



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0137502
(43) 공개일자 2023년10월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61P 43/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7032345(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년12월18일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7020075
원출원일자(국제) 2015년12월18일
심사청구일자 2020년11월25일
(85) 번역문제출일자 2023년09월20일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/002504
(87) 국제공개번호 WO 2016/097865
국제공개일자 2016년06월23일
(30) 우선권주장
62/094,649 2014년12월19일 미국(US)
- (71) 출원인
레제네상스 비.브이.
네덜란드 3723 제 빌토번 스월린클란 2
(72) 발명자
바스, 프랭크
네덜란드 엔엘-1213 브이엘 힐베르숨 수리나멜란 17에이
반 다이크, 마크, 에이.
네덜란드 엔엘-3772 제트에이치 빌토번 가일란 16
(74) 대리인
특허법인 무한

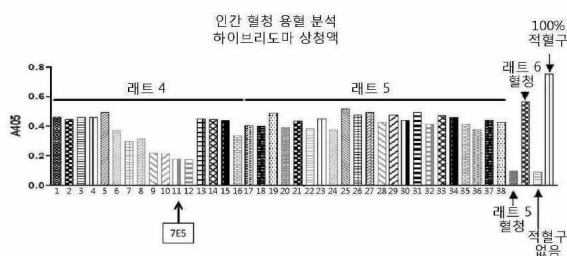
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 인간 C6에 결합하는 항체 및 이의 용도

(57) 요약

인간 보체 성분(complement component) C6 및 관련된 항체-기반 조성물 및 분자들에 결합하는 분리된 단일 클론 항체가 기술된다. 또한, 상기 항체를 사용하기 위한 치료 방법이 기술된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/02 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 43/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 C6에 결합하는 분리된(isolated) 항체로서,

상기 항체는 하기 특성 중 적어도 3가지를 나타내는 것인 분리된 항체:

- (a) 용혈 분석에서 $0.5\mu\text{g/ml}$ 이하의 IC_{50} 을 가짐;
- (b) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 K_D 가 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 이하임;
- (c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 항체-C6 결합 반감기가 40시간 이상임; 및
- (d) 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 C6와 교차반응함.

청구항 2

서열번호 52의 잔기 835-854의 전부 또는 일부를 함유하는, 인간 C6의 영역에 결합하는 분리된 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합하는, 분리된 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합하고,

상기 에피토프는 비연속적인, 분리된 항체.

청구항 5

인간 C6에 대한 결합에 대하여, 서열번호 5에 나타난 중쇄 가변 영역과 서열번호 10에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 교차 경쟁하는, 분리된 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분리된 항체는 인간, 인간화(humanized) 또는 키메라(chimeric) 항체인, 분리된 항체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분리된 항체는 각각 서열번호 6, 7 및 8에 나타난 중쇄 CDR1, 2, 및 3 서열을 포함하고, 각각 서열번호 11, 12 및 13에 나타난 경쇄 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 분리된 항체는 인간화 항체인, 분리된 항체.

청구항 9

서열번호 8에 나타난 중쇄 CDR3; 및 서열번호 13에 나타난 경쇄 CDR3을 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 인간 C6에 결합하는 분리된 항체는 서열번호 7에 나타난 중쇄 CDR2; 및 서열번호 12에 나타난 경쇄 CDR2를 더 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 인간 C6에 결합하는 분리된 항체는 서열번호 6에 나타난 중쇄 CDR1; 및 서열번호 11에 나타난 경쇄 CDR1을 더 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 12

제11항에 있어서,

하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체:

- (a) 서열번호 30의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (b) 서열번호 32의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (c) 서열번호 34의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (d) 서열번호 36의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 37의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (e) 서열번호 38의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 39의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (f) 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- (g) 서열번호 42의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및
- (h) 서열번호 44의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 45의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 13

하기를 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체:

- (a) 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 14

제13항에 있어서

- (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및
- (b) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 15

제13항에 있어서

- (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하고; 및
- (b) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 16

제13항에 있어서

- (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및
- (b) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 인간 C6에 결합하는 항체의 경쇄, 중쇄, 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제17항의 발현 벡터로 형질 전환된 세포.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 담체를 포함하는, 조성물.

청구항 20

환자에게서 막 공격 복합체(Membrane Attack Complex, MAC) 형성 또는 활성을 저해하는 방법으로서,

상기 방법은 환자에게서 MAC 형성 또는 활성을 저해하는 데 유효한 양으로 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 21

환자에서 보체 시스템(complement system)의 바람직하지 않은 활성화에 의해 매개되는 질환의 증상들을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은 유효량의 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 22

환자의 신경 재생을 자극하는 방법으로서,

상기 방법은 치료학적 유효량의 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 23

환자의 손상된 또는 퇴행된 신경의 회복을 촉진시키는 방법으로서,

상기 방법은 치료학적 유효량의 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 24

환자의 신경 퇴행을 감소시키거나 지연시키는 방법으로서,

상기 방법은 치료학적 유효량의 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자는 신경의 물리적 손상으로부터 고통받는 환자인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 물리적 손상은 외상성 손상(traumatic injury), 외과적 손상(surgical injury) 또는 비-외상성 손상인(non-traumatic injury)인 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 손상은 말초신경계(Peripheral Nervous System, PNS)에 대한 것인, 방법.

청구항 28

제26항에 있어서,

상기 손상은 중추신경계(Central Nervous System, CNS)에 대한 것인, 방법.

청구항 29

제25항에 있어서,

상기 항체가 손상 부위 또는 손상 부위 근처에 투여되는 것인, 방법.

청구항 30

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 환자는 면역-매개 염증질환 또는 진행성 신경퇴행성 질환으로 고통받는 환자인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 질환은 후천적인 것인, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 질환은 유전적인 것인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 질환이 만성 탈수초성 신경병증(chronic demyelinating neuropathy)인, 방법.

청구항 34

제30항에 있어서,

상기 질환이 신경퇴행성 질환인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 미국 가출원 No. 62/094,649 (2014.12.19 출원)에 우선권을 주장하고, 그 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

- [0002] 보체 시스템(complement system)은 생물체의 병원균 제거에서 항체와 식세포를 돕거나 "보완"하는 타고난 면역 체계의 일부이다. 시스템의 활성화시, 반응과 상호작용의 촉매 세트가 발생하는 결과로 활성화된 세포, 유기물 또는 입자가 파괴의 표적이 된다. 보체 시스템은 세포 외 형태의 병원체 (예를 들어, 박테리아)를 공격하기 위해 조절되는 캐스케이드 시스템에서 함께 작용하는 30개 이상의 혈장 및 막 단백질 세트를 포함한다. 보체 시스템은 막 공격 경로(membrane attack pathway)로 알려진 공통 말단의 비-효소 경로에 수렴하는 두 가지 별개의 효소에 의한 활성 캐스케이드, 전형적인 경로 및 대체 경로를 포함한다.
- [0003] 전형적인 경로로 알려진 첫 번째 효소적으로-활성화된 캐스케이드는 C1, C4, C2, C3 및 C5 (경로의 순서로 나열)의 여러 구성 요소를 포함한다. 보체 시스템의 전형적인 경로의 개시는 면역 및 비-면역 활성화제 모두에 의한 제1 보체 성분 (C1)의 결합 및 활성화 후에 일어난다. C1은 성분 C1q, C1r 및 C1s의 칼슘 - 의존성 복합체를 포함하고, C1q 성분의 결합을 통해 활성화된다. C1q는 6개의 동일한 하위 단위를 포함하며 각 하위 단위는 3개의 사슬 (A, B 및 C 사슬)을 포함한다. 각 사슬에는 콜라겐 유사 꼬리에 연결된 구형의 머리 영역이 있다. 항원 - 항체 복합체에 의한 C1q의 결합 및 활성화는 C1q 머리 그룹 영역을 통해 일어난다. 단백질, 지질 및 핵산을 비롯한 수많은 비-항체 C1q 활성화제가 콜라겐 유사 줄기 영역의 두드러진 부위를 통해 C1q에 결합하고 활성화시킨다. 이어서, C1qrs 복합체는 C3 전환 효소로서 작용하는 C4b2a 복합체를 형성하는 보체 성분 C4 및 C2의 활성화를 촉진시킨다.
- [0004] 대체 경로로 알려진 두 번째 효소적으로-활성화된 캐스케이드는 보체 시스템 활성화 및 증폭을 위한 신속하고 항체 독립적인 경로이다. 대체 경로는 C3, B 인자 및 D 인자 (경로의 순서에 따라 나열됨)를 포함한다. C3의 단백질 가수 분해 절단 형태인 C3b가 박테리아와 같은 활성화 표면 작용제에 결합 될 때, 대체 경로의 활성화가 일어난다. 이어서, 인자 B는 C3b에 결합되고 인자 D에 의해 절단되어 활성 효소, Ba를 생성한다. 그런 다음 효소 Ba는 더 많은 C3를 절단하여 더 많은 C3b를 생성하여 활성화 표면에 C3b-Ba 복합체의 광범위한 침전물을 생성시킨다.
- [0005] 따라서, 전형적인 경로 및 대체 경로 모두 C3 인자를 C3a 및 C3b로 분리하는 C3 전환효소를 생성한다. 이 시점에서, 두 C3 전환 효소는 C5 전환 효소 (C4b2a3b 및 C3b3bBb)로 더 조립된다. 이들 복합체는 이어서 보체 성분 C5를 C5a 폴리펩티드(9 kDa) 및 C5b 폴리펩티드(170 kDa)의 두 가지 성분으로 절단한다. C5a 폴리 펩타이드는 본래 백혈구와 관련된 7 막 횡단 G- 단백질 연결 수용체에 결합하며, 이체는 간세포 및 뉴런을 포함하는 다양한 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있다. C5a 분자는 인간 보체 시스템의 주요 화학주성(chemotactic) 요소이며 백혈구 주화성, 평활근 수축, 세포 내 신호 전달 경로의 활성화, 호중구-내피 부착, 사이토 카인 및 지질 매개 체 방출 및 산화제 형성을 포함하는 다양한 생물학적 반응을 유발할 수 있다.
- [0006] 보다 큰 C5b 단편은 보체 캐스케이드 후속 구성 요소 C6, C7, C8 및 C9 에 순차적으로 결합하여 C5b-9 막 공격 복합체 ("MAC")를 형성한다. 친유성 C5b-9 MAC은 적혈구를 직접 용해시킬 수 있으며, 백혈구에 대해 용해성이 고, 근육, 상피 및 내피 세포와 같은 조직에 손상을 입힌다. 저용해 양에서, C5b-9 MAC은 접착 분자의 상향 조절, 세포 내 칼슘 증가 및 사이토 카인 방출을 자극할 수 있다. 또한, 저용해 농도에서, C5b-9 MAC는 세포 용해를 일으키지 않고 내피 세포 및 혈소판과 같은 세포를 자극할 수 있다. C5a와 C5b-9 MAC의 비-용해 효과는 비슷하고 상호 교환 가능하다.
- [0007] 보체 시스템은 건강 유지에 중요한 역할을 하지만, 질병을 유발하거나 질병에 기여할 잠재력을 가지고 있다. 예를 들어, 연구들은 보체의 캐스케이드 저해 또는 보체 성분의 고갈은 중추 신경계의 퇴행성 질환 또는 실험적 뇌 손상의 피해를 감소시킨다는 것을 보여주었다(Feasby, TE 외. (1987) Brain Res. 419 : 97-103, Vriesendorp, FJ 등 (1995) J. Neuroimmunol. 58 : 157-165, Jung, S. 등 (1995) Neurosci. Lett. 200 : 167-170, Dailey, AT 외. Leinase, I.외. (2006) BMS Neurosci.14 : 7 : 55). 특히, C6이 결핍되어 막 공격 복합체(MAC)를 형성할 수 없는 래트(rat)는 C6이 충분한 래트와 비교하여 탈수초(demyelination)나 축삭 돌기의 손상을 어느 것도 나타내지 않고, 다발성 경화증에 대한 항체-매개된 실험적인 자가면역의 뇌척수액 모델에서 유의하게 감소된 임상 스코어를 나타내었다 (Mead, R.J. 외. (2002) J. Immunol. 168:458-465). 그러나, 단핵 세포 침윤의 수준은 C6 이 충분한 래트에서 볼 수 있는 것과 동일했다. Mead 외. (2002)는 탈수초와 축삭 돌기 손상이 항체 존재하에서 발생하고, C6의 고갈에 의해 저해될 수 있는 MAC 침전을 포함하는 전체 보체 캐스케이드의 활성화가 필요하다고 결론지었다.
- [0008] 따라서, C6을 저해하기 위한 시약이 필요하고, 시약은 다양한 치료 목적에 바람직하다.

발명의 내용

- [0009] 본 발명은 치료 목적을 위한 바람직한 기능적 특성을 갖는 항 -C6 항체를 제공하는 것으로, 막 공격 복합체 (MAC)의 형성이 시험 관내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)뿐만 아니라 매우 낮은 KD (예 : 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 5×10^{-10} M 이하) 및 매우 긴 반감기 (예 : 40시간 이상)에서 저해되는 C6의 기능적 활성을 효과적으로 억제하는 능력을 포함한다. 38개의 항-인간 항체 패널은 정제된 인간 C6 단백질로 면역화된 래트에 의해 생성되었다. 38개 중 2개가 막 공격 복합체(MAC)의 형성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 원하는 기능적 특성을 갖는 하나의 특정 래트 항-인간 C6 항체(여기서는 7E5로 언급 함)를 제작하고, 인간화 mAb 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02를 포함하는 7E5의 CDR을 보유하는 인간화 항체의 패널을 준비하였다. 이들 8개의 인간화 mAb의 중쇄 및 경쇄 가변 영역뿐만 아니라 인간화 mAb 7C02의 중쇄 가변 영역 및 mAb 7G08의 경쇄 가변 영역은 가능한 모든 81개의 "믹스 앤드 매치" 조합들로 표현되었으며, 모든 81개의 쌍은 효과적으로 C6 기능 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 7E5의 에피토프는 인간 C6 내에서 맵핑되었다.
- [0010] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 인간 C6에 결합하는 분리된(isolated) 항체에 관한 것으로,
- [0011] 상기 항체는 하기 특성 중 적어도 3가지를 나타낸다:
- [0012] (a) $0.5 \mu\text{g/ml}$ 이하의 용혈 분석에서 IC_{50} 을 가짐;
- [0013] (b) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 K_D 가 1×10^{-8} M 이하임;
- [0014] (c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 항체-C6 결합 반감기가 40시간 이상임; 및
- [0015] (d) 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 C6와 교차반응함.
- [0016] 상기 특성들 중 적어도 3가지 조합이 포함된다. 일 양태에서, 상기 항체는 특성 (a), (b) 및 (c)를 나타낸다. 또 다른 양태에서, 상기 항체는 성질 (a), (b), (c) 및 (d)를 나타낸다. 다른 양태들에서, 상기 항체는 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 바와 같이 1×10^{-9} M 이하 또는 5×10^{-10} M 이하의 K_D 를 갖는다.
- [0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 52의 잔기 835-854의 전부 또는 일부를 함유하는, 인간 C6의 영역에 결합하는 분리된 항체에 관한 것이다(즉, 항체는 잔기 835-854 내의 하나 이상의 잔기에 결합한다). 또 다른 양태에서, 상기 항체는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합한다(즉, 항체는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3 내의 하나 이상의 아미노산 잔기와 결합한다). 특정 양태에서, 상기 에피토프는 항체에 의해 인식되는 비연속적인 에피토프의 일부이다. 예를 들어, 일 양태에서, 상기 항체는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 에피토프에 결합하며, 상기 에피토프는 비연속적이다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 C6에 대한 결합에 있어서, 서열번호 5에 나타난 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 교차 경쟁하는 항체를 제공한다(즉, mAb 7E5의 중쇄 및 경쇄 가변 영역). 또 다른 양태에서, 본 발명은 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02로 이루어진 군으로부터 선택된 mAb와 인간 C6으로의 결합에 대해 교차 경쟁하는 항체를 제공한다.
- [0019] 다양한 양태에서, 본 발명의 항체는 인간, 인간화(humanized) 또는 키메라(chimeric) 항체이다.
- [0020] 다양한 양태에서, 본 발명의 항체는 각각 서열번호 6, 7 및 8에 나타난 중쇄 CDR1, 2, 및 3 서열을 포함하고, 각각 서열번호 11, 12 및 13에 나타난 경쇄 CDR1, 2 및 3 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 항체는 전술한 CDR을 포함하는 인간화 항체일 수 있다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 8에 나타난 중쇄 CDR3; 및 서열번호 13에 나타난 경쇄 CDR3을 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체를 제공한다. 상기 항체는 서열번호 7에 나타난 중쇄 CDR2; 및 서열번호 12에 나타난 경쇄 CDR2를 더 포함할 수 있다. 상기 항체는 서열번호 6에 나타난 중쇄 CDR1; 및 서열번호 11에 나타난 경쇄 CDR1을 더 포함할 수 있다. 상기 CDR을 포함하는 항체의 대표적인 예는 다음을 포함한다:
- [0022] (a) 서열번호 30의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [0023] (b) 서열번호 32의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [0024] (c) 서열번호 34의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

- [0025] (d) 서열번호 36의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 37의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [0026] (e) 서열번호 38의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 39의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [0027] (f) 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;
- [0028] (g) 서열번호 42의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및
- [0029] (h) 서열번호 44의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 45의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.
- [0030] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 인간 C6에 결합하는 분리된 항체를 제공한다:
- [0031] (a) 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0032] (b) 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0033] 다른 양태에서, 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 전술한 아미노산 서열과 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 또 다른 양태에서, 상기 분리된 항체는:
- [0034] (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및
- [0035] (b) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0036] 본 발명에 따른 항체의 경쇄, 중쇄 또는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터 뿐만 아니라 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 숙주 세포, 및 형질 전환된 숙주 세포를 이용하여 재조합적으로 항체를 발현시키는 방법은 또한 본 발명에 포함된다. 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 Fab 단편으로 발현된다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 IgG4 아이소타입(isotype) 항체, 예컨대, IgG4 (S228P) 불변 영역을 갖는 IgG4 아이소타입 항체와 같은 전장(full-length) 항체로서 발현된다.
- [0037] 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물과 같은 본 발명의 항체를 포함하는 조성물이 또한 포함된다.
- [0038] 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 한 양태에서, 본 발명은 환자에게서 막 형성 복합체 (MAC) 형성 또는 활성을 저해하는 방법을 제공하며, 이 방법은 환자에게서의 MAC 형성 또는 활성을 저해하는데 효과적인 양으로 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 환자에서 보체 시스템(complement system)의 바람직하지 않은 활성에 의해 매개되는 질환의 증상들을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 환자의 신경을 재생시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 환자의 손상된 또는 퇴행된 신경의 회복을 촉진시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 환자의 신경 퇴행을 감소시키거나 지연시키는 방법으로서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0040] 일 양태에서, 환자는 외상성 손상(traumatic injury)(예: 사고로 인한), 외과적 손상(surgical injury) 또는 비-외상성 손상(non-traumatic injury)(예: 신경 압박)과 같은 신경의 물리적 손상으로부터 고통받는다. 일 양태에서, 상기 손상은 말초 신경계(PNS)에 대한 것이다. 또 다른 양태에서, 상기 손상은 중추 신경계(CNS)에 대한 것이다. 일 양태에서, 상기 항체는 손상 부위 또는 손상 부위 근처에 투여된다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 상기 환자는 면역-매개 염증질환 또는 진행성 신경퇴행성 질환으로 고통받는다. 또 다른 양태에서, 상기 질환은 후천적인 것이다. 또 다른 양태에서, 상기 질환은 유전적인 것이다. 일 양태에서, 상기 질환은 다발성 경화증(MS)과 같은 만성 탈수초성 신경병증(chronic demyelinating neuropathy). 또 다른 양태에서, 상기 질환은 중증 근무력증(myasthenia gravis) 또는 근위축성 측삭경화증(ALS)과 같은 신경퇴행성 질환이다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1a는 인간 C6으로 면역화된 2개의 상이한 래트의 38개의 하이브리도마(hybridoma)로부터의 상청액(supernatant)을 이용한 용혈 분석의 결과를 나타내는 막대 그래프로서, 상청액 11(7E5 mAb를 생성함)이 가장 강력한 저해 효과를 갖는다는 것을 설명한다.

도 1b는 인간 C6으로 면역화된 2개의 상이한 래트의 38개의 하이브리도마(hybridoma)로부터의 상청액(supernatant)을 이용한 만난-활성화(mannan-activated) ELISA의 결과를 나타내는 막대 그래프로서, 상청액 11(7E5 mAb를 생성함)이 가장 강력한 저해 효과를 갖는다는 것을 설명한다.

도 2는 인간 C6에 결합하는 재조합 래트 7E5에 대한 비아코어(biacore) 키네틱스를 보여주는 그래프이다.

도 3A-D는 27B1 mAb와 7E5 mAb 사이의 에피토프 교차-차단 실험 결과를 나타내는 그래프로서, 7E5가 27B1보다 다른 에피토프를 점유한다는 것을 나타낸다.

도 4a는 펩타이드 418의 위치를 보여주는 래트 C6 부분 아미노산 서열 (서열번호 51)과 인간 C6 부분 아미노산 서열 (서열번호 50)의 정렬이다.

도 4b는 펩타이드 418의 위치를 보여주는 인간 C6 단백질의 개략도이다.

도 5는 인간 C6이 보충된 C6 결핍 래트에서 7E5가 in vivo에서 C6을 차단함을 보여주는 막대 그래프로서, 용혈 분석에 의해 측정되었다. 래트는 지시된 양의 인간 C6 및 항체 7E5를 받았다. 보체 활성화는 Y 축에 그려지며, O.D. 1.0은 감작 된 적혈구의 최대 용해를 나타내며, O.D. 0은 용해가 없음을 나타낸다.

도 6a는 차이를 나타낸 래트 항 -C5 7E5 mAb (서열번호 5) 및 인간 VH3_1 생식세포 (서열번호 48)의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열의 정렬이다. 정렬 아래에 표시된 것은 인간화를 목표로하는 아미노산 교환이다.

도 6b는 차이를 나타낸 래트 항-C5 7E5 mAb (서열번호 10) 및 인간 Vk2_5 생식세포 (서열번호 49)의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열의 정렬이다. 정렬 아래에 표시된 것은 인간화를 목표로하는 아미노산 교환이다.

도 7a는 9개의 인간화된 7E5 변이체 VH 사슬과 9개의 인간화 된 7E5 변이체 VL 사슬의 81개의 가능한 모든 조합 (각각 도 7a 및 7b에 도시됨)의 억제 활성을 설명하는 용혈 분석 결과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 7b는 인간화된 7E5 변이체 VH 사슬과 9개의 인간화 된 7E5 변이체 VL 사슬의 81개의 가능한 모든 조합 (각각 도 7a 및 7b에 도시 됨)의 억제 활성을 설명하는 MAC ELISA 분석 결과를 나타내는 막대 그래프이다.

도 8a는 7E5 중쇄 가변영역 (서열번호 5)의 아미노산 서열과 인간화된 7E5 변이체의 중쇄 가변영역 아미노산 서열 7C02 (서열번호 46), 7E11 (서열번호 42), 7E12 (서열번호 32), 7F02 (서열번호 44), 7F06 (서열번호 38), 7F11 (서열번호 40), 7G09 (서열번호 34), 8F07 (서열번호 36) 및 8G09 (서열번호 30)의 정렬이다. 보존된 CDR1, 2 및 3 영역이 표시된다.

도 8b는 7E5 경쇄 가변영역 (서열번호 10)의 아미노산 서열과 인간화된 7E5 변이체의 경쇄 가변영역 아미노산 서열 7E11 (서열번호 43), 7E12 (서열번호 33), 7F02 (서열번호 45), 7F06 (서열번호 39), 7F11 (서열번호 41), 7G08 (서열번호 47), 7G09 (서열번호 35), 8F07 (서열번호 37) 및 8G09 (서열번호 31)의 정렬이다. 보존된 CDR1, 2 및 3 영역이 표시된다.

도 9는 야생형 7E5 래트 F'Ab의 친화도와 비교하여, 인간 C6에 대한 8개의 인간화된 F'Abs의 친화력 (Biacore)을 나타낸다.

도 10은 in vivo 신경 압박 실험(nerve crush experiment)의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

본 발명은 유익한 기능적 특성을 나타내는 항-C6 항체를 제공한다. 이러한 기능적 특징들은, 예를 들어 : (a) 0.5 μ g/ml 이하의 용혈 분석에서 IC₅₀; (b) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 K_D가 5 $\times 10^{-10}$ M 이하; (c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 항체-C6 결합 반감기가 40시간 이상; 및/또는 (d) 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 C6와의 교차반응을 포함한다. 다른 양태에서, 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및/또는 CDR 서열을 포함한다. 예를 들어, 81개의 가능한 모든 사슬의 "믹스 앤드 매치" 조합에서 효과적인 C6 저해 활성을 나타내는 9개의 인간화 중쇄 및 9개의 인간화 경쇄 가변 영역이 제공된다. 또 다른 양태에서, 항-C6 항체는 7E5, 8G09,

7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 또는 7F02과 같이 본원에 개시된 특정 항-C6 항체와 동일하거나, C6에 결합하기 위해 경쟁하는 에피토프에 결합한다.

[0044] 본 발명이 보다 쉽게 이해될 수 있도록, 특정 용어가 먼저 정의된다. 추가적인 정의는 상세한 설명을 통해 설명된다.

[0045] 용어 "C6" ("보체 C6" 또는 "보체 성분 C6"이라고도 함)은 성분 C5b, C7, C8 및 C9와 결합하여 C5b-C9 막 공격 복합체(MAC)를 형성하는 보체 캐스케이드의 성분을 지칭한다. 용어 "C6"는 자연적으로 발현되는 C6의 임의의 변이체 또는 아이소폼(isoform)을 포함한다. 본 발명의 항체는 인간 CD6에 특이적일 수 있고 다른 종과 교차-반응성을 나타내지 않을 수 있다. 다르게는, 본 발명의 항체는 사이노물구스 원숭이와 같은 인간 이외의 종으로부터의 C6와 교차 반응할 수 있다. 다르게는, 본 발명의 항체는 사이노물구스 원숭이와 같은 영장류로부터 C6와 교차 반응할 수 있지만, 마우스 또는 래트 C6과 같은 비-영장류 C6과는 교차 반응하지 않을 수 있다. C6 또는 이들의 임의의 변이체 및 아이소폼은 자연적으로 발현하는 세포 또는 조직으로부터 분리되거나, 해당 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 재조합 적으로 생산될 수 있다. GenBank® (Accession No. NP_00110860.3)는 하기와 같이 인간 C6의 아미노산 서열을 보고한다 (서열번호 52) :

[0046] 1 marrsvlyfi llnalinkgq acfcdhyawt qwtscsktcn sgtqsrhrqi vvdkyqenf

[0047] 61 ceqicskqet recnwqrcpi ncllgdfgpw sdcpciekq skvrsvlrps qfggqpctap

[0048] 121 lvafqpcips klckieeadc knkfrcdsgr ciarklecng endcgdsnde rdcgrtkavc

[0049] 181 trkynpipsv qlmgngfhfl ageprgevd nsftggickt vksrtsnpy rvpanlengv

[0050] 241 fevqtaeddl ktdfykdlts lghnenqqgs fssqgssfs vpifysskrs eninhnsafk

[0051] 301 qaiqashkdk ssfirihkvm kvlnfttkak dlhlsdvflk alnhlpleyn salysrifdd

[0052] 361 fgthyftsgs lggvydllyq fsseelknsg lteeeakhcv rietkkrvlf akktkvehrc

[0053] 421 ttnklsekhe gsfiqgaeks islinggrse ygaalawekg ssgleektfs ewlesvkenp

[0054] 481 avidfelapi vdlvrnipca vtkrnnlrka lqeyaakfdp cqcpcpnnng rptlsgtecl

[0055] 541 cvcqsqtyge ncekqsdyk snavdgqwg wsswstcdat ykrsrtrecn npapqrggkr

[0056] 601 cegekrqeed ctfsimennq qpcinddeem kevdlepeia dsgcpqpvpp engfirnekq

[0057] 661 lylvgedvei scltgfetvg yqyfrclpdg twrqgdvecq rtecikpvvq evltitpfqr

[0058] 721 lyrigesiel tcpkgfvvav psrytcqgns wtppisnslt cekdtltklk ghcqlgkqs

[0059] 781 gsecicmspe edcshhsedl cvfdtdsndy ftspackfla ekclnnqqlh flhigscqdg

[0060] 841 rqlwglert rlssnstkke scgydtydw ekcsastskc vcllppqcfk ggnqlycvkm

[0061] 901 gsstsektln icevgtirca nrkmeilhpg kcla

[0062] 본 명세서에서 언급된 용어 "항체"는 전체 항체 및 임의의 항원 결합 절편 (즉, "항원-결합 부분") 또는 이의 단일 사슬을 포함한다. "항체"는 하나의 바람직한 양태에서, 다이설파이드 결합에 의해 상호 연결된 2개 이상의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L) 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본 명세서에서는 VH로 약칭) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본 명세서에서는 VL로 약칭) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)로 불리는 영역에 보다 보존성이 높은, 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 영역이 산재된 초가변성 (hypervariability) 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단에 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, 다음의 순서를 갖는다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 부위를 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 시스템의 다양한 세포 (예: 주호 세포) 및 고전 보체 시스템의 제 1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개 할 수 있다.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 항체의 "항원 결합 부위"(또는 간단히 "항체 부분")라는 용어는 항원 (예 : 인간 C6)에

특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 이러한 "단편"은 예를 들어, 약 8 내지 약 1500 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 745 아미노산 길이, 적합하게는 약 8 내지 약 300 아미노산, 약 8 내지 약 200 아미노산, 또는 약 10 내지 약 50 또는 100 개의 아미노산 길이를 갖는다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 항체의 "항원-결합 부위"라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 경첩 부위(hinge region)에서 다이설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (Ward 등, (1989) Nature 341 : 544-546) ; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 (vii) 선택적으로 합성 링커(synthetic linker)에 의해 결합될 수 있는 2개 이상의 분리된 CDR의 조합. 뿐만 아니라, Fv 단편, VL 및 VH의 2개의 도메인이 별도의 유전자에 의해 코딩되더라도, 이들은 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 결합 될 수 있고, 합성 링커는 이들을 VL 및 VH 영역이 1가의 분자를 형성하도록 쌍을 이루는 단일 단백질 사슬(단일 사슬 Fv로 알려진)로서 제조될 수 있게 한다; 예를 들어, Bird 외. (1988) Science 242 : 423-426; 및 Huston 외. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5879-5883) 참조. 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원 - 결합 부위"라는 용어 내에 포함되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되며, 손상되지 않은 항체와 동일한 방식으로 단편을 유용성을 위해 스크리닝된다. 항원-결합 부위는 재조합 DNA 기술, 또는 완전한 면역 글로불린의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다.

[0064] "2중 특이성" 또는 "2기능성 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄의 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공적인 하이브리드 항체이다. 2중 특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny 외, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992) 참조.

[0065] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체를 말한다. 따라서, "인간 모노클로날 항체"라는 용어는 단일 결합 특이성을 나타내고, 인간 생식 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변적 및 임의의 불변 영역을 갖는 항체를 나타낸다. 한 양태에서, 인간 모노클로날 항체는 형질전환 비-인간 동물, 예를 들어, 인간 중쇄 형질전환 유전자 및 무한증식 세포(immortalized cell)에 융합된 경쇄 전이유전자를 포함하는 계능을 갖는 형질전환 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "재조합 항체"는, (a) 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자가 이식되거나 염색체가 이식된 동물(예를 들어, 마우스) 또는 이들로부터 제조된 하이브리도마로부터 분리된 항체, (b) 항체를 발현하도록 형질 전환된 숙주 세포로부터 분리된 항체, 예를 들어, 트랜스펙토마(transfectoma), (c) 재조합, 조합의 인간 또는 인간화 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단과 같은 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 키메라, 인간화 및 인간 항체를 포함한다.

[0067] 용어 "인간화 항체"는 인간 생식 계열 서열로부터의 프레임워크 영역 및 비-인간 종(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼)으로부터의 CDR을 갖는 항체를 지칭하고, 예를 들어, 결합을 최적화하기 위해 특정 부위가 지정된 돌연변이 유발을 거친 인간 프레임워크 영역 및/또는 CDR을 포함한다. 인간화 항-C6 항체의 제조에 대한 예시적인 기술은 실시예 8에 기재되어있다.

[0068] 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역 글로불린 서열의 가변 및 불변 영역 (존재하는 경우)을 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식 계열면역글로불린 서열(예를 들어, in vitro 또는 in vivo 체세포 돌연변이에 의한 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이 유발에 의해 도입된 돌연변이)에 의해 코딩되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다 (Lonberg, N.외. (1994) Nature 368 (6474) : 856-859); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49-101; Lonberg, N. 및 Huszar, D. (1995) Intern. Immunol. Vol. 13 : 65-93, 및 Harding, F. 및 Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764 : 536-546). 그러나, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 다른 포유류 종의 생식 계열에서 유래 된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열(즉, 인간화 항체)상에 이식된 항체를 포함하지 않는다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 "분리된(isolated) 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 의미한다 (예를 들어, 인간 C6에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 인간 C6 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나 에피토프에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 상이한 종으로부터

의 다른 C6 단백질에 교차-반응성을 가질 수 있다. 그러나 항체는 가급적 항상 인간 C6에 결합한다. 또한, 분리된 항체는 전형적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학 물질이 실질적으로 없다. 본 발명의 양태에서, 상이한 C6 특이성을 갖는 "분리된"항체의 조합은 잘-정의된 조성물에서 조합된다.

[0070] "에피토프" 또는 "항원 결정기"라는 용어는 면역글로불린 또는 항체가 특이 적으로 결합하는 항원상의 부위를 의미한다. 에피토프는 인접한 아미노산 또는 단백질의 3차 접힘에 의해 나란히 놓인 비인접 아미노산 모두로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 일반적으로 변성 용매로 처리시 손실된다. 에피토프는 일반적으로 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 독특한 공간 구조로 아미노산을 포함한다. 주어진 항체에 의해 어떤 에피토프가 결합되는지를 결정하는 방법 (즉, 에피토프 맵핑)은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 면역블롯팅 및 면역침강반응 분석을 포함하고, 여기서 C6로부터의 중첩 또는 인접 펩타이드는 주어진 항-C6 항체와의 반응성이 시험된다. 에피토프의 공간 구조를 결정하는 방법은 당 분야의 기술 및 본원에 기재된 기술, 예를 들어 x-선 결정학 및 2차원 핵자기 공명을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, GE Morris, Ed. (1996)]).

[0071] 용어 "비연속 에피토프"는 비인접 아미노산으로 이루어진 에피토프를 말한다. 예를 들어, 에피토프는, 구조적으로 폴딩된 경우, 항체가 각 영역 내의 하나 이상의 잔기에 결합하도록 (근접하여) 연결되는, 인간 C6의 다수의 영역으로부터의 잔기를 포함할 수 있다.

[0072] 용어 "에피토프 맵핑"은 항체-항원 인지를 위한 분자 결정자의 동정과정을 의미한다.

[0073] 2개 이상의 항체와 관련하여 "동일한 에피토프에 결합한다"이란 용어는 항체가 항원과의 결합을 위해 경쟁하고, 항체가 동일하거나, 겹쳐지거나 포괄하는 아미노산의 연속 또는 비연속 세그먼트와 결합하는 것을 의미한다. 통상의 기술자는 "동일한 에피토프에 결합한다"라는 문구는 항체가 정확히 동일한 아미노산에 결합하는 것을 의미하지 않는다는 것을 이해한다. 항체가 결합하는 정확한 아미노산은 다를 수 있다. 예를 들어, 제1 항체는 제2 항체에 의해 결합된 아미노산 세그먼트에 의해 완전히 둘러싸인 아미노산 세그먼트에 결합할 수 있다. 또 다른 예에서, 제1 항체는 제2 항체에 의해 결합된 하나 이상의 세그먼트와 상당히 겹치는 하나 이상의 아미노산 세그먼트에 결합한다. 본원의 목적을 위해, 그러한 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"고 여겨진다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 용어 "특이적 결합", "선택적 결합", "선택적 결합" 및 "특이적으로 결합한다"은 미리 결정된 항원상의 에피토프에 대한 항체의 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체는 재조합 인간 C6을 분석 대상 물질로, 항체를 리간드로 사용하는 BIACORE 2000 장치에서 표면 플라즈몬공명(SPR) 기술에 의해 결정될 때 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만, 약 10^{-9} M 또는 약 10^{-10} M 또는 심지어 더 낮은 평형 해리 상수 (K_D)로 결합하고, 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비특이적 항원(예를 들어, BSA, 카제인)에 대한 결합에 대한 그의 친화력보다 적어도 2배 큰 친화력으로 결합한다. "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"라는 문구는 본 명세서에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호 교환적으로 사용된다.

[0075] 본원에 사용된 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 평형 상수를 지칭한다. 전형적으로, 본 발명의 항체는 재조합 인간 C6을 분석 대상 물질로, 항체를 리간드로 사용하는 BIACORE 2000 장치에서 표면 플라즈몬공명(SPR) 기술에 의해 결정될 때 약 10^{-8} M 이하, 또는 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하의 해리 평형 상수 (K_D)로 C6에 결합한다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "kd"는 항체/항원 복합체로부터 항체의 해리에 대한 오프 레이트(off rate) 상수를 지칭한다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "ka"는 항체와 항원의 결합에 대한 온 레이트(on rate) 상수를 지칭한다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "IC₅₀"은 소정의 생물학적 반응을 반으로 억제하기 위해 in vivo 또는 in vitro 분석에서 필요로 하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 농도를 의미한다. 즉, 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 최소 (50%) 저해 농도 (IC)이다.

[0079] 본원에 사용된 "아이소타입(isotype)"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 종류(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다. 한 양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 IgG1 아이소타입이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 IgG2 아이소타입이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날

항체는 IgG4 아이소타입이다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 IgG4 (S228P) 아이소타입 (즉, 아미노산 위치 228에서 야생형 세린 잔기의 프롤린 치환을 갖는 IgG4 아이소타입)이다.

[0080] 용어 "고정화된 C6에 결합"은 본 발명의 인간 항체가 C6에 결합하는 능력, 예를 들어 세포 표면에 발현되거나 또는 고체 지지체에 부착된 C6에 결합하는 능력을 의미한다.

[0081] 본 명세서에서 사용된 용어 "교차 반응"은 본 발명의 항체가 다른 종의 C6에 결합할 수 있는 능력을 의미한다. 예를 들어, 인간 C6에 결합하는 본 발명의 항체는 또한 사이노몰구스 원숭이와 같은 C6의 다른 종에 결합할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 교차 반응성은 결합 분석 (예 : SPR, ELISA)에서 정제된 항원과의 특이적 반응성을 검출하거나, C6를 생리학적으로 발현하는 세포에 결합하거나 그렇지 않으면 기능적으로 상호 작용함으로써 측정된다. 교차 반응성을 결정하는 방법은 본원에 기술된 표준 결합 분석, 예를 들어 BiacoreTM 2000 SPR 장치 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 또는 유동 세포 계측 기술을 사용하는 BiacoreTM 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 분석을 포함한다.

[0082] 본 명세서에서 사용된 "글리코실화 패턴"은 단백질, 보다 구체적으로는 면역글로불린 단백질에 공유 결합된 탄수화물 단위의 패턴으로 정의된다. 통상의 기술자는 이종(heterologous) 항체의 글리코실화 패턴이 전이유전자의 CH 유전자가 유래된 종에 비해 비인간 형질전환 동물의 종에서 상기 글리코실화의 패턴과 더 유사하다고 인식할 때, 이종 항체의 글리코실화 패턴은 비인간 형질전환 동물의 종에 의해 생성된 항체상에서 자연적으로 발생하는 글리코실화 패턴과 실질적으로 유사한 것으로 특징지워질 수 있다.

[0083] 본 명세서에서 객체에 적용되는 것으로 사용되는 "자연적으로 발생하는"이라는 용어는 객체가 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 의미한다. 예를 들어, 자연의 원천으로부터 분리될 수 있고 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 생물체 (바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연 발생적이다.

[0084] 본 명세서에서 사용된 "재배열 된"이란 용어는 V 세그먼트가 본질적으로 완전한 VH 또는 VL 도메인을 각각 코딩하는 형태로 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하여 위치하는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 유전자 자리(locus)의 배열을 의미한다. 재배열 된 면역글로불린 유전자 자리는 생식 계열 DNA와 비교하여 확인할 수 있다; 재배열 된 유전자 자리는 적어도 하나의 재조합된 헤파타머/노나머 상동성 요소를 가질 것이다.

[0085] V 세그먼트와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 "재배열되지 않은"또는 "생식 계열(germline) 배열"이라는 용어는 V 세그먼트가 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접하도록 재조합되지 않는 배열을 지칭한다.

[0086] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 일 수 있지만, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다.

[0087] C6에 결합하는 항체 또는 항체 부분 (예를 들어, VH, VL, CDR3)을 코딩하는 핵산과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "분리된 핵산 분자"는 항체 또는 항체 부분을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 항체를 코딩하는 다른 뉴클레오타이드 서열을 갖지 않거나 또는 C6 이외의 항원을 결합하는 항체 부분을 포함하지 않는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도되며, 다른 서열은 인간 게놈 DNA에서 핵산과 자연적으로 접할 수 있다. 예를 들어, 서열번호 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 및 28은 항-C6 모노클로날 항체의 중쇄(VH) 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02 각각에 상응한다. 서열번호 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 및 29는 항 -C6 모노클로 날 항체 의 경쇄(VH) 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02에 각각 상응한다.

[0088] 본 발명은 또한 서열번호 4 내지 47에 기재된 서열의 "보존적 서열 변형", 즉, 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 항체 또는 아미노산 서열을 함유하는 항체의 항원에 대한 결합을 배제하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열의 변형을 포함한다. 이러한 보존적 서열 변형에는 보존적 뉴클레오타이드 및 아미노산 치환뿐만 아니라 뉴클레오타이드 및 아미노산의 첨가 및 결실이 포함된다. 예를 들어, 부위 특이적 돌연변이 유발 및 PCR 매개 돌연변이 유발과 같은 당업계에서 공지된 표준 기술에 의해 서열번호 4 내지 47에 변형을 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 결사슬을 갖는 아미노산 잔기로 치환된 것을 포함한다. 유사한 결사슬을 갖는 아미노산 잔기의 계열이 당업계에 정의되어있다. 이 계열에는 라이신, 아르기닌, 히스티딘과 같은 염기성 결사슬을 가진 아미노산, 아스파르트산, 글루타민산과 같은 산성 결사슬, 비타민 C와 같은 비전하 극성 결사슬 (예 : 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 결사슬 (예 : 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-가지 결사슬 (예 : 트레오닌, 발린, 이

소류신) 및 방향족 결사슬 (예 : 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘). 따라서, 인간 항-C6 항체에서 예측된 비본질적인 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 결사슬 계열로부터의 또 다른 아미노산 잔기로 대체된다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법은 당업계에 잘 공지되어있다 (예를 들어, Brummell 외, Biochem. 32 : 1180-1187 (1993); Kobayashi 등, Protein Eng. 12 (10) : 879-884 (1999) 및 Burks 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 412-417 (1997)).

[0089] 또한, 다른 양태에서, 돌연변이는 포화 돌연변이 유발과 같은 항-C6 항체 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 생성된 변형된 항-C6 항체는 결합 활성에 대해 스크리닝 될 수 있다.

[0090] 핵산의 경우, 용어 "실질적인 상동성(homology)"은 2개의 핵산 또는 이의 지정된 서열이 최적으로 정렬되고 비교될 때, 뉴클레오타이드의 약 80% 이상, 통상적으로 적어도 약 90% 내지 95%, 보다 바람직하게는 약 98% 내지 99.5%의 뉴클레오타이드에서 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실과 동일함을 나타낸다. 또한, 세그먼트가 선택적 하이브리드 조건하에서 가닥의 상보적인 세그먼트에 혼성화 될 때 실질적인 상동성이 존재한다.

[0091] 두 서열 간의 동일성 비율은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수로, (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수 / 전체 위치 수 × 100), 두 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수 및 각 갭의 길이를 고려한다. 서열의 비교 및 두 서열 간의 동일성 퍼센트의 결정은 하기의 비-한정적인 실시예에 기재된 바와 같이 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다.

[0092] 두 개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60 및 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하는 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용 가능)의 GAP 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 2개의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성은 또한 PAM120 가중치 잔기 테이블, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하는 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 통합된 E. Meyers 및 W. Miller (CABIOS, 4 : 11-17 (1989))의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다. 또한, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 사용 가능)의 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 및 갭 중량 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 를 사용하는 GAP 프로그램에 통합된 Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48) : 444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 두 아미노산 서열 간의 퍼센트 동일성을 결정할 수 있다.

[0093] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 또한 예를 들어, 관련 서열을 동정하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하는 "원하는 서열(query sequence)"로서 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul 외, (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-10 의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 수행 할 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 단어 길이 = 12로 수행되어 본 발명의 핵산 분자와 상동인 뉴클레오타이드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자에 상응하는 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적으로 갭 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST는 Altschul 외, (1997) Nucleic Acids Res.25 (17) : 3389-3402 에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>를 참조.

[0094] 본 발명의 핵산 또는 단백질은 전체 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴딩 (banding), 칼럼 크로마토그래피 (column chromatography), 아가로스겔 전기영동 및 당업계에 널리 공지된 것들을 포함하는 표준 기술에 의해 핵산 또는 단백질은 다른 세포 성분 또는 기타 오염 물질, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때 "분리"되거나 "실질적으로 순수하게 된다".

[0095] 본 발명의 핵산 조성물은 유전자 서열을 제공하기 위한 표준 기술에 따라 종종 cDNA, 게놈 또는 이들의 혼합물로부터의 본래의 서열 (변형 제한 부위 등을 제외하고)에서 돌연변이 될 수 있다. 코딩 서열의 경우, 이들 돌연변이는 원하는 대로 아미노산 서열에 영향을 줄 수 있다. 특히, 본 명세서에 기술된 본래의 V, D, J, 상수, 스위치 및 다른 그와 같은 서열로부터 유래되거나 실질적으로 상동인 DNA 서열이 고려된다 ("유래된"은 서열이 동일하거나 다른 서열로부터 변형된 것을 나타낸다).

[0096] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 주게 되면, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동 가능하게 연결된 것은 연결된 DNA 서열이 연속적이고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한, 연속적이며 리딩 프레임에 있음을 의미한다. 스위치 서열에 있어서, 작동 가능하게 연결된 것은 서열이 스위치 재조

합을 수행할 수 있음을 나타낸다.

- [0097] 본 명세서에서 사용된 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 한 종류의 벡터는 "플라스미드(plasmid)"로, 이것은 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 말하고, 추가로 DNA 세그먼트를 연결할 수 있다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터로, 추가 DNA 세그먼트는 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 특정 벡터는 그들이 도입된 숙주 세포 (예를 들어, 박테리아성 복제 기원 및 에피소말(episomal) 포유류 벡터를 갖는 박테리아 벡터)에서 자을 증식할 수 있다. 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피소말 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성을 갖는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 형태의 벡터이기 때문에 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 바이러스 벡터 (예 : 복제 결합 있는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스 및 아데노 관련 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하도록 의도된다.
- [0098] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 단순히 "숙주 세포")는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 의미한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 부모 세포와 동일하지는 않지만 여기에 사용된 "숙주 세포"라는 용어의 범위에 포함된다.
- [0099] 본 명세서에서 사용된 용어 "연결된"은 2개 이상의 분자의 결합을 의미한다. 결합은 공유 결합 또는 비공유 결합 일 수 있다. 결합은 또한 유전적 (즉, 재조합 적으로 융합 된)일 수 있다. 이러한 결합은 화학적 접합 및 재조합 단백질 생산과 같은 다양한 공인된 기술을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0100] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "저해" 또는 "차단"(예를 들어, 항-C6 항체에 의한 MAC의 형성의 저해/차단을 언급함)은 상호 교환 가능하게 사용되고 부분적 및 완전한 저해/차단을 포함한다. C6의 저해/차단은 바람직하게는 C6이 차단되거나 억제되지 않을 때 발생하는 정상적인 수준 또는 유형의 활성을 감소시키거나 변경시킨다. 저해 및 차단은 또한 항-C6 항체와 접촉하지 않는 C6과 비교하여 항-C6 항체와 접촉할 때 C6의 결합 또는 활성의 측정 가능한 감소를 포함하는 것으로 의도되며, 예를 들어, C6의 결합 또는 활성을 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 저해한다. 일 양태에서, 항-C6 항체는 C6의 결합 또는 활성을 적어도 약 70% 저해한다. 또 다른 실시 양태에서, 항 -C6 항체는 C6의 결합 또는 활성을 적어도 80% 저해한다.
- [0101] 본 명세서에서 사용되는 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 용어는 본 명세서에 기술된 치료 또는 예방 조치를 의미한다. "치료"의 방법은 치료를 필요로 하는 대상, 예를 들어, 그러한 치료가 필요한 환자에게 본 발명의 항체를 투여하는 것을 의미한다.
- [0102] 용어 "유효량(effective dose)" 또는 "유효 투여량(dosage)"은 원하는 효과를 달성하거나 적어도 부분적으로 달성하기에 충분한 양으로 정의된다. 용어 "치료학적 유효량"은 이미 질병으로 고통받는 환자에서 질병 및 그의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 억제하기에 충분한 양으로 정의된다. 이러한 사용에 효과적인 양은 치료되는 장애의 심각도 및 환자 자신의 면역 체계의 일반적인 상태에 따라 달라질 것이다.
- [0103] "환자"란 용어는 예방적 또는 치료학적 치료를 받는 인간 및 다른 포유류 개체를 포함한다.
- [0104] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "개체(subject)"라는 용어는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 방법 및 조성물은 면역 장애를 가진 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 용어 "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어, 비인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 포유류 및 비-포유류를 포함한다.
- [0105] 본 발명의 다양한 측면은 이하의 세부항목에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0106] I. C6에 대한 항체의 생산
- [0107] 본 발명은 C6 (예 : 인간 C6)에 결합하는 항체, 예를 들어, 인간화 항체를 포함한다. C6에 결합하는 예시적인 모노클로날 항체는 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02를 포함하며, 그의 중쇄 가변 영역은 각각 서열번호 5, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 및 44로 나타나고, 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 10, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 및 45로 나타난다. 이들 항체의 중쇄 CDR1, 2 및 3은 각각 서열번호 6, 7 및 8에

나타나는 반면, 이들 항체의 경쇄 CDR1, 2 및 3은 서열번호 11, 12 및 13에 각각 나타난다.

- [0108] 본 발명의 모노클로날 항체는 Kohler 및 Milstein, Nature 256 : 495 (1975)에 기술된 표준 체세포 혼성화 기술과 같은 다양한 공지된 기술을 사용하여 제조 할 수 있다. 체세포 혼성화 절차가 바람직하지만, 원칙적으로, 모노클로날 항체를 생산하는 다른 기술, 예를 들어, B 림프구의 바이러스성 또는 종양발생의 변형, 인간 항체 유전자의 라이브러리를 이용한 파지(phage) 디스플레이 기술 및 실시예 6에 기재된 것과 같은 인간화 기술 또한 사용될 수 있다.
- [0109] 따라서, 일 양태에서, 인간 C6에 결합하는 항체를 생산하기 위해 하이브리도마 방법이 사용된다. 이 방법에서, 면역화에 사용된 항원에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하기 위해 래트, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물을 적합한 항원으로 면역화시킬 수 있다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, 항-인간 C6 항체를 키우기 위한 특히 적합한 숙주 동물은 C6 (C6-/-래트)가 결합된 래트이며, 따라서 인간 C6으로의 면역화는 완전히 "외래"로 간주 될 것이다. 면역화된 숙주 동물로부터의 상청액은 C6 저해 활성을 갖는 항체를 발현하는 숙주 동물을 확인하기 위해, 항-CD 활성을 검출하기 위한 적합한 분석법, 예를 들어 실시예 1에서 상세히 기술된 바와 같은 용혈 분석 또는 MAC ELISA으로 시험 될 수 있다.
- [0110] 선택된 숙주 동물로부터의 림프구는 폴리에틸렌글리콜과 같은 적절한 용제(fusing agent)를 사용하여 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성 할 수 있다 (Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). 예시적인 융합 파트너는 Y3-Ag1.2.3 세포이지만 SP2 / 0-Ag8.653 세포 (ATCC, CRL 1580)와 같은 당업계에 공지된 다른 골수종 세포가 또한 적합하다. 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 용혈 분석 및/또는 MAC ELISA와 함께 항원에 대한 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석된다. 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론을 제한 희석 절차(limiting dilution procedures)에 의해 서브클로닝하고 표준 방법으로 성장시킬 수 있다 (Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양(ascites tumors)으로서 생체 내(in vivo)에서 성장할 수 있다. 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스(protein A-Sepharose), 하이드록실아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 겔 전기영동, 투석 또는 친화 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 과정에 의해 배양 배지, 복수액(ascites fluid) 또는 혈청으로부터 분리될 수 있다. 항-C6 항체를 분리하는 하이브리도마의 제조의 예시적이고 비-제한적인 예가 실시예 1에 상세히 기술되어있다.
- [0111] 래트 또는 마우스 항체와 같은 비인간 모노클로날 항체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 인간화될 수 있다. 예를 들어, 실시예 6에서 상세히 기술된 바와 같이, 래트 항-인간 C6 mAb는 문헌 Hwang, W.Y 외 (2205) Methods 36:35-42에 기술된 접근법을 이용하여 인간화될 수 있다. 이 접근법은 비인간 및 인간 항체가 유사하게 구조화된 CDR을 갖는 경우, 인간 프레임워크가 친화성을 유지하면서 비인간 CDR을 또한 서포트한다는 원리에 기초한다. 따라서, 이 방법에서, 인간 프레임워크 서열은 인간화 될 항체에 대해 인간 CDR의 구조적 유사성에 기초한 인간 생식 계열 유전자의 세트로부터 선택된다. 이탈된 FR 잔기를 함유하는 Fab 변이체 서열의 파지 디스플레이 라이브러리가 생성된다. 친화성 구동(affinity-driven) 선택 후, 개별 클론을 바인딩 및 오프-레이트(off-rate) 및 서열 인간 동일성에 대해 스크리닝하고, 상동성이 결정된다. 당업계에 잘 확립 된 CDR-이식 및 인간화를 위한 다른 접근법 및 방법론은 또한 본 발명의 인간화 된 항-C6 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0112] 또 다른 양태에서, 인간 C6에 결합하는 항체 및 항체 부분은, 예를 들어, McCafferty 외, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson 외, Nature, 352:624-628 (1991), Marks 외, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) and Hoet 외 (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348 ; U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner 외; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower 외; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty 외; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths 외에 개시된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 또한, 체인 셔플링(chain shuffling) (Marks et 외, Bio / Technology, 10 : 779-783 (1992))에 의한 고 친화성(nM 범위) 인간 항체 생산뿐만 아니라, 조합적 감염 및 대형 파지 라이브러리를 구성하기 위한 전략으로서의 생체 내(in vivo) 제조합 (Waterhouse 외, Nuc. Acids. Res., 21 : 2265-2266 (1993)) 또한 사용될 수 있다.
- [0113] 일 양태에서, 인간 C6에 결합하는 항체는 Hoet 외, supra에 개시된 파지 디스플레이 기술을 사용하여 생산된다. 이 기술은 인간 공여체로부터 분리된 면역글로불린 서열의 독특한 조합을 가지고, 중쇄 CDR에서 합성 다양성을

가지는 인간 Fab 라이브러리의 생성을 포함한다. 인간 C6에 결합하는 Fab에 대해 라이브러리를 스크리닝한다.

- [0114] 일 양태에서, C6에 대해 유도된 항체는 마우스 시스템이 아닌 인간 면역 시스템의 일부를 운반하는 형질전환 또는 염색체 이식 마우스를 사용하여 생성된다. 일 양태에서, 본 발명은 내인성 μ 및 γ 사슬 유전자좌를 불활성화하는 표적 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인간 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역 글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니로시(miniloci)를 함유하는 "HuMAb 마이스"로 지칭되는 형질전환 마우스를 사용한다 (Lonberg, N. 외. (1994) Nature 368(6474): 856-859). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 발현이 감소하고, 면역에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 전이 유전자는 종류변환(class switching) 및 체세포 돌연변이를 거쳐 고 친화성 인간 IgG κ 모노클로날 항체를 생성한다(Lonberg, N. 외 (1994), supra; reviewed in Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546). The preparation of HuMAb mice is described in Taylor, L. 외 (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. 외 (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon 외 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:3720-3724; Choi 외 (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. 외 (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon 외 (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg 외, (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. 외 (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. 외 (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. See further, U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay, and GenPharm International; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani 외; International Publication Nos. WO 98/24884, published on June 11, 1998; WO 94/25585, published November 10, 1994; WO 93/1227, published June 24, 1993; WO 92/22645, published December 23, 1992; WO 92/03918, published March 19, 1992).
- [0115] 또 다른 양태에서, 본 발명의 인간 항체는 인간 중쇄 전이 유전자 및 인간 경쇄 트랜스크로모솜(transchromosome)을 보유하는 마우스와 같이, 전이 유전자 및 트랜스크로모솜 상에 인간 면역글로불린 서열을 갖는 마우스를 사용하여 생산될 수 있다. 당해 기술 분야에서 "KM 마우스"로 지칭되는 이러한 마우스는 PCT 공개 공보 WO 02/43478 Ishida 외에 상세히 기술되어있다.
- [0116] 또한, 인간 면역 글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 형질 전환 동물 시스템이 당업계에서 이용 가능하며, 본 발명의 항-C6 항체를 생산시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, Xenomouse (Abgenix, Inc.)라고 하는 대안적인 형질 전환 시스템을 사용할 수 있다; 이러한 마우스는 예를 들어, 미국 특허 제 5,939,598 호; 6,075,181; 6,114,598; Kucherlapati 외.의 미국 특허 제 6,150,584 호 및 제 6,162,963 호에 기술되어 있다.
- [0117] 게다가, 인간 면역 글로불린 유전자를 발현하는 대안적인 염색체 이식 동물 시스템이 당업계에서 이용 가능하며, 본 발명의 항-C6 항체를 생산시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 트랜스크로모솜과 인간 경쇄 트랜스크로모솜 모두를 운반하는 마우스는 당업계에서 "TC 마우스"라고 불릴 수 있다; 그러한 마우스는 Tomizuka 외. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 722-727에 기술되어 있다. 이에 더하여, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스크로모솜을 갖는 쥐소가 당업계에 기술되어 있으며 (Kuroiwa 등 (2002) Nature Biotechnology 20 : 889-894), 본 발명의 항-C6 항체를 생산시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0118] 인간 항체를 생산하기 위한 당업계에 기술된 추가적인 마우스 시스템은 또한 본 발명의 항-C6 항체를 유도하는데 적용될 수 있는데, 이는 (i) VelocImmune® 마우스 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) 내인성 마우스 키메라 항체 (인간 V/마우스 C)가 마우스에서 자라도록 내인성 마우스 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역과 동종 재조합을 통해 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 대체되었고, 이어서 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 완전히 인간 항체로 전환시킨다; 및 (ii) 마우스가 재배치되지 않은 인간 중쇄 가변 영역을 포함하나, 재배열 된 인간 공통 경쇄 가변 영역을 함유하는 MeMo® 마우스 (Merus Biopharmaceuticals, Inc.)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 마우스 및 항체를 생산시키는 그의 용도는 예를 들어 WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, 148873, US 2012/0070861 및 US 2012/0073004에 기술되어 있다.
- [0119] 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 또한 면역화 시 인간 항체 반응이 생성 될 수 있도록 재구성된 SCID 마우스

를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 마우스는 예를 들어, 미국 특허 제 5,476,996 호 및 제 5,698,767 호 Wilson 외에 기술되어 있다.

[0120] C6에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 트랜스펙토마(transfectomas)의 생성

[0121] 본 발명의 항체는 또한, 예를 들어 당업계에 널리 알려진 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질 전환 방법의 조합을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산될 수 있다 (Morrison, S. (1985) Science 229 : 1202). 항-C6 항체의 재조합 발현에 대한 예시적인 양태는 실시예 5 (pMQR 발현 벡터가 HEK-293 숙주 세포에서 사용됨), 실시예 6 (대장균 숙주 세포에서 pCB4 발현 벡터를 사용하여 Fab 발현) 및 실시예 7 (CHO 세포 발현)에 더 기재되어 있다.

[0122] 또한, 일 양태에서, 관심있는 유전자 (예를 들어, 항체 유전자)는 WO 87/04462, WO 89/4462, WO89/0136 및 EP338,841 또는 당업계에서 널리 알려진 발현 시스템에 개시된 GS 유전자 발현 시스템에 의해 사용되는 것과 같은 진핵 발현 플라스미드와 같은 발현 벡터 내로 연결될 수 있다. 01036 및 EP 338 841 또는 당업계에 널리 공지된 다른 발현 시스템을 포함한다. 클로닝된 항체 유전자를 갖는 정제된 플라스미드는 CHO- 세포 또는 NSO-세포와 같은 진핵 숙주 세포 또는 식물 유래 세포, 진균 또는 효모 세포와 같은 다른 진핵 세포에 대안적으로 도입될 수 있다. 이들 유전자를 도입하는 데 사용되는 방법은 전기 천공법, 리포펙틴(lipofectine), 리포펙타민(lipofectamine) 또는 기타와 같은 당업계에 기재된 방법 일 수 있다. 이들 항체 유전자를 숙주 세포에 도입한 후, 항체를 발현하는 세포를 동정 및 선별할 수 있다. 이 세포들은 트랜스펙토마를 나타내며, 그 발현 수준은 증폭될 수 있고 항체 생산은 증가 될 수 있다. 재조합 항체는 이들 배양 상청액 및/또는 세포로부터 분리되고 정제될 수 있다.

[0123] 대안적으로, 이들 클로닝 된 항체 유전자는 대장균 또는 완전한 생물체와 같은 다른 발현 시스템에서 발현되거나 합성적으로 발현될 수 있다.

[0124] 교차-경쟁 및 동일한 에피토프-결합 항체

[0125] 실시예 3에서 상세히 기술된 바와 같이, 7E5 항체가 결합하는 에피토프는 알려진 스캐닝 돌연변이 유발에 의해서열번호 52 (인간 C6)의 아미노산 835-854에 상응하는 인간 C6의 영역 내의 잔기로 맵핑된다. 서열번호 1, 2 및 3에 나타난 특정 펩타이드는 또한 7E5가 결합하는 에피토프의 일부를 형성하는 잔기를 함유하는 것으로 나타났다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 52의 잔기 835-854의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 C6의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 52의 잔기 835-854의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 C6의 에피토프에 결합하는 항체를 제공하며, 상기 에피토프는 비연속적이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 C6의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 1, 2 및 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 인간 C6의 에피토프에 결합하는 항체를 제공하며, 상기 에피토프는 비연속적이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열번호 5에 나타난 중쇄 가변 영역 및 서열번호 10에 나타난 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 C6에 결합하기 위해 교차 경쟁하는 항체를 제공한다 (7E5의 VH 및 VL 서열). 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 본원 명세서에 기재된 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 또는 7F02와 같은 다른 항-C6 항체들과 C6에의 결합에 대해 교차 경쟁한다.

[0126] 이러한 경쟁 항체는 표준 C6 결합 분석에서 mAb 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11, 7F02 중 하나 이상의 C6에의 결합을 경쟁적으로 억제하는 능력에 기초하여 동정 될 수 있다. C6 에의 결합에 대한 교차 경쟁을 시험하기위한 예시적 시험은 실시예 3에 상세히 기술된 에피토프 샌드위치 ELISA이다. 또한, 동일한 에피토프를 인식하거나, 결합을 위해 경쟁하는 항체는 다른 통상의 기술을 사용하여 동정 될 수 있다. 이러한 기술은 예를 들어, 표적 항원에 대한 다른 항체의 결합을 차단하는 하나의 항체의 능력을 나타내는 면역분석, 즉 경쟁적 결합 분석을 포함한다. 경쟁적 결합은 시험중인 면역 글로불린이 C6과 같은 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 분석에서 결정된다. 여러 유형의 경쟁적 결합 시험이 공지되어있다, 예를 들어: 고체상 직접 또는 간접 방사 면역 측정법 (RIA), 고체상 직접 또는 간접 면역분석법 (EIA), 샌드위치 경쟁 분석 (Stahli 외, Methods in Enzymology 9 : 242 (1983) 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Kirkland 외, J. Immunol.137 : 3614 (1986) 참조); 고체상 직접 표지된 분석, 고체상 직접 표지된 샌드위치 분석 (Harlow and Lane, Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988) 참조); I-125 라벨을 사용하는 고체상 직접 라벨 RIA (Morel 외, Mol.Immunol.25 (1) : 7 (1988) 참조); 고체상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Cheung 외, Virology 176 : 546 (1990)); 직접 라벨링 된 RIA. (Moldenhauer 외, Scand. J. Immunol. 32 : 77 (1990)). 전형적으로, 이러한 분석은 고체 표면에 결합된 정제된 항원 또는 표지되지 않은 시험 면역글로불

린 및 표지된 기준 면역글로불린 이들 중 어느 하나를 갖는 세포의 사용을 포함한다. 경쟁적 저해는 시험 면역글로불린의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 측정함으로써 측정된다. 보통 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과도하게 존재할 때, 항체는 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 적어도 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % 이상 저해할 것이다.

[0127] 따라서, 본원에 기술된 특정 항체에 의해 인식되는 에피토프의 전부 또는 일부를 포함하는 C6 상의 에피토프에 결합하는 항체 또한 본 발명에 포함된다 (예를 들어, 동일하거나 겹치는 영역 또는 영역 사이의 영역).

[0128] 한 양태에서, C6에의 결합에 대해 경쟁하고 및/또는 인간 C6 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간화 항체이다. 이러한 인간화 모노클로날 항체는 예를 들어 실시예 6에 기술된 바와 같이 제조 및 분리 될 수 있다.

[0129] 항체가 결합하는 에피토프를 결정하기 위한 다른 기술은, 예를 들어, 에피토프의 원자 분해능을 제공하는 항원:항체 복합체의 결정의 x-선 분석과 같은 에피토프 맵핑 방법을 포함한다. 다른 방법은 항원 서열 내의 아미노산 잔기의 변형으로 인한 결합의 상실이 종종 에피토프 성분의 지표로 간주 되는 항원 단편 또는 돌연변이된 항원의 변이체에 대한 항체의 결합을 모니터링한다. 또한, 에피토프 맵핑을 위한 전산 조합 방법이 또한 사용될 수 있다. 이들 방법은 조합적 파지 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 특이적인 짧은 펩타이드를 친화성으로 분리하는 관심 항체의 능력에 의존한다. 펩타이드는 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하는데 사용되는 항체에 상응하는 에피토프의 정의를 위한 리드로 간주된다. 에피토프 맵핑을 위해, 구조적 비연속 항원 에피토프를 맵핑하는 것으로 밝혀진 계산 알고리즘이 또한 개발되었다.

[0130] 본 명세서에 기술된 목적하는 성질을 갖는 단일의 전형적인 항-C6 mAb가 분리되면, 당해 기술 분야에 공지된 방법을 사용함으로써 동일한 특성, 예를 들어 동일한 에피토프, 를 갖는 다른 mAb를 생성하는 것은 간단하다. 예를 들어, 마우스 또는 래트를 본원에 기술된 바와 같은 C6, 하이브리도마로 면역화시킬 수 있으며, 생성된 모노클로날 항체는 C6에 결합하기 위한 전형적인 mAb와 경쟁하는 능력을 스크리닝한다. 래트 또는 마우스는 전형적인 mAb가 결합하는 에피토프를 함유하는 C6의 더 작은 조각으로 면역화될 수 있다. 에피토프는, 예를 들어, C6에 걸친 일련의 중첩 펩타이드에 대한 결합을 스크리닝함으로써 국한될 수 있다. 대안적으로, Jespers 외, *Biotechnology* 12 : 899, 1994의 방법을 사용하여 동일한 에피토프를 가지고 이에 따른 전형적인 mAb와 유사한 특성을 갖는 mAb의 선택을 유도할 수 있다. 파지 디스플레이를 사용하여, 최초의 전형적인 항체의 중쇄는 C6-결합 mAb를 선택하기 위한 (바람직하게는 인간의) 경쟁의 레퍼토리와 쌍을 이루고, 새로운 경쟁 (바람직하게는 인간의) 전형적인 mAb와 동일한 에피토프를 갖는 (바람직하게는 인간) C6-결합 mAb를 선택하기 위한 중쇄의 레퍼토리와 쌍을 이룬다. 대안으로, 전형적인 mAb의 변이체는 항체의 중쇄 및 경쟁을 코딩하는 cDNA의 돌연변이 유발에 의해 얻어질 수 있다.

[0131] 예를 들어 문헌 Champe 외 (1995) *J. Biol. Chem.* 270 : 1388-1394에 기술된 에피토프 맵핑은, 항체가 관심 있는 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해 수행될 수 있다. Cunningham and Wells (1989) *Science* 244 : 1081-1085에 기술된 바와 같은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발 (alanine scanning mutagenesis)" 또는 인간 C6 아미노산 잔기의 점 돌연변이 유발의 다른 형태는 또한 본 발명의 항-C6 항체에 대한 기능적 에피토프를 결정하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 돌연변이 유발 연구는 C6의 전반적인 3차원 구조에 중요하지만 항체-항원 접촉에는 직접 관여하지 않는 아미노산 잔기를 나타낼 수 있으므로 이 방법을 사용하여 결정된 기능적 에피토프를 확인하기 위해 다른 방법이 필요할 수 있다.

[0132] 특정 항체에 의해 결합된 에피토프는 또한 인간 C6의 단편을 포함하는 펩타이드에 대한 항체의 결합을 평가함으로써 결정될 수 있다. C6의 서열을 포함하는 일련의 중첩 펩타이드는 합성되고, 결합을 위해 스크리닝되거나 칩 상에 존재할 수 있다, 예를 들어, 다이렉트 ELISA, 경쟁 ELISA (펩타이드가 미량정량판(microtiter plate)의 웰에 결합된 C6에 대한 항체의 결합을 방지하는 능력에 대해 평가된 경우). 이러한 펩타이드 스크리닝 방법은 일부 비연속 기능성 에피토프, 즉 C6 폴리펩타이드 사슬의 일차 서열을 따라 인접하지 않은 아미노산 잔기를 포함하는 기능적 에피토프를 검출할 수 없다.

[0133] 본 발명의 항체에 결합된 에피토프는 또한 X선 결정 구조 결정 (예를 들어, WO2005 / 044853), 분자 모델링 및 자유롭고 관심있는 항체와 복합체로 결합될 때 C6에서의 불안정한 아마이드 수소의 H-D 교환율의 NMR 측정을 포함하는 핵자기 공명 (NMR) 분광학과 같은 구조적 방법에 의해 결정될 수 있다 (Zinn-Justin 외 (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347), Zinn-Justin 외 (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891).

[0134] X선 결정학과 관련하여, 결정화는 당업계에서 공지된 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, Giege

외 (1994) Acta Crystallogr. D50 : 339-350; McPherson (1990) Eur.J.Biochem.189:1-23), 마이크로 배치 (microbatch)를 포함하는, (예를 들어, Chayen (1997) Structure 5 : 1269-1274), 행잉-드롭 베이퍼 디퓨전 (hanging-drop vapor diffusion) (예를 들어, McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251 : 6300-6303), 시딩 (seeding) 및 투석(dialysis). 적어도 약 1 mg/mL, 바람직하게는 약 10 mg/mL 내지 약 20 mg/mL의 농도를 갖는 단백질 제제를 사용하는 것이 바람직하다. 결정화는 폴리에틸렌글리콜 1000-20,000 (PEG; 평균 분자량 약 1000 내지 약 20,000 Da 범위), 바람직하게는 약 5000 내지 약 7000 Da, 보다 바람직하게는 약 6000 Da를 함유하는 침전제 용액에서 약 $\pm 10\%$ 내지 30% (w / v)이다. 단백질 안정화제, 예를 들어, 약 0.5% 내지 약 20% 범위의 농도인 글리세롤, 를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 염화 나트륨, 염화 리튬 또는 시트르산 나트륨과 같은 적합한 염은 또한 침전제 용액에 존재할 수 있고, 바람직하게는 약 1mM 내지 약 100mM 범위의 농도일 수 있다. 침전제는 바람직하게는 약 3.0 내지 약 5.0, 바람직하게는 약 4.0의 pH로 완충된다. 침전제 용액에 유용한 특정 완충액은 다양할 수 있고 당해 분야에 잘 알려져있다 (Scopes, Protein Purification : Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). 유용한 완충제의 예는 HEPES, Tris, MES 및 아세트산을 포함 하나 이에 한정되지 않는다. 결정체는 2°C, 4°C, 8°C 및 26°C와 같은 광범위한 온도에서 성장할 수 있다.

[0135] 항체 : 항원 결정은 잘 알려진 X 선 회절 기술을 사용하여 연구할 수 있으며, 개시 내용이 전체적으로 본원에 참고로 인용되는 X-PLOR (Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc.에서 배포, 예를 들어 Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114&115, H. W. Wyckoff 외, eds., Academic Press; U.S. Patent Application Publication No. 2004/0014194) 및 BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49 : 37-60, Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi 외 (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323)와 같은 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 정의될 수 있다.

[0136] 온전한 항체를 표현하기 위한 부분 항체 서열의 사용

[0137] 특정 양태에서, 본 발명의 항-C6 항체는 서열번호 8에 나타난 중쇄 CDR3; 및 서열번호 13에 나타난 경쇄 CDR3을 포함한다. 항체는 서열번호 7에 나타난 중쇄 CDR2; 및 서열번호 12에 나타난 경쇄 CDR2를 더 포함한다. 항체는 여전히 서열번호 6에 나타난 중쇄 CDR1; 및 서열번호 11에 나타난 경쇄 CDR1을 더 포함한다. 상기 CDR을 이용하는 본 발명의 예시적인 항체는 하기를 포함한다 :

[0138] (a) 서열번호 30의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0139] (b) 서열번호 32의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0140] (c) 서열번호 34의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 35의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0141] (d) 서열번호 36의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 37의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0142] (e) 서열번호 38의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 39의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0143] (f) 서열번호 40의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 41의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체;

[0144] (g) 서열번호 42의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 43의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체; 및

[0145] (h) 서열번호 44의 중쇄 가변 영역 및 서열번호 45의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

[0146] 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역(CDRs)에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호 작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개별 항체 사이에서 더 다양하다. CDR 서열은 대부분의 항체-항원 상호 작용을 담당하기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체의 골격 서열 상에 접목된 특이적으로 발생하는 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 작제함으로써 특정 자연 발생 항체의 특성을 모방하는 재조합 항체를 발현하는 것이 가능하다 (예를 들어, Riechmann, L. 외, 1998, Nature 332 : 323-327, Jones, P. 외, 1986, Nature 321 : 522-525 and Queen, C. 외, 1989, Proc. Natl. Acad., USA 86 : 10029-10033 참조). 이러한 프레임워크 서열은 생식 계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개 DNA 데이터베이스로부터 얻을 수 있다. 이러한 생식 계열 서열은 성숙한 항체 유전자 서열과는 다를 것이다. 왜냐하면 B 세포 성숙 과정에서 V(D)J 결합에 의해 형성되는 완전히 조립된 가변 유전자를 포함하지 않기 때문이다. 생식 세포 유전자 서열은 또한 가변 영역을 가로 질러 고르게 친화적인 제2 레퍼토리 항체의 서열과 개별적으로 상이할 것이다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역의 아미노 말단 부분에서 비교적 드물다. 예를 들어, 체세포 돌연변이는 프레임워크 영역 1의 아미노 말단 부분과 프레임워크 영역 4의 카르복시-말단 부분에서 비교적 드물다. 게다가, 많은 체세포 돌연변이는 항체의 결합특성을 크게 변화시키지 않는다. 이러한

이유로 원래 항체의 결합 특성과 유사한 결합 성질을 갖는 온전한 재조합 항체를 재생성하기 위해 특정 항체의 전체 DNA 서열을 얻을 필요는 없다 (PCT / US99 / 05535 참조). 이러한 목적을 위해 일반적으로 CDR 영역에 걸친 부분 중쇄 및 경쇄 서열은 충분하다. 부분 서열은 재조합된 항체 가변 유전자에 기여하는 생식 계열의 가변 및 결합 유전자 세그먼트를 결정하는데 사용된다. 그 후, 생식 계열 서열을 사용하여 가변 영역의 결핍 부분을 채운다. 중쇄 및 경쇄 리더 서열은 단백질 성숙 중에 절단되고 최종 항체의 특성에 기여하지 않는다. 누락된 서열을 추가하기 위해, 클로닝 된 cDNA 서열을 라이 게이션(ligation) 또는 PCR 증폭에 의해 합성 올리고 뉴클레오타이드와 결합시킬 수 있다. 대안적으로, 전체 가변 영역은 짧은 중첩 올리고 뉴클레오타이드의 세트로서 합성될 수 있고, 전체 합성 가변 영역 클론을 생성하기 위한 PCR 증폭에 의해 결합될 수 있다. 이 과정은 제거 또는 포함 또는 특정 제한 효소 또는 특정 코돈의 최적화와 같은 특정한 이점을 갖는다.

[0147] 하이브리도마로부터 유래된 중쇄 및 경쇄 전사의 뉴클레오타이드 서열은 천연 서열과 동일한 아미노산 코딩 용량을 갖는 합성 V 서열을 생성하기 위한 중첩 합성 올리고 뉴클레오타이드 세트의 설계에 사용된다. 합성 중쇄 및 카파 사슬 서열은 천연 서열과 3가지 방식에서 상이할 수 있다 : 반복된 뉴클레오타이드 염기의 스트링을 중단하여 올리고 뉴클레오타이드 합성 및 PCR 증폭을 용이하게 한다; 최적의 번역 개시 부위는 Kozak의 규칙 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266 : 19867-19870)에 따라 통합된다; 그리고, HindIII 부위는 번역 개시 부위의 상류에서 조작된다.

[0148] 중쇄 및 경쇄 가변 영역 모두에 대해, 최적화된 코딩 및 상응하는 논-코딩, 가닥 서열은 상응하는 논-코딩 올리고 뉴클레오타이드의 대략 중간 지점인 30-50 뉴클레오타이드로 분해된다. 따라서, 각각의 사슬에 대해, 올리고 뉴클레오타이드는 150-400 뉴클레오타이드의 세그먼트에 걸친 중첩 이중 가닥 세트로 조립될 수 있다. 그런 다음, 풀을 150-400 뉴클레오타이드의 PCR 증폭 산물을 생산하는 주형으로 사용한다. 전형적으로, 단일 가변 영역 올리고 뉴클레오타이드 세트는 2개의 중첩 PCR 산물을 생성하기 위해 개별적으로 증폭되는 2개의 풀로 분해될 것이다. 그런 다음 이들 중첩 산물을 PCR 증폭으로 결합하여 완전한 가변 영역을 형성한다. 또한, 발현 벡터 구조물에 쉽게 증폭될 수 있는 단편을 생성하기 위해, PCR 증폭에서 중쇄 또는 경쇄 불변 영역의 중첩 단편 (κ 경쇄의 BbsI 부위 또는 감마 중쇄인 경우 AgeI 부위 포함)을 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0149] 재구성된 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 발현 벡터 구조물을 형성하기 위해 클로닝된 프로모터, 리더 서열, 번역 개시, 리더 서열, 불변 영역, 3' 비 번역, 폴리아데닐화, 및 전사 종결 순서로 조합된다. 중쇄 및 경쇄 발현 구조물은 단일 벡터로 조합되거나, 공동으로 형질감염되거나, 연속적으로 형질감염되거나 또는 숙주 세포 내로 개별적으로 형질감염될 수 있으며, 이후 융합되어 양 사슬을 발현하는 숙주 세포를 형성할 수 있다.

[0150] 발현 벡터의 제작에 사용하기 위한 플라스미드는 PCR 증폭 된 V 중쇄 및 V 카파 경쇄 cDNA 서열이 완전한 중쇄 및 경쇄 미니진(minigene)을 재구성하는데 사용될 수 있도록 구성되었다. 이 플라스미드는 완전히 인간 IgG1 κ 또는 IgG4 κ 항체를 발현하는 데 사용할 수 있다. 본 발명의 완전한 인간 및 키메라 항체는 또한 IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM 및 IgD 항체를 포함한다. 유사한 플라스미드는 다른 중쇄 이소타입의 발현을 위해 또는 램다 경쇄를 포함하는 항체의 발현을 위해 제조될 수 있다.

[0151] 따라서, 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명의 항-C6 항체의 구조적 특징은 본 발명의 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 보유하는 구조적으로 관련된 항 -C6 항체를 생성하는데 사용되며, 예를 들어,

[0152] (a) 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 또는 7F02와 같은 본 발명의 항-C6 항체와 동일한 에피토프에 결합함;

[0153] (b) 0.5 μ g/ml 이하의 용혈 분석에서 IC₅₀을 가짐;

[0154] (c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 K_D가 1 $\times$ 10⁻⁸ M 이하임 (또는 대안적으로, 5 x 10⁻⁸ M 이하, 1 x 10⁻⁹ M 이하, 5 x 10⁻⁹ M 이하, 또는 5 x 10⁻¹⁰ M 이하임);

[0155] (d) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 항체-C6 결합 반감기가 40시간 이상임; 또는

[0156] (e) 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 C6와 교차반응함.

[0157] 일 양태에서, 본 발명의 항체의 하나 이상의 CDR 영역은 추가의 재조합적으로 조작된 본 발명의 항-C6 항체를 생성하기 위해 공지된 프레임워크 영역 및 CDR과 재조합적으로 결합될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역은 동일하거나 상이한 항체 서열로부터 유도될 수 있다. 항체 서열은 자연 발생 항체의 서열이거나 여러 항체의 공통 서열일 수 있다. Kettleborough 외, *Protein Engineering* 4 : 773 (1991); Kolbinger 외,

Protein Engineering 6 : 971 (1993) 및 Carter 외, WO 92/22653 참조.

- [0158] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-C6 항체의 제조 방법을 제공한다: 항체를 제조하는 단계로서, (1) 중쇄 CDR 중 적어도 서열번호 6, 7 및 8에 나타난 CDR의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 프레임워크 영역 및 중쇄 CDR; 및 (2) 경쇄 CDR 중 하나 이상은 서열번호 11, 12 및 13에 나타난 CDR의 아미노산 서열로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 프레임 워크 영역 및 경쇄 CDR; 을 포함하고, 여기서 항체는 C6에 결합하는 능력을 보유한다. C6에 결합하는 항체의 능력은 실시예에 기재된 것과 같은 표준 결합 및/또는 기능적 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 상기 (a) 내지 (e)로 나열된 기능적 특성 중 1가지 이상, 또는 2가지 이상 또는 3가지 이상 또는 4가지 또는 5가지 모두를 나타낸다. 본원에 개시된 이러한 항체의 예는 (실시예 6에 기술된 바와 같은) 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02 항체를 포함한다.
- [0159] 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화성에서 특히 중요한 역할을 한다는 것이 당업계에 공지되어있다 (Hall 외, J. Immunol., 149:1605-1612 (1992); Polymenis 외, J. Immunol., 152:5318-5329 (1994); Jahn 외, Immunobiol., 193:400-419 (1995); Klimka 외, Brit. J. Cancer, 83:252-260 (2000); Beiboer 외, J. Mol. Biol., 296:833-849 (2000); Rader 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998); Barbas 외, J. Am. Chem. Soc., 116:2161-2162 (1994); Ditzel 외, J. Immunol., 157:739-749 (1996) 참조). 따라서, 상기 기재된 바와 같이 제조된 본 발명의 제조항체는 바람직하게는 각각 서열번호 8 및 13에 기재된 바와 같이 7E5 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함한다. 본원에 개시된 그러한 항체의 예는 (실시예 6에 기술된 바와 같은) 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02 항체를 포함한다.
- [0160] 또한, 또 다른 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 C6에 결합하는 항-C6 항체를 더 제공한다: (1) 중쇄 프레임 워크 영역, 중쇄 CDR1 영역, 중쇄 CDR2 영역 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3 영역, 및 (2) 경쇄 프레임 워크 영역, 경쇄 CDR1 영역, 경쇄 CDR2 영역 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3 영역. 항체는 서열번호 7 및 12에 각각 기재된 7E5 항체의 중쇄 CDR2 및/또는 경쇄 CDR2를 추가로 포함할 수 있다. 항체는 서열번호 6 및 11에 각각 기재된 7E5 항체의 중쇄 CDR1 및/또는 경쇄 CDR1을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 그러한 항체의 예는 (실시예 6에 기술된 바와 같은) 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02 항체를 포함한다.
- [0161] 변형된 서열을 갖는 항체의 생성
- [0162] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항-C6 항체의 가변 영역 서열 또는 그의 일부는 결합을 보유하는 구조적으로 관련된 항-C6 항체 (즉, 비변형 항체와 동일한 에피토프)를 생성하도록 변형되고, 따라서, 기능적으로 동일하다. 항원 결합을 제거하지 않고 변경될 수 있는 잔기를 확인하는 방법은 당업계에 널리 알려져있다 (예를 들어, Marks 외 (Biotechnology (1992) 10 (7) : 779-83 (경쇄 가변을 서플링함으로써 모노클로날 항체의 다양화, 그리고 고정된 CDR3 서열 변화를 갖는 중쇄 가변 영역), Jespers 외 (1994) Biotechnology 12 (9) : 899-903 (파지 디스플레이 레퍼토리로부터 항원의 단일 에피토프의 인간 항체의 선택), Sharon 외(1986) PNAS USA 83 (8) : 2628-31 (항체의 가변-다양성 세그먼트 접합부에서의 불변 아미노산 잔기의 부위 특이적 돌연변이 유발); Casson 외 (1995) J. Immunol. 155 (12) : 5647-54 (항체 중쇄 가변 영역의 무작위 돌연변이 유발에 기인한 진화의 손실 및 특이성의 변화)).
- [0163] 따라서, 본 발명의 한 측면에서, 상기 기술된 항체의 CDR1, 2 및/또는 3 영역은 본원에 기술된 서열번호 6-7 및 11-13(7E5 CDRs)에 나타난 정확한 아미노산 서열(들)을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명의 다른 측면에서, 항체는 7E5의 정확한 CDR 서열로부터의 유도체를 포함하지만 여전히 효과적으로 C6에 결합하는 능력을 보유한다. 이러한 서열 변형은 하나 이상의 아미노산 첨가, 결실 또는 치환, 예를 들어 상기 기재된 보존적 서열 변형을 포함할 수 있다. 서열 변형은 또한 7E5 항체의 특정 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열에 대해 전술한 공통 서열에 기초할 수 있다.
- [0164] 따라서, 또 다른 양태에서, 조작된 항체는 하나 이상의 CDR, 예를 들어, 90%, 95%, 98% 또는 99.5%로 동일한 7E5 항체의 하나 이상의 CDR (서열번호 6-8 및 11-13에 나타남)로 구성될 수 있다. 상기 서열들 중 하나 이상에 대해 90-95%, 95-98%, 또는 98-100% 동일한 동일성 CDR과 같은 상기 언급된 값의 중간 범위 또한 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0165] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는, 인간 C6에 결합하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0166] (a) 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어

도 90%(또는 90 - 95%, 95% - 98%, 98% - 100%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0167] (b) 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 적어도 90%(또는 90 - 95%, 95% - 98%, 98% - 100%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

[0168] 또 다른 양태에서, 상기 분리된 항체는

[0169] (a) 상기 중쇄 가변 영역이 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및

[0170] (b) 상기 경쇄 가변 영역이 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체이다.

[0171] 실시예 7은 이들 중쇄 및 경쇄 가변 영역 각각이 모든 가능한 81개의 조합에서 서로 쌍을 이루고, C6 활성을 지니는 모든 81개 조합의 기능 활성이 입증된 "믹스 앤드 매치" 실험을 상세하게 기술한다.

[0172] 또한, 또 다른 양태에서, 하나 이상의 CDR의 잔기는 이상적인 결합 상수가 달성되도록, 보다 바람직한 결합의 온-레이트, 보다 바람직한 결합의 오프-레이트, 또는 둘 모두를 달성하기 위해 결합을 변형하도록 변경될 수 있다. 이 전략을 사용하여, 예를 들어 10^{10}M^{-1} 또는 그 이상의 매우 높은 결합 친화성을 갖는 항체가 획득될 수 있다. 당업계에 널리 공지된 친화력 성숙 기술 및 본원에 기술된 기술을 사용하여 CDR 영역(들)을 변경한 후 결합의 원하는 변화에 대한 결과적인 결합 분자의 스크리닝에 사용될 수 있다. 따라서, CDR(들)이 변경됨에 따라, 결합 친화력 및 면역원성(immunogenicity)의 변화가 모니터링되고, 최상의 화합된 결합 및 낮은 면역원성에 대해 최적화된 항체가 얻어질 수 있다.

[0173] 따라서, VH 및/또는 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 가변 영역 변형을 위해, 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 PCR 매개 돌연변이 유발은 돌연변이(들) 및 항체 결합에 대한 효과, 또는 다른 관심 있는 기능적 특성을 도입하기 위해 수행될 수 있고, 본원에 기술되고 실시예에 제공된 바와 같이 in vivo 또는 in vitro 분석법으로 평가될 수 있다. 바람직하게는 보존적 변형(본원에서 논의된 바와 같이)이 도입된다. 돌연변이는 아미노산 치환, 첨가 또는 결실일 수 있으나 바람직하게는 치환이다. 게다가, 전형적으로 CDR 영역 내의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 잔기는 변경되지 않는다.

[0174] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 분리된 항-C6 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다:

[0175] (a) 서열번호 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1 영역 또는 서열번호 6과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열;

[0176] (b) 서열번호 7에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2 영역 또는 서열번호 7과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열;

[0177] (c) 서열번호 8에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3 영역 또는 서열번호 8과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열;

[0178] (d) 서열번호 11에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1 영역 또는 서열번호 11과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열;

[0179] (e) 서열번호 12에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2 영역 또는 서열번호 12과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열;

[0180] (f) 서열번호 12에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3 영역 또는 서열번호 12과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열.

[0181] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 분리된 항-C6 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다:

[0182] (a) 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 및 46과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열; 및

- [0183] (b) 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 서열번호 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 및 47과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열.
- [0184] CDR 내에서의 변형에 더하여 또는 그 대신에, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 FR1, FR2, FR3 및 FR4 중 하나 이상의 프레임워크 영역 내에서 변형이 이루어질 수 있다. 이러한 변형은 항체의 결합 친화성을 제거하지 못하기 때문이다. 예를 들어, 본 발명의 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역의 프레임워크 영역 내의 하나 이상의 비-생식 계열 아미노산 잔기는 생식 계열 아미노산 잔기, 즉, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 대한 인간 생식 계열 서열에 상응하는 아미노산 잔기로서, 상기 항체와 유의한 서열 동일성을 갖는 잔기로 치환된다. 예를 들어, 항체 사슬은 그것과 상당한 서열 동일성을 공유하는 생식 세포 항체 사슬에 정렬될 수 있고, 항체 프레임워크 서열과 생식 세포 사슬 프레임워크 간에 일치하지 않는 아미노산 잔기는 생식 세포 서열로부터의 상응하는 잔기로 치환될 수 있다. 항체 가변 프레임워크 영역과 동등한 인간 생식 세포 서열 가변 프레임워크 영역 사이에 아미노산이 다른 경우, 항체 프레임워크 아미노산은 아미노산이 다음의 카테고리 중 하나에 해당한다고 합리적으로 예상되는 경우, 대개 동등한 인간 생식 계열 아미노산으로 대체되어야 한다:
- [0185] (1) 항원에 직접 비공유결합 하는 아미노산 잔기,
- [0186] (2) CDR 영역에 인접한 아미노산 잔기,
- [0187] (3) CDR 영역과 상호 작용하는 아미노산 잔기(예를 들어, 컴퓨터 모델링에 의해 결정된 CDR 영역의 약 3-6Å 내에 있음), 또는
- [0188] (4) VL-VH 계면에 참여하는 아미노산 잔기.
- [0189] "항원에 직접 비공유 결합"하는 잔기는 확립된 화학적 힘, 예를 들어 수소 결합, 반데르발스 힘, 소수성 상호 작용 등에 의해 항원상의 아미노산과 직접 상호 작용할 좋은 확률을 갖는 프레임워크 부위의 아미노산을 포함한다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명의 항체의 프레임워크 부위의 아미노산 잔기는 항원에 직접 비공유 결합하는 상응하는 생식 계열 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0190] "CDR 영역에 인접한" 잔기는 항체의 일차 서열 중 하나 이상의 CDR에 바로 인접한 서열, 예를 들어 카바트(Kabat)에 의해 정의된 바와 같은 CDR에 바로 인접한 위치에 아미노산 잔기를 포함하거나, Chothia에 의해 정의된 CDR (Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 196:901 (1987)을 포함한다(Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 196 : 901 (1987) 참조). 따라서, 일 양태에서, 본 발명 항체의 프레임워크 영역 내의 아미노산 잔기는 CDR 영역에 인접한 상응하는 생식 계열 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0191] "그렇지 않으면 CDR 영역과 상호 작용하는" 잔기는 2차 구조 분석에 의해 CDR 영역에 영향을 미치기에 충분한 공간적 방향으로 결정되는 잔기를 포함한다. 이러한 아미노산은 일반적으로 CDR 내의 일부 원자의 약 3 옹스트롬 단위 (Å) 내에 결사슬 원자를 가지며, 상기 열거된 바와 같은 확립된 화학적 힘에 따라 CDR 원자와 상호 작용할 수 있는 원자를 함유해야 한다. 따라서, 일 양태에서, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역 내의 아미노산 잔기는 그렇지 않으면 CDR 영역과 상호 작용하는 상응하는 생식 계열 아미노산 잔기로 치환된다.
- [0192] 프레임워크 내의 몇몇 위치의 아미노산은 많은 항체에서 CDR 확인 (예를 들어, CDR과 상호 작용할 수 있음)을 결정하는 데 중요하다고 알려져 있다 (Chothia and Lesk, supra, Chothia 외, supra and Tramontano 외, J. Mol. Biol. 215 : 175 (1990), 이들 모두는 본원에 참고로 인용됨). 이 저자들은 여러 가지 알려진 항체의 구조를 분석하여 CDR 구조에 중요한 보존된 프레임워크 잔기를 확인했다. 분석된 항체는 CDR의 형태에 기초하여 제한된 수의 구조적 또는 "표준" 분류로 분류되었다. 표준 클래스의 구성원 내의 보존된 프레임워크 잔기를 "표준" 잔기라고 한다. 표준 잔기는 경쇄의 잔기 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 및 95 및 중쇄의 잔기 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 및 94를 포함한다. 추가 잔기 (예를 들어, CDR 구조-결정 잔기)는 Martin and Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263 : 800의 방법론에 따라 동정될 수 있다. 특히, 경쇄의 2, 48, 64 및 71 위치의 아미노산 및 중쇄의 26-30, 71 및 94 (카바트(Kabat)에 따른 넘버링)의 아미노산은 많은 항체에서 CDR과 상호 작용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 경쇄의 35 위치 및 중쇄의 93 및 103 위치의 아미노산 또한 CDR과 상호 작용할 가능성이 있다. CDR의 형태를 초래할 수 있는 추가 잔기는 Foote and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224 : 487의 방법론에 따라 동정될 수 있다. 이러한 잔기는 "버니어(vernier)" 잔기로 지칭되고, CDR의 밀접하게 근본적인(즉, "플랫폼"을 형성하는) 프레임워크 영역의 잔기이다.

- [0193] "VL-VH 계면에 참여하는" 잔기 또는 "패킹 잔기"는 예를 들어, Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) 또는 Chothia 외, supra에 의해 정의 된대로, VL과 VH 사이의 계면에서의 잔기를 포함한다.
- [0194] 때로는 특정 아미노산이 위에서 언급한 범주 중 하나 이상에 해당하는지에 대한 모호성이 있다. 그러한 경우, 대안적인 변종의 항체가 생성되고, 그 중 하나는 특정 치환을 가지고, 다른 하나는 그렇지 않다. 이렇게 생산된 다른 변종의 항체는 원하는 활성에 대해 본원에 기술된 임의의 검정법 및 선택된 바람직한 항체에서 시험할 수 있다.
- [0195] 프레임워크 영역 내에서의 치환을 위한 추가 후보 물질은 해당 위치의 항체가 비정상적이거나 희귀한 아미노산이다. 이들 아미노산은 인간 생식 계열 서열의 동등한 위치 또는 보다 전형적인 항체의 동등한 위치로부터의 아미노산으로 치환 될 수 있다. 예를 들어, 항체의 프레임워크 부위의 아미노산이 그 위치에서 희귀하고 생식 계열 서열 내의 상응하는 아미노산이 면역글로불린 서열에서 그 위치에 대해 공통적일 때 치환이 바람직할 수 있다; 또는 항체 내의 아미노산이 그 위치에서 희귀하고 생식 계열 서열 내의 상응하는 아미노산이 다른 서열과 관련하여 드문 경우에도 그러하다. 비정상적인 아미노산을 항체에 전형적으로 일어나는 생식 세포 서열로부터의 아미노산으로 대체함으로써, 항체는 덜 면역원성으로 만들어질 수 있다는 것이 고려된다.
- [0196] 본 명세서에서 사용된 용어 "드문 (rare)"은 약 20% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만, 보다 바람직하게는 약 5% 미만, 더욱 바람직하게는 약 3% 미만, 보다 바람직하게는 서열의 대표 샘플에서 약 2% 미만, 훨씬 더 바람직하게는 약 1% 미만으로 그 위치에서 발생하는 아미노산을 나타내며, 본 명세서에서 사용된 "공통적인"이란 용어는 대표 샘플에서 서열의 약 25% 초과, 보통 약 50% 초과로 발생하는 아미노산을 나타낸다. 예를 들어, 모든 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열은 서로 특히 상동성이고 특정 임계 위치에서 동일한 아미노산을 갖는 서열과 함께 각각 "하위군(subgroup)"으로 분류된다 (Kabat 외, supra). 항체 서열이 "드물"거나 "공통적"인지 여부를 결정할 때, 항체 서열과 동일한 하위 그룹의 서열만을 고려하는 것이 종종 바람직하다.
- [0197] 일반적으로, 항체의 프레임워크 영역은 일반적으로 실질적으로 동일하고, 보다 일반적으로 그들이 유래된 인간 생식 계열 서열의 프레임워크 영역과 동일하다. 물론, 프레임워크 영역의 많은 아미노산은 항체의 특이성 또는 친화성에 직접적으로 기여하지 않는다. 따라서, 생성된 면역글로불린의 특이성 또는 친화성의 상당한 변화없이 프레임워크 잔기의 많은 개별적인 보존적 치환이 허용될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 항체의 가변 프레임워크 영역은 인간 생식 계열 가변 프레임 워크 영역 서열 또는 이러한 서열의 일치에서 적어도 85%의 서열 동일성을 공유한다. 또 다른 양태에서, 항체의 가변 프레임워크 영역은 인간 생식 계열 가변 프레임워크 영역 서열 또는 그러한 서열의 일치에서 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다.
- [0198] Carr 외 US2003/0153043에 기술된 바와 같이, 항체의 면역원성을 감소시키거나 또는 항체의 면역원성을 감소시키거나, 항체의 면역원성을 감소시키거나 또는 거기에 존재하는 T세포 에피토프를 감소시키거나 제거하기 위한 프레임워크 변형이 또한 이루어질 수 있다.
- [0199] 본 발명의 조작된 항체는 예를 들어, 항체의 성질을 향상시키기 위해, VH 및/또는 VL 내의 프레임워크 잔기에 변형이 이루어진 것들을 포함한다. 전형적으로 그러한 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이루어진다. 예를 들어, 하나의 접근법은 하나 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식 계열에 "복귀돌연변이(backmutate)" 시키는 것이다. 보다 구체적으로, 체세포 돌연변이를 겪은 항체는 항체가 유래된 생식 계열 서열과는 다른 골격 잔기를 함유할 수 있다. 이러한 잔기는 항체가 유래된 생식 계열 서열과 항체 프레임워크 서열을 비교함으로써 확인될 수 있다.
- [0200] 프레임워크 변형의 또 다른 유형은 T 세포 에피토프를 제거하여 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해 프레임워크 영역 내 또는 심지어 하나 이상의 CDR 영역 내에서 하나 이상의 잔기를 돌연변이 시키는것을 포함한다. 이 접근법은 또한 "역면역화(deimmunization)"라 불리우며, 미국 특허 공개 공보 제 20030153043호에 보다 상세히 기술되어있다.
- [0201] 단순히 C6에 결합하는 것 이외에, 항체는 본 발명 항체의 다른 기능적인 특성의 보유를 위해 선택될 수 있고, 예를 들어:
- [0202] (a) 7E5, 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 또는 7F02와 같은 본 발명의 항-C6 항체와 동일한 에피토프에 결합함;
- [0203] (b) 0.5 μ g/ml 이하의 용혈 분석에서 IC₅₀을 가짐;

- [0204] (c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 K_D 가 5×10^{-10} M 이하임;
- [0205] (d) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 항체-C6 결합 반감기가 40시간 이상임; 또는
- [0206] (e) 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이의 C6와 교차반응함.
- [0207] 추가적인 항체 변형
- [0208] 본원의 항체는 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 중 하나 이상에 하나 이상의 글리코실화 부위를 함유할 수 있다. 이러한 글리코실화 부위는 항원 결합의 증가된 면역원성 또는 변경된 항원 결합으로 인한 항체의 pK의 변화를 초래할 수 있다 (Marshall 외 (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick 외 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glyco-biology* 12:43R-56R; Parekh 외 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura 외. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). 클리코실화는 N-X-S/T 서열을 함유하는 모티프에서 발생하는 것으로 알려져 있다. 어떤 경우에는, 가변 영역 클리코실화를 포함하지 않는 항-C6 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 가변 영역에서 글리코실화 모티프를 함유하지 않는 항체를 선택하거나 또는 글리코실화 영역 내의 잔기를 변형시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0209] 예를 들어, 일 양태에서, 항체의 글리코실화는 변형되고, 예를 들어 가변 영역은 가변 영역에 상주하는 하나 이상의 글리코실화 부위를 제거하도록 변형된다. 특히, 당해 항체의 서열에서 글리코실화가 일어나기 쉬운 부위를 제거하는 것이 바람직하다. 이것은 부모 가변 영역 (여기서 X는 임의의 아미노산 잔기임)에서 발생하는 하나 이상의 NX-(S/T) 서열의 발생을 변화시킴으로써, 특히 N 잔기 및/또는 S 또는 T 잔기, 달성될 수 있다. 일 양태에서, T95는 K95로 돌연변이된다. 또 다른 양태에서, N47은 R47로 돌연변이된다.
- [0210] 예를 들어, 비글리코실화(aglycoslated)된 항체가 제조될 수 있다 (즉, 글리코실화가 결여된). 글리코실화는 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키기 위해 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 항체 서열 내 하나 이상의 글리코실화 부위를 변경함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위를 제거함으로써 그 부위에서 글리코실화를 제거하는 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 이러한 비글라이코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 예로, 미국 특허 제 5,714,350 호 및 제 6,350,861 호가 참조된다.
- [0211] 부가적으로 또는 대안적으로, 항체는 감소된 양의 푸코실(fucosyl) 잔기를 갖는 하이포푸코실화(hypofucosylated)된 항체 또는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 갖는 항체와 같이 변형된 유형의 글리코실화를 가질 수 있다. 이러한 변형된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들어 변형된 글리코실화 기작을 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변형된 글리코실화 기작을 갖는 세포는 당해 기술 분야에 기술되어 있으며, 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜 변형된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, Ms704, Ms705, Ms709 세포주에는 푸코실트랜스퍼레이스(fucosyltransferase) 유전자인 FUT8 (α (1,6) -fucosyltransferase) 이 없기 때문에 Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현되는 항체는 탄수화물에는 푸코오스(fucose)가 없다. Ms704, Ms705 및 Ms709 FUT8 -/- 세포주는 두 개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포에서 FUT8 유전자의 표적 파괴에 의해 생성되었다(미국 특허 공개 번호 20040110704 및 Yamane-Ohnuki 외 (2004) *Biotechnol Bioeng* 87 : 614-22 참조). 다른 예로서, 유럽 특허 제 1,176,195 호는 α -1,6 결합 관련 효소를 감소시키거나 제거함으로써 하이포푸코실화를 나타내는 세포주에서 항체가 발현되도록, 푸코실트랜스퍼레이스를 코딩하는 기능적으로 파괴된 FUT8 유전자를 갖는 세포주를 기술한다. 유럽 특허 제 1,176,195 호는 또한 항체의 Fc 영역에 결합하거나 N-아세틸 글루코사민에 푸코오스를 첨가하기 위한 낮은 효소 활성을 갖는 세포주 또는 낮은 효소 활성을 갖는 세포주, 예를 들어 래트 골수종 세포주 YB2 / 0 (ATCC CRL 1662)를 기술한다. PCT 공개 공보 WO 03/035835는 푸코오스를 Asn-결합 탄수화물에 부착하는 능력이 감소되고 또한 그 숙주 세포에서 발현된 항체의 하이포푸코실화를 초래하는 변이 CHO 세포주, Luc13 세포를 기술한다(Shields 외 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). 변형된 글라이코실화 프로파일을 갖는 항체는 또한 PCT 공개 WO 06/089231에 기술된 바와 같이 달걀에서 생산될 수 있다. 대안적으로, 변형된 글리코실화 프로파일을 갖는 항체를 람나(Lemna)와 같은 식물 세포에서 생산할 수 있다. 식물 시스템에서의 항체 생산 방법은 2006년 8월 11일자로 출원된 Alston & Bird LLP attorney docket No. 040989/314911에 대응하는 미국 특허 출원에 개시되어있다. PCT 공보 WO 99/54342는 조작된 세포주에서 발현된 항체가 항체의 ADCC 활성을 증가시키는, 증가된 이등분 GlcNac 구조를 나타내도록 당단백질-변형 글리코실 전달 효소 (예를 들어, β (1,4)-N-아세틸글루코사민일트랜스퍼라아제 (acetylglucosaminyltransferase) III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기술하고 있다(Umaña 외

(1999) Nat. Biotech. 17:176-180 참조). 또는, 항체의 푸코오스 잔기는 푸코시다아제 효소를 사용하여 절단될 수 있다; 예를 들어, 푸코시다아제 α -L- 푸코시다아제는 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다 (Tarentino 외 (1975) Biochem., 14 : 5516-23).

[0212] 본 발명의 항체는 하나 이상의 글리코실화 부위를 제거하고 및/또는 항체의 물리적 안정성을 향상시키기 위해 가변 영역에서 변경될 수 있다. 예를 들어, 일 양태에서, 가변 영역의 228 위치의 세린을 프롤린 잔기 (즉, 항체가 S228P 돌연변이를 포함하는 가변 영역을 가짐)로 치환함으로써 항체의 물리적 안정성이 개선된다. S228P 변형은 사슬 속 이황화 결합의 형성에 대한 항체 구조를 상당히 안정화시킨다. 일 양태에서, 본 발명의 전장 항체는 S228P 변형을 갖는 IgG4 이소 타입 (IgG4 S228P)이다.

[0213] 또 다른 양태에서, 가변 영역은 가변 영역에 상주하는 하나 이상의 글리코실화 부위를 제거하도록 변경된다. 특히, 당해 항체의 서열에서 글리코실화가 일어나기 쉬운 부위를 제거하는 것이 바람직하다. 전술한 바와 같이, 이는 부모 가변 영역 (여기서 X는 임의의 아미노산 잔기임)에서 발생하는 하나 이상의 NX-(S/T) 서열 특히 N 잔기 및/또는 S 또는 T 잔기의 발생을 변경함으로써 달성될 수 있다. 한 양태에서, T95는 K95로 돌연변이된다. 또 다른 양태에서, N47은 R47로 돌연변이된다.

[0214] 프레임워크 또는 CDR 영역 내에서 이루어진 변형에 추가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 항체는 Fc 영역 내에 변형을 포함하도록, 전형적으로 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예를 들어 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포의 세포 독성을 포함한다. 항체는 또한 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경하기 위해 화학적으로 변형될 수 있다 (예를 들어, 하나 이상의 화학적 모이어티(moieties)가 항체에 부착될 수 있음) 또는 그의 글리코실화를 변경하도록 변형될 수 있다. 이들의 실시예 각각은 이하에서 더 상세히 설명된다. Fc 영역의 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat)의 EU 색인의 그것이다.

[0215] 특정 양태에서, 본 발명은 모든 이펙터 기능은 아니지만 일부를 보유하는 항체 변이체로서, in vivo 항체의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예 : 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 항체 변이체를 고려하고, 이는 용도에 바람직한 후보가 된다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 in vitro 및 / 또는 in vivo 세포 독성 분석을 수행할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 분석은 항체가 FcR 결합을 갖지 않으므로 (따라서 아마도 ADCC 활성이 결핍 됨), FcRn 결합능을 유지하도록 수행될 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하고, 단핵세포는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포에 대한 FcR 발현은 Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492의 464 페이지 표 3에 요약되어있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 in vitro 분석의 비-제한적인 예는 미국 특허 제 5,002,303 호에 기재되어있다. 미국 특허 제 5,500,362호 (예를 들어, Hellstrom, I. 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063 and Hellstrom, I. 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); 미국 특허 제 5,821,337호 (Bruggemann, M. 외, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361 참조). 대안적으로, 비-방사성 분석 방법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 유동 세포 계측법에 대한 ACT1.TM. 비-방사성 세포 독성 분석 (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; and CytoTox 96.RTM. 비-방사성 세포 독성 분석 (Promega, Madison, Wis.)). 그러한 분석을 위한 유용한 이펙터 세포는 말초혈액단핵구(PBMC) 및 자연 살해 세포(NK)를 포함한다. 선택적으로, 또는 부가적으로, 관심 있는 분자의 ADCC 활성은 in vivo, 예를 들어, Clynes, R. 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다. C1q 결합 분석은 또한 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결핍되었는지를 확인하기 위해 수행될 수 있다. WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석이 수행될 수 있다 (예를 들어, ano-Santoro, H. 외, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, MS 외, Blood 101 (2003) 1045-1052; 및 Cragg, M. S and MJ Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743를 참조). FcRn 결합 및 생체 내 클리어런스/반감기 결정은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행될 수 있다 (예를 들어, Petkova, S.B. 외, Int.Immunol.18 (2006) 1759-1769 참조).

[0216] 특정 양태에서, 항체는 항체의 물리적 안정성을 향상시키기 위해 돌연변이 된 가변 영역을 포함한다. 일 양태에서, 항체는 중쇄 불변 영역의 경첩 영역에서 위치 228 (S228P; EU 인덱스)에 상응하는 위치에서 세린에서 프롤린으로의 돌연변이를 포함하는 IgG4 이소 타입 항체이다. 이 돌연변이는 경첩 영역에서 중간 사슬(inter-heavy chain) 이황화물 교잡종의 이질성(heterogeneity)을 없애는 것으로 보고되었다 (Angal 외, supra; 241 번 위치는 카바트 넘버링 시스템을 기반으로 함). 예를 들어, 다양한 실시 양태에서, 본 발명의 항 -C6 항체는 인간 IgG4 불변 영역에 연결된 본원에 기재된 항체 중 임의의 것의 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 이 영역에서 Angal 외, supra에 기술된 바와 같이 241 위치에 상응하는 세린은 프롤린으로 돌연변이되었다. 따라서, 인간 IgG4 불변 영역에 연결된 중쇄 가변 영역의 경우, 이 돌연변이는 EU 지표에 의한 S228P 돌연변이에 해당한다.

다.

- [0217] 또 다른 양태에서, CH1의 경첩 영역은 경첩 영역 내의 시스테인 잔기의 수가, 예를 들어 증가되거나 감소되도록 변형된다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 5,677,425 호에 추가로 기술되어있다. CH1의 경첩 부위의 시스테인 잔기의 수는 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 조립을 용이하게 하거나 항체의 안정성을 증가 또는 감소 시키도록 변경된다.
- [0218] 또 다른 양태에서, 항체의 Fc 힌지 영역이 돌연변이 되어 항체의 생물학적 반감기가 감소된다. 보다 구체적으로, 하나 이상의 아미노산 돌연변이가 본래의 Fc-경첩 도메인 SpA 결합에 비해 포도상구균 단백질 A (SpA) 결합이 손상시키는 Fc-경첩 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 영역에 도입된다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 6,165,745 호에보다 상세히 기술되어있다.
- [0219] 또 다른 양태에서, 항체는 그의 생물학적 반감기를 증가시키도록 변형된다. 다양한 접근법이 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,277,375 호에 기재된 바와 같은 T252L, T254S, T256F와 같은 하나 이상의 다음 돌연변이가 도입될 수 있다. 대안적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해, 항체는 CH1 또는 CL 영역 내에서, 미국 특허 제 5,869,046 호 및 제 6,121,022 호에 기술 된 바와 같이, IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 두 개의 루프로부터 취해진 셀비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 함유하도록 변경될 수 있다. 또 다른 접근법에서, 항체는 두 개의 돌연변이, 하나는 위치 434의 세린에서, 두 번째 돌연변이는 311 위치의 이소류신, 311 위치의 발린, 436 위치의 이소류신 및 436 위치의 발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 돌연변이를 도입함으로써 그의 생물학적 반감기를 증가시키도록 변형된다. 이러한 접근법은 미국 특허 공보 제 2012/6128663 호에 기술되어있다.
- [0220] 또 다른 양태에서, Fc 영역은 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 항체의 이펙터 기능을 변경시킴으로써 변경된다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산은 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있어 항체가 이펙터 리간드에 대해 변경된 친화성을 가지지만, 모 항체의 항원-결합 능력을 보유한다. 친화성이 변경되는 이펙터 리간드는 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분 일 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 5,624,821 호 및 제 5,648,260 호에 보다 상세히 기술되어있다.
- [0221] 또 다른 실시 양태에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산은 항체가 C1q 결합을 변경시키고 및/또는 보체 의존성 세포 독성 (CDC)을 감소시키거나 파괴시키도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 제 6,194,551 호에 보다 상세히 기술되어있다.
- [0222] 또 다른 양태에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 변경되어 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변화시킨다. 이 접근법은 PCT 공보 WO 94/29351에 추가로 기재되어있다.
- [0223] 또 다른 양태에서, Fc 영역은 항체 의존성 세포의 세포 독성 (ADCC)을 조절하고 및/또는 하기에서 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화성을 증가시키는 항체의 능력을 증가시키도록 변형된다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437438 또는 439. 이러한 접근법은 PCT 공보 WO 00/42072에 추가로 기재되어있다. 또한, Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위가 맵핑되고 개선된 결합을 갖는 변이체가 기술되었다 (Shields 외 (2001) J.Biol.Chem.276 : 6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339의 특정 돌연변이는 Fc γ RIII에 대한 결합을 개선시키는 것으로 나타났다. 또한, 하기의 조합 돌연변이체는 Fc γ RIII에 대한 결합을 개선시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.
- [0224] 또 다른 양태에서, Fc 영역은 항체 의존성 세포의 세포 독성 (ADCC)을 매개하는 항체의 능력을 감소시키고 및/또는 Pro329 위치에 아미노산 치환을 도입함으로써 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화성을 감소시키고, 바람직하게는 S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 및 P331S로부터 선택되는 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함한다. 이 접근법은 미국 특허 공개 공보 제2012/0251531호에 기술되어 있다.
- [0225] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 하나 이상의 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 (미국 특허 제 6,737,056 호)의 치환체를 포함한다. 이러한 Fc 돌연변이체는 2개 이상의 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체, 알라닌으로 잔기 265 및 297을 치환하는 이른바 "DANA" Fc 돌연변이

이체를 (미국 특허 번호 7,332,581)를 포함한다.

- [0226] FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 특정 항체 변이체가 기술되어있다. (예를 들어, 미국 특허 제 6,737,056 호, WO 2004/056312 호 및 Shields, R.L. 외, J.Biol.Chem.276 (2001) 6591-6604 참조).
- [0227] 특정 양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역, 예를 들어 Fc 영역의 298, 333 및/또는 334 위치에서의 치환 (잔기의 EU 넘버링)을 포함한다.
- [0228] 일부 양태에서, C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포 독성 (CDC)을 초래하는 Fc 영역에서 변경(즉, 개선되거나 감소된)이 이루어지고, 예를 들어, 미국 특허 제 6,194,551 호, WO 99/51642 및 Idusogie, E. E. 외, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184에 기술된 바와 같다.
- [0229] 임신부 IgG를 태아에게 전달하는 원인이 되는 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 반감기 및 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer, RL 외, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, Kim, JK 외, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)은 US 2005/0014934에 기술되어있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환체를 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 하나 이상의 Fc 영역 잔기 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환 (미국 특허 제 7,371,826 호)을 포함한다. Duncan, A. R. 및 Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; 미국 특허. 제 5,648,260 호; 미국 특허. 미국 특허 제 5,624,821 호; 및 Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 WO 94/29351 참조.
- [0230] 또한, 항체는 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시키기 위해 폐길화(pegylated) 될 수 있다. 항체를 폐길화하기 위해, 항체 또는 그의 단편은 전형적으로 하나 이상의 PEG 그룹이 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건하에 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예를 들어 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응한다. 바람직하게는, 폐길화는 아실화 반응 또는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 모노 (C1-C10) 알콕시-또는 아릴 옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드와 같은 다른 단백질을 유도체화하는데 사용된 임의의 PEG 형태를 포함한다. 특정 양태에서, 폐길화될 항체는 비글라이코실화된 항체이다. 백질을 폐길화하는 방법은 당업계에서 공지되어 있으며, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, EP 0 154 316 및 EP 0 401 384를 참조한다.
- [0231] C6에 대한 모노클로날 항체의 특성 설명
- [0232] 본 발명의 모노클로날 항체는 다양한 공지된 기술을 사용하여 C6에의 결합 및/또는 C6의 기능적 저해를 특징으로 할 수 있다. 전형적으로, 항원의 표적 항원에 대한 항체의 결합은 초기에 ELISA에 의해 특성화된다. 간단히 말하면, 미량정량판(microtiter plate)은 정제된 C6의 PBS로 코팅된 다음, PBS로 희석된 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)과 같은 관련없는 단백질로 차단될 수 있다. C6 면역 마우스로부터의 혈장 희석을 각 웰에 첨가하고 37°C에서 1 내지 2시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBS/Tween 20으로 세척한 후, 알칼리 포스파타제에 접합된 염소-항-인간 IgG Fc-특이적 다클론성 시약과 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 세척 후, 플레이트를 ABTS 기질로 현상하고 OD 405에서 분석한다. 바람직하게는 가장 높은 결합능 및/또는 기능적 저해 활성을 나타내는 가장 높은 적정량(titer)의 항체를 발달시키는 마우스가 융합에 사용된다.
- [0233] 상기 기재된 ELISA 분석을 사용하여 항체 및 C6 면역원과의 양성 반응성을 나타내는 항체를 생산하는 하이브리도마를 스크리닝 할 수 있다. 이어서, 바람직하게는 높은 친화성으로 C6에 결합하는 하이브리도마를 서브 클로닝하고 추가로 특성화할 수 있다. ELISA에 의해 부모 세포의 반응성을 유지하는 각각의 하이브리도마로부터 하나의 클론을 선택하여 세포 은행을 만들고 항체 정제를 할 수 있다.
- [0234] 추가적으로 또는 대안적으로, C6 활성을 저해 또는 차단하는 항체의 능력을 결정하는 기능적 분석을 관심 있는 항체의 스크리닝 및 선별에 사용할 수 있다. 적합한 in vitro 기능 분석은 실시예 1에서 상세히 기술된 바와 같이, 용혈 분석 및 MAC ELISA 분석을 포함한다. 기능 활성을 결정하기 위한 적합한 in vivo 분석은 실시예 4에 상세히 기재되어있다.
- [0235] 항-C6 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마는 롤러 보틀, 2리터 스피너 플라스크 또는 다른 배양 시스템에서 배양될 수 있다. 상청액은 단백질 A-세 파로스(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용하여 친화성 크로마토그래피 전에 여과 및 농축되어 단백질을 정제할 수 있다. PBS 로의 완충액 교환 후, 농도는 1.43 흡광 계수 또는 바람직하게는 비탁 분석(nephelometric analysis)을 사용하여 OD280에 의해 결정될 수 있다. IgG는 겔 전

기영동 및 항원 특이적 방법으로 검사할 수 있다.

- [0236] 선택된 항 C6 모노클로날 항체가 독특한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 각 항체는 상업적으로 시판되는 시약 (Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 바이오틴화할 수 있다. Biotinylated MAb의 접합은 스트렙타비딘이 표지된 프로브로 검출할 수 있다. 정제된 항체의 아이소타입을 결정하기 위해, 아이소타입 ELISA는 당업계에서 인정된 기술을 사용하여 수행 될 수 있다. 예를 들어, 미량정량판의 웰은 10 μ g/ml의 항-Ig로 4 °C에서 밤새 코팅 할 수 있다. 5 % BSA로 블로킹한 후, 플레이트는 10 μ g/ml의 모노클로날 항체 또는 정제된 아이소타입 대조군과 주변 온도에서 2시간 동안 반응했다. 이어서, 웰을 IgG1 또는 다른 아이소타입 특이적으로 컨쥬게이션된 프로브와 반응시킬 수 있다. 플레이트는 위에서 설명한대로 발달되고 분석된다.
- [0237] 다양한 항-C6 항체의 결합 친화성, 교차-반응성 및 결합 동역학을 분석하는 방법은 당업계에 공지된 표준 분석, 예를 들어 실시예 2에 기재된 바와 같이 Biacore™ 2000 SPR 장치 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)를 사용하여 Biacore™ 표면 플라즈몬공명 (SPR)을 포함한다.
- [0238] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 5 $\times 10^{-8}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하고, 2 $\times 10^{-8}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하고, 5 $\times 10^{-9}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하며, 4 $\times 10^{-9}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하고, 3 $\times 10^{-9}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하고, 2 $\times 10^{-9}$ M의 KD로 C6에 결합하고, 1 $\times 10^{-9}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하고, 5 $\times 10^{-10}$ M 이하의 KD로 C6에 결합하거나, 2.5 $\times 10^{-10}$ M 이하의 KD로 C6에 결합한다.
- [0239] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 24시간 이상, 30시간 이상, 36시간 이상, 40시간 이상, 또는 45시간 이상의 T_{1/2} (표면 플라즈몬 공명에 의한 측정)를 갖는다.
- [0240] 항체 물리적 특성
- [0241] 본원의 항체는 이들의 상이한 부류를 검출 및/또는 구별하기 위해 이들의 다양한 물리적 특성에 의해 특성화될 수 있다.
- [0242] 바람직한 양태에서, 본 발명의 항체는 아스파라긴 이성질체 자리를 개시하지 않는다. 아스파라긴의 탈아미드화 (deamidation)는 N-G 또는 D-G 서열상에 일어나서 폴리펩티드 사슬에 꼬임을 도입하고 그의 안정성 (이소 아스파르트산 효과)을 감소시키는 이소 아스파르트산 잔기의 생성을 초래할 수 있다.
- [0243] 각 항체에는 고유한 등전점 (pI)이 있으며, 일반적으로 pH 범위는 6 ~ 9.5 이다. IgG1 항체에 대한 pI는 전형적으로 7-9.5의 pH 범위 내에 속하며, IgG4 항체에 대한 pI는 전형적으로 6-8의 pH 범위 내에 속한다. 정상 범위를 벗어나는 pI를 갖는 항체는 in vivo 조건하에서 폴딩되지 않고 불안정할 수 있다는 추측이 있다. 따라서, 정상 범위에 속하는 pI 값을 함유하는 항-C6 항체를 갖는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위의 pI를 갖는 항체를 선택하거나 하전된 표면 잔기를 돌연변이 시킴으로써 달성 될 수 있다.
- [0244] 바람직한 양태에서, 빠르게 분해되지 않는 항체가 선택된다. 항체의 분해는 모세관 전기영동 (CE) 및 MALDI-MS (Alexander AJ and Hughes DE (1995) Anal Chem 67 : 3626-32)를 사용하여 측정할 수 있다.
- [0245] 또 다른 바람직한 양태에서, 원하지 않는 면역 반응 및/또는 변경되거나 불리한 약동학적 특성을 유발할 수 있는 최소 응집 효과를 갖는 항체가 선택된다. 일반적으로, 항체는 25% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 보다 바람직하게는 15% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 10% 이하, 훨씬 더 바람직하게는 5% 이하의 응집체로 허용 가능하다. 응집은 크기 배제 컬럼 (size-exclusion column, SEC), 고성능 액체 크로마토 그래피 (HPLC) 및 빛 산란을 포함한 여러 기술로 측정될 수 있다.
- [0246] 각 항체는 in vivo에서 전반적인 안정성이 더 높음을 나타내는 높은 용융 온도와 함께 특징적인 용융 온도를 갖는다 (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3 : 361-71). 일반적으로, TM1 (초기 전개의 온도)은 60°C 초과, 바람직하게는 65°C 초과, 더욱 바람직하게는 70°C 초과인 것이 바람직하다. 항체의 융점은 시차 주사 열량계 (Chen 외(2003) Pharm Res 20 : 1952-60; Ghirlando 외(1999) Immunol Lett 68 : 47-52) 또는 원편광 이색성(circular dichroism) (Murray 외(2002) J. Chromatogr Sci 40 : 343-9)를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0247] 일 양태에서, 본 발명의 항체는 높은 용융 온도를 갖는다. 일 양태에서, 항체는 적어도 65°C, 보다 바람직하게는 적어도 66°C, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 67 °C, 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 68 °C의 융점을 갖는다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 융점이 67°C 내지 72°C, 보다 바람직하게는 68°C 내지 72°C, 또는 69°C 내지

72℃, 또는 70℃ 내지 72℃ 또는 69℃ 내지 71.43℃이다.

[0248] II. 면역 독소(Immunotoxins), 면역접합(Immunoconjugate) 및 항체 유도체

[0249] 또 다른 양태에서, 본 발명의 항체는 치료 모이어티, 예컨대 세포 독소, 약물 또는 방사성 동위 원소에 연결된다. 세포 독소에 접합 될 때, 이들 항체 접합체는 "면역 독소"라고 불린다. 세포 독소 또는 세포 독성제는 세포에 해로운 (예를 들어, 사멸시키는) 임의의 체제를 포함한다. 예를 들어, 탁솔, 사이토칼라신 B (cytochalasin B), 그라미시딘 D (gramicidin D), 에티디움 브로마이드, 에메틴(emetine), 미토마이신 (mitomycin), 에토포시드(etoposide), 테노포시드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디 히드 록시 안트라신 다이온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 1-디하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드, 프로카인 (procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propanolol) 및 푸로마이신 (puromycin) 및 이들의 유사체 또는 상동체를 포함한다. 치료제에는 대사길항제 (예 : 메토크세이트 (methotrexate), 6- 머캅토피린, 6- 티오구아닌, 시타라빈, 5- 플루오로 우라실 데카바진), 알킬화제 (예 : 메클로레타민(mechlorethamine), 티오에파 클로람부실(thioepa chlorambucil), 멜팔란(melphalan), 카르무스틴 (carmustine) (BSNU) 및 로무스틴(lomustine) (CBNU), 시클로토스파미드(cyclophosphamide), 부슬판 (busulfan), 디브로모만니톨(dibromomannitol), 스트렙토조토신(streptozotocin), 마이토마이신 C(mitomycin C) 및 시스-디클로로디아민 플래티늄(II) (DDP) 시스플라틴(cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), 안트라 사이클린 (예, 다우노루바이신 (구 다우노마이신)) 및 독소루비신), 항생제 (예, 닥티노마이신(구 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (anthramycin, AMC)) 및 항-유사분열 억제제 (예 : 빈 크리스틴 및 빈블라스틴). 본 발명의 항체는 세포 독성 방사성 약제를 생성하기 위해 방사성 동위 원소, 예컨대 방사성 요오드에 접합 될 수 있다.

[0250] 본 발명의 항체 접합체는 주어진 생물학적 반응을 변형시키는데 사용될 수 있고, 약물 모이어티는 고전적인 화학 치료제로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리 펩타이드일 수 있다. 이러한 단백질은 예를 들어, 효소 적으로 활성인 독소 또는 이의 단편, 예를 들어, 아브린(abrin), 리신 A, 슈도모나스 외독소(pseudomonas exotoxin) 또는 디프테리아 독소를 포함하고; 중앙 피사 인자 또는 인터페론- γ 과 같은 단백질; 생체반응조절인자, 예를 들어, 림포카인, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 과립구 집락 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자를 포함한다.

[0251] 이러한 치료학적 모이어티를 항체에 접합시키는 기술은 잘 알려져 있다, 예를 들어, Arnon 외, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 외 (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 외, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 외 (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 외 (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 외 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe 외, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) 참조.

[0252] 항체 및 세포 독소의 접합체는 다양한 이작용성(bifunctional)의 단백질 커플링제, 예를 들어, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트, 이미노티올란, 디메틸아디프이미데이트 HCL과 같은 이미드에스테르의 이기작용성 유도체, 디숙신이미딜 수베레이트와 같은 활성 에스테르, 글루타르알데히드와 같은 알데히드, 비스-(p-디아코니움벤조일)-디에틸렌디아민), 톨루엔 2,6-디이소시아네이트와 같은 디이소시아네이트 및 비스-활성 불소 화합물 (예 : 1,5-디플루오로-2,4-디니트로 벤젠)를 사용하여 만들어질 수 있다. C^{14} -표지된 1- 이소티오시아노 벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성 핵종의 항체와의 접합에 적합한 킬레이트제이다.

[0253] 면역 독소의 독소 성분은 예를 들어 화학 요법 약제, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소와 같은 독소 또는 이들의 단편, 또는 소분자 독소 또는 방사성 동위 원소, 예컨대 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In ,

^{111}In , ^{90}Y 및 ^{186}Re 일 수 있다.

[0254] 상기 면역접합체의 생성에 유용한 화학 요법 약제는, DM-1 및 DM-4를 포함하는 메이탄시노이드(maytansinoid), 아우리스타틴(auristatins), 아드리아마이신(adriamycin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 사이토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside) (“Ara-C”), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 티오테파(thiotepa), 부숴판(busulfan), 사이토신(cytosine), 택소이드(taxoids), 예를 들어, 팔리탁셀(paclitaxel), 및 도세탁셀(docetaxel), 택소텔(taxotere), 메토트렉세이트(methotrexate), 시스플라틴(cisplatin), 멜팔란(melphalan), 빈블라스틴(vinblastine), 블레오마이신(bleomycin), 에토포사이드(etoposide), 이포사미드(ifosamide), 마이토마이신 C(mitomycin C), 마이토잔트론(mitoxantrone), 빈크리스틴(vincristine), 비노렐빈(vinorelbine), 카르보플라틴(carboplatin), 테니포사이드(teniposide), 다우노마이신(daunomycin), 카르미노마이신(carminomycin), 아미노프테린(aminopterin), 닥티노마이신(dactinomycin), 마이토마이신(mitomycins), 에스페라마이신(esperamicins), 5-FU, 6-티오구아닌(6-thioguanine), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 액티노마이신 D(actinomycin D), VP-16, 클로람부실(chlorambucil), 멜팔란(melphalan) 및 기타 관련된 머스타드를 포함한다. 또한, 타모시펜(tamoxifen)이나 오나프리스톤(onapristone)과 같은 중앙에서 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 호르몬 제제도 포함된다. 독소 및 이의 단편은 이프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 콜레라 독소, 보툴리누스 독소, 엑소톡신 A쇄(녹농균으로부터), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신(alpha-sarcin), 유동(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴(dianthin) 단백질, 미국자리공(phytolaca Americana) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 비터멜론 억제제(Momordica charantia inhibitor), 쿠르신(curcin), 크로틴(croton), 사파오나리아(sapaonaria), 오퍼시날리스 억제제(officinalis inhibitor), 젤로닌(gelonin), 사포린(saporin), 마이토겔린(mitogellin), 리스트릭토신(restrictocin), 페노마이신(phenomycin), 에노마이신(enomycin), 및 트리코세네스(tricothcenes)를 포함한다. 소분자 독소는 예를 들어, 칼리케아마이신 (calicheamicins), 메이탄시노이드(maytansinoids), 팔리톡신 (palytoxin) 및 CC1065를 포함한다.

[0255] 면역 독소를 형성하기 위해 항체와 접합될 수 있는 추가적인 치료제는 대사길항물질, 알킬화제, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 삽입제, DNA 가교제, 히스톤 디아세틸라아제 저해제, 핵외수송(nuclear export) 저해제, 프로테아좀 저해제, 토포이소머라아제 I 또는 II 저해제, 열충격 단백질 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 항생제 및 항-유사 분열제를 포함한다. 접합체에서, 항체 및 치료제는 바람직하게는 펩티딜, 다이설파이드 또는 하이드라존 링커와 같은 쪼갤 수 있는(cleavable) 링커를 통해 접합된다. 보다 바람직하게는, 링커는 Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (서열번호 15), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, 또는 Glu와 같은 펩티딜 링커이다. 접합체는 미국 특허 제 7,087,600호; 6,989,452호; 및 7,129,261호; PCT 공보 WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; 및 WO 08/103693; 미국 특허 공개 20060024317; 20060004081; 및 20060247295; 이들의 개시내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0256] 본 발명의 항체는 또한 샘플 시험 및 in vivo 이미징을 포함하는 진단 목적으로 사용될 수 있으며, 이 목적을 위해 항체 (또는 그의 결합 단편)는 적절한 검출 가능한 제제에 접합되어 면역 접합체를 형성 할 수 있다. 진단 목적으로 적절한 약물은 전신 이미징을위한 방사성 동위원소, 방사성 동위원소, 효소, 형광 라벨 및 샘플 테스트를위한 기타 적합한 항체 태그를 포함하는 검출 가능한 라벨 이다.

[0257] C6 검출을 위해, 검출 가능한 표지는 in vitro 진단법 분야에서 현재 사용되는 다양한 유형 중 임의의 것일 수 있으며, 콜로이드성 금과 같은 금속 졸(sol), 예를 들어 N2S2, N3S 또는 N4 유형의 펩타이드성 킬레이트 시약으로 제시되는 I125 또는 Tc99와 같은 동위원소를 포함하는 미립자 표지, 형광 마커, 발광 마커, 인광 마커 등을 포함하는 발색단뿐만 아니라 주어진 기질을 검출 가능한 마커로 전환시키는 효소 표지 및 중합 효소 연쇄에 의한 것과 같은 증폭 후 드러나는 폴리뉴클레오티드 태그를 포함 할 수 있다. 적합한 효소 표지에는 홀스래디쉬 퍼옥시다아제 (horseradish peroxidase), 알칼리성 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 포함된다. 예를 들어, 라벨은 1, 2 디옥세탄 기질의 전환 후 화학 발광(chemiluminescence)의 존재 또는 형성을 측정함으로써 탐지되는 효소 알칼리성 포스파타아제일 수 있는데, 이는 아다만틸메톡시포스포릴옥시페닐디옥세탄 (AMPPD), 3-(4-(메톡시 스피로{1,2-디옥세탄 -3,2'-(5'-클로로) 트리시클로{3.3.1.13,7}데칸}-4-일) 페닐 포스페이트 (CSPD) 뿐만 아니라 CDP 및 CDP-star® 또는 다른 당염계에 공지된 발광 기질 예를 들어, 테르븀(III) 및 유로퓸(III)과 같은 적절한 란타넘계의 킬레이트일 수 있다. 검출 수단은 선택된 라벨에 의해 결정된다. 라벨 또는 그의 반응 생성물의 외관은 라벨이 미립자이고 적절한 수준으로 축적되는 경우 육안으로 확인되거나, 분광

광도계, 조도계, 형광 측정기 등과 같은기구를 사용하여 표준 관행에 따라 확인될 수 있다.

- [0258] 특정 양태에서, 본원에 제공된 항체는 당업계에 공지되어 있고 용이하게 입수할 수 있는 추가적인 비-단백질성 모이어티를 함유하도록 더 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 에틸렌글리콜/프로필렌글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐알콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1, 3, 6-트리옥세인, 에틸렌/말레산무수물 공중합체, 폴리아미노산 (호모폴리머 또는 랜덤코폴리머), 텍스트란 또는 폴리 (n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 프롤리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸레이트폴리올 (예 : 글리세롤), 폴리비닐알콜 및 이들의 혼합물을 포함한다. 폴리에틸렌글리콜 프로피온알데히드는 물에 대한 안정성으로 인해 제조상 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량일 수 있고, 분지형 또는 비분지형 일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 하나 이상의 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 성질 또는 기능, 항체 유도체가 정의 된 조건하의 치료에서 사용되는지 여부 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 고려 사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.
- [0259] 또 다른 양태에서, 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비-단백질성 모이어티 및 항체의 접합체가 제공된다. 일 양태에서, 비-단백질성 모이어티는 탄소 나노 튜브 (Kam, N.W. 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)이다. 방사선은 임의의 과장일 수 있으며, 통상적인 세포에 해를 끼치지 않으나, 비-단백질성 부분을 항체-비-단백질성 부분에 인접한 세포가 사멸되는 온도까지 가열하는 과장을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0260] 실질적으로(또는 거의) 비면역원성인 결합을 유도하는 접합 방법이 특히 적합하다. 따라서, 펩티드-(즉, 아미드-), 설페이드-, (입체 장애), 디설페이드-, 하이드라존- 또는 에테르 결합이 특히 적합하다. 이러한 결합은 거의 비면역원성이고, 혈청 내에서 합리적인 안정성을 나타낸다 (Senter, P. D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886 참조).
- [0261] 모이어티와 항체의 생화학적 성질에 따라 상이한 접합 전략이 수반된다. 상기 모이어티가 50 내지 500 아미노산 사이의 자연 발생 또는 재조합인 경우, 단백질 접합체의 합성을 위한 화학을 기술한 교과서에 숙련된 기술자가 쉽게 따라할 수 있는 표준 절차가 있다(예를 들어, Hackenberger, CPR and Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030-10074). 한 양태에서, 항체 또는 모이어티 내의 말레이이미도(maleinimido) 모이어티와 시스테인 모이어티의 반응이 사용된다. 이는 예를 들어, 항체의 Fab 또는 Fab'- 단편이 사용되는 경우에 있어서 특히 커플링 화학에 적합하다. 대안적으로, 일 양태에서, 항체 또는 모이어티의 C-말단에 커플링이 수행된다. 단백질의 C-말단 변형, 예를 들어, Fab-단편은 (Sunbul, M. and Yin, J., Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 3361-3371)에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다.
- [0262] 일반적으로 부위 특이적 반응과 공유 결합은 천연 아미노산을 다른 작용기의 반응성에 직교 반응성을 갖는 아미노산으로 변형시키는 것에 기초한다. 예를 들어, 희귀 서열 내 특정 시스테인은 알데히드에서 효소적으로 전환될 수 있다 (Frese, M.A. and Dierks, T., ChemBioChem.10 (2009) 425-427 참조). 주어진 서열 상황에서 특정 효소의 특정 효소 반응성과 천연 아미노산을 이용함으로써 원하는 아미노산 변형을 얻을 수도 있다 (예를 들어, Taki, M. 외, Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 119-126; Gautier, A. 외 Chem. Biol. 15 (2008) 128-136참조; 및 프로테아제-촉매된 C-N 결합의 형성은 Bordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403에 의해 사용된다).
- [0263] 부위 특이적 반응 및 공유 결합은 또한 말단 아미노산과 적절한 개량제의 선택적 반응에 의해 달성될 수 있다. N 말단 시스테인과 벤조 니트릴 (Ren, H. 외, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 (2009) 9658-9662 참조)의 반응성은 부위 특이적인 공유 결합을 달성하는데 사용될 수 있다.
- [0264] 천연 화학 연결법(native chemical ligation)은 또한 C-말단 시스테인 잔기에 의존할 수 있다(Taylor, E. Vogel, Imperiali, B, Nucleic Acids and Molecular Biology (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).
- [0265] EP 1 074 563은 음으로 하전된 아미노산 구간 내의 시스테인과 양으로 하전 된 아미노산 구간에 위치한 시스테인의보다 빠른 반응에 기초한 접합 방법을 기술한다.
- [0266] 모이어티는 또한 합성 펩타이드 또는 펩타이드 미믹(mimic)일 수 있다. 폴리펩타이드가 화학적으로 합성되는 경우, 직교 화학 반응성을 갖는 아미노산은 그러한 합성 동안에 혼합될 수 있다 (de Graaf, A. J. 외, Bioconjug. Chem. 20 (2009) 1281-1295 참조). 매우 다양한 직교 작용기가 관련되고, 합성 펩타이드에 도입될 수 있기 때

문에, 그러한 펩타이드와 링커의 접합은 표준 화학이다.

- [0267] 모노-라벨링된 폴리펩타이드를 수득하기 위해, 1:1 화학양론을 갖는 접합체는 다른 접합체의 부산물로부터 크로마토그래피에 의해 분리될 수 있다. 이 절차는 염료가 표지된 결합쌍의 구성과 하전된 링커를 사용하여 용이하게 될 수 있다. 이러한 종류의 표지되고 고도로 음전하를 띠는 결합쌍을 사용함으로써, 모노 컨주게이트드 폴리펩타이드는 하나 이상의 링커를 갖는 비 표지 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드로부터 쉽게 분리된다. 왜냐하면, 전하 및 분자량의 차이가 분리에 사용될 수 있기 때문이다. 형광 염료는 표지된 1가 결합체와 같은 결합되지 않은 성분으로부터 착물을 정제하는데 유용할 수 있다.
- [0268] 일 양태에서, 이펙터 모이어티는 결합 모이어티, 라벨링 모이어티 및 생물학적 활성 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0269] III. 조성물
- [0270] 다른 양태에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어 담체 (예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 담체)와 함께 제제화된, 본 발명의 모노클로날 항체의 하나 또는 조합을 함유하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 이종 특이적 분자를 함유하는 조성물 또한 제공된다. 일 양태에서, 조성물은 본 발명의 다수의(예를 들어, 2개 또는 그 이상)분리된 항체의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 조성물의 항체 각각은 별개의, 미리 선택된 C6 에피토프 결합한다.
- [0271] 본 발명의 약학 조성물은 또한 병용 요법으로 토여될 수 있다, 즉 다른 약제와 병용 투여될 수 있다. 예를 들어, 병용 요법은 항염증제, DMARD (질병-개질 항-류마티스 약물), 면역 억제제 및 화학 요법제와 같은 적어도 하나 이상의 추가의 치료제를 갖는 본 발명의 조성물을 포함 할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 방사선 요법과 함께 투여될 수 있다. 다른 항체와 함께 투여되는 것 또한 본 발명에 포함된다.
- [0272] 본 명세서에서 사용된 용어 "담체" 및 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 생리학적으로 상용성 있는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥 내, 근육 내, 피하, 비경구, 척추 또는 표피 투여에 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의해) 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 항체, 이종 특이적 및 다중 특이적 분자는 화합물 및 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 기타 자연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅 될 수 있다.
- [0273] 본 발명의 항체 및 구성물과 함께 사용될 수 있는 보조제는 다음을 포함한다: Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); 알루미늄 히드록사이드 겔(명반) 또는 알루미늄 포스페이트와 같은 알루미늄 염; 칼슘, 철 또는 아연의 염; 아실화된 티로신의 불용성 현탁액; 아실화당; 양이온성 또는 음이온성 유도체화된 폴리사카라이드; 폴리포스파젠; 생분해성 마이크로스피어; GM-CSF, 인터루킨-2, -7, -12 및 기타 유사한 인자와 같은 사이토카인; 3D-MPL; CpG 올리고뉴클레오타이드; 및 모노포스포릴 지질 A, 예를 들어 3-디-0-아실화 모노포스포릴 지질 A.
- [0274] MPL 보조제는 Corixa Corporation (Wash, Seattle, 미국 특허 제 4,436,727 호, 제 4,877,611 호, 제 4,866,034 호 및 제 4,912,094 호 참조)로부터 입수 가능하다. CpG-함유 올리고 뉴클레오타이드 (CpG 디뉴클레오타이드가 비메틸화 된 것)는 잘 알려져 있고, 예를 들어 WO 96/02555, WO 99/33488 및 미국 특허 제 6,008,200호 및 5,856,462호에 기술되어 있다. 면역 자극 DNA 서열은 또한 예를 들어 Sato 외 Science 273:352, 1996에 기술되어 있다.
- [0275] 추가의 다른 보조제는 예를 들어, QS21 및 QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)을 포함하는 Quil A 또는 이의 유도체와 같은 사포닌; 에스신(Escin); 디지토닌(Digitonin); 또는 안개꽃(Gypsophila) 또는 퀴노아(Chenopodium quinoa) 사포닌; Montanide ISA 720 (Seppic, France); SAF (Chiron, California, United States); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); SBAS 계열의 보조제 (e.g., SBAS-2 or SBAS-4, SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium에서 입수 가능); Detox (Enhanzyn™) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) 및 다른 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트(AGPs); WO 99/52549 A1에 기술된 것과 같은 폴리옥시에틸렌 에테르 보조제; [S-26308, R-837], (Harrison, et al., Vaccine 19: 1820-1826, 2001; and resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64-74, 2000와 같은 합성 이미다조퀴놀린(imidazoquinoline); Tucaresol과 같은 항원 제시 세포 및 T 세포 표면 상에 지속적으로 발현되는 카르보닐 및 아민의 시프염기 (Rhodes, J. 등, Nature 377 : 71-75, 1995); 인터페론, IL-1 α , IL-1 β , TGF- α 및 TGF- β , 인터페론 감마와 같은 전-염증성 사이토카인을 포함하는 단백질 또는 펩타이드로서의 사이토카인, 케

모카인 및 보조 자극 분자, IL2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21과 같은 Th1 유도제, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 IL-13와 같은 Th2 유도제 및 기타 케모카인 및 MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RNATES, TCA-3, CD80, CD86 및 CD40L과 같은 공동 자극 유전자; CTLA-4 및 L-셀렉틴과 같은 리간드를 표적으로 하는 면역자극제, Fas와 같은 세포 자멸 촉진 펩타이드 및 단백질; vaxfectin, (Reyes 외, Vaccine 19: 3778-3786, 2001) 스쿠알렌, 알파 토코페롤, 폴리소르베이트80, DOPC 및 콜레스테롤과 같은 합성 지질 기초 보조제; 엔도톡신(endotoxin), [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); 마이코박테리아 단백질 p19, 펩티도글리칸, 테이코산 및 지질 A와 같은 Th1-유도 사이토카인을 생산하기 위한 Toll 수용체를 유발하는 리간드; 및 CT (콜레라 독소, 서브유닛 A 및 B) 및 LT (대장균으로부터의 이열성독소(heat labile enterotoxin, 서브유닛 A 및 B), LLO (리스테리오토신 O; WO 01/72329). 이들 및 다양한 추가의 톨유사수용체 (TLR) 작용제는 예를 들어 Kanzler 외, Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5에 기술되어있다.

[0276] "약학적으로 허용 가능한 염"은 모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 보유하고 임의의 원하지 않는 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다 (Berge, SM, 외 (1977) J. Pharm. Sci. 66 : 1-19)참조. 이러한 염의 예는 산 첨가 염 및 염기 첨가 염을 포함한다. 산 첨가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬산, 요오드화 수소산, 인 등과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것 뿐만 아니라 지방족 모노- 및 디카르복시산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족산, 지방족 및 방향족 술폰산 등을 포함한다. 염기 첨가 염은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속으로부터 유도된 것 뿐만 아니라, N, N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등의 비독성 유기 아민을 포함한다.

[0277] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 투여 될 수 있다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 투여 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 활성 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 미세 캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어된 방출 제제와 같이, 신속한 방출로부터 화합물을 보호하는 담체로 제조될 수 있다. 에틸렌비닐아세테이트, 폴리산무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오쏘에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체 적합한 중합체가 사용될 수 있다. 그러한 제제의 제조를위한 많은 방법은 특허되거나 당업자에게 일반적으로 공지되어있다. 예를 들어, 지속적이고 제어된 방출 약물 전달 시스템, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.

[0278] 본 발명의 화합물을 특정 투여 경로로 투여하기 위해, 그의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 화합물을 코팅하거나 화합물과 함께 투여할 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적절한 담체, 예를 들어, 리포솜 또는 희석제에서 대상에게 투여 될 수 있다. 허용 가능한 희석제는 식염수 및 수성 완충액을 포함한다. 리포솜은 통상적인 리포솜 뿐만 아니라 워터-인-오일-인-워터 CGF 에멀전을 포함한다(Strejan 외, (1981)J. Neuroimmunol. 7:27).

[0279] 담체는 멸균 수용액 또는 분산제 및 멸균 주사용액 또는 분산제의 즉석 제조용 멸균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질을 위한 매질 및 제제의 용도는 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 활성 화합물과 양립불가능한 경우를 제외하고, 본 발명의 약학 조성물에서의 그의 용도가 고려된다. 보충적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0280] 치료 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건 하에서 살균되고 안정되어야 한다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 규칙 구조로 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질 일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우, 등장화제(isotonic agent), 예를 들어 당분, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직 할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 모노스테아린산 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 조래될 수 있다.

[0281] 멸균 주사액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합물과 함께 필요에 따라 혼합한 후, 멸균 미세여과에 의해 제조 할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 성분들 중 필요한 다른 성분을 함유하는 부형제에 혼합시킴으로써 제조된다. 멸균 주사액의 제조를위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분의 분말 + 이전에 멸균 여과된 이의 용액으로부터 임의의 추가적인 원하는 성분을 생성하는 진공 건조 및 냉동 건조(동결 건조)이다 .

[0282] 용량 요법은 최적의 원하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스(bolus)가 투여 될 수 있고, 여러번 분할된 투여량이 시간이 지남에 따라 투여 될 수 있거나, 투여량은 치료 상

황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례하여 감소되거나 증가 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 피하 또는 근육 내 주사에 의해 매주 1회 또는 2회 투여되거나 피하 또는 근육 내 주사에 의해 월 1회 또는 2회 투여 될 수 있다.

[0283] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투약 단위 형태로 비경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 바람직하다. 본 명세서에서 사용된 투여 단위 형태는 치료의 대상을 위한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다; 각 단위는 요구되는 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 나타내도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 설명은 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성될 특정 치료 효과, 및 (b) 그러한 개인의 감수성을 치료하기 위한 활성 화합물을 배합하는 분야에 내재된 한계에 의해 지시되고, 이에 의존한다.

[0284] 약학적으로 허용 가능한 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 아스코르빈산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 바이설페이트, 나트륨 메타바이설페이트, 나트륨 설페이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트 및 알파-토코페롤 등의 유용성 항산화제; 및 (3) 구연산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제.

[0285] 치료 조성물의 경우, 본 발명의 제형은 정맥 내, 복강 내, 경구, 비강, 국소 (구강 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것들을 포함한다. 제제는 단일 제형으로 편리하게 제공될 수 있고, 약학 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 제형을 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 대상 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 제형을 제조하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타내는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이 양은 활성 성분의 약 0.001% 내지 약 90%, 바람직하게는 약 0.005% 내지 약 70%, 가장 바람직하게는 약 0.01 % 내지 약 30 % 일 것이다.

[0286] 질 내 투여에 적합한 본 발명의 제제는 적절한 것으로 당업계에 공지된 담체를 함유하는 질 좌약(pessary), 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼(form) 또는 스프레이 제제를 포함한다. 본 발명의 조성물의 국소 또는 경피 투여용 제형은 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 필요할 수 있는 임의의 방부제, 완충제 또는 분사제(propellant)와 함께 멸균 조건하에서 혼합될 수 있다.

[0287] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"이란 용어는 일반적으로 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 의미하며, 제한 없이, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 척추 강내, 캡슐 내, 안와 내(intraorbital), 심장 내, 피내(intradermal), 복강 내, 기관지 내, 피하(subcutaneous), 피부밑(subcuticular), 관절 내, 피막(subcapsular), 지주막(subarachnoid), 척수 내, 경막 외 및 흉골 내 주사 및 주입으로 투여될 수 있다.

[0288] 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(글리세롤, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예를 들어 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0289] 이러한 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 상기 살균 절차 및 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르빈산 등의 다양한 항균제 및 항진균제의 포함에 의해 보장될 수 있다. 조성물에 당분, 염화나트륨 등의 등장화제를 포함시키는 것이 바람직할 수도 있다. 또한, 주사용 의약 형태의 장기 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 포함에 의해 야기될 수 있다.

[0290] 본 발명의 화합물이 의약으로서 인간 및 동물에게 투여되는 경우, 이들은 단독으로, 또는 예를 들어 0.001 내지 90% (보다 바람직하게는 0.005 내지 70%, 예를 들어 0.01 내지 30%)의 유효 성분을 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 함유하는 약학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0291] 선택된 투여 경로와 관계없이, 적절한 수화된 형태로 사용될 수 있는 본 발명의 화합물 및/또는 본 발명의 약학적 조성물은 당업자에게 자명한 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용 가능한 제형으로 제제화된다.

[0292] 본 발명의 약학적 조성물 중의 활성 성분의 실제 투여 수준은, 환자에게 유독한 것을 제외하고, 특정 환자, 조

성물 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 변화될 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설율, 치료의 지속기간, 다른 약물, 사용되는 특정 화합물과 조합하여 사용되는 다른 화합물 및/또는 물질, 치료되는, 치료되는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전의 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 요인들을 포함하는 다양한 약동학적 인자들에 의존할 것이다. 당업계의 통상적인 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약학 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 원하는 효과가 달성될 때까지 점차적으로 투여량을 증가시키기 위해 치료 효과를 달성하는 데 요구되는 수준보다 낮은 수준으로 약학 조성물에 사용된 본 발명의 화합물의 투여량을 시작할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 일일 투여량은 치료 효과를 생성하는데 유효한 최저 투여량인 화합물의 양일 것이다. 그러한 유효 투여량은 일반적으로 위에 설명된 인자들에 달려있다. 투여는 정맥 내, 근육 내, 복강 내 또는 피하, 바람직하게는 표적 부위 근방에 투여하는 것이 바람직하다. 필요하다면, 치료 조성물의 유효 일일 투여량은 개별적으로 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 이상의 서브 투여량으로, 1일 동안 적절한 간격으로, 선택적으로, 단위 투여형으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 단독으로 투여될 수 있지만, 약학적 제제(조성물)로서 투여하는 것이 바람직하다.

[0293] 치료 조성물은 당업계에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 양태에서, 본 발명의 치료 조성물은 미국 특허 제 5,399,163 호, 제 5,383,851 호, 제 5,312,335 호, 제 5,064,413 호, 제 4,941,880 호, 제 4,790,824 호 또는 제 4,596,556 호에 개시된 장치와 같은 무바늘 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에서 유용한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식형 마이크로-주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제 4,487,603 호; 피부를 통해 약물을 투여하기 위한 치료용 장치를 개시하는 미국 특허 제 4,486,194 호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제 4,447,233 호; 지속적인 약물전달을 위한 가변 유동 이식형 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제 4,447,224 호; 멀티-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,439,196 호; 삼투성 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,475,196 호. 많은 다른 임플란트, 전달 시스템 및 모듈은 통상의 기술자에게 공지되어있다.

[0294] 특정 양태에서, 본 발명의 항체는 생체 내에서의 적절한 분포를 보장하도록 제형화 될 수 있다. 예를 들어, 혈액 뇌 장벽(BBB)은 많은 친수성 화합물을 거부한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 보장하기 위해 (필요하다면), 이들은 예를 들어 리포솜 내에서 제형화 될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제 4,522,811 호; 5,374,548; 및 5,399,331를 참조. 리포솜은 특정 세포 또는 기관으로 선택적으로 수송되는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있으며, 따라서 목표 약물 전달을 향상시킬 수 있다 (V.V. Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol.29 : 685 참조). 예시적인 표적 모이어티는 엽산 또는 비오틴 (예를 들어, Low 등의 미국 특허 제 5,416,016 호 참조); 만노사이드 (Umezawa 외, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 : 1038); 항체 (P.G. Bloeman 외 (1995) FEBS Lett.335:140; M. Owais 외 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180; 본 발명의 제제뿐만 아니라 본 발명의 분자의 성분을 포함할 수 있는 상이한 종의 계면 활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe 외 (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier 외 (1994) J.Biol.Chem.269 : 9090); K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 또한 참조. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 치료 화합물은 리포솜에서 제형화되고; 보다 바람직한 양태에서, 리포솜은 표적 모이어티를 포함한다. 조성은 물 부드러운 주사성 (synergability)이 존재할 정도로 유동적이어야 한다. 그것은 제조 및 저장 조건하에서 안정해야 하며 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다.

[0295] 조성물은 조성물이 주사기에 의해 전달될 수 있는 정도로 멸균되고 유동적이어야 한다. 물에 더하여, 담체는 등장성 완충 식염수, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물 일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지 될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 등장 화제, 예를 들면 당분, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 폴리알콜, 및 염화나트륨을 조성물에 포함 시키는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0296] 활성 화합물이 적절하게 보호되는 경우, 상기 기재된 바와 같이, 화합물은 예를 들어 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다.

[0297] IV. 발명의 용도 및 방법

[0298] 본 발명의 항-C6 항체는 in vivo 및 in vitro에서 C6를 기능적으로 저해할 수 있어, C6를 필요로하는 막 공격 복합체의 형성이 저해된다. 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 막 공격 복합체(MAC) 형성 또는 활성을 억제하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 대상체에서 MAC 형성을 저해하거나 활성을 억제하는데 유효한 양으로 본 발명의 항체를 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 보체 시스템의 원하지 않는 활성화에 의해 매개 되는 장애의 증상을 치료, 예방 또는 감소시키는 방법으로, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 항체를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이러한 장애의 예가 아래에서 더 설명된다.

[0299] 미국 특허 제 8,703,136 호 (전체 내용이 본원에 참고로 인용됨)에 상세히 기술된 바와 같이, 축삭 재생은 보체 시스템의 억제에 의해 향상될 수 있다는 것이 확인되었다. 따라서, 보체 시스템의 억제, 특히 MAC 형성의 억제에 대한 항-C6 항체의 사용은 축삭 재생을 필요로 하는 증상의 치료에 사용될 수 있다, 예를 들어, 중추 신경계 또는 말초 신경계의 손상 또는 질병에 의해 영향을 받는 포유류에서. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 축삭 재생을 필요로 하는 증상은 말초 또는 중추 신경계의 신경퇴행성 질환뿐만 아니라 물리적 손상을 포함한다.

[0300] 일 양태에서, 본 발명의 항체는 축삭 재생을 촉진한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "축삭 재생의 촉진" 또는 "신경 재생의 촉진"은 축삭 또는 신경 퇴행을 감소시키거나 예방하는 것과 구별된다. 축삭 또는 신경 재생의 촉진 (또는 조장)은 본 명세서에서, 축삭 또는 신경의 재생이, 치료되지 않은 대상과 비교하여 치료되는 대상에서 개선된다는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 개선된 축삭의 재생은 바람직하게는 치료되지 않은 대상과 비교하여 치료된 대상에서 초기(축삭 또는 신경 손상 후 또는 치료 시작 후) 시점에서 발생하는 재생이다. 축삭 또는 신경의 개선된 재생은 또한 치료되지 않은 대상과 비교하여 치료된 대상에서 더 높은 속도 및/또는 보다 큰 규모로 발생하는 재생을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 항체는 바람직하게는 감각 또는 운동 기능의 회복을 생성한다.

[0301] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에게서 신경을 재생시키는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 손상되거나 퇴행된 신경의 회복을 촉진 시키는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자의 신경 퇴행을 감소 또는 지연시키는 방법을 제공한다.

[0302] 환자는 물리적 손상으로 인한 신경 외상, 예를 들어, 말초 신경계 (PNS) 또는 중추 신경계 (CNS)의 손상, 예를 들어 물리적 손상(이하에서 더 논의됨)으로부터의 신경성 외상으로 고통받을 수 있다. 물리적 손상은 예를 들어, 외상(예: 사고), 외과적 손상 또는 비-외상성 손상(예: 신경 압박)일 수 있다. 일 양태에서, 항체는 손상 부위 또는 손상 부위 근처에 투여된다. 또한, 환자는 얻어진 및/또는 유전적인 면역-매개 염증 질환 및/또는 신경퇴행성 질환, 만성 탈수초화 신경병증, 다발성 경화증(MS) 또는 중증 근무력증(myasthenia gravis) 또는 근위축성 측삭경화증(ALS)과 같은 기타 신경 퇴행성 질환(이하에서 더 논의됨)으로부터 고통받을 수 있다.

[0303] 축삭 재생의 개선은 바람직하게는 인간 환자에서 비교적 쉽게 수행되는 기능적 시험에 의해 결정되며, 예를 들어, 감각 또는 운동 기능의 회복은 당해 기술 분야에서 이용 가능한 표준화된 시험에서 바람직하게 결정된다 (예를 들어 .g. Wong, K.H 외 (2006) Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 40:219-224; Jerosch-Herold (2005) Hand Surg. 30:252-264 참조). 적합한 시험은 바람직하게는 정량적이며, 표준화되어 있고, 보다 바람직하게는 그의 정신측정 특성이 평가되고 정량화되어있다. 이러한 테스트는 WEST(Weinstein Enhanced Sensory Test) 또는 SWMT(Semmes-Weinstein Monofilament Test) 및 촉각 인지 검사를 위한 STI(shape-texture identification)를 포함한다. 개선된 축삭 재생은 Hare, G.M.T 외 (1992) Plastic and Reconstr. Surg. 89:251-258 and De Koning, P. et al. (1986) J. Neurol. Sci. 74:237-246.에 의해 기술된 바와 같이 감각 또는 운동 기능의 회복을 위한 기능적 시험에 의해 시험 동물에서 실험적으로 결정될 수 있다. 항체는, 바람직하게는 전술한 시험에서 결정될 수 있는 바와 같이 감각 또는 운동 기능의 회복을 생성한다.

[0304] 실시예 8은 본 발명의 항-C6 항체가 감각 기능에 미치는 영향을 시험하는데 사용될 수 있는 동물 모델을 상세히 기술한다. 이 신경 압박 모델(좌골신경(nervus ischiadicus)의 압박)은 인간 C6가 보충된 C6-녹아웃-랫(PV C)의 감각 기능 회복에 대한 항-인간 C6 모노클로날 항체의 효과를 시험하는데 사용된다. 신경 압박은 말초 신경 손상의 모델이다. WO 2010/005310 (PCT / NL2009 / 050418); 및 de Jonge 외 (2004) Hum Mol Genet. 13 (3) : 295-302 참조.

- [0305] 개선된 축삭 재생은 또한 조직학적 검사에 의해 시험 동물에서 실험적으로 결정될 수 있으며, 예를 들어, 개선된 재수초화(remyelination)는 치료된 동물 대 비-치료된 동물에서 축삭 주위의 미엘린초의 축적을 비교함으로써 결정될 수 있으며, 더 두꺼운 미엘린초는 개선된 재수초화를 나타낸다. 더 효율적인 축삭 재생은 치료를 받지 않은 동물의 작은 축삭 군집과 비교할 때, 치료받은 동물에서 큰 직경의 단일 축삭 돌출(axon sprout)들이 생성되는 되는 것으로 결정될 수 있다.
- [0306] 항체의 적절한 투여량은 전술한 감각 또는 운동 기능의 개선에 의해 알 수 있는 바와 같이 축삭 재생을 촉진 시키는데 효과적인 양이다. "유효량", "치료학적 양" 또는 "유효 투여량"은 목적하는 약리학적 또는 치료학적 효과를 유도하기에 충분한 양을 의미하며, 따라서 손상 또는 장애의 효과적인 치료를 야기한다.
- [0307] 가능한 한 빨리 신경 손상을 최소화 및/또는 가능한 한 빨리 축삭 재생을 촉진하기 위해, 항체는 바람직하게는 신경 손상 발생 직후, 즉 24, 12, 6, 3, 2 또는 1 시간 내에, 보다 바람직하게는 45분, 30분, 20분 또는 10분 이내에 투여될 수 있다. 본 발명의 일 양태 예에서, 항체는 신경 손상을 최소화하기 위해 및/또는 신경의 외과적 손상시 즉시 축삭 재생을 촉진 시키기 위해 신경 손상 위험하에(하기 참조) 수술 전에 투여될 수 있다(예 : 예방 조치로서).
- [0308] 축삭 재생을 필요로 하는 다양한 질환가 본 발명의 항체로 치료될 수 있다. 상기 조건은 PNS의 손상뿐만 아니라 CNS의 손상을 포함한다. 상기 질환에는 물리적 손상으로 인한 신경 외상이 포함된다. 그러한 질환은 면역-매개 염증성 질환 또는 손상 및/또는 후천적인 및/또는 유전의 진행성 신경 퇴행성 질환을 포함한다.
- [0309] PNS 및 CNS의 물리적 손상은 외과적 손상 또는 비-외상성 손상을 포함하는 외상성 손상일 수 있다. 본 발명의 방법 및/또는 약제로 치료될 수 있는 외상성 PNS 및 CNS 손상은 척수 손상뿐만 아니라 충돌, 자동차 사고, 총상, 골절, 탈구, 열상, 또는 어떤 다른 형태의 관통 외상을 포함하는 말초 신경에 대한 외상을 포함한다. 치료될 수 있는 외상을 통해 손상된 말초 신경은 손가락 신경, 정중 신경, 척골 신경, 요골 신경, 안면 신경, 척수 더부신경 및 상완신경총 신경을 포함한다.
- [0310] 외과적 PNS 손상은 외과적 수술절차 중에 신경을 제거하거나 해부하는 것이 임상적으로 필요할 때 발생하는 말초 신경에 대한 손상으로 이해된다. 이것은 매년 수천 건의 외과 수술에서 발생한다. 본 발명의 방법 및/또는 약제로 치료될 수 있는 외과적으로 손상된 말초 신경의 한 예는 예를 들어, 발기 기능과 방광 조절을 지원하는 해면 신경으로; 이러한 신경은 종종 전립선 종양 및 그 주위의 조직을 수술적으로 제거하는 동안 손상을 입는다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 외과적으로 손상된 말초 신경의 또 다른 예는 관상 동맥 우회술(CABG) 후의 횡격막 신경이다.
- [0311] 본 발명의 항체로 치료될 수 있는 비-외상성 물리적 PNS 손상은 신경포착 증후군(entrapment syndromes)으로도 알려진 말초 신경의 압박 및/또는 부착을 포함한다. 가장 흔한 신경포착 증후군은 손목 터널 증후군이다(carpal tunnel syndrome).
- [0312] 또한, 면역-매개 염증 질환 또는 손상은 본 발명의 항체로 치료할 수 있다. 여기에는 자가 면역 기반을 가지고, 희돌기교세포(oligodendrocytes) 또는 미엘린에 직접적으로 야기되는 손상의 결과로 신경 탈수초를 일으키는 것으로 생각되는 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환이 포함된다. 그러한 탈수초성 질병은 예를 들어, 길랭-바레증후군(GBS; 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 급성 특발 다발 근신경염(acute idiopathic polyradiculoneuritis), 급성 특발 다발 신경염(acute idiopathic polyneuritis), 프랑스 소아마비 및 란드리상행 마비(Landry's ascending paralysis)라고도 함). 바람직하게는, 본 발명의 항체는 GBS에서 급성기 후에 축삭 재생을 촉진하기 위해 적용된다. 유사하게 GBS의 만성 대응물로 간주되는 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(CIDP)은 본 발명의 항체로 치료할 수 있다. 다발성 경화증(MS)은 본 발명의 항체로 치료할 수 있는 또 다른 탈수초성 질환이다.
- [0313] 본 발명의 항체로 치료할 수 있는 유전적 구성 요소를 갖는 신경 퇴행성 CNS 및/또는 PNS 질환에는 근위축성 측삭경화증(루게릭병으로 때때로 지칭되는 ALS), 샤르코-마리-투스병(유전성 운동 및 감각 신경병증, HMSN) 및 헌팅턴병(HD)이 포함된다.
- [0314] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 하기 실시예에 의해 더욱 제한적으로 해석되어서는 안 된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 서열 목록, 숫자 및 모든 참고 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참고로 인용된다.
- [0315] 실시예

[0316] 실시예 1: 래트 항-인간 C6 모노클로날 항체의 생성

[0317] 래트 항-인간 C6 모노클로날 항체는 PVG C6 -/- 균주의 5마리 래트를 인간 C6 단백질로 면역화하여 생성하였다. C6 결핍 래트가 선택되었는데, 이는 이 분야의 현재의 이해에 따라 정상적인 설치류에서 기능적 C6 항체를 생성하기가 극히 어렵기 때문이다. 인간과 설치류 사이의 C6 단백질의 상동성이 높기 때문에 야생형 동물에서는 C6에 대한 면역이 효율적이지 않다는 가설을 세웠다. C6 결핍 동물에서의 항체 반응은 순환계에서 기능적 C6 단백질이 없으므로 C6를 완전히 "외래"로 간주하기 때문에 보다 활발하다. 인간 C6은 세파로즈(GE Healthcare Cat No. 17-0717-01)에 커플링된 23D1 마우스 모노클로날 항체 23D1 (L. Clayton (2005) Ph.D. Thesis, Cardiff University에 기술됨)를 사용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 전체 인간 혈청으로부터 정제되었다.

[0318] 항원 및 예방접종: 예방 접종 1주일 전에 꼬리 정맥에서 100 μ l의 혈액을 채취하여 사전 예방 접종을 래트에게 실시했다. 예방 접종 1일에, 래트에게 주사 당 250 μ l의 부피로 완전프로인트항원보강제(Complete Freund's Adjuvant, CFA)에 100 μ g C6 항원을 피하 주사 (s.c.)로 4개의 위치에 주사하였다. 부스터 주사는 14일과 21일에, 다시 4개의 s.c. 위치에서, 불완전프로인트보강제(Incomplete (Freund's Adjuvant, IFA)에서 50 μ g의 C6 항원을 주사 당 250 μ l의 부피로 수행되었다. 시험 출혈은 in vitro 검사를 위해 꼬리 정맥에서 100 μ l의 혈액을 채취하여 36일째에 수행되었다. 5마리 래트 모두 C6에 대한 양성 면역 반응을 보인 이러한 실험 출혈을 C6 ELISA, C6 웨스턴 블롯 및 용혈 분석 (아래에 기술됨)에서 분석하였다: 5마리의 래트는 모두 용혈을 막는 항체를 가지고 있었고, 용혈 분석 및 모든 5마리의 래트는 웨스턴 블롯(변성 조건)에서 정제된 C6을 인식하는 항체를 가졌다. 예비 용합 부스터는 250 μ l의 PBS 내 100 μ g의 항원을 복강 내 주사하여 62일째에 수행되었다. 마지막으로, 예비 용합 부스터는 정맥 내(꼬리 정맥) 250 μ l의 PBS 내 100 μ g의 항원을 주사하여 64일째에 수행되었다. 2마리의 래트의 비장을 66일째에 수확하고(다른 3마리는 백업으로 남겨둠) 하이브리도마 제조에 사용된 분리된 비장 세포를 수확했다.

[0319] 하이브리도마 제조: 하이브리도마는 Luk, J. M. 외 (1990) J. Immunol. Methods 129:243-250에 기술된 바와 같이 기본적으로 표준 폴리에틸렌글리콜(PEG)-매개 용합을 사용하여 인간 C6-면역화된 래트로부터의 비장 세포를 Y3-Ag1.2.3 용합 파트너 세포와 용합시킴으로써 제조하였다. 상청액을 수확하고 인간 C6 항원으로 코팅된 96-웰 플레이트를 사용하여 ELISA를 통해 항-인간 C6 항체에 대한 초기 스크리닝에 사용하였다. 양성 클론을 선택하여 서브클로닝 하였다. 추가 분석을 위해 38개의 양성 클론을 선정하였다.

[0320] 용혈 분석: 보충원으로 인간 혈청을 사용한 1:50 희석 용혈 분석에서 이들 38개의 상청액 및 대조 상청액을 추가로 시험 하였다. 이 분석에서, 보체 활성화 항원으로 코팅된 적혈구를 혈청 존재하에서 항은 배양한다. 혈청은 보체 시스템의 성분을 함유하고 있으며 코팅된 적혈구가 발견될 때 전형적인 경로를 통해 활성화된다. 막 공격 복합체 (MAC)는 말단 보체 시스템의 일부로서 형성되고, MAC은 적혈구의 용해를 개시한다. 적혈구 용해는 상청액에서 405 또는 415 nm에서 OD를 측정하여 정량화할 수 있으며 MAC의 활성을 직접 측정한다. 보체 저해제가 효과적이라면 적혈구 용해를 양적으로 방지하기 때문에 이 시스템에서 보체 저해제를 테스트할 수 있다.

[0321] 분석을 수행하기 위해, CFT 완충액 (Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany)과 함께 사용할 준비가 된 용혈 시스템을 상업적으로 구했다 (Virion / Serion GmbH, Wurzburg, Germany). CFT 완충액은 제조자의 지시에 따라 준비되었다. 용혈 시스템은 적혈구를 철저히 혼합하기 위해 저온실의 롤러 뱅크(rollerbank)에 놓았다. CFT 혈청 각테일을 만들기 위해 100 μ l의 인간 혈청을 5ml의 CFT 완충액에 넣었다. 50 μ l의 부피에서 시험 저해제의 희석액을 등근 바닥 96-웰 플레이트에 첨가하고, 50 μ l의 CFT 혈청 각테일을 각 웰에 첨가하고, 피펫팅 하면서 조심스럽게 혼합하고, 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 양성 대조군은 EDTA였다. 음성 대조군은 무혈청 또는 C6 결핍 혈청이었다. 배양 후, 플레이트를 2000rpm에서 5분 동안 회전시켜 (Hettich 탁상 원심 분리기) 80 μ l의 상등액을 405 또는 415 nm에서 측정하기 위해 평평한 바닥판에 옮겼다. OD는 이동 10분 이내에 측정되었다.

[0322] 적혈구 용해를 예방 하는지를 결정하기 위해 시험 상청액을 용혈 분석에서 희석하여 첨가하였다. 특정 상청액이 다른 것보다 더 강한 저해 활성을 나타냄을 입증하는 예시적인 결과가 도 1a에 도시되어 있다. 특히, 상청액 #6-12는 다른 상청액보다 강한 저해를 나타내었고, 상청액 #11 및 #12는 가장 강한 저해를 보였다. 상청액 (1:50 희석)은 또한 보충원으로 래트 혈청을 사용하는 용혈 분석에서 시험되었고, 저해 효과는 관찰되지 않았으며, 항체의 저해 활성은 인간 C6에 특이적이라는 것을 입증하였다.

[0323] MAC ELISA 분석: 상청액이 MAC 형성을 차단할 수 있는지를 결정하기 위해 두 번째 분석을 사용하였다. 이 분석에서 플레이트의 ELISA 웰은 만난(Mannan) 또는 IgG로 코팅하여 혈청 존재하에서 각각 렉틴 또는 보체의 전형적인 경로를 유발한다. 혈청은 보체 시스템의 성분을 함유하고 있으며 코팅된 플레이트에 노출되었을 때 어느 경

로를 통해 활성화된다. 막 공격 복합체(MAC)는 말단 보체 시스템의 일부로 형성되며 MAC은 ELISA 플레이트에 침전된다. 플레이트상의 MAC 침전은 HRP-결합 항체에 의해 검출될 수 있고 색원체(chromogen) 및 기질의 존재 하에서 효소 반응에 의해 가시화 될 수 있다. 이 반응은 450 또는 655 nm에서 OD를 측정하여 정량화 할 수 있는 색상을 만든다. OD는 MAC 형성량의 직접 측정이다. 보체 저해제가 효과적이라면 플레이트 상에 MAC의 침전을 방지하거나 억제할 수 있기 때문에, 이 시스템에서 시험 할 수 있다.

[0324] 하이브리도마 상청액을 시험하기 위해 사용된 두 번째 분석에서, 만난 활성화 보체 ELISA 분석이 수행되었다. 간단히 말해, ELISA 플레이트를 만난으로 희석하고, 희석된 하이브리도마 상청액을 코팅하고 인간 혈청을 첨가하였다. 만난 코팅 플레이트에서 복합체를 형성하는 보체 성분은 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 이 특정 검사에서, C9는 MAC 형성의 지표로서 검출되었다. 상청액이 없을 때 보 다 상청액이 존재할 때 C9가 더 적게 검출된다면, 이것은 MAC 저해를 나타낸다. 사용된 양성 대조군은 EDTA (반응은 칼슘 의존적이기 때문에)였다.

[0325] 분석을 수행하기 위해, 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 15 mM NaN₃, pH 9.6), 블로킹 버퍼 (1 mg/ml BSA/HAS, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 145 mM NaCl, 15 mM NaN₃, pH 7.4) 워시 버퍼 (1×TBS, 0.05% Tween 20, 5 mM CaCl₂) 및 희석 버퍼 (4 mM 바르비탈(barbital), 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.3% BSA, 0.02% Tween 20)가 준비되었다. 평평한 바닥의 고 결합 96-웰 플레이트의 웰을 10 µg/ml 만난(Sigma, 카탈로그 번호 M7504)을 함유하는 100µl의 코팅 버퍼로 코팅하고 4℃에서 밤새 배양하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 200µl의 블로킹 버퍼로 차단시켰다. 희석 버퍼(1:100) 중의 인간 혈청을 둥근 바닥 플레이트에서 상청액 (1:50)으로 희석하고, 평평한 바닥의 고 결합 플레이트에 웰 당 50µl 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, 워시 버퍼로 3회 세척하였다. 항-C5b-9neo (clone aE11, DAKO, 카탈로그 번호 M0777)를 희석 버퍼에서 1:100으로 희석하고, 웰 당 50µl를 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 워시 버퍼로 3회 세척하였다. 항-마우스 HRP (DAKO, Cat. No. P0447)를 희석 버퍼에서 1:2000으로 희석하고 웰 당 50µl를 첨가하고 플레이트를 실온에서 30분 동안 배양한 다음 워시 버퍼로 3회 세척하였다. 발달을 위해 50µl TMB 색원체 (TMB : Sigma T2885, DMSO에서 10 mg/ml TMB으로 제조된 저장 용액)과 10µl 3% H₂O₂ 가 5 ml NaAc 버퍼에 첨가되고 (8.2 gm 아세트산 나트륨, 1리터 H₂O에서의 21 gm 시트르산 모노하이드레이트) 96-웰 플레이트에 분배하였다. 25µl 1M H₂SO₄로 반응을 멈추고 450 nm/655 nm에서 분광 광도계로 OD를 측정하였다.

[0326] 이 분석의 예시적인 결과를 상청액 # 11의 분석된 모든 클론 중 가장 우수한 저해능과 함께, 두 개의 상청액, # 11 및 # 17이 다른 36개의 상청액보다 현저하게 우수한 저해능을 갖는다는 것을 입증하는 도 1b에 나타내었다.

[0327] 상청액 # 11이 용혈 분석 및 MAC ELISA 분석 모두에서 가장 강한 억제를 나타내기 때문에, 이 하이브리도마를 추가적인 특성화를 위해 선택하였다. 이 하이브리도마에 의해 생성된 모노클로날 항체를 본 명세서에서는 7E5라 칭한다.

[0328] 실시예 2: 7E5 모노클로날 항체의 특성화

[0329] 이 실시예에서, 추가 실험을 수행하여 래트 항 - 인간 C6 모노클로날 항체 7E5의 결합 및 기능적 특성을 추가로 조사하였다.

[0330] 교차 반응성: 웨스턴 블롯은 사이노몰구스 원숭이(Cyno)의 혈청 및 인간 혈청을 사용하여 수행되었다. 인간 및 Cyno 혈청을 PAGE (10% 겔) 및 표준 웨스턴 블롯팅에 사용하였다. 항체를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 배양하였다. LAS3000(Fuji) darkbox 영상 시스템에서 항-래트 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP) (DAKO, 1:1000) 및 Lumilight (Roche)를 사용하여 검출을 수행했다. 결과는 7E5가 인간과 사이노몰구스 원숭이 C6을 모두 인식할 수 있음을 나타내었다.

[0331] 결합 동역학: C6에 대한 7E5 결합의 동역학을 연구하기 위해 연구용 CM5 센서 칩이 장착된 BIACORE 2000 (GE Healthcare)에서 표면 플라즈몬공명 측정을 사용하였다. 아민-커플 링 화학을 이용하여 리간드 (C6, 113 kDa)를 고정시켰다. 유동 세포 2의 표면을 0.1M NHS (N- 히드록시숙신이미드)와 0.4M EDC (3-(N, N-디메틸아미노) 프로필-N-에틸카르보디이미드)의 1:1 혼합물로 7분 동안 유속 5µl/min으로 활성화시켰다. pH 5.0의 10 mM 아세트산나트륨 중 10µg/ml 농도의 리간드를 955 RU의 밀도로 고정시켰다. 표면을 1M 에탄올아민 (pH 8.0)을 7분간 주입하여 차단시켰다.

[0332] 유동 세포 1을 초기 실험 (aVWWF; 987 RU)의 항체로 고정시키고 기준 표면으로 사용하였다.

[0333] 동역학 결합 데이터를 수집하기 위해, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005 % P20, pH 7.4에서 분석물 (항-C6 항체, 150 kDa)을 30 μ l/min의 유속으로 25℃의 온도에서 2개의 플로우 셀에 주입하였다. 주입된 농도는 항체마다 다르다. 데이터는 1 Hz의 속도로 수집되었다. 복합체는 각각 90초와 300초 동안 결합 및 해리 할 수 있었다. 표면을 0.1 M HCl의 10초 주입으로 재생시켰다. 각 시료와 버퍼 블랭크를 두 표면에 똑같이 (무작위 순서로) 주사했다.

[0334] 이 데이터는 BiaEvaluation 4.1 소프트웨어에서 사용할 수 있는 글로벌 데이터 분석 옵션을 사용하는 간단한 1:1 상호 작용 모델에 적합했다. Biacore 동역학 결과는 도 2에 표시되어 있다. 대표 실험 결과도 아래 표 1-4 에 요약되어 있다.

표 1

ka	1.69 x 10 ⁴ M ⁻¹ s ⁻¹
kd	4.27 x 10 ⁻⁶ s ⁻¹
K _D	2.53 x 10 ⁻¹⁰ M
Rmax	36 RU
Rmax	95%

[0335]

[0336] 표면 플라즈몬공명에 의해 결정된 7E5 결합의 동역학

표 2

kd (s ⁻¹)	t _{1/2} (sec)	t _{1/2} (min)	t _{1/2} (hour)
4.27 x 10 ⁻⁶ s ⁻¹	162330	2705.5	45.1

[0337]

[0338] 7E5 결합의 복합체 반감기

표 3

kd (s ⁻¹)	Time (min)	Time (hour)	R (RU)
4.27 x 10 ⁻⁶ s ⁻¹	200.2	3.3	34

[0339]

[0340] 7E5 결합의 5% 해리까지 시간

표 4

kd (s ⁻¹)	Time (min)	Time (hour)	R (RU)
4.27 x 10 ⁻⁶ s ⁻¹	11692.9	194.9	2

[0341]

- [0342] 7E5 결합의 95% 해리까지 시간
- [0343] 7E5의 K_D 는 2.5×10^{-10} M으로 계산된다. 이 높은 친화도는 주로 높은 항체-항원 복합체 반감기 (45시간)에 의해 유발된다. 따라서, 7E5 결합은 매우 안정하며, 7E5-C6 복합체의 반감기는 40시간 이상으로 추정된다.
- [0344] Fc 감마 수용체에 의한 결합 및 세포 흡수 후 항원-항체 복합체가 엔도솜 및 리소솜에서 방출될 수 있는지를 결정하기 위해, 7E5-C6 복합체의 민감도를 낮은 pH에서 시험하였다. 리소솜에서는 pH가 약 4.8이므로 복합체 안정성은 pH = 4까지 테스트되었다. 이 BIACORE 실험에서 칩 상의 7E5-C6 복합체는 pH를 감소시키는 버퍼로 세척되었다. Hepes buffered saline (HBS)을 pH 7.4, 7.0 및 6.5에 사용하였고, 10mM 아세트산 나트륨을 pH 6.0, 5.5, 5.0, 4.5 및 4.0에 사용하였다. 복합체의 안정성은 낮은 pH에 민감하지 않다는 것이 관찰되었다.
- [0345] 용혈 분석에 대한 사전 배양의 영향: BIACORE 실험은 C6에서 7E5의 느린 방출이 7E5의 K_D 의 일차적 결정 인자라는 것을 밝혀내었으므로, 적혈구를 첨가하기 전에 보체 원(인간 혈청)과 함께 7E5의 사전 배양이 용혈 분석에서 억제 효능을 증가시켰는지 조사하였다. 7E5를 실온 (20°C)에서 30분, 90분 또는 180분 동안 인간 혈청과 사전 배양한 후, 적혈구를 첨가하고 반응을 37°C에서 시작하였다. 그 결과, 3시간까지 사전 배양 시간을 증가시키지 않아도 용혈 억제 효과가 더 향상되지 않았다. 이는 이 반응에서 7E5에 의한 C6 결합의 동역학이 C6가 효과적으로 수분 내에 완전히 복합체화 되고 중화되는 것과 같다는 것을 의미한다.
- [0346] 실시예 3: 7E5 모노클로날 항체의 에피토프 맵핑
- [0347] 펩타이드 어레이는 인간 C6에서 7E5의 에피토프를 결정하는데 사용되었다. C6 단백질 서열로부터 연속적으로 중첩되는 16mer 펩타이드 (펩타이드 16개 아미노산 길이, 중첩된 14개 아미노산)를 합성하고 멤브레인 상에 그리드 패턴으로 스폿팅 하였다. 이어서, 멤브레인을 7E5 항체와 함께 배양하여 어느 펩타이드가 항체에 의해 인지되는지를 검출하였다. 7E5에 의해 인식되는 일차 펩티드 서열은 GSCQDGRQLEWGLERT (펩타이드 418) (서열번호 1)이었다.
- [0348] 이어서, 선택된 펩타이드에 대한 알라닌 스캔 (아미노산을 하나씩 대체하기 위해 알라닌을 사용함)을 수행하여 에피토프를 정확하게 나타냈다. 이 연구에서, 펩티드 418의 변형에 더하여, 418과 비교해 4개의 아미노산들이 이동된 펩티드 420 (DGRQLEWGLERTLSS) (서열번호 2), 및 그의 알라닌 변형 중 몇 개는 7E5의 결합을 나타냈다. 따라서, 7E5의 주된 에피토프의 일부를 형성하는 아미노산은 펩타이드 418 및 420: GSCQDGRQLEWGLERTLSS (서열번호 3)를 조합한 펩타이드 서열 내에 있을 것으로 예상된다.
- [0349] 도 4a는 인간 (서열번호 50) 및 래트 C6 (서열번호 51)의 펩타이드 418 및 주변 영역의 서열을 나타낸다. 도 4b에 개략적으로 도시된 바와 같이, 펩티드 418은 부분적으로 C6의 제1 FIM 도메인의 말단에 위치한다.
- [0350] 다른 항체가 7E5 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해, Biacore 교차 차단 실험을 C6 항원을 칩에 결합시킨 다음, 단일 항-C6 항체 (대조군) 또는 제1 항-C6 항체 (항체 1), 이어서 제2 항-C6 항체 (항체 2)를 사용하여 수행하였다. 마우스 mAb 27B1이 래트 모노클로날 항체 7E5와 동일한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위한 교차 차단 실험의 결과를 도 3A-D에 나타내었고, 도 3A는 27B1을 항체 1로, 7E5를 항체 2로 사용한 결과를 나타내고, 도 3B는 7E5를 항체 1로, 27B1을 항체 2로 사용한 결과를 나타내며, 도 3C는 27B1 단독에 대한 결과를 나타내고, 도 3D는 7E5 단독에 대한 결과를 나타낸다.
- [0351] 실시예 4: 7E5 모노클로날 항체의 in vivo 효과
- [0352] 7E5가 살아있는 동물에서 C6을 차단할 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 인간 C6으로 보충된 C6 결핍 PGR 래트를 사용하였다. 이 접근법은 7E5가 인간 C6에 특이적이고 래트 C6을 차단할 수 없기 때문에 사용되었다. C6 결핍 래트에서 인간 C6은 완전한 보체 시스템 기능성 및 MAC 활성을 회복시키기 위해 주입될 수 있고, 7E5의 효과는 래트 C6에 의한 교란 효과 없이 측정될 수 있다.
- [0353] 먼저, 이 접근법은 인간 C6을 주사 한 2마리의 래트에서 용혈 활성을 측정하여 시험하였다. C6 주사 후 시간 경과에 따라 여러 혈액 샘플을 채취함으로써 래트에서의 C6의 반감기는 약 48시간으로 추정되었다. 2마리의 C6 결핍 래트에게 IV에 4mg/kg의 인간 C6을 주사했다. C6의 주입 후 10분, 24시간 및 48시간 후에 혈액 샘플을 채취하였다. 모든 혈액 샘플의 응고 후, 응고물 (실온에서 10분 동안 에펜 도르프 테이블 원심 분리기에서 13,000 rpm으로)을 회전시켜 혈청을 분리하였다. 혈청을 실시예 1에 기재된 용혈 분석에 사용하여 MAC 활성을 측정하였다. 야생형 PVG 래트의 혈청 및 처리되지 않은 C6 결핍 래트를 최대 및 최소 용혈 활성에 대한 기준으로 사용하였다. 용혈 분석을 사용하여, 래트에서 인간 C6의 반감기는 약 48 시간으로 추정되었다.

- [0354] 파일럿 실험에서 한 암컷 C6 결핍 PVG 래트 (체중 220g)에 높은 12mg 용량의 7E5를 복강 내 주사하고 2mg의 인간 C6 (정맥 내 주사)을 보충하였다. 인간 C6은 C6 항체로 코팅된 컬럼에서 친화성 정제를 사용하여 인간 혈청으로부터 분리하였다. C6은 7E5 볼러스 주입 전 24시간 전과 5분 후에 1mg씩 투여되었다. 대조군 래트 (7E5 처리 래트와 같은 체중)는 C6 주사만 받았다. 용혈 분석을 위한 혈액은 7E5 주사 후 60분에 그려졌다. 그 결과는 도 5에 나타내었다. 결과는 7E5 투약 60분 후에 용혈 활성이 7E5에 의해 차단되어 7E5가 in vivo에서 MAC 형성을 차단할 수 있음을 입증하였다.
- [0355] 후속 실험에서, 2개의 C6 결핍 암컷 래트 (PVG 군주)에 1mg C6을 주사하였다. 정상 및 보충된 용혈 활성을 확인하기 위해 C6 주사 전 및 C6 주사 후 (IV 1 mg) 혈액 샘플을 채취했다. C6 주사 후 10분, 7E5는 8mg IP 또는 2mg IV로 투약 되었다. 7E5 투여 후 60분에 혈액 샘플을 채취하여 7E5가 용혈 활성에 미치는 영향을 평가하였다. 두 투약 전략 모두 혈액에서 MAC 활성을 차단하였다. 그 다음 동일한 래트에 1mg의 다른 C6을 IV 주사했다. 새로운 C6 보충 후 15분 동안의 혈액 표본은 단지 용혈 활성의 완만한 증가를 보였으나, 자유 순환 7E5에 의해 두마리의 래트 모두에서 용혈 활성이 억제된 것으로 추측되었다.
- [0356] 위에서 설명한 실험은 7E5가 살아있는 동물에서 C6을 차단할 수 있음을 보여준다.
- [0357] 실시예 5: 7E5 모노클로날 항체의 시퀀싱 및 재조합 발현
- [0358] 7E5 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 표준 절차에 의해 결정하였다.
- [0359] VH 영역의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:
- [0360] gaggtgcagctggtggagctgatggaggcttagtgcagcctggagggtccctgaaactctcctgtgtagcctcaggattctctttcagtgactattacatggcctgggtccgccagggtccaacgaagggtggagtggtcgcaaccattaatatgatggtagtagtacttactatcgagagtcctgaagggccgattcactatctccagagataatgcgaacgcaccctatacctgcaaatggacagctctgaggtctgaggacacggccacttattactgttcaagaccttctacggaggccctgtttgcttactggggccacggcactctggtcactgtctcctca (서열번호 4)
- [0361] VH 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0362] EVQLVESDGLVQPGSLKLSVASGFSFDYYMAWVRQGPVKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNKRTLYLQMDSLRSEDATYYCSRPEALFAYWGHGTLVTSS
- [0363] (서열번호 5)
- [0364] VH CDR1, CDR 및 CDR 3의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0365] CDR1: DYYMA (서열번호 6)
- [0366] CDR2: TINYDGSSTYYRESVKG (서열번호 7)
- [0367] CDR3: PSTEALFAY (서열번호 8)
- [0368] VL 영역의 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:
- [0369] gatgttgtgtgaccagactccatccacattatcggtaccattggacaatcggtctccatctcttgcaggtcaagtcagagtctcttaaatgatgttggaacacctatttatattggtatctacagaggcctggccaatctccacagcttctaatatttttggtctccgacctgggactctggggtccccaacaggttcagtggcagtggtcaggaacagatttcacactcaaaatcagtgagtgaggctgaggatttggaatttattactgcatgcaagctagtcagctccgtacagtttgagctgggaccaacctggaactgaaa (서열번호 9)
- [0370] VL 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0371] DVVLTPSTLSATIGQSVSISCRSSQSLNDVGNITYLYWYLQRPQSPQLLIYLVSDLGSGVGNRFSGSGSGTDFTLKISGVEADLGIYYCMQASHAPYTFGAGTNLELK (서열번호 10)
- [0372] VL CDR1, CDR 및 CDR3의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0373] CDR1: RSSQSLNDVGNITYLY (서열번호 11)
- [0374] CDR2: LVSDLGS (서열번호 12)
- [0375] CDR3: MQASHAPYT (서열번호 13)

- [0376] 생산 세포주 (Hek-293 세포)에서의 발현을 위한 코딩 서열의 최적화 및 클로닝을 위한 적절한 제한 부위의 도입에 이어서, 발현 카세트를 제조하였다. 합성 된 7E5의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 pMQR 진핵 발현 벡터 세트 (pMQR-hIgG1 및 pMQR-hIgK)에 클로닝하여 인간-랫 키메라 제조항체를 생성하였다. 생성된 클론의 서열 분석 결과, 두 서열 모두 올바르게 클로닝된 것으로 나타났다. 두 7E5 가변 영역을 모두 포함하는 pMQR 진핵 세포 발현 벡터를 Hek-293 세포에 형질 감염시키고 이들 세포는 제조항체를 생산하도록 허용되었다. 생산 후 hIgG1/hIgK 항체는 포획된 ELISA를 통해 폐 상청액에서 검출되었다. 형질 감염 상청액에는 0.019 mg/ml의 제조항 7E5가 포함되어있는 것으로 나타났다.
- [0377] 실시예 6: 7E5 모노클로날 항체의 인간화
- [0378] 부위 특이적 돌연변이 유발 과정에 기초한 항체 인간화 방법 대신, 황과 그의 동료들에 의해 기술된 바와 같이, 인간과 쥐과(murine) 항체 사이의 CDR-상동성에 기초한 인간화 접근법을 사용하여 랫 7E5 모노클로날 항체를 인간화하였다 (Methods. 2005, 36:35 -42). 이 방법은 비인간 및 인간 항체가 유사하게 구조화된 CDR을 갖는 경우, 좋은 친화력을 유지하면서 인간 프레임워크 또한 비인간 CDR을 서포트한다는 원리에 기초한다. 이 방법에서, 인간 프레임워크 서열은 인간화된 항체(동일한 Chothia 정준 구조)에 대한 인간 CDR의 구조적 유사성에 기초한 인간 생식 계열 유전자 세트로부터 선택된다. 이틀 FR 잔기를 함유하는 Fab 변이체 서열의 파지 디스플레이 라이브러리가 생성된다. 친화력에 의한 선택 후, 개별 클론은 결합 및 오프-레이트에 대해 스크리닝되고, 서열 인간 동일성 및 상동성이 결정된다.
- [0379] 이 작업에 적용된 7E5 랫 항체를 인간화하는 과정은 다음의 단계들로 구성된다:
- [0380] 1 - 인간화 라이브러리의 설계 : 가장 가까운 인간 생식 계열의 식별 및 이들 인간 생식 계열에서 벗어난 랫 VH 및 VK FR 잔기의 동정.
- [0381] 2 - 7E5 유전자 라이브러리의 조립 (PCR을 통해 가변 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 사슬 코딩 유전자를 합성적으로 생성하기 위해 중첩 올리고 뉴클레오티드를 사용함).
- [0382] 3 - 인간 불변 중쇄 (CH1) 및 경쇄 (C_K)(라이브러리 구성)을 함유하는 파지미드(phagemid) (pCB13-CK1/3)에 이들 유전자 라이브러리를 클로닝한다.
- [0383] 4 - 파지 디스플레이 및 친화성 선택을 이용한 기능적 Fab의 선택.
- [0384] 5 - 오프-레이트(Biacore) 및 시퀀싱에 대한 스크리닝.
- [0385] 6 - hC6에 대한 결합을 잃지 않으면서 가장 높은 인간 동일성 및 상동성을 갖는 Fab의 선택.
- [0386] 7 - 추가의 친화성 측정 및 기능 분석에 사용되는 8개의 인간화된 리드의 생산 및 정제.
- [0387] 인간화 라이브러리의 설계: 랫 7E5 항체 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 및 공개 데이터베이스 앤트 툴을 사용하여, 7E5가 생식 계열 세그먼트로 IGHV5S45*01, IGHD1-6*01, IGHJ3*01 및 IGKV2S27*01, IGKJ2-3*01을 사용하는 것을 확인하였다. 7E5의 CDR H1 및 CDR H2에 대한 정준 폴드 조합은(canonical fold combinations) 1-3이고, CDR L1 및 CDR L2의 7E5에 대한 정준 폴드 조합은 4-1이다.
- [0388] CDR1 및 CDR2에 대해 동일한 정준 폴드 조합 1-3을 갖는 인간 생식 계열과 7E5 VH 서열의 비교는 가장 가까운 일치로서 인간 생식 계열 VH3 패밀리를 나타냈다. 가장 가까운 인간 JH 생식 계열은 IGHJ4이다. 이러한 생식 계열 분절에 대한 정렬을 도 6a에 나타내었다. 7E5 중쇄 아미노산 서열은 또한 서열번호 5에 나타내었다. 인간 생식 계열 VH3_1 아미노산 서열은 또한 서열번호 48에 나타내었다. 인간 생식 계열로부터 벗어난 FR 잔기의 식별을 가능하게 하는 FR 및 CDR이 표시된다.
- [0389] 유사한 분석을 사용하여 7E5 V_K 서열에 대해 가장 가까운 인간 생식 계열이 인간 VK2 패밀리를 5인 것으로 확인되었다. 가장 가까운 인간 JH 생식 계열은 IGKJ2 및 IGKJ5이다. 이러한 생식 계열 세그먼트에 대한 정렬은 도 6b에 도시된다. 7E5 경쇄 아미노산 서열은 또한 서열번호 10에 나타내었다. 인간 생식 계열 VK2_5 아미노산 서열도 서열번호 49에 나타내었다. 인간 생식 계열로부터 벗어난 FR 잔기의 식별을 가능하게 하는 FR 및 CDR이 표시된다.
- [0390] 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 각각 인간화 라이브러리에 대해 인간 잔기가 포함된 7E5 VH 서열에 대해서는 13 위치, 7E5V에 대해서는 16 위치가 있었지만, 변화가 항원 결합에 해로운 경우에는 랫의 잔기도 포함되었다. 돌연변이할 위치의 수와 위치 당 변이의 수를 고려하여, 도입된 다양성을 포괄할 수 있는 라이브

러리 크기는 각각 VH 및 V_K 라이브러리의 경우 8.2×10^3 및 9.8×10^4 이다.

- [0391] 인간화 7E5 Fab 라이브러리의 구축: 최종 인간화된 7E5 Fab 파지 디스플레이 라이브러리의 구축을 위해, 초기에는 2개의 상이한 서브 라이브러리가 구축되었다 :
- [0392] 1 - VH 인간화 7E5 VH 유전자가 인간 불변 영역 CH1 및 C_K를 코딩하는 유전자를 함유하는 pCB13-CK3 파지미드 내로 WT 7E5V_K와 함께 클로닝 된 Fab 서브 라이브러리.
- [0393] 2 - VL 인간화 7E5 V_K 유전자가 WT 7E5VH와 함께 인간 불변 영역 CH1 및 C_K를 코딩하는 유전자를 함유하는 파지미드 벡터 pCB13-CK1 및 pCB13-CK3로 클로닝 된 인간화 Fab 서브 라이브러리.
- [0394] 클로닝 전략 및 사용된 두 개의 상이한 파지미드의 서열로 인해, pCB13-CK1로부터 생산된 클론의 경쇄 V 영역의 104 내지 107 위치의 잔기는 LEIK (인간화 7E5 서열)에 상응 할 것이지만, pCB13-CK3에서 생산된 클론의 V 영역 경쇄는 동일한 위치에 아미노산 LELK (7E5 WT V_K 서열)를 나타낼 것이다.
- [0395] 중쇄 및 경쇄가 모두 인간화된 최종 Fab 라이브러리 구축을 진행하기 위해 두 개의 최종 서브 라이브러리를 인간 C6에 대해 패닝하고 결합 클론을 회수하였다.
- [0396] 합성 유전자 조립 : 상이한 인간화 중쇄 및 경쇄 서브 라이브러리를 구축하기 위해, 유전자 조립에 의해 인간화 7E5 VH 및 V_K 유전자가 생성되었다 (Cherry, J. 외 (2008) J Biochem Biophys Methods, 70 : 820- 2, Stemmer, WP 외 (1995) Gene, 164 : 49-53).
- [0397] 인간화 7E5 VH 및 V_K 서브 라이브러리 구축 : 7E5 VH Fab 서브 라이브러리의 구축을 위해, 유전자 조립에 의해 생성된 약 400 bp의 합성 VH 유전자 및 7E5 VWTW를 코딩하는 DNA 단편을 파지미드 pCB13-CK3 (인간의 불변 중쇄 및 카파 경쇄 코딩 유전자를 함유함)에 클로닝 하였다.
- [0398] 7E5 V_K Fab 서브 라이브러리의 구축을 위해, 유전자 조립에 의해 생성된 약 400 bp의 합성 V_K 유전자 및 7E5 VH WT를 코딩하는 DNA 단편을 ApaLI/XhoI 부위 및 NcoI/NheI를 통해 각각 파지미드 pCB13-CK1 및 pCB13-CK3(인간의 불변 중쇄 및 카파 경쇄 코딩 유전자를 함유함)의 등몰(equimolar) 혼합물에 클로닝 하였다.
- [0399] 클로닝 과정에서 생성된 새로운 벡터를 전기천공법에 의해 대장균 TG1 세포로 형질전환시켰다. 라이브러리의 크기는 LBA Carbenicillin (100 μ g/ml), Glucose 2 %에서 TG1 형질 전환 세포의 5 μ l 반점으로부터 계산되었고, Fab 삽입의 백분율은 콜로니 PCR에 의해 결정되었다. 서브 라이브러리의 크기 및 삽입 백분율은 아래 표 5에 요약되어 있다.

표 5

[0400]

인간화 7E5 서브 라이브러리에서 얻은 크기 및 삽입 백분율					
서브 라이브러리	라이브러리 크기	삽입 %	최종 라이브러리 크기	최대 이론적 다양성	다양성 적용 범위 (이론적 다양성 초과)
인간화 7E5 VH	2.4×10^8	95%	2.3×10^8	8.2×10^3	~28,000 폴드
인간화 7E5 V _K	1.7×10^8	91%	1.5×10^8	9.8×10^4	~1,500 폴드

- [0401] 서브 라이브러리는 또한 라이브러리 당 48개 클론들의 DNA 서열 분석으로 QCed되었다. CLC Main Workbench Software를 사용하여 아미노산 서열을 추출했다. 유효한 VH 및 V_K 서열 및 위치 당 WT 또는 돌연변이 된 잔기의 빈도 분석 결과, 약 50/50의 WT/돌연변이 비율로 서브 라이브러리가 성공적으로 설계되고 구성되었으며(V 유전자의 103 위치의 경우 33/33/33), 설계된대로 평균 FR 돌연변이 수를 얻었다.
- [0402] 인간화 7E5 VH 및 V_K 서브 라이브러리의 패닝 선택: 파지는 2 개의 서브 - 라이브러리로부터 제조되었고 코팅된 인간 C6에 대한 1차 선택을 위해 사용되었다. 이 선택 라운드의 목표는 비-결합 Fab로부터 서브 라이브러리를 정리하는 것이었고, 따라서 엄격한 조건은 적용되지 않았다.
- [0403] 패닝 선택을 위해 5 및 0 μ g/ml의 인간 C6을 96-웰 Maxisorp 플레이트 (Nunc)에 코팅하고 저지방 분유 (PBS 중 Marvell 4 %)로 차단시켰다. 서브 라이브러리 파지 및 이후의 세척으로 2시간 동안 배양한 후, 트립신 용출 (10mg/ml)을 실온에서 수행하였다. 프로테아제 활성은 16 mM 프로테아제 억제제 ABSF를 적용하여 즉시 중화시켰다.

- [0404] 모든 파지 결과물을 대수적으로 성장한 대장균 TG1 세포에 감염시켰고 감염된 박테리아 5 μ l를 출력 분석 및 농축 측정을 위해 아가 플레이트(LBAGluc2 % Carb100 μ g/ml)에 평판 배양했다. 농축은 인간 C6으로부터 용출된 파지의 수 대비 단백질 없는 조건으로부터 용출된 파지의 수 사이의 비율로 계산하였다. 인간화 7E5 V_K 및 VH Fab 서브 라이브러리 모두에 대해 배경 (PBS)에 비교하여 매우 우수한 농축물이 관찰되었다.
- [0405] 최종 인간화 7E5 Fab 파지 디스플레이 라이브러리의 제작: 최종 인간화 7E5 Fab 라이브러리는 7E5 VH Fab 서브 라이브러리로부터 선택된 클론으로부터 회수된 인간화 중쇄 (VHCH)를 7E5 VH Fab 서브 라이브러리로부터 선택된 회수된 인간화 경쇄 (V_KCK)와 조합함으로써 구성된다. 생성된 라이브러리의 크기는 LBA Carbenicillin (100 μ g/ml), Glucose 2% 에서 TG1 형질 전환 세포의 5 μ l 반점으로부터 계산하였고, Fab 삽입의 백분율은 콜로니 PCR 에 의해 결정하였다.
- [0406] 인간화 7E5 Fab 라이브러리의 선택: 래트 WT 7E5 항체와 비교할 때, 친화성의 손실이 없거나 개선된 친화성을 갖는 인간화 변이체를 선택하기 위해, 인간화 7E5 Fab 라이브러리를 이용한 용액 내 파지 디스플레이 선택을 비오틴화된 hC6 항원을 사용하여 수행하였다. 뉴트라비딘 코팅 플레이트에 포획된 비오틴화 C6을 검출하기 위해 인간 C6는 비오틴화 되고, 항-인간 C6 항체 7E5를 사용하는 SDS-PAGE, 웨스턴 블롯 및 ELISA에 의해 QC된다. 항원 농도가 라운드에서 라운드로 감소하고, 파지 인풋이 라운드 1에서 라운드 2로 또한 감소하는 친화성 선택의 3연속 라운드가 수행되었다. 두 번째 및 세 번째 선택에서, 뉴트라비딘으로 포획된 인간 C6과 함께 항원 배양한 파지는 높은 오프-레이트 바인딩 클론을 제거하기 위해 몇 번의 세척 후 과도한 비-비오틴화 C6의 존재하에서 2시간 또는 밤새 (오프-레이트 선택) 항원 배양된다. 대조군으로서, 평행하게, 파지를 비-비오틴화 hC6 대신에 뉴트라비딘-포획 인간 C6 및 PBS와 함께 배양한 곳에서 (오프-레이트 선택 없음) 유사한 선택을 수행하였다.
- [0407] 모든 파지 선택 결과물을 대수적으로 성장한 대장균 TG1 세포에 감염시켰고 감염된 박테리아 5 μ l를 출력 분석 및 농축 측정을 위해 아가 플레이트 (LBAGluc2 % Carb100 μ g/ml)에 평판 배양하였다. 농축은 인간 C6으로부터 용출된 파지의 수 대비 단백질 없는 조건으로부터 용출된 파지의 수 사이의 비율로 계산하였다. 배경 (PBS)에 비교하여 매우 우수한 농축물이 얻어졌다.
- [0408] 인간화 7E5 Fab 라이브러리에서 선택된 클론의 결합 스크리닝:
- [0409] 오프-레이트 선택의 두 번째와 세 번째 라운드 후에 얻은 용출된 파지 풀에 감염된 대장균 TG1의 개별 콜로니를 100 μ l의 2TYGlucose2% Carbenicillin을 포함하는 2개의 96 웰 플레이트 (마스터 플레이트)에서 8시간 동안 37 °C에서 성장시켰다. 100 μ g/ml, -80°C에서 20% 글리세롤로 저장하고 이후의 시퀀싱 및 세포질 추출물 생성에 사용되었다. 두 번째 라운드에서 나온 클론과 세 번째 라운드에서 나온 클론으로 총 2개의 마스터 플레이트 (MP)가 생성되었다. 이러한 MP로부터 용해성 모노클로날 Fab (세포질 추출물)를 함유한 박테리아 추출물이 생산되었다. 모노클로날 박테리아의 소규모 배양은 이소프로필-b-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 1mM의 최종 농도로 첨가함으로써 OD600이 0.8로 유도되었다. Fab를 함유하는 세포질 추출물 (P.E.s)은 PBS에서의 박테리아 펠렛의 동결-해동 및 이후의 세포 파편을 제거하기위한 원심 분리에 의해 제조되었다.
- [0410] 선택된 클론의 표적 결합능을 결정하기 위해, 1:5 희석된 P.E.s는 뉴트라비딘-코팅된 Maxisorp 플레이트 상에 포획된 10 nM의 비오틴화 hC6에 대한 결합에 대해 시험되었다. 래트 7E5 WT Fab로부터 제조된 P.E.를 양성 대조군으로 사용하였다. Blank P.E. (MP에서 비-접종 우물로부터 제조됨)를 음성 대조군으로 사용하였다. HRP (Horseradish peroxidase)에 접합된 항-c-myc 마우스 항체를 사용하여 P.E.s의 표적에 대한 결합을 검출하였다. 두 MP에 대한 결합 적중률 40%가 얻어졌으며(O.D. 450nm 값) 양성 클론의 결합 신호는 부모 래트의 7E5 Fab로 얻은 신호와 유사했다.
- [0411] 선택된 클론의 인간 동일성의 오프-레이트 스크리닝 및 선택된 인간 C6 결합 클론의 상동성: 양성 결합 클론에 대하여, hC6에 대한 오프-레이트는 SPR 방법을 사용하여 결정하였고, 동시에, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 시퀀싱 하였다.
- [0412] 오프-레이트를 결정하기 위해 Biacore 3000 (GE Healthcare)이 사용되었다. 그 목적을 위해, CM5 센서 칩 (GE Healthcare BR-1000-12)에 아세트이트 버퍼 pH 4.5 내 50 μ g/ml의 hC6을 약 2000 RU로 고정시켰다. 재생 조건을 시험하고 10 mM NaOH와 1M NaCl 2 $\times$ 10 μ l를 샘플 주입 사이의 재생에 사용했다. 앞서 설명한 바와 같이 제조된 P.E. 30 μ l를 120 μ l의 HBS-EP 버퍼에 희석시키고 이의 60 μ l가 30 μ l/분의 유량으로 주입되었다. 400초 동안 해리를 측정하고 1:1 Langmuir 해리 피팅 모델(Langmuir dissociation fitting model)을 적용하여 오프-레이트를 결정하였다.

- [0413] 인간 동일성과 상동성을 분석하기 위해 hC6에 특이적인 결합을 보이는 클론의 가변 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 DNA를 시퀀싱 하였다. CLC Main Workbench Software를 사용하여 아미노산 서열을 추출했다. V_K 및 V_H 서열은 기준 서열 (7E5 WT)에 대해 개별적으로 정렬되었다. 모든 서열을 분석하여 인간 동일성 (가장 가깝게 일치하는 생식 계열에서 발견되는 프레임워크 잔기의 비율) 및 인간 상 동성 (가장 가깝게 일치하는 생식 계열 또는 동일한 서브 클래스의 다른 생식 계열에서 발견되는 프레임워크 잔기의 비율)을 Abaligner software를 사용하여 결정하였다.
- [0414] 전반적으로 ELISA와 Biacore 데이터 간에는 좋은 상관관계가 관찰되었으며, 88-99%의 훌륭한 인간 동일성 및 상동성 백분율 값이 관찰되었다.
- [0415] 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02로 지칭되는 우수한 결합, 오프-레이트 및 인간 동일성 및 상동성 데이터를 갖는 8개의 클론의 리드 패널이 선택되었다. 8개의 인간화 클론의 리드 패널의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 완전한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 하기에 나타낸다 :
- [0416] **8G09 V_H 및 V_L 뉴클레오타이드 서열:**
- [0417] 8G09 V_H
- [0418] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTTCAGTGACTATTACATG GCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCT ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAACGCACCCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAAGACCTTCTACGGAG GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 14)
- [0419] 8G09 V_K
- [0420] GATATTGTGTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG TTTGGAGCGGGACCAGACTCGAGATCAAA (서열번호 15)
- [0421] **7E12 V_H 및 V_L 뉴클레오타이드 서열:**
- [0422] 7E12 V_H
- [0423] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACCTTTCAGTGACTATTACATG GCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCT ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACCCCTATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACCTTCTACGGAG GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 16)
- [0424] 7E12 V_K
- [0425] GATGTTGTGTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG TTTGGACAGGGGACCAACCTCGAGATCAAA (서열번호 17)
- [0426] **7G09 V_H 및 V_L 뉴클레오타이드 서열:**
- [0427] 7G09 V_H
- [0428] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACCTTTCAGTGACTATTACATG GCCTGGGTCCGCCAGGTTCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCT ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACCCCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAAGACCTTCTACGGAG GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 18)
- [0429] 7G09 V_K
- [0430] GATGTTGTGTGACCCAGACTCCATCGTCATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCGACAGGTTTCAGT GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTTCACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG

TTTGGACAGGGGACCAAACTCGAGCTGAAA (서열번호 19)

[0431] **8F07 VH and VL 뉴클레오티드 서열:**

[0432] 8F07 VH

[0433] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCTCTTTCAGTGACTATTACATG
GCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACACCTATACCTGCAATGAACAGTCTGAGGCTGTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGAAGACCTTCTACGGAG
GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 20)

[0434] 8F07 V_K

[0435] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA
AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTCACACTCAAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG
TTTGGAGCGGGGACCAAACTCGAGATCAAA (서열번호 21)

[0436] **7F06 VH 및 VL Nucleotide 서열:**

[0437] 7F06 VH

[0438] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTTTTCAGGGACTATTACATG
GCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACACCTATACCTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGAAGACCTTCTACGGAG
GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 22)

[0439] 7F06 V_K

[0440] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA
AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTCACACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG
TTTGGAGCGGGGACCCAGACTCGAGCTGAAA (서열번호 23)

[0441] **7F11 VH 및 VL Nucleotide 서열:**

[0442] 7F11 VH

[0443] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACTTTTCAGTGACTATTACATG
GCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACACCTATACCTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGACCTTCTACGGAG
GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 24)

[0444] 7F11 V_K

[0445] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA
AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTGAGAACAGATTTCACACTCAAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG
TTTGGAGCGGGGACCCAGACTCGAGATCAAA (서열번호 25)

[0446] **7E11 VH 및 VL 뉴클레오티드 서열:**

[0447] 7E11 VH

[0448] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACTTTTCAGTGACTATTACATG
GCCTGGGTCCGCCAGGTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACACCTATACCTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGAAGACCTTCTACGGAG
GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 26)

[0449] 7E11 V_K

[0450] GATATTGTGCTGACCCAGACTCCATTGTCATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA

AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAGGCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCGACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTTCAGGAACAGATTTACACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG
TTTGGAGCGGGGACCAACCTCGAGATCAAA (서열번호 27)

[0451] **7F02 VH 및 VL 뉴클레오타이드 서열:**

[0452] 7F02 VH

[0453] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCACCTTCAGTGACTATTACATG
GCCTGGGTCCGCCAGGGTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTC
ACTATCTCCAGAGATAATGCGAAAAACAGCCTATACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCAAGACCTTCTACGGAG
GCCCTGTTTGCTTACTGGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (서열번호 28)

[0454] 7F02 VK

[0455] GATGTTGTGATGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGCCTCCATCTCTTGCAGGTCAAGTCAGAGTCTCTTAAATGATGTTGGA
AACACCTATTTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCTCCACAGCTTCTAATTTATTTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGGTCCCCAACAGGTTTCAGT
GGCAGTGGGTTCAGGAACAGATTTACACTCAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAATTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGCTCCGTACACG
TTTGGAGCGGGGACCAAGACTCGAGCTGAAA (서열번호 29)

[0456] **8G09 VH 및 VL 아미노산 서열:**

[0457] 8G09 VH

[0458] EVQLVESDGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNKRTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTE
ALFAYWGQGLTVTVSS (서열번호 30)

[0459] 8G09 VK

[0460] DIVLTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVGNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYT
FGAGTRLEIK (서열번호 31)

[0461] **7E12 VH 및 VL 아미노산 서열:**

[0462] 7E12 VH

[0463] EVQLVESDGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYYMAWVRQGPGLGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARPSTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 32)

[0464] 7E12 VK

[0465] DVVLTQTPTSLVTPGQPASISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVGNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQASHAPYT
FGQGTNLEIK (서열번호 33)

[0466] **7G09 VH 및 VL 아미노산 서열:**

[0467] 7G09 VH

[0468] EVQLVESDGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQGPTKGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 34)

[0469] 7G09 VK

[0470] DIVLTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVGNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYT
FGAGTRLEIK (서열번호 35)

[0471] **8F07 VH 및 VL 아미노산 서열:**

[0472] 8F07 VH

[0473] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDYYMAWVRQGPGLGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDATYYCARPSTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 36)

[0474] 8F07 VK

- [0475] DVVLTQTPLTSLVTPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVIYCMQASHAPYT
FGAGTKLEIK (서열번호 37)
- [0476] **7F06 VH 및 VL 아미노산 서열:**
- [0477] 7F06 VH
- [0478] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFRDYIMAWVRQGPGLGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 38)
- [0479] 7F06 V_K
- [0480] DVVLTQTPLTSLVTPGQPVSIISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVDPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYT
FGAGTRLELK (서열번호 39)
- [0481] **7F11 VH 및 VL 아미노산 서열:**
- [0482] 7F11 VH
- [0483] EVQLVESDGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYIMAWVRQGPGLGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSRPESTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 40)
- [0484] 7F11 V_K
- [0485] DVVLTQTPTSLVTPGQPVSIISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVDPNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGVYYCMQASHAPYT
FGAGTRLEIK (서열번호 41)
- [0486] **7E11 VH 및 VL 아미노산 서열:**
- [0487] 7E11 VH
- [0488] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYIMAWVRQAPGKLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNANKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTE
ALFAYWGQGTILTVTVSS (서열번호 42)
- [0489] 7E11 V_K
- [0490] DIVLTQTPLSLSATPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQRPQSPQLLIYLVSDLGSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYT
FGAGTNLEIK (서열번호 43)
- [0491] **7F02 VH 및 VL 아미노산 서열:**
- [0492] 7F02 VH
- [0493] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYIMAWVRQGPGLGLEWVATINVDGSSTYYRESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNLSRSEDVAVYYCARPSTE
ALFAYWGHGTLTVTVSS (서열번호 44)
- [0494] 7F02 V_K
- [0495] DVVMTQTPTSLSATPGQSASISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVDPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQASHAPYT
FGAGTRLELK (서열번호 45)
- [0496] 인간화 7E5 변이체 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열에 대한 래트 7E5 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 정렬을 도 8a에 CDR 1, 2 및 3과 함께 나타내었다. 래트 7E5 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 인간화 7E5 변이체 8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열의 정렬을 도 8b에 CDR 1, 2, 및 3과 함께 나타내었다. 래트 7E5 항체의 8가지 인간형 변이체에 대한 중쇄 CDR1, 2 및 3 서열은 래트 7E5 모노클로날 항체의 아미노산 서열과 동일하다 (그의 아미노산 서열은 각각 서열번호 6, 7 및 8에 나타남). 마찬가지로, 래트 7E5 항체의 8가지 인간형 변이체에 대한 경쇄 CDR1, 2 및 3 서열은 래트 7E5 모노클로날 항체의 아미노산 서열과 동일하다 (그의 아미노산 서열은 각각 서열번호 11, 12 및 13에 나타남).
- [0497] Fab 발현, 정제 및 QC: 추가 분석에서 7E5 인간화 변이체의 일부를 특성화하기 위해, (즉, 사전 감작된 적혈구 분석의 보체 매개된 용해, 친화성 측정, 용융 온도 및 응집 행동 분석) 가용성의 Fab을 상기 기술된 8개 클론의 리드 패널로부터 제조하고 정제하였다. 8개의 모든 인간화 클론 및 7E5 WT 대조군의 Fab 유전자를 SfiI/NotI

분해를 통해 pCB4 발현 벡터 (pCB13과 매우 유사 하나, 유전자 3 표준화 서열 없이)에 클로닝하고 열충격을 통해 TG1 대장균 균주로 형질 전환 시켰다. 서열은 CLC Main Workbench Software를 사용하여 확인되었다.

[0498] pCB4-클론된 7E5 인간화 변이체 및 7E5 WT로부터 가용성의 Fab를 함유하는 P.E.s의 생산은 0.1 %의 글루코오스 및 카르베니실린(Carbenicillin)을 100 μ g/ml로 첨가 한 800ml의 2xYT에서 수행하였다. 1mM의 최종 농도로 IPTG로 OD 600이 0.5-0.8로 유도된 후, 배양액을 24시간 동안 적어도 20시간 동안 배양했다. 가용성의 Fab은 TALON 금속 친화성 수지로 정제하였다.

[0499] 생성된 정제 생성물 500ng을 SDS-PAGE에서 수행할 때, Fab 특이적 밴드 (50kDa 및 약 25kDa 각각 비-환원 및 환원 조건하에서)를 제외한 몇 개의 여분의 밴드가 관찰되었다. 이러한 샘플을 추가로 정제하기 위해, 제조사의 지침에 따라, 인간 CH1 도메인 (CaptureSelect™ 친화성 수지 IgG-CH1, cat# 194320005)에 특이 적으로 결합하는 VHH를 함유하는 Life Technologies의 수지를 사용하였다. 생성된 정제된 단백질의 농도는 마이크로 부피 분광 광도계를 사용하여 OD280nm를 측정하고 $\epsilon = 1.53$ 의 몰 흡광 계수를 가정하여 추정하였다. 정제된 샘플의 SDS-PAGE 분석은 높은 순도를 보였다. 정제된 Fab의 기능은 ELISA에서 확인되었으며, 뉴트라비딘-코팅된 Maxisorp 플레이트 상에 포획된 10 nM의 비오티화된 hC6에 대한 이들 Fab의 연속 희석의 결합이 검사되었다. 8개의 모든 정제된 Fab는 hC6에 효과적인 결합을 나타냈다.

[0500] Biacore 분석: 7E5의 인간화가 결과적인 인간화 항체의 결합 특이성 또는 활성을 변화 시켰는지 여부를 결정하기 위해, (부모)야생형 래트 7E5 mab 및 마우스 27B1 mAb와 비교하여 8개의 선택된 인간화 Fab (7E12, 7E11, 7F2, 7F6, 7F11, 7G9, 8F7 및 8F9)에 대해 Biacore 친화성 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다. 결과는 7E5의 인간화가 항체의 특이성 또는 활성을 변화시키지 않았음을 나타낸다.

[0501] 실시예 7: 인간화 항-C6 항체의 "믹스 앤드 매치" 특성화

[0502] 이 실험에서, 선택된 인간화 항-C6 항체로부터의 인간화 VH 사슬 및 인간화 VL 사슬의 패널을 다양한 조합으로 포유동물 세포에서 전장 항체로서 발현시키고, 이들의 기능적 활성을 평가하였다.

[0503] 사용된 인간화 VH 사슬은 실시예 6에서 기술된 8개의 VH 사슬 (8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02)뿐만 아니라 그의 아미노산 서열이 서열번호 46의 아미노산 서열을 나타내는 9번 사슬인, 7C02 이었다. 이들 9개의 사슬의 정렬이 도 8a에 도시되어있다.

[0504] 사용된 인간화 VL 사슬은 실시예 6에 기재된 8개의 VH 사슬 (8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11 및 7F02)뿐만 아니라 서열번호 47의 아미노산 서열을 나타내는 9번 사슬인, 7G08 이었다. 이들 9개의 사슬의 정렬이 도 8b에 도시되어있다.

[0505] 안정화된 IgG4 (S228P) 불변 영역을 갖는 전장 사슬에 대한 코딩 서열을 생성하기 위해 중쇄 및 경쇄 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하였다. CHO 숙주 세포에서 가능한 모든 조합에서 9개의 중쇄 및 9개의 경쇄가 쌍으로 동시 발현되었다. 따라서 9개의 중쇄와 9개의 경쇄의 81가지 가능한 "믹스 앤드 매치"조합을 평가했다. 81쌍은 각각 용혈 분석 및 MAC ELISA에서 테스트되었다. 각 분석을 위해, CHO 상청액으로부터 4 μ g의 인간화 된 7E5 mAb를 사용하였다. 용혈 분석 결과는 도 7A에 도시되어있다. MAC ELISA에 대한 결과가 도 7B에 도시되어있다. 결과는 9개의 VH 및 9VL 사슬의 81가지 가능한 "믹스 앤드 매치" 조합이 두 분석에서 모두 강력한 저해 활성을 나타냄을 입증한다.

[0506] 실시예 8: C6의 항체가 신경 재생에 미치는 영향을 평가하기 위한 동물 모델

[0507] 신경 압박 모델 (좌골신경의 압박)은 래트 7E5 또는 인간화 7E5와 같은 항-인간 C6 모노클로날 항체의 인간 C6으로 보충된 C6-녹아웃 래트(PVC)에서 감각 기능의 회복에 대한 효과를 시험하는 데 사용된다. 신경 압박은 말초 신경 손상의 모델이다. WO 2010/005310 (PCT/NL2009/050418); 및 de Jonge 외 (2004) Hum Mol Genet. 13(3):295-302 참조.

[0508] 치료를 위해, C6 +/- 래트 (PVG, 6-8 주)는 인간 C6 또는 대조군 (PBS)으로 보충되었다. C6은 압박 손상 전 (하루-1)에 PBS에 4 mg/kg의 투여량으로 C6 +/- 래트에게 정맥 내 투여되었고, 0-6일에는 하루에 한 번 투여되었다. C6-보충된 래트 및 대조군을 압박하기 10분 전에 (0일) (4 mg/랫트 복강 내 주사) 항-인간 C6 mAb로 처리하였다. PVG 래트를 신경 압박 5분 전에 항-인간 C6 mAb (4 mg/랫트 IP)로 다시 처리하였다. 후속 투여량의 항-인간 C6 mAb를 1일 내지 6일에 투여하였다 (4 mg/랫트 IP). 대조군 동물은 동일한 신경 압박을 받았지만 항체로 치료하지는 않았다. 신경의 조직학을 연구하기 위해 동물의 일부를 분쇄 후 72시간에 희생시켰다. 월러 변성(Wallerian degeneration)이 WT 동물에서 최대이기 때문에 72시간이 선택되었으며 이 시점은 치료 효능을

평가하는 데 매우 유용하다.

[0509] 신경 압박은 다음과 같이 수행되었다. 모든 수술 절차는 깊은 이소플루레인 마취 (이소플루레인 2.5 vol %, 1 L/min O₂ 및 1 L/min N₂O) 하에서 무균적으로 수행되었다. 왼쪽 허벅지를 깎고 좌골 신경을 대퇴부의 절개를 통해 노출시켰다. 신경은 부드럽고 구부러진 포셉 (No.7)을 사용하여 좌골 절흔(sciatic notch)의 수준에서 10 초 동안 3번 압박되었고 신경이 압박된 부분이 완전히 반투명하게 보였다. 오른쪽 다리는 내부 통제로 사용되었다. 근육과 피부는 봉합되었다.

[0510] 하기 표 6은 재조합 항-인간 C6 mAb 7E5 (12 mg/kg)로 처리하기 위한 실험 설정이다 :

표 6

[0511] 신경 압박 실험을 위한 실험 설정

랫트 넘버	Temgesic	재구성 (4mg/kg)	사전출혈	치료 (12mg/Kg)	압박 손 상	후 출혈 상
1	예	C6	예	7 E 5	예	예
2	예	C6	예	7 E 5	예	예
3	예	C6	예	7 E 5	예	예
4	예	C6	예	7 E 5	예	예
5	예	C6	예	7 E 5	예	예
6	예	C6	예	PBS	예	예
7	예	C6	예	PBS	예	예
8	예	C6	예	PBS	예	예
9	예	없음	예	PBS	예	예
10	예	없음	예	PBS	예	예

[0512] 손상 후 3일째에, 모든 동물을 피페라진-N-N'-비스(2- 에탄술포산) (PIPES) 완충액 (pH 7.6) 내 4 % 파라포름알데히드로 심장 내 관류 시켰다. 좌, 우측 좌골 신경을 각 동물에서 제거하고, 압박 부위로부터 5mm 길이의 한 세그먼트를 말단으로 수집했다. 각 세그먼트는 면역 조직 화학을 위해 파라핀 왁스로 통상적으로 가공 처리되었다.

[0513] 7 마이크론 두께의 파라핀 절편을 슈퍼 프로스트 플러스 슬라이드 글라스 (Knittel Glass, Germany)에 올려놓았다. 섹션을 탈파라핀 처리하고 재수화 했다. 에피토프는 10 mM 시트르산 나트륨 완충액에서 열에 의해 유도된 항원 검색에 의해 노출되었다 (pH 6.0). 항체의 비특이적 결합을 실온에서 20분 동안 PBS 중 10% 정상 염소 혈청 (DAKO, Glostrup, Denmark)을 사용하여 차단하였다. 1차 항체를 정상 항체 희석액 (Immunologic, Duiven, Netherlands)에서 희석시키고 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 염소 항-토끼 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-컨쥬게이트 또는 1% 소 혈청 알부민에서 1:200으로 희석한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터의 양 항-마우스 Cy3-컨쥬게이트 된 IgG에서 섹션을 배양함으로써 검출을 수행하였다. 지시될 때, 슬라이드를 4,6-디아미딘-2-페닐인돌 (DAPI) (Sigma-Aldrich)로 대조 염색하고, Vectashield 장착 배지 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 장착하였다. 형광 현미경 (Vanox, AHB3, Olympus, The Netherlands)에 부착된 디지털 카메라 (DP12, Olympus, Zoeterwoude, The Netherlands)로 이미지를 촬영했다.

[0514] 그 결과를 도 10에 나타내었다. 세포는 MAC 검출을 위한 항-C9, 축삭 검출을 위한 항-판-신경필라멘트(anti-pan-neurofilament, SMI312), 미엘린을 검출하기 위한 항-미엘린 염기성 단백질(anti-myelin basic protein, MBP) 및 항-리소조말 맴브레인 (CD68)을 검출하기 위한 식세포(대식세포)로 염색되었다. 패널 A는 손상되지 않은 좌골 신경에 대한 결과를 보여 주며, MAC의 부재, 강한 축삭 염색, 환형 미엘린 염색의 및 활성화된 대식세포가 없음을 보인다. 패널 B는 정상적인 보체 활성을 갖는 래트가 손상 후 결과인, MAC 침전, 축삭 및 미엘린의 손실 및 대식세포의 유입을 나타낸다. 패널 C는 항체가 MAC 형성을 완전히 차단하고, 축삭 및 미엘린 파괴를 억제하고, 대식세포 유입을 억제함을 입증하는, C6-재구성 래트를 항 -C6으로 처리한 후의 결과를 나타낸다. 패널 D는 재구성되지 않은 C6 -/- 래트에 대한 결과를 보여 주며, MAC 침전의 및 빠른 신경 퇴행의 부재를 나타낸다.

[0515] 따라서, 신경 압박 실험 결과는, 7E5 항-C6 항체로 in vivo 치료가 성공적으로 MAC 형성을 차단하고, 축삭 및

미엘린 파괴 및 대식세포 유입을 억제함으로써 말초 신경 손상 동물 모델에서 생체 내 항체의 유효성을 입증함을 입증한다.

[0516] 등가물

[0517] 당업자는 통상적인 실험만을 사용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 양태들의 다수의 등가물을 인식할 수 있거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

[0518] 서열 목록 요약

서열 번호	설명
1	GSCQDGRQLEWGLERT (펩타이드 418)
2	DGRQLEWGLERTRLSS (펩타이드 420)
3	GSCQDGRQLEWGLERTRLSS (펩타이드 418/420)
4	7E5 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 5)
5	7E5 VH 아미노산 서열 (실시예 5)
6	7E5 VH CDR1 아미노산 서열 (실시예 5)
7	7E5 VH CDR2 아미노산 서열 (실시예 5)
8	7E5 VH CDR3 아미노산 서열 (실시예 5)
9	7E5 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 5)
10	7E5 VL 아미노산 서열 (실시예 5)
11	7E5 VL CDR1 아미노산 서열 (실시예 5)
12	7E5 VL CDR2 아미노산 서열 (실시예 5)
13	7E5 VL CDR3 아미노산 서열 (실시예 5)
14	8G09 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
15	8G09 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
16	7E12 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
17	7E12 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
18	7G09 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
19	7G09 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
20	8F07 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
21	8F07 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
22	7F06 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
23	7F06 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
24	7F11 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
25	7F11 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
26	7E11 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
27	7E11 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
28	7F02 VH 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
29	7F02 VL 뉴클레오티드 서열 (실시예 6)
30	8G09 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
31	8G09 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
32	7E12 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
33	7E12 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
34	7G09 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
35	7G09 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
36	8F07 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
37	8F07 VL 아미노산 서열 (실시예 6)

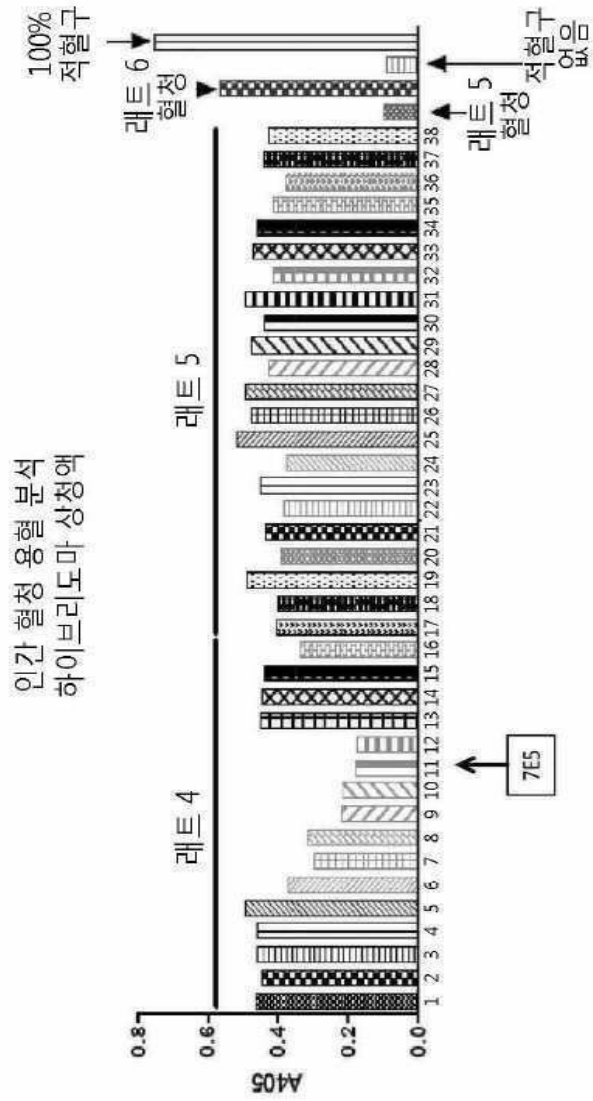
[0519]

서열 번호	설명
38	7F06 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
39	7F06 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
40	7F11 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
41	7F11 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
42	7E11 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
43	7E11 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
44	7F02 VH 아미노산 서열 (실시예 6)
45	7F02 VL 아미노산 서열 (실시예 6)
46	7C02 VH 아미노산 서열 (도 8A)
47	7G08 VL 아미노산 서열 (도 8B)
48	인간 VH3_1 서열 (도 6A)
49	인간 VK2_5 아미노산 서열 (도 6B)
50	인간 C6 부분 아미노산 서열 (도 4A)
51	랫트 C6 부분 아미노산 서열 (도 4A)
52	인간 C6 전장 아미노산 서열 (C6 명세서의 정의)

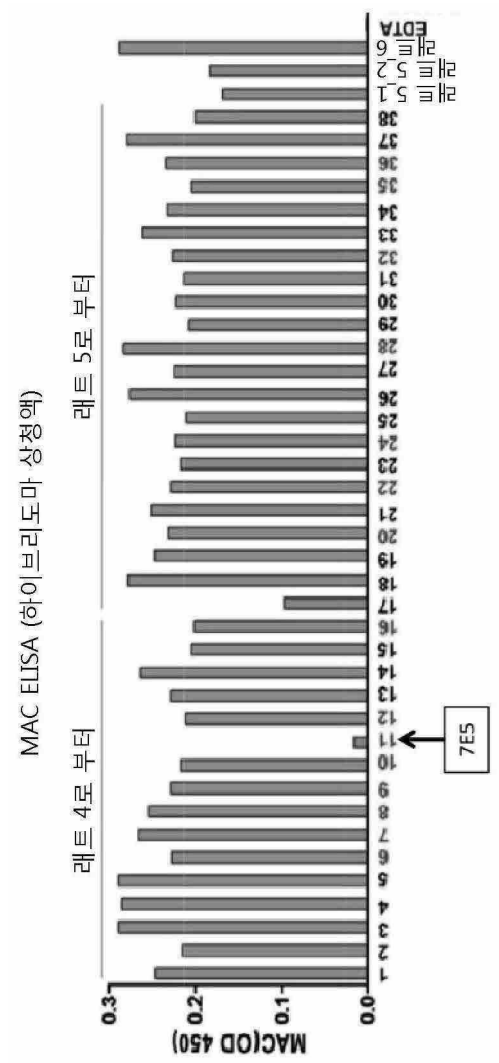
[0520]

도면

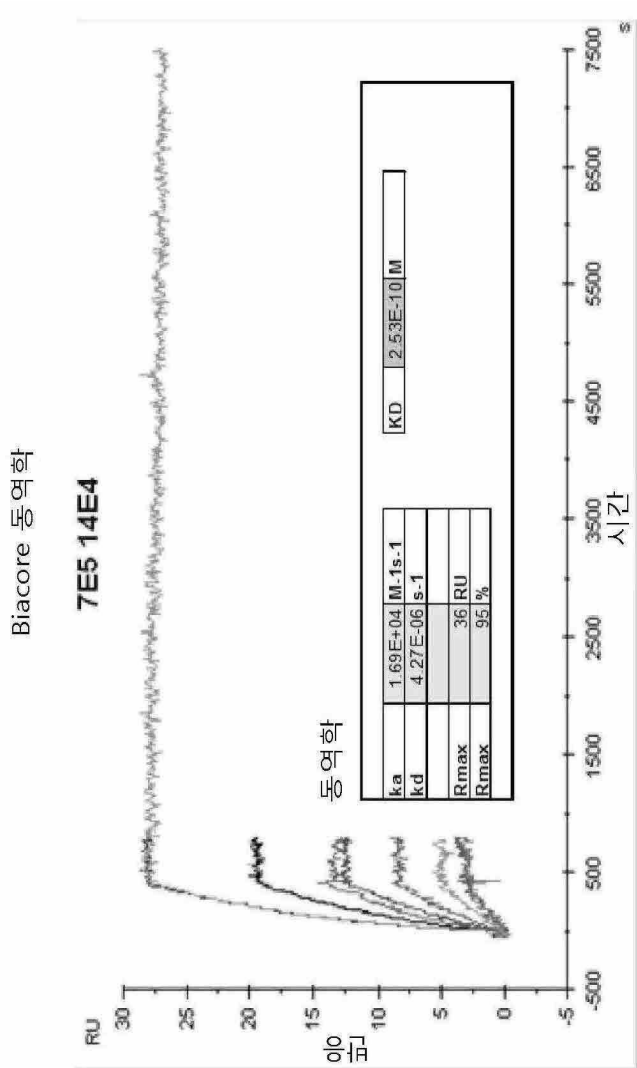
도면1a



도면1b

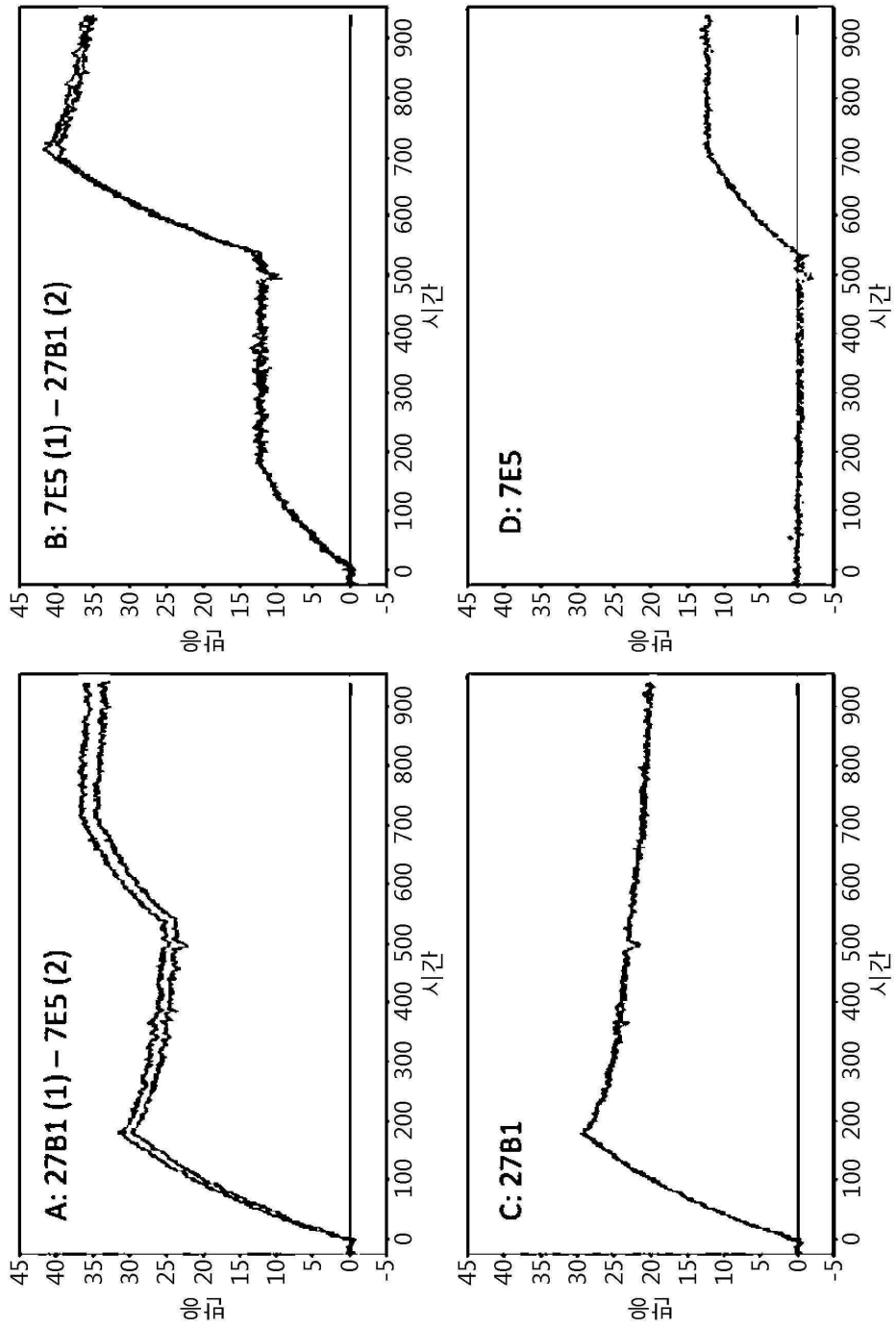


도면2



도면3

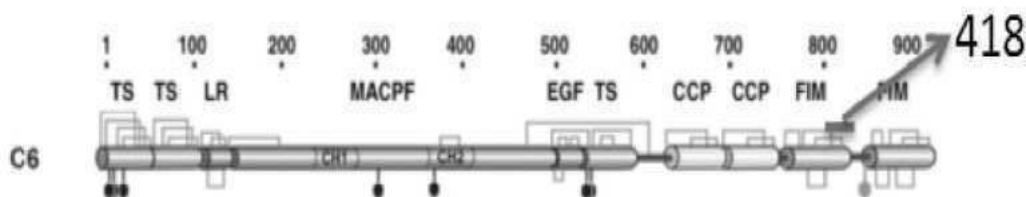
7E5 및 27D1 간 에피토프 교차 차단



도면4a

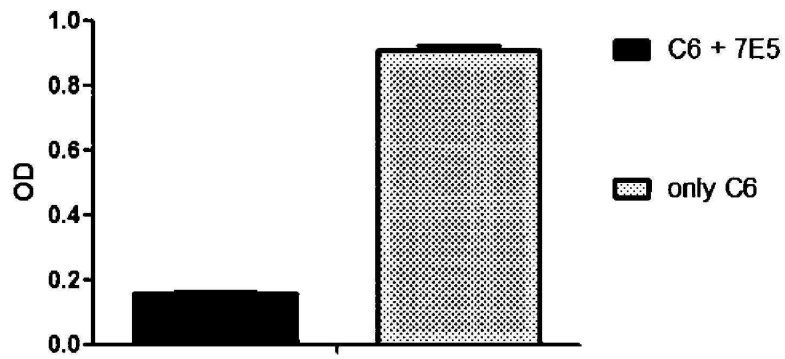
인간	601	CEGEKQEDCTFSIMENNGQPCINDDEENKEVDLPEIADSGCPQVPPENGFIRNEKQ	660
랫		CEG+ QEDCTFSIME GQPCI+DDEE+KEVDL E EADSGCPQ PEN F+ NEK+	
601	CEGKHQEDCTFSIMEKVGQPCISDDEEIKVDLAEPEADSGCPQPLPENAFVWNEK	660	
인간	661	LYLVGEDVEISCLTGFEIVGYQYFRCLPDGTWRQGDVEQTECIKPVVQEVLTITPFQ	720
랫		LY VGE+VEISCLTG+ VGYQYFRCLPD TWRQGDVEQTEC+KPVVQ+VLTII+PFQ	
661	LYSVGEEVEISCLTGFKAVGYQYFRCLPDRTWRQGDVEQTECLKPVVQDVLTITISPFQS	720	
인간	721	Peptide 360 Peptide 373, 376 & 377 LYRIGESIETCPKGFVVAGPSRYTCQNS CEKDTLTKLKHCQLGQKQS	780
랫		+Y+IGESIETCP+GFVVAGPSRYTC+G+SWTPPI NSL+CEKD LTK KG CQ GQKQS	
721	VYKIGESIETCPRGFVVAGPSRYTCCKGDSWTPPIPNLSCEKDILTKSKGLCQPGQKQS	780	
인간	781	GSECICMSPEEDCSHSEDLCVFDTDSNDYFTSPACKFLAEKCLNNQQLHFLHIGSCQDC	840
랫		GSEC+CMSPEEDCS +SEDL C+FD S+ YFTS ACKFLAEKCLN+ Q HFT+H GSCQ+G	
781	GSECVCMSPEEDCSSYSEDLCIFDEGSSQYFTSSACKFLAEKCLNSNQHFVHAGSCQEG	840	
인간	841	QLEWGLERLSSNSTKKESCGYDTCYDWEKCSASTSKCVCLLPQCCKGNQLYCVKM	900
랫		QLEWGLER +L+ STK+ CGYDTCYDWEKCSA TS CVCLLPQC K NQL+CVKM	
841	PQLEWGLERLKLAMKSTRKRVPCGYDTCYDWEKCSAHTSNVCVCLLPQCPRDENQLHCVKM	900	
인간	901	GSSTSEKTNICEVGTIRCANKRMEILHPGKCL	933
랫		GSS KT+NIC +G +RCANKR+EIL+PG+CL	
901	GSSMRGKTVNICTLGAVRCANKRVEILNPGRCCL	933	

도면4b



도면5

CH50에 대한 7E5의 in vivo 효과
 12 mg IP 60'[순환]
 C6 보충된 C6-/- 래트
 (총 2mg: 24시간 전 1mg, 7E5 5분후 1mg)



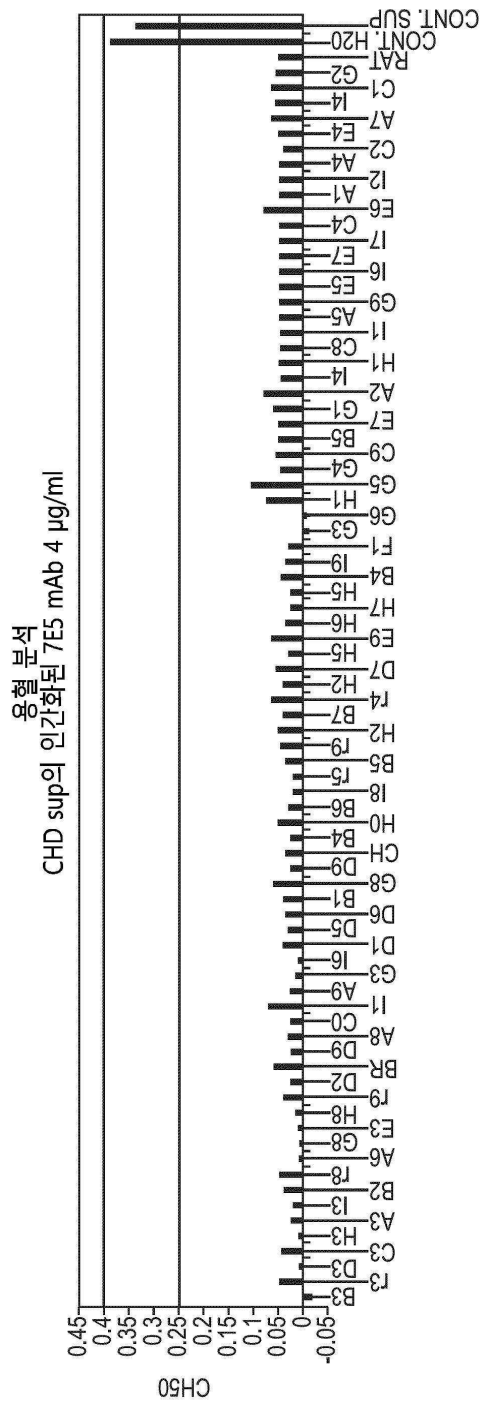
도면 6a

[illegible]

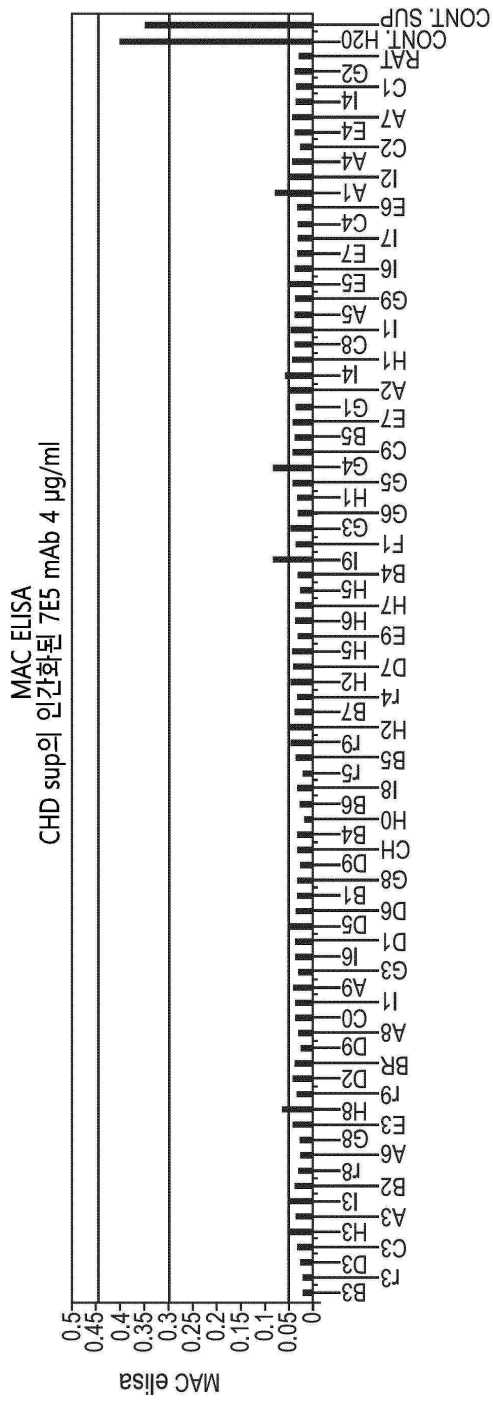
도면 6b

[illegible]

도면7a



도면 7b



도면8a

중쇄

7E5 wt VH	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSVAGSFPS	CDR1	CDR2	CDR3	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSVAGSFPS
7C02 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKRTLYIQMDSLRSED	TATYYCARPST
7E11 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVAGSFPS	DYNAWVRQAPGKGL	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
7E12 VH	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSCAASGFTFS	DYNAWVRQAPGKGL	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
7F02 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
7F06 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVAGSFPS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
7F11 VH	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSCAASGFTFS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
7G09 VH	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSVAGSFPS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
8F07 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVAGSFPS	DYNAWVRQGP	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKNTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST
8G09 VH	EVQLVESDGGILVQPGGSLKLSVAGSFPS	DYNAWVRQAPGKGL	INVDGSSTYYRESVKGRFTISRDN	AKRTLYIQMDSLRSED	TAVYYCARPST

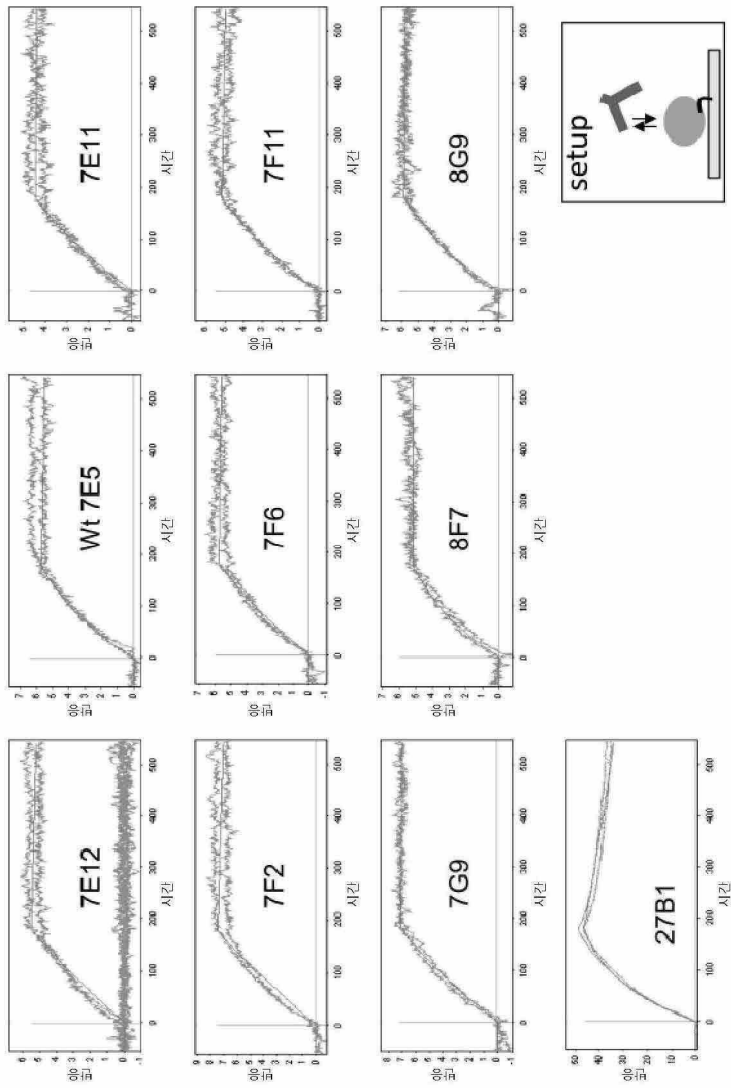
도면8b

경쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
7E5 WT VK	DVLTQTPTLSATTGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDGIIYCMQASHAPYTFGAGTNLEIK		
7E11 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQPVSISSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7E12 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQPVSISSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7F02 VK	DVMTQTPTLSATTGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7F06 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQPVSISSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7F11 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQPVSISSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7G08 VK	DIVMTQTPTLSATTGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
7G09 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
8F07 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		
8G09 VK	DVLTQTPTLSVTTPGQSVSISCSQSLLNDVGNLYWYLRPQSPQLLIYLVSDLGSEVFNRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDVGIYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK		

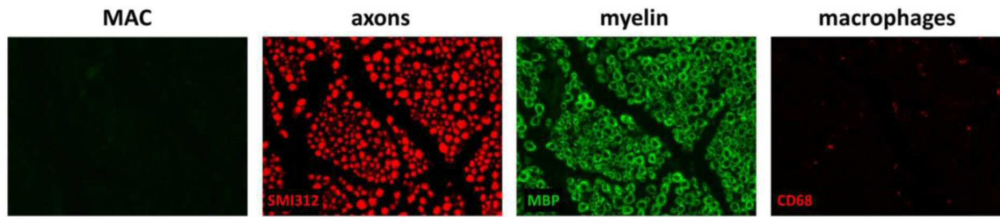
도면9

wt 래트 7E5와 비교한 인간화 F'Ab의 Biacore 친화성



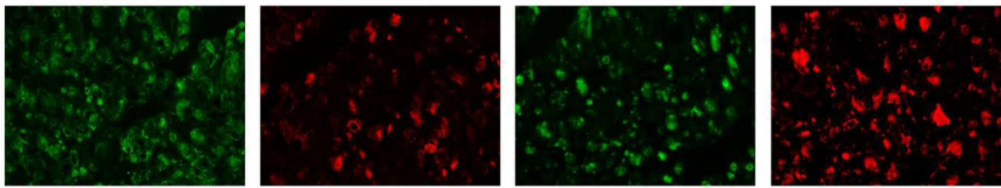
도면10

왼쪽에서부터 오른쪽으로: 손상되지 않은 좌골 신경은 막 공격 복합체(MAC)의 부재, 강한 축삭 염색(신경 필라멘트, SMI312), 환형 미엘린 염색(미엘린 염기성 단백질, MBP) 및 활성화된 대식세포(CD68 마커)가 없음을 나타낸다.



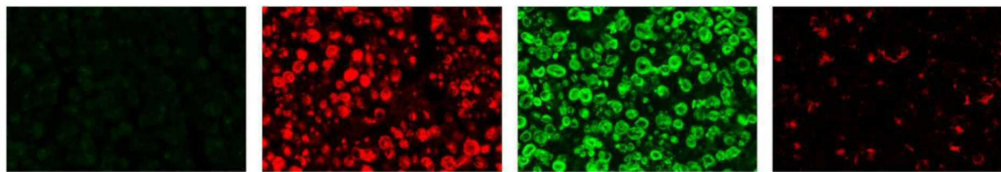
패널 A: 손상되지 않은 좌골 신경

손상 후 MAC 침전, 축삭 및 미엘린의 손실과 함께 대식세포의 유입을 보이는 정상 보체 활성을 갖는 래트



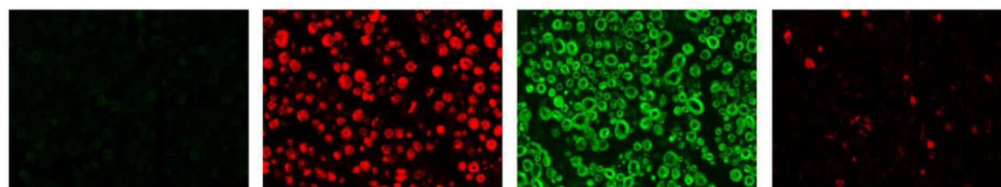
패널 B: 인간 C6 및 정상 보체 활성으로 재구성된 C6 -/- 래트에서 관찰된 손상된 좌골 신경

Regenemab 치료는 MAC 생성, 축삭 및 미엘린 파괴 및 대식세포 유입을 완전히 차단한다.



패널 C: 인간 C6으로 재구성되고 7E5로 치료된 래트는 MAC 침전과 변성이 없다.

이러한 결과는 C6 -/- 래트가 재구성되지 않은 경우에 관찰되는 것과 유사하다.



패널 D: C6 결핍 (-/-) 래트에서의 MAC 침전 및 빠른 신경 변성의 부재

서열 목록

- <110> FEGENESANCE B.V.
- <120> ANTIBODIES THAT BIND HUMAN C6 AND USES THEREOF
- <130> APC-2017-0278
- <150> US 62/094649
- <151> 2014-12-19
- <160> 53
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Peptide 418
 <400> 1
 Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<
 <220><223> Peptide 420
 <400> 2
 Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr Arg Leu Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Peptide 418/420

<400> 3
 Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Ser
 20

<210> 4
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VH nucleotide sequence
 <400> 4
 gaggtgcagc tgggtggagtc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgtag cctcaggatt ctctttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120

ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
cgagagtcgc tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcgaaacg caccctatac 240
ctgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgttc aagaccttct 300
acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VH amino acid sequence

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 5

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VH CDR1 amino acid sequence

<400> 6

Asp Tyr Tyr Met Ala

1 5

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VH CDR2 amino acid sequence

<400> 7

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

1 5 10 15

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VH CDR3 amino acid sequence

<400> 8

Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr

1 5

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VL nucleotide sequence

<400> 9

gatgttgtgc tgacccagac tccatccaca ttatcggtcta ccattggaca atcgggtctcc 60

atctcttgca ggtaagta gagtctctta aatgatgttg gaaacaccta tttatatattgg 120

tatctacaga ggctggcca atctccacag cttctaattt atttgggtctc cgacctggga 180

tctgggggtcc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaatc 240

agtggagtgg aggctgagga tttgggaatt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gagctgggac caacctggaa ctgaaa 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VL amino acid sequence

<400> 10

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

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VL CDR1 amino acid sequence

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VL CDR2 amino acid sequence

<400> 12

Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E5 VL CDR3 amino acid sequence

<400> 13

Met Gln Ala Ser His Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8G09 VH nucleotide sequence

<400> 14

gaggtgtagc tgggtggagtc tgatggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180

cgagagtccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcgaaacg caccctatac 240

ctgcaaatgg acagtctgag ggctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccaa ggcaactctg tcactgtctc ctca 354

<210> 15

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8G09 VL nucleotide sequence

<400> 15

gatatgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtta cccctggaca atcggtctcc 60

atctcttgca ggtaagtc gagtctctta aatgatgtg gaaacaccta tttatattgg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggcttc cgacctggga 180

tctggggtcc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgtccg 300

tacacgtttg gagcggggac cagactcgag atcaaa 336

<210> 16

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E12 VL nucleotide sequence

<400> 16

gaggtgtagc tgggtggagtc tgatggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tactgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180

cgagagtcgc tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240

ctgcaaatga acagtctgag ggctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 17

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E12 VL nucleotide sequence

<400> 17

gatgttgtgc tgaccagac tccatcgaca ttatcggtta cccctggaca accggcctcc 60

atctcttga ggtcaagtc agtctctta aatgatgtg gaaacaccta tttatattgg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggctc cgacctggga 180

tctgggttc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtagagtgg agctgagga tgtgggaatt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gacaggggac caacctcgag atcaaa 336

<210> 18

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7G09 VH nucleotide sequence

<400> 18

gaggtgtagc tgggtggagtc tgatggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120
ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaa caccctatac 240
ctgcaaatgg acagtctgag ggctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300
acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 19

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7G09 VL nucleotide sequence

<400> 19

gatgttgtgc tgaccagac tccatcgta ttatcggtta cccctggaca atcggcctcc 60
atctcttgca ggtcaagta gactctctta aatgatgtg gaaacaccta tttatattgg 120
tatctacaga agcctggcca atctccacag ctctaatat atttggctc cgacctggga 180
tctgggtcc cgcacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240
agtagagtgg aggtcgagga ttgggaatt tattactgca tgcaagctag tcatgtccg 300

tacacgtttg gacaggggac caaactcgag ctgaaa 336

<210> 20

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F07 VH nucleotide sequence

<400> 20

gaggtgtagc tgggtggagtc tgggtggagc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt ctctttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaa caccctatac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F07 VL nucleotide sequence

<400> 21

gatgttgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtta cccctggaca atcggctctcc 60

atctcttgca ggtcaagtc agtctcttta aatgatgttg gaaacaccta tttatatagg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggcttc cgacctggga 180

tctggggctc ccgacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtggagtgg aggtcaggga tgtgggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gagcggggac caaactcgag atcaaa 336

<210> 22

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F06 VH nucleotide sequence

<400> 22

gaggtgtagc tgggtggagtc tgggtggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagg gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaatatg atggtagtag tacttactat 180

cgagagtccg tgaagggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa cagcctatac 240

ctgcaaatgg acagtctgag ggctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcaactctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 23

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F06 VL nucleotide sequence

<400> 23

gatgttgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtta cccctggaca accggtctcc 60

atctcttgca ggtcaagtc agtctcttta aatgatgttg gaaacaccta tttatatagg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggcttc cgacctggga 180

tctggggctc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtagagtgg aggtcaggga tgtgggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gagcggggac cagactcgag ctgaaa 336

<210> 24

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F11 VH nucleotide sequence

<400> 24

gaggtgtagc tggtaggagtc ttagtgagcgc ttagtgagcgc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120

ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaatatg atggtagtag tacttactat 180

cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaa caccctatac 240

ctgcaaatga acagtctgag ggctgaggac acggccgttt attactgttc aagacattct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggcaactctg tcaactgtct ctca 354

<210> 25

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F11 VL nucleotide sequence

<400> 25

gatgttgtgc tgaccagac tccatcgaca ttatcggtta cccctggaca accggtctcc 60

atctcttga ggtcaagtc agtctctta aatgatgtg gaaacaccta tttatatgg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggctc cgacctggga 180

tctgggtcc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtggagtgg aggtgagga tgtgggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gagcggggac cagactcgag atcaaa 336

<210> 26

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E11 VH nucleotide sequence

<400> 26

gaggtgcagc tggtaggagtc tggtaggagc ttagtgagcgc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaatatg atggtagtag tacttactat 180
cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaa caccctatac 240
ctgcaaatgg acagtctgag ggctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccaa ggactctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 27

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E11 VL nucleotide sequence

<400> 27

gatattgtgc tgaccagac tccattgtca ttatcggtc cccctggaca atcggtctcc 60
atctcttgca ggtcaagtc agtctctta aatgatgtg gaaacaccta tttatattgg 120
tatctacaga ggctggcca atctccacag ctctaatat atttggctc cgacctggga 180
tctgggtcc ccgacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtagagtgg aggtgagga tgtgggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgtccg 300

tacacgtttg gagcggggac caacctcgag atcaaa 336

<210> 28

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F02 VH nucleotide sequence

<400> 28

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggtggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt cgcagggt 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaatatg atggtagtag tacttactat 180

cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaa caccctatac 240

ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300

acggaggccc tgtttgctta ctggggccac ggactctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F02 VL nucleotide sequence

<400> 29

gatgttgtga tgaccagac tccatcgaca ttatcggcta cccctggaca atcggcctcc 60

atctcttgca ggtcaagta gactctctta aatgatgttg gaaacaccta tttatatgg 120

tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggcttc cgacctggga 180

tctgggttc ccaacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaatc 240

agtagagtgg aggtcgagga tgtgggaatt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300

tacacgtttg gagcggggac cagactcgag ctgaaa 336

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8G09 VH amino acid sequence

<400> 30

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

1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30
Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8G09 VL amino acid sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E12 VH amino acid sequence

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

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

Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7E12 VL amino acid sequence

<400> 33

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7G09 VH amino acid sequence

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7G09 VL amino acid sequence

<400> 35

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

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60
 Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F07 VH amino acid sequence

<400> 36

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

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

115

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F07 VL amino acid sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 38

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> 7F06 VH amino acid sequence

<400> 38

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> 7F06 VL amino acid sequence
 <400> 39
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
 20 25 30
 Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 <210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 7F11 VH amino acid sequence

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F11 VL amino acid sequence

<400> 41

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

65						70						75						80	
Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala				
					85					90					95				
Ser	His	Ala	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
					100					105					110				
<210>	42																		
<211>	118																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	7E11 VH amino acid sequence																		
<400>	42																		
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1					5					10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr				
					20					25					30				
Tyr	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
					35					40					45				
Ala	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Ser	Val				
					50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70				75				80						
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
					85					90					95				
Ala	Arg	Pro	Ser	Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
					100					105					110				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
					115														
<210>	43																		
<211>	112																		
<212>	PRT																		
<213>	Artificial Sequence																		
<220><223>	7E11 VL amino acid sequence																		

<400> 43

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

1 5 10 15

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F02 VH amino acid sequence

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F02 VL amino acid sequence

<400> 45

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

1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp

20 25 30

Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7C02 VH amino acid sequence

<400> 46

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

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

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

115
 <210> 47
 <211> 112

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 7G08 VL amino acid sequence
 <400> 47

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

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85 90 95
Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 48

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> Human VH3_1 sequence

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> Human VK2_5 amino acid sequence

<400> 49

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

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

<210> 50

<211> 333

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(333)

<223> Human C6 partial amino acid sequence

<400> 50

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

50 55 60
 Gly Glu Asp Val Glu Ile Ser Cys Leu Thr Gly Phe Glu Thr Val Gly

 65 70 75 80
 Tyr Gln Tyr Phe Arg Cys Leu Pro Asp Gly Thr Trp Arg Gln Gly Asp
 85 90 95
 Val Glu Cys Gln Arg Thr Glu Cys Ile Lys Pro Val Val Gln Glu Val
 100 105 110
 Leu Thr Ile Thr Pro Phe Gln Arg Leu Tyr Arg Ile Gly Glu Ser Ile
 115 120 125
 Glu Leu Thr Cys Pro Lys Gly Phe Val Val Ala Gly Pro Ser Arg Tyr
 130 135 140

 Thr Cys Gln Gly Asn Ser Trp Thr Pro Pro Ile Ser Asn Ser Leu Thr
 145 150 155 160
 Cys Glu Lys Asp Thr Leu Thr Lys Leu Lys Gly His Cys Gln Leu Gly
 165 170 175
 Gln Lys Gln Ser Gly Ser Glu Cys Ile Cys Met Ser Pro Glu Glu Asp
 180 185 190
 Cys Ser His His Ser Glu Asp Leu Cys Val Phe Asp Thr Asp Ser Asn
 195 200 205
 Asp Tyr Phe Thr Ser Pro Ala Cys Lys Phe Leu Ala Glu Lys Cys Leu

 210 215 220
 Asn Asn Gln Gln Leu His Phe Leu His Ile Gly Ser Cys Gln Asp Gly
 225 230 235 240
 Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr Arg Leu Ser Ser Asn Ser
 245 250 255
 Thr Lys Lys Glu Ser Cys Gly Tyr Asp Thr Cys Tyr Asp Trp Glu Lys
 260 265 270
 Cys Ser Ala Ser Thr Ser Lys Cys Val Cys Leu Leu Pro Pro Gln Cys
 275 280 285

 Phe Lys Gly Gly Asn Gln Leu Tyr Cys Val Lys Met Gly Ser Ser Thr
 290 295 300

Ser Glu Lys Thr Leu Asn Ile Cys Glu Val Gly Thr Ile Arg Cys Ala
305 310 315 320

Asn Arg Lys Met Glu Ile Leu His Pro Gly Lys Cys Leu
325 330

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(333)

<223> Rat C6 partial amino acid sequence

<400> 51

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ile His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 934

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(934)

<223> amino acid sequence of human C6

<400> 52

Met Ala Arg Arg Ser Val Leu Tyr Phe Ile Leu Leu Asn Ala Leu Ile

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

Asn Cys Leu Leu Gly Asp Phe Gly Pro Trp Ser Asp Cys Asp Pro Cys
85 90 95
Ile Glu Lys Gln Ser Lys Val Arg Ser Val Leu Arg Pro Ser Gln Phe
100 105 110
Gly Gly Gln Pro Cys Thr Ala Pro Leu Val Ala Phe Gln Pro Cys Ile
115 120 125
Pro Ser Lys Leu Cys Lys Ile Glu Glu Ala Asp Cys Lys Asn Lys Phe
130 135 140
Arg Cys Asp Ser Gly Arg Cys Ile Ala Arg Lys Leu Glu Cys Asn Gly

145 150 155 160
Glu Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Arg Asp Cys Gly Arg Thr
165 170 175
Lys Ala Val Cys Thr Arg Lys Tyr Asn Pro Ile Pro Ser Val Gln Leu
180 185 190
Met Gly Asn Gly Phe His Phe Leu Ala Gly Glu Pro Arg Gly Glu Val
195 200 205
Leu Asp Asn Ser Phe Thr Gly Gly Ile Cys Lys Thr Val Lys Ser Ser
210 215 220

Arg Thr Ser Asn Pro Tyr Arg Val Pro Ala Asn Leu Glu Asn Val Gly
225 230 235 240

Phe Glu Val Gln Thr Ala Glu Asp Asp Leu Lys Thr Asp Phe Tyr Lys
 245 250 255
 Asp Leu Thr Ser Leu Gly His Asn Glu Asn Gln Gln Gly Ser Phe Ser
 260 265 270
 Ser Gln Gly Gly Ser Ser Phe Ser Val Pro Ile Phe Tyr Ser Ser Lys
 275 280 285
 Arg Ser Glu Asn Ile Asn His Asn Ser Ala Phe Lys Gln Ala Ile Gln
 290 295 300
 Ala Ser His Lys Lys Asp Ser Ser Phe Ile Arg Ile His Lys Val Met
 305 310 315 320
 Lys Val Leu Asn Phe Thr Thr Lys Ala Lys Asp Leu His Leu Ser Asp
 325 330 335
 Val Phe Leu Lys Ala Leu Asn His Leu Pro Leu Glu Tyr Asn Ser Ala
 340 345 350
 Leu Tyr Ser Arg Ile Phe Asp Asp Phe Gly Thr His Tyr Phe Thr Ser
 355 360 365
 Gly Ser Leu Gly Gly Val Tyr Asp Leu Leu Tyr Gln Phe Ser Ser Glu
 370 375 380
 Glu Leu Lys Asn Ser Gly Leu Thr Glu Glu Glu Ala Lys His Cys Val
 385 390 395 400
 Arg Ile Glu Thr Lys Lys Arg Val Leu Phe Ala Lys Lys Thr Lys Val
 405 410 415
 Glu His Arg Cys Thr Thr Asn Lys Leu Ser Glu Lys His Glu Gly Ser
 420 425 430
 Phe Ile Gln Gly Ala Glu Lys Ser Ile Ser Leu Ile Arg Gly Gly Arg
 435 440 445
 Ser Glu Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Trp Glu Lys Gly Ser Ser Gly Leu
 450 455 460
 Glu Glu Lys Thr Phe Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Lys Glu Asn Pro
 465 470 475 480
 Ala Val Ile Asp Phe Glu Leu Ala Pro Ile Val Asp Leu Val Arg Asn
 485 490 495

Ile Pro Cys Ala Val Thr Lys Arg Asn Asn Leu Arg Lys Ala Leu Gln
500 505 510

Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Asp Pro Cys Gln Cys Ala Pro Cys Pro Asn
515 520 525

Asn Gly Arg Pro Thr Leu Ser Gly Thr Glu Cys Leu Cys Val Cys Gln
530 535 540

Ser Gly Thr Tyr Gly Glu Asn Cys Glu Lys Gln Ser Pro Asp Tyr Lys
545 550 555 560

Ser Asn Ala Val Asp Gly Gln Trp Gly Cys Trp Ser Ser Trp Ser Thr
565 570 575

Cys Asp Ala Thr Tyr Lys Arg Ser Arg Thr Arg Glu Cys Asn Asn Pro
580 585 590

Ala Pro Gln Arg Gly Gly Lys Arg Cys Glu Gly Glu Lys Arg Gln Glu
595 600 605

Glu Asp Cys Thr Phe Ser Ile Met Glu Asn Asn Gly Gln Pro Cys Ile
610 615 620

Asn Asp Asp Glu Glu Met Lys Glu Val Asp Leu Pro Glu Ile Glu Ala
625 630 635 640

Asp Ser Gly Cys Pro Gln Pro Val Pro Pro Glu Asn Gly Phe Ile Arg
645 650 655

Asn Glu Lys Gln Leu Tyr Leu Val Gly Glu Asp Val Glu Ile Ser Cys
660 665 670

Leu Thr Gly Phe Glu Thr Val Gly Tyr Gln Tyr Phe Arg Cys Leu Pro
675 680 685

Asp Gly Thr Trp Arg Gln Gly Asp Val Glu Cys Gln Arg Thr Glu Cys
690 695 700

Ile Lys Pro Val Val Gln Glu Val Leu Thr Ile Thr Pro Phe Gln Arg
705 710 715 720

Leu Tyr Arg Ile Gly Glu Ser Ile Glu Leu Thr Cys Pro Lys Gly Phe
725 730 735

Val Val Ala Gly Pro Ser Arg Tyr Thr Cys Gln Gly Asn Ser Trp Thr

740 745 750
Pro Pro Ile Ser Asn Ser Leu Thr Cys Glu Lys Asp Thr Leu Thr Lys
755 760 765
Leu Lys Gly His Cys Gln Leu Gly Gln Lys Gln Ser Gly Ser Glu Cys
770 775 780
Ile Cys Met Ser Pro Glu Glu Asp Cys Ser His His Ser Glu Asp Leu
785 790 795 800

Cys Val Phe Asp Thr Asp Ser Asn Asp Tyr Phe Thr Ser Pro Ala Cys
805 810 815
Lys Phe Leu Ala Glu Lys Cys Leu Asn Asn Gln Gln Leu His Phe Leu
820 825 830
His Ile Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu
835 840 845
Arg Thr Arg Leu Ser Ser Asn Ser Thr Lys Lys Glu Ser Cys Gly Tyr
850 855 860
Asp Thr Cys Tyr Asp Trp Glu Lys Cys Ser Ala Ser Thr Ser Lys Cys

865 870 875 880
Val Cys Leu Leu Pro Pro Gln Cys Phe Lys Gly Gly Asn Gln Leu Tyr
885 890 895
Cys Val Lys Met Gly Ser Ser Thr Ser Glu Lys Thr Leu Asn Ile Cys
900 905 910
Glu Val Gly Thr Ile Arg Cys Ala Asn Arg Lys Met Glu Ile Leu His
915 920 925
Pro Gly Lys Cys Leu Ala

930

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide linker

<400> 53

Pro Val Gly Val Val

1

5