



공개특허 10-2020-0067145



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0067145
(43) 공개일자 2020년06월11일

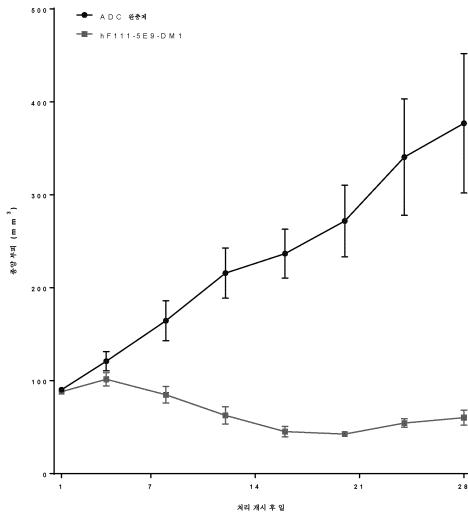
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01) **C07K 16/30** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) **G01N 33/573** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 47/6803 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2020-7010151
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월10일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년04월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2018/051108
- (87) 국제공개번호 WO 2019/051586
국제공개일자 2019년03월21일
- (30) 우선권주장
62/557,870 2017년09월13일 미국(US)
- (71) 출원인
내셔널 리서치 카운실 오브 캐나다
캐나다 온타리오 케이1에이 0알6 오타와 몬트리올
로드 1200
- (72) 발명자
헨리, 케빈
캐나다 케이1지 0이6 온타리오 오타와 리버사이드
드라이브 804-1725
자라밀로, 마리아 루즈
캐나다 에이치4피 2알2 케벡 몬트리올 룸 엘-142
로얄마운트 애비뉴 6100 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 AXL-특이적 항체 및 그의 용도

(57) 요약

모노클로날 및 단일 도메인 항체를 비롯한 AXL-특이적 항체 및 그에 대한 용도가 기재된다. 이러한 항체는 AXL 엑토도메인의 이뮤노글로불린-유사 (IgL) 도메인에서의 에피토프에서 세포 표면 발현된 인간 AXL에 결합한다. 항체는 항체-약물 접합체 (ADC)에, 예를 들어 암의 치료, 검출 또는 스테이징에 사용될 수 있다. 항체는 이중파라토프성일 수 있다.

대 표 도 - 도18

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)

A61K 47/6851 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/71 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

G01N 33/543 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/22 (2013.01)

(72) 발명자

메켄지, 콜린 로저

캐나다 케이1제이 6케이9 온타리오 오타와 하멜린

크레센트 2195

마르실, 안

캐나다 에이치9제이 2에이6 퀘벡 피에르폰즈 류 그
리어 4801

명세서

청구범위

청구항 1

인간 AXL 엑토도메인 (ECD)의 이뮤노글로불린-유사 (IgL) 도메인에서의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리되거나 정제된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, AXL ECD가 서열식별번호:71의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 에피토프가 AXL의 IgL1 또는 IgL2에 위치하는 것인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, AXL 발현 종양 세포 내로 내재화가 가능한 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 단일 도메인 항체, 모노클로날 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중파라토프성 항체, 이중특이적 항체, 또는 그의 AXL-결합 항체 단편인 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 키메라 항체가 인간 IgG1로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 키메라 항체가 인간 카파 경쇄 및 인간 IgG 중쇄로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM으로부터의 프레임워크 영역을 포함하는 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 전장 IgG, Fv, scFv, Fab, 또는 F(ab')2, VH, VL, 또는 VH를 포함하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 인간 AXL 엑토도메인에 대해 ≤ 50 nM의 평형 해리 상수 (K_d)를 갖는 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, AXL ECD의 IgL 도메인에서의 에피토프에의 결합이 AXL에의 성장 정지-특이적 6 (Gas6) 리간드의 결합과 경쟁하지 않는 것인 항체.

청구항 12

서열식별번호 (SEQ ID NO):98, 99, 및 100;

서열식별번호:92, 93 및 94;

서열식별번호: 110, 111, 및 112;

서열식별번호:86, 87, 및 88;

서열식별번호:80, 81, 및 82;

서열식별번호: 104, 105, 및 106;

서열식별번호: 116, 117, 및 118; 및

그와 실질적으로 동일한 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 13

서열식별번호:38;

서열식별번호:40

서열식별번호:42

서열식별번호:44

서열식별번호:46

서열식별번호:74

서열식별번호:76; 및

그와 실질적으로 동일한 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 14

서열식별번호:95, 96, 및 97;

서열식별번호:89, 90 및 91;

서열식별번호: 107, 108, 및 109;

서열식별번호:83, 84, 및 85;

서열식별번호:77, 78, 및 79;

서열식별번호: 101, 102, 및 103;

서열식별번호: 113, 114, 및 115; 및

그와 실질적으로 동일한 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 15

서열식별번호:39;

서열식별번호:41;

서열식별번호:43;

서열식별번호:45;

서열식별번호:47;

서열식별번호:73;

서열식별번호:75; 및

그와 실질적으로 동일한 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,
 VL, 서열식별번호:98 내지 100; 및 VH, 서열식별번호:95 내지 97;
 VL, 서열식별번호:92 내지 94; 및 VH, 서열식별번호:89 내지 91;
 VL, 서열식별번호: 110 내지 112; 및 VH, 서열식별번호: 107 내지 109;
 VL, 서열식별번호:86 내지 88; 및 VH, 서열식별번호:83 내지 85;
 VL, 서열식별번호:80 내지 82; 및 VH, 서열식별번호:77 내지 79;
 VL, 서열식별번호: 104 내지 106; 및 VH, 서열식별번호: 101 내지 103;
 VL, 서열식별번호: 116 내지 118; 및 VH, 서열식별번호: 113 내지 115; 및
 그와 실질적으로 동일한 서열
 로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VL) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 및 (VH) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서
 열을 포함하는 항체, 또는 그의 단편.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,
 서열식별번호: 127, 128, 및 129;
 서열식별번호: 130, 131, 및 132;
 서열식별번호: 133, 134, 및 135;
 서열식별번호: 136, 137, 및 138;
 서열식별번호: 139, 140, 및 141;
 서열식별번호: 142, 143, 및 144;
 서열식별번호: 145, 146, 및 147;
 서열식별번호: 148, 149, 및 150; 및
 그와 실질적으로 동일한 서열
 로 이루어진 군으로부터 선택되는 단일 도메인 (sd) 중쇄 가변 (VHH) 도메인 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함
 하는 항체, 또는 그의 단편.

청구항 18

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQAPGKQRELVAITLDIA
NYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMDSLKPEDTARYHCAAFQSDQNYWGQGTQVT
VSS (SEQ ID NO:119);

QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFRQAPEKVRDFVGFITNSG
NLYDDSVKGRFTISRDNAQNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKWSFSSGYGDLRRA
AMYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:120);

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDYTAIGWFRQAPGKERELVAITSGGN
TDYAESAKGRFRISRDNSKNTIYLQMNSLKPEDTGYYYCAARRGGARGEYDYWDQ
GTQVTVSS (SEQ ID NO:121);

QVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAFSRGAFDTYEIGWFRQAPGKEREFVAAVTRNG
DSVYADSLKARFTASRNNAVNNTAYLHMNILQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADD
YADWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:122);

QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISSINTIGWFRQAPGKQRELVAASDSGAN
RNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIYYCRAWGTGTISTMYWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO:123);

QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASESIFGFNTMGWYRQAPGNERELVYSISNSKR
TMYADSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNNLKPEDTAVYYCRAWGIITSATVYWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO:124);

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRVSSAVMAWFRQAPEKERDFVGFISNSG
SVYYDDSVKGRFTISRDNAQNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTW
GQGTQVTVSS (SEQ ID NO:125);

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSGMINTMGWYRQAPGKQRELVARRSTG
GTTNYADSVKGRFTISRDANNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTW
GQGTQVTVSS (SEQ ID NO:126);

및 그와 실질적으로 동일한 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 단일 도메인 (sd) 중쇄 가변 (VHH) 도메인 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 19

서열식별번호:39의 VH, 및 서열식별번호:38의 VL;

서열식별번호:41의 VH, 및 서열식별번호:40의 VL;

서열식별번호:43의 VH, 및 서열식별번호:42의 VL;

서열식별번호:45의 VH, 및 서열식별번호:44의 VL;

서열식별번호:47의 VH, 및 서열식별번호:46의 VL;

서열식별번호:73의 VH, 및 서열식별번호:74의 VL;

서열식별번호:75의 VH, 및 서열식별번호:76의 VL;

서열식별번호: 119의 VHH;

서열식별번호: 120의 VHH;

서열식별번호: 121의 VHH;

서열식별번호: 122의 VHH;

서열식별번호: 123의 VHH;

서열식별번호: 124의 VHH;

서열식별번호: 125의 VHH;

서열식별번호: 126의 VHH; 및

그와 85% 이상 동일성을 갖는 서열

로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 그의 단편.

청구항 20

제19항에 있어서, 서열 동일성이 $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, 또는 $\geq 98\%$ 인 항체 또는 단편.

청구항 21

제1항에 있어서, 서열식별번호: 1, 2, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호: 3, 4, 및 5의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하며, 항체가 AXL의 IgL1 도메인에서의 에피토프에 결합하고, IgL2 도메인에서는 그렇지 않은 것인 항체.

청구항 22

제1항에 있어서, 서열식별번호: 1, 6, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호: 7, 8, 및 5의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하며, 항체가 AXL의 IgL1 도메인에서의 에피토프에 결합하고, IgL2 도메인에서는 그렇지 않은 것인 항체.

청구항 23

제1항에 있어서, 서열식별번호: 9, 10, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호: 12, 13, 및 14의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 항체.

청구항 24

제1항에 있어서, 서열식별번호: 15, 16, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호: 17, 18, 및 19의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, AXL 결합에 대해 Gas6과 경쟁하지 않는 항체.

청구항 26

제5항에 있어서, 항체가 이중파라토프성이고, sdAb001/005 또는 sd Ab 001/006을 포함하는 것인 항체.

청구항 27

약물 모이어티에 접합된 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC).

청구항 28

제27항에 있어서, 약물 모이어티가 항암 약물인 항체 약물 접합체.

청구항 29

제27항에 있어서, 약물 모이어티가 DM1인 항체 약물 접합체.

청구항 30

제22항의 ADC 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 31

제1항에 따른 항체, 및 인간 IgG1 Fc를 포함하는 융합 단백질.

청구항 32

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 33

제32항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 34

제33항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 재조합 미생물 숙주 세포이거나 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 36

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 세포가 제1항의 항체를 생산하는 것인 숙주 세포.

청구항 37

제1항의 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 유기체.

청구항 38

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 표면 상으로 고정화되는 것인 항체.

청구항 39

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 화물 분자에 연결되는 것인 항체.

청구항 40

제39항에 있어서, 화물 분자가 검출제, 치료제, 약물, 펩티드, 효소, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 그의 항체, 화학적 화합물, 탄수화물 모이어티, DNA-기재 분자, 세포독성제, 또는 바이러스 벡터인 항체.

청구항 41

제39항에 있어서, 화물 분자가 크기가 약 1 kDa 내지 약 500 kDa인 항체.

청구항 42

제40항에 있어서, 화물 분자가 1종 이상의 리포솜 또는 나노운반체에 로딩되는 것인 항체.

청구항 43

제42항에 있어서, 나노운반체가 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자 점을 포함하는 것인 항체.

청구항 44

제40항에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노바이러스성, 렌티바이러스성 또는 레트로바이러스성인 항체.

청구항 45

제40항에 있어서, DNA-기재 분자가 안티-센스 올리고뉴클레오티드, 마이크로RNA, siRNA, 또는 플라스미드를 포함하는 것인 항체.

청구항 46

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 화물 분자가 세포독성제인 항체.

청구항 47

- a) 샘플을 검출제에 연결된 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 1종 또는 1종 초과의 단리되거나 정제된 항체와 접촉시키고;
- b) 샘플에서 AXL에 결합된 그의 항체에 연결된 검출제를 검출하는 것을 포함하는, AXL을 검출하는 시험관내 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 방법이 순환 세포에서 AXL을 검출하고, 샘플이 혈청 샘플인 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 검출 단계가 광학 영상화, 면역조직화학, 분자 진단 영상화, 또는 ELISA를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 50

- a) 검출제에 연결된 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 1종 이상의 항체를 대상체에게 투여하고;
- b) AXL에 결합된 그의 항체에 연결된 검출제를 검출하는 것을 포함하는, 대상체에서 AXL 발현을 검출하는 생체내 방법.

청구항 51

제47항에 있어서, 검출 단계가 PET, SPECT, 또는 형광 영상화를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 52

관심의 분자에 연결된 1종 이상의 제1항의 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 항체가 관심의 분자를 AXL을 발현하는 대상체의 세포에 전달하는 것인, 관심의 분자를 AXL을 발현하는 세포 내로 수송하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 관심의 분자가 검출제, 치료제, 약물, 펩티드, 효소, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 그의 항체, 화학적 화합물, 탄수화물 모이어티, DNA-기재 분자, 세포독성제, 또는 바이러스 벡터인 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 관심의 분자가 1종 이상의 리포솜 또는 나노운반체 상에 로딩되는 것인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 나노운반체가 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자 점을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 관심의 분자가 세포독성제를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 세포독성제가 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것인 방법.

청구항 58

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 항암 항체 약물 접합체를 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 59

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 세포 요법, 키메라 항원 수용체 (CAR-T 세포) 요법, 또는 종양용해성 바이러스를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 60

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 항암 항체 약물 접합체를 포함하는 의약의 제조를 위한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 61

암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 항암 항체 약물 접합체의 용도.

청구항 62

세포 요법, 키메라 항원 수용체 (CAR-T 세포) 요법, 또는 종양용해성 바이러스의 제조를 위한 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

이 출원은 2017년 9월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/557,870호의 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

분야

[0004]

본 개시내용은 AXL-특이적 항체 및 그의 용도에 관한 것이다. 이러한 항체는 세포 표면 발현된 인간 AXL에 결합하며, 융합물에 또는 항체-약물 접합체에 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005]

AXL은 Tyro3- AXL -Mer (TAM) 수용체 티로신 키나제 서브페밀리의 구성원이다. AXL 도메인 구조의 개략도를 도 1의 선행 기술 예시에 나타낸다. AXL 단백질 (100)의 세포외 도메인은 지시된 액손 (1 내지 20)과 함께 나타내어진다. AXL 단백질 (100)은 2개의 이류노글로불린-유사 도메인 (102) 및 2개의 피브로넥틴 유형 III (FNIII) 반복부 (104)를 포함한다. 막횡단 도메인 (106)은 세포막, 이어서 세포내 키나제 도메인 (108)에 걸친다. 스플라이싱 (110에서 지시됨)은 약간 더 짧은 전사체를 생성한다.

[0006]

성장 정지-특이적 6 (Gas6)에의 AXL 세포외 도메인의 결합 후에, 비타민 K-의존성 단백질, AXL은 다수의 세포 유형에서 성장, 이동, 응집, 및 항-염증을 비롯한 몇몇 세포 기능에 관여하는 신호를 전달할 수 있다 (Holland et al., 2005; Li et al., 2009). AXL은 원래 만성 골수성 백혈병에서 종양유전자로서 확인되었다 (O'Bryan et al., 1991). 이어서, AXL의 발현은 유방, 위, 전립선, 난소, 및 폐를 비롯한 다양한 암에서 상향조절되는 것으로 보고되었다 (Linger et al., 2008; Paccez et al., 2014).

[0007]

AXL은 또한 악성 세포의 침습성 운동성 및 전이와 가깝게 연관된 프로세스인 상피-내지-중간엽 전이에 연루되었다 (Gjerdrum et al., 2010). 더욱이, AXL 발현은 환자 생존과 음성적으로 연관되는 것으로 나타났다 (Linger et al., 2008; Gjerdrum et al., 2010). 몇몇 최근의 연구는 AXL이 몇몇 약물-저항성 암 세포주에서 과발현되고 활성화됨을 보고하였으며 (Asiedu et al., 2014; Meyer et al., 2013; Thomson et al., 2011), 이는 AXL이 화학요법 및 다른 분자적으로 표적화된 요법에 대한 저항성에 있어서 역할을 할 수 있음을 시사한다. AXL 발현은 또한 최근 저산소증 동안 증가되는 것으로 나타났으며 (Rankin et al., 2014), 고형 종양으로서 빈번히 발생

하는 상태는 보다 크고 보다 공격적이 된다. 함께, 이들 데이터는 암에 대한 유망한 진단, 예측, 및 치료 표적으로서의 AXL을 시사한다.

[0008] 유전자 네-아웃 또는 RNAi를 사용한 최근의 연구는 세포주 및 마우스 모델에서 AXL 억제의 치료적 가치를 입증한다. 또한, 보수티닙 (BOSUTINIB)™, 즉, 화이자 인크. (Pfizer Inc.) 제품 번호 PF-5208763을 갖는 SKI-606으로도 공지된 화이자 인크.에 의해 명칭 보수리프 (BOSULIF)™ 하에 판매되는 단백질-티로신 키나제 억제제 (Lee et al., 2014); 카보잔티닙 (CABOZANTINIB)™, 즉, 엑셀릭시스 (Exelixis)에 의해 명칭 코메트릭 (COMETRIQ)™, 제품 번호 XL184 하에 판매되는 티로신 키나제 c-Met 및 VEGFR2의 소분자 억제제 (Yakes et al., 2011); 및 화이자 인크.에 의해 명칭 수텐트 (SUTENT)™, 제품 번호 SU11248 하에 판매되는 수니티닙 (SUNITINIB)™ (Kitagawa et al., 2013)을 비롯한 몇몇 소분자 AXL 억제제가 개발되고 시장화되었다. 이들 약물은 다수의 키나제를 표적화하며, AXL 활성을 그들의 1차 키나제 표적보다 덜 효과적으로 억제한다 (Feneyrolles et al., 2014).

[0009] 현재 AXL의 가장 강력하고 선택적인 억제제 중 하나인 베겐바이오 (BergenBio) (노르웨이 베겐) 및 리겔 파마슈티칼즈 (Rigel Pharmaceuticals) (미국 캘리포니아주 샌 프란시스코)의 BGB324™ (이전에 R428로 공지됨)를 비롯한 다른 소분자 약물은 임상 및 전임상 개발의 초기 단계에 있다. 이는 14 nM의 IC50을 가지며, 시험된 다른 키나제보다 AXL에 대해 상당히 더 선택적인 것으로 나타났지만 (Holland et al., 2010); 이는 여전히 Tie-2, Flt-4, Flt-1, Ret, AbI에 대해 뿐만 아니라 TAM 패밀리, Tyro-3 및 Mer의 다른 구성원에 대해 활성을 나타낸다. 이는 전임상 유방 동물 모델에서 혈관신생 및 전이를 촉진시키는 AXL의 능력을 차단하며 (Holland et al., 2010), 공격적 및 전이성 암의 치료를 위해 2013년에 임상 I상에 들어갔다. 소분자 AXL 억제제의 개발은 AXL 키나제 도메인의 3차원 구조의 부재 하에서 도전하고 있었으며, 오프-타겟 독성에 대한 잠재성은 주요한 문제로 남아 있다.

[0010] 소분자의 단점 중 일부를 회피하기 위해, 항-AXL 항체가 고려될 수 있다. 리 (Li) 등 (2009)은 피하 비-소세포 폐암 (NSCLC) 모델에서 Gas6 결합을 간섭하지 않고, AXL 활성화를 억제하고, AXL 하향조절을 유도하고, 종양 이종이식편의 성장을 감소시킨 AXL에 대한 모노클로날 항체 (12A11)를 개발하였다. 이어서, 예 (Ye) 등 (2010)은 인간 및 뮤린 AXL 둘 다의 세포외 도메인을 인식하고, Gas6 결합을 차단하는 모노클로날 항체 (YW327.6S2)를 개발하였다. 이 항체는 NSCLC 모델 뿐만 아니라 유방암의 동소 전이 모델에서 이종이식편 종양 성장을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, YW327.6S2로의 치료는 NSCLC 종양 성장을 감소시키는 데 있어서 애를로티닙 및 화학요법의 효과를 향상시켰을 뿐만 아니라, 유방암 및 NSCLC 마우스 이종이식편 모델에서 항-VEGF 치료를 가능하게 하였다. 레코네트 (Leconet) 등 (2014)은 Gas6 결합을 간섭하지 않고, AXL 활성화를 억제하고, 세포 표면으로부터의 그의 하향조절을 유도한 항-AXL 모노클로날 항체를 기재하고 있다. 대상 항체는 생체내에서 피하 및 동소 퀘장 종양 이종이식편 둘 다의 성장을 감소시켰다.

[0011] AXL의 활성을 감소시키는 치료 항체의 한 가지 단점은 이들이 민감도의 내재적 결여로 인한 선천적 성질의, 또는 치료의 선택 압력 동안 발생하는 우회 메커니즘으로 인한 획득된 성질의 치료 저항성에 직면할 가능성이 있다는 것이다. 따라서, 보다 적은 오프-타겟 효과를 갖고, 감소되거나 허용되는 독성 및 치료 저항성을 갖는 활성이고 특이적인 AXL 억제제에 대한 필요가 있다.

[0012] 항체-약물 접합체는 항체를 전형적으로 링커를 통해 약물과 조합하는 매우 복잡한 실체이다. 젠맵 에이/에스 (Genmab A/S) (덴마크 코펜하겐) 및 시애틀 제네티克斯 (Seattle Genetics) (미국 워싱턴)에 의해 개발 중인 항체-약물 접합체, 휴맥스 (HUMAX)-AXL-ADC™는 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE)에 접합된 Gas6 결합과 경쟁하지 않는 AXL-특이적 모노클로날 항체를 포함한다. 휴맥스-AXL-ADC™는 1 mg/kg의 단일 용량 후에 NSCLC 이종이식편 모델에서 종양 퇴행을 강력하게 유도하였으며, AXL 발현이 이종인 환자-유래된 이종이식편 모델에서 유사한 효과를 가졌다. Gas6 결합과 경쟁하지 않는 AXL에 결합하는 항체는 국제 특허 공개 WO2016/005593 A1 (브레이지 (Breij) 등)에 기재되어 있다.

[0013] 항-AXL 항체가 강력한 세포독성 약물을 전달하는 데 사용되는 항체-약물 접합체 (ADC) 접근법은 약물에 반응할 가능성이 있는 환자 집단을 증가시킨다. ADC는 심지어 항체에 대한 획득된 저항성의 사건에서 사용될 수 있다.

[0014] 질환 검출, 스테이징 및/또는 요법에 사용하기 위한 AXL-특이적 항체에 대한 필요가 있다.

발명의 내용

[0015] 요약

- [0016] 본 개시내용의 목적은 AXL-특이적 항체를 제공하는 것이다. 항체로도 지칭되는 AXL-특이적 모노클로날 및 단일 도메인 항체 및 항원-결합 단편, 뿐만 아니라 그의 용도가 기재된다. 이러한 AXL-특이적 항체는 세포 표면-발현된 인간 AXL에 결합한다. 항체-약물 접합체 및 융합물이 기재된다.
- [0017] 본 개시내용은 인간 AXL 엑토도메인 (ECD)의 이뮤노글로불린-유사 (IgL) 도메인에서의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리되거나 정제된 항체를 제공한다.
- [0018] 또한, 서열식별번호 (SEQ ID NO):98 내지 100; 서열식별번호:92 내지 94; 서열식별번호:110 내지 112; 서열식별 번호:86 내지 88; 서열식별번호:80 내지 82; 서열식별번호: 104 내지 106; 서열식별번호: 116 내지 118; 및 그 와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0019] 서열식별번호:38; 서열식별번호:40; 서열식별번호:42; 서열식별번호:44; 서열식별번호:46; 서열식별번호:74; 서열식별번호:76; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 본원에서 제공된다.
- [0020] 또한, 서열식별번호:95 내지 97; 서열식별번호:89 내지 91; 서열식별번호: 107 내지 09; 서열식별번호:83 내지 85; 서열식별번호:77 내지 79; 서열식별번호: 101 내지 103; 서열식별번호: 113 내지 115; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0021] 서열식별번호:39; 서열식별번호:41; 서열식별번호:43; 서열식별번호:45; 서열식별번호:47; 서열식별번호:73; 서 열식별번호:75; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 본원에서 제공된다.
- [0022] 또한, 서열식별번호: 119 내지 126; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 단일 도 메인 (sd) 중쇄 가변 (VHH) 도메인 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0023] 또한, 서열식별번호:39의 VH, 및 서열식별번호:38의 VL; 서열식별번호:41의 VH, 및 서열식별번호:40의 VL; 서열 식별번호:43의 VH, 및 서열식별번호:42의 VL; 서열식별번호:45의 VH, 및 서열식별번호:44의 VL; 서열식별번호:47의 VH, 및 서열식별번호:46의 VL; 서열식별번호:73의 VH, 및 서열식별번호:74의 VL; 서열식별번호:75의 VH, 및 서열식별번호:76의 VL; 서열식별번호: 119의 VHH; 서열식별번호:120의 VHH; 서열식별번호: 121의 VHH; 서열식별번호:122의 VHH; 서열식별번호: 123의 VHH; 서열식별번호:124의 VHH; 서열식별번호: 125의 VHH; 서열식 별번호: 126의 VHH; 및 그와 85% 이상 동일성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 그의 단 편이 제공된다.
- [0024] 기재된 항체를 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC), 제약 조성물, 및 융합 단백질이 기재된다. 기재된 항체를 코 딩하는 핵산 분자, 및 이를 포함하는 벡터 또는 숙주 세포가 또한 제공된다.
- [0025] AXL의 시험관내 및 생체내 검출 방법이 기재된다. 관심의 분자를 AXL을 발현하는 세포 내로 수송하는 방법이 기재된다. 항체 약물 접합체를 채용한, 암을 치료하기 위한 기재된 항체의 방법 및 용도가 제공된다.
- [0026] 본 개시내용의 다른 측면 및 특색은 첨부된 도면과 함께 하기 구체적인 실시양태의 설명의 검토 시 관련 기술분 야의 통상의 기술자에게 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 본 개시내용의 실시양태는 이제 단지 예로 첨부된 도면을 참조로 기재될 것이다.
- 도 1 (선행 기술)은 AXL 도메인 구조의 개략적 도시이다.
- 도 2는 A549 세포 생존에 대한 항-AXL mAb의 효과의 결과를 나타낸다.
- 도 3은 H292 세포 상의 세포 표면-발현된 AXL에의 항-AXL mAb의 결합 특성을 측정하는 유동 세포측정 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 4는 H292 종양 세포주, A549 세포주, 인간 유방 선암종 MDA-MB-231 종양 세포주, 및 불멸화 HaCaT 각질세포 세포에서의 세포 생존율에 대한 항-AXL-DM1 접합체의 활성의 결과를 나타낸다.
- 도 5는 인간 AXL 단백질 엑토도메인 (hAXL-ECD) 및 막횡단 도메인의 개략적 도시이다. 도메인 결합은 hAXL-ECD

의 10개의 웹타드 단편에 대해 나타내어진다.

도 6은 항-rhAXL ECD 단일 도메인 항체 (sdAb)의 단리를 위한 전략의 개략적 도시이다.

도 7은 볼드체 밑줄 폰트로 나타내어진, IMGT 정의를 사용한 CDR을 갖는 mAb V_H/V_L 도메인의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 8은 볼드체 밑줄 폰트로 나타내어진, IMGT 정의를 사용한 CDR을 갖는 VHH의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 9는 폐 (H292), 유방 (MDA-MB-231), 난소 (SKOV3) 및 교모세포종 (U87) 세포주에서의 항체 결합 능력을 나타낸다.

도 10은 폐 (NCI-H292), 유방 (MDA-MB-231), 및 난소 (SKOV3) 세포주에서의 항-AXL hIgG 및 sdAb의 결합 특성을 측정하는 유동 세포측정 실험의 결과를 나타낸다.

도 11은 3가지 종양 세포주에서의 hIgG Ab 및 sdAb의 성장 억제 결합 곡선을 나타낸다.

도 12는 H292 세포주에서의 Gas6의 존재 및 부재 하에서의 hIgG-F11-5E9-DM1 및 hIgG-F107-10G1-DM1의 성장 억제 결합 곡선을 나타낸다.

도 13은 SKOV3 세포주에서의 단일파라토프성 모 ADC에 비한 항-AXL 이중파라토프성 구축물 ADC의 성장 억제 결합 곡선을 나타낸다.

도 14는 선택된 시험 항체에 의한 SKOV3 종양-함유 마우스에서의 종양 성장 억제를 나타낸다.

도 15는 선택된 시험 항체에 의한 SKOV3 종양-함유 마우스에서의 종양 성장 억제를 나타낸다.

도 16은 실시예 17에서의 MDA-MB-231-Luc 종양-함유 마우스에서의 종양 성장 측정을 위한 연구 설계 및 시점을 나타낸다.

도 17은 실시예 17에서의 처리 개시후 37일까지의 체중에 대한 hF111-5E9-DM1의 효과를 나타낸다.

도 18은 실시예 17에서의 처리 개시후 28일까지의 종양 성장에 대한 hF111-5E9-DM1의 효과를 나타낸다.

도 19는 실시예 18에서 평가된 FC5Hfc1X0 (양성 대조군), TWIN200-hIgG1 (음성 대조군) 및 7종의 항-AXL sdAb의 Papp 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

상세한 설명

일반적으로, 본 개시내용은 질환, 예컨대 암의 치료, 확인/진단, 및 스테이징/예측에 사용하기 위한 항-AXL 모노클로날 및 단일 도메인 항체를 제공한다.

인간 AXL 엑토도메인 (ECD)의 이谬노글로불린-유사 (IgL) 도메인에서의 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리되거나 정제된 항체가 기재된다. AXL ECD는 예를 들어, 서열식별번호:71의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 항체의 에피토프는 AXL의 IgL1 또는 IgL2에 위치할 수 있다. 항체는 AXL 발현 종양 세포 내로 내재화가 가능할 수 있다.

항체는 단일 도메인 항체, 모노클로날 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중파라토프성 항체, 이중특이적 항체일 수 있거나, 그의 AXL-결합 항체 단편일 수 있다. 항체가 키메라 항체인 경우, 이는 인간 IgG1로부터의 프레임워크 영역을 포함할 수 있으며, 인간 카파 경쇄 및 인간 IgG 중쇄로부터의 프레임워크 영역을 포함할 수 있다. 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM으로부터의 프레임워크 영역을 포함할 수 있다.

항체는 전장 IgG, Fv, scFv, Fab, 또는 F(ab')2, VHH, VL, 또는 VH일 수 있다. 항체는 인간 AXL 엑토도메인에 대해 < 50 nM의 평형 해리 상수 (KD)를 가질 수 있다. 임의로, AXL ECD의 IgL 도메인에서 에피토프에의 결합은 AXL에의 성장 정지-특이적 6 (Gas6) 리간드의 결합과 경쟁하지 않는 것일 수 있다.

항체 또는 단편은 서열식별번호:98, 99, 및 100; 서열식별번호:92, 93 및 94; 서열식별번호: 110, 111, 및 112; 서열식별번호:86, 87, 및 88; 서열식별번호:80, 81, 및 82; 서열식별번호:104, 105, 및 106; 서열식별번호: 116, 117, 및 118; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 가질 수 있다.

- [0034] 항체 또는 그의 단편은 서열식별번호:38; 40; 42; 44; 46; 74; 76; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) 서열을 포함하는 것일 수 있다. 항체 또는 단편은 서열식별번호:95 내지 97; 89 내지 91; 107 내지 109; 83 내지 85; 77 내지 79; 101 내지 103; 113 내지 115; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 서열식별번호:39; 41; 43; 45; 47; 73; 75; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 서열을 포함하는 항체 또는 그의 단편이 기재된다.
- [0036] 항체 또는 그의 단편은 VL, 서열식별번호:98 내지 100 및 VH, 서열식별번호:95 내지 97; VL, 서열식별번호:92 내지 94 및 VH, 서열식별번호:89 내지 91; VL, 서열식별번호: 110 내지 112 및 VH, 서열식별번호:107 내지 109; VL, 서열식별번호:86 내지 88 및 VH, 서열식별번호:83 내지 85; VL, 서열식별번호:80 내지 82 및 VH, 서열식별번호:77 내지 79; VL, 서열식별번호:104 내지 106 및 VH, 서열식별번호: 101 내지 103; VL, 서열식별번호:116 내지 118 및 VH, 서열식별번호: 113 내지 115; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열; 및 (VH) CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 기재된 항체는 서열식별번호: 127 내지 129; 서열식별번호: 130 내지 132; 서열식별번호: 133 내지 135; 서열식별번호:136 내지 138; 서열식별번호: 139 내지 141; 서열식별번호: 142 내지 144; 서열식별번호: 145 내지 147; 서열식별번호: 148 내지 150; 및 그와 실질적으로 동일한 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 단일 도메인 (sd) 중쇄 가변 (VHH) 도메인 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함할 수 있다.
- [0038] 서열식별번호: 119 내지 126; 및 그와 실질적으로 동일한 서열 중 어느 하나로 이루어진 군으로부터 선택되는 단일 도메인 (sd) 중쇄 가변 (VHH) 도메인 서열을 갖는 항체 또는 그의 단편이 기재된다.
- [0039] 서열식별번호:39의 VH, 및 서열식별번호:38의 VL; 서열식별번호:41의 VH, 및 서열식별번호:40의 VL; 서열식별번호:43의 VH, 및 서열식별번호:42의 VL; 서열식별번호:45의 VH, 및 서열식별번호:44의 VL; 서열식별번호:47의 VH, 및 서열식별번호:46의 VL; 서열식별번호:73의 VH, 및 서열식별번호:74의 VL; 서열식별번호:75의 VH, 및 서열식별번호:76의 VL; 및 119 내지 126으로부터의 VHH 서열, 뿐만 아니라 그와 85% 이상 동일성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 또는 그의 단편이 기재된다.
- [0040] 예를 들어, 항체 또는 그의 단편은 본원에 열거된 구체적으로 예시된 서열에 비해 >90%, >95%, 또는 > 98%의 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0041] 기재된 항체는 서열식별번호: 1, 2, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호:3, 4, 및 5의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함할 수 있으며; 여기서, 항체는 AXL의 IgL1 도메인에서의 에피토프에 결합하며, IgL2 도메인에서는 그렇지 않다. 항체는 서열식별번호: 1, 6, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호:7, 8, 및 5의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함할 수 있으며; 여기서, 항체는 AXL의 IgL1 도메인에서의 에피토프에 결합하며, IgL2 도메인에서는 그렇지 않다.
- [0042] 항체는 서열식별번호:9, 10, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호:12, 13, 및 14의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함할 수 있다.
- [0043] 대안적으로, 항체는 서열식별번호: 15, 16, 및 11의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열; 및 서열식별번호: 17, 18, 및 19의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함할 수 있다.
- [0044] 항체는 AXL 결합에 대해 Gas6과 경쟁하지 않는 것일 수 있다.
- [0045] 항체는 이중파라토프성인 것일 수 있다. 이러한 이중파라토프성 항체는 예를 들어: sdAb001/005 또는 sdAb001/006일 수 있다.
- [0046] 약물 모이어티에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함하는 항체 약물 접합체 (ADC)가 기재된다. 약물 모이어티는 예를 들어, 항암 약물일 수 있다. 예시적인 약물 모이어티는 DM1이다.
- [0047] ADC 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 기재된다.
- [0048] 본원에 기재된 항체 및 인간 IgG1 Fc를 포함하는 융합 단백질이 기재된다.
- [0049] 항체를 코딩하는 핵산 분자가 기재된다. 핵산 분자를 포함하는 벡터가 기재된다. 바이러스 벡터는 아데노바이러스성, 렌티바이러스성 또는 레트로바이러스성일 수 있다.

- [0050] 상기 언급된 벡터를 포함할 수 있는 숙주 세포가 기재된다. 숙주 세포는 재조합 미생물 숙주 세포일 수 있거나, 포유동물 세포일 수 있으며, 상기 세포는 본원에 기재된 항체를 생산할 수 있다.
- [0051] 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 유기체가 또한 제공된다.
- [0052] 일부 예에서, 항체는 표면 상으로 고정화될 수 있다. 또한, 항체는 화물 분자에 연결될 수 있다. 임의로, 화물 분자는 검출제, 치료제, 약물, 웹티드, 효소, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 그의 항체, 화학적 화합물, 탄수화물 모이어티, DNA-기재 분자, 세포독성제, 또는 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0053] 항체가 화물 분자를 갖는 경우, 화물 분자의 예시적인 크기는 약 1 내지 약 500 kDa일 수 있다. 화물 분자는 리포솜 또는 나노운반체에 로딩될 수 있다. 이러한 나노운반체는 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자 점을 포함할 수 있다. 화물 분자는 세포독성제일 수 있다.
- [0054] DNA-기재 분자는 안티-센스 올리고뉴클레오티드, 마이크로RNA, siRNA, 또는 플라스미드를 포함할 수 있다.
- [0055] a) 샘플을 검출제에 연결된 1종, 또는 1종 초과의 단리되거나 정제된 항체와 접촉시키고; b) 샘플에서 AXL에 결합된 그의 항체에 연결된 검출제를 검출하는 것을 포함하는, AXL을 검출하는 시험판내 방법이 기재된다.
- [0056] 샘플이 혈청 샘플일 수 있는 순환 세포에서 AXL을 검출하는 방법이 기재된다.
- [0057] 이러한 방법에서 검출 단계는 광학 영상화, 면역조직화학, 분자 진단 영상화, 또는 ELISA를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0058] a) 검출제에 연결된 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 항체를 대상체에게 투여하고; b) AXL에 결합된 그의 항체에 연결된 검출제를 검출하는 것을 포함하는, 대상체에서 AXL 발현을 검출하는 생체내 방법이 본원에 기재된다.
- [0059] 임의로, 검출 단계는 PET, SPECT, 또는 형광 영상화를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0060] 관심의 분자에 연결된 1종 이상의 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 항체가 관심의 분자를 AXL을 발현하는 대상체의 세포에 전달하는 것인, 관심의 분자를 AXL을 발현하는 세포 내로 수송하는 방법이 기재된다. 관심의 분자, 예컨대 검출제, 치료제, 약물, 웹티드, 효소, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 그의 항체, 화학적 화합물, 탄수화물 모이어티, DNA-기재 분자, 세포독성제, 또는 바이러스 벡터가 있을 수 있다. 이러한 방법에서, 관심의 분자는 1종 이상의 리포솜 또는 나노운반체 상에 또는 내에 로딩될 수 있다. 나노운반체는 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자 점을 포함할 수 있다. 또한, 관심의 분자는 세포독성제, 예컨대 암을 치료하는 데 사용되는 세포독성제를 포함할 수 있다.
- [0061] 항암 항체 약물 접합체 (본원에 기재된 항체를 포함함)를 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 기재된다. 또한, 세포 요법, 키메라 항원 수용체 (CAR-T 세포) 요법, 또는 종양용해성 바이러스를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0062] 본원에 기재된 항체에 대한 용도는 항암 항체 약물 접합체를 포함하는 의약의 제조를 위한 것일 수 있다. 항체는 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 데 유용하다. 항암 항체 약물 접합체가 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 데 사용되는 추가의 용도가 기재된다.
- [0063] 이러한 항체의 용도가 기재되며, 항체는 세포 요법, 키메라 항원 수용체 (CAR-T 세포) 요법, 또는 종양용해성 바이러스의 제조에 사용될 수 있다.
- [0064] 암 치료제로서 사용하기 위한 항-AXL 항체 약물 접합체가 본원에 기재된다. 강력하고 선택적인 항암 활성을 갖는 면역치료제 및 면역접합체를 제공하는 것이 바람직하다. 암 표적으로서 AXL에 기초한 암의 치료를 위한 항체-약물 접합체 (ADC)는 접합체에서 기능할 수 있는 항체의 개발을 요구한다. AXL은 수용체 티로신 키나제의 TAM 패밀리에 있으며, 그의 과발현은 다수의 인간 암에서 검출되었다. 부분적으로 몇몇 세포주 암 모델에서 250개 초과의 모노클로날 항체 (mAb)의 대용물 ADC 스크리닝 및 독성 시험을 위한 시노몰거스 원숭이로부터의 AXL 단백질의 교차-반응성에 기초하여 측정되는, AXL ADC에 적합한 항체가 본원에 기재된다. ADC 개발을 위한 항-AXL 항체가 기재되며, Gas6 경쟁 및 단일 도메인 항체 (sdAb) 특징규명 데이터가 본원에서 제공된다.
- [0065] Gas6 경쟁. 항-AXL ADC에서, AXL에의 항체 결합을 차단하는 Gas6 (AXL 리간드)의 능력은 AXL ADC 선택을 위한 중요한 특색이다. 이 능력은 본원에서 Gas6 경쟁으로 지칭된다. 전신적으로 또는 종양 미세환경에 존재하는 (그러나 배양물에서 성장된 종양 세포주에서는 발견되지 않음) 고 농도의 Gas6 리간드는 생체내에서 대 시험판

내에서 보여지는 항체 결합 활성의 차이를 설명할 수 있다. 따라서, Gas6에 의해 활성이 영향받지 않거나 약하게 영향받은 항체의 선택은 항체 결합이 생체내에서 Gas6에 의해 방해되지 않음을 보장할 것이다.

[0066] 모노클로날 항체 (mAb). AXL ADC를 항-AXL 마우스 mAb 라이브러리 내로부터 스크리닝하여 Gas6의 존재에 의해 활성이 영향받지 않은 강력한 ADC 내재화제 (IC50<1 nM)를 확인하였다.

[0067] 단일 도메인 항체 (sdAb). AXL ADC 후보를 과지 제시 라이브러리로부터 폐닝함으로써 단리된 항-AXL 단일 도메인 항체 (sdAb, 단지 중쇄 가변 도메인 VH)로부터 확인한다. 본원에서 sdAb의 평가에 사용된 기법은 내재화 검정 및 경쟁적 결합 검정을 포함한다. Gas6 경쟁 및 sdAb 특징규명 데이터를 얻었다. 일반적으로, 중쇄 항체의 1개의 가변 도메인 (VH)을 포함하는 단일 도메인 항체는 길이로 약 110 아미노산 이하일 수 있다. sdAb는 Fc 영역이 결여되며, 따라서 sdAb-Fc 융합물이 제조될 수 있다.

[0068] 에피토프. 에피토프 및/또는 결합 도메인이 본원에 기재된다.

[0069] 관련 기술분야에서 "이뮤노글로불린" (Ig)으로도 지칭되는 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 쌍형성한 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 쇄로부터 구축된 단백질을 지칭하며; IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM을 비롯한 다양한 Ig 이소형이 존재한다. 단일 도메인 sdAb 뿐만 아니라 모노클로날 항체 mAb는 본원에 기재된다. 항체가 정확하게 폴딩되는 경우, 각각의 쇄는 보다 선형 폴리펩티드 서열에 의해 연결된 다수의 별개의 구형 도메인으로 폴딩된다. 예를 들어, 이뮤노글로불린 경쇄는 가변 (VL) 및 불변 (CL) 도메인으로 폴딩되는 반면, 중쇄는 가변 (VH) 및 3개의 불변 (CH, CH2, CH3) 도메인으로 폴딩된다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 (VH 및 VL)의 상호작용은 항원 결합 영역 (Fv)의 형성을 초래한다. 각각의 도메인은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 익숙한 널리 확립된 구조를 갖는다.

[0070] 용어 "항체"는 또한 이뮤노글로불린에 대해 관찰된 바와 같은 전형적인 필적하는 기간 동안 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 분자의 유도체를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 항체의 결합 영역 또는 결합 도메인은 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역을 포함할 수 있거나, 단일 도메인 (VHH) 분자일 수 있다. 용어 "항체"는 항원-결합을 보유하는 항체의 이러한 단편 (이는 본원에서 "항체 단편" 또는 간단히 "단편"으로 지칭될 수 있음)을 포괄하는 데 사용된다. 결합 능력을 보유하는 단편은 Fab' 또는 Fab 단편, VL, VH, CL 및 CH1 도메인을 가질 수 있는 1가 단편, F(ab')₂ 단편, 이중파라토프 성 단편, 2가 단편, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편, 낙타 항체, 나노바디, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR), 링커에 의해 연결된 다수의 단편, 및 다른 이러한 분자를 포함할 수 있다.

[0071] 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 단일 도메인 항체, 항체-유사 폴리펩티드, 인간화 항체, 키메라 항체 분자, 이중파라토프성 항체, 및 항원-결합이 가능한 본원에 구체적으로 언급되지 않은 임의의 단편을 포괄한다. 항체 단편은 천연-발생 항체 단편일 수 있고, 천연-발생 항체의 조작에 의해 또는 재조합 방법을 사용함으로써 얻어질 수 있으며, 비-천연 발생 항체 또는 단편일 수 있다. 예를 들어, 항체 단편으로는 Fv, 단일-쇄 Fv (scFv; 펩티드 링커와 연결된 VL 및 VH로 이루어진 분자), Fab, F(ab')₂, 및 이를 중임의의 것의 다가 제시를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 항체 단편, 예컨대 방금 기재된 것들은 단편의 상이한 위치에 연결하기 위해 링커 서열, 디슬퍼드 결합, 또는 다른 유형의 공유 결합을 요구할 수 있으며; 관련 기술분야의 통상의 기술자는 다양한 접근법에 익숙할 것이다. 단일 도메인 항체 단편 뿐만 아니라 모노클로날 항체 단편은 용어 "항체"에 의해 포괄된다.

[0072] 비-제한적 예에서, 항체 단편은 천연-발생 공급원으로부터 유래된 sdAb일 수 있다. 낙타 기원의 중쇄 항체는 경쇄가 결여되며, 따라서 그들의 항원 결합 부위는 V_H로 용어화되는 1개의 도메인으로 이루어진다. sdAb는 또한 상어에서 관찰되었으며, V_{NAR}로 용어화된다. 다른 sdAb는 인간 Ig 중쇄 및 경쇄 서열에 기초하여 조작될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "sdAb"는 과지 제시 또는 다른 기술을 통해 임의의 기원의 V_H, V_HH, V_L, 또는 V_{NAR} 저장소로부터 직접적으로 단리된 sdAb, 상기 언급된 sdAb로부터 유래된 sdAb, 재조합적으로 제조된 sdAb, 뿐만 아니라 인간화, 친화성 성숙, 안정화, 가용화, 낙타화, 또는 항체 조작의 다른 방법에 의한 이러한 sdAb의 추가의 변형을 통해 생성된 sdAb를 포함한다. 또한, 항원-결합 기능 및 sdAb의 특이성을 보유하는 동족체, 유도체, 또는 단편이 포괄된다.

[0073] SdAb는 항체 분자를 위한 바람직한 특성, 예컨대 높은 열안정성, 높은 세정제 저항성, 프로테아제에 대한 상대적으로 높은 저항성 및 높은 생산 수율을 갖는다. 이들은 또한 면역 라이브러리로부터의 단리에 의해 또는 시험관내 친화성 성숙에 의해 매우 높은 친화도를 갖도록 조작될 수 있다. 안정성을 증가시키는 추가의 변형, 예

컨대 비-정준 디슬퍼드 결합의 도입은 또한 sdAb에 도입될 수 있다.

[0074] 단일-도메인 항체의 구조는 확립되어 있고, 널리 공지되어 있다. sdAb는 이뮤노글로불린 폴드를 보유하는 단일 이뮤노글로불린 도메인을 포함하며; 가장 현저하게는, 단지 3개의 CDR/초가변 루프는 항원-결합 부위를 형성한다. 그러나, 모든 CDR이 항원에 결합하는 데 요구되지는 않을 수 있다. 예를 들어, 및 제한되지 않고, CDR 중 1개, 2개, 또는 3개는 본원에 기재된 sdAb에 의한 항원의 결합 및 인식에 기여할 수 있다. sdAb의 CDR 또는 가변 도메인은 본원에서 CDR1, CDR2, 및 CDR3으로 지칭된다.

[0075] 기재된 항체 (그의 단편을 포함함)는 수용체 티로신 키나제 서브페밀리의 일부인 AXL에 대해 특이적이다. AXL (엔트레즈 진 (Entrez Gene): 558)은 2개의 이뮤노글로불린-유사 도메인 및 2개의 피브로넥틴 유형 III 반복부를 포함하는 세포외 도메인; 막횡단 도메인; 및 티로신 키나제 도메인을 포함하는 세포내 도메인으로 조직화된 894개의 아미노산을 포함한다 (선행 기술 도 1 참조). AXL 단백질은 비타민 K-의존성 단백질인 리간드 Gas6에 결합한다. AXL은 통상적으로 많은 세포 유형에 걸쳐 발현되지만, 발현 수준은 다수의 질환 상태에서 증가된다.

[0076] 항체는 높은 정도의 내재화를 나타내야 한다. 용어 "높은 정도의 내재화"란, 항체가 AXL을 발현하는 것으로 공지된 1종 초과의 종양 세포주에서 사포린- 또는 DM1-접합된 2차 항체 세포독성 스크리닝 검정에서 nM 이하 (IC_{50}) 효능을 나타냄을 의미한다. 본원에 기재된 항체는 세포 표면 AXL 수용체의 세포외 도메인에 결합한다.

그 후, 항체는 세포에 의해 내재화되고, 엔도솜 및 리소좀을 비롯한 세포이하 소기관 내로 전달될 수 있다. 항체는 또한 중화 기능을 포함할 수 있으며, 즉, 이는 AXL 수용체를 통한 신호전달을 차단할 수 있다.

[0077] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 표적 항원에의 결합을 담당하며, 따라서, 항체 사이에 상당한 서열 다양성을 나타낼 수 있다. 불변 영역은 적은 서열 다양성을 나타내며, 중요한 생화학적 사건을 유발하는 다수의 천연 단백질에의 결합을 담당한다. 항체의 가변 영역은 분자의 항원-결합 결정자를 함유하며, 따라서, 그의 표적 항원에 대한 항체의 특이성을 결정한다. 대다수의 서열 가변성은 6개의 초가변 영역, 즉, 가변 경쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 도메인 당 각각 3개에서 발생하며; 초가변 영역은 조합하여 항원-결합 부위를 형성하고, 항원 결정자의 결합 및 인식에 기여한다. 그의 항원에 대한 항체의 특이성 및 친화도는 초가변 영역의 구조, 뿐만 아니라 그들의 크기, 형상 및 그들이 항원에 제시하는 표면의 화학에 의해 결정된다. 초가변성의 영역의 확인을 위한 다양한 방식이 존재하며, 그 중 하나 (카바트 방식 (Kabat Scheme))는 VH 및 VL 도메인의 항원-결합 영역에서의 서열 가변성에 기초하여 "상보성-결정 영역" (CDR)을 정의한다. 또 다른 것 (코티아 방식 (Clothia Scheme))은 VH 및 VL 도메인에서의 구조적 루프 영역의 위치에 기초하여 "초가변 루프" (H 또는 L)를 정의한다. 이들 개별적 방식은 인접하거나 중첩하는 CDR 및 초가변 루프 영역을 정의하기 때문에, 항체 기술분야의 통상의 기술자는 대개 용어 "CDR" 및 "초가변 루프"를 상호교환가능하게 이용하며, 이들은 본원에서 그렇게 사용될 수 있다. 국제 면역유전학 정보 시스템 (International Immunogenetics Information System) (IMGT)은 본원에서 사용되며, 카바트 넘버링이 또한 나타내어진다. IMGT 넘버링 시스템은 가변 도메인의 비교를 용이하게 하기 위해 개발되었다. 이 시스템에서, 보존된 아미노산 (예컨대 Cys23, Trp41, Cys104, Phe/Trp118, 및 위치 89에서 소수성 잔기)은 항상 동일한 위치를 갖는다. 또한, 프레임워크 영역 (FR1: 위치 1 내지 26; FR2: 39 내지 55; FR3: 66 내지 104; 및 FR4: 118 내지 129)의 및 CDR (CDR1: 27 내지 38, CDR2: 56 내지 65; 및 CDR3: 105 내지 117)의 표준화된 한계가 제공된다.

[0078] 본원에서, IMGT로서 언급된 CDR 서열은 -A에 이어진 서술적 명칭에 의해 확인되는 반면, 카바트 서열의 서술적 명칭은 -B로 이어진다.

[0079] CDR/루프는 본원에서 CDR H1에 대해 코티아 방식, 및 모든 다른 CDR에 대해서는 카바트 방식에 따라 지칭된다.

본원에 기재된 항체의 CDR은 경쇄에서의 CDR에 대해 CDR L1, L2, L3, 및 중쇄에서의 CDR에 대해 CDR H1, H2, H3으로 지칭된다.

[0080] 서열식별번호:72는 공지된 AXL 전장 His6 서열을 제공하며, 단지 정보를 위해 제공된다.

[0081] 접합되거나 결합된 세포독성제의 내재화 및 활성화를 유발하는 것 외에도, 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 초래할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 바와 같이, ADCC 및 CDC 활성은 다양한 항체 구조에 존재하는 불변 도메인을 통해 매개된다.

[0082] 항체는 임의의 공급원, 인간, 마우스, 또는 기타로부터의 것일 수 있고; IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM을 비롯한 임의의 이소형일 수 있으며; Fv, scFv, Fab, F(ab')₂를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 유형의 단편일 수 있다.

[0083] 항체는 또한 1종 초파의 종으로부터 기원한 단백질 서열의 조합으로서 형성된 키메라일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 키메라 항체는 비인간 공급원 (예를 들어 마우스 (그러나 이에 제한되지는 않음))으로부터의 유전 물질을 인간으로부터의 유전 물질과 조합함으로써 제조된다. 예를 들어, 인간 불변 도메인은 마우스 VH 및 VL 서열에 융합될 수 있다.

[0084] 항체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예를 들어 CDR 그래프팅 및 베니어링 (그러나 이에 제한되지는 않음)을 사용하여 "인간화될" 수 있다. 항체의 인간화는 항원-결합 능력 또는 특이성의 소실 없이, 인간 컨센서스 서열에서 발견된 바와 같이, 서열에서의 아미노산을 그의 인간 대응물로 대체하는 것을 포함하며; 이 접근법은 인간 대상체 내로 도입되는 경우 항체의 면역원성을 감소시킨다. CDR 그래프팅의 프로세스에서, 본원에서 정의된 중쇄 CDR 중 1개 또는 1개 초파는 CDR이 그래프팅될 수 있는 인간 가변 영역 (VH 또는 VL)에, 또는 다른 인간 항체 (IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM) 또는 단편 프레임워크 영역 (Fv, scFv, Fab) 또는 유사한 크기 및 성질의 단백질에 융합되거나 그래프팅될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Nicaise et al, 2004] 참조). 이러한 경우, 상기 1개 또는 1개 초파의 초기 루프의 입체형태는 보존될 가능성이 있으며, 그의 표적 (즉, AXL)에 대한 항체의 친화도 및 특이성은 최소로 영향받을 가능성이 있다. CDR 그래프팅은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 인간화 항체의 한 비-제한적 예에서, 마우스 공급원으로부터의 상기 기재된 바와 같은 CDR은 인간 경쇄 및 중쇄 프레임워크 영역 상으로 그래프팅될 수 있다.

[0085] 관련 기술분야에서 "가변 영역 재표면처리"로도 지칭되는 베니어링은 항체의 용매-노출된 위치를 인간화하는 것을 포함한다. 따라서, CDR 입체형태에 중요할 수 있는 매몰된 비-인간화 잔기는 보존되는 반면, 용매-노출된 영역에 대한 면역학적 반응에 대한 잠재성은 최소화된다. 베니어링은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 본질적으로 천연 항체 또는 그의 단편의 프레임워크 영역에서의 노출된 잔기를 그들의 인간 대응물에서의 아미노산 잔기로 대체하는 것을 포함한다 (Padlan, 1991; Gonzales et al 2005).

[0086] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 또한 이러한 인간화 항체 단편을 제조하고, 아미노산 위치를 인간화하는 방법에 충분히 익숙할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Vincke et al., 2009]을 참조한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 바와 같이, 결합 및 특이성을 보유하기 위해 특정 천연 아미노산 잔기를 인간 프레임워크 내로 혼입시키는 것이 필요할 수 있다. CDR 그래프팅에 의한 인간화는 관련 기술분야에 공지되어 있으며 (예를 들어, 문헌 [Tsurushita et al, 2005]; [Jones et al, 1986]; [Tempest et al, 1991]; [Riechmann et al, 1988]; [Queen et al, 1989]; [Gonzales et al, 2005] 참조), 따라서, 통상의 기술자는 이러한 인간화 항체 또는 그의 단편을 제조하는 방법에 충분히 익숙할 것이다.

[0087] 상기 정의된 바와 같은 VH 및 VL 및 인간 IgG1 프레임워크를 포함하는 키메라 항체일 수 있는 AXL에 대해 특이적인 단리되거나 정제된 항체. 예를 들어, 인간 IgG1 프레임워크는 인간 카파 경쇄 및 인간 IgG1 중쇄를 포함할 수 있다.

모노클로날 항체

[0089] AXL에 대해 지정된 고-친화도 모노클로날 항체 (mAb)가 기재된다. mAb를 유전적 면역화에 의해 (즉, rhAXL-ECD를 코딩하는 DNA를 주사함으로써) 생성하였다. mAb를 높은 정도의 내재화를 나타내는 항체를 확인하도록 설계된 기능적 검정을 사용하여 스크리닝하였다.

[0090] 확인된 5종의 항-hAXL mAb를 항체-약물 접합체 (ADC)로서의 잠재성에 대해 기능적으로 특징규명하였다. 이들 항체는 본원에서 F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 및 F107-10G1로 지정된다. 이들 항-인간 AXL 항체는 이들이 하기 세포주 중 적어도 2종에서 사포린-접합된 2차 항체-기재 세포독성 스크리닝 검정에서 nM 이하 (IC_{50}) 효능을 나타내었기 때문에 선택되었다: U87 교모세포종, A549 폐포 선암종, 및 MDA-MB-231 유방 선암종. 이들은 또한 DM1에 접합되는 경우, H292 폐 암종 세포, A549 세포 및 MDA-MB-231 세포에 대한 독성을 나타내었다. 에피토프 비닝 분석은 접합된 2차 항체 스크리닝 검정에서의 효능에 기초한 이들 항체의 선택이 모든 5종의 mAb가 하기 에피토프에 결합하는 것을 초래하였음을 지시하였다: AXL의 Ig-유사 도메인 1에 위치한 2종 (F107-7H5 및 F107-8D12) 및 Ig-유사 도메인 2에 위치한 1종 (F111-3C8 및 F111-5E9). F107-10G1의 결합은 또한 Ig-유사 도메인 1에 있지만, F107-7H5 및 F107-8D12의 그것과 별개의 부위에서임이 주목된다.

서열 동일성 및 특징

[0092] 실질적으로 동일한 서열은 1개 이상의 보존적 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다. 참조 서열에 대한 1개 이상의 보존적 아미노산 돌연변이는 참조 서열에 비해 생리학적, 화학적, 물리-화학적 또는 기능적 특성의 실질적 변화를 갖지 않는 돌연변이체 웨პ티드를 생성할 수 있음이 관련 기술분야에 공지되어 있으며; 이러한 경우, 참조

및 돌연변이체 서열은 "실질적으로 동일한" 폴리펩티드로 간주될 것이다. 보존적 아미노산 치환은 본원에서 아미노산 잔기의 유사한 화학적 특성 (예를 들어 크기, 전하, 또는 극성)을 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 대한 치환으로 정의된다. 이들 보존적 아미노산 돌연변이는 상기 열거된 CDR 서열 및 항체의 전체 구조를 유지하면서 항체의 프레임워크 영역에 이루어질 수 있으며; 따라서, 항체의 특이성 및 결합은 유지된다.

[0093] 비-제한적 예에서, 보존적 돌연변이는 아미노산 치환일 수 있다. 이러한 보존적 아미노산 치환은 염기성, 중성, 소수성, 또는 산성 아미노산을 동일한 군의 또 다른 것에 대해 치환할 수 있다. 용어 "염기성 아미노산"이란, 생리학적 pH에서 전형적으로 양으로 하전된 7 초과의 측쇄 pK 값을 갖는 친수성 아미노산을 의미한다. 염기성 아미노산으로는 히스티딘 (His 또는 H), 아르기닌 (Arg 또는 R), 및 리신 (Lys 또는 K)을 들 수 있다. 용어 "중성 아미노산" (또한 "극성 아미노산")이란, 생리학적 pH에서 비하전되지만, 2개의 원자에 의해 공통적으로 공유된 전자의 쌍이 원자 중 하나에 의해 보다 가깝게 보유되는 적어도 1개의 결합을 갖는 측쇄를 갖는 친수성 아미노산을 의미한다. 극성 아미노산으로는 세린 (Ser 또는 S), 트레오닌 (Thr 또는 T), 시스테인 (Cys 또는 C), 티로신 (Tyr 또는 Y), 아스파라긴 (Asn 또는 N), 및 글루타민 (Gln 또는 Q)을 들 수 있다. 용어 "소수성 아미노산" (또한 "비-극성 아미노산")은 정규화된 컨센서스 소수성 스케일에 따라 0 초과의 소수성을 나타내는 아미노산을 포함하는 것으로 의미된다. 소수성 아미노산으로는 프롤린 (Pro 또는 P), 이소류신 (Ile 또는 I), 페닐알라닌 (Phe 또는 F), 발린 (Val 또는 V), 류신 (Leu 또는 L), 트립토판 (Trp 또는 W), 메티오닌 (Met 또는 M), 알라닌 (Ala 또는 A), 및 글리신 (Gly 또는 G)을 들 수 있다. "산성 아미노산"은 생리학적 pH에서 전형적으로 음으로 하전된 7 미만의 측쇄 pK 값을 갖는 친수성 아미노산을 지칭한다. 산성 아미노산으로는 글루타메이트 (Glu 또는 E), 및 아스파르테이트 (Asp 또는 D)를 들 수 있다.

[0094] 서열 동일성은 2개의 서열의 유사성을 평가하는 데 사용되며; 이는 2개의 서열이 잔기 위치 사이에 최대 상응성에 대해 정렬되는 경우 동일한 잔기의 퍼센트를 계산함으로써 측정된다. 임의의 공지된 방법이 서열 동일성을 계산하는 데 사용될 수 있으며; 예를 들어, 컴퓨터 소프트웨어는 서열 동일성을 계산하는 데 이용가능하다. 서열 동일성은 예를 들어, 소프트웨어, 예컨대 스위스 인스티튜트 오브 바이오인포메틱스 (Swiss Institute of Bioinformatics)에 의해 유지되는 NCBI BLAST2 서비스, BLAST-P, 블라스트 (Blast)-N, 또는 FASTA-N, 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 적절한 소프트웨어에 의해 계산될 수 있다.

[0095] 본원에 기재된 바와 같은 실질적으로 동일한 서열은 적어도 90% 동일할 수 있으며; 또 다른 예에서, 실질적으로 동일한 서열은 본원에 기재된 서열에 대한 아미노산 수준에서 적어도 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%, 또는 그 사이의 임의의 백분율로 동일할 수 있다. 중요하게는, 실질적으로 동일한 서열은 참조 서열의 활성 및 특이성을 보유한다. 비-제한적 실시양태에서, 서열 동일성의 차이는 보존적 아미노산 돌연변이(들)에 기인할 수 있다. 비-제한적 예에서, 본원에 기재된 특정 서열과 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 항체가 포함된다.

[0096] 서열이 비교되는 경우, mAb 3C7, 8D12 및 7H5로서 언급되는 본 항체는 약 90% 이상의 유사성 (또는 ≥90% 동일성)으로 서로와 관련된다. 그럼에도 불구하고 실질적으로 동일한 활성을 초래하는 서열에서의 변이는 실질적으로 동일한 서열로 간주될 것이다.

[0097] 변경, 예컨대 인간화로 인한 서열의 변화는 예측가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이해되는 방식으로 서열을 변경시킬 수 있다. 따라서, 이러한 변경된 서열은 동일성이 상기 언급된 90% 값 미만이도록, 보다 많은 수의 변경된 잔기를 가질 수 있다. 서열의 변이는 실질적으로 동일한 결합이 달성되는 한, CDR의 외부의 영역에 존재할 수 있거나, CDR 내에 있을 수 있다.

[0098] 항체는 또한 재조합 항체의 발현, 겸출 또는 정제를 보조하기 위한 추가의 서열을 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 이러한 서열 또는 태그가 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 표적화 또는 신호 서열 (예를 들어, ompA (그러나, 이에 제한되지는 않음)), 겸출/정제 태그 (예를 들어, c-Myc, His₅, His₆, 또는 His₈G (그러나, 이에 제한되지는 않음)), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 신호펩티드는 MVLQTQVFISLLLWISGAYG (서열식별번호:59) 또는 MDWTWRILFLVAAATGTHA (서열식별번호:60)일 수 있다. 추가의 예에서, 추가의 서열은 비오틴 인식 부위일 수 있다. 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 링커 서열은 추가의 서열 또는 태그와 함께 사용될 수 있거나, 겸출/정제 태그로서 기능할 수 있다.

다량체화, 연결, 및 화물

[0100] 항체는 본원에서 다가 제시로도 지칭되는 다가 제시 형식일 수 있다. 다량체화는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 및 어떠한 식으로도 제한되지 않고, 다량체화는 자기-어셈

블리 분자를 사용하여, 및/또는 항체 및 AB₅ 독소 패밀리의 B-서브유닛의 오량체화 도메인을 포함하는 융합 단백질을 발현시켜 웬타바디를 제조함으로써 달성될 수 있다. 그 후, 오량체화 도메인은 오량체로 어셈블리된다. 다량체는 또한 다량체성 분자를 초래하는 코일드-코일 웨이드를 갖는, 항체의 융합물을 기재하기 위한 "콤바디" 형태로 지칭될 수 있는 다량체화 도메인을 사용하여 형성될 수 있다. 다가 제시의 다른 형태는 또한 본원에 포함된다. 예를 들어, 및 제한되지 않고, 항체는 이량체, 삼량체, 또는 임의의 다른 적합한 올리고머로서 제시될 수 있다. 이는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 직접 연결 연결로, c-jun/Fos 상호작용으로, 놈 인투 홀 (knob into holes) 상호작용을 사용하여 달성될 수 있다.

[0101] 상기 기재된 다량체의 각각의 서브유닛은 동일하거나 상이한 특성을 가질 수 있는 동일하거나 상이한 항체를 포함할 수 있다. 또한, 다량체화 도메인은 요구되는 경우 링커를 사용하여 항체에 연결될 수 있으며; 이러한 링커는 2개의 분자의 유연한 부착을 제공하기 위해 충분한 길이 및 적절한 조성의 것이어야 하지만, 항체의 항원-결합 특성을 방해하지 않아야 한다. 예를 들어, 및 어떠한 식으로도 제한되지 않고, 항체는 화물 분자에 연결될 수 있다. 화물 분자는 임의의 적합한 분자일 수 있다. 예를 들어, 화물 분자는 검출제, 치료제, 약물, 웨이드, 효소, 성장 인자, 시토카인, 수용체 트랩, 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, IgG, scFv, Fab, V_H, V_L 등) 화학적 화합물, 탄수화물 모이어티, DNA-기재 분자 (안티-센스 올리고뉴클레오티드, 마이크로RNA, siRNA, 플라스미드), 세포독성제, 바이러스 벡터 (아데노-, 렌티-, 레트로-), 화물 분자의 이전에 인용된 유형 중 임의의 것으로 로딩된 1종 이상의 리포솜 또는 나노운반체, 또는 1종 이상의 나노입자, 나노와이어, 나노튜브, 또는 양자 점일 수 있다. 항체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법 (제조합 기술, 화학적 접합 등)을 사용하여 화물 분자에 연결될 수 있다.

[0102] 한 비-제한적 예에서, 화물 분자는 검출가능한 표지, 방사성동위원소, 상자성 표지, 예컨대 가돌리늄 또는 산화철, 형광단, 형광제, 근적외선 (Near Infra-Red) (NIR) 형광색소 또는 염료, 예컨대 Cy5.5, 예코발생 미세버블, 친화성 표지 (예를 들어 비오틴, 아비딘 등), 검출가능한 단백질-기재 분자, 뉴클레오티드, 양자 점, 나노입자, 나노와이어, 또는 나노튜브 또는 영상화 방법에 의해 검출될 수 있는 임의의 다른 적합한 작용제일 수 있다. 구체적인 비-제한적 예에서, 항-AXL 항체는 근적외선 형광 (NIRF) 영상화 염료, 예를 들어 Cy5.5, 알렉사 (Alexa)680, 다이라이트 (DyLight)680, 또는 다이라이트800에 연결될 수 있다.

[0103] 본원에 기재된 항체는 세포 요법에, 키메라 항원 수용체 (CAR-T 세포) 요법에, 종양용해성 바이러스에, 및 이들의 및 다른 치료 조성물에서의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0104] 또다른 구체적인 비-제한적 실시양태에서, 항체는 약물에 연결되며, 따라서 항체-약물 접합체 (ADC)를 제공한다. 약물은 임의의 유형의 약물, 예를 들어 세포독성제 또는 화학치료제 (그러나, 이에 제한되지는 않음)일 수 있다. 세포독성제 또는 화학치료제로는 미세관 억제제 (예컨대 마이탄신 및 아우리스타틴), DNA 손상제 (예컨대 칼리케아미신 및 다우카르마이신), RNA 폴리머라제 억제제 (예컨대 알파-아만틴), 항-대사물, DNA 와 반응하는 작용제 (예컨대 알킬화제, 배위 화합물, 백금 치료제, DNA 가교 화합물 등), 전사 효소의 억제제, 티로신 키나제 억제제, 토포이소마라제 억제제, DNA 소hom 결합 화합물, 항유사분열제 (예컨대 빈카 알칼로이드 및 탁산), 항종양 항생제, 호르몬, 효소, 및 다른 강력한 약물을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이, 항체-약물 접합체는 약물의 표적화된 전달을 허용하며, 따라서 전신 노출을 제한한다. 이 구축물에서, 항체는 세포 표면 AXL 수용체의 세포외 도메인에 결합하며; 항체에 연결된 약물은 따라서 내재화되고, 세포내로 전달된다. 그 후, 약물은 세포에서 직접적으로 활성이거나, 엔도솜을 통해 먼저 활성화된 후, 세포에 대해 작용할 수 있다.

[0105] 본원에 기재된 바와 같은 화물 분자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 항체에 연결될 (또한 본원에서 "접합된"으로 지칭됨) 수 있다. 예를 들어, 및 제한되지 않고, 화물 분자는 공유 결합 또는 이온 상호작용에 의해 웨이드에 연결될 수 있다. 연결은 화학적 가교 반응을 통해, 또는 임의의 웨이드 발현 시스템, 예컨대 박테리아, 효모 또는 포유동물 세포-기재 시스템과 조합된 재조합 DNA 방법론을 사용한 융합을 통해 달성될 수 있다. 화물 분자를 항체에 접합시키는 경우, 적합한 링커가 사용될 수 있다. 항체를 화물 분자, 예컨대 치료제 또는 검출제에 연결시키는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있을 것이다.

[0106] 본원에 기재된 바와 같은 분자를 코딩하는 핵산 서열은 또한 포함된다. 유전 암호의 축퇴성을 고려하여, 다수의 뉴클레오티드 서열은 통상의 기술자에 의해 용이하게 이해될 것인 바와 같이, 바람직한 폴리웨이드를 코딩하는 효과를 가질 것이다. 핵산 서열은 다양한 미생물에서 발현에 대해 코돈-최적화될 수 있다. 방금 기재된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터는 또한 포함된다. 더욱이, 기재된 바와 같은 핵산 및/또는 벡터를 포함하는 세

포는 포괄된다.

[0107] 단리되거나 정제된 항체는 다양한 방법론을 사용하여 표면 상으로 고정화될 수 있으며; 예를 들어, 항체는 His-태그 커플링, 비오틴 결합, 공유 결합, 흡착을 통해, 또는 다른 경로에 의해 표면에 연결되거나 커플링될 수 있다. 항체의 고정화는 단백질을 포획하거나, 정제하거나, 단리하기 위한 다양한 적용에 유용할 수 있다. 고체 표면은 임의의 적합한 표면, 예를 들어, 미세역가판의 웰 표면, 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 센서칩의 채널, 막, 비드 (예컨대 자기-기체 또는 세파로스-기체 비드 또는 다른 크로마토그래피 수지), 유리, 플라스틱, 스테인리스 스틸, 필름, 또는 임의의 다른 유용한 표면, 예컨대 나노입자, 나노와이어 및 캔틸레버 표면 (그러나, 이에 제한되지는 않음)일 수 있다. 표면 상으로 고정화된 정제된 항체는 진단 방법을 비롯한 다양한 방법에 사용될 수 있다.

[0108] 샘플을 검출제에 연결된 1종 또는 1종 초과의 단리되거나 정제된 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, AXL을 검출하는 시험관내 방법이 기재된다. 그 후, AXL-항체 복합체는 관련 기술분야에 공지된 검출 및/또는 영상화 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 방금 기재된 바와 같은 방법에서 샘플은 임의의 적합한 조직 샘플, 예를 들어 혈청 샘플, 혈관 조직 샘플, 또는 종양 조직 샘플 (그러나 이에 제한되지는 않음)일 수 있으며; 샘플은 인간 또는 동물 대상체로부터의 것일 수 있다. 접촉 단계는 항체 및 AXL 사이의 복합체의 형성을 위한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 적합한 조건 하에서 수행된다. 검출 단계는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 광학 영상화, 면역조직화학, 분자 진단 영상화, ELISA, 또는 다른 적합한 방법 (그러나 이에 제한되지는 않음)에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 검출제에 연결된 단리되거나 정제된 항체는 효소 IA (EIA), ELISA, "급속 항원 포획", "급속 크로마토그래피 IA", 및 "급속 EIA"를 포함하나 이에 제한되지는 않는 면역검정 (IA)에 사용될 수 있다. 구체적인 비-제한적 실시양태에서, 시험관내 방법은 순환 세포에서의 AXL의 검출을 위한 것이며, 샘플은 혈청 샘플이다.

AXL 검출 및 질환 진단

[0110] 대상체에서 AXL 발현을 검출하는 생체내 방법이 기재된다. 방법은 검출제에 연결된 1종 또는 1종 초과의 단리되거나 정제된 항체를 대상체에게 투여한 후, AXL에 결합된 표지된 항체를 검출하는 것을 포함한다. 검출 단계는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예를 들어, PET, SPECT, 또는 형광 영상화, 또는 임의의 다른 적합한 방법 (그러나, 이에 제한되지는 않음)을 포함할 수 있다. 방금 기재된 바와 같은 방법은 조직, 예를 들어 종양 조직 (그러나, 이에 제한되지는 않음)에서 AXL의 발현을 검출하는 데 유용할 수 있다.

[0111] 상기 기재된 방법에서 생체내 검출 단계는 질환의 진행 또는 치료 처방에 대한 숙주 반응을 평가하기 위한 정량적 방식에서, 진단 목적을 위한 전신 영상화 또는 특이적 부위, 예컨대 고형 종양 성장의 부위 (그러나, 이에 제한되지는 않음)에서의 국소 영상화일 수 있다. 상기 기재된 바와 같은 방법에서 검출 단계는 면역조직화학, 또는 광학 영상화; 양전자 방출 단층촬영술 (PET) (여기서, 검출제는 동위원소, 예컨대 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{62}Cu , ^{124}I , ^{76}Br , ^{82}Rb 및 ^{68}Ga 이며, ^{18}F 가 가장 임상적으로 이용됨); 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영술 (SPECT) (여기서, 검출제는 구체적 적용에 따라 방사선추적자, 예컨대 ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{201}TI , ^{133}Xe 임); 자기 공명 영상화 (MRI) (여기서, 검출제는 예를 들어 가돌리늄, 산화철 나노입자 및 탄소-코팅된 철-코발트 나노입자 (이에 제한되지는 않음)일 수 있으며, 그에 의해 플라크의 검출을 위한 MRI의 민감도를 증가시킴); 또는 조영-증강 초음파검사 (Contrast-Enhanced Ultrasonography) (CEUS) 또는 초음파 (여기서, 검출제는 적어도 1종의 음향학적으로 활성 및 기체-충전된 미세버블임)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-침습성 (분자) 진단 영상화 기술일 수 있다. 초음파는 인간 질환의 스크리닝 및 조기 검출을 위한 광범위한 기술이며, MRI 또는 섬광조영술보다 덜 비싸고, 그것이 방사선을 포함하지 않기 때문에, 분자 영상화 양식, 예컨대 방사선핵종 영상화보다 더 안전하다.

AXL을 발현하는 세포에의 분자의 전달

[0113] 관심의 분자를 AXL을 발현하는 세포 내로 수송하는 방법이 기재된다. 방법은 항체에 연결된 분자를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 분자는 이전에 기재된 바와 같은 화물 분자를 비롯한 임의의 바람직한 분자일 수 있으며; 분자는 용합 단백질로서의 접합 또는 발현을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 방법을 사용하여 항체에 "연결될" 수 있다. 투여는 임의의 적합한 방법, 예를 들어 정맥내 (iv), 피하 (sc), 및 근육내 (im) 투여를 포함하나 이에 제한되지는 않는 비경구 투여에 의해서일 수 있다. 이 방법에서, 항체는 바람직한 분자를 세포에 표적화된 방식으로 전달한다.

[0114] 조성물

[0115] 1종 또는 1종 초과의 단리되거나 정제된 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 상기 기재된 바와 같은 단일 항체를 포함할 수 있거나, 항체의 혼합물을 수 있다. 더욱이, 항체의 혼합물을 포함하는 조성물에서, 항체는 동일한 특이성을 가질 수 있거나, 그들의 특이성에 있어서 상이할 수 있으며; 예를 들어, 조성물은 AXL에 대해 특이적인 항체 (동일하거나 상이한 에피토프)를 포함할 수 있다. 항체는 이중파라토프성일 수 있다. 조성물은 또한 1종 또는 1종 초과의 화물 분자에 연결된 1종 이상의 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 1종 또는 1종 초과의 ADC를 포함할 수 있다.

[0116] 항-AXL 항체가 강력한 세포독성 약물을 전달하는 데 사용되는 항체-약물 접합체 (ADC) 접근법은 약물에 반응할 가능성이 있는 환자 집단을 증가시킨다. 이론에 구애되지는 않지만, 이는 대체로 진행중인 AXL 활성에 대한 요건이라기 보다는 AXL의 증가된 발현에 대한 요건에 기인할 수 있다. 또 다른 이점은 ADC가 항체에 대한 획득된 저항성의 경우 빈번히 주어질 수 있다는 것이다.

[0117] 항체가 제공되는 조성물은 또한 제약상 허용되는 희석제, 부형제, 또는 담체를 포함할 수 있다. 희석제, 부형제, 또는 담체는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 희석제, 부형제, 또는 담체일 수 있으며, 조성물에서의 다른 성분과, 조성물의 전달 방법과 혼화성이어야 하고, 조성물의 수혜자에게 유해하지 않다. 조성물은 임의의 적합한 형태일 수 있으며; 예를 들어, 조성물은 혼탁액 형태, 분말 형태 (예를 들어, 동결건조되거나 캡슐화됨 (그러나, 이에 제한되지는 않음)), 캡슐 또는 정제 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 조성물이 혼탁액 형태로 제공되는 경우, 담체는 물, 염수, 적합한 완충제, 또는 용해도 및/또는 안정성을 개선시키는 첨가제를 포함할 수 있으며; 혼탁액을 제조하기 위한 재구성은 항체의 생존율을 보장하기 위해 적합한 pH에서의 완충제에서 실행된다. 건조 분말은 또한 안정성을 개선시키는 첨가제 및/또는 벌크/부피를 증가시키는 담체를 포함할 수 있으며; 예를 들어 건조 분말 조성물은 수크로스 또는 트레할로스를 포함할 수 있다. 구체적인 비-제한적 예에서, 조성물은 항체를 대상체의 위장관에 전달하도록 제형화될 수 있다. 따라서, 조성물은 캡슐화, 시간-방출, 또는 항체의 전달을 위한 다른 적합한 기술을 포함할 수 있다. 본 화합물을 포함하는 적합한 조성물을 제조하는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 역량 내일 것이다.

[0118] 항체는 AXL 발현이 조절이상된 질환 또는 상태의 치료에 사용될 수 있거나, 이러한 용도를 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다. 항체는 화물 분자에 연결될 수 있거나, 조성물에 포함될 수 있다. 본원에 기재된 항체를 사용하여 치료될 수 있는 질환 및 상태로는 유방, 신장, 자궁내막, 난소, 갑상선, 및 비-소세포 폐 암종, 흑색종, 전립선 암종, 육종, 위암 및 포도막 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고형 암 종양; 백혈병 (특히 골수성 백혈병) 및 림프종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 액상 종양; 자궁내막증, 혈관 질환/손상 (재협착, 축상동맥경화증 및 혈전증을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 건선; 황반 변성으로 인한 시각 손상; 당뇨병성 망막증 및 미숙의 망막증; 신장 질환 (사구체신염, 당뇨병성 신장병증 및 신장 이식 거부를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 류마티스성 관절염; 골관절염, 골다공증 및 백내장을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 치료될 수 있는 질환 및 상태로는 또한 하기 생물학적 프로세스에 의해 영향받는 것들을 들 수 있다: 암에서 나타나는 바와 같은 침습, 이동, 전이, 또는 약물 저항성; 암에서 나타나는 바와 같은 줄기 세포 생물학; 침습, 이동, 부착, 또는 혈관신생; 혈관 재형성; 골 항상성; 바이러스 감염; 또는 비만에서 나타나는 바와 같은 분화. 화학식 (I)의 화합물은 또한 폐혈증을 치료하고/거나, 백신 아주반트로서 작용하고/거나, 면역-손상된 환자에서 면역 반응을 강화함으로써 염증 프로세스를 조정하는 데 사용될 수 있다. 한 비-제한적 예에서, 질환 또는 상태는 전이성 암일 수 있다.

[0119] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 예시될 것이다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범위를 어떠한 식으로도 제한하는 데 사용되지 않아야 함이 이해되어야 한다.

[0120] 실시예

[0121] 실시예 1: 항-AXL 항체의 제조

[0122] AXL에 대한 모노클로날 항체 (mAb)를 재조합 인간 AXL 단백질의 세포외 도메인 (rhAXL-ECD; 서열식별번호:58)으로 마우스를 면역화시킴으로써 뿐만 아니라 유전적 면역화에 의해 생성하였다.

[0123] rhAXL-ECD의 제조: C-말단적으로 His8-태그부착된 재조합 인간 (rh)AXL 세포외 도메인 (ECD; 서열식별번호:71)의 합성 재조합 단편을 함유하는 pTT5 구축물을 CHO 세포에서 발현시키고, Ni-아가로스에 의해 정제하고, SDS-PAGE에 의해 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음).

- [0124] 면역화: 마우스 mAb를 유전적 면역화에 의해 생성하였다. 유전적 면역화를 위해, 마우스를 채혈하고 (사전-면역 혈청), 가용성 rhAXL-ECD의 발현을 위해 100 μ g의 pTT40 발현 플라스미드를 사용하여 수력학적 꼬리 정맥 전달 기법 (HTV)에 의해 제0일 및 제42일에 면역화하였다. 마우스를 7 내지 10일 후에 채혈하고, 혈청 역가를 ELISA에 의해 측정하였다. 4 내지 5개월 후, 100 μ g의 pTT40-AXL-H8G를 사용한 부스터 주사를 융합 실험 전 3 내지 4일에 HTV에 의해 수행하였다.
- [0125] 융합 실험 및 하이브리도마 선택. 모든 조작은 멸균 조건 하에서 수행하였다. 비장 세포를 IMDM (하이-클론 (Hy-Clone))에서 수확하고, PEG 융합 프로토콜을 사용하여 NS0 골수종 세포주에 융합시켰다. 이 목적으로, 비장 세포 및 골수종 세포를 IMDM에서 세척하고, RBC 용해 완충제 (시그마 (Sigma))에서 카운팅하고, 5:1 비로 함께 혼합하였다. 펠릿화된 세포를 PBS 중 PEG 4000 (이엠디-밀리포어 (EMD-Millipore))의 50% 용액 1 ml를 1 분에 걸쳐 적가함으로써 함께 융합시키고, 37°C에서 추가의 90초 동안 인큐베이션하였다. 반응을 22°C에서 2분에 걸쳐 30 ml의 IMDM의 첨가에 의해 정지시켰다. 10분 인큐베이션 후, 새롭게 융합된 세포를 233 xg에서 10분 동안 회전시켰다. 세포를 10% 열 불활성화된 FBS (시그마)로 보충된 IMDM에서 1회 세척하고, 20% 열 불활성화된 FBS, 페니실린-스트렙토마이신 (시그마), 1 ng/ml 마우스 IL-6 (바이오소스 (Biosource)), HAT 배지 보충 물 (시그마) 및 L-글루타민을 함유하는 HAT 선택 배지 (IMDM)에서 ml 당 2×10^5 개 투입 골수종 세포의 농도로 혼탁시키고, 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 다음 날, 하이브리도마 세포를 세척하고, 5% 열 불활성화된 FBS, 1 ng/ml 마우스 IL-6 및 10 μ g/ml FITC-Fab'2 염소 항-마우스 IgG (H+L) (잭슨 (Jackson))로 보충된 반고체 배지 D (스템셀 (StemCell))에서 ml 당 2×10^5 개 투입 골수종 세포의 농도로 혼탁시켰다. 세포 혼합물을 페트리 디쉬 (젠틱스 (Genetix))에 플레이팅하고, 37°C, 5% CO₂에서 6 내지 7일 동안 추가로 인큐베이션하였다. 그 후, 분비선 클론을 포유동물 세포 클론 피커 (클론픽스 (CLONEPIX) TM FL, 몰리큘라 디바이시즈 (Molecular Devices))를 사용하여 20% 열 불활성화된 FBS, 페니실린-스트렙토마이신 (시그마), 1 ng/ml 마우스 IL-6 (바이오소스), HT 배지 보충물 (시그마) 및 L-글루타민으로 보충된 200 μ l의 IMDM을 함유하는 멸균 96-w 플레이트 (코스타 (Costar)) 내로 옮기고, 37°C, 5% CO₂에서 2 내지 3일 동안 인큐베이션하였다.
- [0126] 하이브리도마 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 rhAXL-ECD 단백질에의 결합에 대해 평가하였다. 이 목적으로, 96-w 반-면적 플레이트 (코스타)를 PBS 중 5 μ g/ml의 rhAXL-ECD 25 μ l로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBS로 3회 세척하고, PBS-BSA 1%로 차단하고, 25 μ l의 하이브리도마 상청액을 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-트윈 (TWEEN) TM 20 0.05%로 4회 세척하고, 차단 완충제 중 1/3000 희석된 2차 항체 알칼리성 포스파타제 접합된 F(ab)'2 염소 항-마우스 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson Immunoresearch)) 25 μ l와 함께 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS-트윈 TM 20 0.05%로 4회 세척 후, 25 μ l의 1 mg/ml pNPP 기질 용액을 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. OD405nm 측정을 마이크로플레이트 판독기 (스펙트라맥스 (Spectramax) 340 PC, 몰리큘라 디바이시즈)를 사용하여 수행하였다.
- [0127] ELISA 양성 항체를 선택하고 (클론 F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 및 F107-10G1을 포함함), 소규모 정제를 10 ml 부피의 하이브리도마 상청액 상에서 수행하였다. mAb를 단백질 G 맥 세파로스 (Mag SEPHAROSE) TM 액스트라 (Extra) (지이 헬스케어 라이프 사이언시즈 (GE Healthcare Life Sciences) #28-9670-70) 상으로의 흡착을 통해 정제하고, PBS에서 세척하고, 200 μ l의 글리신 200 mM pH 2.5로 2회 용리시키고, TRIS-HCl 1 M pH 9.0에서 중화시켰다. 정제된 항체를 PBS에서 사전-평형화된 제바 스핀 (Zeba Spin) 수지 (피어스 (Pierce))를 사용하여 탈염하고, 0.22 μ M 막 (밀리포어 (Millipore))을 통해 필터 멸균하였다. 항체 용액의 최종 농도를 나노-드롭 (#ND-1000)에 의해 측정하였다.
- [0128] 실시예 2: 항-AXL mAb의 교차-반응성 평가
- [0129] 재조합 AXL 액토도메인에 대한 실시예 1에서 정제된 항-hAXL 모노클로날 항체의 교차-반응성 결합 특성을 평가하였다.
- [0130] TAM 수용체 티로신 키나제 서브페밀리의 다른 구성원에 대한 mAb의 교차-반응성을 평가하기 위해, rhAXL-ECD, rhMER-ECD, rhTyro-3 및 BSA (음성 대조군)에의 mAb의 결합을 ELISA에 의해 측정하였다. 96-w 반-면적 플레이트 (코스타)를 PBS에서 25 μ l의 5 μ g/ml rhAXL-ECD, rhMER-ECD, rhTyro-3 또는 BSA로 코팅하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBS로 3회 세척하고, PBS-BSA 1%로 차단하고, PBS-BSA 1%에 희석된 25 μ l의 10 μ g/ml를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-트윈 TM

20 0.05%로 4회 세척하고, 차단 완충제에 1/5000 희석된 2차 항체 알칼리성 포스파타제 접합된 F(ab)'2 염소 항-마우스 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치) 25 μ l와 함께 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS-트윈 20 0.05%로 4회 세척 후, 25 μ l의 1 mg/ml pNPP 기질 용액을 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. OD405nm 측정을 마이크로플레이트 판독기 (스펙트라맥스 340 PC, 몰리큘라 디바이시즈)를 사용하여 수행하였다.

[0131] 표 1은 동일한 단백질 패밀리로부터의 다른 표적에 대한 항-AXL 모노클로날 항체의 교차-반응성 평가의 결과를 제공한다. OD405nm에서의 측정이 나타내어진다.

[0132] <표 1>

표 1 항-AXL mAb의 교차-반응성 평가				
정제된 항체	코팅 항원			
	AXL	MER	Tyro3	BSA
F107-7H5-2	2.403	0.000	0.000	0.000
F107-8D12-2	2.592	0.000	0.000	0.000
F107-10G1-3	1.758	0.000	0.000	0.000
F111-3C8-2	2.301	0.000	0.000	0.000
F111-5E9-2	1.364	0.000	0.000	0.000

[0133]

[0134] 교차-반응성 평가의 결과는 5종의 mAb가 AXL의 세포외 도메인에 특이적으로 결합함을 지시하며, 즉, 이들은 BSA 또는 TAM 패밀리의 다른 구성원, 즉, Tyro3 및 MER의 세포외 도메인과 교차-반응하지 않는다.

[0135] 실시예 3: ADC 잠재성에 대한 기능적 특징규명

[0136] 실시예 1에서 정제된 항-hAXL-ECD 모노클로날 항체를 ADC 대용물 스크리닝 검정에서 그들의 내재화 능력 및 항체-약물 접합체 (ADC) 잠재성에 대해 평가하였다. 비-소세포 폐암 (NSCLC) A549 세포, 유방암 MDA-MB 231 세포, 또는 교모세포종 U87MG 세포를 사용하였으며, 이를 모두는 중간 내지 높은 수준의 AXL을 발현한다. 관심의 종양 표적 (즉, AXL)을 발현하는 것으로 공지된 1종 초과의 종양 세포주에서 2차 접합체 사포린-기재 세포독성 스크리닝에서 낮은 또는 nM 이하 (IC₅₀) 효능을 나타내는 mAb를 선택하였다.

[0137] 세포 배양. 하기 세포주를 ATCC로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다: A549 인간 비-소세포 폐암 (NSCLC), MDA-MB-231 삼중 음성 (ER-/PR-/HER2low) 유방암 (TNBC), 및 U87MG 교모세포종 세포주. 일반적으로, 세포를 1주 1회 또는 2회 계대하고, 모든 실험에 대해 4 내지 6주 내에 사용하였다.

[0138] 항체-약물 접합체로서의 항체-매개 세포독성의 평가. 1차 마우스 항체 (농도에 있어서 전형적으로 1 nM)를 사포린 독소로 화학적으로 접합된 등물 농도의 항-마우스 2차 항체 (어드밴스드 타겟팅 시스템 (Advanced Targeting Systems), 미국 캘리포니아주 샌 디에고), 세포 사멸을 유발하기 위해 내재화되는 데 필요한 리보솜 불활성화 효소와 함께 인큐베이션하였다. 그 후, 항체 복합체를 지시된 세포 유형에 첨가하고 (삼중으로 플레이팅됨), 세포 생존율에 대한 그들의 효과를 37°C에서 3일의 인큐베이션 후에 측정하였다. 1차 항체 없이 (2차 항체 단독) 또는 무관한 1차 항체 (대조군 인간 IgG)와의 인큐베이션을 사용하여 비-표적-지정된 세포독성을 평가하였다. 세포 생존율 및 대사를 통상적인 방법, 예컨대 알라마 블루 (Alamar Blue)와 같은 레수리진 염료 또는 단백질 함량을 측정하기 위한 시약, 예컨대 술포로다민 B의 사용을 사용하여 측정하였다.

[0139] A549 NSCLC 세포를 100 μ l RPMI-5% FBS에서 2000개 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에서 RPMI-5% FBS에 시딩하였다. 다음 날, 20 nM의 항-AXL mAb를 20nM의 Mab-Zap 2차 항체 (어드밴스드 타겟팅 시스템, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)와 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고; 11 μ l의 이 혼합물을 항-AXL mAb (F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 또는 F107-10G1) 및 사포린-접합된 항-마우스 2차 항체 (Mab-Zap)의 1:1 복합체의 1 nM 최종 농도가 세포와 함께 인큐베이션되도록 세포에 삼중으로 첨가하였다. 72시간의 인큐베이션 (37°C, 5% CO₂, 습윤 인큐베이터) 후, 세포 생존율을 알라마 블루를 제조자의 지시서 (바이오소스)에 따라 사용하여 측정하였다. 이어서, 1nM 농도에서 A549 세포 생존율의 50% 초과의 감소를 유발한 항체를 또한 상기

기재된 방법을 사용하여 유방암 MDA-MB 231 세포, 또는 교모세포종 U87MG 세포주에 대한 세포독성 효과에 대해 시험하였다.

[0140] **도 2**는 항-hAXL-ECD mAb에 대한 ADC 대용률 스크리닝 검정의 결과를 나타낸다. 검정에서 항체는 2차 접합체 단독 (Mab-Zap)으로 처리된 세포에 비해 A549 세포 생존의 현저한 감소를 유발하였다. 삼중 실험의 평균 값+SEM 이 나타내어진다.

[0141] **도 2**에서, 세포의 생존이 mAb-ZAP 2차 접합체 단독의 그것 (100%로서 나타내어짐)에 비해 표현된다. 선택된 mAb 클론 (F107-7H5, F107-8D12, F107-10G1, F111-3C8, 및 F111-5E9)은 A549 세포에서 및 적어도 1종 이상의 세포주에서 생존율의 50% 초과의 감소를 유발하였으며, 고도로 세포독성 약물 DM1에의 직접적 접합을 위해 선택하였다. 시험된 250개 초과의 1차 마우스 mAb 중으로부터, 이들 5종의 항체와 연관된 높은 정도의 세포독성 ($IC_{50}<1nM$)은 이들이 높은 정도의 내재화 및 사포린 독소의 활성화를 달성하기 위한 적절한 세포내 경로화를 나타내며, 이는 이들을 ADC 개발에 이상적으로 만듦을 입증한다. 놀랍지 않게, 이 스크린에서 확인된 항체는 모두 종양 세포의 표면 상에 AXL에의 주목할 만한 결합을 나타내었다 (**도 3**).

[0142] **도 3**은 세포 표면-발현된 AXL에의 항-AXL mAb의 결합 특성을 측정하는 유동 세포측정 실험의 결과를 나타낸다. 패널 A는 선형 규모 용량-반응 곡선을 나타내는 반면, 패널 B는 로그 규모 용량 반응 곡선을 나타낸다.

[0143] 실시예 4: DM1 접합 및 ADC 시험

[0144] 실시예 1에서 정제된 항-hAXL-ECD 모노클로날 항체를 리신 잔기를 통해 N2'-데아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (DM1)에 연결된 숙신이미딜 트랜스-4-[말레이이미딜메틸] 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC)에 접합시켰다. 생성물 순도 및 약물:항체 비를 UPLC 기재 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정하였다.

[0145] 접합: 정제된 항-hAXL-ECD mAb (F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 또는 F107-10G1; 실시예 1)를 사전-평형화된 스픈 탈염 컬럼을 사용하여 접합 완충제 (100 mM 인산나트륨, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 7.2)로 완충제-교환하였다. 각각의 mAb의 농도를 접합 완충제로 2 mg/mL로 조정하고, 각각의 총 200 μ g를 접합에 사용하였다. SMCC-DM1의 스톡 용액을 디메틸아세트아미드 (DMA)에서 제조하였다. DMA 스톡 용액으로부터의 SMCC-DM1을 각각의 mAb에 첨가하여 10.0의 물 SMCC-DM1:mAb 비를 달성하였다. 용액을 철저히 혼합하고, 37°C에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 혼합물을 0.02% w/v 폴리소르베이트 (Polysorbate)-20 첨가된 접합 완충제에서 평형화된 2개의 스픈 탈염 컬럼을 통해 통과시킴으로써 반응을 정지시켰다.

[0146] 약물-항체 비 (DAR)를 280 nm 및 252 nm 둘 다에서 UPLC-SEC 크로마토그램으로부터의 단량체 피크를 적분하고, 이들을 동일한 파장에서 비접합된 항체 및 유리 약물에 대한 소광 계수의 비와 비교함으로써 측정하였다. 퍼센트 단량체를 단량체의 총 적분된 면적으로부터 측정하고, 고-분자량 종 및 저-분자량 종을 크로마토그램에서 관찰하였다. 결과를 **표 2**에 나타내며, 이는 DM1에 접합된 F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 및 F107-10G1에 대한 UPLC-SEC에 의해 측정된 약물-항체 비 및 퍼센트 응집체를 제공한다.

[0147] <표 2>

표 2 약물-항체 비 및 퍼센트 응집체		
mAb	DAR	퍼센트 응집체
F111-3C8	7.21	27.0
F107-7H5	5.46	1.1
F107-8D12	4.90	1.8
F107-10G1	5.21	0.7
F111-5E9	5.22	1.1

[0148] [0149] 세포 배양. NCI-H292 및 A549 인간 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 MDA-MB-231 삼중 음성 (ER-/PR-/HER2low) 유방암 (TNBC) 세포주를 ATCC로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다. HaCaT 세포는 피부 생물학 및 분화의 연구에 폭넓게 사용된 자발적으로 불멸화된 인간 각질세포주이다. 이 세포주를 독일 하이텔베르크 셀 라인 서비스 (Cell Line Services), DKFZ로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다. 일반적으로, 세

포를 1주 1회 또는 2회 계대하고, 모든 실험에 대해 4 내지 6주 내에 사용하였다.

[0150] ADC 시험: 상기 제조된 항-AXL ADC를 비-소세포 폐암 (NSCLC) NCI-H292 및 A549 세포주, 인간 유방 선암종 MDA-MB-231 종양 세포주, 뿐만 아니라 불멸화 각질세포를 비롯한 AXL을 발현하는 것으로 공지된 다양한 배양된 세포주의 생존율에 대한 그들의 효과에 대해 시험하였다. 5일의 노출 후, 세포 성장/생존율을 술포로다민 B 시약을 사용하여 평가하고, 용량-반응 곡선을 생성하여 그레프페드 프리즘 (GraphPad Prism) v6.0 소프트웨어로부터 로그(억제) 대 반응 -- 가변 기울기 (4 파라미터) 모델을 사용하여 그들의 효능 (IC_{50}) 및 효력 (%) 최대 억제)을 측정하였다.

[0151] 도 4는 AXL을 발현하는 H292 종양 세포주, A549 세포주, 인간 유방 선암종 MDA-MB-231 종양 세포주, 뿐만 아니라 불멸화 HaCaT 각질세포 세포에서의 세포 생존율에 대한 항-AXL-DM1 접합체의 활성의 결과를 나타낸다.

[0152] DM1-접합된 항-AXL 항체는 비-표적화된 무관한 인간 IgG-DM1 접합체 음성 대조군에 비해 분석된 종양 세포주에서 양호한 효력 (55 내지 74% 최대 성장 억제로부터) 및 강한 효능 ($IC_{50} < 0.1$ nM)을 입증하였다. 대조적으로, 매우 적은 독성이 AXL을 발현하는 비-종양형성, 불멸화 HaCaT 각질세포 세포에 대해 보여졌다.

[0153] 표 3은 항-AXL 항체의 ADC 시험의 결과를 제공한다. % max inh = 퍼센트 최대 억제.

[0154] <표 3>

표 3 항-AXL 항체의 ADC 시험의 결과						
세포주		F107-7H5-DM1	F107-8D12-DM1	F107-10G1-DM1	F111-3C8-DM1	hIgG-DM1
H292 NSCLC	IC_{50} (nM)	0.113	0.176	0.044	0.419	0.159
	% 최대 억제	74.0	72.8	57.7	70.3	64.6
A549 NSCLC	IC_{50} (nM)	0.120	0.218	0.058	0.313	0.169
	% 최대 억제	58.5	61.8	55.7	71.2	70.0
231 TNBC	IC_{50} (nM)	0.037	0.056	~ 0.029	0.147	0.067
	% 최대 억제	71.4	73.4	64.9	77	69.2
HaCaT	IC_{50} (nM)	효과 없음	효과 없음	효과 없음	효과 없음	효과 없음
	% 최대 억제	불완전	불완전	불완전	불완전	불완전

[0155] [0156] 실시예 5: 유동 세포측정에 의한 세포 표면 결합

[0157] 세포 표면 상의 AXL에의 실시예 1에서 정제된 항-hAXL-ECD 모노클로날 항체의 결합 특성을 항-hAXL-ECD mAb에 의한 그의 강한 억제로 인해, H292 세포주를 사용하여 유동 세포측정에 의해 평가하였다 (실시예 2 참조).

[0158] 유동 세포측정에 의한 표면 AXL에 결합하는 항체의 검출. 분석 전에, 세포를 이들이 분석의 날에 80% 이하 전면 생장하도록 플레이팅하였다. 세포를 PBS에서 세척하고, 세포 해리 완충제 (시그마)의 첨가에 의해 수확하였다. 2.5×10^5 개의 세포 ($500 \mu l$ 상응하는 세포 배양 배지 중)를 함유하는 세포 혼탁액을 다양한 농도 (0.01 내지 10nM)의 항-AXL 항체와 함께 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다 (내재화를 방지하기 위해). 세포 배양 배지로 1회 세척 후, 1차 항체를 $2 \mu g$ 다이라이트™ 488 접합된 아피니퓨어 (AffiniPure) 염소 항-마우스 IgG 알렉사 488 2차 항체 (액슨 이뮤노리서치)와 함께 $100 \mu l$ 의 배지에서 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 분석 전에, 세포 펠릿을 300 내지 $500 \mu l$ 배지에 재-현탁시키고, $50 \mu m$ 나일론 메쉬 필터를 통해 여과하여 세포 응집체를 제거하였다. 유동 세포측정 분석을 전방향 스캐터링, 측면 스캐터링 파라미터 및 아이오드화프로피듐 염료 배제 상에 게이팅된 10,000개의 생존성 세포에 대해 BD LSRII 유동 세포측정기 (베톤-디킨슨 바이오사이언시즈 (Becton-Dickinson Biosciences), 미국 캘리포니아주) 및 BD 팩스디바 (BD FACSDiva)™ 획득 소프트웨어를 사용하여 설정된 표준 필터를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 수행하였다.

[0159] 항체 결합의 특이적 검출을 1차 항체 (그러나 검출 항체를 함유하지 않음)의 부재 하에서의 결합의 평균 형광 강도의 배경 수준 삭감 후에 각각의 1차 항체에의 결합의 평균 형광 강도로서 계산하였다. 그 후, 결합 파라미터 B_{max} , (수용체 포화에서의 최대 형광 신호), 및 KD (결보기 세포 결합 상수)를 그레프페드 프리즘 v 6.0에서 힐 슬로프를 갖는 한 부위 - 특이적 결합 (One site - Specific binding with Hill slope) 모델을 사용하여 측정하였다.

[0160] 결과를 도 3 및 표 4에 나타낸다. 이를 결과는 mAb 7H5, 8D12, 및 5E9가 음성-결합 대조군 (300 nM 마우스

IgG)에 비해 강하게 결합하였음을 나타내었다 (겉보기 결합 상수, $K_D \leq 1\text{nM}$ 을 가짐).

[0161] 표 4는 H292 세포 상의 세포-기재 AXL에의 항-AXL mAb의 결합 특성을 제공한다.

[0162] <표 4>

표 4 H292 세포 상의 세포-기재 AXL에의 항-AXL mAb의 결합 특성					
최량-적합 값	F107- 8D12	F107- 7H5	F111- 3C8	F107- 10G1	F111-5E9
Bmax (MFI)	1309	1431	1477	937	1149
Kd (nM)	0.08802	0.1038	1.227	0.1005	0.1767

[0163]

[0164] 실시예 6: 에피토프 비닝 실험

[0165] 실시예 1의 항-hAXL-ECD mAb가 동일한 에피토프 영역에 결합하는지 여부를 평가하기 위해, 표면 플라즈몬 공명 에피토프 비닝 실험을 수행하였다.

[0166] 항체를 침 표면 ('mAb1') 상에 직접적으로 고정화한 후, rhAXL ECD를 유동시키고, 이어서 동일하거나 상이한 항체 ('mAb2')를 유동시켰다. 모든 실험은 구동 완충제로서 PBST (0.05% v/v 트원20을 갖는 PBS)를 사용하여 25 °C에서 프로트온 (ProteOn) XPR36 바이오센서 상에서 수행하였다. GLM 센서 칩 및 커플링 시약 (10mM 아세트산 나트륨, pH 4.5, 술포-N-히드록시숙신이미드 (SNHS), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디아미드 히드로 클로라이드 (EDC), 및 에탄올아미드)은 바이오래드, 임크 (BioRad, Inc) (미국 캘리포니아주 허큘레스)로부터 구입하였다.

[0167]

항체 어레이의 생성. 항체 (Mab1)를 GLM 칩 표면 상에 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 에서 고정화하였다. 활성화 시약 (물 중 0.4M EDC 및 0.1M SNHS의 스톡 농도에서)을 물에 각각 20배 희석하였다. 상부 (A1) 수평 채널 (프로트온 제어 소프트웨어에서의 분석물 채널)을 희석된 활성화 시약으로 3분 동안 활성화시켰다. 다음으로, mAb (실시예 1)를 각각 10 mM 아세테이트 pH4.5에 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고, 별개의 수직 (L1 내지 L6) 채널 (프로트온 제어 소프트웨어에서의 리간드 채널)에서 3분 동안 주사, 이어서, 에탄올아민의 3분 주사로 반응성 스팟을 차단하였다. 그 후, 다중-채널 모듈 (MCM)을 회전시키고, 에탄올아민의 또 다른 3분 주사를 활성화된 수평 채널 (A1) 상에서 수행하였다. 그 후, 이 4-단계 '활성화-결합-및-2x 탈활성화' 절차를 수평 채널 (A2 내지 A6)의 각각에 대해 반복하였다.

[0168]

샌드위치 에피토프 비닝. 2-단계 샌드위치 에피토프 비닝을 분석물 배향에서 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 에서 수행하였다. 100nM rhAXL-ECD 단백질을 3분 동안 주사한 직후, 100nM의 mAb2를 3분 주사하였다. 고정화된 mAb (mAb1) 표면을 100 $\mu\text{l}/\text{분}$ 에서의 0.85% 인산의 18초 주사에 의해 재생하였다. 이 2-단계 주사 (rhAXL-ECD-mAb2)를 각각의 개별적 mAb2에 대해 반복하였다. 각각의 mAb를 또한 mAb1 (침 상에 고정화됨) 및 mAb2 (용액 중)와 동시에 시험하였다. 고정화된 mAb1로부터 AXL 해리를 모니터링하기 위해 PBST를 mAb2 대신 주사하였다.

[0169]

표 5는 mAb에 대한 에피토프 비닝 결과를 제공한다. "nc"로 표기된 세포는 경쟁 없음을 지시하고, "sc" 세포는 자기-경쟁을 지시하고, "C" 세포는 경쟁을 지시한다.

[0170]

<표 5>

표 5 mAb에 대한 에피토프 비닝 결과					
	F107-8d12	F107-7H5	F111-3C8	F111-5E9	F107-10G1
F107-8D12	sc	C	nc	nc	nc
F107-7H5	C	sc	nc	nc	nc
F111-3C8	nc	nc	sc	C	nc
F111-5E9	nc	nc	C	sc	nc
F107-10G1	nc	nc	nc	nc	sc

[0171]

[0172]

표 5에 나타내어진 결과로부터, mAb 중 4종은 2개의 에피토프 빈에 해당함, 즉, 이들은 AXL에의 결합에 대해 서로와 경쟁하며; 7H5는 8D12와 경쟁하고, 그 역도 마찬가지이고, 3C8은 5E9와 경쟁하고, 그 역도 마찬가지임을 알 수 있다. 10G1은 다른 mAb와 경쟁하지 않는다. 대조적으로, ADC 대용물 검정에서 내재화되는 그들의 능력에 기초하여 선택되지 않은 항-AXL mAb는 그들 자신을 다수의 빈 새로 분포시키는 경향이 있었다 (데이터는 나타내지 않음). 이 데이터는 항체를 내재화하기 위한 기능적 선택이 AXL 세포와 도메인 상의 3개의 주요한 부위에 선택적으로 결합하는 하위세트를 초래함을 시사한다. 더욱이, 유사한 방법을 사용한 추가의 SPR 결합 연구는 이들 부위가 이뮤노글로불린-유사 도메인-1 및 -2 내의 영역에 상응함을 입증하였다. 개별적 AXL 세포와 하위도메인 (이뮤노글로불린-유사 도메인 또는 피브로네틴 유형 III-유사 도메인)으로 수행된 에피토프 비닝 실험 (상기와 동일한 방법)은 mAb F107-10G1이 이뮤노글로불린-유사 도메인-1에서의 서열에 결합하고, 이는 전체 AXL 엑토도메인을 이용한 결과와 일치하게, 시험된 모든 다른 IgL1-결합 항체와 경쟁하는 데 실패하였음을 나타내었다. 이들 결과는 ADC mAb가 상호작용하는 이뮤노글로불린-유사 도메인-1 내의 적어도 2개의 별개의 에피토프가 있음을 지시한다.

[0173]

실시예 7: 효모 표면 제시에 의한 에피토프 지도화

[0174]

효모 표면 제시를 사용하여 실시예 1의 항-hAXL-ECD mAb가 결합하는 서열을 지도화하였다.

[0175]

에피토프 지도화. hAXL 엑토도메인 (ECD) 및 그의 단편을 발현시키고, 효모 표면 제시 방법을 사용하여 효모 세포의 표면 상에 공유적으로 제시하였다 (Feldhaus et al., 2003). YSD 벡터 (pPML6)는 미국 더 퍼시픽 노쓰 웨스트 내셔널 래버리토리 (The Pacific Northwest National Laboratory)로부터의 것이었다. 전체 hAXL-ECD를 커버하는 hAXL 단편 (도 5)은 효모 세포 표면 상에 융합 단백질 (Aga2-HA-(hAXL)-MYC로서 발현되었다. 제시된 hAXL 단편을 사용하여 실시예 1의 항-hAXL-ECD mAb가 결합하는 hAXL의 도메인을 지도화하였다. 효모 세포에의 mAb의 결합을 전체 효모 세포 ELISA를 사용하여 수행하였다. 제시된 융합 단백질의 상대량을 항-MYC 항체로, 이어서 HRP-접합된 2차 항체로 탐색함으로써 측정하고, 실시예 1의 mAb에 대한 결합 신호를 정규화하는 데 사용하였다.

[0176]

도 5는 인간 AXL 엑토도메인 및 막횡단 도메인의 개략적 도시이다. 전체 hAXL-ECD를 커버하는 10개의 웹티드를 효모 막 상에 발현시켜 항-AXL mAb의 결합 에피토프를 지도화하였다. 웹티드를 제시하고, 1 내지 10으로 넘버링하였다.

[0177]

표 6은 제시된 효모 세포 상의 AXL 세포와 도메인에서의 다양한 영역에의 항-AXL mAb 결합의 결과를 나타낸다. 실시예 1의 mAb는 2개의 영역에 결합한다: 이뮤노글로불린-유사 도메인 1 (IgL1, aa 26 내지 138에 상응함) 또는 이뮤노글로불린-유사 도메인 2 (IgL2, aa 135 내지 226에 상응함) 중 어느 하나. 이들 결과는 실시예 6에서 얻어진 결과와 일치한다.

[0178]

<표 6>

표 6 AXL 세포의 도메인에서의 다양한 영역에의 항-AXL mAb 결합의 결과		
mAb	에피토프 위치	에피토프 입체형태
F107-7H5	IgL1	입체형태적
F107-8D12	IgL1	입체형태적
F111-5E9	IgL2	입체형태적
F111-3C8	IgL2	입체형태적
F107-10G1	IgL1	입체형태적

[0179]

[0180] 에피토프의 성질. mAb에 대한 에피토프가 연속적 (선형)인지 비-연속적 (입체형태적)인지를 측정하기 위해, IgL1 또는 IgL2 도메인 중 어느 하나의 다양한 단편을 발현시키고, 효모 세포 상에 제시하고, 상기 기재된 바와 같이 세포 ELISA를 사용하여 mAb에의 결합에 대해 검정하였다. 양쪽 IgL 도메인의 하위-단편 중 어느 것도 실시예 1의 임의의 mAb에 유의하게 결합하지 않지만, 이를 하위-단편은 항-MYC 신호의 신호에 의해 판단된 바와 같이 효모 세포의 표면 상에 잘 제시되었다. 이들 결과는 실시예 1의 mAb에 대한 에피토프가 IgL 도메인의 전체 서열 정보를 요구하며, 따라서 대체로 입체형태적임을 강하게 시사한다.

[0181]

실시예 8: 항체 시퀀싱

[0182]

실시예 1의 항-hAXL mAb의 VH 및 VL 도메인을 시퀀싱하고, 분석하였다.

[0183]

VH 및 VL 도메인 뿐만 아니라 CDR 영역의 서열을 표 7에 나타낸다. VH 및 VL 쇄의 CDR 1 내지 3 영역의 컨센서스 결합 서열에 대한 서열의 분석을 웹-기재 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 이 분석의 결과는 mAb F107-7H5의 VH 및 VL 영역 둘 다의 CDR 영역이 F107-8D12의 그것과 매우 유사함 (2 아미노산 변화)을 지시하였다. 이들 항체는 함께 클러스터화하며, IgL1 내의 공통적인 선형 에피토프를 인식한다. 대조적으로, 항체의 나머지는 보다 작은 분화된 클러스터를 형성하는 경향이 있으며, 이들의 대다수는 IgL2에 결합하며, F107-10G1은 예외이다 (이는 선택된 대다수의 IgL1 결합 항체와 별개인 IgL1 상의 부위에 결합함).

[0184]

<표 7>

mAb	표 7 mAb F107-7H5, F107-8D12, F111-5E9, F111-3C8, 및 F107-10G1에 대한 CDR 서열		
	경쇄 CDR		중쇄 CDR
F107-7H5	V _L	SEQ ID NO:38	V _H SEQ ID NO:39
	L1	KSSQSLNSRTRKIYLA (SEQ ID NO:9)	H1 GYTFTSYWIN (SEQ ID NO:12)
	L2	WASTRQS (SEQ ID NO:10)	H2 NIYPDSSSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:13)
	L3	KQSYNLWT (SEQ ID NO:11)	H3 DTYGGSPDY (SEQ ID NO:14)
F107-8D12	V _L	SEQ ID NO:40	V _H SEQ ID NO:41
	L1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:15)	H1 GYTFTISFWIN (SEQ ID NO:17)
	L2	WASTRES (SEQ ID NO:16)	H2 NIFPGSSSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:18)
	L3	KQSYNLWT (SEQ ID NO:11)	H3 DYVGGSPDY (SEQ ID NO:19)
F111-3C8	V _L	SEQ ID NO:42	V _H SEQ ID NO:43
	L1	SASSSVSYMY (SEQ ID NO:26)	H1 GYTFTSYWMH (SEQ ID NO:29)
	L2	RTSNLAS (SEQ ID NO:27)	H2 NINPNSTSADYNEKFKR (SEQ ID NO:30)
	L3	QQYHNYPPT (SEQ ID NO:28)	H3 PLMGPYWYFDV (SEQ ID NO:31)
F111-5E9	V _L	SEQ ID NO:44	V _H SEQ ID NO:45
	L1	RASQDINNYLN (SEQ ID NO:20)	H1 KYGMN (SEQ ID NO:23)
	L2	YISRLHS (SEQ ID NO:21)	H2 WINTYTGEPTYADDFKG (SEQ ID NO:24)
	L3	QQGNTLPFT (SEQ ID NO:22)	H3 GGYYSNPIYPMDY (SEQ ID NO:25)
F107-10G1	V _L	SEQ ID NO:46	V _H SEQ ID NO:46
	L1	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO:32)	H1 NYGMS (SEQ ID NO:35)
	L2	WASTRHT (SEQ ID NO:33)	H2 SISGGGGRTYYLDNVKG (SEQ ID NO:36)
	L3	QQHFTTPLT (SEQ ID NO:34)	H3 GARASYFAMDY (SEQ ID NO:37)

[0185]

[0186] 실시예 9: 재조합 항체 제조 및 정제

[0187]

대규모 mAb 제조 및 제조 사이의 일관성을 용이하게 하기 위해, 실시예 8에서 확인된 항-hAXL-ECD mAb를 CHO 세포에서 재조합적으로 제조하였다.

[0188]

VH 및 VL 영역 (실시예 8 참조)을 인간 IgG1 불변 영역 (각각 인간 IgG1 중쇄 및 인간 카파 경쇄)을 갖는 응합물로서 pTT5 벡터 내로 클로닝함으로써, 키메라 mAb를 생성하였다.

[0189]

표 8은 키메라 mAb의 각각에 대한 서열을 제공한다: hFC-F107-7H5, hFC-F107-8D12, hFC-F111-5E9, hFC-F111-3C8, 및 hFC-F107-10G1. 또한, 모든 경쇄 서열은 N-말단에 신호 서열 MVLQTQVFISLLLWISGAYG (서열식별번호:59)를 포함한 반면, 중쇄 서열은 N-말단에 신호 서열 MDWTWRLFLVAAATGTHA (서열식별번호:60)를 포함하였다.

[0190]

<표 8>

표 8 키메라 mAb의 서열	
mAb	서열
hFC-F107-7H5 경쇄	SEQ ID NO:48
hFC-F107-7H5 중쇄	SEQ ID NO:49
hFC-F107-8D12 경쇄	SEQ ID NO:50
hFC-F107-8D12 중쇄	SEQ ID NO:51
hFC-F111-3C8 경쇄	SEQ ID NO:52
hFC-F111-3C8 중쇄	SEQ ID NO:53
hFC-F111-5E9 경쇄	SEQ ID NO:54
hFC-F111-5E9 중쇄	SEQ ID NO:55
hFC-F107-10G 경쇄	SEQ ID NO:56
hFC-F107-10G 중쇄	SEQ ID NO:57

[0191]

[0192]

키메라 mAb 발현을 2 mL 발현 스카우트를 통해 확인하였다: CHO 세포를 VL 및 VH 함유 구축물 (1:1 비)로 일시적으로 형질감염시키고; 컨디셔닝된 배지 (CM)를 제7일에 수확하고, mAb 발현 수준을 SDS-PAGE에 의해 평가하였다 (데이터는 나타내지 않음). 키메라 mAb는 잘 발현하였으며, 소규모 제조 (50 mL)를 CHO 세포를 동일한 구축물 비로 일시적으로 형질감염시킴으로써 개시하였다. 컨디셔닝된 배지 (CM)를 제7일에 수확하고, 키메라 mAb를 정제하고 (ProtA), 정량하고, SDS-PAGE에 의해 평가하였다. 데이터는 모든 5종의 키메라 mAb가 일시적으로 형질감염된 CHO 세포에 의해 잘 발현되었음을 나타내었다.

[0193]

제조합적으로 발현된 키메라 mAb가 하이브리도마-발현된 mAb와 유사하게 거동하는지를 확인하기 위해, SPR 결합 실험을 AXL 결합이 손상되지 않음을 보장하기 위해 수행한다.

[0194]

실시예 10: 항-AXL mAb 및 sdAb의 단리

[0195]

이 실시예에서, 인간 AXL 엑토도메인에 대해 지정된 라마 sdAb의 단리를 수행한다.

[0196]

물질 및 방법

[0197]

제조합 인간 AXL 엑토도메인 (rhAXL ECD)의 제조. C-말단적으로 His₈-태그부착된 제조합 인간 AXL 세포와 도메인의 합성 제조합 단편을 함유하는 포유동물 발현 백터 (pTT5)를 CHO 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, Ni-아가로스에 의해 정제하고, SDS-PAGE에 의해 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0198]

라마 단일 도메인 항체 (sdAb) 생성. 라마 sdAb (VHH)를 라마를 rhAXL ECD 단백질로 면역화하고, 이어서 말초 혈액 림프구로부터 구축된 과지-제시된 VHH 라이브러리를 패닝함으로써 생성하였다. 간략하게, 하나의 라마 (라마 글라마 (Lama glama))를 제0일, 제21일, 제28일, 제35일 및 제42일에 100 µg의 rhAXL로 면역화하였다. 항원을 제0일에 프로인트 완전 아주반트, 및 제21일, 제28일, 제35일 및 제42일에 프로인트 불완전 아주반트와 혼합하였다. 혈청을 제0일의 제1 면역화 (사전-면역) 전에 뿐만 아니라 제35일 및 제49일에 뽑아낸 후, 단백질 A 및 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 사용하여 중쇄 IgG (hcIgG)로부터 별개의 통상적인 IgG (cIgG) 내로 분획화하였다. 비분획화된 및 분획화된 혈청 상의 rhAXL에 대한 ELISA를 수행하였다. 간략하게, PBS에 희석된 1 µg의 rhAXL을 96 웰 맥시소르프 (MAXISORP)™ 플레이트 (날지 눈크 인터내셔널 (Nalge Nunc International), 미국 뉴욕주 로체스터)에서 밤새 코팅하였다 (100 µl/웰, 18시간, 4°C). 플레이트를 5% 탈지유/PBST로 차단하고, PBS-T (PBS + 0.05% (v/v) 트윈 20)로 세척하고, 사전-면역 총 (비분획화된) 혈청, 면역후 총 혈청 (제35일 및 제49일) 및 분획화된 혈청 (제49일; 100 µg/ml 출발 농도)의 계열 희석을 적용하였다. 실온에서 1.5 시간 동안 인큐베이션 및 PBS-T로의 세척 후, 염소 항-라마 IgG-HRP (PBS 중 1:10,000)를 37°C에서 1시간 동안 첨가하였다. 최종 PBS-T 세척은 10분 동안의 100 µl/웰 TMB 기질 (KPL, 미국 매릴랜드주 게이더스버그)의 첨가를 진행하였다. 반응을 100 µl/웰 1 M H3P04로 정지시키고, 바이오래드 플레이트 판독기 (미국 캘리포니아주 허큘레스) 상에서 450 nm에서 판독하였다.

[0199]

과지-제시된 VHH 라이브러리 구축을 위해, RNA를 퀴아앰프 RNA 블러드 미니 키트 (QIAamp RNA Blood Mini Kit) (퀴아젠 (QIAGEN), 캐나다 온타리오주 미시소거)를 사용하여 면역화 후 제35일 및 제49일에 수집된 대략 5 × 10⁷ 개의 림프구로부터 단리하였다. 대략 10 µg의 총 RNA를 제1-가닥 cDNA 합성 키트 (First-Strand cDNA Synthesis Kit) (지이 헬스케어 (GE Healthcare), 캐나다 케벡주 베-듀흐페)를 사용한 올리고 dT 프라이머로의

제1 가닥 cDNA 합성에 대한 주형으로서 사용하였다. cDNA를 3개의 가변 영역-특이적 센스 프라이머 (MJ1, MJ2, 및 MJ3) 및 2개의 안티센스 CH2-특이적 프라이머 (CH2 및 CH2b3)의 등을 믹스에 의해 PCR-증폭시켰다. 간략하게, PCR 반응 혼합물을 하기 성분을 갖는 50 μ l의 총 부피에서 설정하였다: 5 μ l cDNA, 5 pmol의 MJ1-3 프라이머 혼합물, 5 pmol의 CH2 또는 CH2b3 프라이머 중 어느 하나, 5 μ l의 10x 반응 완충제, 1 μ l의 10 mM dNTP 및 2.5 단위의 플래티넘 (PLATINUM)® Taq DNA 폴리머라제 (인비트로젠 (Invitrogen)/라이프 테크놀로지스 (Life Technologies), 캐나다 온타리오주 벌링تون). PCR 프로토콜은 94°C에서 3분 동안 초기 단계, 이어서 94°C에서 30초 동안, 57°C에서 45초 동안, 72°C에서 1분 동안의 30 사이클, 및 72°C에서 10분 동안 최종 연장 단계로 이루어졌다. 증폭된 PCR 생성물을 2% 아가로스 젤에서 구동시켰으며, 2개의 주요 밴드가 관찰되었다: 통상적인 IgG에 상응하는 약 850 bp의 밴드, 및 중쇄 항체 (hcIgG)에 상응하는 약 600 bp의 제2 밴드. 보다 작은 밴드를 커팅하고, 퀴아퀵 젤 추출 키트 (QIAquick Gel Extraction Kit) (퀴아젠)를 사용하여 정제하고, 1 μ l의 DNA 주형, 5 pmol의 각각의 MJ7 프라이머 및 MJ8 프라이머, 5 μ l의 10x 반응 완충제, 1 μ l의 10 mM dNTP 및 2.5 단위의 플래티넘® Taq DNA 폴리머라제를 사용하여 50 μ l의 총 부피에서 제2 PCR에서 재-증폭시켰다. PCR 프로토콜은 94°C에서 3분 동안 초기 단계, 이어서 94°C에서 30초 동안, 57°C에서 30초 동안 및 72°C에서 1분 동안의 30 사이클, 및 72°C에서 7분 동안 최종 연장 단계로 이루어졌다. 340 bp 내지 420 bp 범위 및 hcIgG의 VHH 단편에 상응하는 증폭된 PCR 생성물을 퀴아퀵 PCR 정제 키트 (QIAquick PCR Purification Kit) (퀴아젠)를 사용하여 정제하고, SfiI 제한 효소 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England BioLabs), 캐나다 온타리오주 피커링)로 소화시키고, 동일한 키트를 사용하여 재-정제하였다. 50 마이크로그램의 pMED1 파지미드를 SfiI로 50°C에서 밤새 소화시켰다.

[0200]

자기-라이게이션을 최소화하기 위해, 20 단위의 XhoI 및 PstI 제한 효소를 첨가하고, 소화 반응물을 37°C에서 추가의 2시간 동안 인큐베이션하였다. 20 마이크로그램의 소화된 파지미드 DNA를 T4 DNA 리가제 (인비트로젠) 및 그의 프로토콜을 사용하여 실온에서 3시간 동안 6 μ g의 소화된 VHH 단편으로 라이게이션하였다. 라이게이션된 물질을 퀴아퀵 PCR 정제 키트를 사용하여 100 μ l의 최종 부피에서 정제하고, 기재된 바와 같이 상업적 전기적 TG1 이. 콜라이 (E. coli) 세포 (스트라타진 (Stratagene), 미국 캘리포니아주 라 호야) 내로 5 μ l 부분에서 전기천공하였다. 라이브러리의 크기를 기재된 바와 같이 측정하였다. 라이브러리를 37°C, 250 rpm에서 2시간 동안 2% (w/v) 글루코스의 존재 하에서 성장시켰다. 박테리아 세포를 펠릿화하고, 35% (v/v) 글리세롤을 갖는 2xYT/Amp/Glu (100 μ g/ml 암피실린 및 2% (w/v) 글루코스를 갖는 2 x YT 배지)에 재-현탁시키고, 작은 분취물로 -80°C에서 저장하였다.

[0201]

파지-제시된 라이브러리를 M13K07 헬퍼 파지를 사용하여 구제하였다. AXL-특이적 VHH를 2가지 전략을 사용하여 라이브러리로부터 선택하였다. 첫번째 전략에서, 라이브러리를 문헌 [Zhou et al., 2010]에 기재된 바와 같이 고정화된 rhAXL ECD에 대해 및 A549 종양 세포에 대해 동시에 패닝하였다. 두번째 전략에서, 문헌 [Henry et al., 2016]에 기재된 바와 같이 라이브러리를 rhAXL ECD에 대해 패닝하고, VHH-제시 파지를 AXL-특이적 뮤린 mAb (5E9 및 10G1)으로 경쟁적으로 용리하였다. 라이브러리 파지 및 패닝으로부터 용리된 파지를 문헌 [Henry et al., 2016]에 기재된 바와 같이 일루미나 마이 сек (Illumina MiSeq) 차세대 DNA 시퀀싱을 사용하여 탐문하였다.

[0202]

결과

[0203]

rhAXL ECD에 대해 지정된 VHH를, 상기 방법 색션에 기재된 바와 같이 면역화된 라마로부터 파지-제시된 VHH 라이브러리를 구축하고, 라이브러리의 다양한 선택을 수행함으로써 확인하였다. 투입 (라이브러리) VHH-제시 파지 및 산출 (용리된) VHH-제시 파지를 시퀀싱하고, 특정 선택에서 선택적으로 풍부화된 개별적 VHH 서열을 확인하였다.

[0204]

도 6은 항-rhAXL ECD sdAb의 단리를 위한 전략을 예시한다. 패널 A 및 C에서, rhAXL-ECD로 면역화된 라마로부터 구축된 파지-제시된 VHH 라이브러리를 고정화된 rhAXL 상에 및 AXL+ A549 종양 세포 상에 동시에 패닝하였다. rhAXL ECD에의 결합 및 A549 세포 내로의 내재화에 대해 동시에 풍부화된 VHH (NRC-sdAb001, 서열식별번호: 119; NRC-sdAb002, 서열식별번호: 120) 뿐만 아니라 단지 A549 세포 내로의 내재화에 대해 풍부화된 VHH (NRC-sdAb003, 서열식별번호: 121; NRC-sdAb004, 서열식별번호: 122)를 확인하였다. 패널 B 및 D에서, rhAXL-ECD로 면역화된 라마로부터 구축된 파지-제시된 VHH 라이브러리를 rhAXL ECD에 대해 패닝하고, VHH를 AXL-특이적 mAb 5E9 또는 8D12를 사용하여 경쟁적으로 용리하였다. 이 선택 전략을 사용하여 풍부화된 VHH를 차세대 DNA 시퀀싱을 사용하여 확인하였다.

[0205]

실시예 11: 항-AXL mAb 및 sdAb의 DNA 및 아미노산 서열의 측정

[0206] 이 실시예에서, 항-AXL mAb 및 sdAb (실시예 10에 따라 단리됨)의 DNA 및 아미노산 서열이 기재된다.

물질 및 방법

[0208] 뮤린 mAb 시퀀싱을 위해, 총 RNA를 하이브리도마 클론 (큐아젠, RN이지 (RNEasy))으로부터 추출하고, cDNA (수퍼스크립트 (Superscript)™, 씨모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific), 미국 매사추세츠주 월텀)로 역전사하였다. VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA를 FR1에서 어닐링하는 축퇴성 전방향 프라이머 및 CH1에서 어닐링하는 단일 역방향 프라이머의 혼합물 (노바젠 (Novagen)/EMD 밀리포어 카탈로그 번호 69831-3)을 사용하여 PCR 증폭시켰다 (플래티넘 택 (Platinum Taq) 또는 등가물). 생성된 앰플리콘을 서브클로닝하고 (TOPO-TA), ABI 3730x1 기기 상에서 생거 (Sanger) 방법을 사용하여 시퀀싱하였다.

[0209] 라마 VHH DNA 서열의 측정을 위해, 파지-제시된 VHH 라이브러리를 다양한 시험관내 선택으로 처리하고 (실시예 10에 기재됨), 일루미나 마이색 기기 상에서 2×250 bp 리드를 사용하여 시퀀싱하였다. 관심의 VHH 서열을 전에 비해 선택후 증가된 빈도에 의해 확인하였다. VHH를 코딩하는 DNA 구축물을 상업적으로 합성하고 (진아트 (Geneart), 라이프 테크놀로지즈), 박테리아 발현 벡터 내로 서브클로닝한 후, ABI 3730x1 기기 상에서 생거 방법을 사용하여 다시 확인하였다.

결과

[0211] 7종의 뮤린 mAb의 VH 및 VL 도메인의 DNA 서열을 하이브리도마 세포로부터 유래된 앰플리콘의 생거 시퀀싱에 의해 측정하였다. mAb VH/VL 도메인을 코딩하는 DNA 구축물을 단편 결정화 가능한 영역 (Fc 영역)을 함유하는 포유동물 발현 벡터에서 상업적으로 합성하고, 생거 시퀀싱에 의해 확인하였다.

[0212] 도 7은 볼드체 밑줄 폰트로 나타내어진 국제 면역유전학 (International ImMunoGeneTics) (IMGT) 정보 시스템 정의를 사용한 CDR을 갖는 mAb VH/VL 도메인의 아미노산 서열을 나타낸다. IMGT 정의는 본원에서 CDR 서열을 언급하는 경우 사용된다. CDR의 카바트 정의는 단지 주로 흥미를 위해, IMGT에 대한 대안적 정의로서 도 7에 음영처리 폰트로 나타내어진다. CDR의 IMGT 정의는 약간 더 많은 N-말단 서열을 포함할 수 있는 반면, 카바트 정의는 CDR을 보다 나중에 시작하고, 추가로 C-말단적으로 연장된 것으로서 나타낸다.

[0213] 8개의 라마 VHH의 DNA 서열을 일루미나 마이색 기기 상에서 2×250 bp 리드를 사용하여 측정하였다 (서열을 실시예 10에 기재된 바와 같이 이들 VHH의 단리의 일부로서 측정하였음). VHH를 코딩하는 DNA 구축물을 박테리아 발현 벡터에서 상업적으로 합성하고 (진아트, 라이프 테크놀로지즈), 그들의 서열을 생거 시퀀싱을 사용하여 확인하였다.

[0214] 도 8은 볼드체 밑줄 폰트로 나타내어진 IMGT 정의를 사용한 CDR을 갖는 VHH의 아미노산 서열을 나타낸다. IMGT 정의는 본원에서 CDR 서열을 언급하는 경우 사용된다. CDR의 카바트 정의는 IMGT에 대한 대안으로서 도 8에 음영처리 폰트로 나타내어진다. NRC-sdAb001 내지 NRC-sdAb008로 지칭된 서열이 나타내어진다.

실시예 12: 재조합 AXL 세포의 도메인 (ECD)에의 mAb 및 sdAb의 결합

[0216] 이 실시예의 목적은 재조합 AXL 세포의 도메인 (ECD)에의 mAb/sdAb의 결합을 특징규명하여, 친화도 및 동역학, 종교차-반응성, 및 도메인 및 에피토프 지도화를 평가하는 것이다.

물질 및 방법

[0218] 뮤린 mAb의 제조. 뮤린 mAb를 하이브리도마 상청액으로부터 직접적으로 정제하거나, CHO 세포의 일시적 형질감염에 의해 재조합적으로 제조하였다 (인간 IgG1 Fc 영역을 가짐). 10 mL 하이브리도마 상청액으로부터의 소규모 정제를 위해, mAb를 단백질 G 맥 세파로스™ 엑스트라 (지이 헬스케어 라이프 20 사이언시즈 (GE Healthcare Life 20 Sciences) #28-9670-70) 상으로 흡착을 통해 정제하고, PBS에서 세척하고, 200 μl의 글리신 200 mM pH 2.5로 2회 용리시키고, TRIS-HCl 1M pH 9.0에서 중화시켰다. 정제된 mAb를 PBS에서 사전-평형화된 제바 스픈 수지 (피어스)를 사용하여 탈염하고, 0.22 μM 막 (밀리포어)을 통해 필터 멀균하였다. mAb의 최종 농도를 나노-드롭 (#ND-1000)에 의해 측정하였다. 재조합 제조를 위해, DNA 구축물을 문헌 [Raymond et al. (2015)]에 기재된 바와 같이 CHO 세포에서 일시적으로 형질감염시키고, 정제하였다.

[0219] VHH 및 VHH-Fc의 제조. VHH를 문헌 [Baral et al. (2013)]에 의해 이전에 기재된 바와 같이 이. 콜라이에서 6xHis- 및 Myc-태그부착된 단량체로서 제조하였다. VHH-Fc를 문헌 [Zhang et al., 2009]에 기재된 바와 같이 인간 IgG1 Fc에 N-말단적으로 융합된 VHH를 코딩하는 DNA로의 HEK293 세포의 일시적 형질감염에 의해 제조하였다.

- [0220] 표면 플라즈몬 공명. 뮤린 mAb에 대해, 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에의 결합을 비아코어 (Biacore) T200 기기 를 사용하여 평가하였다. 간략하게, 항-마우스 또는 항-인간 Fc 항체 중 어느 하나를 아세테이트 완충제에서의 아민 커플링을 사용하여 연구-등급 CM5 시리즈 S 센서 칩 상에 고정화하였다. 뮤린 또는 재조합 키메라 뮤린-인간 mAb (마우스 VH/VL; 인간 불변 영역)를 포획한 후, 재조합 인간 또는 시노몰거스 AXL ECD를 항체에 따라 상이한 농도 범위 (0.1 내지 500 nM)에서 표면 상으로 유동시켰다. 구동 완충제는 PBS/트윈-20이고, 유속은 100 uL/분이었다. 모든 결합 연구는 25°C에서 수행하였다. 표면을 10 mM 글리신, pH 1.5를 사용하여 재생하였다.
- [0221] VHH 및 VHH-Fc에 대해, 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에의 결합을 비아코어 T200 기기 또는 비아코어 3000 기기 중 어느 하나를 사용하여 평가하였다. 인간 AXL ECD 또는 항-인간 Fc 항체 중 어느 하나를 아세테이트 완충제에서의 아민 커플링을 사용하여 연구-등급 CM5 시리즈 S 센서 칩 (T200, rhAXL ECD) 또는 C1 센서 칩 (3000, 항-인간 Fc) 상에 고정화하였다. VHH-Fc를 항-인간 Fc 표면 상에 포획하였다. 단량체성 VHH (rhAXL ECD 표면에 대해) 또는 인간 및 시노몰거스 AXL ECD (VHH-Fc 표면에 대해) 중 어느 하나를 상이한 농도 범위에서 표면 상으로 유동시켰다. 구동 완충제는 HBS-EP (3000) 및 HBS-EP+ (T200)였다. 유속은 10 내지 40 uL/분이었다. 모든 결합 연구는 25°C에서 수행하였다. 표면을 10 mM 글리신, pH 1.5를 사용하여 재생하였다.
- [0222] 에피토프 비닝 실험을 위해, 2가지 시험 물품 (VHH 또는 mAb)을 먼저 별개로 주사하고 (50 nM mAb; VHH 단량체에 대해 25배 K_D), 해리시켰다. 그 후, mAb (50 nM)를 다시 주사하고, 반응의 피크에서, VHH (25배 K_D) 및 mAb (50 nM)의 혼합물을 주사하여 임의의 추가의 결합을 관찰하였다.
- [0223] ELISA. 인간, 시노몰거스 및 마우스 AXL ECD에 대한 ELISA를 100 ng의 각각의 단백질을 눈크 맥시소르프 마이크로플레이트의 웰에서 밤새 고정화함으로써 수행하였다. 인간 AXL (aa 1 내지 451) 및 시노몰거스 AXL (aa 1 내지 449)을 실시에 10에 기재된 바와 같이 재조합적으로 제조하였다. 마우스 AXL은 시노 (Sino) (카탈로그 51026-M08H)로부터 구입하였다. 다음 날, 플레이트를 PBS 중 5% (w/v) 건조유로 차단하였다. 뮤린 mAb (하이브리도마- 또는 재조합적으로-제조된) 또는 VHH-Fc 중 어느 하나를 1% BSA 및 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS에 희석하고, 실온에서 2시간 동안 웰에 침가하였다. 웰을 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS로 5회 세척한 후, HRP-표지된 단백질 A (1% BSA 및 0.1% 트윈™-20을 함유하는 PBS에 1:1000 희석됨)를 실온에서 1시간 동안 웰에 침가하였다. 웰을 다시 PBS/0.1% 트윈-20으로 다시 5회 세척하고, TMB 기질을 사용하여 전개하였다. 흡광도를 450 nm에서 측정하였다. 마우스 AXL 결합에 대한 양성 대조군으로서, 상업적 항-마우스 AXL mAb (클론 175128, 알앤디 시스템즈 (R&D Systems) MAB8541, 래트 IgG2A)를 사용하고, 당나귀 항-마우스:HRP 2차 항체로 검출하였다.
- [0224] 효모 표면 제시. 인간 AXL, Tyro3 및 Mer 세포의 도메인의 효모 표면 제시를 수행하였다. 간략하게, 효모를 Aga2p 단백질에 융합된 myc-태그부착된 TAM-페밀리 RTK 엑토도메인을 코딩하는 DNA 구축물로 형질전환시켰다. 구축물을 완전한 AXL ECD (aa 1 내지 449) 또는 개별적 하위도메인 (N-에서 C-말단으로 Ig1, Ig2, Fn1, Fn2)을 코딩하도록 설계하였다. 미세 에피토프 지도화를 위해, AXL ECD의 개별적 아미노산을 구축물에서 Ala로 치환하였다. 부분적 또는 완전한 AXL, Tyro3 및 Mer 세포의 도메인을 발현하는 생성된 효모 세포를 마이크로웰 플레이트에 흡착시키고, mAb/VHH-Fc의 결합을 ELISA에 의해 평가하고, 염소 항-인간 F(ab')₂-HRP를 사용하여 검출하였다. 항-AXL mAb/VHH-Fc 결합을 발현 수준에 대해 대조하기 위해 항-myc 항체의 결합 수준에 대해 정규화하였다.
- [0225] 결과
- [0226] 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에의 뮤린 mAb의 결합을 재조합적으로 제조된 키메라 뮤린-인간 mAb를 사용하여 SPR에서 평가하였다. 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에의 라마 VHH의 결합을 단량체성 VHH 및 키메라 재조합 VHH-hIgG1 Fc 융합물 둘 다를 사용하여 SPR에서 평가하였다.
- [0227] SPR에 의한 친화도 측정. 재조합 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에 대한 뮤린 mAb의 친화도 및 동역학을 표 9에 나타낸다.

[0228]

<표 9>

mAb	제조합 인간 및 시노몰거스 AXL ECD에 대한 mAb의 친화도 및 동역학					
	인간 AXL			시노몰거스 AXL		
	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
mAb F107-10G1	1.1×10^6 ^a 1.2×10^6 ^b	5.9×10^{-4} ^b 5.6×10^{-4} ^b	0.5 ^a 0.4 ^b	8.2×10^5 ^a 1.8×10^6 ^b	4.3×10^{-4} ^a 2.3×10^{-4} ^b	0.5 ^a 0.2 ^b
mAb F111-5E9	7.8×10^5 ^a	1.8×10^{-3} ^a	2 ^a	6.9×10^5 ^a	2.7×10^{-3} ^a	4 ^a
mAb F107-8D12	2.7×10^6 ^a	1.3×10^{-2} ^a	5 ^a	-	-	1835 ^c
mAb F107-7H5	1.4×10^6	1.5×10^{-3}	1 ^a	-	-	925 ^c
mIgG2 F155-3C7	5.6×10^5 ^b	1.8×10^{-3} ^b	3 ^b	2.9×10^5 ^b	7.3×10^{-3}	25 ^b
mAb F111-3C8	8.6×10^4 ^a	1.0×10^{-3} ^a	12 ^a	6.0×10^4	1.1×10^{-3}	18 ^a
mIgG2 F149-4G4	7.5×10^5 ^b	1.2×10^{-3} ^b	1 ^b	-	-	>160 ^b

^a단일-사이클 동역학을 사용하여 측정됨^b다중-사이클 동역학을 사용하여 측정됨^c안정-상태 분석을 사용하여 측정됨

[0229]

표 10에서의 데이터는 제조합 인간 및 시노몰거스 AXL 세포의 도메인 (ECD)에 대한 라마 VHH의 친화도 및 동역학을 지시한다.

[0230]

<표 10>

sdAb	인간 AXL			시노몰거스 AXL		
	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
NRC-sdAb001	8.5×10^6 ^a 1.3×10^6 ^c	3.7×10^{-2} ^a 7.2×10^{-3} ^c	4 ^a 6 ^c	9.2×10^5 ^c	7.2×10^{-3} ^c	8 ^c
NRC-sdAb002	-	-	96 ^e	nd	nd	nd
NRC-sdAb003	8.5×10^3 ^a	5.4×10^{-3} ^a	955 ^a	nd	nd	nd
NRC-sdAb005	1.7×10^5 ^b 1.2×10^6 ^c	9.7×10^{-3} ^b 4.1×10^{-3} ^c	58 ^b 34 ^c	1.3×10^5 ^c	4.6×10^{-3} ^c	35 ^c
NRC-sdAb006	2.4×10^5 ^b 8.9×10^4 ^c	4.5×10^{-3} ^b 2.1×10^{-3} ^c	19 ^b 24 ^c	1.0×10^5 ^c	2.6×10^{-3} ^c	26 ^c
NRC-sdAb007	-	-	>100 ^c	nd	nd	nd
NRC-sdAb008	3.3×10^6 ^d 5.3×10^6 ^c	3.3×10^{-3} ^d 8.2×10^{-3} ^c	1 ^d 2 ^c	-	-	>200 ^c

^a단일-사이클 동역학을 사용하여 측정됨 (AXL ECD 고정화, VHH 단량체 유동)^b다중-사이클 동역학을 사용하여 측정됨 (AXL ECD 고정화, VHH 단량체 유동)^c단일-농도 동역학을 사용하여 측정됨 (VHH-Fc 포획, AXL ECD 유동)^d단일-사이클 동역학을 사용하여 측정됨 (VHH-Fc 포획, AXL ECD 유동)^e안정-상태 분석을 사용하여 측정됨

[0231]

시노몰거스 및 뮤린 AXL의 교차-반응성을 측정하고, 결과를 하기 표 11에 나타낸다. 이들 데이터는 ELISA에서의 제조합 인간 및 마우스 AXL ECD에 결합하는 mAb/sdAb에 대한 반-최대 유효 농도 EC₅₀을 나타낸다.

[0234]

<표 11>

표 11 결합 ELISA에 대한 반-최대 유효 농도		
mAb/sdAb	인간 AXL (nM)	마우스 AXL (nM)
MAB8541 (R&D)	61	1
mAb F107-10G1	2	n.b.
mAb F111- 5E9	2	n.b.
mAb F107- 8D12	1	n.b.
mAb F107- 7H5	6	n.b.
mlgG2 F155- 3C7	14	n.b.
mAb F111- 3C8	ND	ND
mlgG2 F149-4G4	15	n.b.
NRC-sdAb001	1	n.b.
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND	ND
NRC-sdAb005	1	n.b.
NRC-sdAb006	1	n.b.
NRC-sdAb007	ND	ND
NRC-sdAb008	1	n.b.
n.b., 결합 없음; ND, 측정되지 않음		

[0235]

[0236] 효모 표면 제시를 사용한 TAM 패밀리 RTK (Mer, Tyro3)에 대한 교차-반응성의 측정을 측정하고, 결과를 표 12에 나타낸다.

[0237]

<표 12>

표 12 효모 표면 제시를 사용한 TAM에 대한 교차-반응성					
	약 1:5000에서의 염소 항-인간 F(ab') ₂ -HRP				항-Myc-HRP
	hFC-107-10G1	NRC-sdAb0001-Fc	NRC-sdAb0002-Fc	NRC-sdAb0003-Fc	hFC-항-RSV
huAXL-ECD	1.392	1.026	0.882	0.659	0.087
cyAXL-ECD	1.141	0.824	0.760	0.668	-0.004
huMER-ECD	-0.020	-0.010	0.010	-0.009	-0.001
huTyro3-ECD	-0.023	0.017	-0.004	-0.005	0.059
pNL6 벡터	-0.039	-0.025	0.020	-0.025	-0.036
비-변성된 효모: myc 발현 수준에 대해 정규화됨					

[0238]

[0239] 에피토프 비닝을 평가하고, 데이터를 표 13에 요약한다. 항-AXL mAb/sdAb에 의해 표적화된 에피토프 빈이 나타내어진다. 효모 표면 제시를 사용한 도메인 지도화를 평가하였다.

[0240]

<표 13>

표 13 항-AXL mAb/sdAb에 의해 표적화된 애피토프 빈		
mAb/sdAb	도메인	애피토프 빈
mAb F107-10G1	Ig1	1A
mAb F111- 5E9	Ig2	2
mAb F107- 8D12	Ig1	1B
mAb F107- 7H5	Ig1	1B
mIgG2 F155- 3C7	ND	ND
mAb F111- 3C8	Ig2	ND
mIgG2 F149-4G4	ND	ND
NRC-sdAb001	ND (비[닝]에 기초한 Ig1) 비[닝] 경쟁에 기초한 10G1의 그것과 유사한 애피토프	1A
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND (비[닝]에 기초한 Ig1)	1A
NRC-sdAb005	ND (비[닝]에 기초한 Ig2)	2
NRC-sdAb006	ND (비[닝]에 기초한 Ig2)	2
NRC-sdAb007	ND (비[닝]에 기초한 Ig1)	1B
NRC-sdAb008	ND (비[닝]에 기초한 Ig1)	1B

[0241]

[0242] 실시예 13: 종양 세포주에의 결합의 특징규명

[0243]

이 실시예의 목적은 Kd의 관점에서 중간 내지 높은 수준의 AXL을 발현하는 종양 세포주에의 mAb/sdAb의 결합, 및 최대 항체 결합 (Bmax)을 특징규명하는 것이다.

[0244]

물질 및 방법

[0245]

세포 배양. NCI-H292 인간 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 SKOV3 (인간 난소 선암종) 세포주를 ATCC로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다. MDA-MB-231 삼중 음성 (ER-/PR-/HER2low) 유방암 (TNBC)을 미국 노쓰 캐롤라이나주 벌링톤 씨더레인 랩스 (Cedar lane Labs)로부터 구입하였다. 반딧불이 루시페라제 유전자를 갖는 안정한 형질감염체를 생성하였다. 이 세포주를 RPMI-1640 + 5%FBS에서 배양하였다. U87 교모세포종 세포를 실시예 3에 상기 기재된 바와 같이 사용하였다. 세포를 1주 2회 계대하고, 모든 세포주에 대해 4 내지 6주 내에 사용하였다.

[0246]

FACS 결합 검정. 부착성 세포를 비-효소적 시그마 세포 해리 용액 (카탈로그 번호 C5789)으로 해리시켰다. 세포 혼탁액을 폴리프로필렌, V-바닥 96-웰 플레이트에 첨가하고, 얼음 상에서 2시간 동안 100 nM 내지 0.001 nM 범위의 농도에서 또는 100 nM의 단일 용량에서 (비-특이적 대조군에 대해) 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 및 세척 후, 세포를 형광적으로 표지된 2차 항체 (잭슨 카탈로그 번호 709-546-098로부터의 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor)® 488 항-인간 IgG)와 함께 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척하였다. 세포 생존율을 퍽서블 (Fixable) 생존율 염료 450을 사용하여 측정하였다 (얼음 상에서 20분). 염색된 세포를 4 °C에서 1% 포름알데히드에서 고정시키고, 다음 날 수행된 획득까지 4°C에서 저장하였다.

[0247]

데이터 획득을 FACS 디바 소프트웨어 및 HTS 유닛 (96-웰 플레이트에서 자동화 샘플링)을 구비한 LSR-포르테사 (Fortessa) 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨 (Beckton Dickinson))에서 수행하였다. FACS 데이터를 엑셀 (Excel) 데이터 파일 내로 내보내고, AF488-염색된, 살아있는 (단일 세포) 피크의 MFI (중위 형광 강도 (Median Fluorescence intensity))를 계산을 위해 취하였다. 배경 삭감을 2차 항체의 부재 하에서 인큐베이션된 세포의 MFI 값을 사용하여 모든 웰에 대해 계산하였다.

[0248]

배경 삭감된 데이터를 그래프패드™ 6.0에서 힐 슬로프를 갖는 한-부위 특이적 결합 비-선형 회귀 곡선 적합 모델을 사용하여 분석하여 시험 물품의 각각에 대한 겉보기 Bmax 및 Kd를 측정하였다. 사용된 모델은 식 I에 따랐다.

$$[0249] \text{모델 } Y = \frac{B_{max} \times X^h}{Kd^h + X^h} \quad (\text{식 } I)$$

[0250] B_{max} 는 Y 와 동일한 단위로, 최대 특이적 결합이다.

[0251] Kd 는 X 와 동일한 단위로 표현되는, 평형에서의 반 최대 결합을 달성하는 데 필요한 리간드 농도이다.

[0252] 변수 "h"는 힐 슬로프이다.

[0253] AXL 수용체 밀도 측정. $10 \mu\text{l}$ 의 인간 AXL 알렉사 플루오르 488 MAb (클론 108724)를 사용하여 콘텀 (Quantum™) 심플리 셀룰러 비드 (Simply Cellular Beads) (미국 인디애나주 피셔스, 방스 래버리토리즈 (Bangs Laboratories)로부터의 카탈로그 번호 814)를 4°C 에서 30분 동안, 또는 AXL 발현 세포주 (100 000 세포/시험)를 4°C 에서 2시간 동안 표지하였다.

[0254] 비드 및 세포에 대한 데이터 획득을 동일한 FACS 설정 하에서 수행하고, 플로우조 (FlowJo)™ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 기하평균을 사용하여 표준 곡선을 생성하고, 각각의 세포 유형에 대한 값을 보간하였다. 블랭크 비드 값을 검출 역치로서 간주하고, 비염색된 세포의 값을 각각의 경우 기하평균 값으로부터 삭감하였다. 생성된 항체 결합 능력을 시험된 세포주의 각각에 대한 수용체 밀도의 척도로서 사용하였다.

결과

[0255] 3종의 세포주에의 재조합 키메라 Ab의 결합을 상기 기재된 바와 같이 FACS에 의해 평가하였다. 겉보기 B_{max} 및 Kd 측정을 하기 표 14에 나타낸다.

[0257] <표 14>

표 14 3종의 AXL 발현 세포주에서의 인간 Fc 함유 mAb의 겉보기 Kd			
1차 Ab	SKOV3 Kd (nM)	NCI-H292 Kd (nM)	MDA-MB-231 루시페라제 Kd (nM)
NRC-sdAb001	0.1122	0.1053	0.2327
NRC-sdAb005	2.0330	1.4740	1.4720
NRC-sdAb006	13.4300	2.1170	0.8317
NRC-sdAb008	0.0549	0.0414	0.1216
hIgG-F107-10G1	0.0608	0.0708	0.1012
hIgG-F107-7H5	0.0700	0.0509	0.1696
hIgG-F111-5E9	ND*	ND*	0.3659

*불완전 곡선

[0258]

[0259] 도 9는 하기 세포주에서의 수용체 밀도 (수용체/세포)에 기초한 AXL의 항체 결합 능력을 예시한다: H292, MDA-MB-231, SKOV, 및 U87 교모세포종.

[0260] 도 10은 폐, 유방 및 난소암에 대한 3종의 세포주에서의 인간 (h) IgG Ab 및 sdAb의 FACS 결합 곡선을 예시한다. 나타내어진 모든 예에서, 비-특이적 결합 (x)은 무시가능한 반면, hIgG 곡선 (F107-10G1, F107-7H5, F111-5E9)은 일부의 경우 sdAb (sdAB001, sdAb008, sdAb006)보다 약간 더 높은 형광 강도의 평균 (MFI)을 나타낸다.

실시예 14: 시험관내 세포독성 검정

[0262] 이 실시예에서, 항-AXL 모노클로날 항체를 효능 (IC_{50}) 및 최대 백분율 성장 억제 (효력)의 관점에서, AXL-발현 세포에서의 성장 억제 검정에서의 내재화 능력 및 항체-약물 접합체 (ADC) 잠재성에 대해 평가하였다.

물질 및 방법

[0264] 세포 배양. NCI-H292 인간 비-소세포 폐암 (NSCLC) 및 SKOV3 (인간 난소 선암종) 세포주를 ATCC로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다. MDA-MB-231 삼중 음성 (ER-/PR-/HER2low) 유방암 (TNBC) 세포주는 씨더레인 랩스로부터 구입하였다. 반딧불이 루시페라제 유전자를 갖는 안정한 형질감염체를 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer)에 의해 생성하였다. 이 세포주를 RPMI-1640+5%FBS에서 배양하였다. 세포를 1주 2회 계대하고, 모든

세포주에 대해 4 내지 6주 내에 사용하였다.

[0265] 성장 억제 검정. 항-AXL ADC를 NCI-H292 (비-소세포 폐암), MDA-MB-231 (인간 유방 선암종) 및 SKOV3 (난소 암종)을 비롯한 AXL을 발현하는 것으로 공지된 다양한 배양된 세포주에 대한 생존율에 대한 그들의 효과에 대해 시험하였다. 세포를 3종의 세포주에 대해 각각 125개, 200개 및 200개 세포/웰에서 384-웰 플레이트 (코닝 (Corning)® 384 백색 평평 바닥 폴리스티렌 TC-처리된 마이크로플레이트 (Well White Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates), 카탈로그 번호 3570)에서 시팅하였다. 세포를 시험 물품의 계열 회색 또는 100 nM 내지 0.0017 nM 범위의 벤치마크 대조군의 존재 하에서 및 첨가된 Gas6 리간드 (2 μ g/mL, 알앤디 CF885)의 존재 또는 부재 하에서 5일 동안 성장시켰다. 5일 후 (37°C, 5% CO₂, 습윤 인큐베이터), 배양물 중의 생존성 세포의 수를 대사적으로 활성인 세포의 존재를 신호전달하는 각각의 웰에 존재하는 ATP의 정량에 기초하여, 셀타이터글로 (CellTiterGlo)™ (프로메가 (Promega), 매디슨)를 사용하여 측정하였다.

[0266] 신호 출력을 0.1초의 통합 시간에서 설정된 발광 플레이트 판독기 (엔비전 (Envision), 퍼킨 엘머) 상에서 측정하였다. 통합 시간을 높은 ATP 농도에서 신호 포화를 최소화하도록 조정한다.

[0267] 데이터 분석. 각각의 농도 점 (S)을 음성 대조군 웰 (NC)에 대해 정규화하고, % 생존으로서 표현하고, 식 II에 따라 계산한다.

$$[0268] \% \text{ 생존} = \frac{NC - S}{NC \times 100} \quad (\text{식 II})$$

[0269] % 생존 대 로그 농도의 용량-반응 곡선을 4 파라미터 로지스틱 모델을 갖는 그래프패드™ 프리즘 6.0을 사용하여 피팅하여 IC₅₀ 및 최대 효력을 추정하였다. 모델 Y를 식 III에 따른 계산에 사용하였다.

$$[0270] \text{모델 } Y = \frac{IC_{50} - S}{1 + e^{(S - IC_{50})/HillSlope}} \quad (\text{식 III})$$

[0271] IC₅₀은 하부 및 상부 사이의 반응 중간을 제공하는 효능제의 농도이다.

[0272] 힐슬로프 (HillSlope)는 곡선의 기울기를 기재한다.

[0273] 상부 및 하부는 Y 축의 단위에서 플래토이다.

[0274] 결과

[0275] 3종의 세포주에서의 DM1 또는 MMAE에 접합된 재조합 키메라 Ab의 성장 억제 활성을 상기 기재된 바와 같이 평가하였다.

[0276] 적접적 약물 접합체로서의 세포독성을 표 15에 나타난 바와 같이 평가하였다. 3종의 AXL 발현 세포주에서의 항 AXL ADC의 효능 (IC₅₀) 및 효력 (% 최대 억제). 결과를 평균 +/- 표준편차 (N)로서 표현한다.

[0277]

<표 15>

	표 15 AXL 발현 세포주에서의 항-AXL ADC의 효능 및 효력					
	SKOV3		MDA-MB-231-luc		NCI-H292	
	IC50 (nM)	% 최대 억제	IC50 (nM)	% 최대 억제	IC50 (nM)	% 최대 억제
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	0.021 +/- 0.006 (2)	75 +/- 3 (2)	0.942 (1)	105 (1)	~1 (1)	불완전 곡선 (1)
hFc-F111-5E9-DM1	0.038 +/- 0.043 (3)	73 +/- 7 (3)	0.452 +/- 0.279 (6)	82 +/- 20 (6)	0.084 +/- 0.060 (9)	78 +/- 9 (9)
hFc-sdAb005-DM1	0.631 +/- 0.202 (2)	78 +/- 6 (2)	ND	ND	6.664 +/- 1.718 (6)	83 +/- 4 (6)
hFc-sdAb006-DM1	0.162 +/- 0.03 (2)	76 +/- 6 (2)	0.869 +/- 0.001 (2)	83 +/- 2 (2)	2.714 +/- 0.871 (2)	87 +/- 13 (6)
hFc-F107-10G1-DM1	0.022 (1)	66 (1)	0.029 +/- 0.037 (2)	62 +/- 9 (2)	0.013 +/- 0.014 (4)	71 +/- 5 (4)
hFc-sdAb001-DM1	0.055 +/- 0.006 (2)	81 +/- 0 (2)	ND	ND	0.887 +/- 0.218 (6)	81 +/- 3 (6)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.019 (2)	91 +/- 31 (2)	0.076 +/- 0.079 (2)	65 +/- 13 (2)	0.014 +/- 0.026 (9)	97 +/- 50 (9)
hFc-F107-8D12-DM1	0.001 (1)	103 (1)	0.033 (1)	72 (1)	0.011 +/- 0.006 (3)	89 +/- 1 (3)
hFc-sdAb008-DM1	~0.001	~80	ND	ND	0.034 +/- 0.012 (6)	83 +/- 8 (6)
mlgG-F155-3C7-DM1	0.092 (1)	89 (1)	0.630 (1)	74 (1)	0.327 +/- 0.098 (8)	82 +/- 5 (8)
mlgG-F149-4G4-DM1	0.005 (1)	90 (1)	0.051 (1)	64 (1)	0.015 +/- 0.009 (8)	79 +/- 4 (8)

[0278]

[0279] Gas6 민감도의 평가. Gas6 리간드 (2 μ g/mL)의 존재 또는 부재 하에서의 NCI-H292에서의 항-AXL ADC의 효능 (IC₅₀)을 평가하였다. 결과를 표 16에 평균 +/- 표준편차 (N)로서 표현한다.

[0280]

<표 16>

	표 16 Gas6 민감도의 평가	
	-Gas6 IC50 (nM)	+Gas6 IC50 (nM)
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	~1 (1)	ND
hFc-F111-5E9-DM1	0.084 +/- 0.060 (9)	0.074 +/- 0.050 (2)
hFc-sdAb006-DM1	2.714 +/- 0.871 (2)	2.2.6 (1)
hFc-F107-10G1-DM1	0.013 +/- 0.014 (4)	0.460 (1)
hFc-sdAb001-DM1	0.887 +/- 0.218 (6)	수렴하지 않음 (1)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.026 (9)	0.098 +/- 0.035 (2)
hFc-F107-8D12-DM1	0.011 +/- 0.006 (3)	0.296 (1)
hFc-sdAb008-DM1	0.034 +/- 0.012 (6)	0.240 (1)
mlgG-F155-3C7-DM1	0.327 +/- 0.098 (8)	3.900 +/- 0.780 (2)
mlgG-F149-4G4-DM1	0.015 +/- 0.009 (8)	0.013 +/- 0.002 (2)
hFc-sdAb005-DM1	6.664 +/- 1.718 (6)	3.777 (1)

[0281]

[0282] 성장 억제를 평가하고, 3종의 종양 세포주에서의 hIgG Ab 및 sdAb의 성장 억제 결합 곡선을 도 11에 나타낸다. 폐, 유방 및 난소 세포주 (각각 H292, MDA-MB-231 루시페라제, 및 SKOV3)가 나타내어진다. 퍼센트 생존 분율 (5d)이 평가된다.

[0283]

부류 1에서, hIgG-F107-10G1-DM1 대 비-특이적 결합이 모든 세포에 대해 나타내어지며, sdAb001이 또한 H292에 대해 평가된다.

[0284]

부류 2에서, hIgG-F107-7H5-DM1 및 hIgG-F107-8D12-DM1 대 비특이적 결합 곡선이 MDA-MB-231 루시페라제 및 SKOV3 세포에 대해 나타내어진다. sdAb008 및 hIgG-F107-7H5-DM1을 H292에 대한 비-특이적 결합에 비해 평가하였다.

[0285]

부류 3에서, hIgG-F111-5E9-DM1 및 hIgG-F111-5E9-MMAE 대 비-특이적 결합이 모든 세포에 대해 나타내어지며, sdAb006이 또한 H292에 대해 평가된다.

- [0286] 도 12는 비-특이적 결합에 비해, H292 세포주에서 Gas6의 존재 및 부재 하에서의 hIgG-F11-5E9-DM1 및 hIgG-F107-10G1-DM1의 성장 억제 결합 곡선을 예시한다.
- [0287] 실시예 15: 이중파라토프성/1가 항-AXL 항체의 활성의 평가.
- [0288] 이 실시예에서, 이중파라토프성/1가 항-AXL 항체를 제조하고, 효능 및 효력에 대해 평가하였다.
- [0289] 2개의 비-중첩하는 에피토프를 표적화하는 이중파라토프성 항체는 표적 클러스터링을 유도할 수 있으며, 이는 다시 HER2를 비롯한 수용체 표적의 왕성한 내재화, 리소좀 트래피킹을 촉진시킨다 (Li et al. 2016). 이 실시예는 단일 도메인 항-AXL 항체의 이중파라토프성 (동일한 표적 상에 2개의 에피토프) 조합의 ADC 효능을 평가한다. 이중파라토프성 항체를 함유하는 인간 Fc를 문헌 [Strop et al. (2012)]에 의해 공개된 방법에 따라 구축하였으며, 여기서, 상보적 점 돌연변이 (RRR, EEE)를 인간 IgG1 Fc 영역에서 조작하여 반 단량체 교환을 용이하게 하고, 이중특이적 항체를 안정화시킨다. 관심의 2종의 항체를 별개로 발현시키고, 정제하고, 적절한 산화환경 조건 하에서 함께 혼합하여, 안정한 이중특이적 항체의 형성을 초래할 수 있다. 모든 경우, 이중파라토프성 ADC의 활성을 그들이 유래된 동종1가 단일파라토프성 sdAb-기재 ADC의 효능과 비교하였다.
- [0290] 표 17은 SKOV3 세포주에서의 단일파라토프성 (2가) 모 ADC에 비한 항 AXL 이중파라토프성 구축물 ADC의 효능 (IC_{50}) 및 효력 (% 최대 억제)을 나타낸다. 이용가능한 경우, 결과는 평균 +/- 표준편차 (N)로서 표현된다.
- [0291] <표 17>
- | 샘플 명칭 | 항체 설계 | MW | DAR | $IC50$ (nM) | % 최대 억제 |
|--------------------|---------|-------|------|---------------------|--------------|
| sdAb001-DM1 | 단일파라토프성 | 77200 | 3.13 | 0.055 +/- 0.006 (2) | 81 +/- 0 (2) |
| sdAb005-DM1 | 단일파라토프성 | 77200 | 3.05 | 0.631 +/- 0.202 (2) | 78 +/- 6 (2) |
| sdAb006-DM1 | 단일파라토프성 | 77800 | 2.77 | 0.162 +/- 0.03 (2) | 76 +/- 6 (2) |
| sdAb008-DM1 | 단일파라토프성 | 78200 | 3.08 | <0.001 | ~80 |
| sdAb 001R/005E-DM1 | 이중파라토프성 | 77200 | 3.6 | 0.008 | 89 |
| sdAb 001R/006E-DM1 | 이중파라토프성 | 77500 | 3.39 | 0.0004 | 73 |
| sdAb 008R/005E-DM1 | 이중파라토프성 | 77700 | 2.61 | 0.014 | 78 |
| sdAb 008R/006E-DM1 | 이중파라토프성 | 78000 | 2.69 | 0.003 | 70 |
- [0292]
- [0293] 예비적 결과는 도메인 1A/도메인 2에서 발견되는 이중파라토프성 sdAb 지정된 에피토프 (sdAb 001R/005E-DM1, sdAb 001R/006E-DM1)를 포함하는 ADC 둘 다가 상응하는 2가 Fc 함유 sdAb로부터 유래된 ADC보다 훨씬 더 강력하게 나타남 (7 내지 100x)을 지시한다. 이 실시예에서 시험된 다른 이중파라토프성 조합은 증가된 효능을 나타내지 않았다.
- [0294] 도 13은 SKOV3 세포주에서의 단일파라토프성/2가 모 ADC에 비한 항 AXL 이중파라토프성/1가 구축물 ADC의 성장 억제 결합 곡선을 나타낸다. 5일 후의 퍼센트 생존 분율을 로그 농도 (nM)로서 플롯팅한다. 패널 A는 SKOV3 조합 008R/005E, sdAb008-DM1 (정사각형), sdAb005-DM1 (삼각형), 및 이중파라토프성 008/005 (별표)의 차트가 비교됨을 제공한다. 패널 B는 예시된 SKOV3 조합 008R/006E 차트를 제공한다: sdAb006-DM1 (마름모), sdAb008-DM1 (정사각형), 및 이중파라토프성 008/006 (비어있는 원)이 비교된다. 패널 C는 hFc/sdAb001R/005E, sdAb005-DM1 (삼각형), sdAb001-DM1 (채워진 원), 및 이중파라토프성 001/005 구축물 ("X"로 나타내어짐)의 차트가 비교됨을 제공한다. 패널 D는 SKOV3 조합 001R/006E, sdAb001-DM1 (채워진 원), sdAb006-DM1 (마름모) 및 이중파라토프성 001/006 구축물 (큰 별표)이 비교됨을 제공한다.
- [0295] 실시예 16: SKOV3 종양 이종이식편 마우스 모델에서의 ADC에 의한 생체내 종양 성장 억제
- [0296] 이 실시예에서, 시험관내 세포독성을 SKOV3 세포에서의 종양 성장 억제의 억제를 사용하여 평가한다. 항-hAXL 항체-약물 접합체 ADC를 AXL을 발현하는 이종이식편 모델에서 종양 성장 억제를 유발하는 능력에 대해 평가하였

다.

물질 및 방법

[0297] 프로토콜. 이 연구에서 동물의 관리 및 사용을 포함하는 프로토콜 및 절차는 오타와-NRC 동물 관리 위원회 (Ottawa-NRC Animal Care Committee) (프로토콜 # 2014.02)에 의해 검토되고, 승인되었다. 6주령, 18 내지 20 그램 암컷 CD1 알비노 (Albino) 마우스 (Cr1:CD1-Foxn1nu)를 찰스 리버 캐나다 (Charles River Canada) (캐나다 케벡주 세인트-콘스탄트)로부터 주문하였다. 동물을 동물 관리에 관한 캐나다 위원회 (Canadian Council on Animal Care) (CCAC)의 지침에 따라 관리하고, 사용하였다.

[0299] 항-hAXL-ECD 모노클로날 항체를 실시에 1에 개요된 바와 같이 정제하고, 실시에 4에서와 같이 리신 잔기를 통해 N2'-데아세틸-N2'-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신 (DM1)에 연결된 숙신이미딜 트랜스-4-[말레이이미딜메틸] 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC)에 접합시켰다.

[0300] 세포 배양 및 종양 성장 측정. SKOV3 (인간 난소 선암종) 세포를 ATCC로부터 얻고, 공급자의 권고사항에 따라 배양하였다. MDA-MB-231 삼중 음성 (ER-/PR-/HER2low) 유방암 (TNBC)은 ATCC (씨더레인 램스)로부터 구입하였다. 반딧불이 루시페라제 유전자를 갖는 안정한 형질감염체를 퍼킨 엘머에 의해 생성하였다. 이 세포주를 RPMI-1640+5%FBS에서 배양하였다.

[0301] 세포를 1주 2회 계대하고, 모든 세포주에 대해 4 내지 6주 내에 사용하였다. 세포를 멸균 조건 하에서 이소플루란 마취된 누드 마우스 (n=8)의 좌측 옆구리에 피하로 접종하였다 (주사 부위 당 0.1 mL PBS의 부피에서 5×10^6 개의 세포). 종양을 부피로 80 내지 100 mm^3 의 크기로 성장시킨 후, 각각의 코호트가 가변적 종양 크기를 갖는 동물을 함유하는 것을 보장하기 위해 동물을 투여 일 1일 전에 무작위화하였다. 각각의 동물에 대한 적절한 부피의 시험/대조군 물품을 투여 일에 제조하고, 정맥내로 (i.v.) 주사하였다. 마우스를 제0일 및 제4일 (96시간 간격)에 꼬리 정맥을 통해 5 mg/kg의 시험 물품으로 주사하였다. 대조군은 염수로 처리하였다.

[0302] 종양 성장을 처리후 29일 동안 또는 이들이 윤리적 이유로 안락사될 때까지 (인도적 종점) 캘리퍼스 측정에 의해 3일마다 모니터링하였다.

[0303] 종양 부피를 식 IV에 따라 계산하였다:

[0304] $\text{추정된 종양 부피 } [\text{mm}^3] =$

[0305] $\pi / 6(\text{길이 } [\text{mm}] \times (\text{폭 } [\text{mm}] \times (\text{높이 } [\text{mm}])))$ (식 IV)

[0306] 각각의 군에서의 종양 부피를 평균 \pm SEM으로서 나타내고, SKOV3 세포 접종 후 측정 시간의 함수로서 플롯팅한다. 종양 부피 데이터에 대한 군 비교를 그래프패드 프리즘 버전 7.0을 사용하여 터키 (Tukey) 다중 비교 검정을 갖는 2-원 ANOVA를 사용하여 수행하였다. 처리군 및 대조군 사이의 차이는 $P < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하였다.

결과

[0308] 비히클 (PBS 대조군) 처리된 동물에 비해, 5 mg/kg (mpk)으로 투여된 AXL ADC는 SKOV3 종양 이종이식편 마우스 모델 (n=2)에서 유의한 종양 성장 억제를 유발하는 것으로 나타났다. 종양 성장의 높은 재현성이 2개의 별개의 연구 (본원에서 "연구 15A" 및 "연구 15b"로 지칭됨)에서 대조군 및 처리군 둘 다에서 관찰되었다. 이를 2개의 별개의 연구로부터의 데이터를 **도 14** 및 **도 15**에 제시한다.

[0309] **도 14**는 5 mg/kg의 선택된 ADC로 2회 (제0일 및 제4일) 처리된 SKOV3 종양-함유 마우스에 대한 연구 15a에서의 종양 성장 억제를 나타낸다. 사용된 ADC는 염수 (1a)와의 비교를 위한 hF107-10G1-DM1 (2a), hF111-5E9-DM1 (3a); hF107-7H5-DM1 (4a); hF107-8D12-DM1 (5a); mF149-4G4-DM1 (6a); 및 mF155-3C7-DM1 (7a)이었다. 종양 부피 (mm^3)를 3일마다 기록하였다. 각각의 데이터 점은 평균 \pm SEM, (n=8)을 나타낸다.

[0310] **도 15**는 5 mg/kg의 선택된 ADC로 2회 (제0일 및 제4일) 처리된 SKOV3 종양-함유 마우스에 대한 연구 15b에서의 종양 성장 억제를 나타낸다. 사용된 ADC는 염수 대조군 (1b)과의 비교를 위한 hF111-5E9-DM1 (2b); hF107-7H5-DM1 (3b); hF107-10G1-DM1 (4b); sdAb001-DM1 (6b); sdAb006-DM1 (7b); sdAb008-DM1 (8b); 및 mF149-4G4-DM1 (9b)이었다. 종양 부피 (mm^3)를 3일마다 기록하였다. 각각의 데이터 점은 평균 \pm SEM, (n=8)을 나타낸다.

[0311] ADC-처리된 및 염수-처리된 군 사이에 종양 성장에 대한 통계적으로 유의한 ($p<0.05$) 효과가 제28일에서 37.0%로부터 66.9%로의 종양 부피 감소로 제13 내지 18일 내지 제28일에 관찰되었다.

[0312] 표 18은 연구 15a 및 15b의 데이터 (각각 도 14 및 도 15 참조)에 대한 처리 개시후 제28일에 대조군 (염수)에 비한 종양 부피 감소의 백분율을 나타낸다. 대조군에 비한 종양 부피 (TV) 감소의 백분율을 % 감소 = $(TV_{\text{대조군}} - TV_{\text{처리군}}) / TV_{\text{대조군}} * 100$ (식 V)으로서 계산하였다.

[0313] <표 18>

표 18 SKOV3 이종이식편 마우스 모델에서의 ADC에 의한 종양 부피 감소의 백분율		
연구 번호	시험 ADC	대조군에 비한 종양 부피 감소의 %
연구 15A 도 14	hF107-10G1-DM1	57.9 ± 2.9
	hF111-5E9-DM1	62.5 ± 5.0
	hF107-7H5-DM1	48.9 ± 3.2
	hF107-8D12-DM1	55.4 ± 4.4
	mF149-4G4-DM1	54.4 ± 9.0
	mF155-3C7-DM1	38.4 ± 10.7
연구 15B 도 15	hF111-5E9-DM1	61.0 ± 5.1
	hF107-7H5-DM1	66.9 ± 3.1
	hF107-10G1-DM1	63.7 ± 7.3
	sdAb001-DM1	47.6 ± 6.8
	sdAb006-DM1	47.7 ± 9.48
	sdAb008-DM1	37.0 ± 16.0
	mF149-4G4-DM1	54.2 ± 10.3

[0314]

[0315] 실시예 17: 반복된 정맥내 투여 후의 MDA-MB-231-Luc 이종이식편 마우스에서의 항-AXL ADC 히트의 효력의 평가

[0316]

AXL은 다양한 유형의 암에서 발현되며, 침습, 전이 뿐만 아니라 혈관신생과 연관된다. 생성된 항-AXL ADC는 SMCC 링커를 통해 미세관 억제제, 면탄신 (DM1)에 접합된 항-AXL 항체를 갖는다. 이들 ADC는 다양한 세포주에서 유망한 시험관내 효력을 나타내며, 효능 및 Gas6 민감도에 기초하여 선택되었다. 이 실시예에서, 몇몇 항-AXL ADC 히트를 스크리닝하고, 항-AXL ADC의 생체내 효력에 대한 Gas6 민감도의 역할을 평가한다.

[0317]

효력 및 약동학을 암컷 NU/NU 누드 마우스에의 2회의 정맥내 볼루스 투여 후에 몇몇 항-AXL ADC에 대해 평가한다. 이 실시예는 항-AXL ADC의 효력에 대한 Gas6 민감도의 역할을 추가로 조사한다.

[0318] 방법

[0319]

세포주. MDA-MB-231은 원래 51세 백인 여성 환자로부터 유래된 상피 부착성 세포인 삼중 음성 (ER^- , PR^- , $HER2^-$) 인간 유선 선암종 세포주이다. 이들 세포는 1차 난소 종양과 일치하는 중간 정도로 잘 분화된 선암종을 형성하는 누드 마우스에서 종양형성성이다. MDA-MB-231 세포는 표피 성장 인자 (EGF) 및 전환 성장 인자 알파 (TGF α)를 발현하는 종양형성성 세포이다. 이들 세포는 ALS 처리된 BALB/c 마우스에서 저조하게 분화된 선암종 (등급 III)을 형성하고, 누드 마우스에서 저조하게 분화된 선암종 (등급 III)을 형성한다. 세포주는 원래 아메리칸 티슈 컬쳐 콜렉션 (American Tissue Culture Collection) (ATCC, 미국 버지니아주 마나사스)으로부터 얻었다.

[0320]

세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS, 하이클론 (Hyclone) SH30070.03)을 갖는 ATCC-제형화된 RPMI 1640 배지 (ATCC 카탈로그 #: 30-2001)에서 최대 80% 전면생장률로 성장시켰다. 세포를 습윤 5% CO_2 분위기에서 37°C에서 유지하였다. 이들을 트립신화에 의해 수화하고 (0.25% 트립신/EDTA, 지브코 (Gibco)/BRL 15090-046), 이어서 차가운 포스페이트-완충 염수 용액 (PBS)에서 세척하고, 트리판 블루 염료를 배제하는 능력에 의해 생존율에 대

해 평가하였다. 마우스에서 이종이식편으로서 성장을 위한 모든 세포 집단은 최소로 98% 생존성이었다.

[0321] 동물 관리: 수령, 순응, 하우징 및 취급. 이 연구에서 동물의 관리 및 사용을 포함하는 프로토콜 및 절차는 오타와-NRC 동물 관리 위원회 (프로토콜 # 2014.02)에 의해 검토되고, 승인되었다. 동물의 관리 및 사용은 동물 관리에 대한 캐나다 위원회 (CCAC)의 지침에 따랐다. 6주령, 18 내지 20 그램 암컷 CD1 알비노 마우스 (Cr1:CD1-Foxn1nu)를 찰스 리버 캐나다 (캐나다 퀘벡 세인트-콘스탄트 라살레 18)로부터 주문하였다. 도착 시, 마우스를 정상적인 건강 상태를 보장하기 위해 스태프 구성원에 의한 일반적 신체 검사로 처리하였다. 자명한 이상은 수령된 동물에서 검출되지 않았다. 마우스를 적어도 5일의 기간 동안 순응시켜 이들이 하우징 환경에 익숙하게 되도록 하였다. 마우스를 오염을 피하기 위해 필터 톱을 구비한 옥수수대 베딩 상에 폴리카르보네이트 케이지에서 케이지 당 4마리씩 하우징하였다. 각각의 케이지를 프로토콜 번호, 주요 조사자의 성명, 동물 번호 및 성별을 지시하는 컬러-부호화된 케이지 카드로 명확하게 표지하였다. 각각의 마우스를 귀 편침을 사용하여 고유하게 식별하였다.

[0322] 마우스를 하기 조건 하에서 시간 당 75 공기 변화에 대해 설정된 양으로 가압된 테크니플라스트 그린 라인 (Tecniplast Green Line) 개별적으로 환기된 케이지 (Individually Ventilated Cages) (IVC)에서 하우징하였다: 온도: 23 내지 24°C; 습도: 50%; 광 사이클: 12시간 명 및 12시간 암.

[0323] 무균 기법을 마우스를 취급하는 경우 모든 시간에 사용하였다. 이 연구에 사용된 모든 장비는 사용 전에 70% 에탄올로 멸균하였다. 동물을 또한 사용 전에 매회 70% 에탄올로 소독한 생물학적 안전성 캐비닛 (Biological Safety Cabinet) (BSC) 하에서 취급하였다. 마우스를 취급하는 모든 개인은 증기 멸균된 가운, 마스크, 헤어 보닛 및 멸균 장갑을 착용하였다. 1/8" 조사된 옥수수대 베딩으로 충전된 오토클레이브된 IVC 케이지 (엔비고 (Envigo), 미국 위스콘신주 매디슨) 및 작은 부피의 엔비로-드라이 (Enviro-dri) 페이퍼 (쉐퍼드 스페셜티 페이퍼스 (Shepherds Specialty Papers))를 BSC에서 매주 적어도 1회 교환하였다.

[0324] 식이. 모든 동물은 먹이 및 물에 자유로운 접근을 가졌다. 물병을 한외-여과된 물로 채우고, 오래된 마우스 구두상자 케이지에서 별개로 캡으로 정치하고, 증기 오토클레이브하였다. 일단 오토클레이브되면, 캡을 BSC의 테두리에서 작동하면서 설치하였다. 물병을 1주 1회 또는 물 수준이 낮아진 경우 보다 빈번히 교환하였다. 동물을 순응 및 실험 기간 동안 무제한, 감마-조사된 유지 설치류 식이 (2914 테크래드 글로벌 (Teklad Global) 14% 단백질 유지 식이 (Protein Maintenance Diet), 엔비고)로 공급하였다.

[0325] 피하 이종이식편 종양 모델. 세포를 멸균 조건 하에서 이소플루란 마취된 누드 마우스 (n=8)의 좌측 옆구리에 피하로 접종하였다 (주사 당 0.1 mL PBS의 부피에서 5×10^6 개의 세포). 종양을 부피로 80 내지 100 mm³의 크기로 성장시킨 후, 각각의 코호트가 가변적 종양 크기를 갖는 동물을 함유하는 것을 보장하기 위해 동물을 투여 일 전 1일에 무작위화하였다.

[0326] 종양 모니터링. 종양 성장을 처리후 29일 동안 또는 윤리적 이유로 안락사될 때까지 (인도적 종점) 캘리퍼스 측정에 의해 3일마다 모니터링하였다: 1) 48주 내에 체중 회복이 없는 10% 초과의 체중 감소; 2) 2500 mm³ 초과의 종양 부피; 3) 종양 궤양화; 및 4) 고통의 명백한 징후, 예컨대 부동성 및 감소된 그루밍 등.

[0327] 종양 부피를 식 IV에 따라 계산하였다:

[0328] 추정된 종양 부피 [mm³] =

[0329] $\pi / 6(\text{길이} [\text{mm}] \times (\text{폭} [\text{mm}] \times (\text{높이} [\text{mm}])))$ (식 IV)

[0330] 시험 물품 및 비히클. 모든 시험 물품을 NRC 몬트리올로부터 오타와로 얼음 상에 선적하고, 투여 전에 4°C에서 저장하였다. ADC, hF111-5E9-DM1을 뱃지 번호: CC31MAY 2016; 약물 대 항체 비 (DAR): 2.62; 농도: 1.31mg/mL; 분취물 부피: 3.7mL; 저장 조건: 4°C; 내독소 수준: <0.15로서 제조하고; 캐나다 퀘벡주 몬트리올에서, NRC 설비 HHT 몬트리올에서 제조하였다.

[0331] 처리를 위한 비히클은 하기 특징을 갖는 ADC 완충제였다: 멸균성: 멸균-여과됨; 저장 조건: 20 내지 25°C; 공급자: NRC-HHT 몬트리올.

[0332] 용량 제형 제조. 각각의 제형을 투여 일에 제조하였다. 5 mg/kg의 용량 수준을 얻기 위해, 시험/대조군 물품의 주사 부피를 그들의 스톡 농도 및 동물의 체중에 기초하여 계산하였다. 최종 투여 용액의 제조를 깨끗한 HEPA/UV 램프 생물학적 후드 하에서 바람직한 부피를 얻기 위해 염수를 첨가함으로써 수행하였다. 시험/대조군 물품을 제조 기간 동안 4°C에서 보관하였다. 각각의 동물에 대한 적절한 부피의 시험/대조군 물품을 정맥내로

주사하였다.

- [0333] 임상적 관찰 및 체중. 모든 동물을 사망률 및 질병 건강의 정후에 대해 매일 1회 관찰하였다. 동물의 개별적 체중 및 종양 크기를 측정하고, 처리 일에 및 그 후 3일마다 기록하였다.
- [0334] 처리. 마우스를 제0일 및 제4일 (96시간 간격)에 꼬리 정맥을 통해 5 mg/kg의 시험 물품으로 주사하였다. 대조군은 염수로 처리하였다. 주사 일에 동물 중량 및 주사된 부피를 기록하였다.
- [0335] 샘플 수집, 프로세싱 및 저장. 혈액 샘플을 시점 당 3마리의 동물로부터 제2 용량 후 1, 2, 4, 6, 24, 48, 96, 120, 168, 216, 264 및 336시간에 하약 정맥을 통해 수집하였다.
- [0336] **도 16**은 혈액 샘플이 제2 용량전, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 24시간, 48시간, 96시간, 120시간, 168시간, 216시간, 264시간, 및 336시간에 취해진 것을 비롯한 연구 설계를 나타낸다. 종양 부피 측정, 및 투여를 제1일 및 제4일에 취한 반면, 종양 부피 측정을 지시된 간격에서 취하였다. 또한 **도 16**에 나타난 바와 같이, 하기 연구 설계는 동물 수 및 연구에 대한 시점이다. 대략 80 내지 100 μ L의 얻어진 혈액을 실온에서 15 내지 30분 동안 응고시킨 후, 실온에서 10분 동안 1500 g에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 액체 성분 (혈청)을 즉시 사전-표지된 튜브 내로 옮기고, 드라이 아이스 상에서 즉시 순간-동결시키고, -80°C에서 저장하였다.
- [0337] 연구의 종료 시, 종양을 수집하였다. 각각의 종양의 반 부분을 4% 파라포름알데히드에 실온에서 밤새 고정시키고, PBS로 세척하고, 파라핀 포매하였다. 이어서, 파라핀 포매된 종양을 프로젝트 리드의 재량에 따라 AXL 발현에 대해 프로세싱할 것이다. 종양의 다른 반을 드라이 아이스를 사용하여 급속하게 동결시키고, 추가의 분석을 위해 -80°C에서 저장하였다.
- [0338] 통계적 분석. 각각의 군에서의 종양 부피를 평균 \pm SEM으로 나타내고, MDA-MB-231-Luc 세포 접종 후의 측정 시간의 함수로서 플로팅한다. 종양 부피 데이터에 대한 군 비교를 그래프패드™ 프리즘 버전 7.0을 사용하여 터키 다중 비교 검정을 갖는 2-원 ANOVA를 사용하여 수행하였다. 처리군 및 대조군 사이의 차이는 $P < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하였다. 그립스 (Grubbs) 검정을 사용하여 대조군/처리군 내의 아웃라이어를 측정하였다 ($\alpha=0.05$).
- [0339] **결과 및 논의**
- [0340] **도 17**은 5 mg/kg의 hF111-5E9-DM1로 2회 (제0일 및 제4일) 처리한 후의 MDA-MB-231-Luc 종양-함유 마우스에서의 초기 체중 (BW)의 백분율로서의, 체중에 대한 항-AXL ADC의 효과를 나타낸다. ADC 완충제 (원) 및 hF111-5E9-DM1 (삼각형) 군이 예시된다.
- [0341] 체중을 오프-타겟 잠재적 독성의 지표로서 측정하였다. 대조군 동물 (ADC 완충제 군) 및 hF111-5E9-DM1 처리된 동물 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 둘 다의 군에서의 마우스는 실험 기간 동안 약 10% 체중 증가하였다.
- [0342] **도 18**은 종양 부피로서 평가된, 종양 성장에 대한 항-AXL ADC의 효과를 나타낸다. ADC 완충제 (CTR) 또는 5 mg/kg hF111-5E9-DM1 중 어느 하나로 2회 (제0일 및 제4일) 처리된 MDA-MB-231-Luc 종양-함유 마우스에서의 종양 성장 곡선이 나타내어지며, 종양 부피 (mm^3)는 3일마다 기록된다. 각각의 데이터 점은 ADC 완충제 (원) 및 hF111-5E9-DM1 (삼각형) 군에 대한 평균 \pm SEM을 나타낸다.
- [0343] 종양 성장에 대한 통계적으로 유의한 ($p<0.05$) 효과가 제8일 내지 제28일에 hF111-5E9-DM1-처리된 및 ADC 완충제-처리된 군 사이에 관찰되었다. hF111-5E9-DM1 군으로부터의 1마리의 동물은 동일한 군에서 나머지에 비해 유의하게 더 높은 종양 성장 속도를 나타내었다. 이 동물을 그립스 검정을 사용하여 아웃라이어로서 추가로 확인하였다 ($\alpha=0.05$).
- [0344] hF111-5E9-DM1-처리된 군에서의 평균 종양 부피 감소는 제28일에 약 90에서 360 mm^3 까지의 종양 성장을 경험한 대조군에 비해, 약 90에서 60 mm^3 였다. 감소된 종양 부피의 이 현저한 차이는 항-AXL ADCx가 유방암 종양 모델에서 종양 부피를 감소시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0345] 실시예 18: 시험관내에서 혈액 뇌 장벽을 횡단하는 항-AXL sdAb 능력의 평가
- [0346] 혈액 뇌 장벽을 횡단하는 항-AXL 항체의 능력을 이 실시예에서 평가한다. 중추 신경계 (CNS)에서의 AXL의 발현으로 인해, AXL을 표적화하고 독소 (예컨대 DM1, MMAE 등)에 연결된 항체는, 이들이 혈액 뇌 장벽 (BBB)을 횡단할 수 있는 경우, 뇌에서 매우 강력한 온-타겟 독성을 나타낼 수 있다. 따라서, BBB를 횡단하는 특정 항-AXL

sdAb의 능력을 인간 시험관내 BBB 모델을 사용하여 평가한다.

[0347] 물질 및 방법

[0348] 인간 혈액 뇌 장벽 모델. 줄기 세포 기재 인간 BBB 모델을 사용한다. 모델은 인간 양수-유래된 유도된 다능성 줄기 세포로부터 생성된 뇌 내피 세포 (BEC)를 이용한다. 이 시험관내 인간 혈액-뇌 장벽 (BBB) 모델은 유망한 BBB-침투 화합물 및 CNS-표적화 항체의 전-임상 스크리닝을 가능하게 한다. 이들 BEC는 실질적 장벽 특성, 예컨대 잘 조직화된 연속적 긴밀한 연접부, 높은 경내피 전기 저항성 (TEER) 및 유출 및 수용체-매개 통과세포외 배출 (RMT) 수송체의 극성화된 발현을 나타낸다.

[0349] 트랜스웰-기재 시험관내 BBB 모델. 트랜스웰 BBB 검정은 12-웰 동반 플레이트 내로 정치된 젤라틴-코팅된 투과성 트랜스웰 막 삽입물 상으로 시팅된 BEC로 구성된다. BEC를 폐놀 레드가 없는 1 mL의 BEC 공급 배지에서 1 μ m 기공 크기의 래트-꼬리 콜라겐 코팅된 0.83 cm^2 팔콘 (Falcon)TM 세포 삽입물 상에 500,000개 세포/막으로 시팅하였다. 12-웰 조직 배양 플레이트 (즉, 수송을 위한 하부 챔버)의 웰은 폐놀 레드가 없는 2 mL의 BEC 배지를 함유하였다. TEER 값을 각각의 삽입물에 대해 측정하고, 단지 $> 300 \Omega \text{ cm}^2$ 의 TEER을 갖는 삽입물을 통과세포외배출 연구에 사용하였다. 수송 실험을 1.25 μM 의 각각에서 시험 항체 (표 19) 및 음성 대조군 (A20.1)의 혼합물을 상부 챔버에 첨가함으로써 및 나노LC-MS/MS에 의한 모든 시험 항체의 동시 정량화 (다중 반응 모니터링 - MRM)를 위한 15, 30, 60 및 90분에서의 하부 챔버로부터 100 μL 분취물을 수집함으로써 (이어서, 각각의 분취물 수집 후에 하부 챔버 내로 100 μL 의 수송 완충제의 대체) "다중화" 방식으로 수송 완충제 (포스페이트 완충 염수 중 10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 및 0.01% BSA, pH 7.4; 1 mL 상부 챔버 및 2 mL 하부 챔버)에서 수행하였다.

[0350] 시험 물품에 대한 및 A20.1에 대한 특이적 웨პ티드 시그니처를 MRM 분석을 위해 측정하였다. 시험 항체에 대해, Fc 웨პ티드 (TTPVVLSDGSSFLYSK; 서열식별번호: 187) 및 음성 대조군에 대해 A20.1 웨პ티드 (EFVAAGSSTGR; 서열식별번호: 188)를 MRM에 의해 검출하였다. 검정의 기간 동안 BBB의 통합성을 각각의 시험 샘플에서 BBB 비-횡단 sdAb (A20.1)의 혼입에 의해 모니터링하였다. FC5HFc1X0을 양성 대조군으로서 및 TWIN200-hIgG1을 음성 대조군으로서 사용하였다. 이 연구에서 평가된 sdAb 및 대조군 시험 물품을 표 19에 개요한다. 실험은 삼중으로 수행하였다.

[0351] <표 19>

표 19 시험관내 BBB 검정에 사용된 시험 물품 (hIgG1의 Fc 도메인에 융합된 항-AXL sdAb) 및 대조군 분자*										
코드	삽입물의 수	시간 (분)	시험 항체				음성 대조군			
			평청	상세사항	MW	상부 μM	평청	상세사항	MW	상부 μM
AOL	3	90	FC5hFc1X0	AP16 0408	78334	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOM	3	90	NRC-sdAb001-hlgG1	-	76853	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AON	2	90	NRC-sdAb002-hlgG1	-	79514	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOO	1	90	NRC-sdAb003-hlgG1	-	77267	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOP	2	90	NRC-sdAb004-hlgG1	-	78810	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOQ	3	90	NRC-sdAb005-hlgG1	-	76915	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOR	3	90	NRC-sdAb006-hlgG1	-	77496	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOS	3	90	NRC-sdAb008-hlgG1	-	77838	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOT	1	90	TWIN200-hlgG1		79009	1.25	A20.1	140915	15670	1.25

*시험 항체에 대해, Fc 웨პ티드 (SEQ ID NO:187) 및 음성 대조군에 대해 A20.1 웨პ티드 (SEQ ID NO:188)을 모니터링하였다 (MRM).

[0352]

[0353] 결과

[0354] FC5Hfc1X0 (양성 대조군), TWIN200-hIgG1 (음성 대조군) 및 7종의 항-AXL sdAb의 시험관내 P_{app} 값의 비교를 도 19에 나타낸다. 다양한 분자량의 대조군 분자, 15.6 kDa (A20.1), 및 79.0 kDa (TWIN200-hIgG1)은 약 9.0 내지 15.0×10^{-6} cm/분의 범위의 유사한 낮은 P_{app} 값을 나타내었으며; 대조적으로, FC5Hfc1X0에 대한 P_{app} 값은 약 175×10^{-6} cm/분이었다 (A20.1보다 > 10배 더 높음). 모든 항-AXL sdAb는 음성 대조군과 유사한 P_{app} 값을 나타내었으며, 이는 그들의 각각의 대조군에 비해 (약 2배의) 낮은 P_{app} 값을 나타내는 NRC-sdAb004 및 NRC-sdAb005 항체를 제외하고, 시험관내 BBB의 유의한 침투성이 없음을 지시한다. 차트의 하부에서의 회색 선은 정량화의 하부 수준 (Lower Level of Quantification) (LLOQ)을 지시한다. NRC-sdAb006-hIgG1에 대해 차트에 나타내어진 별표는 누출성 삽입물 AOR1 데이터가 제거되었음을 지시한다.

[0355] 표 20은 P_{app} 데이터를 제공하며, A20.1 (음성 대조군)에 비한 시험 물품에 대한 P_{app} 값의 통계적 분석을 나타낸다.

[0356] <표 20>

표 20 P_{app} 값 및 통계적 유의성			
시험 Ab	시험 Ab의 P_{app}	A20.1의 P_{app}	p-값 (시험 대 A20.1)
FC5hFc	175.8 ± 26.3	11.9 ± 0.8	p<0.001
NRC-sdAb001-hIgG1	9.56 ± 1.52	10.7 ± 2.6	ns
NRC-sdAb001-hIgG1	7.02 ± 1.04	14.1 ± 2.2	ns
NRC-sdAb002-hIgG1	5.22 ± 0.0	9.15 ± 0.0	ns
NRC-sdAb003-hIgG1	9.17 ± 0.21	12.5 ± 0.3	ns
NRC-sdAb004-hIgG1	17.1 ± 8.3	9.75 ± 1.25	p=0.01
NRC-sdAb005-hIgG1	24.3 ± 10.2	10.9 ± 0.2	p=0.01
NRC-sdAb006-hIgG1	11.4 ± 3.3	11.8 ± 2.9	ns
NRC-sdAb008-hIgG1	13.6 ± 0.0	12.5 ± 0.0	ns

[0357]

[0358] 선행 설명에서, 설명의 목적으로, 다수의 상세사항이 실시양태의 철저한 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 이들 구체적인 상세사항은 요구되지 않음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0359] 상기-기재된 실시양태는 단지 예인 것으로 의도된다. 변경, 변형 및 변화가 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 특정 실시양태에 실행될 수 있다. 청구항의 범위는 본원에 제시된 특정 실시양태에 의해 제한되지 않아야 하지만, 전체로서 명세서와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0360] 서열

[0361] 본원에 언급된 서열의 통합된 목록은 표 21에서 발견된다.

[0362]

<표 21>

표 21 서열의 통합 목록		
SEQ ID NO:	서열	설명
1	KSSQSLNX ₁ RTRKX ₂ YLA, X ₁ =S 또는 T; X ₂ =I 또는 N	CDR L1-B 컨센서스
2	WASTRX ₁ X ₂ , 여기서 X ₁ =E, H 또는 Q 및 X ₂ =S 또는 T	CDR L2-B 컨센서스
3	GX ₁ TFX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ , X ₁ =F 또는 Y; X ₂ =I, S 또는 T; X ₃ = S, N 또는 K; X ₄ =F 또는 Y; X ₅ =G 또는 W; X ₆ =I 또는 M; X ₇ =N, S 또는 H	CDR H1-B 컨센서스
4	NIX ₁ PX ₂ SX ₃ SX ₄ X ₅ YNEKFKX ₆ , X ₁ =F, N, 또는 Y; X ₂ =G, N, 또는 D; X ₃ =S 또는 T; X ₄ =A 또는 T; X ₅ =N 또는 D; X ₆ =S 또는 R	CDR H2-B 컨센서스
5	DX ₁ YGGSPDY, X ₁ =T 또는 Y	CDR H3-B 컨센서스
6	WASTRX ₁ S, X ₁ =E 또는 Q	CDR L2-B 컨센서스 (2)
7	GYTFTSX ₁ WIN, X ₁ =F 또는 Y	CDR H1-B 컨센서스 (2)
8	NIX ₁ PX ₂ SSSTNYNEKFKS, X ₁ =F 또는 Y 및 X ₂ =G 또는 D	CDR H2-B 컨센서스 (2)
9	KSSQSLNNSRTRKIYLA	F107-7H5 CDR L1-B
10	WASTRQS	F107-7H5 CDR L2-B
11	KQSYNLWT	F107-7H5/F107 & 8D12 CDR L3-B
12	GYTFTSYWIN	F107-7H5 CDR H1-B
13	NIYPDSSSTNYNEKFKS	F107-7H5 CDR H2-B
14	DTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-B
15	KSSQSLLNTRTRKNYLA	F107-8D12 CDR L1-B
16	WASTRES	F107-8D12 CDR L2-B
17	GYTFISFWIN	F107-8D12 CDR H1-B
18	NIFPGSSSTNYNEKFKS	F107-8D12 CDR H2-B
19	DYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-B
20	RASQDINNYLN	F111-5E9 CDR L1-B

[0363]

21	YISRLHS	F111-5E9 CDR L2-B
22	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-B
23	KYGMN	F111-5E9 CDR H1-B
24	WINTYTGEPTYADDFKG	F111-5E9 CDR H2-B
25	GGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-B
26	SASSSVSYMY	F111-3C8 CDR L1-B
27	RTSNLAS	F111-3C8 CDR L2-B
28	QQYHNPPT	F111-3C8 CDR L3-B
29	GYTFTSYWMH	F111-3C8 CDR H1-B
30	NINPNSTSADYNEKFKR	F111-3C8 CDR H2-B
31	PLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-B
32	KASQDVTTAVA	F107-10G1 CDR L1-B
33	WASTRHT	F107-10G1 CDR L2-B
34	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-B
35	NYGMS	F107-10G1 CDR H1-B
36	SISGGGGRTYYLDNVKG	F107-10G1 CDR H2-B
37	GARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-B
38	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNNRTRKIYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQA EDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTLEIK	F107-7H5 VL
39	QVQLQQPGGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWKQRPG QGLEWIGNIYPDSSSTNYNEKFKSATLTVDKSSTAYIQFSSLT SEDSAVYYCTRDTYGGSPDYWGQGTTLTVSS	F107-7H5 VH
40	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLNNTRTRKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQA EDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTLEIK	F107-8D12 VL
41	QVQLQQPGGAELVKPGASVQLSCKASGYTFTFISFWINWKQRPG QGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSATLTVDKSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTLTVSS	F107-8D12 VH
42	QIVLTQSPAAMSASPGEKVТИSCSASSSVSYMYWYQQKPGSSP KPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAEDAATYY CQQYHNPPTFGGGTLEIK	F111-3C8 VL
43	QVQLQQPGGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRVP GQGLEWIGNINPNSTSADYNEKFKRATLTVDKSSTAYMQLSS TLTSEDSAVYYCTRPLMGPYWYFDVWGTTVSS	F111-3C8 VH
44	DIQMTQTTSSLASLGDRVVTICRASQDINNYLNWYQQKPDGT VKLIIYIYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLELEDVATYFC QQGNTLPFTFGSGTLEIK	F111-5E9 VL
45	QIQLVQSGPELKPGTETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQAPGK GLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNL TTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPMDYWGQGTSVTVSS	F111-5E9 VH
46	VIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRHTGVDRFTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLAFY YCQQHFTTPLTFGAGTLEIK	F107-10G1 VL
47	EVNLVESGGGVVKPGASLKLSCAESGFTFSNYGMSW/RQTS KRLEWVASISGGGGRTYYLDNVKGRIISRENAKNTLYLQMSSL KSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSVTVSS	F107-10G1 VH
48	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNNRTRKIYLAWYQ	키메라 F107-7H5 경쇠

[0364]

	QKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAVYYCKQSINYLWTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE 49		
49	QVQLQQPGAEVKPGASVQLSCKASGYTFTSYWINWKQRPG QGLEWIGNIYPDSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYIQFSSLT SEDSAVYYCTRDTYGGSPDYWGQGTTLVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	기메라 F107-7H5 중쇄	
50	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLNTRKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAVYYCKQSINYLWTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE 51	QVQLQQPGAEVKPGASVQLSCKASGYTFTFISFWINWKQRPG QGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCARDYGGSPDYWGQGTTLVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKDTLMSRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	기메라 F107-8D12 중쇄
52	QIVLTQSPAAMSAPGEGKVTISCSASSSVSYMWYQQKPGSSP KPWIYRTSNLASGPARFSGSGSGTTSYSLTISSMEAADAATYY CQQYHNPPTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 53	QVQLQQPGAEVGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRVP GQGLEWIGNINPNSTSADYNEKFKRKATLTVDKSSSTAYMQLS TLTSEDSAVYYCTRPLMGPWYFDWVGTGTTVTVSSASTKG SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPPKDTLMS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	기메라 F111-3C8 중쇄

54	DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISC RASQDIN NYLNWYQQKPDGT VKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLELEDVATYFC QQGNTLPFTFGSGT KLEI KRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASV VCLNNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE C	키메라 F111-5E9 경쇄
55	QIQLVQSGPELKKGPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQAPGK GLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNL TTEDMV TYFCAKGGYYSNPIYPMYWGQGTSVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMIS RTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHN A KTPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAK GQPREPVYTLPPSRDELT K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHTQKSLSLSPG	키메라 F111-5E9 중쇄
56	VIVMTQSHKFMSTS VGD RVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQ SPKLLIYWA STRHTGV PDRFTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLAFY YCQQQHFTTPLTFAGT KLELKRTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTA SVVCLNNF YPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE C	키메라 F107-10G1 경쇄
57	EVNLVESGGGVVKPGASLKLSC EASGFTFSNYGMSW RQ TSD KRLEW V A S I S G G G R T Y Y L D N V K G R F I I S R E N A K N T L Y L Q M S S L K S E D T A L F Y C A R G A R A S Y F A M D Y W G Q G S S V T V S S A S T K G P S V FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRT PEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHN A KTPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQ PREPVYTLPPSRDELT K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS V MHEALHNHTQKSLSLSPG	키메라 F107-10G1 중쇄
58	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVG PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPPEVHWLRDGQILEADSTQ TQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTF VSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFLNLS CQAQGPPEPV DLLWLQDAVPLATAGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAK GVTTSRATITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEV A WTPGLSGIYPL THCTLQAVLSDDGMGIQAGEPD PPEEPLTSQASVPPHQLRLGS LHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGP PENIS ATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEV LMDI GLRQEVTLELQGDGSVSNLTV CVAAYTAAGDGPWSLP VPLEA WRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWGSGGGSSSTG	rhAXL-ECD
59	MVLQTQVFISLLWISGAYG	경쇄 신호 서열
60	MDWTWRLFLVAAATGTHA	중쇄 신호 서열
61	gacattgtatgtcacagtccatccctccggctgtcagcaggagagaaggctact tgagctgcaatccagtcagactgctcaacagtagaaccgaaagatctactggctt	F107-7H5 VL 서열

[0366]

[0367]

	ggccaatctctaaactactgatttactgggcattccacccggcacactggagtcctgatc gcttcacaggcagtggatctggacagattattcttcaccatcagcaatgtcagactga agacctggcatttattactgtcagacaatttaccactcctcagttcggtctgggacc aagtggagctgaaa	
70	gaagtgaacctgggagctggggaggcgtagtgaaggcctggagcgctctgaaaact ctccctgtgaaggcctctggatcttcattactatggcatgtctgggtcgccagactca gacaagaggctggagtggtcgcatccattactgtgggtgtgtgaaacactactatcta gacaatgtaaaggccgattcatctccagagagaatgcaagaacaccctgtacct gcaaattgatgtcgaagtgctgaggacacggcctgtttactgtgcaagaggagctcg ggcccttactttctatggactactggcataaggaaatgtcaccgtctccca	F107-10G1 VH 서열
71	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVEHWLRDGQILELADSTQ TQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTF VSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPV DLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLLHVPGLNKTSSFSCEAHNAK GVTTSRATITVLPQQPRNLHLSRQPTLEVAWTPGLSGIYPL THCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGS LHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPENIS ATRNGSQAFVHWQEPRAVLQGTLGYRLAYQGQDTPEVLMDI GLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEA WRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWGSGGSSTGHHHHH HHHG	(rh)AXL-ECD His8
72	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVEHWLRDGQILELADSTQ TQVPLGEDEQDDWIVVSQRLITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTF VSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPV DLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLLHVPGLNKTSSFSCEAHNAK GVTTSRATITVLPQQPRNLHLSRQPTLEVAWTPGLSGIYPL THCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGS LHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPENIS ATRNGSQAFVHWQEPRAVLQGTLGYRLAYQGQDTPEVLMDI GLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEA WRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWVLLGAVVAAACVLIL ALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVRYRVRKSYSRRTTE ATLNSLGLISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEG QLNQDDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDLSEAVCMKEFDHPNV MRLIGVCFQGSERESFPAPVILPFMKGDLHSFLLYSRLGDQP VYLPTQMLVKFMADIASCMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENM SVCVADFGLSKKIYNGDYYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVT KSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQ PADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPA QEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGAADPPTQPDPKDSCSCL TAAEVHPAGRYVLCPSITTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGAYLE CGRYASHHHHHH	AXL – 전장 His6
73	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYIFTNFWINWKQRPG QGLEWIGNIFPGNSNSNNYNEFKKNKATLTVDKSSSTAYMHLSSL TSEDSAVYYCVRDYYGGSPDYWGQGTTLVSS	F155-3C7 VH
74	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSSLNSKTRKNYAWYQ QKPGQSPKLLIYWAStRESGVPARFTGSGSGTDFTLTISSVQA	F155-3C7 VL

	EDLAIYYCKHSYNLWTGGGTKLEIR	
75	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFYYGINWVKQAPGK GLEWMGWINTYLGEPTYADDFKGRFAFSLSTSASTAYLQINNL RDEDMATYFCTRGTMSYSFDYWGQGTALTVSS	F149-4G4 VH
76	QNVLTQSPAIMSASPGEEVMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSG ASPKLWYSTSCLKASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEVAEDAAT YYCHQYSGDPLTFGSGTKLEVK	F149-4G4 VL
77	GFTFSNYG	F107-10G1 CDR H1-A
78	ISGGGGRT	F107-10G1 CDR H2-A
79	ARGARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-A
80	QDVTTA	F107-10G1 CDR L1-A
81	WAS	F107-10G1 CDR L2-A
82	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-A
83	GYTFTKYG	F111-5E9 CDR H1-A
84	INTYTGEP	F111-5E9 CDR H2-A
85	AKGGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-A
86	QDINNY	F111-5E9 CDR L1-A
87	YIS	F111-5E9 CDR L2-A
88	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-A
89	GYTFISFW	F107-8D12 CDR H1-A
90	IFPGSSST	F107-8D12 CDR H2-A
91	ARDYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-A
92	QSLLNTRTRKNY	F107-8D12 CDR L1-A
93	WAS	F107-8D12 CDR L2-A
94	KQSYNLWT	F107-8D12 CDR L3-A
95	GYTFTSYW	F107-7H5 CDR H1-A
96	IYPDSSST	F107-7H5 CDR H2-A
97	TRDTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-A
98	QSLLNSRTRKIY	F107-7H5 CDR L1-A
99	WAS	F107-7H5 CDR L2-A
100	KQSYNLWT	F107-7H5 CDR L3-A
101	GYIFTNFW	F155-3C7 CDR H1-A
102	IFPGSNSS	F155-3C7 CDR H2-A
103	VRDYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-A
104	QSLLNSKTRKNY	F155-3C7 CDR L1-A
105	WAS	F155-3C7 CDR L2-A
106	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-A
107	GYTFTSYW	F111-3C8 CDR H1-A
108	INPNSTSA	F111-3C8 CDR H2-A
109	TRPLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-A
110	SSVSY	F111-3C8 CDR L1-A
111	RTS	F111-3C8 CDR L2-A
112	QQYHNYPPT	F111-3C8 CDR L3-A
113	GYTFTYYG	F149-4G4 CDR H1-A
114	INTYLGEP	F149-4G4 CDR H2-A
115	TRGTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-A
116	SSSVSSSY	F149-4G4 CDR L1-A
117	STS	F149-4G4 CDR L2-A

[0369]

118	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-A
119	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQAPGK QRELVAAITTLDIANYRDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMDSLKP EDTARYHCAAFQSDQNYWGQGTQTVSS	NRC-sdAb001
120	QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRVSSAVMAWFRQAPE KVRDFVGFITNSGNILYDDSVKGRFTISRDNNAQNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAKW\$FSSGYGDLRRAAMYDYWGQGTQTVSS	NRC-sdAb002
121	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDYTAIGWFRQAPG KERELVAAITSGGNNTDYAESAKGRFRISRDNKNTIYLQMNSLK PEDTGVYYCAARRGGARGEYDYWDQGTQTVSS	NRC-sdAb003
122	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAFSRGAFDTYEIGWFRQAPG KEREFAAATRNGDSVYADSLKARFTASRNNAVNNTAYLHMNI LQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADDYADWGQGTQTVSS	NRC-sdAb004
123	QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISIINTIGWFRQAPGK QRELVAASDGSANRNYADSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNNLK PEDTAIYYCRAWTGTISTMYWGQGTQTVSS	NRC-sdAb005
124	QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASESIFGFNTMGWYRQAPG NERELVASINSKRTMYADSVKGRFTISRDNNAKNTVNLQMNNL KPEDTAVYYCRAWGIITSATVYWGQGTQTVSS	NRC-sdAb006
125	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRVSSAVMAWFRQAPE KERDFVGFISNSGSVYDDSVKGRFTISRDNNAQNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQTVSS	NRC-sdAb007
126	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSGMINTMGWYRQAP GKQRELVARSTGTTNYADSVKGRFTISRDDANNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQTVSS	NRC-sdAb008
127	ASISSFDI	NRC-sdAb001 CDR1-A
128	ITTLDIA	NRC-sdAb001 CDR2-A
129	AAFQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-A
130	TRTVSSAV	NRC-sdAb002 CDR1-A
131	ITNSGNII	NRC-sdAb002 CDR2-A
132	AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-A
133	GVTLDYTA	NRC-sdAb003 CDR1-A
134	ITSGGNT	NRC-sdAb003 CDR2-A
135	AARRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-A
136	RGAFDTYE	NRC-sdAb004 CDR1-A
137	VTRNGDSV	NRC-sdAb004 CDR2-A
138	AANWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-A
139	GSISSIONT	NRC-sdAb005 CDR1-A

[0370]

140	SDSGANR	NRC-sdAb005 CDR2-A
141	RAWGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-A
142	ESIFGFNT	NRC-sdAb006 CDR1-A
143	ISNSKRT	NRC-sdAb006 CDR2-A
144	RAWGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-A
145	TRTVSSAV	NRC-sdAb007 CDR1-A
146	ISNSGSV	NRC-sdAb007 CDR2-A
147	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-A
148	GSSGMINT	NRC-sdAb008 CDR1-A
149	RSTGGTT	NRC-sdAb008 CDR2-A
150	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-A
151	NFWIN	F155-3C7 CDR H1-B
152	NIFPGSNSSNYNEKFKN	F155-3C7 CDR H2-B
153	DYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-B
154	KSSQSLNNKTRKNYLA	F155-3C7 CDR L1-B
155	WASTRES	F155-3C7 CDR L2-B
156	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-B
157	YYGIN	F149-4G4 CDR H1-B
158	WINTYLGEPTYADDPKG	F149-4G4 CDR H2-B
159	GTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-B
160	RASSSVSSSYLH	F149-4G4 CDR L1-B
161	STSKLAS	F149-4G4 CDR L2-B
162	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-B
163	FDIMG	NRC-sdAb001 CDR1-B
164	AITTLIDIANYRDSVKKG	NRC-sdAb001 CDR2-B
165	FQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-B
166	SAVMA	NRC-sdAb002 CDR1-B
167	FITNSGNILYDDSVKG	NRC-sdAb002 CDR2-B
168	KWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-B
169	YTAIG	NRC-sdAb003 CDR1-B
170	AITSGGNTDYAESAKG	NRC-sdAb003 CDR2-B
171	RRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-B
172	TYEIG	NRC-sdAb004 CDR1-B
173	AVTRNGDSVYADSLKA	NRC-sdAb004 CDR2-B
174	NWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-B
175	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR1-B

[0371]

176	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR2-B
177	WGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-B
178	FNTMG	NRC-sdAb006 CDR1-B
179	SISNSKRTMYADSVKG	NRC-sdAb006 CDR2-B
180	WGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-B
181	SAVMA	NRC-sdAb007 CDR1-B
182	FISNSGSVYYDDSVKG	NRC-sdAb007 CDR2-B
183	IWRSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-B
184	INTMG	NRC-sdAb008 CDR1-B
185	RRSTGGTTNYADSVKG	NRC-sdAb008 CDR2-B
186	IWRSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-B
187	TPPPVLDSDGSFFLYSK	Fc 펩티드
188	EFVAAGSSTGR	A20.1 펩티드

주 - “-A”에 이어진 CDR 서열 설명은 IMGT CDR 관례를 지시한다.

“-B”에 이어진 CDR 서열 설명은 카바트 CDR 관례를 지시한다.

[0372]

[0373]

참고문헌:

[0374] 본원에 언급된 모든 간행물은 본원에 참조로 포함된다.

[0375] 국제 특허 공개 WO2016/005593 A1 (브레이지 등)

[0376] 미국 특허 출원 공개 US 2014/0227283 A1 (로버트 (Robert) 등)

Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. (2014) AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*. 33(10):1316-24.

Baral et al. (2013) Single-domain antibodies and their utility. *Curr Protoc Immunol*. 2013 Nov 18;103:Unit 2.17.

Feneyrolles c, Spenlinhauer A, Guiet L, Fauvel B, Daydé-Cazals B, Warnault P, Chevé G, Ysri A. (2014) AXL Kinase as a Key Target for Oncology: Focus on Small Molecule Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13; 2141-2148.

Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Li S, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorens JB (2010) AXL is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(3):1124-9.

Gonzales NR, DePascalis R, Schlom J, Kashmiri SVS (2005) Minimizing the Immunogenicity of Antibodies for Clinical Application. *Tumor Biol* 26, 31-43.

[0377]

Henry et al., 2016, "Isolation of TGF- β -neutralizing single-domain antibodies of predetermined epitope specificity using next-generation DNA sequencing", Protein Engineering, Design and Selection, pp. 1-5, 2016-09-08 (PEDS)

Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Friera AM, Atchison RE, McLaughlin J, Swift SE, Pali ES, Yam G, Wong S, Lasaga J, Shen MR, Yu S, Xu W, Hitoshi Y, Bogenberger J, Nör JE, Payan DG, Lorens JB. (2005) Multiple roles for the receptor tyrosine kinase AXL in tumor formation. *Cancer Res.* 65(20):9294-303.

Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan DG, Hitoshi Y. R428, a selective small molecule inhibitor of AXL kinase blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2010 Feb 15;70(4):1544-54.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.

Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, Narumi Y, Ohmoto H, Nishiwaki E, Akita K, Kirii Y. (2013) Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells.* 18(2):110-22.

Leconet et al., (2014) Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene* 33, 5405-5414 (20 November 2014).

Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, Chung L, Yuan RH. (2014) Gas6/ AXL pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 35:769–775.

Li Y, Ye X, Tan C, Hong JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009) AXL as a potential therapeutic target in cancer: role of AXL in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene.* 28:3442–3455.

Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, Hinrichs MJ, Bezabeh BZ, Fleming RL, Dimasi N, Feng H, Toader D, Yuan AQ, Xu L, Lin J, Gao C, Wu H, Dixit R, Osbourn JK, Coats SR. A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell.* 2016 Jan 11;29(1):117-29.

Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008) TAM receptor tyrosine kinases: Biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35–83.

Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. (2013) The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal*. 6(287).

O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. (1991) AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 11:5016–5031.

Paccez JD, Vogelsang M, Parker MI, Zerbini LF. (2014) The receptor tyrosine kinase AXL in cancer: biological functions and therapeutic implications. *Int J Cancer*. 134(5):1024-33.

Padlan EA (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol* 28, 489-498.

Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033.

Raymond et al. (2015) Production of α 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs* 7(3):571–583.

Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, LaGory EL, Kariolis MS, Chan A, Lindgren D, Axelson H, Miao YR, Krieg AJ, Giaccia AJ. (2014) Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(37):13373-8.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.

Strop P, Ho WH, Boustany LM, Abdiche YN, Lindquist KC, Farias SE, Rickert M, Appah CT, Pascua E, Radcliffe T, Sutton J, Chaparro-Riggers J, Chen W, Casas MG, Chin SM, Wong OK, Liu SH, Vergara G, Shelton D, Rajpal A, Pons J. Generating bispecific human IgG1 and IgG2 antibodies from any antibody pair. *J Mol Biol* 2012; 420(3): 204-219.

Tempest PR, Bremmer P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ, Harris WJ (1991) Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. *Biotechnology* 9, 266-271.

Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, Seymour SL, Argast GM, Epstein DM, Haley JD. (2011) A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis*. 28(2):137-55.

Tsurushita N, Hinton, RP, Kumar S (2005) Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36, 69-83.

Vincke C, et al., General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009 Jan 30;284(5):3273-84.

Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi YC, Yu PW, Qian F, Chu FL, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, et al. (2011) Cabozantinib (XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Molecular cancer therapeutics*. 10:2298-2308.

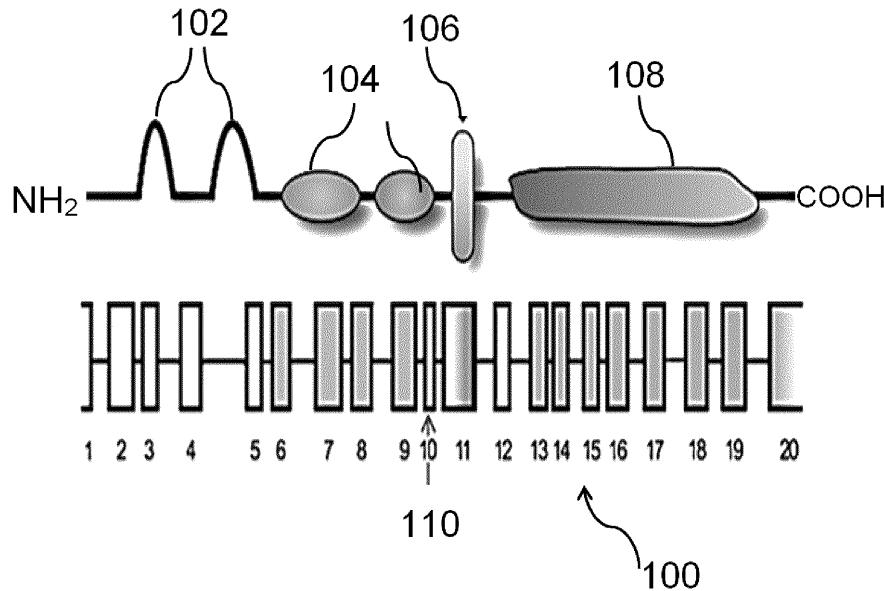
Zhang et al., 2009, Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression and Purification*, May; 65(1):77-82.

Zhou et al., 2010, *J Mol Biol*, Nov 19;404(1):88-99 Internalizing cancer antibodies from phage libraries selected on tumor cells and yeast displayed tumor antigen.

[0380]

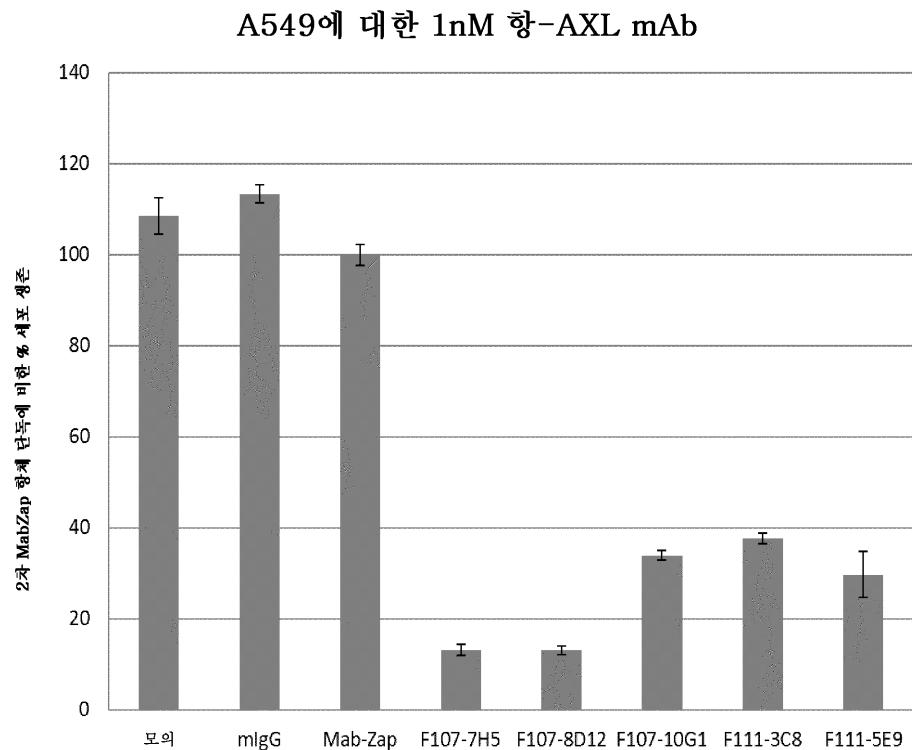
도면

도면1

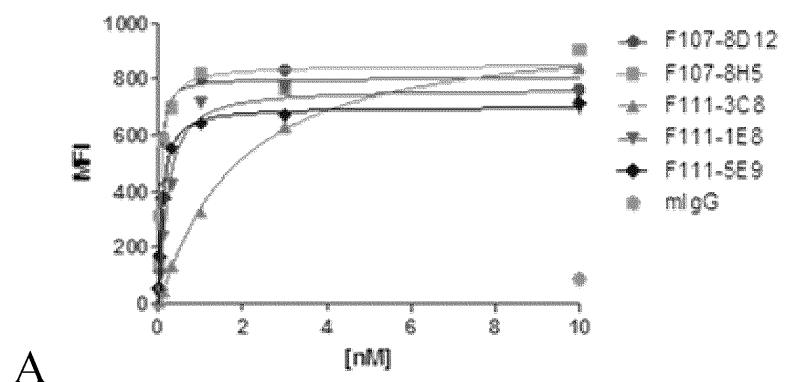


선행 기술

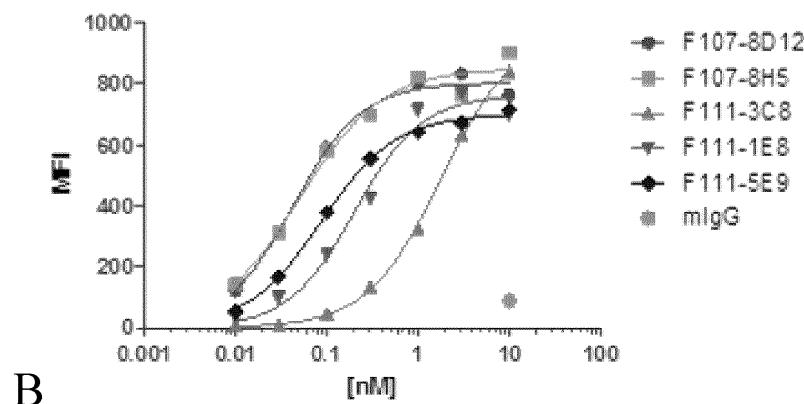
도면2



도면3

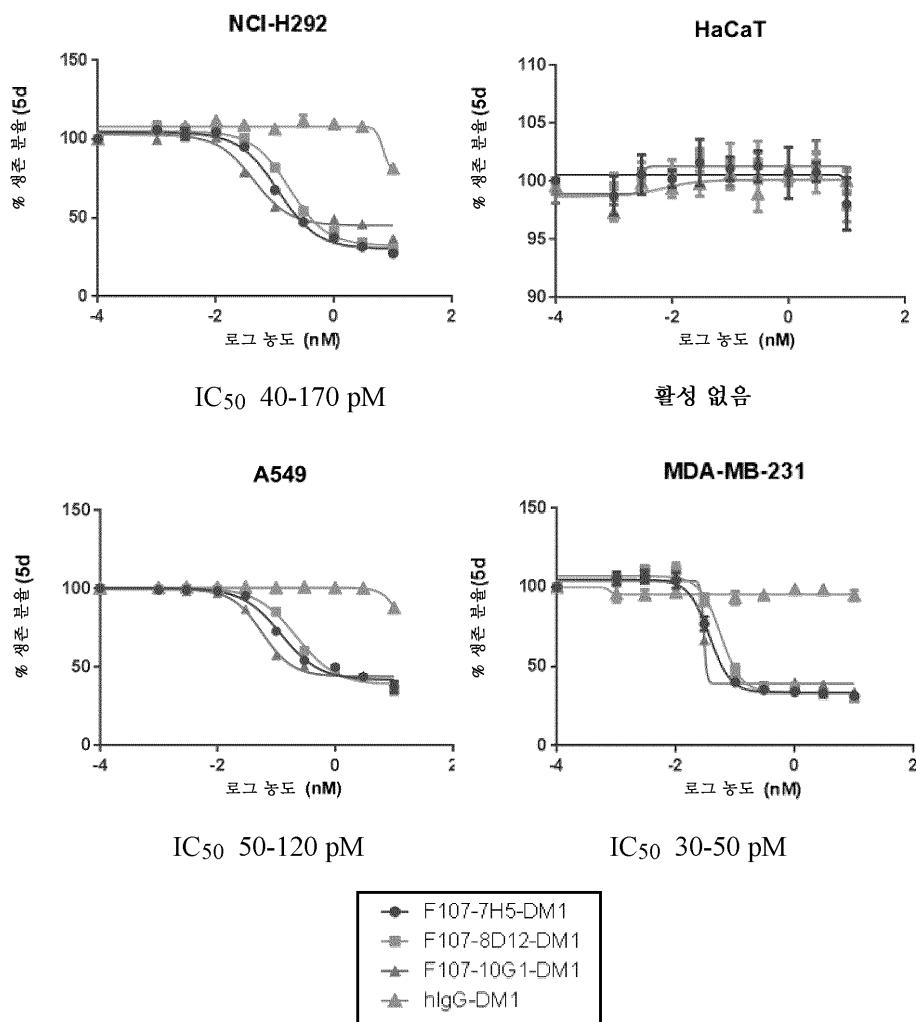


A

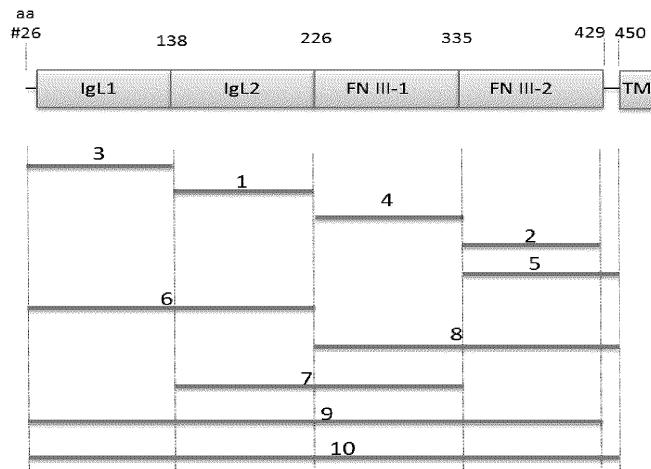


B

도면4

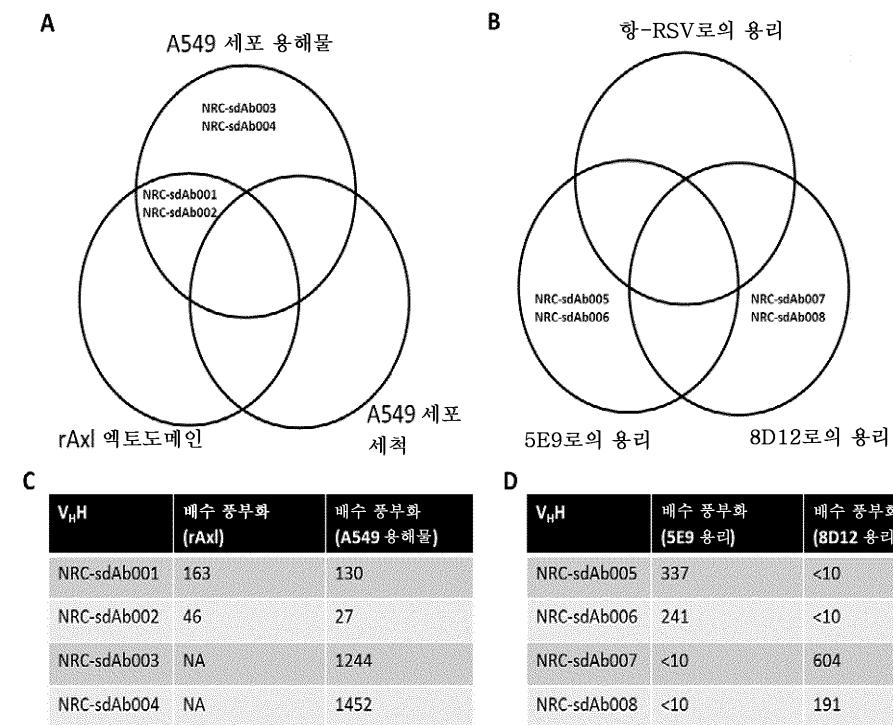


도면5

AXL 단백질 엑토도메인

AXL 단편 #	AXL 아미노산	AXL 도메인	F107-8D12- 2	F107-7H5-2	F107-10G1- 3	F111-3C8-2	F111-5E9-2	F138-9H4-2	F138-9G4-2
1	135-226	IgL2	-	-	-	++	+	-	+
2	321-429	FN III-2	-	-	-	-	-	-	-
3	26-138	IgL1	+++	+++	+++	-	-	++	-
4	219-335	FN III-1	-	-	-	-	-	-	-
5	321-450	FN III-2+	-	-	-	-	-	-	-
6	26-226	IgL1+IgL2	++++	++++	+++	++	+	+++	+
7	135-335	IgL2+FN III-1	-	-	-	++	++	-	+
8	219-450	FN III-1+FN III-2+	-	-	-	-	-	-	-
9	26-429	IgL1+IgL2+FN III-1+FN III- 2	++++	+++	++	+++	++	++	+
10	26-450	IgL1+IgL2+FN III-1+FN III- 2+	++++	++++	+++	++++	++	+++	+
없음	----	----	-	-	-	-	-	-	-

도면6



도면7

>F107.10G1(중쇄)>EVNLVESGGGVVKPGASLKSCEASGFTFSNYGMSWVRQTSRKLEWVAISGGGGRTYYLD
NVKGRIISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSVTVSS (SEQ ID:47, 77-79, 35-37)

>F107.10G1(카파)>VIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVTTAWAQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDR
FTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLAFYQQHFTPLTFAGTKEIK (SEQ ID NO:46, NO:80-82 및 NO:32-34)

>F111.5E9(중쇄)>QIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQAPGKGLKWMGINTYGEPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLTTEDMVTYCAKGGYYSNPYPMWGQGTSVTVSS (SEQ:45, 83-85, 23-25)

>F111.5E9(카파)>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPGDTVKLLIYYISRLHSGVPSRSGS
GSGTDYSLTISNLEDVATYQQGNTLPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:44, NO: 86-88 and NO:20-22)

>F107.8D12(중쇄)>QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQRPQGLEWMGNIIFPGSSSTNYN
EKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYFCARDYGGSPDWGQGTTLVSS (SEQ ID NO:41, 89-91, 17-19)

>F107.8D12(카파)>DIVMSQSPSSLAWSAGERVTMSCKSSQSLLNTRTRKNYWAQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYKOSYNLWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:40, NO: 92-94, 15,16,11)

>F107.7H5(중쇄)>QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGLEWIGNNIYPDSSSTNYNEK
FKSKATLTVDKSSSTAYIQFSSLTSEDAVYYCTRDTYGGSPDWGQGTTLVSS (SEQ ID NO:39, 95-97, 12-14)

>F107.7H5(카파)>DIVMSQSPSSLAWSAGEKVMSCKSSQSLNSRTRKIYWAQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKOSYNLWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38, NO: 98-100, 9-11)

>F155.3C7(중쇄)>QVQLQQPGTELVKPGASVQLSCKASGYIFTNFWINWVKQRPQGLEWIGNNIIFPGSNSSNYNEK
FKNKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDAVYYCVRDYYGGSPDWGQGTTLVSS (SEQ NO:73, 101-103, 151-153)

>F155.3C7(카파)>DIVMSQSPSSLAWSAGEKVMSCKSSQSLNSKTRKNYWAQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PARFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCKHSYNLWTFGGGTKLEIR (SEQ:74, 104-106, 154-156)

>F111.3C8(중쇄)>QVQLQQPGAEVKGPGTSVQLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGNNIINPNSTSADYN
EKFKRKATLTVDKSSSTAYMQLSLTSEDAVYYCTRPLMGPWYFDVWGTTTVSS (SEQ:43, 107-109, 29-31)

>F111.3C8(카파)>QIVLTQSPAAMSASPGEKVTCASSSSVSYWYQQKPGSSPKWIYRTSNLASGVPARFSGSG
SGTSYSLTISSMEAADAATYYCQQYHNYPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:42, 110-112 및 26-28)

>F149.4G4(중쇄)>QIQLVQSGPELKPGETVKISCKTSGYTFTYYGINWVKQAPGKGLEWMGWINTYGEPTYADD
FKGRFAFSLETSASTAYLQINNLREDMATYCTRGTMYSFDWGQGTTLVSS (SEQ:75, 113-115, 157-159)

>F149.4G4(카파)>QNVLTQSPAAMSASPGEEVMTCRASSSSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSKLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCHQYSGDPLTFGSGTKLEV (SEQ ID NO:76, NO: 116-118, 160-162)

도면8

>NRC-sdAb001
 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATAS**SISSFDI**MGWYRQAPGKQRELVA**AITLDIA**NYRDSVKGRFTISRDNAKNTVY
 LQMDSLKPEDTARYH**AAFQSDQNY**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO: 119, NO: 127-129, 163-165)

>NRC-sdAb002
 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAT**STRTVSSAVMA**WFRQAPEKVRDFVG**FITNSGNILY**YDDSVKGRFTISRDNAQNT
 YLQMNSLKPEDTAVYYC**AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY**WGQGTQTVSS (SEQ. NO:120, 130-132, 166-168)

>NRC-sdAb003
 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCA**ASGVTLDYTA**IGWFRQAPGKEREV**AAITSGGNTD**YAESAKGRFRISRDNSKNTIY
 LQMNSLKPEDTGVYYC**CAARRGGARGEYDY**WDQGTQTVSS (SEQ ID NO:121, NO: 133-135, 169-171)

>NRC-sdAb004
 QVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAFS**RGAFTDTYE**IGWFRQAPGKEREV**AAVTRNGDSV**YADSLKARFTASRNNAVN
 TAYLHMNILQPEDTATYYC**AAANWRPLRTSSGADDYAD**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:122, 136-138, 172-174)

>NRC-sdAb005
 QVKELESGGGLAQAGGSLRLSCA**ASGSISINTIG**WFRQAPGKQRELVA**ASDSGANRNYADSV**KGRFTISRDNAKNTV
 YLQMNNLKPEDTAIYYC**RAWGTGTISTMY**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:123, NO: 139-141, 및 175-177)

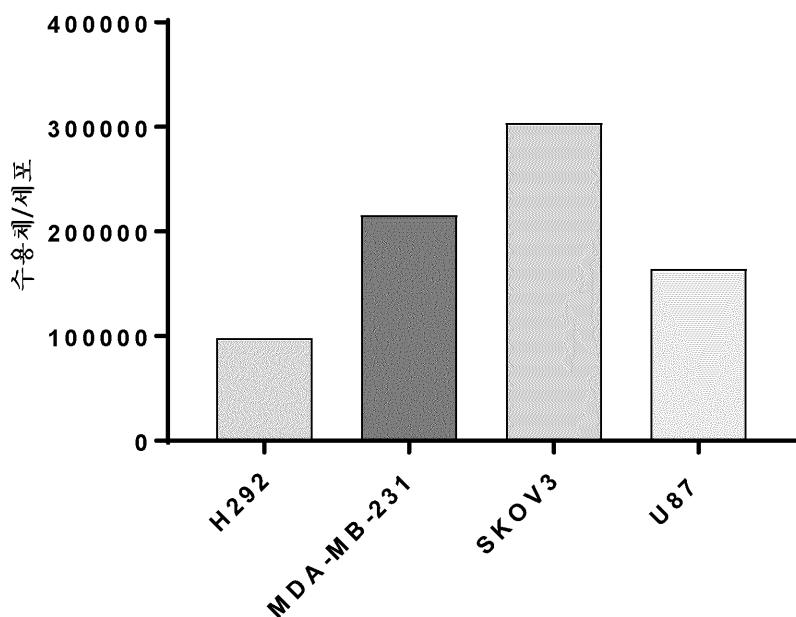
>NRC-sdAb006
 QVKELESGGGLVQAGGSLRLSCA**SESIFGFNTMG**WYRQAPGNERELVA**ASINSKRTMYADSV**KGRFTISRDNAKNTV
 NLQMNNLKPEDTAVYYC**RAWGIIITSATVW**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:124, NO: 142-144, 178-180)

>NRC-sdAb007
 QVKELESGGGLVQAGGSLRLSCAT**STRTVSSAVMA**WFRQAPEKERDFVG**FISNSGSV**YDDSVKGRFTISRDNAQNTV
 YLQMNSLKPEDTAVYYC**AIIWRTSDLTGRFNT**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:125, NO: 145-147, 181-183)

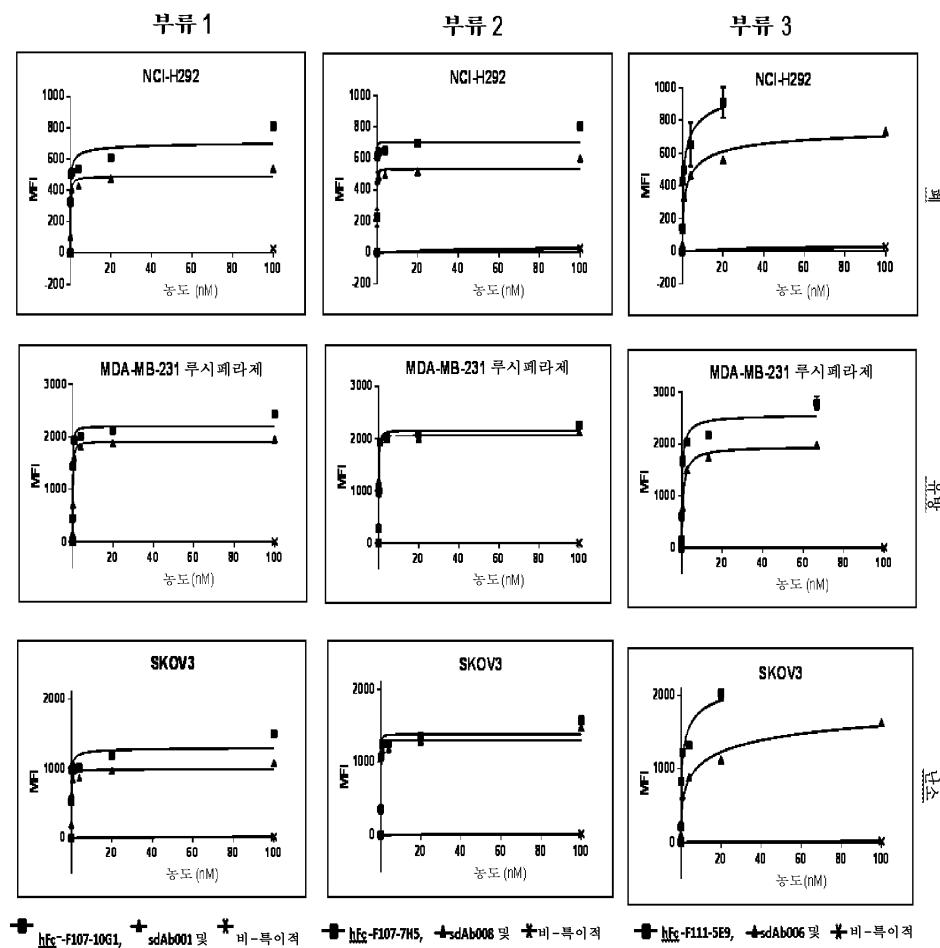
>NRC-sdAb008
 QVKELESGGGLVQAGGSLRLSCA**ASGSSGMINTMG**WYRQAPGKQRELVA**ARSTGGTT**NYADSVKGRFTISRDDANN
 TVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AIIWRTSDLTGRFNT**WGQGTQTVSS (SEQ ID NO:126, NO: 148-150, 184-186)

도면9

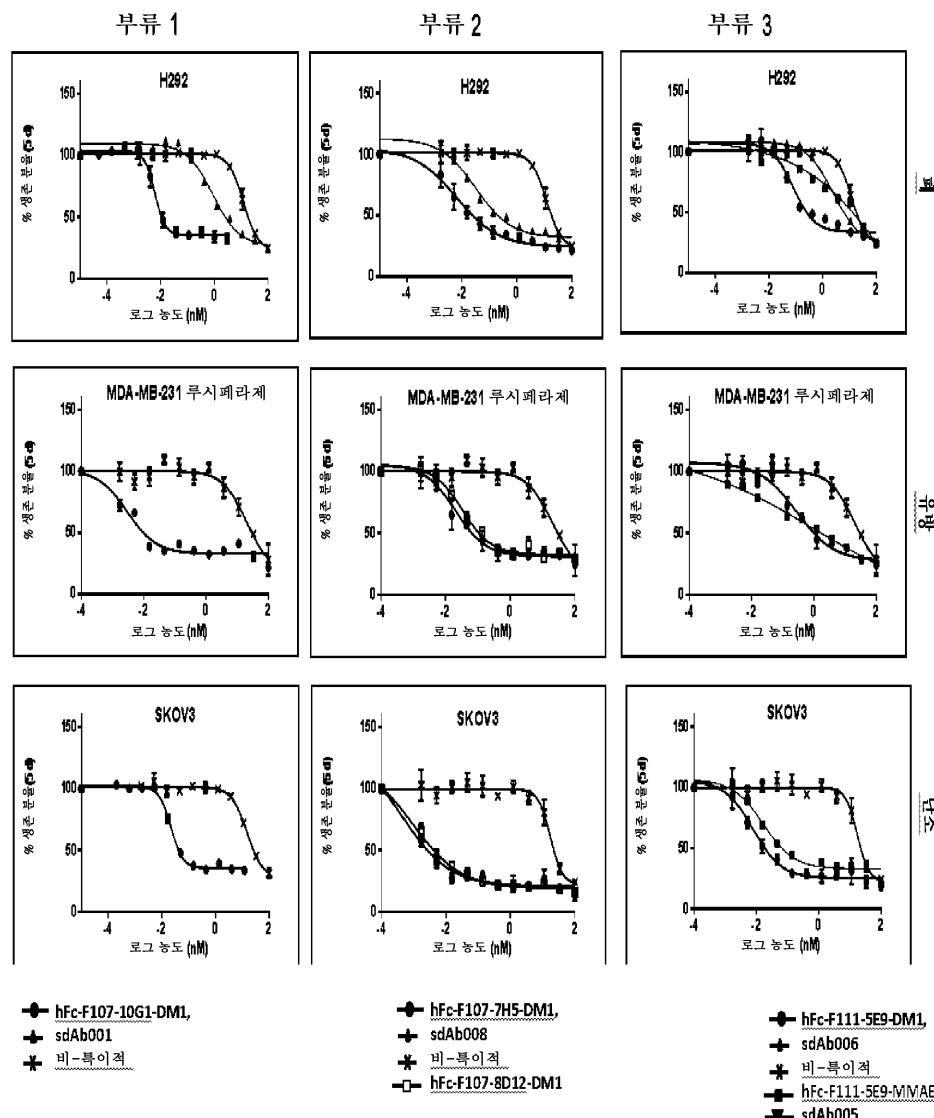
항체 결합 능력 (A X L)



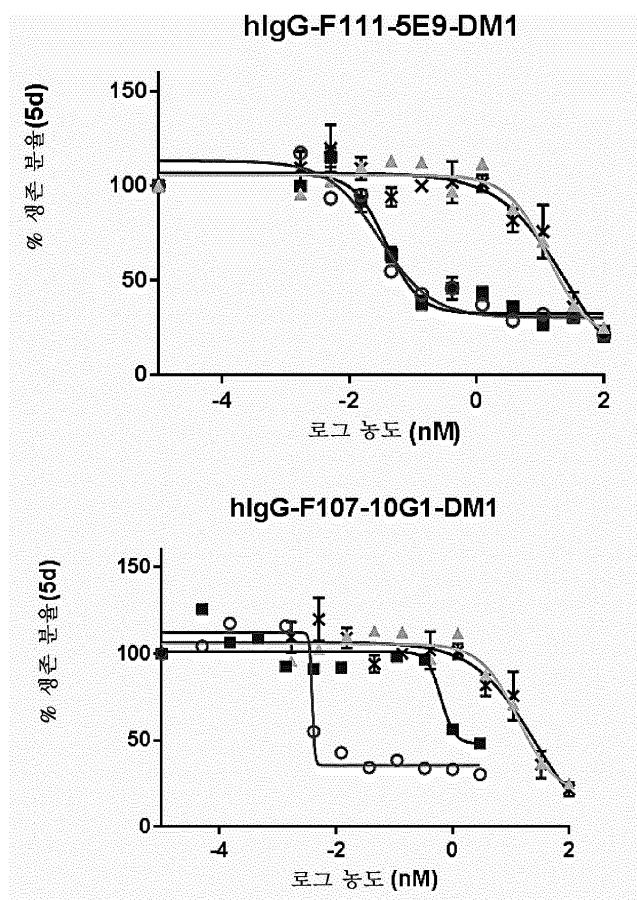
도면10



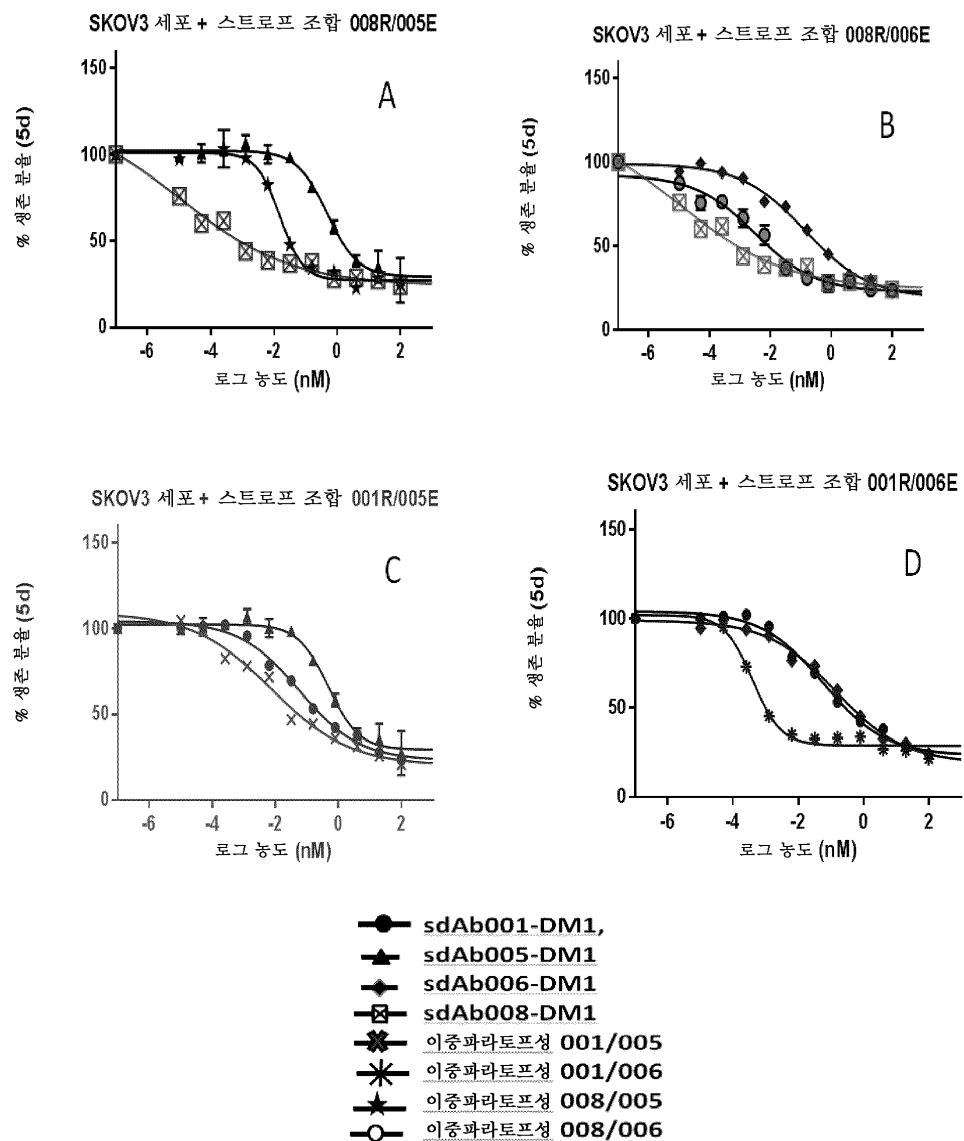
도면11



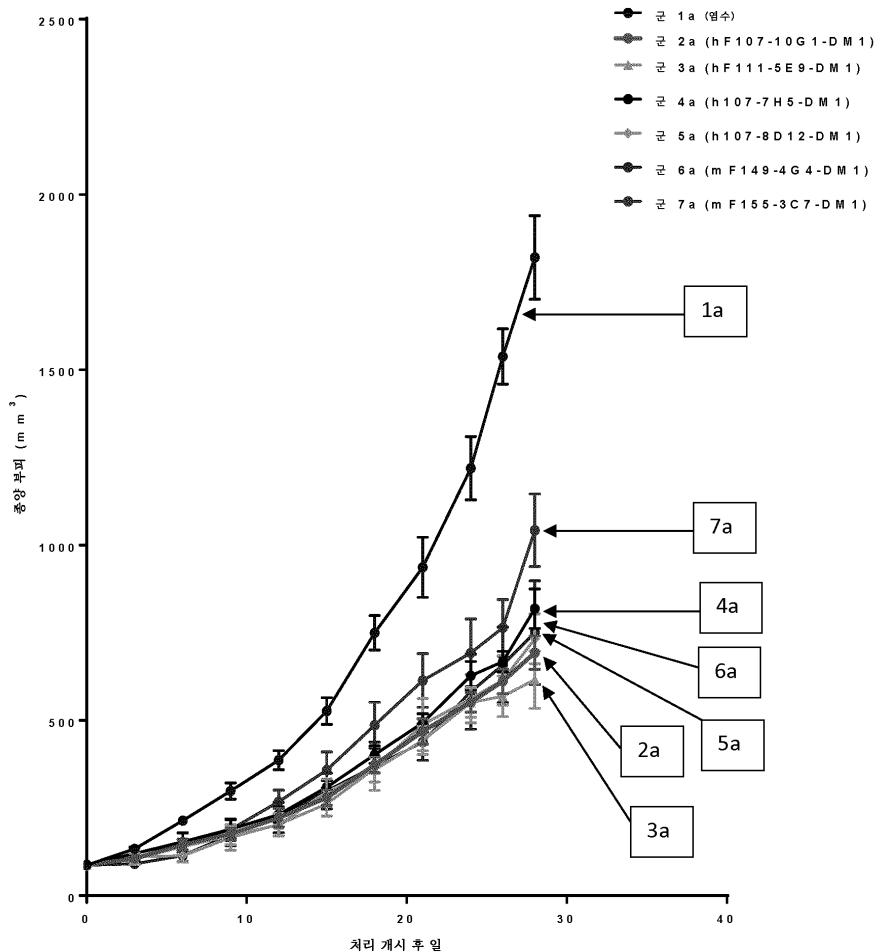
도면12



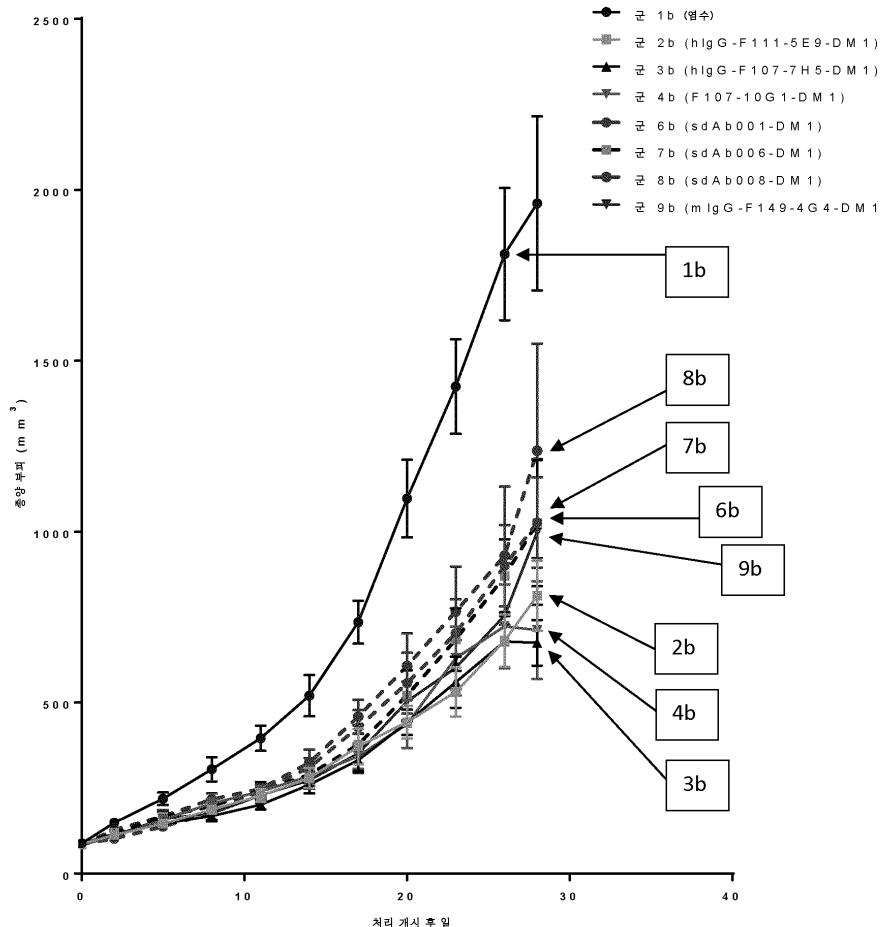
도면13



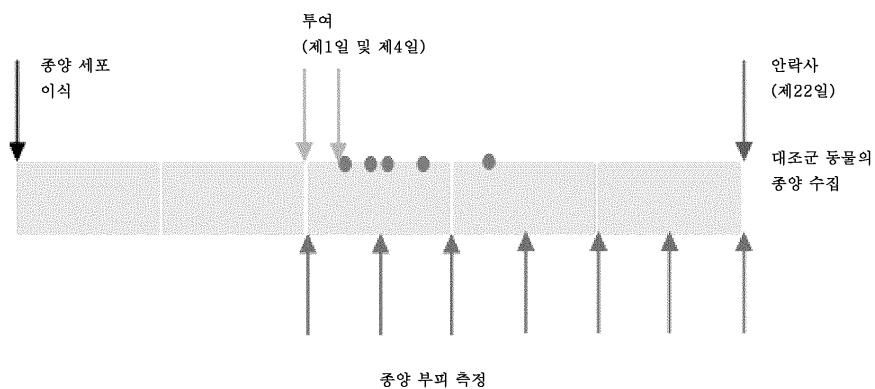
도면14



도면15



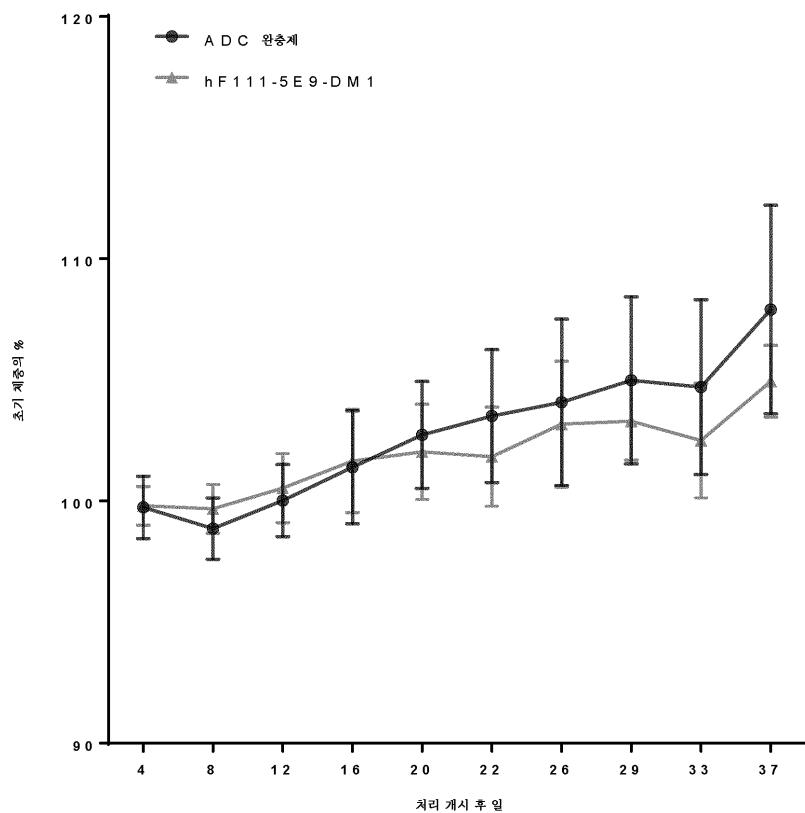
도면16



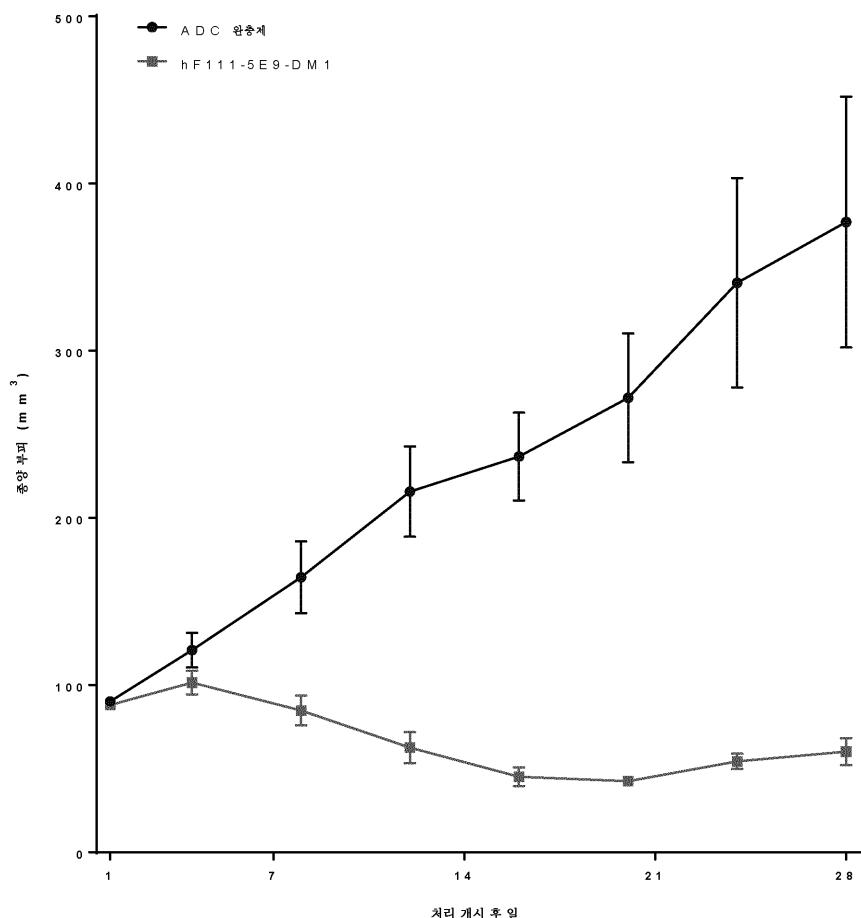
● 혈액 샘플

군	동물의 수/ 시점 ^②	제2 용량 전	제2 용량 후											
			1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	96 h	120 h	168 h	216 h	264 h	336 h
2 대지 3	1	x				x				x				x
	1	x				x				x				x
	1	x			x				x				x	
	1		x				x				x			
	1		x				x				x			
	1		x				x				x			
	1			x			x				x			
	1			x			x				x			
	1			x			x				x			
	1			x			x				x			

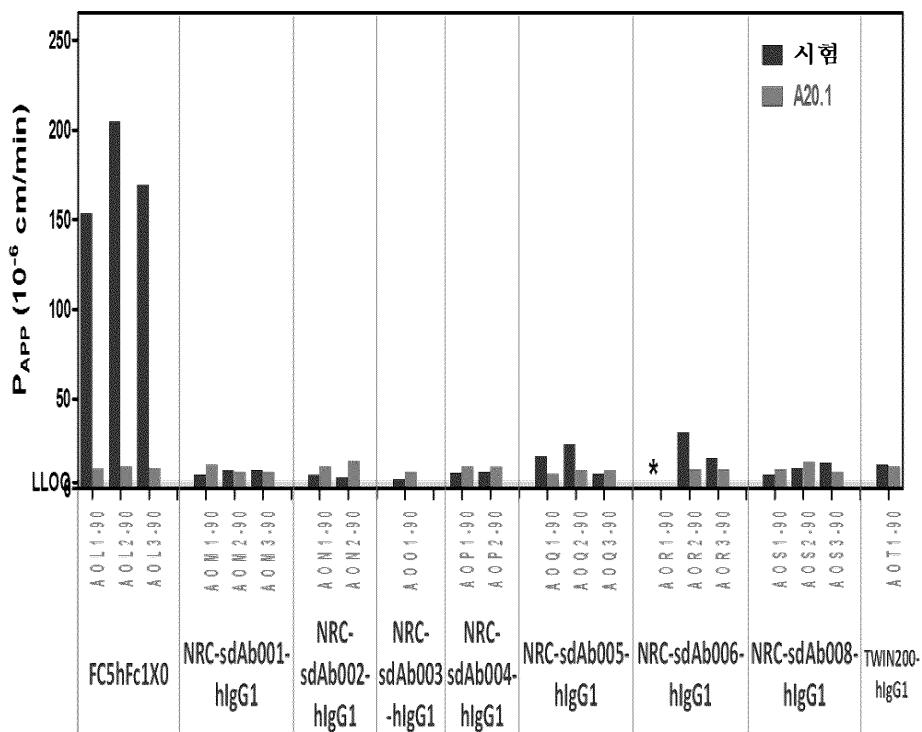
도면17



도면18



도면19



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> National Research Council Canada

<120> AXL-SPECIFIC ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> PAT 86600W-90

<150> US 62/557,870

<151> 2017-09-13

<160> 188

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR L1-B consensus

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = S or T

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa = I or N

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Arg Thr Arg Lys Xaa Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR L2-B consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is E, H or Q

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is S or T

<400> 2

Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Xaa

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR H1-B consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is F or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is I, S, or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is S, N, or K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is F or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is G or W

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is I or M

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is N, S, or H

<400> 3

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR H2-B consensus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is F, N, or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is G, N, or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is S or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa is A or T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa is N or D

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa is S or R

<400> 4

Asn Ile Xaa Pro Xaa Ser Xaa Ser Xaa Xaa Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

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

Xaa

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR H3-B consensus

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is T or Y

<400> 5

Asp Xaa Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1	5
---	---

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR L2-B consensus (2)

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is E or Q

<400> 6

Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Ser

1	5
---	---

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR H1-B consensus (2)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is F or Y

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Xaa Trp Ile Asn

1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2-B consensus (2)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is F or Y

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is G or D

<400> 8

Asn Ile Xaa Pro Xaa Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR L1-B

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Ile Tyr Leu

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

Ala

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F107-7H5 CDR L2-B
 <400> 10

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser

1	5
---	---

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F107-7H5/F107 & 8D12 CDR L3-B
 <400> 11

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1	5
---	---

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F107-7H5 CDR H1-B
 <400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn

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

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F107-7H5 CDR H2-B
 <400> 13

Asn Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR H3-B

<400> 14

Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5

<210> 15

<211> 17

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR L1-B

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR L2-B

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H1-B

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe Trp Ile Asn

1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H2-B

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H3-B

<400> 19

Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L1-B

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L2-B

<400> 21

Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L3-B

<400> 22

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H1-B

<400> 23

Lys Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H2-B

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H3-B

<400>

25

Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L1-B

<400> 26

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L2-B

<400> 27

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L3-B

<400> 28

Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR H1-B

<400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR H2-B

<400> 30

Asn Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR H3-B

<400> 31

Pro Leu Met Gly Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L1-B

<400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L2-B

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L3-B

<400> 34

Gln Gln His Phe Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H1-B

<400> 35

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 36

<211> 17

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H2-B

<400> 36

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

1 5 10 15

Gly

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H3-B

<400> 37

Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 VL

<400> 38

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 VH

<400> 39

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F107-8D12 VL
 <400> 40
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

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

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 VH

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 VL

<400> 42

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

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
20	25	30	
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr			
85	90	95	
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 43			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> F111-3C8 VH			
<400> 43			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Gly Lys Pro Gly Thr			
1	5	10	15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Met His Trp Val Lys Arg Val Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Asn Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	
Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Thr Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

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

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 VL

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 VH

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Thr Thr Glu Asp Met Val Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 VL

<400> 46

Val Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 VH

<400> 47

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F107-7H5 light chain

<400> 48

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 49

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F107-7H5 heavy chain

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

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

435 440 445

<210> 50

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F107-8D12 light chain

<400> 50

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 51

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F107-8D12 heavy chain

<400> 51

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420 425 430

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

435 440 445

<210> 52

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F111-3C8 light chain

<400> 52

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 53

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F111-3C8 heavy chain

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

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

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

<210> 54

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F111-5E9 light chain

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 55

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F111-5E9 heavy chain

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Thr Thr Glu Asp Met Val Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

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

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

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

435

440

445

Ser Pro Gly

450

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric F107-10G1 light chain

<400> 56

Val Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Thr

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 57		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Chimeric F107-10G1 heavy chain		
<400> 57		
Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
20	25	30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
160		

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

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

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly

<210> 58

<211> 460

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rhAXL-ECD

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu

180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His

195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu

210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln

260 265 270

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

275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro

290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp

305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro

325 330 335

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

340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg

355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Pro Trp Trp Gly Ser Gly Gly Ser Ser Thr Gly

450 455 460

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain signal sequence

<400> 59

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly

20

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain signal sequence

<400> 60

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 61

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 VL sequence

<400> 61

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtaact	60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagat ctacttgct	120
tggtaaccagg agaaaccagg tcagtcctt aaactgctga tctattggc atccactagg	180
caatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctacc	240
atcagcagtgc tcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg	339

<210>

> 62

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 VH sequence

<400> 62

cagggtccaa tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtggaaactg	60
tcctgcaagg cttctggcta cactttcacc agtactgga taaactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgagtg gattggaaat atttacccctg atagtagtag tactaactac	180
aatgagaagt tcaagagcaa ggcacactg actgttagaca agtccctccac cacagcctac	240
atacagttca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt attattgtac aagagataacc	300
tatggtgta gccctgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca	354

<210> 63

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 VL sequence

<400> 63

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gagggtaact	60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacacttagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaaccagg agaaaccagg gcagtcctt aaactgctga tctactggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctacc	240
atcagcagtgc tcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300

tggacgttcg	gtggaggcac	caagctggaa	atcaaa	336
------------	------------	------------	--------	-----

<210> 64

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 VH sequence

<400> 64

caggtccaac	tgcagcagcc	tggggcttag	cttgtgaagc	ctggggcttc	agtgcagctg	60
tcctgcaagg	ctctggcta	cactttcatc	agcttctgga	taaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gatggaaat	attttcctg	gttagtagtag	tacgaactac	180
aatgagaagt	tcaagagcaa	ggccacactg	actgttagaca	aatcctccag	cacagectac	240
atgcagctca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggct	attttgtgc	aagagattac	300
tatgtgtgta	gccctgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtytc	ctca	354

<210> 65

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 VL sequence

<400> 65

gatatccaga	tgacacagac	tacatctcc	ctgtctgcct	ctctgggaga	cagagtccacc	60
atcagttgca	ggcaagtca	ggacattaac	aattattaa	actggtatca	gcagaaacca	120
gatgaaactg	ttaaactcct	gatctactac	atataagat	tacactcagg	agtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tggaacagat	tattctctca	ccattagcaa	cctggagcta	240
gaagatgttgc	ccacttactt	ttgccaacag	ggtaatacgc	ttccattcac	gttcggctcg	300
gggacaaagt	tggaaataaa	a				321

<210> 66

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 VH sequence

<400> 66

cagatccagt	tggtgcaagtc	tggaccttag	ctgaagaagc	ctggagagac	agtcaagatc	60
------------	-------------	------------	------------	------------	------------	----

tcctgcaagg cttctggta tacttcaca aaatatggaa tgaactgggt aaagcaggct	120
ccagggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gccaacat	180
gctgtatgact tcaaggacg gtttgccttc tcttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcac aactgaggac atggcacat atttctgtgc aaaagggggg	300
tattatagta acctatcta tcctatggac tactgggtc aaggaacctc agtaccgtc	360
tcctca	366
<210> 67	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F111-3C8 VL sequence	
<400> 67	
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atatcctgca gtgccagctc aagtgttaatg tacatgtatt ggtaccagca gaagccagga	120
tcctccccca aaccctggat ttatgcaca tccaaacctgg ctctggaggt ccctgctcgc	180
ttcagtgccca gtgggtctgg gacctttac tcttcacaa tcagcagcat ggaggctgaa	240
gatgctgcca ctattactg ccagcagttt cataattacc cacccacgtt cggagggggg	300
accaagctgg aaataaaacg g	321
<210> 68	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> F111-3C8 VH sequence	
<400> 68	
caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggcaagc ctggacatc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctggcta cacttcacc agctattgga tgcactgggt gaagcgggtg	120
cctggacaag gccttgatgt gattggaaat attaatccata atagtacttag tgctgactac	180
aatgagaatgt tcaagaggaa ggccacattg actgttagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca gcaccctgac atctgaggac tctgcggctc actactgtac aagaccctta	300
atgggtcctt actggtaattt cgatgtctgg ggcacaggaa ccacggtcac cgttcctca	360
<210> 69	
<211> 321	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 VL sequence

<400> 69

gtcattgtga tgaccaggc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt	60
atcacctgca aggccaggta ggtatgtact actgtgttag cctggtatca acaaaaacca	120
ggccaaatctc ctaaactact gatattactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180
cgcttcacag gcagtggtac tgggacagat tattctctca ccatcagcaa tgtgcagact	240
gaagacctgg cattttatta ctgtcagcaa catttacca ctccctcac gttcggtgct	300

gggaccaagt tggagctgaa a	321
-------------------------	-----

<210> 70

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 VH sequence

<400> 70

gaagtgaacc tggtgaggc tgggggaggc gtagtgaagc ctggaggcgtc tctgaaactc	60
tcctgtgaag cctctggatt cacttcagt aactatggca tgtcttggt tcgcccagact	120
tcagacaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtggtg gtggtggttag aacctactat	180
ctagacaatg taaagggccg attcatcatc tccagagaga atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gtagtctgaa gtctgaggac acggccttgt tttactgtgc aagaggagct	300

cgggccttt acttgctat ggactactgg ggtcaaggaa gttcagtac cgtccctca	360
---	-----

<210> 71

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (rh)AXL-ECD His8

<400> 71

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gln Arg Ser Leu

180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His

195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu

210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln

260 265 270

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

275

280

285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro

290

295

300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp

305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro

325

330

335

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

340

345

350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg

355

360

365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly

370

375

380

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

385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

Pro Trp Trp Gly Ser Gly Gly Ser Ser Thr Gly His His His His

450

455

460

His His His His Gly

465

<210> 72

<211> 909

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AXL - full length His6

<400> 72

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

1	5	10	15
Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala			
20	25	30	
Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg			
35	40	45	
Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro			
50	55	60	
Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp			
65	70	75	80
Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Gln Asp Asp Trp			
85	90	95	
Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr			
100	105	110	
Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser			
115	120	125	
Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu			
130	135	140	
Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys			
145	150	155	160
Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp			
165	170	175	
Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu			
180	185	190	
His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His			
195	200	205	
Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu			
210	215	220	
Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu			
225	230	235	240
Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr			

245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln

260 265 270

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

275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro

290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp

305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro

325 330 335

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

340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg

355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Cys Val

450 455 460

Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Glu Thr Arg

465 470 475 480

Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser

545 550 555 560

Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg

565 570 575

Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe

580 585 590

Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser

595 600 605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys

610 615 620

His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln

625 630 635 640

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile

645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp

660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val

675 680 685

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

690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser

705 710 715 720

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

725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly

740	745	750
Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Arg Gly Asn Arg Leu		
755	760	765
Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg		
770	775	780
Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg		
785	790	795
Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro		
805	810	815
Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Tyr Pro Glu		
820	825	830
Pro Pro Gly Ala Ala Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro		
835	840	845
Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly		
850	855	860
Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala		
865	870	875
Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala Tyr Leu		
885	890	895
Glu Cys Gly Arg Tyr Ala Ser His His His His His		
900	905	
<210> 73		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> F155-3C7 VH		
<400> 73		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Phe		
20	25	30
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		

35 40 45

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 VL

<400> 74

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 75

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 VH

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asp Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 VL

<400> 76

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys

100 105

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H1-A

<400> 77

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H2-A

<400> 78

Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr

1 5

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR H3-A

<400> 79

Ala Arg Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L1-A

<400> 80

Gln Asp Val Thr Thr Ala

1 5

<210> 81

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L2-A

<400> 81

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-10G1 CDR L3-A

<400> 82

Gln Gln His Phe Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H1-A

<400> 83

Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Gly

1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H2-A

<400> 84

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR H3-A

<400> 85

Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L1-A

<400> 86

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L2-A

<400> 87

Tyr Ile Ser Arg

1

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-5E9 CDR L3-A

<400> 88

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H1-A

<400> 89

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe Trp

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H2-A

<400> 90

Ile Phe Pro Gly Ser Ser Ser Thr

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR H3-A

<400> 91

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR L1-A

<400> 92

Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR L2-A

<400> 93

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-8D12 CDR L3-A

<400> 94

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR H1-A

<400> 95

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR H2-A

<400> 96

Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Ser Thr

1 5

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR H3-A

<400> 97

Thr Arg Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR L1-A

<400> 98

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Ile Tyr

1 5 10

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR L2-A

<400> 99

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F107-7H5 CDR L3-A

<400> 100

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR H1-A
 <400> 101

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Phe Trp

1 5

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR H2-A
 <400> 102

Ile Phe Pro Gly Ser Asn Ser Ser

1 5

<210> 103
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR H3-A
 <400> 103

Val Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR L1-A
 <400> 104

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Lys Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR L2-A
 <400> 105

Trp Ala Ser Thr

1
 <210> 106

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F155-3C7 CDR L3-A
 <400> 106

Lys His Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F111-3C8 CDR H1-A
 <400> 107

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F111-3C8 CDR H2-A
 <400> 108

Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala

1 5

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR H3-A

<400> 109

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

1 5 10

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L1-A

<400> 110

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 111

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L2-A

<400> 111

Arg Thr Ser Asn

1

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F111-3C8 CDR L3-A

<400> 112

Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H1-A

<400> 113

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Gly

1 5

<210> 114

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H2-A

<400> 114

Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro

1 5

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H3-A

<400> 115

Thr Arg Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L1-A

<400> 116

Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 117

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L2-A

<400> 117

Ser Thr Ser Lys

1

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L3-A

<400> 118

His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 119

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001

<400> 119

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Ala Ser Ile Ser Ser Phe Asp

20 25 30

Ile Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Thr Leu Asp Ile Ala Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Arg Tyr His Cys Ala

85 90 95

Ala Phe Gln Ser Asp Gln Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115
<210> 120
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NRC-sdAb002
<400> 120
Gln Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala
20 25 30
Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Val Arg Asp Phe Val
35 40 45
Gly Phe Ile Thr Asn Ser Gly Asn Ile Leu Tyr Asp Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Ala Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala Ala
100 105 110
Met Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 121
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> NRC-sdAb003
<400> 121
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Asp Tyr Thr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr Trp Asp Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 122

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004

<400> 122

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

35 40 45

Ala Ala Val Thr Arg Asn Gly Asp Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Leu

50 55 60

Lys Ala Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asn Asn Ala Val Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Asn Trp Arg Pro Leu Arg Thr Ser Ser Gly Ala Asp Asp Tyr

100 105 110

Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 123

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005

<400> 123

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Arg

85 90 95

Ala Trp Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Met Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 124

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006

<400> 124

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Ser Ile Phe Gly Phe Asn

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

85 90 95
 Ala Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 125
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRC-sdAb007
 <400> 125

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala

20 25 30
 Val Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Glu Lys Glu Arg Asp Phe Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Asp Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 126

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008

<400> 126

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Met Ile Asn

20 25 30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

35 40 45

Ala Arg Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR1-A

<400> 127

Ala Ser Ile Ser Ser Phe Asp Ile

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR2-A

<400> 128

Ile Thr Thr Leu Asp Ile Ala

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR3-A

<400> 129

Ala Ala Phe Gln Ser Asp Gln Asn Tyr

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb002 CDR1-A

<400> 130

Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala Val

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb002 CDR2-A

<400> 131

Ile Thr Asn Ser Gly Asn Ile

1 5

<210> 132

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb002 CDR3-A

<400> 132

Ala Ala Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala

1 5 10 15

Ala Met Tyr Asp Tyr

20

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb003 CDR1-A

<400> 133

Gly Val Thr Leu Asp Tyr Thr Ala

1 5

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb003 CDR2-A

<400> 134

Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 135

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb003 CDR3-A

<400> 135

Ala Ala Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210

> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR1-A

<400> 136

Arg Gly Ala Phe Asp Thr Tyr Glu

1 5

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR2-A

<400> 137

Val Thr Arg Asn Gly Asp Ser Val

1 5

<210> 138

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR3-A

<400> 138

Ala Ala Asn Trp Arg Pro Leu Arg Thr Ser Ser Gly Ala Asp Asp Tyr

1 5 10 15

Ala Asp

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005 CDR1-A

<400> 139

Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Thr

1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005 CDR2-A

<400> 140

Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg

1 5

<210> 141

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> NRC-sdAb005 CDR3-A

<400> 141

Arg Ala Trp Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Met Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR1-A

<400> 142

Glu Ser Ile Phe Gly Phe Asn Thr

1 5

<210> 143

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR2-A

<400> 143

Ile Ser Asn Ser Lys Arg Thr

1 5

<210> 144

<211>

> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR3-A

<400> 144

Arg Ala Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 145

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR1-A

<400> 145

Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala Val

1 5

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR2-A

<400> 146

Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val

1 5

<210> 147

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR3-A

<400> 147

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

1 5 10 15

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR1-A

<400> 148

Gly Ser Ser Gly Met Ile Asn Thr

1 5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR2-A

<400> 149

Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr

1 5

<210> 150

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR3-A

<400> 150

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

1 5 10 15

<210> 151

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR H1-B

<400> 151

Asn Phe Trp Ile Asn

1 5

<210> 152

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR H2-B

<400> 152

Asn Ile Phe Pro Gly Ser Asn Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

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

Asn

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR H3-B

<400> 153

Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1	5
---	---

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR L1-B

<400> 154

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Lys Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

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

Ala

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR L2-B

<400> 155

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 156

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F155-3C7 CDR L3-B

<400> 156

Lys His Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210

> 157

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H1-B

<400> 157

Tyr Tyr Gly Ile Asn

1 5

<210> 158

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H2-B

<400> 158

Trp Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR H3-B

<400>

159

Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L1-B

<400> 160

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L2-B

<400> 161

Ser Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> F149-4G4 CDR L3-B

<400> 162

His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 163

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR1-B

<400> 163

Phe Asp Ile Met Gly

1 5

<210> 164

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR2-B

<400> 164

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

1 5 10 15

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb001 CDR3-B

<400> 165

Phe Gln Ser Asp Gln Asn Tyr

1 5

<210> 166

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb002 CDR1-B

<400> 166

Ser Ala Val Met Ala

1 5

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb002 CDR2-B

<400> 167

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

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

<210> 168
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRC-sdAb002 CDR3-B
 <400> 168
 Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala Ala Met
 1 5 10 15
 Tyr Asp Tyr

<210> 169
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRC-sdAb003 CDR1-B
 <400> 169
 Tyr Thr Ala Ile Gly
 1 5
 <210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRC-sdAb003 CDR2-B

<400> 170
 Ala Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRC-sdAb003 CDR3-B
 <400> 171

Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 172

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR1-B

<400> 172

Thr Tyr Glu Ile Gly

1 5

<210

> 173

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR2-B

<400> 173

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

1 5 10 15

Ala

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb004 CDR3-B

<400> 174

Asn Trp Arg Pro Leu Arg Thr Ser Ser Gly Ala Asp Asp Tyr Ala Asp

1 5 10 15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005 CDR1-B

<400> 175

Ala Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 176

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005 CDR2-B

<400> 176

Ala Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 177

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb005 CDR3-B

<400> 177

Trp Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Met Tyr

1 5 10

<210> 178

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR1-B

<400> 178

Phe Asn Thr Met Gly

1 5

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR2-B

<400> 179

Ser Ile Ser Asn Ser Lys Arg Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

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

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb006 CDR3-B

<400> 180

Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr

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

<210> 181

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR1-B

<400> 181

Ser Ala Val Met Ala

1	5
---	---

<210> 182

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR2-B

<400> 182

Phe Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Asp Asp Ser Val Lys Gly

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

<210> 183

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb007 CDR3-B

<400> 183

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

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

<210> 184

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR1-B

<400> 184

Ile Asn Thr Met Gly

1 5

<210> 185

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR2-B

<400> 185

Arg Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 186

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRC-sdAb008 CDR3-B

<400> 186

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

1 5 10

<210> 187

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fc peptide

<400> 187

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

1 5 10 15

Lys

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> A20.1 peptide

<400> 188

Glu Phe Val Ala Ala Gly Ser Ser Thr Gly Arg

1

5

10