTCTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
 CTAAGAGGAAGAGGTCTCTGGAGGTTCTGTGTCACAAAGAAGTTACTTGTGGACTCTCGGC
 AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGGTTACGGTTAGACGTCT
 TCCTGTGCCGACACATAATGACACGCTCTACAGACTCGTCCTACGCCCAATGCCAAATCTGCAGA

XbaI

GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGAG
 CCCCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCAGAGCTC

[0380]

[0381]

23K12 감마 HC 가변 영역의 번역은 이하와 같은 바, 폴리뉴클레오티드 서열(위, 서열 번호 99, 상부) 및 아미노

산 서열(아래, 서열 번호 100에 상응함)이다:

```

HindIII
AAGCTTCCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGTTTCTTGTGCTATTTAAAAGGTGTCCAG
M E L G L C W V F L V A I L K G V Q
TGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGAGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGAAATCTCC
C E V L L V E S G G G L V Q P G G S L R I S
TGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCAACTACATGAGTTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAG
C A A S G F T V S S N Y M S W V R Q A P G K
GGGCTGGAGTGGGCTCAGTTATTTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
G L E W V S V I Y S G G S T Y Y A D S V K G
AGATTCTCCTCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACAGTGTCTTCTCAAATGAACAGCCTGAGAGCC
R F S F S R D N S K N T V F L Q M N S L R A
GAGGACACGGCTGTGTTAACTGTGCGAGATGTCTGAGCAGGATGCGGGGTTACGGTTAGACCGTC
E D T A V Y Y C A R C L S R M R G Y G L D V
XbaI
TGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGCTCTCGAG
W G Q G T T V T V S

```

[0382]

[0383] 특정 도메인이 이하와 같이 규명된, 23K12 감마 HC 가변 영역의 아미노산 서열은 이하와 같다(CDR 서열은 카밧방법에 따라 정의됨):

M E L G L C W V F L V A I L K G V Q C VH 리더(서열 번호 101)
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S C A A S G F T V S FR1 (서열 번호 102)
S N Y M S CDR1 (서열 번호 103)
W V R Q A P G K G L E W V S FR2 (서열 번호 104)
V I Y S G G S T Y Y A D S V K CDR2 (서열 번호 105)
G R F S F S R D N S K N T V F L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R FR3 (서열 번호 106)
C L S R M R G Y G L D V CDR3 (서열 번호 107)
W G Q Q G T T V T V S FR4 (서열 번호 108)

[0384]

[0385] 실시예 3: 보존된 항체 가변 영역의 동정

[0386] 3개의 항체 카파 LC 및 감마 HC 가변 영역의 아미노산 서열을 정렬시켜, 이하에 나와 있는 바와 같이 보존된 영역 및 잔기를 동정하였다.

[0387] 3개 클론의 카파 LC 가변 영역의 아미노산 서열 정렬:

Translation of mp 73.21615_L	A	M	M	V	L	A	L	L	G	L	L	L	L	L	G	A	C	I	V	L
Translation of mp 147_310k	A	M	M	V	L	A	L	L	G	L	L	L	L	L	G	A	C	I	M	L
Translation of mp 137_23612	A	M	M	V	L	A	L	L	G	L	L	L	L	L	G	A	C	I	M	L
Translation of mp 73.21615_L	A	V	G	V	I	C	A	G	I						G	A	G	L		
Translation of mp 147_310k	A	V	G	V	I	C	A	G	I						G	A	G	L		
Translation of mp 137_23612	A	V	G	V	I	C	A	G	I						G	A	G	L		
Translation of mp 73.21615_L	I	A	A	G	L	G	V								G	G	G	L	I	L
Translation of mp 147_310k	I	A	A	G	L	G	V								G	G	G	L	I	L
Translation of mp 137_23612	I	A	A	G	L	G	V								G	G	G	L	I	G
Translation of mp 73.21615_L	A	C						L							V	I				
Translation of mp 147_310k	A	C						L							V	I				
Translation of mp 137_23612	A	C						M	-A	G	G				L	I				

[0388]

[0389]

3개 클론의 감마 HC 가변 영역의 아미노산 서열 정렬:

Translation of mp 81_21B15_F2	A	M	L	L	L	V	A	A	V	V	L	V	L
Translation of mp 146_23K12_F2	A	M	L	G	L	C	V	L	V	A	C	V	L
Translation of mp 153_8i10_g2	A	M	L	L	L	V	A	A	V	L	V	L	V
Translation of mp 81_21B15_F2	G	G	G	L	V		L	L	C	V	G	I	
Translation of mp 146_23K12_F2	G	G	G	L	V		G	G	L	I	C	A	G
Translation of mp 153_8i10_g2	G	G	G	L	V		L	L	C	V	G	I	
Translation of mp 81_21B15_F2	I		G	G	L	I	G	I	G	G		L	
Translation of mp 146_23K12_F2	V	A	G	G	L	V	V	V	G	G		S	V
Translation of mp 153_8i10_g2	I		G	G	L	I	G	I	G	G		L	
Translation of mp 81_21B15_F2	V	I				V	L	M	V	A	A	A	V
Translation of mp 146_23K12_F2	V	I				V	L	M	V	A	A	A	V
Translation of mp 153_8i10_g2	V	I				V	L	M	V	A	A	A	V
Translation of mp 81_21B15_F2	C	A	A	C	G	G	C	I	L	G	G	L	V
Translation of mp 146_23K12_F2	C	A	C	L	M	G	G	L	V	G	G	V	V
Translation of mp 153_8i10_g2	C	A	A	C	G	G	C	I	L	G	G	L	V

[0390]

클론 8i10 및 21B15는 2개의 상이한 공여체로부터 나온 것이다, 이들은 동일한 그대로의 감마 HC를 가지고, 프레임워크 1 영역의 4번 위치에 있는 단지 1개의 아미노산만이 카파 LC에서 차이가 있다(아미노산 M 대 V, 상기 참조), (카파 LC의 프레임워크 4에서의 D 대 E 유동 위치 배제).

[0392]

항체의 가변 영역의 서열 비교는, 클론 8i10의 중쇄가 생식계열 서열 IgHV4로부터 유래되었고 경쇄는 생식계열 서열 IgKV1로부터 유래되었음을 나타냈다.

[0393]

항체의 가변 영역의 서열 비교는, 클론 21B15의 중쇄가 생식계열 서열 IgHV4로부터 유래되었고 경쇄는 생식계열 서열 IgKV1로부터 유래되었음을 나타냈다.

[0394]

항체의 가변 영역의 서열 비교는, 클론 23K12의 중쇄가 생식계열 서열 IgHV3로부터 유래되었고 경쇄는 생식계열 서열 IgKV1로부터 유래되었음을 나타냈다.

[0395]

실시예 4: M2 항체의 생성 및 특징 분석

[0396]

상기 기재된 항체를 293 PEAK 세포에서의 보다 큰 규모의 일시적 형질감염에 의해 밀리그램 양으로 생성시켰다. 조질의 정제되지 않은 항체 상등액을 사용하여, ELISA 플레이트 상에서의 인플루엔자 A/푸에르토리코 /8/1932(PR8) 바이러스에의 항체 결합을 조사하여, 역시 보다 큰 규모의 일시적 형질감염에 의해 생성된 대조 항체 14C2의 결합과 비교하였다. 항-M2 재조합 인간 단클론성 항체는 인플루엔자에 결합한 반면, 대조 항체는 결합하지 않았다(도 9).

[0397]

PR8 바이러스로 감염된 MDCK 세포에 대해서도 결합을 테스트하였다(도 10). 대조 항체 14C2 및 3개의 항-M2E 클론, 즉 8I10, 21B15 및 23K12는 모두 PR8-감염 세포의 표면 상에 발현된 M2 단백질에 대한 특이적 결합을 나타냈다. 비감염 세포에서는 결합이 관찰되지 않았다.

[0398]

항체를 상등액으로부터 단백질 A 칼럼에서 정제하였다. 1 μ g/ml 농도로 정제된 항체를 이용하여 FACS 분석을 수행하여, 세포 표면에서 M2 단백질을 발현하는 일시적으로 형질감염된 293 PEAK 세포에의 항체의 결합을 조사하였다. 모의 형질감염된 세포, 및 인플루엔자 서브타입 H3N2, A/베트남/1203/2004(VN1203) 또는 A/홍콩/483/1997 HK483 M2 단백질로 일시적으로 형질감염된 세포에 대한 결합을 테스트함으로써, 결합을 측정하였다. 양성 대조군으로서, 항체 14C2를 사용하였다. 비염색 및 2차 항체 단독 대조군은 배경 결정을 도왔다. M2 단백질로 형질감염된 세포에 대한 특정 염색이 3개의 모든 클론에서 관찰되었다. 또한, 3개의 모든 클론은 고병원성 (high path) 균주 A/베트남/1203/2004 및 A/홍콩/483/1997 M2 단백질에 결합한 반면, H3N2 M2 단백질에 잘 결합한 양성 대조 14C2은 A/ 베트남/1203/2004 M2 단백질에는 더 약하게 결합하였고, A/홍콩/483/1997 M2 단백질에는 결합하지 않았다. 도 11을 참조한다.

[0399]

항체 21B15, 23K12 및 8I10은 M2 단백질을 안정하게 발현하는 293-HEK 세포의 표면에는 결합하였으나, 백터 형질감염된 세포에는 결합하지 않았다(도 1 참조). 부가적으로, 이들 항체의 결합은 5 mg/ml 24량체 M2 웨პ티드의 존재에 의해 경쟁되지 않았고, 반면 선형 M2 웨პ티드에 대해 생성된 대조군 키메라 마우스 V-영역/인간 IgG1 카파 14C2 항체(hu14C2)의 결합은 M2 웨პ티드에 의해 완전히 억제되었다(도 1 참조). 이 데이터로써, 상기 항체가 선형 M2e 웨პ티드와는 반대로, 세포 또는 바이러스 표면 상에 발현된 M2e 내에 존재하는 입체구조 에피토프에 결합한다는 것이 확인된다.

[0400] 실시예 5: 인간 항-인플루엔자 단클론성 항체의 바이러스 결합

UV 불활성화 인플루엔자 A 바이러스(A/PR/8/34)(어플라이드 바이오테크놀로지즈(Applied Biotechnologies))를 $25 \mu\text{l}$ 웨로 하여 PBS 중에 $1.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 384-웰 맥시솝(MaxiSorp) 플레이트(Nunc)에 플레이팅하여, 4°C 에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플레이트를 PBS로 3회 세정하여, $50 \mu\text{l}$ 웨로 1% 무지방 드라이 밀크로 블로킹한 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 2차 세정한 후, MAb를 3별로 지정 농도로 첨가하였고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 한 번 더 세정한 후, 각 웨에 PBS/ 1% 밀크 중 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)가 접합된 염소 항-인간 IgG Fc(피어스(Pierce))의 25 ml 의 $1/5000$ 희석액을 첨가하였고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 최종 PBS 세정 후, HRP 기질 1-스텝(1-Step)TM 울트라-TMB-ELISA(피어스)를 $25 \mu\text{l}$ 웨로 첨가하였고, 반응은 실온에서 암 상태로 진행하였다. 검정을 $25 \mu\text{l}$ 웨의 $1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ 로 중단하였고, 450 nm 에서의 흡광도(A450)를 스펙트로맥스 플러스(SpectroMax Plus) 플레이트 리더에서 판독하였다. 데이터를 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 결합하는 MAb 8I10의 흡광도에 대해 정규화하였다. 결과가 도 2a 및 2b에 나와 있다.

[0402] 실시예 6: 전장 M2 변이체에 대한 인간 항-인플루엔자 단클론성 항체의 결합

분석을 위해 (생체내 고 병리 표현형을 가지는 것들을 포함한) M2 변이체를 선택하였다. 서열에 대해 도 3a를 참조한다.

M2 cDNA 작제물을 HEK293 세포에서 일시적으로 형질감염시켜, 이하와 같이 분석하였다: FACS에 의해 일시적 형질감염물질을 분석하기 위해, 10 cm 조직 배양액 플레이트 상의 세포를 0.5 ml 의 세포 해리 완충액(인비트로젠)으로 처리하고, 수거하였다. 세포를 1% FBS, 0.2% NaN_3 (FACS 완충액)을 함유하는 PBS에서 세정하고, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 토끼 IgG로 보충된 0.6 ml 의 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 각 형질감염물질을 5×10^5 내지 10^6 세포/샘플로 하여 0.2 ml 의 FACS 완충액 중에 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 지정 MAb과 혼합하였다. 세포를 FACS 완충액으로 3회 세정하였고, 각 샘플을 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 알렉사플루오르(alexaphluor)(AF) 647-항인간 IgG H&L(인비트로젠)을 함유하는 0.1 ml 용액 중에 재현탁시켰다. 세포를 다시 세정하였고, 유세포분류법을 FACSCanto 장치(베톤-딕킨슨(Becton-Dickenson))에서 수행하였다. 데이터를 M2-D20 일시 형질감염물질의 평균 형광도의 백분율로서 표시한다. 변이체 결합에 대한 데이터는 2회 실험을 대표한다. 알라닌 돌연변이체에 대한 데이터는 표준 오차와 함께 3회 분리된 실험들로부터의 평균 판독값이다. 결과가 도 3b 및 3c에 나와 있다.

[0405] 실시예 7: M2 결합을 평가하기 위한 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발

항체 결합 부위를 평가하기 위해, 알라닌을 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 나타내어지는 바와 같이, 개별 아미노산 위치에서 치환하였다.

M2 cDNA 작제물을 실시예 6에서 상기 기재된 바와 같이 HEK293 세포 내에 일시적으로 형질감염시키고 분석하였다. 결과가 도 4a 및 4b에 나와 있다. 도 8은, M2 폴리펩티드의 아미노 말단의 매우 보존된 영역 내에 있음을 도시한다. 도 4a, 4b 및 도 8에 나와 있는 바와 같이, 에피토프는 M2 폴리펩티드의 2번 위치의 세린, 5번 위치의 트레오닌, 및 6번 위치의 글루탐산을 포함한다.

[0408] 실시예 8: 에피토프 블로킹

MAb 8I10 및 23K12가 동일 부위에 결합하는지의 여부를 결정하기 위해, 인플루엔자 균주 A/HK/483/1997 서열을 나타내는 M2 단백질을 CHO(차이니즈 햄스터 난소) 세포주 DG44에서 안정하게 발현시켰다. 세포를 세포 해리 완충액(인비트로젠)으로 처리하고, 수거하였다. 세포를 1% FBS, 0.2% NaN_3 (FACS 완충액)을 함유하는 PBS에서 세정하고, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 토끼 IgG로 보충된 FACS 완충액 내에 10^7 세포/ ml 로 재현탁시켰다. 세포를 4°C 에서 1시간 동안 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAb(또는 2N9 대조군)에 의해 예비 결합시킨 후, FACS 완충액으로 세정하였다. 이어서, 직접 접합된 AF647-8I10 또는 -23K12(알렉사플루오르[®] 647 단백질 표지 키트(인비티로젠)으로 표지됨)를 사용하여, 샘플당 10^6 개 세포에 대해 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 3개의 예비 블로킹된 세포 샘플을 염색하였다. FACSCanto를 이용한 상기 경우와 같이, 유세포분류 분석이 진행되었다. 데이터는 표준 오차와 함께 3회의 분리된 실험들로부터의 평균 판독값이다. 결과가 도 5에 나와 있다.

[0410] 실시예 9: 인간 항-인플루엔자 단클론성 항체의 M2 변이체 및 절단 M2 웨პ티드에의 결합

MAb 8I10 및 23K12의 다른 M2 웨პ티드 변이체에 대한 교차반응성을 ELISA에 의해 평가하였다. 웨პ티드 서열이 도

6a 및 6b에 나와 있다. 부가적으로, 유사한 ELISA 검정을 이용하여, M2 절단 펩티드에 대한 결합 활성을 결정하였다.

[0412] 간략히 말해, 각 펩티드를 4°C에서 하룻밤 동안 25 μ l/웰의 PBS 완충액 중에 편평한 바닥의 384 웰 플레이트 (Nunc)에 2 μ g/mL로 코팅하였다. 플레이트를 3회 세정하고, 실온에서 1시간 동안 1% 밀크/PBS로 블로킹하였다. 3회 세정한 후, MAb 역가를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 희석된 FC 특이성의 HRP 접합 염소 항-인간 면역글로불린(피어스)을, 3회 세정 후에 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 3회 세정하였다. 1-스텝™ 울트라-TMB-ELISA(피어스)를 25 μ l/웰로 첨가하였고, 반응은 실온에서 암 상태에서 진행하였다. 검정을 25 μ l/웰의 1 N H₂SO₄로 중단시켰고, 450 nm에서의 흡광도(A450)를 스펙트로맥스 플러스 플레이트 리더에서 판독하였다. 결과가 도 6a 및 6b에 나와 있다.

[0413] 실시예 10: 인간 항-인플루엔자 단클론성 항체의 치명적 바이러스 챌린지로부터의 보호 능력의 생체내 평가

[0414] 고병원성 조류 인플루엔자 균주를 이용한 치명적 바이러스 챌린지로부터 마우스를 보호하는, 항체, 23K12 및 8I10의 능력을 테스트하였다.

[0415] 암컷 BALB/c 마우스를 각 10마리로 된 5개 군으로 무작위 분류하였다. 감염 1일전(일-1(마이너스 1)) 및 감염후 2일(일+2(플러스 2))에, 200 μ g의 항체를 200 μ l 울트라-복강 주사액을 통해 주입하였다. 0일째(0)에, 대략 LD90(치사 용량 90)의 A/베트남/1203/04 인플루엔자 바이러스를 30 ml 부피로 비강내 주입하였다. 감염후 1일 내지 28일에 걸쳐 생존율을 관찰하였다. 결과가 도 7에 나와 있다.

기타 실시양태

[0416] 본 발명의 구체적 실시양태들이 예시적 목적으로 본원에 기재되었으나, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않도록 하면서 각종 변형들이 이루어질 수 있다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구범위에 의한 경우를 제외하고는 제한되지 않는다.

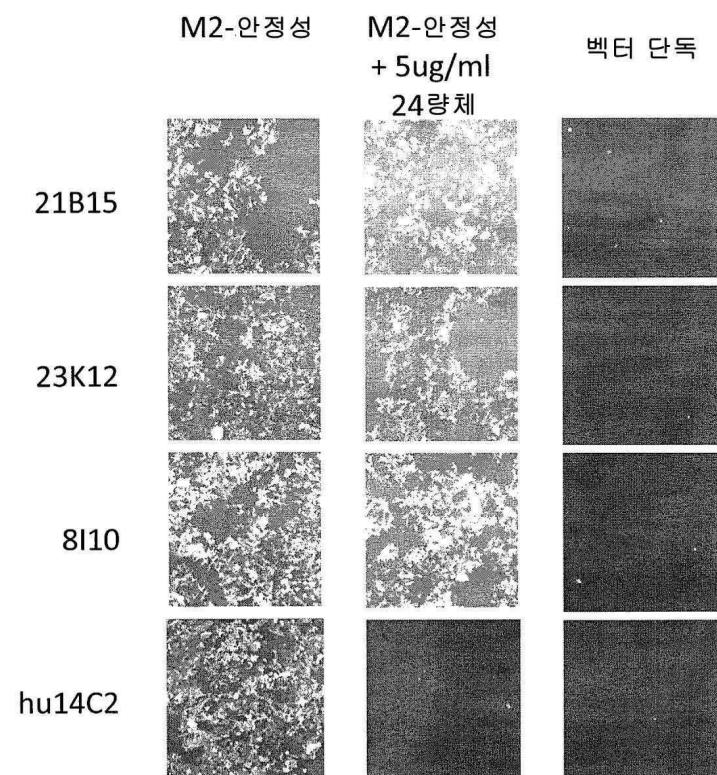
[0417] 본 발명이 발명의 상세한 설명과 함께 기재되었으나, 상기 설명은 첨부된 특허청구범위의 범주에 의해 한정되는, 본 발명의 범주를 예시하고 제한하지 않는 것으로 한다. 다른 측면, 이점 및 변형이 이하 특허청구범위의 범주 내에 속한다.

[0418] 본원에 언급된 특허 및 과학 문헌은 당업자에게 이용 가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 모든 미국 특허 및 공개 또는 비공개 미국 특허 공보가 참조 인용된다. 본원에 인용된 모든 공개된 외국 특허 및 특허 출원이 본원에 참조 인용된다. 본원에 인용된 수탁 번호로 표시된 Genbank 및 NCBI 자료는 본원에 참조 인용된다. 본원에 인용된 모든 다른 공개 참조문, 문헌, 원고 및 과학 문헌은 본원에 참조 인용된다.

[0419] 본 발명이 본 발명의 바람직한 실시양태와 관련하게 구체적으로 나타내어지고 기재되었으나, 첨부된 특허청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않는 한, 형태 및 상세내용에서 각종 변화가 가해질 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

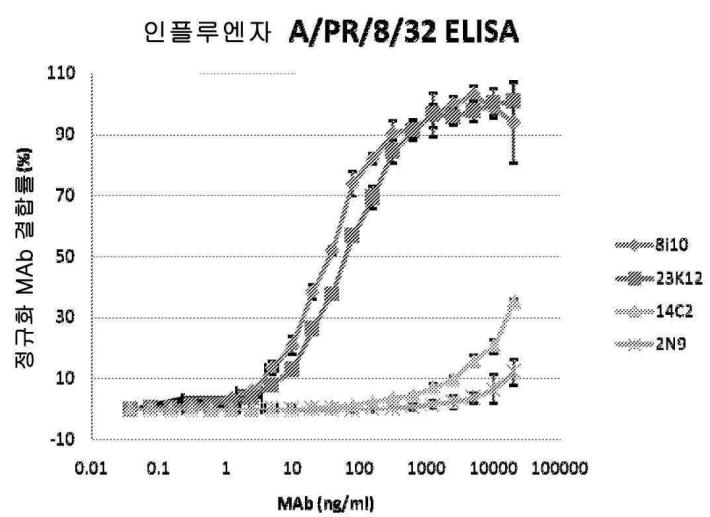
도면

도면1



도면2a

바이러스 결합

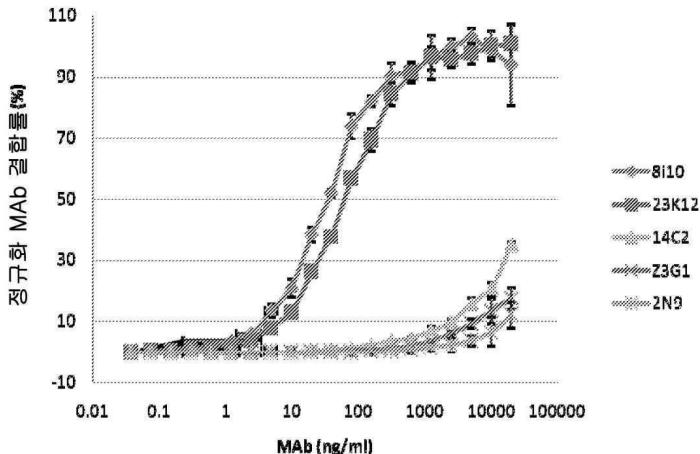


도면2b

바이러스 결합

(Z3G1 01용)

인플루엔자 A/PR/8/32 ELISA

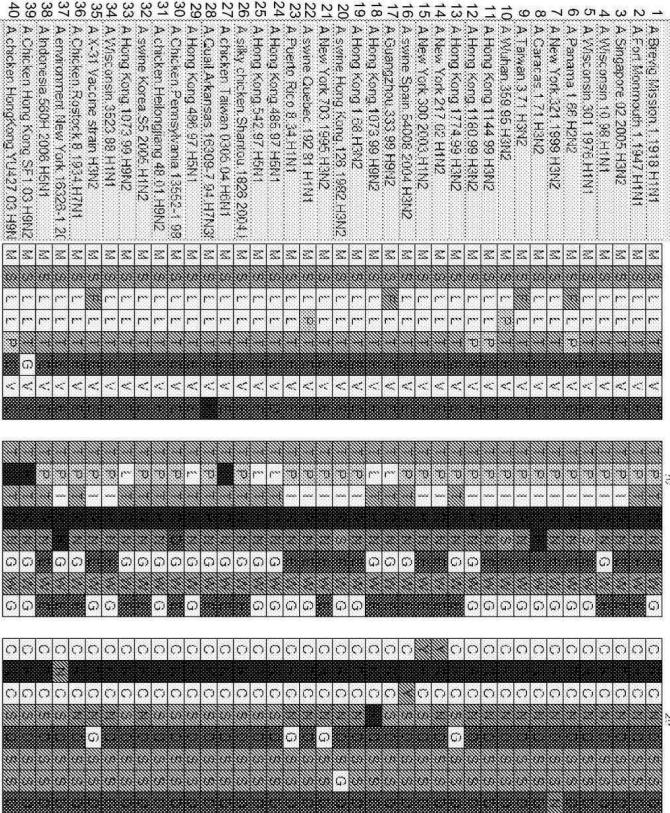


도면3a

V120의 세포와 도메인은 #19와 동일하고, H120은 동일하며, V1203의 세포와 도메인은 동일함

D20의 세포와 도메인은 #19와 동일하고, HK483의 세포와 도메인은 #29와

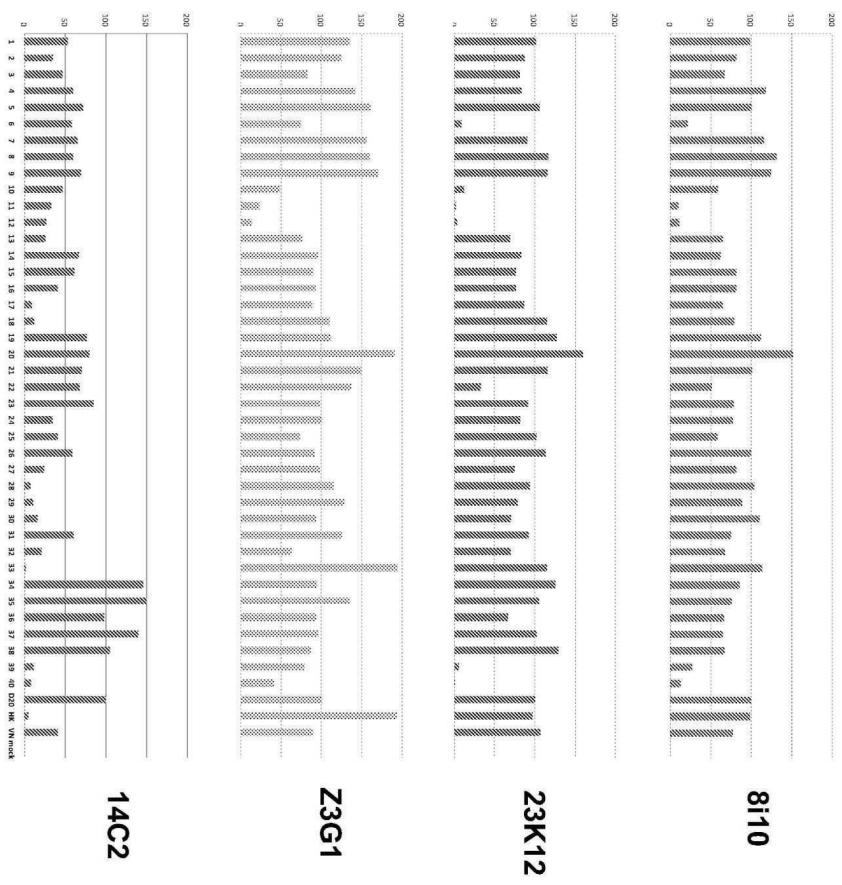
M2 변이체의 세포와 도메인의 아미노산 서열



도면3b

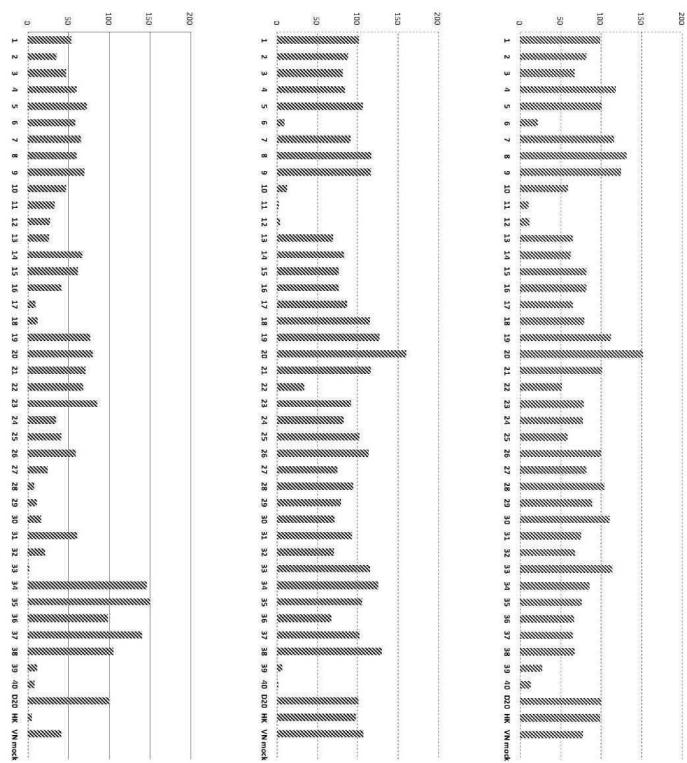
결합률(%) (D20에 대한 결합으로 정규화)

전장 M2 변이체 결합
(Z3G1 이용)



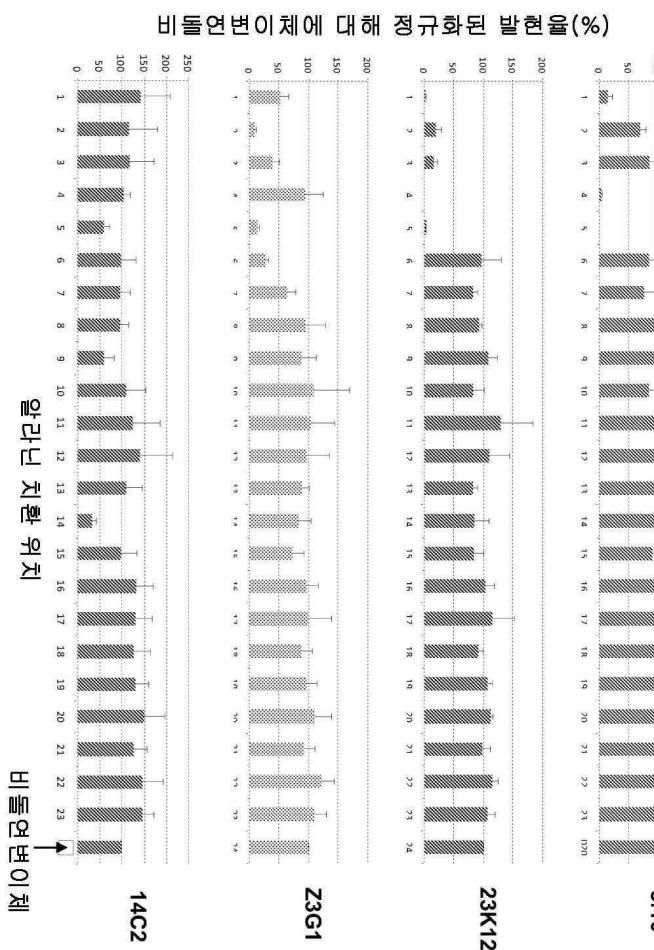
도면3c

결합률(%) (D20에 대한 결합으로 정규화)



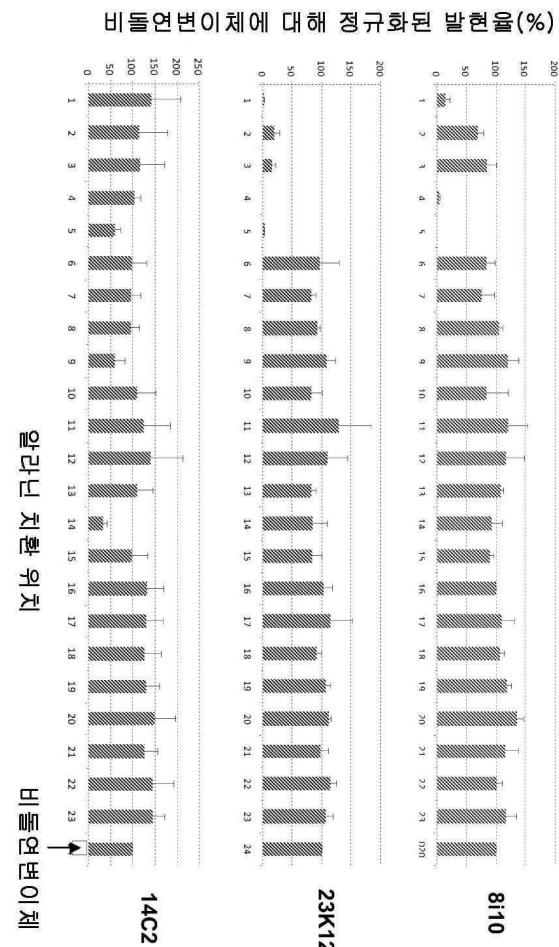
전장 M2 변이체 결합

도면4a



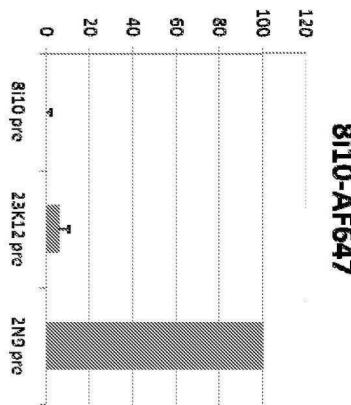
알라닌 스캐닝 돌연변이 유발 (Z3G1 이용)

도면4b



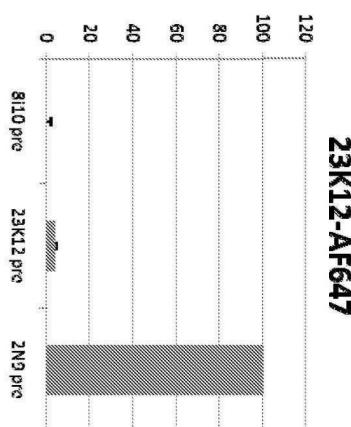
도면5

정규화 결합률(c2N9 대조군에 대한 비율(%))



에피토프 블로킹

정규화 결합률(c2N9 대조군에 대한 비율(%))



도면6a

변이체 M2 펩티드에 대한 항M2 항체의 교차반응성 결합

서열 번호	명칭	크기	설명
1	M2	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRNDSSD
2	M2SG	23 aa	SLTVEVETPIRSEWGCRCNDSSD
3	M2EG	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRCNGSSD
4	M2P	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRCNDSSD
5	M2G	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRCNGSSD
6	M2DLTGs	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRCNDSSD
7	M2KNS	23 aa	SLTVEVETPIRKEWGCNCSDSSD
8	M2LGS	23 aa	SLTVEVETIIRNGWGCRCSDSSD
9	M2LTGKS	23 aa	SLTVEVETLTKNGWGCRCSDSSD
10	M2SY	23 aa	SLTVEVETPIRSEWGCRCYNDSSD
11	M2TGEKS	23 aa	SLTVEVETPIRNGWECKCSDSSD
12	M2HTGEKS	23 aa	SLTVEVETIIRNGWECKCSDSSD
13	M2KGGEKS	23 aa	SLTVEVKIPTIRNGWECKCSDSSD
14	M2LTGGS	23 aa	SLTVEVETIIRNGWGCRCSDSSD
15	M2TDGEKS	23 aa	SLTVEVETPIRNDGWECKCSDSSD
16	M2TGS	23 aa	SLTVEVETPIRNGWGCRCSDSSD
17	M2TGEK	23 aa	SLTVEVETPIRNGWECKCSDSSD
18	M2LTGEKS	23 aa	SLTVEVETIIRNGWECKCSDSSD
19	M2K	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCCKNDSSD
20	M2FG	23 aa	SLTVEVETPIRNEWGCRCNGSSD
21	M2TGE	23 aa	SLTVEVETPIRNGWECKCSDSSD
22	M2KGEMS	23 aa	SLTVEVETPIRKGWECNGCSDSSD
23	M2TES	23 aa	SLTVEVETPIRNEWECRCSDSSD
24	M2GHTGKS	23 aa	SLTVEVETIIRNGWGCKSDSSD
25	M2PHTGs	23 aa	SLTVEVETIIRNGWGCRCSDSSD

아생 펩티드(서열 번호 1)에의 결합에 비교한 백분율

>25%	-	비결합
25~40%	W	약한 결합
>40%	+	강성 결합

주: mAb를 5 μ g/ml로 테스트하였다

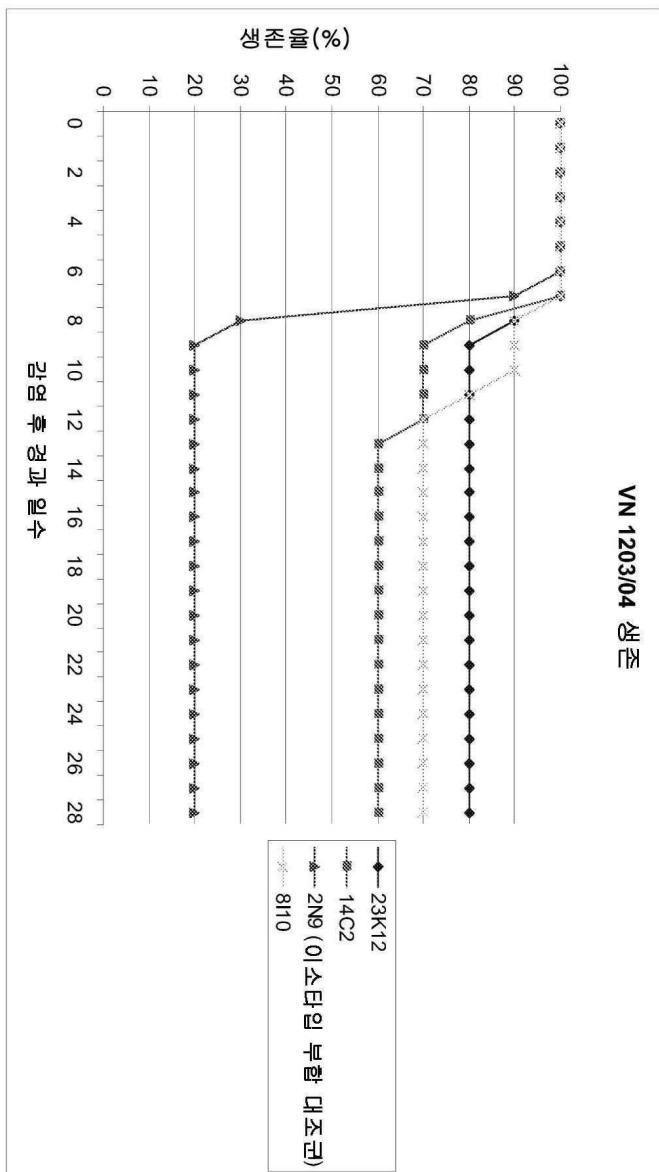
도면6b

절단된 M2 펩티드에 대한 M2 항체의 결합 활성

서열 번호	명칭	크기	설명	활성	활성	활성	
1	M2	23 aa	SLITEVETPIRNEWGCRNDSSD	3.85	0.11	0.22	0.06
26	M16	16 aa	LLTEVETPIRNEWGCR	3.94	0.09	0.21	0.09
27	M15	15 aa	LTEVETPIRNEWGCR	3.95	0.09	0.21	0.09
28	M12	12 aa	VETPIRNEWGCR	0.15	0.09	0.20	0.09
29	CM17	17 aa	ETPIRNEWGCRNDSSD	0.19	0.11	0.34	0.11
30	CM16	16 aa	TPRNEWGCRNDSSD	0.23	0.13	0.35	0.12
31	CM15	15 aa	PIRNEWGCRNDSSD	0.19	0.12	0.34	0.11
32	CM14	14 aa	IRNEWGCRNDSSD	0.23	0.14	0.36	0.13
33	CM13	13 aa	RNEWGCRNDSSD	0.22	0.14	0.34	0.13
34	CM12	12 aa	NEWGCRNDSSD	0.27	0.14	0.39	0.14
35	NM17	17 aa	SLITEVETPIRNEWGCR	3.99	0.26	0.58	0.10
36	NM16	16 aa	SLITEVETPIRNEWG	3.90	0.29	0.62	0.09
37	NM15	15 aa	SLITEVETPIRNEWG	3.97	0.12	0.30	0.11
38	NM14	14 aa	SLITEVETPIRNEW	3.97	0.11	0.24	0.09
39	NM13	13 aa	SLITEVETPIRNE	0.18	0.11	0.25	0.10
40	NM12	12 aa	SLITEVETPIRN	0.20	0.10	0.24	0.09
41	NM11	11 aa	SLITEVETPIR	0.21	0.13	0.30	0.12
42	NM10	10 aa	SLITEVETPI	0.17	0.10	0.24	0.10
43	NM8	8 aa	SLITEVET	0.15	0.10	0.20	0.09
44	NM7	7 aa	SLITEV	0.14	0.10	0.20	0.08
45	NM9	9 aa	SLITEVTP	0.21	0.12	0.30	0.19
46	M2e	24 aa	MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSSD	3.98	0.13	0.43	0.10
CMV	HVR1			0.16	0.11	0.21	3.99

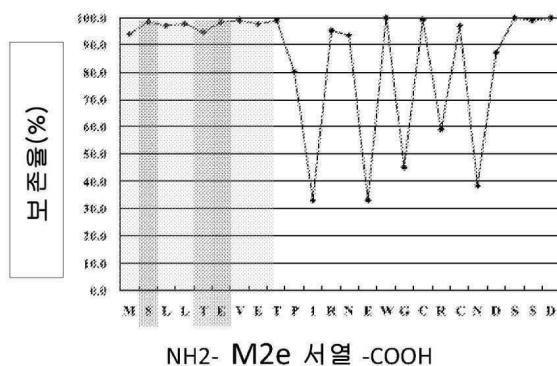
주: mAb를 5 μ g/ml로 테스트하였다

도면7

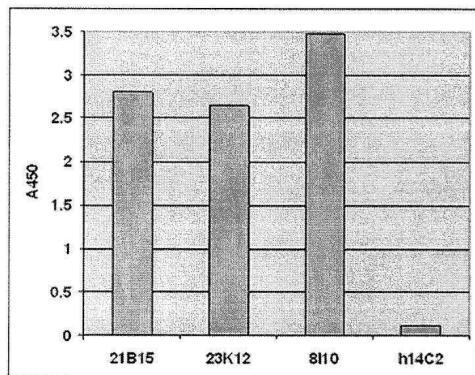


도면8

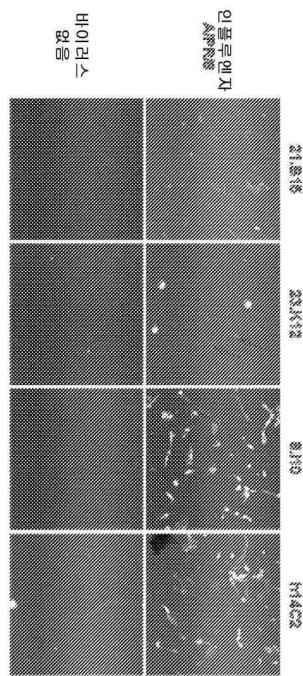
SPDQ M2e mAb는 M2e의
매우 보존된 N-말단 영역에 결합하는
것으로 보인다



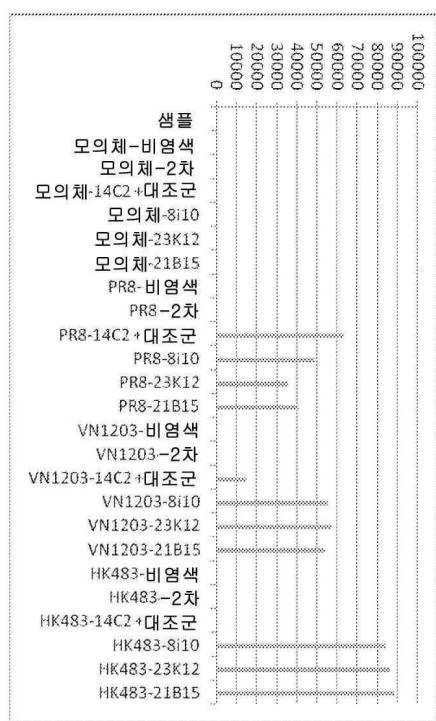
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Spaltudaq Corporation

Grandea, Andres G III

King, Gordon

Cox, Thomas

Olsen, Ole

Mitcham, Jennifer

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE THERAPY AND DIAGNOSIS

OF

INFLUENZA

<130> 37418-503001W0

<140> PCT/US 08/083265

<141> 2008-11-12

<150> 60/987353

<151> 2007-11-12

<150> 60/987355

<151> 2007-11-12

<150> 61/053840

<151> 2008-05-16

<150> 61/095208

<151> 2008-09-08

<160> 114

<170>

PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Lys Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 5

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 6

Met Ser Phe Leu Pro Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 7

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asn

20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 8

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Lys Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 9

Met Ser Phe Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 10

Met Ser Leu Pro Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly

1

5

10

15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 11

Met Ser Leu Leu Pro Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1

5

10

15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 12

Met Ser Leu Leu Pro Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Gly Trp Gly

1

5

10

15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 13

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Gly Ser Ser Asp

20

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 14

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Tyr Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 15

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Tyr Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 16

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Tyr Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 17

Met Ser Phe Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 18

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Arg Asp Ser Ser Asp

20

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 19

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 20

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Ser Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Gly Asp

20

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 21

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 22

Met Ser Leu Pro Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 23

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 24

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Asp Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 25

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 26

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 26

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 27

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 28

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Lys Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 29

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 30

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 30

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asp Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 31

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 32

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 33

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 34

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Lys Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 35

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 35

Met Ser Phe Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 36

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 37

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 37

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Lys Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Asn Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 38

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 39

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 39

Met Ser Leu Leu Thr Gly Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 40

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 40

Met Ser Leu Leu Pro Glu Val Glu Thr His Thr Arg Asn Gly Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 41

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr

1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 42

Ser Leu Leu Thr Glu Val

1 5

<210> 43

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

caggtgcaat tgccaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggttc gtccatcagt aattactact ggagctggat ccggcagtcc 120

ccagggagg gactggagggtt gattgggtt atctattacg gtggaaacac caagtacaat 180
 ccctccctca agagccgcgt caccatataca caagacactt ccaagagtca ggtctccctg 240
 acgatgagct ctgtgaccgc tgccgaatcg gccgtctatt tctgtgcgag agcgtcttgt 300
 agtggtggtt actgtatcct tgactactgg ggccaggaa ccctggcac cgtctcg 357

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Glu Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Arg Ala Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Cys Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115

<210> 45

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	60
atcacttgcc gggcagtc aacatttac aagtattaa attggatca gcagagacca	120

gggaaagccc ctaagggct gatctctgct gcatccgggt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagtgc cagtggttc tggacagat ttcactctca ccatcaccag tctgcaacct	240
gaagatttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtc ccccttcac tttcggcggaa	300
gggaccaggg tggagatcaa ac	322

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 47

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

caggtgcaat tgccaggagtc gggccagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggttc gtccatcgt aattactact ggagctggat cggcagtc	120

ccagggagg gactggagtg gattgggtt atctattacg gtggaaacac caagtacaat 180

ccctccctca agagccgcgt caccatatca caagacactt ccaagagtca ggtctccctg 240
acgatgagct ctgtgaccgc tgccgaatcg gccgtctatt tctgtgcgag agcgtcttgt 300
agtggtggtt actgtatcct tgactactgg ggccaggaa ccctggtcac cgtctcg 357

<210> 48

<211> 322

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

gacatccagg tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60
atcaacttgcc gcgcgagtca gaacatttaa aagtattaa attggatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagggcct gatctctgct gcatccgggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtc cccctctcac tttcggcgg 300
gggaccaggg tggatatcaa ac 322

<210> 49

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

gaggtgcagc tggtgagtc tggggaggc ttggccagc ctgggggtc cctgagaatc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccgtcagt agcaactaca tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatagtg gtggtagcac atactacgca 180

gactccgtga agggcagatt ctcctctcc agagacaact ccaagaacac agtgtttctt 240
caaataaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag atgtctgagc 300
aggatgcggg ttacggttt agacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcg 357

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn			
20	25	30	

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

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

<210> 51		
<211> 318		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 51		
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	60	
atcacttgcc ggacaagtca gagcatttagc agctattaa attggtatca gcagaaacca	120	
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagg tgcaaagtgg ggtccatca	180	
aggttcagtg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcgg tctgcaacct	240	

gaagatttg caacctacta ctgtcaacag agttacagta tgcctgcctt tggccagggg	300	
accaagctgg agatcaaa	318	

<210> 52		
<211> 106		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 52		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		

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

<210> 53

<211> 291

<212> DNA

<213> Influenza A virus

<400> 53

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgcct atcagaaacg aatgggggtg cagatgcaac	60
gattcaagtg atcctttgt tggtgccgca agtatcattg ggatcctgca cttgatattg	120
tggattcttg atcgtctttt ttcaaatgc atttacgtc tcttaaaca cggctgaaa	180
agagggcctt ctacggaagg agtaccagag tctatgaggg aagaatatcg aaaggaacag	240
cagagtgcgtg tggatgctga cgatagtcat ttgtcaaca tagagctgga g	291

<210> 54

<211> 404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

aagcttccac catggacatg agggtcctcg ctcaagtccctt gggctccctg ctactctggc	60
tccgagggtgc cagatgtgac atccagatga cccagtcctt atcctccctg tctgcatttg	120
taggagacag agtaccatc acttgccggg cgagtcagaa catttacaag tatttaattt	180
ggtatcagca gagaccaggg aaagccccta agggcctgat ctctgctgca tccgggttgc	240

aaagtgggt cccatcaagg ttcatggca gtggatctgg gacagattc actctacca	300
tcaccagtct gcaacctgaa gatttgaa cttaactactg tcaacagagt tacagtcccc	360
ctctcacttt cggcgaggaccagggtgg agatcaaacg tacg	404

<210> 55

<211> 404

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo sapiens

<400> 55

ttcgaagggt gtacctgtac tcccaggagc gagtcgagga ccccgaggac gatgagaccg	60
aggctccacg gtctacactg taggtctact gggtcagagg taggaggac agacgttagac	120
atccctgtc tcagtggtag tgaacggccc gctcagtctt gtaaatgttc ataaatttaa	180
ccatagtcgt ctctggtccc ttcgggat tcccgacta gagacgacgt aggcccaacg	240
tttcacccca ggtagttcc aagtccacgt cacctagacc ctgtctaaag tgagagtgg	300

agtggtcaga cgttggactt ctaaaacgtt gaatgatgac agttgtctca atgtcagggg	360
gagagtgaaa gcccctccc tggcccacc tctagttgc atgc	404

<210> 56

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Thr Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110
 Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr

130

<210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys

20

<210> 58

<211> 23

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

1 5 10 15

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Ala Ser Gly Leu Gln Ser

1 5

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Gln Ser Tyr Ser Pro Pro Leu Thr

1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 65

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 65

tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga cccaaagctgg cttagcgttta aacttaagct	60
tccaccatgg acatgagggt cctcgcttag ctccctgggc tcctgctact ctggctccga	120

gggtgccagat gtgacatcca gatgacccag tctccatcct ccctgtctgc atctgttagga	180
---	-----

gacagagtca ccatacttg ccggcgagt cagaacattt acaagttttt aaattggat	240
--	-----

cagcagagac cagggaaagc ccctaaggc ctgatctcg ctgcattcgg gttgaaagt	300
--	-----

ggggtcccat caaggttcag tggcgttggaa tctgggacag atttactt caccatcacc	360
--	-----

agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcaac agagttacag tcccccttc	420
--	-----

actttcgccg gagggaccag ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtttc	480
--	-----

atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctgaaactg cctctgttgcgtg	540
--	-----

aataacttct atcccaagaga ggc当地aaagta cagtgaaagg tggataacgc cctccaaatcg	600
--	-----

ggtaactccc aggagagtgt cacagacgcg gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	660
---	-----

agcacccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	720
--	-----

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagttca acaggggaga gtgttagagg	780
--	-----

gtcttagaggg cccgtttaaa	800
------------------------	-----

<210> 66

<211> 800

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo

sapiens

<400> 66

agctttaatt atgctgatgt atatccctt gggatcgacc gatgc当地aaat ttgaattcga	60
aggtggtaacc tggactccca ggagcgatc gaggaccccg aggacatga gaccgaggct	120

ccacggtcta cactgttagt ctactggtc agaggttagga gggacagacg tagacatcct	180
ctgtctcagt ggtagtgaac ggcgcgtca gtctgtaaa tttcataaa tttaaccata	240
gtcgctctg gtcccttcg gggattcccg gactagagac gacgtaggcc caacgttca	300
ccccaggta gtccaaatc accgtcacct agaccctgtc taaagtgaga gtggtagtgg	360
tcagacgtt gacttctaaa acgttgaatg atgacagttg tctcaatgtc agggggagag	420

tgaaagccgc ctccctggc ccacctctag tttgcattgc accgacgtgg tagacagaag	480
tagaaggcg gtagactact cgtcaacttt agaccttgc ggagacaaca cacggacac	540
ttattgaaga tagggctctt ccgggttcat gtcacccatc acctattgcg ggaggtagc	600
ccatgtggg tcccttcaca gtgtctcgic ctgtcgatcc tgcgtggat gtcggagtcg	660
tcgtggact gcgactcggt tcgtctgatc ctcttgcgtt ttcagatgcg gacgtttag	720
tggtagtcc cgactcgag cggcagtgt ttctcgaagt tgccttcata cacaatctcc	780
cagatctccc gggcaaaattt	800

<210> 67

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 67

aagcttccac catgaaacac ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagctggg	60
tcctgtccca ggtcaattt caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct tcggagaccc	120
tgtccctcac ctgcactgtc tctggttcg tccatcgataa ttactactgg agctggatcc	180
ggcagtcccc agggaggga ctggagtgga ttgggttat ctattacggt gaaacacca	240
agtacaatcc ctccctcaag agccgcgtca ccatatcaca agacacttcc aagagtcagg	300
tctccctgac gatgagctt gtgaccgctg cggaaatcgcc cgtctatttc tgtgcgagag	360

cgtctttag tggtggttac tgtatccttg actactgggg ccagggaaacc ctggtcaccg	420
tctcgag	427

<210> 68

<211> 427

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo

sapiens

<400> 68

ttcgaagggtg gtactttgtg gacaccaaga aggaagagga ccaccgtcga gggtcgaccc 60
 aggacaggggt ccacgttaac gtcttcagcc cgggtcctga ccacttcgga agcctctggg 120
 acagggagtg gacgtgacag agaccaagca ggtagtcatt aatgtatgacc tcgacacctagg 180

ccgtcagggg tcccttcct gacctcacct aacccaaata gataatgcca cctttgtgg 240
 tcatgttagg gaggaggttc tcggcgact ggtatagttt tctgtgaagg ttctcagtc 300
 agagggactg ctactcgaga cactggcgac gccttagccg gcagataaag acacgcttc 360
 gcagaacatc accaccaatg acataggaac tcatgacccc ggtcccttgg gaccagtggc 420
 agagctc 427

<210> 69

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

65	70	75	80												
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Gln	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Gln
85	90	95													
Val	Ser	Leu	Thr	Met	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Val	Tyr
100	105	110													
Phe	Cys	Ala	Arg	Ala	Ser	Cys	Ser	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ile	Leu	Asp	Tyr
115	120	125													
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser						
130	135														

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Asn Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

1 5 10

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

1 5 10 15

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

1 5 10 15

Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Glu Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Ser Cys Ser Gly Gly Tyr Cys Ile Leu Asp

1 5 10

<210> 77

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

1 5 10

<210> 78

<211> 1557

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 78

tggcttatcg aaattaatac gactcaactat agggagaccc aagctggcta gcgtttaac 60
 ttaagctcc accatgaaac acctgtggtt cttcccttc ctggtggcag ctcccagctg 120
 ggtcctgtcc caggtgcaat tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcgagac 180
 cctgtccctc acctgtcaactg tctctggttc gtccatcagt aattactact ggacgtggat 240

ccggcagtcc ccagggaagg gactggagtg gattgggtt atctattacg gtggaaacac 300
 caagtacaat ccctccctca agagccgcgt caccatatca caagacactt ccaagagtca 360
 ggtctccctg acgtgagct ctgtgaccgc tgccgaatcg gccgtctatt tctgtgcgag 420
 agcgtcttgt agtggtggtt actgtatcct tgactactgg ggccaggaa ccctggtcac 480
 cgtctcgaga gccicccacca agggcccaatc ggtctcccc ctggcacccct cctccaagag 540
 cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccgg 600
 gacggtgtcg tggacttag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtcct 660

acagtccctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg 720
 caccaggacc tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag 780
 agttgagccc aaatcttgc aaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact 840
 cctgggggga ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc 900
 ccggaccctt gaggtcacat cgtggtggtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa 960
 gttcaactgg tacgtggacg cgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga 1020
 gcagttacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct 1080

gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctccagccc ccacgcgagaa 1140
 aaccatctcc aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc 1200
 ccggaggag atgaccaaga accaggttag cctgaccctgc ctggtcaaag gcttctatcc 1260
 cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac 1320
 gcctccctg ctggactccg acggctcctt ctccctat agcaagctca ccgtggacaa 1380
 gagcaggtagg cagcaggaga acgtttctc atgctccgt atgcattgagg ctgtgcacaa 1440
 ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tgagttctag agggcccg 1500

taaaccggct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgttgc 1557

<210> 79

<211> 1557

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo

sapiens

<400> 79

accgaatgc ttaattatg ctgagtgata tccctctgg ttcgaccgat cgcaaatttg	60
aattcgaagg tggtaacttgc tggacaccaa gaaggaagag gaccaccgtc gagggtcgac	120
ccaggacagg gtccacgtta acgtcctcg cccgggtcct gaccacttcg gaaggctctg	180
ggacagggag tggacgtgac agagaccaag caggtagtc ttaatgtga cctcgaccta	240
ggccgtcagg ggtcccttcc ctgacctac ctaacccaa tagataatgc caccttgc	300
gttcatgtta gggagggagt tctcgccga gtggatagt gttctgtgaa gtttctcagt	360
ccagagggac tgcgtactcga gacactggcg acgccttagc cggcagataa agacacgtc	420
tcgcagaaca tcaccaccaa tgacatagga actgtatgacc ccggccctt gggaccagt	480
gcagagctc cggaggtgg tccgggttag ccagaagggg gaccgtggg ggaggttctc	540
gtggagaccc ccgtgtcgcc gggacccgac ggaccagttc ctgtatgaaagg ggcttggcca	600
ctgcacacgc accttgatgc cgcggactg gtgcggcac gtgtgaaagg gcccacagga	660
tgtcaggagt cctgagatga gggagtcgtc gcaccactgg cacggaggt cgtcgaaacc	720
gtgggtctgg atgtagacgt tgcacttagt gttcgggtcg ttgtggttcc acctgttctc	780
tcaactcggg tttagaacac tgggttggat gtgtacgggt ggcacgggtc gtggacttga	840
ggacccccc ggcagtccaga aggagaaggg ggggttggg ttctgtggg agtactagag	900
ggccctggga ctccagtgtta cgcaccacca cctgcactcg gtgcctctgg gactccagtt	960
caagttagacc atgcacctgc cgcacccca cgtattacgg ttctgttgc ggccttctc	1020
cgtcatgttg tctgtcatgg cacaccatgc gcaggagttt caggacgtgg tcctgaccga	1080
cttaccgttc ctcatgttca cgttccagag gttgtttcg gagggtcg ggttagctt	1140
ttggtagagg ttccgggttc ccgtcgccgc tcttgggtgc cacatgtgg acggggtag	1200
ggcccttctc tacgttct tggccatgc ggactggacg gaccatgttc cgaagatagg	1260
gtcgctgttag cggcacctca ccctctcgat acccgtcgcc ctcttggat ttgttctgg	1320
cgagggtgcac gacccgtggc tgccgaggaa gaaggagata tcgttgcgtt ggcacccgtt	1380
ctcgccacc gtcgtccct tgcagaagag tacgaggac tacgtactcc gagacgttt	1440
ggtagatgtgc gtcttctcg gagggtgcac agggccattt actcaagatc tcccgccaa	1500
atttgggcga ctatcgag ctgacacggaa agatcaacgg tcggtagaca acaaacg	1557
<210> 80	
<211> 11	
<212> PRT	

<213> Homo sapiens

<400> 80

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Cys Thr Cys Gly Ala Gly

1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg

1 5 10

<210> 83

<211> 404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

aagcttccac catggacatg agggtcctcg ctcagctcct ggggctcctg ctactctggc	60
tccgagggtgc cagatgtgac atccaggtga cccagtctcc atcctccctg tctgcatctg	120
taggagacag agtcaccatc acttgccgcg cgagtcagaa catttacaag tatttaatt	180
ggtatcagca gagaccaggg aaagcccta agggcctgat ctctgctgca tccgggttgc	240
aaagtgggtt cccatcaagg ttcatggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca	300
tcaccagtct gcaacctgaa gatttgcaa cttactactg tcaacagagt tacagtcccc	360

ctctcacttt cggcgaggaccagggtgg atatcaaacg tacg	404
---	-----

<210> 84

<211> 404

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo

sapiens

<400> 84

ttcgaaggtg gtacctgtac tcccaggagc gagtcgagga ccccgaggac gatgagaccg	60
aggctccacg gctcacactg taggtccact gggtcagagg taggaggggac agacgttagac	120
atcctctgtc tcagtggtag tgaacggcgc gctcagtctt gtaaatgttc ataaattaa	180
ccatagtctg cttctggccc tttcgggat tcccggacta gagacgacgt aggcccaacg	240

tttacccca gggtagttcc aagtccacgt cacccatgacc ctgtctaaag tgagagtgg	300
agtggtcaga cgttggactt ctaaaacgtt gaatgtatgac agttgtctca atgtcagggg	360
gagagtgaaa gccgcctccc tggtcccacc tatagttgc atgc	404

<210> 85

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

aagcttccac catgaaacac ctgtggttct tccttcctt ggtggcagct cccagctggg	60
tcctgtccca ggtcaattt caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct tcggagaccc	120
tgtccctcac ctgcactgtc tctggttcg tccatcgataa ttactactgg agctggatcc	180

ggcagtcccc agggaaaggga ctggagtgga ttgggttat ctattacggt gaaacaccca	240
agtacaatcc ctccctcaag agccgcgtca ccatatcaca agacacttcc aagagtcagg	300
tctccctgac gatgagctct gtgaccgctg cgaaatcggc cgtctatttc tgtgcgagag	360
cgtttttag tggtggttac tgtatcctt actactgggg ccaggaaacc ctggtcaccc	420
tctcgag	427

<210> 86

<211> 427

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo

sapiens

<400> 86

ttcgaaggtg gtactttgtg gacaccaaga aggaagagga ccaccgtcga gggtcgaccc	60
---	----

aggacagggt ccacgttaac gtcctcagcc cgggtctga ccacttcgga agcctctggg	120
acagggagt gacgtgacag agaccaagca ggtagtcatt aatgatgacc tcgacctagg	180
ccgtcagggg tccctccct gacctcacct aacccaaata gataatgcc a ctttgtggt	240
tcatgtiagg gagggagttc tcggcgcagt ggtatagtgt tctgtgaagg ttctcagtc	300
agagggactg ctactcgaga cactggcgac gccttagccg gcagataaag acacgcttc	360
gcagaacatc accaccaatg acataggaac tcatgacccc gttcccttgg gaccagtggc	420
agagctc	427
<210> 87	
<211> 427	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 87	
aagttccac catgaaacac ctgtggttct tccttctcct ggtggcagct cccagctggg	60
tcctgtccca ggtgcaattt caggagtcgg gcccaggact ggtgaagcct tcggagaccc	120
tgtccctcac ctgcactgtc tctggttcg t ccatcgtaa ttactactgg agctggatcc	180
ggcagtcccc agggaaaggga ctggagtgga ttgggttat ctattacggt ggaaacacca	240
agtacaatcc ctccctcaag agccgcgtca ccatatcaca agacacttcc aagagtcagg	300
tctccctgac gatgagctct gtgaccgctg cggaatcgcc cgtctatttc tgtgcgagag	360
cgtctttagt tggtggttac tgtatccttg actactgggg ccagggaaacc ctggtcaccc	420
tctcgag	427
<210> 88	
<211> 401	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 88	
aagttccac catggacatg agggtcctcg ctca gctcct ggggctcctg ctactctggc	60
tccgagggtgc cagatgtgac atccagatga cccagtc tccatccctg tctgcaccc	120
taggagacag agtaccatc acttgccgga caagt cagag cattagcagc tatttaatt	180
ggtatcagca gaaaccaggaa aagccccata aactcctgat ctatgctgca tccagttgc	240
aaagtgggtt cccatcaagg ttca gttggca gtggatctgg gacagatttc actctcacca	300
tcagcggtct gcaacctgaa gat tttgca a cctactactg tcaacagagt tacagttatgc	360
ctgccttgg ccaggggacc aagctggaga tcaa acgtac g	401

<210> 89

<211> 401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo sapiens

<400> 89

ttcgaagggtg gtacctgtac tcccaggagc gagtcgagga ccccgaggac gatgagaccg 60

```

aggctccacg gctcacactg taggtctact gggtcagagg taggagggac agacgtagac 120
atcctctgtc tcagtggtag tgaacggcct gttcagtctc gtaatcgtcg ataaattaa 180
ccatagtcgt ctgggtccc ttccgggat ttgaggacta gatacgcgtt aggtcaaacg 240
tttcacccca gggtagttcc aagtcaccgt cacctagacc ctgtctaaag tgagagtgg 300
agtccgcaga cgttggactt ctaaaacgtt ggatgtgac agttgtctca atgtcatacg 360
gacggaaacc ggtccctgg ttgcacctct agttgcatt c 401

```

<210> 90

<211> 401

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 90

```

aagcttccac catggacatg agggtcctcg ctcaatcctt ggggctccctg ctactctggc 60
tccgagggtgc cagatgtgac atccagatga cccagtcctcc atcctccctg tctgcattcg 120
taggagacag agtcaccatc acttgcggaa caagtcagag catttcgcattttaaatt 180
ggtagtcgtca gaaaccaggaa aagccctta aacttcgtat ctatgtcgat tccagttgc 240
aaagtgggtt cccatcaagg ttcaatggca gtggatctgg gacagatttc acttcacca 300
tcagcgtctt gcaacctgaa gatttgcaa cctactactg tcaacagatg tacatgtgc 360
ctgccttgg ccagggacc aagctggaga tcaacgtac g 401

```

<210> 91

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

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

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

115	120	125	
Arg Thr			

130			
<210>	92		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	92		

Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

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

<210>	93		
<211>	15		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	93		

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

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

<210>	94		
<211>	13		

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

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

1 5 10

<210> 95

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

1 5 10 15

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Ala

1 5

<210> 97

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

aagttccac catggagttg gggctgtgct gggtttcct tggcgttatt ttaaaagggtg	60
tccagtgta ggtgcagctg gtggagtcg ggggaggctt ggtccagcct ggggggtccc	120
tgagaatctc ctgtgcagcc tctggattca ccgtcagtag caactacatg agttgggtcc	180
gccaggctcc aggaaagggg ctggagtggt tctcgttat ttatagtggt ggttagcacat	240
actacgcaga ctccgtgaag ggcagattct ctttcctccag agacaactcc aagaacacag	300
tgtttttca aatgaacacgc ctgagagccg aggacacggc tgtgttattac tgtgcgagat	360

gtctgaggcag gatgcggggt tacggtttag acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg 420
tctcgag 427
<210> 98
<211> 427
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-sense strand, orientation 3' to 5', sequence from Homo
sapiens 120
<400> 98
ttcgaagggt gtagccaaac cccgacacgaa cccaaaaggg acaacgataa aattttccac 60
agggtcacact ccacgtcgac cacctcgac cccctccgaa ccaggtcgga ccccccaggg 120
actcttagag gacacgtcggt agacctaagt ggcagtcatc gttgtatgtac tcaaccagg 180

cggtccgagg tccctcccc gacctcaccc agagtcaata aatatcacca ccatcgta 240
tgatgcgtct gaggcacttc ccgtctaaga ggaagagggtc tctgttgagg ttcttgttc 300
acaaagaagt ttacttgtcg gactctcgcc tccctgtgccc acacataatg acacgtcta 360
cagactcgta ctacgccccca atgc当地atc tgca gaccccc ggttccctgg tgccagtg 420
agagctc 427
<210> 99
<211> 422
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 99
aagttccac catggagttt gggctgtgct gggtttctt tttgttatt ttaaaaggtg 60

tccagtgtga ggtgcagctg gtggagtctg gggaggctt ggtccagcct ggggggtccc 120
tgagaatctc tggcgtccct ctggattcac cgtcgtac aactacatga gttgggtccg 180
ccaggctcca gggaaaggct gggtgggtc tcaatgtttt atagtgggtgg tagcacatc 240
tacgcagact ccgtgaagg agattctct tctccagaga caactccaag aacacagtgt 300
ttcttcaat gaacagcctg agagcgagga cacggctgtg tattactgtg cgagatgtct 360
gagcaggatg cgggttacg gtttagacgt tggggccaag ggaccacggt caccgtctcg 420
ag 422

<210> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Cys Leu Ser Arg Met Arg Gly Tyr Gly Leu Asp Val

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

130 135

<210> 101

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 102

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Asn Tyr Met Ser

1 5

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1 5 10

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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

1 5 10 15

<210> 106

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

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

1	5	10	15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
20	25	30	
Arg			

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 107

Cys Leu Ser Arg Met Arg Gly Tyr Gly Leu Asp Val			
1	5	10	

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 108

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
1	5	10	

<210> 109
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 109

Gly Ser Ser Ile Ser Asn			
1	5		

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110			
Phe Ile Tyr Tyr Gly Gly Asn Thr Lys			
1	5		

<210> 111

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gly Ser Ser Ile Ser Asn

1 5

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr

1 5

<210> 114

<211

> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10