

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0061702 (43) 공개일자 2017년06월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/44</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61K 47/50</i> (2017.01) (52) CPC특허분류 <i>C07K 16/44</i> (2013.01) <i>A61K 39/395</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2017-7011599 (22) 출원일자(국제) 2015년09월30일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2017년04월27일 (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/072516 (87) 국제공개번호 WO 2016/050822 국제공개일자 2016년04월07일 (30) 우선권주장 14187180.6 2014년09월30일 유럽특허청(EPO)(EP) 15180310.3 2015년08월07일 유럽특허청(EPO)(EP)		(71) 출원인 뉴리문 홀딩 아게 스위스 솔리렌, 체하-8952, 바기스트라쎄 13 (72) 발명자 몬트라시오 파비오 스위스 체하-8834 신텔레기 보겔네스트슈트라쎄 7 그림 안 스위스 체하-8600 뒤벤도르프 뷔르글리슈트라쎄 16 (74) 대리인 특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **인간-유래의 항-디펩티드 반복체(DPR) 항체**

(57) 요약

바람직하게는 C9ORF72 DPR에 결합할 수 있는 신규한 인간-유래의 디펩티드 반복체(DPR) 특이적 항체뿐만 아니라 그의 합성 변이체 및 생물공학적 유도체뿐만 아니라 이와 연관된 방법이 제공된다. C9ORF72 DPR과 같은 DPR 및 DPR 단백질에 특이적인 항체와 연관된 분석법, 키트 및 고형 지지체가 또한 개시된다. 본 발명의 항체는 DPR 단백질-표적화 면역치료 및 진단법용 약학적 및 진단적 조성물에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/48384 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/6025 (2013.01)
A61K 2039/6031 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

9번 염색체 개방 해독틀 72(C9orf72) 유전자로부터 그 안티센스 방향에서 번역될 때 적어도 하나의 디펩티드 (XX') 반복체(DPR)(폴리-(Pro-Arg; PR), 폴리-(Pro-Ala; PA), 폴리-(Gly-Pro; GP)) 및/또는 C9orf72 유전자로부터 그 센스 방향에서 번역될 때 적어도 하나의 DPR(폴리-(Gly-Arg; GR), 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP))을 인식하며, 바람직하게는 상기 반복 수는 (XX')₁₅인, 인간-유래의 모노클론 항-디펩티드(XX') 반복체 (DPR) 항체 또는 그의 DPR-결합 절편, 합성 변이체 또는 생물공학적 유도체.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 항체는 상기 C9orf72 유전자로부터 그 안티센스 방향에서 번역될 때 적어도 하나의 DPR 및 상기 C9orf72 유전자로부터 그 센스 방향에서 번역될 때 적어도 하나의 다른 DPR을 인식하는 항체.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 DPR은 단백질 내에 함유되거나 단백질에 접합되며(DPR-단백질), 바람직하게는 상기 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)이고 상기 DPR에 접합되는 항체.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 어느 한 항에 있어서,

DPR 단백질의 조합을 인식하고, 바람직하게는 상기 항체는 폴리-(GR), 폴리-(PR), 및 선택적으로는 폴리-(GA); 폴리-(GA) 및 폴리-(GP); 폴리-(GA) 및 폴리-(GR); 폴리-(GR) 및 폴리-(PR); 폴리-(GA), 폴리-(GR), 및 선택적으로는 폴리-(PR); 폴리-(PA), 폴리-(PR), 및 선택적으로는 폴리-(GR); 또는 폴리-(PA) 및 폴리-(GA)를 인식하는 항체.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 (XX')₁₅로 이루어지는 DPR 펩티드에 결합할 수 있고, 선택적으로 상기 항체는 BSA에 커플링된 펩티드에 결합하지 않거나 적어도 더 작은 크기로 결합하는 항체.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

각각 DPR 및 DPR 단백질의 응집된 형태에 결합할 수 있는 항체.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 DPR-단백질은 C9ORF72-DPR인 항체.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

GA 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1a 내지 도 1d 중 어느 하나에 나타내고, 각각

- (i) V_H 서열(서열번호 2, 8, 22, 26, 30, 34); 및
- (ii) V_L 서열(서열번호 4, 6, 10, 12, 24, 28, 32, 36)에 도시된 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1 및 NI-308.45C2 중 어느 하나의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- (b) 도 1a 내지 도 1d 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

GR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1f, 도 1g 및 도 11에 나타내고, 각각

- (i) V_H 서열(서열번호 14, 18, 44, 48, 72, 76); 및
- (ii) V_L 서열(서열번호 16, 20, 46, 50, 74, 78)에 도시된 항체 NI-308.5G2, NI-308.46E9 및 NI-308-12A3 중 어느 하나의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- (b) 도 1f, 도 1g 또는 도 11에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

GR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1h 및 도 1i에 나타내고, 각각

- (i) V_H 서열(서열번호 52, 56, 58, 62); 및
- (ii) V_L 서열(서열번호 54, 60)에 도시된 항체 NI-308.6B11 또는 NI-308.46F8의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- (b) 도 1h 또는 도 1i에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;

(d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는

(e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

PR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1e에 나타내고, 각각

(i) V_H 서열(서열번호 38); 및

(ii) V_L 서열(서열번호 40, 42)에 도시된 항체 NI-308.24E11의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);

(b) 도 1e에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;

(c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;

(d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는

(e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

PA 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1j에 나타내고, 각각

(i) V_H 서열(서열번호 64, 68); 및

(ii) V_L 서열(서열번호 66, 70)에 도시된 항체 NI-308.4M1의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);

(b) 도 1j에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;

(c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;

(d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는

(e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

PR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함하는 항체:

(a) 도 1m에 나타나고, 각각

(i) V_H 서열(서열번호 80, 84); 및

(ii) V_L 서열(서열번호 82, 86)에 도시된 항체 NI-308.16C10의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);

(b) 도 1m에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;

(c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;

(d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는

(e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이종성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.

청구항 14

청구항 9에 있어서,

폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.5G2이거나 이로부터 유래되는 항체.

청구항 15

청구항 10에 있어서,

폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.6B11이거나 이로부터 유래되는 항체.

청구항 16

청구항 10 또는 청구항 14에 있어서,

폴리 PR 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.6B11이거나 이로부터 유래되는 항체.

청구항 17

청구항 12에 있어서,

폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.4M1이거나 이로부터 유래되는 항체.

청구항 18

청구항 13에 있어서,

폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.16C10이거나 이로부터 유래되는 항체.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

비-커플링된 DPR 펩티드에 선택적으로 또는 우세하게 결합하는 항체.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서,

반복 수 n 이 ≥ 6 , 바람직하게는 ≥ 10 , 보다 바람직하게는 ≥ 15 일 때만 상기 DPR에 결합하는 항체.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

비-커플링된 및 BSA-커플링된 DPR에 실질적으로 동일한 친화도로 또는 동일한 크기의 제곱수(order) 내에서 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 비-커플링된 및 BSA-커플링된 DPR에 결합하기 위한 EC_{50} (절반 최대 유효 농도) 값은 간접 ELISA에 의해 결정될 때 ≤ 20 , 바람직하게는 ≤ 15 , 보다 바람직하게는 ≤ 10 , 보다 더 바람직하게는 ≤ 5 및 가장 바람직하게는 약 ≤ 2 또는 3 이하의 배수 이하로 상이하며, 상기 반복 수 n 은 15인 항체.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

2 이상의 상이한 DPR에 실질적으로 동일한 친화도로 또는 동일한 크기의 제곱수 내에서 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 DPR 중 어느 하나의 결합에 대한 EC_{50} 은 간접 ELISA에 의해 결정될 때 DPRn 또는 DPRn 단백질의 결합에 대해 적어도 ≤ 200 nM, 바람직하게는 ≤ 150 nM, 보다 바람직하게는 ≤ 100 nM, 보다 더 바람직하게는 ≤ 50 nM 및 가장 바람직하게는 ≤ 25 nM이며, 상기 반복 수 n 은 15이고; 예를 들면, 항체 NI-308.5G2는 약 15.3의 EC_{50} 으로 (GA)₁₅에 결합하고, 약 0.88의 EC_{50} 으로 (GP)₁₅에 결합하며, 항체 NI-308.6B11은 약 38.4의 EC_{50} 으로 (GA)₁₅에 결합하고, 약 0.94의 EC_{50} 으로 (GR)₁₅에 결합하며, 약 119의 EC_{50} 으로 (PR)₁₅에 결합하고; 실시예 3 및 도 2 참조하는 항-DPR 항체.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

간접 ELISA에 의해 결정될 때 적어도 하나의 DPRn 또는 DPRn 단백질에 대해 ≤ 25 nM, 바람직하게는 ≤ 2 nM, 보다 바람직하게는 ≤ 1 nM 및 가장 바람직하게는 ≤ 0.5 nM의 EC_{50} (절반 최대 유효 농도) 값에 해당하는 결합 친화도를 갖고, 상기 반복 수 n 은 15인 항체.

청구항 24

청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

키메라 쥐과-인간 또는 쥐과화된 항체인 항체.

청구항 25

청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 정의된 것과 같은 DPR 또는 DPR-단백질에 특이적으로 결합하기 위한 청구항 1 내지 청구항 24 중 어느 한 항의 항체와 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 분자.

청구항 26

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

단일쇄 Fv 절편(scFv), F(ab)' 절편, F(ab) 절편 및 F(ab')₂ 절편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

청구항 27

적어도 청구항 1 내지 청구항 26 중 어느 한 항의 항체의 면역글로불린 사슬의 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로서, 바람직하게는 상기 폴리뉴클레오티드는 cDNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 28

청구항 27의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로서, 선택적으로 상기 결합 분자의 다른 면역글로불린 사슬의

가변 영역을 암호화하는 청구항 27의 폴리뉴클레오타이드와 조합되는 벡터.

청구항 29

청구항 27의 폴리뉴클레오타이드 또는 청구항 28의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 30

항-DPR 항체를 생산하기 위한 청구항 27의 cDNA, 청구항 28의 벡터 또는 청구항 29의 숙주 세포의 용도.

청구항 31

(a) 청구항 29의 세포를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 배양물로부터 상기 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)을 분리하는 단계를 포함하는, 항-DPR 항체 또는 그의 생물공학적 유도체 또는 면역글로불린 사슬(들)의 제조 방법.

청구항 32

청구항 27의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되거나 청구항 31의 방법에 의해 수득가능한 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들).

청구항 33

청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

검출가능하게 표지되는 항체.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 검출가능한 표지는 효소, 방사성동위원소, 형광단 및 중금속으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 중 어느 한 항에 있어서,

약물에 부착되는 항체.

청구항 36

청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 내지 청구항 34 중 어느 한 항의 항체, 청구항 27의 폴리뉴클레오타이드, 청구항 28의 벡터 또는 청구항 29의 세포를 포함하는 조성물.

청구항 37

청구항 36에 있어서,

약학적 조성물이고, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

백신인 조성물.

청구항 39

(a) 청구항 29의 세포를 배양하는 단계;

(b) 상기 배양물로부터 상기 항체, 그의 생물공학적 변이체 또는 면역글로불린 사슬(들)을 약학적 등급으로 정제하는 단계; 및

(c) 상기 항체 또는 그의 생물공학적 유도체를 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, DPR

및 DPR-단백질 응집체와 연관되거나 이로 인해 초래되는 장애의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물의 제조 방법.

청구항 40

청구항 36 또는 청구항 37에 있어서,

응집된 DPR 단백질, 예를 들면 C9ORF72-DPR과 연관된 질환 및/또는 징후의 치료에 유용한 추가적인 제제를 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 41

청구항 40에 있어서,

진단적 조성물인 조성물.

청구항 42

청구항 41에 있어서,

종래 면역 또는 핵산 기반의 진단적 방법에 사용되는 시약을 포함하는 진단적 조성물.

청구항 43

DPR 단백질 및 그의 응집된 형태와 연관된 질환의 예방적 및 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조에 사용하기 위한 청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 항체 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR 단백질-결합 분자, 청구항 27의 폴리뉴클레오티드, 청구항 28의 벡터 또는 청구항 29의 세포.

청구항 44

청구항 43에 있어서,

예방적 및 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조에 사용하기 위한 것이고, 상기 질환은 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS) 및 FTLD-ALS로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체.

청구항 45

인간 또는 동물 신체에서 치료제 및/또는 진단제의 생체내 검출 또는 응집에 대한 표적화에 사용하기 위한 청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 DPR 단백질-결합 분자.

청구항 46

청구항 45에 있어서,

상기 생체내 이미징은 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 단층촬영(SPECT), 근적외선(NIR) 광학 이미징 또는 자기 공명 이미징(MRI)을 포함하는 DPR 단백질-결합 분자.

청구항 47

상기 대상체의 생물학적 샘플 내에서 청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 따른 항체의 존재를 결정하는 단계를 포함하는 DPR 단백질과 연관된 장애의 진단 방법.

청구항 48

청구항 1 내지 청구항 26 또는 청구항 32 내지 청구항 35 중 어느 한 항의 적어도 하나의 항체 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR 단백질-결합 분자, 청구항 27의 폴리뉴클레오티드, 청구항 28의 벡터 또는 청구항 29의 세포와, 선택적으로 시약 및/또는 사용 설명서를 포함하는, DPR 단백질과 연관된 장애의 진단 또는 모니터링에 유용한 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 항체-기반의 치료법 및 진단 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 전통적이지 않은 비-ATG 번역물, 특히 디펩티드 반복체(DPR)를 형성하는 핵사뉴클레오타이드 반복체 및 이러한 DPR을 포함하는 항원에 특이적으로 결합하며, 각각 응집된 DPR 및 DPR 함유 펩티드에 의해 유도되는 질환 및 증상의 진단에 유용한 신규한 분자에 관한 것이다. 한 구현예에서, 본 발명은 폴리-글리신-알라닌 반복체, 폴리-글리신-프롤린 반복체, 폴리-글리신-아르기닌 반복체, 폴리-프롤린-알라닌 반복체 또는 폴리-프롤린-아르기닌 반복체와 같이 9번 염색체의 개방 해독틀(open reading frame) 72(C9ORF72) 내에 발견되는 것과 같은 DPR을 인식하고, 응집된 C9ORF72-DPR에 의해 유도되는 질환 및 증상의 치료 및 진단에 유용한 인간-유래의 항체뿐만 아니라 그의 절편, 유도체 및 생물공학적 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명은 DPR 또는 그의 응집체와 연관된 질환, 예를 들면 전두측두엽 퇴화(Frontotemporal lobar degeneration, FTL), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), FTL-ALS 및 척수소뇌성 실조증(spino-cerebellar ataxia) 타입 36을 확인하기 위한 진단적 도구 및 이러한 질환을 치료하기 위한 수동적 백신화 전략으로서 모두 가치가 있는 이러한 결합 분자, 항체 및 그의 모방체를 포함하는 약학적 및 진단적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전두측두엽 퇴화(FTLD)는 임상적, 병리적 및 유전적으로 뇌의 전두엽 및 측두엽 내의 위축과 연관된 이종성(heterogeneous) 장애의 군에 속한다. 이것은 치매의 이른 개시의 두 번째로 가장 흔한 원인이다. 인지 징후는 다양하며, 전두 및 측두 피질의 퇴화로 인한 치매, 행동 및 성격의 변화, 언어 기능장애(dysfunction) 및/또는 정신병을 포함한다. 그 증상에 따라 FTLD는 (i) 행동-변이성(behavioral-variant) 전두측두엽 치매(byFTLD), (ii) 의미적 치매(semantic dementia, SD), 또는 (iii) 진행성 비유창성 실어증(progressive nonfluent aphasia, PNFA)의 3가지 군으로 나누어질 수 있다. 적합한 치료법이 이용가능하지 않기 때문에, FTLD를 갖는 환자는 징후 개시 후 5-10년에 사망한다. 그러나, 50%의 FTLD 환자는 양성 가족력을 갖는 것으로 나타났고, 근위축성 측삭 경화증(ALS)과 비교하여 공유된 기저 발병과정(pathogenesis)을 갖는 질환 연속체를 나타내는 것으로 보인다. 양쪽 상염색체 우성 장애 모두 유전적 및 병리적으로 이종성인 것으로 나타났지만(예컨대, [Vance *et al.*, Brain 129 (2006), 868-876] 참조), 유전자 분석은 FTLD 및 ALS의 가장 흔한 유전적 원인으로 C9ORF72 유전자의 비코딩 엑손 1a 및 1b 사이에 위치하는 이형접합 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체(GGGGCC)를 확인하였다; 예컨대, [DeJesus-Hernandez *et al.*, Neuron 72 (2011), 245-256] 및 [Renton *et al.*, Neuron 72 (2011), 257-268] 참조. 특히, 3가지 대체 해독틀 내의 센스 전사체, 즉 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체의 통상적이지 않은 비-ATG 번역의 결과 각각 2개 아미노산의 반복 단위(디펩티드 반복체, DPR), 즉 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP) 및 폴리-(Gly-Arg; GR)로 이루어지는 3가지 상이한 폴리펩티드가 생산, 생성 및 응집되는 것으로 나타났다. 또한, 대응하는 안티센스 전사체의 번역 결과 폴리-(Pro-Arg; PR), 폴리-(Pro-Ala; PA) 및 폴리-(Gly-Pro; GP)가 생성된다. 상기 C9ORF72-디펩티드 반복체(DPR) 확장은 30%의 FTLD, 50%의 ALS 및 80%의 FTLD-ALS 환자까지를 차지하는 것으로 나타났고, 가장 높은 돌연변이 빈도는 미국 및 유럽 코카시안 모집단(population)에서 관찰되었다. 추가적으로, 19개 반복체 이상을 갖는 C9ORF72-DPR 확장을 갖는 환자는 다른 형태의 FTLD 및/또는 ALS를 갖는 환자들과 비교하여 더 낮은 개시 연령, 증가된 신경학적 장애 발생률, 및 정신병 또는 환각에 대한 경향을 가졌다; 예컨대, [Harms *et al.*, Neurobiol. Aging 34 (2013), e13-e19] 참조.

[0003] 그러나, 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장과 연관된 것으로 보이는 다른 질환 및/또는 장애, 예컨대 척수소뇌성 실조증(spino-cerebellar ataxia) 타입 36이 또한 보고되었다. 실제로, (마이크로새틀라이트(microsatellite) 또는 미니새틀라이트(minisatellite)로서) 이러한 중열(tandem) 반복체는 진핵생물 및 원핵생물 유기체 모두에서 돌연변이 되기 쉬운 DNA이다. 예를 들면, 박테리아의 세포 표면 부착분자(adhesin)는 종종 18-뉴클레오타이드 반복체의 배열을 갖는 세린-아스파테이트의 아미노산 쌍을 암호화하는 미니새틀라이트 SD 반복체를 함유하고, 상기 인자는 특히 스타필로코커스 균주에서 보존적 GAYTCNGAYTCN GAYAGY를 따르며, 상기 N은 임의의 염기이고, Y는 T 또는 C이다. 세린-아스파테이트 반복체(SDR)는 응고 인자(clumping factor) A(ClfA)의 R 도메인과 같이 상기 부착분자의 다양한 반복 영역에 존재하는 것으로 나타났다; 예컨대, [Hazenbos *et al.*, PLOS Pathogens 9 (2013), e1003653] 참조.

[0004] 디펩티드 반복체(DPR) 확장과 연관된 질환 및/또는 장애를 위한 치료, 예컨대 상기 질환의 진행을 늦추는 약물은 없다. 지금까지 의료적 돌봄의 주요 초점은 종종 매우 스트레스성인 동반하는 징후의 치료를 위한 약물을 제공하는 것에 있다. 그러나, 지금까지 효과적인 치료에 대한 증거는 없다.

[0005] 상기 기술적 문제는 청구항에서 특정되고 아래에 추가로 개시되며 실시예 및 도면에서 도시된 구현예에 의해 해결된다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 특히 DPR 단백질 및 그의 응집된 형태와 연관된 질환 및 증상의 예방적 또는 치료적 처치에 유용한 디펩티드 반복체(DPR) 및 DPR 함유 단백질(DPR 단백질)에 결합할 수 있는 인간-유래의 모노클론 항체뿐만 아니라 본 명세서에 예시된 상기 항체의 DPR-결합 절편, 합성 변이체 및 생물공학적 변이체와 같은 등가의(equivalent) DPR 단백질-결합 분자를 제공한다. 보다 구체적으로, 폴리-글리신-알라닌(Gly-Ala; GA), 폴리-글리신-프롤린(Gly-Pro; GP), 폴리-글리신-아르기닌(Gly-Arg; GR), 폴리-프롤린-아르기닌(Pro-Arg; PR), 또는 폴리-프롤린-알라닌(Pro-Ala; PA) 반복체 및 이러한 DPR을 포함하는 단백질을 인식하는 치료적으로 유용한 인간-유래의 항체 및 등가의 DPR 단백질-결합 분자가 제공된다.

[0007] 본 발명에 따라 수행된 실험들은 인체에서 성숙되고 비-응집 및 응집된 C9ORF72-DPR 단백질 중 및 그의 절편을 특이적으로 인식할 수 있는 인간-유래의 모노클론 항-DPR-특이적 항체의 단리에 성공하였다. 각각 인간-유래의 모노클론 항-DPR 단백질 항체 및 그 가변 도메인을 암호화하는 cDNA가 단리된 B 세포의 공급원인 인간 대상체는 신경학적 및 신경퇴행성 증상의 징후가 부재하였다. 그러나, 본 발명의 다른 구현예에서, 각각 인간-유래의 모노클론 항-DPR 항체 및 그 가변 도메인을 암호화하는 cDNA가 단리될 수 있는 B 세포의 공급원은 PDR 단백질과 연관된 질환 및/또는 장애의 징후를 보이는 환자이다. 본 발명의 항체는 인체로부터 단리되고, 실시예에 나타난 것과 같이, FTLD 환자에서 DPR 단백질에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났으므로, 본 발명의 인간 모노클론 항-DPR 단백질 항체 및 그의 유도체가 비-면역원성이더라도 인간에서 치료학적으로 유용한 효과를 나타낼 것임을 예상하는 것은 신중하다.

[0008] 픽 질환(Pick's disease)으로도 알려져 있는 전두측두 치매(FTD)는 뇌의 전두엽 및/또는 측두엽에서의 점진적 신경 세포 퇴화와 연관된 장애의 군이다. 세포 손상 및 조직 수축으로 인한 뇌의 감소된 기능과 연관된 징후는 전두측두엽 퇴화(FTLD)로 불린다. 그 개시된 내용이 본 명세서에 포함되는 배경기술 항목에서 이미 설명한 것과 같이, C9ORF72의 비코딩 엑손 1a 및 1b 사이에 위치하는 이형접합 확장된 헥사뉴클레오타이드 반복체(GGGGCC), 즉 디펩티드 반복체(DPR)(NC_000009.12, 27546545-27573866, complement; NG_031977.1, 5001-32322 RefSeqGene)가 FTLD 및 근위축성 측삭 경화증(ALS)의 가장 흔한 원인으로 확인되었다. 상기 확장된 헥사뉴클레오타이드 반복체의 결과 2개 아미노산이 반복하는 단위(디펩티드 반복체, DPR)로 이루어지는 상이한 폴리펩티드, 특히 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP), 폴리-(Pro-Arg; PR), 또는 폴리-(Pro-Ala, PA), 및/또는 폴리-(Gly-Arg; GR)가 생산, 생성 및/또는 응집된다.

[0009] 본 발명은 일반적으로 DPR 단백질, 특히 상기 DPR이 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP), 폴리-(Pro-Arg; PR), 폴리-(Pro-Ala, PA), 및/또는 폴리-(Gly-Arg; GR)로 이루어지는 단백질을 특이적으로 인식할 수 있는 인간-유래의 항체, 그의 항원-결합 절편, 합성 및 생물공학적 변이체 및 등가의 항원-결합 분자에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 하나의 특정한 디펩티드 반복체, 예를 들면 폴리-GA를 선택적으로 인식하는 항체뿐만 아니라, 하나 이상의 디펩티드 반복체, 예를 들면 폴리-GA 및 폴리-GP 또는 폴리-GR, 폴리-GA 및 폴리-PR을 인식할 수 있는 친화도가 실질적으로 동일하거나 상이하지만 여전히 배경보다는 현저하게 높은 항체 모두에 관한 것이다. 달리 나타내지 않는 한, "DPR을 특이적으로 인식하는", "DPR에 대해 특이적인 항체" 및 "항-DPR 항체"는 천연 또는 응집된 형태의 "DPR 단백질", "디펩티드 반복체", "DPR"에 특이적으로, 일반적으로 및 종합적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이들은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. DPR은 확장된 헥사뉴클레오타이드 반복체의 결과이며, 2개 아미노산의 반복 단위를 포함한다. 상기 반복 단위는 임의의 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 DPR은 글리신 및 알라닌(Gly-Ala; GA), 글리신 및 프롤린(Gly-Pro; GP), 글리신 및 아르기닌(Gly-Arg; GR), 프롤린 및 아르기닌(Pro-Arg; PR), 또는 프롤린 및 알라닌(Pro-Ala; PA)을 포함한다. 따라서, 본 발명은 GA, GP, GR, PR 또는 PA로 이루어지는 DPR 단백질에 대해 선택적인 인간-유래의 항체, 그의 단백질-결합 절편, 합성 및 생물공학적 유도체를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 DPR 결합 분자는 더 높은 수의 반복체를 함유하는 DPR 단백질, 즉 (GA)_x, (GP)_x, (GR)_x, (PR)_x 또는 (PA)_x로 이루어지는 DPR에 결합한다. 특히, 상기 X는 반복체의 수를 나타내며, 예컨대 15개의 반복체를 갖는 DPR 단백질은 (GA)₁₅로 나타낼 것이고, 또한 예컨대 헥사뉴클레오타이드 확장 G₄C₂가 15회 반복되는 것임을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 항체는 바람직하게는 (GA)₁₅의 DPR 단백질을 인식한다.

[0010] 전형적으로, DPR에 결합하는 항체의 능력은 BSA 또는 GST와 같은 담체 단백질에 결합된 DPR 펩티드를 이용해 평

가된다; 예컨대, 그 중에서도 마우스 모노클론 항-GA 항체의 생성 및 특징분석에서 재조합 GST-GA₁₅ 단백질의 사용에 대해 개시하는 [Mori *et al.*, Science 339 (2013), 1335-1338 and Mackenzie *et al.*, Acta Neuropathol. 126 (2013), 859-879] 참조. 그러나, 본 발명에 따라 수행된 실험들은 놀랍게도 일부 항-DPR 항체가 BSA-커플링된 DPR 펩티드에 대한 현저한 결합이 없거나 비-커플링된 DPR 펩티드에 대해 단지 낮은 친화도만을 나타내고 상기 BSA-커플링된 DPR 펩티드보다 현저하게 높은 친화도를 가짐을 밝혔다; 예컨대, 항-폴리 GA 항체 NI_308.45C2, 항-폴리 PR 항체 NI-308.24E11, 특히 BSA-커플링된 (GR)₁₅ 펩티드에 전혀 결합하지 않고 따라서 마우스 모노클론 항-DPR 항체의 생성을 위해 종래기술에서 사용된 ELISA 방법에서 누락되었을 가능성이 가장 높은 항-폴리 GR 항체 NI-308.6B11 및 NI-308.46F8에 대해 도 3a에 요약되어 있는 EC₅₀ 값들의 비교.

[0011] 예를 들면, 국제 출원 WO 2014/114303 A1 및 WO 2014/114660 A1은 각각 말토오즈 결합 단백질(MBP)에 융합된 폴리-GA (GA)₁₅ 및 폴리-GP (GP)₁₅에 대해 토끼에서 유발된 폴리클론 항체 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 결합된 응집된 폴리-GA (GA)₁₀에 대해 유발되고 글루타치온 S-트랜스퍼라아제(GST)에 융합된 폴리-GA (GA)₁₅를 인식하는 마우스 모노클론 항체를 개시한다. 그러나, 인간 C9orf72-FTLD 뇌 조직에서 비연관성 아밀로이드생성 단백질에 대한 결합 특이성과 병리적 DPR 응집체에 대한 결합에 대한 데이터는 개시되어 있지 않다. 따라서, 상기 항체들의 진단적 및 치료적 유용성은 입증되지 않은 채로 남아 있다.

[0012] 국제 출원 WO 2014/116865 A1은 각각 아미노헥산산(Ahx)에 커플링되고 면역 담체로서 m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS)에 접합된(conjugated) 폴리-GA (GA)₈, 폴리-GP (GP)₈ 및 폴리-GR (GR)₈의 혼합물에 대해 토끼에서 유발된 폴리클론 항체의 생성을 개시한다. MC-0001로 명명된 한 폴리클론 토끼 항체는 폴리-GP (GP)₈에 결합하지만 다른 DPR 에는 결합하지 않는 것으로 개시된다. 상기 폴리클론 MC-001 항체는 C9⁺ ALS 환자의 뇌척수액(CSF) 및 C9ORF72 유전자 확장을 갖는 환자의 뇌에서 폴리-GP 폴리펩티드의 불용성 함유물(inclusion)에서 면역반응성을 검출하기 위해 개시된다. 또한, 상이한 반복 수 및 면역 담체와 함께 개별 DPR 펩티드를 이용하여 토끼 및 염소에서 각각 폴리클론 항-폴리-GA, 폴리-GP, 폴리-GR 및 폴리-PA 항체를 생성하기 위한 시도뿐만 아니라 폴리클론 MC-001 항체의 생성을 위해 사용된 접근법을 이용하여 마우스 모노클론 항-폴리-GP 항체를 생산하는 한 실험도 개시된다. 그러나, 폴리-GP (GP)₈에만 결합하는 3가지 모노클론 항체 클론 G2, G3 및 G4가 수득되었음이 개시되어 있지만, 비연관성 아밀로이드생성 단백질에 대한 결합 특이성 및 인간 C9orf72-FTLD 뇌 조직에서 병리적 DPR 응집체에 대한 결합에 관한 데이터는 개시되어 있지 않다. 또한, 상기 모노클론 항체를 생산하는 프로토콜의 모호한 개시 이외에도, 항체 또는 이의 기탁물의 가변 영역에 대한 서열 정보가 제공되어 있지 않다. 따라서, 여기에서 WO 2014/116865 A1에서 시사된 면역화 프로토콜에 의해 잠재적으로 수득될 수 있는 모노클론 항체의 진단적 및 치료적 유용성은 조사해 봐야 한다.

[0013] 국제 출원 WO 2014/159247 A1은 상이한 반복 수 및 N- 및/또는 C-말단 변형, 예컨대 아세틸화 및 아미드화를 갖는 합성 DPR 펩티드에 대해 유발된 폴리클론 토끼 및 마우스 항체를 개시한다. 그러나, 모노클론 항-DPR 항체의 생성은 개시되어 있지 않다. 또한, WO 2014/159247 A1은 그 중에서도 센스 및 안티센스 전사체 모두가 ALS/FTD에 기여한다는 가설을 테스트하기 위하여 C9ORF72 ALS의 유전자이식 마우스 모델을 개시한다. 본 발명에 따르면, 상기 마우스 모델은 본 발명의 항체의 치료적 유용성을 테스트하기 위해 사용될 수 있다.

[0014] 요약하면, 상기 종래기술은 인간 C9orf72-FTLD 뇌 조직에서 병리적 DPR 응집체에 결합할 수 있고 ALS/FTD에서와 같은 DPR 단백질의 축적 및 응집과 연관된 장애의 진단 및 치료 모두에서 유용성을 갖는 상기 C9orf72 유전자의 상이한 해독틀로부터 유래되는 하나 이상의 DPR에 선택적으로 결합하는 항-DPR 항체의 제공에 대해 전혀 시사 및 제시하고 있지 않다. 이와 대조적으로, 본 발명은 처음으로 그 센스 및/또는 안티센스 방향에서 C9orf72 유전자로부터 번역된 하나 이상의 DPR을 특이적으로 인식하는 인간 메모리 B 세포로부터 유래되는 인간-유래의 모노클론 항-DPR 항체의 세트를 제공한다. 실시예에 개시한 것과 같이, 본 발명의 인간-유래의 모노클론 항-DPR 항체는 높은 친화도를 갖고, 비연관성 아밀로이드생성 단백질을 실질적으로 인식하지 않으며, 인간 C9orf72-FTLD 뇌 조직에서 병리적 DPR 응집체에 결합할 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 항-DPR 항체는 인간 자가항체(autoantibody)로부터 유래되고 따라서 인간에서 실질적으로 비-면역원성일 것으로 추정된다는 사실을 고려할 때, 실시예에서 예시된 진단적 가치 이외에 이들이 치료적 유용성도 함께 갖고 있음을 예측하기는 신중하다. 상기 문맥에서, 상기 종래기술은 DPR 펩티드에 대한 인간 자가항체의 존재 가능성에 대해서는 침묵하고 있지만 합성 및 변형된 DPR 펩티드만을 이용한 실험 동물의 면역화에 대한 적용은 시사하고 있고, 또 공통의 면역화 방법은 실패하고 PEG-접합된 폴리 GA (GA)₁₀ 펩티드를 이용한 면역

화만이 안정한 항체 클론을 생성하였기 때문에 마우스 모노클론 항-DPR 항체의 생성은 다소 어려움이 있음을 유의해야 한다; 예컨대, 국제 출원 WO 2014/114660 A1의 80 페이지 5-15줄의 실시예 10 참조. 따라서, 물론 본 발명의 항체의 공급원을 제공하는 메모리 B 세포가 비-면역화된 인간 환자/자원자로부터 수득되었으므로, 이것은 본 발명의 발견, 즉 인간-유래의 항-DPR 항체의 제공이 더욱 더 놀라운 것으로 한다.

[0016] 따라서, 본 발명은 일반적으로 다음의 구현예에 관한 것이다:

[0017] [1] 9번 염색체 개방 해독틀 72(C9orf72) 유전자로부터 그 센스 및/또는 안티센스 방향에서 번역될 때 적어도 하나의 DPR을 인식하는, 디펩티드(XX') 반복체(DPR)에 결합할 수 있는 인간-유래의 모노클론 항체 또는 그의 DPR-결합 절편, 합성 변이체 또는 생물공학적 유도체로서, 바람직하게는 인간 메모리 B 세포(인간 자가항체)에 의해 발현될 때 항체의 하나 또는 바람직하게는 양쪽 가변 경쇄 및 중쇄의 적어도 1개, 바람직하게는 2개 및 가장 바람직하게는 3개의 모든 CDR이 인간 항체로부터 유래된다. 바람직하게는, 상기 항체는 적어도 2개의 상이한 DPR을 인식하며, 바람직하게는 적어도 하나의 DPR은 그 센스 방향에서 상기 C9orf72 유전자로부터 번역되고 적어도 하나의 DPR은 그 안티센스 방향에서 C9orf72 유전자로부터 번역된다; 예컨대, 실시예 및 도 2a의 표에 예시된 것과 같은 대상 항체 NI-308.6N11 참조. 명확성을 위하여, 달리 나타내지 않는 한 다음의 아이템들에서 항체에 대한 언급은 단지 간결함을 위한 것이며, 물론 상기 항체의 개시된 DPR-결합 절편, 합성 변이체 및 생물공학적 변이체를 포함함이 이해되어야 한다.

[0018] [2] [1]의 항체에 있어서, 상기 DPR은 단백질(DPR-단백질)에 함유되거나 접합되어 있으며, 바람직하게는 상기 단백질은 소 혈청 알부민(BSA)이고 상기 DPR에 접합된다.

[0019] [3] [1] 또는 [2]의 항체에 있어서, 상기 DPR은 폴리-글리신-알라닌(Gly-Ala; GA), 폴리-글리신-프롤린(Gly-Pro; GP), 폴리-(Gly-Arg; GR), 폴리-(Pro-Arg; PR), 및/또는 폴리-(Pro-Ala, PA) 반복체로 이루어지고, 바람직하게는 상기 반복 수는 (XX')₁₅이다.

[0020] [4] [1] 내지 [3] 중 어느 한 항체에 있어서, DPR 단백질의 조합을 인식하고, 바람직하게는 상기 DPR 단백질은 폴리-(GA) 또는 폴리-(PA), 폴리-(GP) 또는 폴리-(PA), 또는 폴리-(GR) 또는 폴리-(PR)로 이루어지고, 바람직하게는 상기 항체는 폴리-(GA) 및 폴리-(GP); 폴리-(GA) 및 폴리-(GR); 폴리-(PA) 및 폴리-(GA); 폴리-(GA), 폴리-(GR) 및 선택적으로 폴리-(PR); 폴리-(PA), 폴리-(PR) 및 선택적으로 폴리-(GR); 또는 폴리-(PA), 폴리-(GR), 폴리-(PR) 및 선택적으로 폴리-(GA)로 이루어진다.

[0021] [5] [1] 내지 [4] 중 어느 한 항체에 있어서, 상기 항체는 (XX')₁₅로 이루어지는 DPR 펩티드에 결합할 수 있고, 선택적으로 상기 항체는 BSA 또는 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오즈 결합 단백질(MBP), 또는 글루타치온-S 트랜스퍼라아제(GST)와 같은 다른 담체 단백질에 커플링된 펩티드에 결합하지 않거나 적어도 더 작은 크기로 결합한다.

[0022] [6] [1] 내지 [5] 중 어느 한 항체에 있어서, 각각 DPR 및 DPR 단백질의 응집된 형태에 결합할 수 있다.

[0023] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 한 항체에 있어서, 상기 DPR-단백질은 C9ORF72-DPR이다.

[0024] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, GA 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:

[0025] (a) 도 1a 내지 도 1d 중 어느 하나에 나타내고, 각각

[0026] (i) V_H 서열(서열번호 2, 8, 22, 26, 30, 34); 및

[0027] (ii) V_L 서열(서열번호 4, 6, 10, 12, 24, 28, 32, 36)에 도시된 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1 및 NI-308.45C2 중 어느 하나의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(complementarity determining region, CDR);

[0028] (b) 도 1a 내지 도 1d 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;

[0029] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;

[0030] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는

- [0031] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입(isotype)의 인간 불변(constant) 도메인을 포함한다.
- [0032] [9] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, GP 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:
- [0033] (a) 도 1f, 도 1g 및 도 1k에 나타내고, 각각
- [0034] (i) V_H 서열(서열번호 14, 18, 44, 48, 72, 76); 및
- [0035] (ii) V_L 서열(서열번호 16, 20, 46, 50, 74, 78)에 도시된 항체 NI-308.5G2, NI-308.46E9 및 NI.308-12A3 중 어느 하나의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- [0036] (b) 도 1f, 도 1g 또는 도 1k에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- [0037] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- [0038] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- [0039] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.
- [0040] [10] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, GR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:
- [0041] (a) 도 1h 및 도 1i에 나타내고, 각각
- [0042] (i) V_H 서열(서열번호 52, 56, 58, 62); 및
- [0043] (ii) V_L 서열(서열번호 54, 60)에 도시된 항체 NI-308.6B11 또는 NI-308.46F8의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- [0044] (b) 도 1h 또는 도 1i에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- [0045] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- [0046] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- [0047] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.
- [0048] [11] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, PR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:
- [0049] (a) 도 1e에 나타내고, 각각
- [0050] (i) V_H 서열(서열번호 38); 및
- [0051] (ii) V_L 서열(서열번호 40, 42)에 도시된 항체 NI-308.24E11의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- [0052] (b) 도 1e에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;

- [0053] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- [0054] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- [0055] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.
- [0056] [12] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, PA 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:
- [0057] (a) 도 1j에 나타내고, 각각
- [0058] (i) V_H 서열(서열번호 64, 68); 및
- [0059] (ii) V_L 서열(서열번호 66, 70)에 도시된 항체 NI-308.4M1의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- [0060] (b) 도 1j에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- [0061] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- [0062] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- [0063] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.
- [0064] [13] [1] 내지 [7] 중 어느 한 항체에 있어서, PR 반복체를 포함하는 DPR을 인식하고, 그 가변 영역 내에 다음을 포함한다:
- [0065] (a) 도 1l에 나타내고, 각각
- [0066] (i) V_H 서열(서열번호 80, 84); 및
- [0067] (ii) V_L 서열(서열번호 82, 86)에 도시된 항체 NI-308.16C10의 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR);
- [0068] (b) 도 1l에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열;
- [0069] (c) (a)의 아미노산 서열 중 어느 하나가 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR;
- [0070] (d) (b)의 아미노산 서열이 부분적으로 변경된 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역; 및/또는
- [0071] (e) 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 상기 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 절편으로서, 바람직하게는 상기 폴리펩티드 서열은 바람직하게는 IgG 타입, 가장 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 불변 도메인을 포함한다.
- [0072] [14] [9]의 항체에 있어서, 폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.5G2이거나 이로부터 유래된다.
- [0073] [15] [10]의 항체에 있어서, 폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.6B11이거나 이로부터 유래된다.

- [0074] [16] [10] 또는 [14]의 항체에 있어서, 폴리 PR 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.6B11이거나 이로부터 유래된다.
- [0075] [17] [12]의 항체에 있어서, 폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.4M1이거나 이로부터 유래된다.
- [0076] [18] [13]의 항체에 있어서, 폴리 GA 반복체에 또한 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 항체는 항체 NI-308.16C10이거나 이로부터 유래된다.
- [0077] [19] [1] 내지 [18] 중 어느 한 항체에 있어서, 비-커플링된 DPR 펩티드에 선택적으로 또는 우세하게 결합한다.
- [0078] [20] [1] 내지 [19] 중 어느 한 항체에 있어서, 반복 수 n 이 ≥ 6 , 바람직하게는 ≥ 10 , 보다 바람직하게는 ≥ 15 일 때만 상기 DPR에 결합한다.
- [0079] [21] [1] 내지 [20] 중 어느 한 항체에 있어서, 비-커플링된 및 BSA-커플링된 DPR에 실질적으로 동일한 친화도로 또는 동일한 크기의 제곱수(order) 내에서 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 비-커플링된 및 BSA-커플링된 DPR에 결합하기 위한 EC_{50} (절반 최대 유효 농도) 값은 간접 ELISA에 의해 결정될 때 ≤ 20 , 바람직하게는 ≤ 15 , 보다 바람직하게는 ≤ 10 , 보다 더 바람직하게는 ≤ 5 및 가장 바람직하게는 약 ≤ 2 또는 3 이하의 배수 이하로 상이하며, 상기 반복 수 n 은 15이다.
- [0080] [22] [1] 내지 [22] 중 어느 한 항-DPR 항체에 있어서, 2 이상의 상이한 DPR에 실질적으로 동일한 친화도로 또는 동일한 크기의 제곱수 내에서 결합할 수 있고, 바람직하게는 상기 DPR 중 어느 하나의 결합에 대한 EC_{50} 은 간접 ELISA에 의해 결정될 때 DPRn 또는 DPRn 단백질의 결합에 대해 적어도 ≤ 200 nM, 바람직하게는 ≤ 150 nM, 보다 바람직하게는 ≤ 100 nM, 보다 더 바람직하게는 ≤ 50 nM 및 가장 바람직하게는 ≤ 25 nM이며, 상기 반복 수 n 은 15이다. 예를 들면, 항체 NI-308.5G2는 약 15.3의 EC_{50} 으로 (GA)₁₅에 결합하고, 약 0.88의 EC_{50} 으로 (GP)₁₅에 결합하며, 항체 NI-308.6B11은 약 38.4의 EC_{50} 으로 (GA)₁₅에 결합하고, 약 0.94의 EC_{50} 으로 (GR)₁₅에 결합하며, 약 119의 EC_{50} 으로 (PR)₁₅에 결합한다; 실시예 3 및 도 2 참조.
- [0081] [23] [1] 내지 [22] 중 어느 한 항체에 있어서, 간접 ELISA에 의해 결정될 때 적어도 하나의 DPRn 또는 DPRn 단백질에 대해 ≤ 25 nM, 바람직하게는 ≤ 2 nM, 보다 바람직하게는 ≤ 1 nM 및 가장 바람직하게는 ≤ 0.5 nM의 EC_{50} (절반 최대 유효 농도) 값에 해당하는 결합 친화도를 갖고, 상기 반복 수 n 은 15이다.
- [0082] [24] [1] 내지 [23] 중 어느 한 항체에 있어서, 키메라 쥐과(murine)-인간 또는 쥐과화된 항체이다.
- [0083] [25] [1] 내지 [24] 중 어느 하나에 정의된 것과 같은 DPR 또는 DPR-단백질에 특이적으로 결합하기 위한 [1] 내지 [24] 중 어느 한 항체와 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 분자.
- [0084] [26] [1] 내지 [25] 중 어느 한 항체에 있어서, 단일쇄 Fv 절편(scFv), F(ab)' 절편, F(ab) 절편 및 F(ab')₂ 절편으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0085] [27] 적어도 [1] 내지 [26] 중 어느 한 항체의 면역글로불린 사슬의 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 바람직하게는 상기 폴리뉴클레오타이드는 cDNA이다.
- [0086] [28] [7]의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로서, 선택적으로 상기 결합 분자의 다른 면역글로불린 사슬의 가변 영역을 암호화하는 [27]의 폴리뉴클레오타이드와 조합된다.
- [0087] [29] [27]의 폴리뉴클레오타이드 또는 [28]의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0088] [30] 항-DPR 항체를 생산하기 위한 [27]의 cDNA, [28]의 벡터 또는 [29]의 숙주 세포의 용도.
- [0089] [31] 항-DPR 항체 또는 그의 생물공학적 유도체 또는 면역글로불린 사슬(들)의 제조 방법으로서, 상기 방법은
- [0090] (a) [30]의 세포를 배양하는 단계; 및
- [0091] (b) 상기 배양물로부터 상기 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0092] [32] [27]의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되거나 [31]의 방법에 의해 수득가능한 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들).

- [0093] [33] [1] 내지 [26] 또는 [32] 중 어느 한 항체에 있어서, 검출가능하게 표지된다.
- [0094] [34] [33]의 항체에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 효소, 방사성동위원소, 형광단(fluorophore) 및 중금속으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0095] [35] [1] 내지 [26] 또는 [32] 중 어느 한 항체에 있어서, 약물에 부착된다.
- [0096] [36] [1] 내지 [26] 또는 [32] 내지 [34] 중 어느 한 항체, [27]의 폴리뉴클레오티드, [28]의 벡터 또는 [29]의 세포를 포함하는 조성물.
- [0097] [37] [36]의 조성물에 있어서, 약학적 조성물이고, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0098] [38] [37]의 조성물에 있어서, 백신이다.
- [0099] [39] DPR 및 DPR-단백질 응집체와 연관되거나 이로 인해 초래되는 장애의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법은
- [0100] (a) [29]의 세포를 배양하는 단계;
- [0101] (b) 상기 배양물로부터 상기 항체, 그의 생물공학적 변이체 또는 면역글로불린 사슬(들)을 약학적 등급으로 정제하는 단계; 및
- [0102] (c) 상기 항체 또는 그의 생물공학적 유도체를 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0103] [40] [36] 또는 [37]의 약학적 조성물에 있어서, 응집된 DPR 단백질, 예를 들면 C9ORF72-DPR과 연관된 질환 및/또는 징후의 치료에 유용한 추가적인 제제를 추가로 포함한다.
- [0104] [41] [40]의 조성물에 있어서, 진단적 조성물이다.
- [0105] [42] [41]의 진단적 조성물에 있어서, 종래 면역 또는 핵산 기반의 진단적 방법에 사용되는 시약을 포함한다.
- [0106] [43] DPR 단백질 및 그의 응집된 형태와 연관된 질환의 예방적 및 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조에 사용하기 위한 [1] 내지 [26] 또는 [32] 내지 [34] 중 어느 한 항체 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR 단백질-결합 분자, [27]의 폴리뉴클레오티드, [28]의 벡터 또는 [29]의 세포.
- [0107] [44] 예방적 및 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조에 사용하기 위한 [43]의 항체로서, 상기 질환은 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS) 및 FTLD-ALS로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0108] [45] 인간 또는 동물 신체에서 치료제 및/또는 진단제의 생체내 검출 또는 응집에 대한 표적화에 사용하기 위한 [1] 내지 [26] 또는 [32] 내지 [35] 중 어느 한 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 DPR 단백질-결합 분자.
- [0109] [46] [45]의 DPR 단백질-결합 분자에 있어서, 상기 생체내 이미징은 양전자 방출 단층촬영(positron emission tomography, PET), 단일 광자 방출 단층촬영(single photon emission tomography, SPECT), 근적외선(near infrared, NIR) 광학 이미징 또는 자기 공명 이미징(magnetic resonance imaging, MRI)을 포함한다.
- [0110] [47] 상기 대상체의 생물학적 샘플 내에서 [1] 내지 [26] 또는 [32] 내지 [35] 중 어느 하나에 따른 항체의 존재를 결정하는 단계를 포함하는 DPR 단백질과 연관된 장애의 진단 방법.
- [0111] [49] DPR 단백질과 연관된 장애의 진단 또는 모니터링에 유용한 키트로서, 상기 키트는 [1] 내지 [27] 또는 [32] 내지 [35] 중 어느 하나의 적어도 하나의 항체 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR 단백질-결합 분자, [27]의 폴리뉴클레오티드, [28]의 벡터 또는 [29]의 세포, 선택적으로 시약 및/또는 사용 설명서를 포함한다.
- [0112] 반복체 확장의 독성 특성은 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS, 및 척수소뇌성 실조증 타입 36을 비제한적으로 포함하는 몇 가지 질환에서 나타나 있다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS, 및/또는 척수소뇌성 실조증 타입 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 및/또는 장애 중 어느 하나에서 DPR에 결합할 수 있다. C9ORF72-DPR은 FTLD와 연관된 것으로 나타났으므로(상기 참조), 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 C9ORF72 디펩티드 반복체(DPR)에 결합한다.
- [0113] 실시예 및 도면에서 나타난 것과 같이, 본 발명에 따라 수득된 항체는 인간 C9ORF72-FTLD 환자에서 C9ORF72-DPR

의 응집된 형태에 결합한다; 예컨대, 실시예 10 내지 실시예 12 뿐만 아니라 도 9 내지 도 12 및 도 14 참조. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 C9ORF72-DPR의 응집된 형태에 결합할 수 있다. 흥미롭게도, 본 발명에 따라 수득된 항체는 또한 인간 C9ORF72-FTLD 환자에서 C9ORF72-DPR의 공-응집된 형태에 결합한다; 실시예 13 및 도 15 참조. 따라서, 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 C9ORF72-DPR의 공-응집된 형태에 결합할 수 있다.

[0114] 본 발명의 한 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 결합 절편, 합성 또는 생물공학적 유도체는 도 1에 나타난 가변 영역 V_H 및/또는 V_L 중 어느 하나에 의해 특정되는 항체의 면역학적 결합 특징을 나타낸다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 그 가변 영역 내에 (i) V_H 서열(서열번호 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 62, 64, 68, 72, 76, 80, 84); 및 (ii) V_L 서열(서열번호 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88)에 도시된 V_H 및/또는 V_L 가변 영역 아미노산 서열의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0115] 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 항체는 도 1a 내지 도 1j 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열을 포함한다.

[0116] 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 부가적으로 또는 대안적으로 (i) V_H 서열(서열번호 2, 8, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 44, 48, 52, 56, 58, 62, 64, 68, 72, 76, 80, 84); 및 (ii) V_L 서열(서열번호 4, 6, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 42, 46, 50, 54, 60, 66, 70, 74, 82, 86, 88)의 아미노산 서열의 임의의 하나의 부분적 변경의 결과인 아미노산 서열로 이루어지는 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 전술한 아미노산 서열의 부분적인 변경의 결과인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0117] 본 발명의 추가 구현예에서, 상기 항체 또는 그의 항원 결합 절편은 부가적으로 또는 대안적으로 선택적으로 상기 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 적어도 하나의 CDR에 이중성인 폴리펩티드 서열을 추가로 포함하고, 바람직하게는 폴리펩티드 서열은 인간 불변 도메인을 포함한다.

[0118] 바람직한 구현예에서, 후술한 것과 같이, 상기 항체 또는 그의 생물공학적 유도체는 바람직하게는 IgG1 클래스 또는 이소타입의 인간 IgG 이소타입 항체이다.

[0119] 실시예 및 도면에서 예시된 것과 같이, 상기 항-DPR 단백질 항체는 $(GA)_{15}$ 또는 $(GP)_{15}$ 또는 $(GR)_{15}$ 또는 $(PA)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 반복체를 갖는 C9ORF72-DPR에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 그의 생물공학적 유도체는 $(XX')_{15}$ 로 이루어지는 DPR의 결합에 대해 ≤ 2 nM, 바람직하게는 ≤ 1 nM 및 가장 바람직하게는 ≤ 0.5 nM의 EC_{50} (절반 최대 유효 농도) 값에 해당하는 결합 친화도를 갖고, 바람직하게는 상기 DPR은 DPR 단백질 $(GA)_{15}$ 또는 DPR 단백질 $(GP)_{15}$ 또는 DPR 단백질 $(GR)_{15}$ 또는 DPR 단백질 $(PA)_{15}$ 또는 DPR 단백질 $(PR)_{15}$ 이다.

[0120] 개별 디펩타이드 반복체에 대해 높은 친화도 및 특이성을 갖는 항-DPR 항체는 일반적으로 관심이 있고, 실시예에서 예시된 대상 항체는 등가의 항체 및 유사한 DPR 결합 분자에 도달하기 위한 수단을 제공하며, 본 발명은 또한, 전술한 것과 같이, DPR 단백질에 대한 특이적인 결합에 대해 항체와 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 분자에 관한 것이다.

[0121] 상기 항체의 항원-결합 절편은 단일쇄 Fv 절편, F(ab') 절편, F(ab) 절편, 및 F(ab')₂ 절편, 또는 임의의 다른 항원-결합 절편일 수 있다. 다른 한편으로, 상기 항체는 키메라 인간-설치류(rodent) 또는 설치류화된 항체, 예컨대 쥐과-인간, 쥐과 또는 쥐과화된 항체, 래트 또는 래트화된 항체이며, 설치류 버전이 동물에서의 진단 방법 및 연구를 위해 특히 유용하다.

[0122] 또한, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 합성 또는 생물공학적 유도체를 포함하는 조성물 및 DPR 단백질 및/또는 응집된 C9ORF72와 연관된 질환 및/또는 장애의 예방, 진단 또는 치료에서 이러한 조성물을 이용하는 면역치료 및 면역진단 방법에 관한 것이며, 여기서 유효량의 조성물이 이를 필요로 하는 환자에게 투여된다.

[0123] 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 면역글로불린 사슬의 적어도 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관

한 것이다. 바람직하게는 상기 가변 영역은 도 1a 내지 도 1l에 나타난 것과 같은 가변 영역의 V_H 및/또는 V_L 의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0124] 따라서, 본 발명은 또한 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 이를 이용해 형질전환된 숙주 세포뿐만 아니라 DPR에 특이적이고, 바람직하게는 C9ORF72-DPR 단백질 또는 그의 절편에 결합할 수 있는 항체 및 등가의 결합 분자의 생산을 위한 그의 용도를 포괄한다. 항체 및 그의 모사체의 재조합 생산을 위한 수단 및 방법뿐만 아니라 항체일 수도 항체가 아닐 수도 있는 결합 분자와의 경쟁을 위한 스크리닝 방법이 본 기술분야에 공지되어 있다. 그러나 본 명세서에 개시된 것과 같이, 특히 인간에서의 치료적 적용에 대해 본 발명의 항체는 상기 항체의 적용에서 다른 경우에는 키메라 및 심지어 인간화된 항체에 대해서도 관찰되는 상기 항체에 대한 면역 반응이 실질적으로 없다는 관점에서 인간-유래의 항체이다.

[0125] 또한, 본 명세서는 DPR, 특히 시험관내, 예컨대 샘플 및/또는 생체내에서 C9ORF72-DPR 또는 절편을 확인하기 위해 사용될 수 있는 조성물 및 방법이 개시된다. 상기 개시된 항-DPR 단백질 항체 및 그의 결합 절편은, 예를 들면, ELISA-기반 또는 표면 적응 분석을 이용함으로써 샘플에서 DPR 및/또는 C9ORF72-DPR 중 또는 그의 절편의 존재에 대해 인간 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 복막액, 뇌척수액("CSF") 및 소변을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 DPR 단백질 중 또는 그의 절편과 연관된 질환 및/또는 장애의 진행을 진단 또는 모니터링하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 진단되는 대상체 유래의 샘플에서 적어도 하나의 본 발명의 항체 또는 등가의 DPR-결합 분자를 이용하여 DPR 단백질 중 또는 절편의 존재를 결정하는 단계를 포함하며, DPR 단백질 중 또는 절편의 존재는 상기 장애를 시사한다. 또한, 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 개시된 항-DPR 항체 및 DPR-결합 분자는 인간 또는 동물 신체에서 DPR, 특히 C9ORF72-DPR 중의 치료제 및/또는 진단제를 생체내 검출(또한 생체내 이미징으로도 불림) 또는 표적화하기 위한 조성물의 제조를 위해 제공된다. 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물은 DPR 단백질과 연관되고 예컨대 DPR의 응집된 형태의 출현에 의해 특징되는 질환 및/또는 장애를 도울 수 있고, 예를 들면 생체내 이미징과 연관된 진단 방법에서 질환의 진행 및 대상체에 제공된 치료법의 치료 효능을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 상기 생체내 검출(이미징)은 신틸그래피, 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 단층촬영(SPECT), 근적외선(NIR) 광학 이미징 또는 자기 공명 이미징(MRI)을 포함한다.

[0126] 따라서, 본 발명의 특별한 목적은 DPR 단백질, 바람직하게는 C9ORF72-DPR과 연관된 질환 및/또는 장애를 치료, 진단 또는 예방하기 위한 방법을 제공하는 것이다. 상기 방법은 바람직하게는 인간-유래의 항체 또는 생물공학 적 항체 유도체를 대상체에 효과적인 농도로 투여하는 단계를 포함하며, 상기 항체는 DPR 및 DPR 단백질, 바람직하게는 C9ORF72-DPR 단백질 중 또는 그의 절편을 표적으로 한다.

[0127] 본 발명의 추가 구현예는 다음의 설명 및 실시예로부터 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0128] 도 1은 인간 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI308-6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10의 가변 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. 골격(framework, FR) 및 상보성 결정 영역이 나타나 있고, CDR에는 밑줄을 친다. Kabat 번호지정 방식(scheme)이 사용되었다(<http://www.bioinf.org.uk/abs/> 참조). 박스는 전술한 웹 참고문헌에서 개시된 Kabat 등[Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of 단백질 of Immunological Interest" (1983)]에 의해 정의된 것과 같은 VH CDR1을 나타내며, 하기 표 1에 개시되어 있다.

도 2는 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 결합 특이성 및 EC_{50} 결정을 나타낸다. (A) C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1 결합 특이성 및 친화도의 요약. 간접 ELISA에 의해 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드 (GA)₁₅ (■), (GP)₁₅ (▲), (GR)₁₅ (▼), (PA)₁₅ (◆), (PR)₁₅ (●) 및 BSA 대조군 (△)에 대한 인간-유래의 NI-308 항체의 EC_{50} 이 결정되었다. 항체 NI-308.1507(B), NI-308.28G1(C), NI-308.45C2(D) 및 NI-308.18F7(E)는 각각 0.48 nM, 1.1 nM, 1.1 nM 및 1.5 nM의 결합 친화도로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₅를 특이적으로 인식하였다. 항체 NI-308.24E11(F)는 12.8 nM의 EC_{50} 으로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (PR)₁₅를 특이적으로 표적화하였지만, 항체 NI-308.16C10(M)은 3.5 nM의 결합 친화도로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (PR)₁₅에 대한 우세한 결합을 보여주었고, 또한 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₅도 낮은 결합 친화도로 인식하였다. 항체 NI-308.5G2(G), NI-308.12A3(L) 및 NI-308.46E9(H)는 각각 0.88 nM, 2.2 nM 및 13.9 nM

의 결합 친화도로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GP)₁₅에 대한 우세한 결합을 보여주었지만, C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₅도 낮은 결합 친화도로 인식하였다. 항체 NI-308.6B11(I) 및 NI-308.46F8(J)는 각각 0.94 nM 및 40.6 nM의 결합 친화도로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GR)₁₅를 우세하게 표적화하였지만, C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₅ 및 (PR)₁₅도 낮은 결합 친화도로 인식하였다. 항체 NI-308.4M1(K)는 0.10 nM의 결합 친화도로 C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (PA)₁₅에 대한 우세한 결합을 보여주었지만, C9orf72 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₅도 낮은 결합 친화도로 인식하였다.

도 3은 BSA-커플링 및 비-커플링된 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드에 대한 EC₅₀ 결정을 나타낸다. (A) BSA-커플링 및 비-커플링된 C9orf72 DPR 펩티드에 대한 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10 결합 친화도의 요약. 간접 ELISA를 이용한 BSA-커플링 (▲) 및 비-커플링된 (■) C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드 (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PR)₁₅, (PA)₁₅ 또는 BSA 대조군 (△)에 대한 인간-유래의 NI-308 항체의 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)의 결정. 항체 NI-308.18F7(B), NI-308.1507(C), NI-308.28G1(D), NI-308.5G2(G), NI-308.46E9(H), NI-308.4M1(K) 및 NI-308.12A3(L)은 유사한 결합 친화도로 BSA-커플링 및 비-커플링된 C9orf72 DPR 단백질 펩티드를 인식하였다. 항체 NI-308.45C2(E), NI-308.24E11(F) 및 NI-308.16C10(M)은 비-커플링된 펩티드와 비교할 때 낮은 EC₅₀으로 BSA-커플링된 단백질 펩티드를 표적화하였다. 항체 NI-308.6B11(I) 및 NI-308.46F8(J)에 대해서는 BSA-커플링된 DPR 단백질 펩티드 (GR)₁₅에 대한 결합이 검출되지 않았다.

도 4는 비연관성 응집 단백질에 대한 인간-유래의 DPR 항체의 결합 특이도 분석을 나타낸다. 센스 ((GA)₁₅, (GP)₁₅ 및 (GR)₁₅) 및 안티센스 ((PA)₁₅ 및 (PR)₁₅) DPR 단백질 펩티드 혼합물 및 6가지 비연관성 아밀로이드생성 단백질에 대한 항체 결합이 간접 ELISA에 의해 결정되었다. 항체 NI-308.1507(A), NI-308.18F7(B), NI-308.28G1(C), NI-308.45C2(D), NI-308.5G2(F) 및 NI-308.46F8(I)는 비연관성 분석물에 대한 현저한 오프(off)-표적 결합 없이 센스 DPR 단백질 펩티드 혼합물에 대한 결합을 보여주었다. 항체 NI-308.46E9(G) 또한 센스 DPR 단백질 펩티드 혼합물을 표적화하였고, 추가적으로 비연관성 분석물에 대한 보통의 오프-표적 결합을 보여주었다. 항체 NI-308.24E11(E)는 안티센스 DPR 단백질 펩티드 혼합물에 대한 특이적 결합을 보여주었지만, 항체 NI-308.6B11(H)는 센스 및 안티센스 DPR 펩티드 혼합물 모두를 표적화하였다. 양쪽 항체의 경우, 비연관성 아밀로이드생성 단백질에 대한 현저한 오프-표적 결합은 결정되지 않았다. NI-308 항체는 20 nM 농도에서 테스트되었다.

도 5는 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 NI-308 항체 결합 선택성을 나타낸다. 웨스턴 블롯 분석에 의한 BSA-커플링된 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드 (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ 및 (PR)₁₅에 대한 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체 결합 선택성의 결정. C9orf72 폴리-GA DPR 단백질은 항체 NI-308.1507(A), NI-308.18F7(B), NI-308.28G1(C) 및 NI-308.45C2(D)에 의해 인식되었다. 상기 폴리-PR DPR 단백질은 항체 NI-308.24E11(E) 및 NI-308.16C10(J)에 의해 특이적으로 인식되었고, 항체 NI-308.16C10은 폴리-GA DPR 단백질에 대해서도 더 약한 결합을 보여주었다. 항체 NI-308.5G2(F), NI-308.46E9(G) 및 NI-308.12A3(I)는 폴리-GP DPR 단백질을 표적화하였고, NI-308.5G2는 폴리-GA DPR 단백질에 대해서도 더 약한 결합을 보여주었다. 항체 NI-308.4M1(H)는 C9orf72 폴리-PA DPR 단백질을 특이적으로 인식하였다.

도 6은 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 용액내 결합을 나타낸다. 면역침전 분석에 의한 펩티드 (GA)₁₅, (PR)₁₅ 및 (GR)₁₅에 대한 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체의 용액내 결합의 결정. C9orf72 폴리-GA DPR 단백질은 항체 NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.45C2 및 NI-308.28G1(A)에 의해 용액 내에서 포획되었다. 폴리-PR DPR 단백질은 항체 NI-308.24E11(B)에 의해 침전되었지만, 항체 NI-308.6B11은 폴리-GR DPR 단백질에 의해 포획되었다. 이소타입 대조군 항체 NI-43A11은 C9orf72 DPR 단백질(A-C) 중 어느 것도 침전시키지 않았다.

도 7은 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 DPR 단백질 반복체-길이 의존적 결합을 나타낸다. (A) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GA 반복체-길이 의존적 결합의 요약. (B) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GP 반복체-길이 의존적 결합의 요약. (C) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GR 반복체-길이 의존적 결합의 요약. (D) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-PR 반복체-길이 의존적 결합의 요약. (E) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-PA 반복체-길이 의존적 결합의 요약. 간접 ELISA에 의한 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드에 대한 인간-

유래의 NI-308 항체의 디펩티드 반복체-길이 의존적 결합 특이성 및 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)의 결정. 항체 NI-308.1507(F)는 각각 >150 nM, 7.9 nM, 0.37 nM 및 0.54 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₅, (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 인식하였다. 항체 NI-308.18F7(G)는 각각 >200 nM, 0.78 nM 및 0.83 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 인식하였다. 항체 NI-308.28G1(H)는 각각 >200 nM, 6.3 nM, 0.9 nM 및 1.1 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₅, (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 표적화하였다. 항체 NI-308.45C2(I)는 각각 >200 nM, 7.6 nM 및 9.6 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀에 결합하였다. 항체 NI-308.5G2(J 및 K)는 각각 >200 nM, 26.8 nM, 0.94 nM 및 0.47 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GP)₅, (GP)₆, (GP)₁₀ 및 (GP)₂₀을 인식하였고, 각각 >200 nM, 5.7 nM 및 18.2 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 인식하였다. 항체 NI-308.6B11(L 및 M)은 각각 14.3 nM, 13.2 nM, 0.47 nM, 0.33 nM, 1.3 nM 및 0.25 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GR)₃, (GR)₄, (GR)₅, (GR)₆, (GR)₁₀ 및 (GR)₂₀에 결합하였고, 각각 >200 nM, 27.7 nM 및 33.6 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₆, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀에 결합하였다. 항체 NI-308.46E9(N)은 각각 63.3 nM 및 15.5 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GP)₁₀ 및 (GP)₂₀에 결합하였다. 항체 NI-308.24E11(O)는 각각 >200 nM, 31.7 nM 및 11.3 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (PR)₆, (PR)₁₀ 및 (PR)₂₀을 인식하였다. 항체 NI-308.4M1(P)는 각각 26.9 nM, 4.3 nM, 0.06 nM 및 0.06 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (PA)₅, (PA)₆, (PA)₁₀ 및 (PA)₂₀에 결합하였다.

도 8은 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GA 및 폴리-GP DPR 단백질 반복체-길이 의존적 결합을 나타낸다. (A) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GA 반복체-길이 의존적 결합의 요약. (B) 선택된 NI-308 항체의 C9orf72 폴리-GP 반복체-길이 의존적 결합의 요약. 샌드위치 ELISA에 의한 C9orf72 폴리-GA 또는 폴리-GP 디펩티드 반복체 단백질 펩티드에 대한 인간-유래의 NI-308 항체의 디펩티드 반복체-길이 의존적 결합 특이성 및 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)의 결정. 항체 NI-308.1507(C)는 각각 >400 nM 및 9.0 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀에 용액내 결합하였다. 항체 NI-308.18F7(D)는 각각 0.34 nM 및 0.45 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 용액내 인식하였다. 항체 NI-308.28G1(E)은 각각 0.46 nM 및 0.40 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 DPR 단백질 펩티드 (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀을 용액내 표적화하였다. 항체 NI-308.5G2(F)는 38.2 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 단일 DPR 단백질 펩티드 (GP)₂₀만을 용액내 인식하였다.

도 9는 C9orf72 (GA)₂₀ 디펩티드 반복체 단백질 펩티드 모노머성 및 응집된 제조물에 대한 NI-308.18F7 및 NI-308.1507 항체의 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다.

도 10은 투과전자현미경에 의한 시험관내 C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물의 특징분석을 나타낸다. 비-응집된(모노머성, A) 및 아밀로이드-피브릴 유사 응집된(응집된, B) (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물의 대표적인 이미지. 배율: 66k. 축척 막대: 0.5 μm.

도 11은 간접 ELISA 결합 분석에 의한 모노머성 및 응집된 C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물에 대한 NI-308.18F7 및 NI-308.1507 결합 특이성 및 EC₅₀ 결정을 나타낸다. 간접 ELISA를 이용한 모노머성 (●) 및 응집된 (■) C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물에 대한 NI-308.18F7 및 NI-308.1507 항체의 결합 특이성 및 EC₅₀ 결정. 항체 NI-308.18F7(A)는 각각 0.87 nM 및 0.89 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 모노머성 및 응집된 (GA)₂₀ 제조물을 인식하였다. 항체 NI-308.1507(B)은 각각 0.53 nM 및 0.78 nM의 EC₅₀에서 결합 친화도로 모노머성 및 응집된 (GA)₂₀ 제조물에 결합하였다.

도 12는 샌드위치 ELISA 결합 분석에 의한 모노머성 및 응집된 C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물에 대한 NI-308.18F7 및 NI-308.1507의 결합 특이성 및 EC₅₀ 결정을 나타낸다. 샌드위치 ELISA를 이용하여 용액내에서 모노머성 (●) 및 응집된 (■) C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물에 대한 NI-308.18F7 및 NI-308.1507 항체의 결합 특이성 및 EC₅₀ 결정. 항체 NI-308.18F7(A)는 각각 0.64 nM 및 2.9 nM의 EC₅₀에서 결합 친

화도로 모노머성 및 응집된 (GA)₂₀ 제조물을 인식하였다. 항체 NI-308.1507(B)는 각각 6.3 nM 및 8.1 nM의 EC₅₀으로 모노머성 및 응집된 (GA)₂₀ 제조물에 결합하였다. his-태그된 (GA)₂₀ 제조물 (△)이 없이는 어떠한 항체 결합도 검출되지 않았다. 결합 특이성 및 친화도는 도 9의 표에 요약되어 있다.

도 13은 NI-308 항체의 온전성(integrity) 분석을 나타낸다. 5 µg의 재조합 인간-유래의 NI-308 항-C9orf72 DPR 항체의 SDS-PAGE 분석과 이후의 쿠마시 블루(Coomassie blue) 염색. 예측된 크기의 항체 중쇄 및 경쇄에 대응하는 2개의 주된 밴드가 검출되었다.

도 14는 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1이 FTLD 환자에서 병리적 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 응집체를 검출하였음을 나타낸다. (A) 인간-유래의 NI-308.18F7, NI-308.1507 및 NI-308.5G2 항체는 테스트된 모든 3가지 C9orf72-FTLD 경우의 소뇌의 과립 세포 층에서 병리적 뉴런성 세포막 함유물, 뉴런성 핵내 함유물 및 이영양성 신경돌기(dystrophic neurite)를 밝혔다. 이와 대조적으로, 비-신경학적 대조군 소뇌는 NI-308.18F7, NI-308.1507 및 NI-308.5G2 염색에 대해 음성이었다. 상업적으로 시판되는 항체 C9RANT는 대조군 항체로 사용되었다. 대표적인 이미지가 나타나 있다. (B) 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507 및 NI-308.5G2에 의해 검출된 선택된 C9orf72-FTLD 경우의 소뇌의 과립 세포 층에서의 뉴런성 C9orf72 DPR 함유물의 대표적인 고 배율 이미지. (C) 항체 NI-308.4M1에 의해 검출된 선택된 C9orf72-FTLD 경우의 소뇌의 과립 세포 층에서의 뉴런성 세포질 및 핵내 C9orf72 DPR 함유물의 대표적인 고 배율 이미지. 이와 대조적으로, 비-신경학적 대조군 소뇌는 NI-308.4M1 염색에 대해 음성이었다.

도 15는 C9orf72 폴리-GA 및 폴리-GP DPR 단백질이 공-응집체를 형성함을 나타낸다. C9orf72 핵사뉴클레오티드 반복체 확장을 갖고 있는 인간 FTLD 환자의 소뇌의 과립 층에서의 병리적 C9orf72 폴리-GA 및 폴리-GP DPR 단백질 공-응집체의 존재. NI-308.18F7은 C9orf72 폴리-GA를 인식하였지만, 항체 NI-308.5G2는 C9orf72 폴리-GP 세포질 및 핵내 함유물을 특이적으로 검출하였다. 많은 수의 폴리-GP DPR 단백질 응집체가 폴리-GA 응집체와 함께 공-편재(co-localization)되었다. 대표적인 이미지가 나타나 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0129] 본 발명은 일반적으로 디펩티드 반복체(DPR) 단백질, 특히 그의 응집된 형태의 존재와 연관된 질환 및/또는 증상을 검출하기 위한 면역치료 및 비-침습적 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 선택된 인간 공여자 모집단으로부터 수득된 서열 정보에 기초하여 생성되고 이러한 DPR, 특히 폴리-글리신-알라닌 (Gly-Ala, GA)-DPR, 폴리-글리신-프롤린(Gly-Pro; GP)-DPR, 폴리-글리신-아르기닌(Gly-Arg; GR)-DPR, 폴리-프롤린-아르기닌(Pro-Arg; PR)-DPR 및/또는 폴리-프롤린-알라닌(Pro-Ala; PA)-DPR 및 그의 항원에 결합할 수 있는 재조합 인간-유래의 모노클론 항체 및 그의 항원-결합 절편에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 인간-유래의 모노클론 항체는 C9ORF72-디펩티드 반복체(DPR)를 형성하는 확장된 핵사뉴클레오티드 반복체를 갖는 변형된 C9ORF72에 특이적으로 결합하는 것에 의해 유리하게 특징된다. 실시예에 나타난 것과 같이, 본 발명의 재조합 항체는 위양성을 제공하는 일 없이 DPR 및/또는 병리적 C9ORF72의 검출용 진단 시약으로서 매우 특이적이고, 각각 적어도 가변 영역 및 CDR을 암호화하는 서열이 인간 기원이기 때문에, 인체 내에서 원래 항체의 성숙이 효과적이고 치료제로서 안전할 것으로 합리적으로 기대된다.

[0130] 또한, 본 발명은 그의 임의의 생물공학적 유도체를 포함하는 본 명세서에 개시된 것과 같은 인간-유래의 모노클론 항체를 단독으로 또는 DPR과 연관된 질환, 장애 및/또는 징후를 위해 사용되는 다른 제제와의 조합으로 환자의 치료에 사용하는 용도에 관한 것으로서, 바람직하게는 본 발명의 항체는 추가적인 부작용을 억제하는 제제와 동시에 또는 그의 투여 전후에 연속하여 투여되도록 디자인된다. 상기 문맥에서, 본 발명의 항-DPR 항체는 인간에서 실질적으로 비-면역원성인 것이 바람직하다. 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 인간-유래의 모노클론 항체 및 DPR과 연관된 질환, 장애 및/또는 징후용으로 이용되는 하나 이상의 약물 모두를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0131] I. 정의

[0132] 달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 용어는 2000년 개정되고 2003년 재인쇄된 [Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, ISBN 0 19 850673 2]에서 제공되는 것과 같은 정의로 주어진다.

[0133] 용어 "하나" 또는 "한"의 대상이 하나 이상의 대상을 나타내는 것이 주지된다; 예를 들면 "항체"는 하나 이상의 항체를 나타내는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "하나" (또는 "한"), "하나 이상의" 및 "적어도 하나의"는

본 명세서에서 상호교환적으로 이용될 수 있다.

- [0134] 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 용어 "DPR", 즉 "디펩티드 반복체" 단백질은 본 명세서에서 특히 유전자 내에서 확장된 핵사뉴클레오티드 반복체로 인한 2개 아미노산의 반복 단위를 구체적으로 나타내기 위해 사용된다. 용어 "DPR" 및 "DPR들"은 또한 GA, GR, GP, PA, PR 등과 같은 모든 타입 및 형태의 DPR을 종합적으로 나타내기 위해 사용된다. 이하에서, 본 발명은 주로 FLTD 또는 ALS을 앓고 있는 환자의 뇌 조직 내에서 발견되는 C9ORF72-DPR 단백질에서 흔히 관찰되는 GA, 바람직하게는 15개 반복체(GA₁₅), GP, 바람직하게는 15개 반복체(GP₁₅), GR, 바람직하게는 15개 반복체(GR₁₅), 또는 PR, 바람직하게는 15개 반복체(PR₁₅), 또는 PA, 바람직하게는 15개 반복체(PA₁₅) 중 하나를 포함하거나 이로 이루어지는 DPR을 특이적으로 인식하는 항체에 관해 개시될 것이다. 그러나, 항-C9ORF72-DPR 항체가 바람직한 구현예를 나타내고 있지만, 본 발명은 일반적으로 항-DPR 단백질 및 대응하는 구현예들을 제공한다. 따라서, 원칙적으로 본 명세서에 개시되고 실시예 및 도면에서 예시된 임의의 구현예 및 대응하는 특성들은, 항-C9ORF72-DPR에만 특이적으로 적용가능하지 않는 한, 일반적으로 임의의 항-DPR 단백질 항체에 적용하는 것도 의미함이 강조된다.
- [0135] DPR 연관성 질환의 다른 예는 성인-발병 보행 및 사지(gait and limb) 실조증, 다리 경직(spasticity), 구음장애(dysarthria), 근육 연축(fasciculation), 혀 위축 및 반사항진(hyperreflexia)에 의해 특징되는 천천히 진행되는 신경퇴행성 장애이고 상염색체 우성 소뇌성 실조증 타입 1(ADCA type 1)의 서브타입인 척수소뇌성 실조증 타입 36 이다. 일부 발병된 개체는 또한 청각 소실이 발생할 수 있다; 예컨대, [Garcia-Murias *et al.*, Brain 135 (2012), 1423-1435] 참조. 척수소뇌성 실조증 타입 36은 염색체 20p13 상의 NOP56 유전자에서의 인트론성 GGCTG 핵사뉴클레오티드 반복체의 이형접합 확장에 의해 초래되는 것으로 나타났다; 예컨대, [Garcia-Murias *et al.*, Brain 135 (2012), 1423-1435. Ikeda *et al.*, Neurology 79 (2012), 333-341, Kobayashi *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 89 (2011), 121-130] 참조.
- [0136] 용어 "C9ORF72"는, 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 변경된 형태의 염색체 9 개방 해독틀 72(C9ORF72)를 나타낸다. 용어 "C9ORF72"는 또한 일반적으로 C9ORF72-디펩티드 반복체(DPR)를 유도하는 C9ORF72 핵사뉴클레오티드 확장을 확인하기 위해 사용된다. 따라서, 상기 용어는 또한 C9ORF72-DPR을 나타내기 위해 사용된다. 용어 "C9ORF72"는 또한 돌연변이화 C9ORF72와 같은 모든 타입 및 형태의 C9ORF72를 집합적으로 나타내기 위해 사용된다. 용어 C9ORF72 앞에 부가된 문자는 특정 오솔로그(ortholog)가 기원하는 유기체를 나타내기 위해 사용되며, 예컨대 hC9ORF72는 인간 C9ORF72이고, mC9ORF72는 쥐과 기원이다.
- [0137] 본 명세서에 개시된 항-DPR 항체는 바람직하게는 C9ORF72-디펩티드 반복체(DPR) 및 그의 에피토프에 결합한다. 예를 들면, 병리적으로 변경된 C9ORF72 중 또는 그의 절편, 즉 확장된 인트론성 C9ORF72 핵사뉴클레오티드 반복체의 C9ORF72 전사체로부터 전통적이지 않게 번역된 디펩티드 반복체뿐만 아니라 응집된 형태의 C9ORF72-DPR 또는 그의 절편에 특이적으로 결합하는 항체가 본 명세서에 개시된다. 용어 C9ORF72의 (병리적으로) 응집된/응집체는 전술한 형태를 구체적으로 나타내기 위해 본 명세서에서 이용된다. 본 명세서에서 이용되는 용어 (병리적) "응집된 형태" 또는 "응집체"는 확장된 인트론성 C9ORF72 핵사뉴클레오티드 반복체의 C9ORF72 전사체로부터의 C9ORF72의 오류적/병리적 번역으로 인한 축적 또는 클러스터 형성 생성물을 나타낸다. 이들 응집체, 축적 또는 클러스터 형태는 C9ORF72-DPR 단백질 및/또는 그의 절편이거나, 실질적으로 이로 이루어지거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 C9ORF72-DPR에 "특이적으로 결합하는", "선택적으로 결합하는", 또는 "우세하게 결합하는" 항체에 대한 언급은 다른 비연관성 단백질에 결합하지 않는 항체를 나타낸다; 예컨대, 도 4 참조. 도 4 및 실시예 5에 나타난 것과 같이, 본 발명의 항체는 쌍을 이룬 나선형 필라멘트(paired helical filament, PHF)-tau, TAU, 교차활성 반응 DNA 결합 단백질 43(TDP-43), 트랜스티레틴(transthyretin, TTR), 전장 아밀로이드 전구체 단백질(f1APP) 및 헌팅틴(HTT)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비연관성 아밀로이드-형성 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다.
- [0138] 한 예에서, 본 명세서에 개시된 C9ORF72-DPR 항체는 DPR 및/또는 C9ORF72-DPR 또는 그의 에피토프에 결합할 수 있고, 다른 단백질에 대해서는 배경의 약 2배 이상의 결합을 보이지 않는다. DPR 및/또는 C9ORF72-DPR 단백질 변이체에 "특이적으로 결합하는" 또는 "선택적으로 결합하는" 항체는 C9ORF72-DPR 단백질의 모든 변이체에 결합하지 않는, 즉 적어도 하나의 다른 C9ORF72 콘포머(conformer)에 결합하지 않는 항체를 나타낸다. 예를 들면, 시험관내 및 C9ORF72와 연관된 질환을 갖거나 C9ORF72와 연관된 질환이 발생할 위험성을 갖는 환자로부터 수득된 조직에서 모두 확장된 핵사뉴클레오티드 반복체를 형성하는 DPR을 보여주는 C9ORF72의 형태에 우세하게 결합할 수 있는 항체가 본 명세서에 개시된다; 예컨대, 실시예 8 및 도 7 참조.

- [0139] 본 발명의 항-DPR 항체는 인간 대상체로부터 단리되었으므로, 본 발명의 DPR 항체는 또한 이들 항체가 대상체에 의해 실제로 처음으로 발현되었고, 예를 들면, 여태까지 인간-유사 항체를 제공하기 위해 시도하는 하나의 일반적인 방법으로 제시된 인간 면역글로불린 발현 파지 라이브러리 또는 상기 인간 면역글로불린 레퍼토리의 일부를 발현하는 유전자이식 동물에서 생성된 이종발생(xenogeneic) 항체에 의해 생성된 합성 구조체(construct)가 아님을 강조하기 위하여 "인간 자가-항체" 또는 "인간-유래의 항체"로 불릴 수 있다. 다른 한편으로, 본 발명의 인간-유래의 항체는 단백질 A 또는 친화 컬럼을 통해 정제될 수 있는 인간 혈청 항체 그 자체로부터 이를 구별하기 위하여 합성, 재조합 및/또는 생물공학적으로 나타낼 수 있다.
- [0140] 본 발명의 치료적 접근법의 특별한 이점은 본 발명의 항체는 DPR 단백질 및 그의 응집된 형태의 출현이나 이와 연관됨을 보여주는 질환의 증상이 없는 건강한 인간 대상체로부터의 B 세포 또는 B 메모리 세포로부터 유래되고, 따라서 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR 단백질과 연관된 임상적으로 분명한 질환을 방지하거나, 임상적으로 분명한 질환의 발생 위험을 줄이거나, 임상적으로 분명한 질환의 개시 또는 진행을 지연시킬 수 있는 잠재적 가능성을 갖고 있다는 사실에 있다.
- [0141] 전형적으로, 본 발명의 항체는 또한 이미 체세포 성숙, 즉 항체의 가변 영역의 체세포 변동에 의해 표적 DPR 분자에 대한 높은 친화도 결합에서 선택성 및 효과에 관한 최적화를 통해 성공적으로 진행되었다. 이러한 세포가 생체내, 예컨대 인간에서 자가면역적 또는 알리지성 반응의 측면에서 연관된 또는 다른 생리적 단백질 또는 세포 구조에 의해 달성되지 않았다는 사실은 또한 큰 의학적 중요성을 갖는데, 그 이유는 이것은 임상 테스트 시험을 통해 성공적으로 살아갈 상당히 증가된 기회를 나타내기 때문이다. 말하자면, 효율, 접근성 및 내약성(tolerability)은 이미 적어도 한 인간 대상체에서 예방적 또는 치료적 항체의 전임상 및 임상 개발 이전에 설명되었다. 따라서, 본 발명의 인간-유래의 항-DPR 항체는 치료제로서 그 표적 구조-특이적 효율 및 감소된 부작용 가능성 모두에서 임상적 성공 가능성을 증가시킬 것으로 예측할 수 있다.
- [0142] 이와 대조적으로, cDNA 라이브러리 또는 파지 디스플레이로부터 유래된 항체는 여전히 쥐과 기원인 인간화 항체와 같이 인공 분자이고, 따라서 인체에 대해 외래이다. 따라서, 치료적 항체의 임상적 이용성 및 효능은 항체의 효능 및 약동학에 영향을 미치고 때때로 심각한 부작용을 유도할 수 있는 항-약물 항체(anti-drug antibody, ADA)의 생산에 의해 제한될 수 있다; 예컨대, [Igawa *et al.*, MAbs. 3 (2011), 243-252] 참조. 특히, 인간화 항체 또는 최근의 인간-항체-생성 기술로 생성된 항체들은 본 발명의 항체와 같은 인간-유래의 항체와 대조적으로 항체 반응을 유도하기 쉽고, 예컨대 아달리무맙(adalimumab)과 같이 파지 디스플레이로부터 유래된 인간-유사 항체는 ADA 생산을 유도하는 것으로 보고되었다; 예컨대, [Mansour, Br. J. Ophthalmol 91 (2007), 274-276 and Igawa *et al.*, MAbs. 3 (2011), 243-252] 참조. 따라서, 원하지 않는 면역 반응이 어려운 인간-유래의 항체는 라이브러리 또는 디스플레이 유래의 인공 분자보다 환자에게 더 유익하다.
- [0143] 용어 "펩티드"는 그 의미 내에 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질" (때때로 본 명세서에서 상호교환적으로 이용될 수 있음)을 포함하는 것으로 이해된다. 유사하게, 단백질 및 폴리펩티드의 절편도 고려되며, 본 명세서에서 "펩티드"로 불릴 수 있다. 그럼에도 불구하고, 용어 "펩티드"는 바람직하게는 적어도 5개의 인접 아미노산, 바람직하게는 적어도 10개의 인접 아미노산, 보다 바람직하게는 적어도 15개의 인접 아미노산, 더욱 바람직하게는 적어도 20개의 인접 아미노산, 특히 바람직하게는 적어도 25개의 인접 아미노산을 포함하는 아미노산 중합체를 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 펩티드는 전형적으로 100개 이하의 인접 아미노산, 바람직하게는 80개 이하의 인접 아미노산, 보다 바람직하게는 50개 이하의 인접 아미노산을 갖는다.
- [0144] 본 명세서에서 이용되는 용어 "폴리펩티드"는 단수의 "폴리펩티드"뿐만 아니라 복수의 "폴리펩티드"도 포괄하려는 것이며, 아미드 결합(펩티드 결합으로도 알려져 있음)으로 선형으로 연결된 모노머(아미노산)로 이루어진 분자를 나타낸다. 용어 "폴리펩티드"는 둘 이상의 아미노산의 임의의 사슬 또는 사슬들을 나타내며 특정 길이의 생성물을 나타내지는 않는다. 따라서 "펩티드", "디펩티드", "트리펩티드", "올리고펩티드", "단백질", "아미노산 사슬" 또는 둘 이상의 아미노산의 사슬 또는 사슬들을 나타내기 위해 이용되는 임의의 다른 용어가 "폴리펩티드"의 정의 내에 포함되며, 용어 "폴리펩티드"가 임의의 이들 용어 대신에 또는 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0145] 용어 "폴리펩티드"는 또한 비제한적으로 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화 및 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단 또는 비-천연 생성 아미노산에 의한 변형을 포함하는 폴리펩티드의 발현 후 변형 생성물을 나타내기 위한 것이다. 폴리펩티드는 천연 생물학적 원천에서 유래되거나 재조합 기술에 의해 생산될 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되지는 않는다. 화학적 합성에 의한 것을 포함하는 임의의 방식으로 생성될 수 있다.

- [0146] 본 발명의 폴리펩티드는 약 3개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 25개 이상, 50개 이상, 75개 이상, 100개 이상, 200개 이상, 500개 이상, 1,000개 이상, 또는 2,000개 이상의 아미노산의 크기일 수 있다. 폴리펩티드는 정의된 3 차원 구조를 가질 수 있지만, 반드시 이러한 구조를 갖지는 않는다. 정의된 3 차원 구조를 갖는 폴리펩티드는 접혀진 것으로 불리며, 정의된 3 차원 구조를 보유하지 않고 다수의 상이한 입체형태(conformation)를 채용할 수 있는 폴리펩티드는 접혀지지 않은 것으로 불린다. 본 명세서에서 이용되는 용어 당단백질은 아미노산 잔기의 산소 함유 또는 질소 함유 측쇄, 예컨대 세린 잔기 또는 아스파라긴 잔기를 통해 단백질에 부착되는 적어도 하나의 탄수화물 모이어티(moiety)에 커플링된 단백질을 나타낸다.
- [0147] "단리된" 폴리펩티드 또는 그의 절편, 변이체, 또는 유도체는 그 천연 환경에 있지 않는 폴리펩티드에 관한 것이다. 특정한 레벨의 정제가 요구되지는 않는다. 예를 들면, 단리된 폴리펩티드는 그 천연 또는 자연 환경에서 제거될 수 있다. 임의의 적합한 기법에 의해 분리되거나 분획화되거나 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 천연 또는 재조합 폴리펩티드와 같이, 숙주 세포에서 발현된 재조합적으로 생산된 폴리펩티드 및 단백질은 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다.
- [0148] "재조합 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질"은 재조합 DNA 기법에 의해 생산된, 즉 원하는 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 외인성 재조합 DNA 발현 구조체에 의해 형질전환된 세포, 미생물 또는 포유류로부터 생산된 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다. 대부분의 박테리아 배양에서 발현된 단백질 또는 펩티드에는 전형적으로 글리칸이 없을 것이다. 효모에서 발현된 단백질 또는 폴리펩티드는 포유류 세포에서 발현되는 것과 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있다.
- [0149] 본 발명의 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드의 절편, 유도체, 유사체 또는 변이체뿐만 아니라 합성 또는 생물학적 변이체 및 그의 임의의 조합이 포함된다. 용어 "절편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"에는 천연 펩티드의 아미노산 서열과 충분히 유사한 아미노산 서열을 갖는 펩티드 및 폴리펩티드가 포함된다. 용어 "충분히 유사한"은 제1 및 제2 아미노산 서열이 공통 구조 도메인 및/또는 공통 기능적 활성을 갖도록 제2 아미노산 서열에 대해 충분한 또는 최소 수의 동일하거나 등가의 아미노산 잔기를 함유하는 제1 아미노산 서열을 의미한다. 예를 들면, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100% 동일한 공통 구조 도메인을 포함하는 아미노산 서열이 본 명세서에서 충분히 유사한 것으로 정의된다. 바람직하게는 변이체는 본 발명의 바람직한 펩티드, 특히 병리적 C9ORF72-DPR과 같은 변형된 C9ORF72 뿐만 아니라 DPR 단백질 단독, 그의 변이체, 유도체 또는 유사체의 아미노산 서열과 충분히 유사할 것이다. 이러한 변이체는 일반적으로 본 발명의 펩티드의 기능적 활성을 보유한다. 변이체에는 하나 이상의 아미노산 결실(들), 부가(들), 및/또는 치환(들)에 의해 각각 천연 및 야생형 펩티드의 아미노산 서열과 상이한 펩티드가 포함된다. 이들은 천연 생성 변이체뿐만 아니라 인공적으로 설계된 것일 수 있다.
- [0150] 또한, 본 발명의 항체 또는 항체 폴리펩티드를 언급할 때의 용어 "절편", "변이체", "유도체" 및 "유사체"에는 대응하는 천연 결합 분자, 항체, 또는 폴리펩티드의 적어도 일부 항원-결합 특성을 보유하는 임의의 폴리펩티드가 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드 절편에는 본 명세서에서 다른 곳에 논의된 특정 항체 절편에 부가하여 단백질 분해 절편뿐만 아니라 결실 절편이 포함된다. 본 발명의 항체 및 항체 폴리펩티드의 변이체에는 상술된 것과 같은 절편, 및 아미노산 치환, 결실 또는 삽입으로 인해 변형된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드도 포함된다. 변이체는 천연 생성되거나 천연 생성되지 않을 수 있다. 비-천연 생성 변이체는 본 기술분야에 공지된 돌연변이화 기법을 이용해서 생산될 수 있다. 변이체 폴리펩티드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. DPR 단백질 특이적 결합 분자, 예컨대 본 발명의 항체 및 항체 폴리펩티드의 유도체는 천연 폴리펩티드에서 발견되지 않는 추가적 특징을 나타내기 위해 변형된 폴리펩티드이다. 예에는 융합 단백질이 포함된다. 변이체 폴리펩티드는 또한 본 명세서에서 "폴리펩티드 유사체"로 불릴 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 결합 분자 또는 그의 절편, 항체, 또는 항체 폴리펩티드의 "유도체"는 기능적 측쇄기의 반응에 의해 화학적으로 유도체화된 하나 이상의 잔기를 갖는 대상체 폴리펩티드를 나타낸다. 또한 "유도체"로서 20 가지 표준 아미노산의 하나 이상의 천연 생성 아미노산 유도체를 함유하는 펩티드가 포함된다. 예를 들면, 4-히드록시프롤린이 프롤린에 대해 치환될 수 있고; 5-히드록시라이신이 라이신에 대해 치환될 수 있고; 3-메틸히스티딘이 히스티딘에 대해 치환될 수 있고; 호모세린이 세린에 대해 치환될 수 있고; 오르니틴이 라이신에 대해 치환될 수 있다.
- [0151] 분자의 유사성 및/또는 동일성의 결정:

- [0152] 두 펩티드 사이의 "유사성"은 한 펩티드의 아미노산 서열을 제2 펩티드의 서열과 비교하여 결정된다. 한 펩티드의 아미노산은 이것이 동일하거나 보존적 아미노산 치환인 경우, 제2 펩티드의 대응 아미노산과 유사하다. 보존적 치환에는 [Dayhoff, M.O., ed., The Atlas of Protein Sequence and Structure 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (1978), 및 Argos, EMBO J. 8 (1989), 779-785]에 기재된 것들이 포함된다. 예를 들면, 하기 군 중 하나에 속하는 아미노산은 보존적 변화 또는 치환을 나타낸다: -Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr; -Cys, Ser, Tyr, Thr; -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; -Lys, Arg, His; -Phe, Tyr, Trp, His; 및 -Asp, Glu.
- [0153] 두 폴리뉴클레오티드 간의 "유사성"은 한 폴리뉴클레오티드의 핵산 서열을 폴리뉴클레오티드의 서열과 비교하여 결정된다. 한 폴리뉴클레오티드의 핵산은 이것이 동일한 경우, 또는 핵산이 코딩 서열의 일부인 경우, 제2 폴리뉴클레오티드의 대응 핵산과 유사하며, 핵산을 포함하는 각각의 삼중자(triplet)가 동일한 아미노산 또는 보존적 아미노산 치환을 암호화한다.
- [0154] 두 서열 사이의 동일성 또는 유사성 백분율의 결정은 바람직하게는 [Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 5873-5877]의 수학적 알고리즘을 이용하여 달성된다. 이러한 알고리즘은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 이용 가능한 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410]의 BLASTn 및 BLASTp 프로그램에 도입된다.
- [0155] 동일성 또는 유사성 백분율 결정은 특정 길이 및 조성의 서열에 대해 NCBI 웹페이지 및 "BLAST 프로그램 선택 가이드"에서 권장되는 것과 같이 BLAST 폴리뉴클레오티드 검색을 위해서는 BLASTn 프로그램 및 BLAST 단백질 검색을 위해서는 BLASTp 프로그램의 표준 파라미터로 수행된다.
- [0156] BLAST 폴리뉴클레오티드 검색은 BLASTn 프로그램으로 수행된다.
- [0157] 일반 파라미터에 있어서, "최대 표적 서열" 박스는 100으로 설정될 수 있고, "단축 쿼리" 박스가 확인될 수 있고, "예상 역치" 박스는 1,000으로 설정될 수 있고 "워드 크기" 박스는 NCBI 웹페이지에서 짧은 서열(20개 염기 이하)에 대해 권장된 것과 같이 7로 설정될 수 있다. 더 긴 서열에 있어서, "예상 역치" 박스는 10으로 설정될 수 있고 "워드 크기" 박스는 11로 설정될 수 있다. 스코어링 파라미터에 있어서, "매치/미스매치 스코어"는 1, -2로 설정될 수 있고, "갭 코스트" 박스는 전형으로 설정될 수 있다. 여과 및 마스킹 파라미터에 있어서, "저복잡성 영역" 박스가 확인되지 않을 수 있고, "중-특이적 반복" 박스가 확인되지 않을 수 있고, "순람표만 마스킹" 박스가 확인될 수 있고, "DUST 여과 설정"이 확인될 수 있고 "소문자 마스킹" 박스가 확인되지 않을 수 있다. 일반적으로 "짧고 거의 정확한 매치에 대한 검색"을 이에 대해 이용할 수 있고, 이는 상기 나타난 설정을 대부분 제공한다. 이에 대한 추가 정보는 NCBI 웹페이지에 공개된 "BLAST 프로그램 선택 가이드"에서 확인할 수 있다.
- [0158] BLAST 단백질 검색은 BLASTp 프로그램으로 수행된다. 일반 파라미터에 있어서, "최대 표적 서열" 박스는 100으로 설정될 수 있고, "단축 쿼리" 박스가 확인될 수 있고, "예상 역치" 박스가 10으로 설정될 수 있고 "워드 크기" 박스가 "3"으로 설정될 수 있다. 스코어링 파라미터에 있어서, "매트릭스" 박스는 "BLOSUM62"로 설정될 수 있고, "갭 코스트" 박스는 "존재: 11 연장: 1"로 설정될 수 있고, "조성 조정" 박스는 "조건부 조성 스코어 매트릭스 조정"으로 설정될 수 있다. 여과 및 마스킹 파라미터에 있어서, "저복잡성 영역" 박스가 확인되지 않을 수 있고, "순람표만 마스킹" 박스가 확인되지 않을 수 있고, "소문자 마스킹" 박스가 확인되지 않을 수 있다.
- [0159] 예컨대, 검색된 서열 길이에 대한 두 프로그램의 변형은 NCBI 웹페이지에서 HTML 및 PDF 버전으로 공개된 "BLAST 프로그램 선택 가이드"에서의 권장사항에 따라 수행된다.
- [0160] 폴리뉴클레오티드:
- [0161] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 단수 핵산뿐만 아니라 복수 핵산을 포괄하려는 것이며, 단리된 핵산 분자 또는 구조체, 예컨대 메신저 RNA(mRNA) 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드는 통상적인 포스포디에스테르 결합 또는 비-통상적인 결합(예컨대, 펩티드 핵산(PNA)에서 발견되는 아마이드 결합)을 포함할 수 있다. 용어 "핵산"은 임의의 하나 이상의 핵산 절편, 예컨대 폴리뉴클레오티드에 존재하는 DNA 또는 RNA 절편을 나타낸다. "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는 그 천연 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA에 관한 것이다. 예를 들면, 벡터에 함유된 항체를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 간주된다. 단리된 폴리뉴클레오티드의 추가 예에는 이중성 숙주 세포에서 유지된 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 용액 중의 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) 폴리뉴클레오티드가 포함된다. 단리된 RNA 분자에는 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체가 포함된다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴

클레오티드 또는 핵산에는 합성적으로 생산된 분자가 추가로 포함된다. 또한, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 조절 요소, 예컨대 프로모터, 리보솜 결합 부위 또는 전사 종료자이거나 이를 포함할 수도 있다.

[0162] 본 명세서에서 이용되는 "코딩 영역"은 아미노산으로 번역되는 코돈으로 구성되는 핵산 부분이다. "정지 코돈"(TAG, TGA, 또는 TAA)은 아미노산으로 번역되지 않지만 코딩 영역의 일부로 간주될 수 있지만, 임의의 측면 서열, 예를 들면 프로모터, 리보솜 결합 부위, 전사 종료자, 인트론 등은 코딩 영역의 일부가 아니다. 본 발명의 둘 이상의 코딩 영역은 단일 폴리뉴클레오티드 구조체에, 예컨대 단일 벡터 상에, 또는 별도의 폴리뉴클레오티드 구조체에, 예컨대 별도의 (상이한) 벡터 상에 존재할 수 있다. 또한, 임의의 벡터는 단일 코딩 영역을 함유할 수도 있고, 또는 둘 이상의 코딩 영역을 함유할 수도 있으며, 예컨대 단일 벡터가 별도로 번역글로불린 중쇄 가변 영역 및 번역글로불린 경쇄 가변 영역을 암호화할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오티드, 또는 핵산은 결합 분자, 항체, 또는 그의 절편, 변이체, 또는 유도체를 암호화하는 핵산에 융합되거나 융합되지 않은 이중성 코딩 영역을 암호화할 수 있다. 이중성 코딩 영역에는 비제한적으로 특화된 요소 또는 모티프, 예컨대 분비 신호 펩티드 또는 이중성 기능 도메인이 포함된다.

[0163] 어떤 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 DNA이다. DNA의 경우, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오티드에는 보통 하나 이상의 코딩 영역에 작동가능하게 연관된 프로모터 및/또는 다른 전사 또는 번역 제어 요소가 포함될 수 있다. 작동가능한 연관 유전자 생성물, 예컨대 폴리펩티드에 대한 코딩 영역이 조절 서열(들)의 영향 또는 제어 하에 유전자 생성물의 발현을 배치하기 위한 방식으로 하나 이상의 조절 서열에 연관되는 경우이다. 두 DNA 절편(예컨대 폴리펩티드 코딩 영역 및 이에 연관된 프로모터)은 프로모터 기능의 유도가 원하는 유전자 생성물을 암호화하는 mRNA 전사를 일으키는 경우 그리고 두 DNA 절편 사이의 연결의 성질은 발현 조절 서열이 유전자 생성물의 발현을 지시하는 능력을 방해하거나 DNA 주형이 전사되는 능력을 방해하지 않는 경우 "작동가능하게 연관된" 또는 "작동가능하게 연결된" 것이다. 따라서 프로모터 영역은 프로모터가 핵산의 전사를 일으킬 수 있는 경우, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연관될 것이다. 프로모터는 소정 세포에서만 DNA의 실질적인 전사를 지시하는 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 프로모터 외에 다른 전사 제어 요소, 예를 들면 인핸서, 작동유전자, 억제유전자 및 전사 종료 신호가 세포-특이적 전사를 지시하기 위해 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연관될 수 있다. 적합한 프로모터 및 다른 전사 제어 영역이 본 명세서에 개시된다.

[0164] 다양한 전사 제어 영역이 본 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 이들에는 비제한적으로 척추동물 세포에서 기능하는 전사 제어 영역, 예컨대 비제한적으로 사이토메갈로바이러스(인트론-A와 더불어 최조기 발현 프로모터), 원숭이 바이러스 40(조기 발현 프로모터), 및 레트로바이러스(예컨대 라우스 육종 바이러스)로부터의 프로모터 및 인핸서 절편이 포함된다. 다른 전사 제어 영역에는 척추동물 유전자, 예컨대 액틴, 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 β -글로빈에서 유래된 것들뿐만 아니라 진핵 세포에서 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 서열이 포함된다. 추가적인 적합한 전사 제어 영역에는 조직-특이적 프로모터 및 인핸서뿐만 아니라 림포카인-유도성 프로모터(예컨대, 인터페론 또는 인터류킨에 의해 유도 가능한 프로모터)가 포함된다.

[0165] 유사하게, 다양한 번역 제어 요소가 본 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이들에는 비제한적으로 리보솜 결합 부위, 번역 개시 및 종료 코돈, 및 피코나바이러스에서 유래된 요소(특히 CITE 서열로도 불리는 내부 리보솜 진입 부위, 또는 IRES)가 포함된다.

[0166] 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA, 예를 들면 메신저 RNA(mRNA) 형태이다.

[0167] 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 핵산 코딩 영역은 분비 또는 신호 펩티드를 암호화하는 추가적인 코딩 영역에 연관될 수 있으며, 이는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드의 분비를 지시한다. 신호 가설에 따르면, 포유류 세포에 의해 분비된 단백질은 조면 소포체를 통한 성장하는 단백질 사슬의 외수송이 개시되면 성숙 단백질로부터 절단되는 신호 펩티드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 척추동물 세포에 의해 분비된 폴리펩티드가 일반적으로 폴리펩티드의 N-말단에 융합된 신호 펩티드를 가지며, 이것이 완전한 또는 "전장" 폴리펩티드로부터 절단되어 분비된 또는 "성숙" 형태의 폴리펩티드를 생산하는 것을 알고 있다. 어떤 구현예에서, 천연 신호 펩티드, 예컨대 번역글로불린 중쇄 또는 경쇄 신호 펩티드, 또는 이에 작동가능하게 연관된 폴리펩티드의 분비를 지시하는 능력을 보유하는 그 서열의 기능적 유도체가 이용된다. 다른 한편으로, 이중성 포유류 신호 펩티드, 또는 그의 기능적 유도체가 이용될 수 있다. 예를 들면, 야생형 리더 서열은 인간 조직 플라스미노겐 활성화제(TPA) 또는 마우스 β -글루쿠로니다아제의 리더 서열로 치환될 수 있다.

[0168] 본 발명의 문맥에서 이용되는 "결합 분자"는 주로 항체, 및 그의 절편에 관련되지만, 또한 비제한적으로

호르몬, 수용체, 리간드, 구조적 적합 복합체(MHC) 분자, 샤페론, 예컨대 열 충격 단백질(HSP)뿐만 아니라 세포-세포 접착 분자, 예컨대 카드헤린, 인테그린, C-형 렉틴 및 면역글로불린(Ig) 수퍼패밀리 구성원을 포함하는 디펩티드 반복체(DPR) 단백질에 결합하는, 바람직하게는 변경된 C9ORF72, 특히 (병리적으로) 변경된 C9ORF72-DPR에 결합하는 다른 비-항체 분자를 나타낼 수 있다. 따라서 본 발명의 범위를 제한하지 않고 오직 명확성을 위해, 하기 구현예의 대부분은 치료제 및 진단제의 개발을 위해 바람직한 결합 분자를 나타내는 항체 및 항체-유사 분자에 대해 논의된다.

[0169] 항체:

[0170] 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본 명세서에서 상호교환적으로 이용된다. 항체 또는 면역글로불린은 적어도 중쇄의 가변 도메인을 포함하며, 보통 적어도 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 결합 분자이다. 척추동물 계에서 기본 면역글로불린 구조는 비교적 잘 이해되어 있다; 예컨대, [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)] 참조.

[0171] 아래에 보다 상세히 논의되는 것과 같이, 용어 "면역글로불린"은 생화학적으로 구별될 수 있는 다양하고 넓은 범위의 폴리펩티드 클래스를 포함한다. 본 기술분야의 기술자는 중쇄가 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론(γ , μ , α , δ , ϵ)으로 분류되며 이들 중 일부 서브클래스가 있음(예컨대, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)을 이해할 것이다. 항체의 "클래스", 예컨대 각각 IgG, IgM, IgA IgG, 또는 IgE를 결정하는 것은 이 사슬의 성질이다. 면역글로불린 서브클래스(이소타입), 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 등은 잘 분석되어 있고, 기능적 특화를 부여하는 것으로 알려져 있다. 이들 클래스 및 이소타입 각각의 변형된 버전은 본 개시의 관점에서 본 기술분야의 기술자가 쉽게 식별할 수 있고, 따라서 본 발명의 범위 내이다. 모든 면역글로불린 클래스가 명확히 본 발명의 범위 내이며, 하기 설명은 일반적으로 면역글로불린 분자의 IgG 클래스에 대해 주어질 것이다. IgG에 있어서, 표준 면역글로불린 분자는 분자량 약 23,000 달톤의 두 동일한 경쇄 폴리펩티드 및 분자량 53,000-70,000의 두 동일한 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 4개 사슬은 전형적으로 경쇄가 "Y"의 입구에서 시작하여 가변 영역을 통해 계속 중쇄를 감싸 넣는 "Y" 배치로 이황화 결합에 의해 연결된다.

[0172] 경쇄는 카파 또는 람다(κ , λ)로 분류된다. 각각의 중쇄 클래스는 카파 또는 람다 경쇄에 결합될 수 있다. 일반적으로 경쇄 및 중쇄는 서로 공유 결합되며, 두 중쇄의 "꼬리" 부분은 공유 이황화 연결에 의해 또는 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포 또는 유전적으로 조작된 숙주 세포에 의해 생성되는 경우 비공유 연결에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 배치의 포크형 말단의 N-말단부터 각 사슬 저부의 C-말단으로 진행된다.

[0173] 경쇄 및 중쇄는 모두 구조 영역 및 기능적 상동성으로 구분된다. 용어 "불변(constant)" 및 "가변(variable)"은 기능적으로 이용된다. 이와 관련해서, 두 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H) 부분 모두의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것이 이해될 것이다. 반대로, 경쇄(CL) 및 중쇄(CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 중요한 생물학적 특성, 예컨대 분비, 태반 통과 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등을 부여한다. 관례 상, 불변 영역 도메인의 번호지정은 이들이 항체의 항원-결합 부위 또는 아미노-말단으로부터 더 멀어질수록 증가한다. N-말단 부분은 가변 영역이고, C-말단 부분은 불변 영역이다; CH3 및 CL 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카르복시-말단을 포함한다.

[0174] 상기 나타난 것과 같이, 가변 영역은 항체가 항원 상의 에피토프를 선택적으로 인식하고 특이적으로 결합할 수 있게 한다. 즉, 항체의 V_L 도메인 및 V_H 도메인, 또는 상보성 결정 영역(CDR)의 서브세트가 조합하여 3 차원 항원-결합 부위를 정의하는 가변 영역을 형성한다. 이러한 4 차 항체 구조는 Y의 각 팔의 말단에 존재하는 항원-결합 부위를 형성한다. 보다 구체적으로, 항원-결합 부위는 각각의 V_H 및 V_L 사슬 상에서 세 CDR에 의해 정의된다. DPR, 특히 변경된 C9ORF72를 형성하는 C9ORF72-DPR에 특이적으로 결합하기 충분한 구조를 함유하는 임의의 항체 또는 면역글로불린 절편은 본 명세서에서 "결합 절편" 또는 "면역특이적 절편"으로 상호교환적으로 표시된다.

[0175] 실시예 11에 개시되고 도 13에 나타난 것과 같이, 본 발명의 항체는 IgG, 바람직하게는 포유류 세포, 특히 CHO-S 세포에서 IgG1로 발현될 때, 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 부분 모두에 관해 높은 온전성을 나타내지만, 현저한 오염 또는 단백질분해성 분해 생성물은 검출될 수 없었다.

[0176] 천연 생성 항체에서, 항체는 때때로 각각의 항원-결합 도메인에 존재하는 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 불리는 6개의 고가변 영역을 포함하며, 이는 항체가 수성 환경에서 그 3 차원 배치를 취할 때 항원-결합 도메인을 형성하도록 특이적으로 배치되는 아미노산의 짧은 비인접 서열이다. "CDR"에는 더 작은 분자간 변동성을 나타내

는 4개의 비교적 보존된 "골격" 영역 또는 "FR"이 측면에 있다. 골격 영역은 크기는 β -시트 입체형태를 채용하며, CDR은 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서 골격 영역은 사슬 사이의 비공유 상호작용에 의해 정확한 배향으로 CDR의 배치를 제공하는 골격을 형성하는 작용을 한다. 배치된 CDR에 의해 형성된 항원-결합 도메인은 면역반응성 항원 상에서 에피토프에 상보적인 표면을 정의한다. 상기 상보적 표면은 그 인지체 에피토프에 대한 항체의 비공유 결합을 촉진한다. 각각 CDR 및 골격 영역을 포함하는 아미노산이 정확히 정의되었으므로 본 기술분야의 통상의 기술자는 이를 임의의 주어진 중쇄 또는 경쇄 가변 영역에 대해 쉽게 확인될 수 있다; 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된 ["Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E. et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 및 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917] 참조.

[0177] 본 기술분야에서 이용되거나 및/또는 허용되는 용어의 둘 이상의 정의가 존재하는 경우, 본 명세서에서 이용되는 용어의 정의는 명시적으로 반대로 언급되지 않는 한 이러한 모든 의미를 포함하려는 것이다. 구체예는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두의 가변 영역 내에서 확인되는 비인접 항원 조합 부위를 설명하기 위한 용어 "상보성 결정 영역" ("CDR")의 이용이다. 상기 특정 영역은 본 명세서에 참조로 포함된 [Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 및 Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917]에 기재되었으며, 여기서 정의에는 서로에 대해 비교되는 경우 아미노산 잔기의 중복 또는 서브세트가 포함된다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 그의 변이체의 CDR을 나타내기 위한 어느 정의의 적용도 본 명세서에서 정의되고 이용된 것과 같은 용어의 범위 내인 것으로 의도된다. 상기 언급된 각각의 참고문헌에 의해 정의된 것과 같은 CDR을 포괄하는 적절한 아미노산 잔기를 비교로서 아래 표 1에 나타낸다. 특정 CDR을 포괄하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 변할 것이다. 본 기술분야의 기술자는 어느 잔기가 항체의 주어진 가변 영역 아미노산 서열에 대해 항체의 인간 IgG 서브타입의 특정한 고가변 영역 또는 CDR을 포함하는지를 일상적으로 결정할 수 있다.

표 1

[0178] CDR 정의¹

	Kabat	Chothia
V _H CDR1	31-35	26-32
V _H CDR2	50-65	52-58
V _H CDR3	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32
V _L CDR2	50-56	50-52
V _L CDR3	89-97	91-96

[0179] ¹ 표 1에서 모든 CDR 정의의 번호지정은 Kabat et al.에 나타난 번호지정 관례에 따른다(아래 참조).

[0180] Kabat 등은 또한 임의의 항체에 적용가능한 가변 도메인 서열에 대한 번호지정 시스템을 정의하였다. 본 기술분야의 통상의 기술자는 서열 자체를 넘는 임의의 실험 데이터에 의존하지 않고 임의의 가변 도메인 서열에 대해 상기 "Kabat 번호지정" 시스템을 모호하지 않게 지정할 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 "Kabat 번호지정"은 [Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 나타난 번호지정 시스템을 나타낸다. 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에서 특정 아미노산 잔기 위치의 번호지정에 대한 언급은 Kabat 번호지정 시스템을 따르지만, 이는 이론적인 것이며 본 발명의 모든 항체에 동일하게 적용되지 않을 수 있다. 예를 들면, 제1 CDR의 위치에 따라 이후 CDR이 어느 방향으로든 이동될 수 있다.

[0181] 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 면역특이적 절편, 변이체 또는 유도체에는 비제한적으로 폴리클론, 모노클론, 다중특이성, 인간, 인간화된, 영장류화된, 쥐과화된 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, 에피토프-결합 절편, 예컨대 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fv, 단일쇄 Fv(scFv), 단일쇄 항체, 이황화-연결된 Fv(sdFv), V_L 또는 V_H 도메인을 포함하는 절편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 절편 및 항-이디오타입(항-Id) 항체(예컨대, 본 명세서에 개시된 항체에 대한 항-Id 항체)가 포함된다. ScFv 분자는 본 기술분야에 공지되어 있고, 예컨대 US 특허 5,892,019에 기재된다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM,

IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자일 수 있다.

[0182] 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 5가 구조를 갖는 IgM 또는 그의 유도체가 아니다. 특히 본 발명의 특정 적용, 특히 치료적 이용에서, IgM의 5가 구조 및 친화도 성숙 부재로 인해 IgM은 종종 비특이적 교차 반응성 및 매우 낮은 친화도를 나타내므로, IgM은 IgG 및 다른 2가 항체 또는 대응하는 결합 분자에 비해 덜 유용하다.

[0183] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 폴리클론 항체가 아니며, 즉 혈장 면역글로불린 샘플로부터 수득된 혼합물이기 보다는 실질적으로 하나의 특정 항체종으로 구성된다.

[0184] 단일쇄 항체를 포함하는 항체 절편은 단독으로 또는 하기의 전부 또는 일부와의 조합으로 가변 영역(들)을 포함할 수 있다: 힌지(hinge) 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인. 또한 가변 영역(들)과 힌지 영역, CH1, CH2, 및 CH3 도메인의 임의의 조합을 포함하는 DPR 결합 절편이 본 발명에 포함된다. 본 발명의 항체 또는 그의 면역특이적 절편은 조류 및 포유류를 포함하는 임의의 동물 기원에서 유래될 수 있다. 바람직하게는 항체는 인간, 쥐과, 당나귀, 토끼, 염소, 기니아 피그, 낙타, 라마, 말 또는 닭 항체이다. 다른 구현예에서, 가변 영역은 기원(예컨대, 상어)에서 콘드릭토이드(condrichthoid)일 수 있다.

[0185] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 인간으로부터 단리된 인간 모노클론 항체이다. 선택적으로, 인간 항체의 골격 영역은 데이터베이스에서 관련 인간 생식 계열 가변 영역 서열에 따라 정렬되고 채택된다; 예컨대, MRC Centre for Protein Engineering(Cambridge, UK)에서 호스팅되는 Vbase(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 참조. 예를 들면, 실제 생식 계열 서열에서 잠재적으로 일탈한 것으로 간주되는 아미노산은 클로닝 절차 동안 도입된 PCR 프라이머 서열에 기인할 수 있다. 인공적으로 생성된 인간-유사 항체, 예컨대 파지 디스플레이된 항체 라이브러리 또는 이중발생 마우스로부터의 단일쇄 항체 절편(scFv)에 비해, 본 발명의 인간 모노클론 항체는 (i) 동물 대리물에서에 비해 인간 면역 반응을 이용하여 수득됨, 즉 항체가 인체에서 그 관련 입체형태로 천연 DPR 및 DPR 단백질, 바람직하게는 C9ORF72-DPR에 반응하여 생성되었음, (ii) DPR, 바람직하게는 C9ORF72-DPR의 존재 하에 개체를 보호했거나 적어도 유의미함, 및 (iii) 항체가 인간 기원이므로, 자가 항원에 대한 교차 반응성 위험이 최소화됨을 특징으로 한다; 또한 상기 내용 참조. 따라서 본 발명에 따르면, 용어 "인간 모노클론 항체", "인간 모노클론 자가항체", "인간 항체" 등은 인간 기원인, 즉 인간 세포, 예컨대 B 세포 또는 그의 하이브리도마로부터 단리되었거나 그 cDNA가 인간 세포, 예를 들면 인간 메모리 B 세포의 mRNA로부터 직접 클로닝된 DPR-결합 분자를 표시하기 위해 이용된다. 인간 항체는 항체에서 아미노산 치환이, 예컨대 결합 특징을 개선하기 위해 수행된 경우에도 여전히 "인간", 즉 인간-유래이다. 상기 문맥에서, 인간화 항체 및 다른 인간-유사 항체와 대조적으로, 아래의 논의를 참조하면, 본 발명의 인간-유래의 항체는 인체에서 보여지고 따라서 면역원성의 위험성이 실질적으로 없는 CDR을 포함하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명의 항체는 항체의 가변 경쇄 및 중쇄의 하나 또는 양쪽 모두의 적어도 하나, 바람직하게는 2개 및 가장 바람직하게는 3개의 CDR 모두가 본 명세서에 예시된 인간 항체로부터 유래된다면, 인간-유래인 것으로 나타낼 수 있다.

[0186] 한 구현예에서, 본 발명의 인간-유래의 항체는 자연 발생 항체와 비교하여 예컨대 골격 영역에서의 아미노산 치환, 가변 영역에 외인성으로 융합된 불변 영역, C- 또는 N-말단에서의 상이한 아미노산 등과 같은 이중성 영역을 포함한다.

[0187] 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 또는 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대한 유전자이식되고 아래 및 예를 들면 US 특허 제5,939,598호(Kucheralapati et al.)에 기재된 것과 같이 내인성 면역글로불린을 발현하지 않는 동물로부터 유래된 항체는 본 발명의 실제 인간 항체로부터 이들을 구별하기 위해 인간-유사 항체로 표시된다.

[0188] 예를 들면, 인간-유사 항체, 예컨대 파지 디스플레이로부터 전형적으로 단리된 합성 및 반-합성 항체의 중쇄 및 경쇄의 페어링이 원래 인간 B 세포에서 일어난 것과 같은 원래 페어링을 반드시 반영하지는 않는다. 따라서 본 기술분야에서 일반적으로 이용된 것과 같은 재조합 발현 라이브러리로부터 수득된 Fab 및 scFv 절편은 면역원성 및 안정성에 대한 모든 가능한 연관 효과를 갖는 인공적인 것으로 간주될 수 있다.

[0189] 대조적으로 본 발명은 선택된 인간 대상으로부터 단리된 친화도-성숙된 항체를 제공하며, 이는 인간에서 그의 치료적 유용성 및 그의 내성을 특징으로 한다.

[0190] 본 명세서에서 이용되는 용어 "설치류화된 항체" 또는 "설치류화된 면역글로불린"은 본 발명의 인간 항체로부터 하나 이상의 CDR; 및 설치류 항체 서열에 기반한 아미노산 치환 및/또는 결실 및/또는 삽입을 함유하는 인간 골격 영역을 포함하는 항체를 나타낸다. 설치류를 참조하면, 바람직하게는 마우스 및 래트에서 기원하는 서열이 이용되며, 여기서 상기 서열을 포함하는 항체는 각각 "쥐과화된" 또는 "래트화된" 것으로 불린다. CDR을 제공하

는 인간 면역글로불린은 "부모" 또는 "수신체"로 불리며, 골격 변화를 제공하는 설치류 항체는 "공여체"로 불린다. 불변 영역이 존재할 필요는 없지만, 존재하는 경우 보통 설치류 항체 불변 영역과 실질적으로 동일하며, 즉 적어도 약 85% 내지 90%, 바람직하게는 약 95% 이상 동일하다. 따라서 일부 구현예에서, 전장 쥐과화된 인간 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린은 마우스 불변 영역, 인간 CDR, 및 여러 "쥐과화" 아미노산 치환을 갖는 실질적으로 인간 골격을 함유한다. 전형적으로 "쥐과화된 항체"는 쥐과화된 가변 경쇄 및/또는 쥐과화된 가변 중쇄를 포함하는 항체이다. 예를 들면, 쥐과화된 항체는, 예컨대 키메라 항체의 전체 가변 영역이 비-마우스이므로 전형적인 키메라 항체를 포괄하지 않을 것이다. "쥐과화" 절차에 의해 "쥐과화된" 변형된 항체는 CDR을 제공하는 모체(parent) 항체와 동일한 항원에 결합하고, 보통 모체 항체에 비해 마우스에서 면역원성이 더 적다. "쥐과화된" 항체에 대한 상기 설명은 다른 "설치류화된" 항체, 예컨대 "래트화된 항체"에 대해서도 유사하게 적용되며, 여기서 래트 서열이 쥐과 대신 이용된다.

[0191] 본 명세서에서 이용되는 용어 "중쇄 부분"에는 면역글로불린 중쇄로부터 유래된 아미노산 서열이 포함된다. 중쇄 부분을 포함하는 폴리펩티드는 하기 중 적어도 하나를 포함한다: CH1 도메인, 힌지(예컨대, 상부, 중앙, 및/또는 하부 힌지 영역) 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 또는 그의 변이체 또는 절편. 예를 들면, 본 발명에서 이용하기 위한 결합 폴리펩티드는 CH1 도메인; CH1 도메인, 적어도 일부의 힌지 도메인, 및 CH2 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; CH1 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬; CH1 도메인, 적어도 일부의 힌지 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬, 또는 CH1 도메인, 적어도 일부의 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 또한 본 발명에서 이용하기 위한 결합 폴리펩티드에는 적어도 일부 CH2 도메인(예컨대, CH2 도메인의 전부 또는 일부)이 없을 수 있다. 상기 나타난 것과 같이, 본 기술 분야의 통상의 기술자는 이들 도메인(예컨대, 중쇄 부분)이 천연 생성 면역글로불린 분자로부터의 아미노산 서열과 다르도록 변형될 수 있음을 이해할 것이다.

[0192] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 개시된 특정 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에서, 다량체의 하나의 폴리펩티드 사슬의 중쇄 부분은 다량체의 제2 폴리펩티드 사슬에서와 동일하다. 다른 한편으로, 본 발명의 중쇄 부분-함유 모노머는 동일하지 않다. 예를 들면, 각각의 모노머는, 예를 들면 양특이성 항체 또는 디아바드를 형성하는 상이한 표적 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0193] 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 단일 폴리펩티드 사슬, 예컨대 scFv로 이루어지며, 가능한 생체내 치료 및 진단 적용을 위해 세포내에서 발현된다(인트라바디).

[0194] 본 명세서에 개시된 진단 및 치료 방법에서 이용하기 위한 결합 폴리펩티드의 중쇄 부분은 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드의 중쇄 부분은 IgG1 분자에서 유래된 CH1 도메인 및 IgG3 분자에서 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 그리고 부분적으로 IgG3 분자로부터 유래된 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 중쇄 부분은 부분적으로 IgG1 분자로부터 그리고 부분적으로 IgG4 분자로부터 유래된 키메라 힌지를 포함할 수 있다.

[0195] 본 명세서에서 이용되는 용어 "경쇄 부분"에는 면역글로불린 경쇄로부터 유래된 아미노산 서열이 포함된다. 바람직하게는, 경쇄 부분은 적어도 하나의 V_L 또는 C_L 도메인을 포함한다.

[0196] 항체에 대한 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프의 최소 크기는 약 4개 내지 5개 아미노산으로 여겨진다. 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 바람직하게는 적어도 7개, 보다 바람직하게는 적어도 9개, 가장 바람직하게는 적어도 약 15개 내지 약 30개 아미노산을 함유한다. CDR이 그 3 차 형태로 항원성 펩티드 또는 폴리펩티드를 인식할 수 있으므로, 에피토프를 포함하는 아미노산이 인접할 필요는 없고, 일부 경우에는 심지어 동일한 펩티드 사슬 상에 있지 않을 수도 있다. 본 발명에서, 본 발명의 항체에 의해 인식되는 펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프는 C90RF72-DPR에서 발견되는 것과 같은 GA_{15} 와 같은 DPR의 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 보다 바람직하게는 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 또는 약 15개 내지 약 30개의 인접 또는 비-인접 아미노산 서열을 함유한다. 달리 말하면, 본 발명의 항체 또는 그의 생물공학적 유도체는 바람직하게는 예를 들면, 3 내지 50, 바람직하게는 10 내지 40, 보다 바람직하게는 15 내지 30 및 가장 바람직하게는 15의 2개의 상이한 아미노산 X 및 X'(XXX 및 XXX'; XaaXaa')로 이루어지는 디펩티드의 반복 수를 갖는 DPR을 인식한다. 따라서, 본 발명의 항체 또는 그의 생물공학적 유도체에 의해 인식되는 에피토프 또는 항원은, 15의 반복 수를 갖는 DPR로 이루어진다면, 일반적으로 $(XX')_{15}$ 로 나타낼 수 있다.

[0197] 본 명세서에서 상호교환적으로 이용되는 "특이적으로 결합하는", 또는 "특이적으로 인식하는"은 일반적으로 결

합 분자, 예컨대 항체가 그 항원-결합 도메인을 통해 에피토프에 결합하며, 결합이 항원-결합 도메인 및 에피토프 간의 일부 상보성을 수반한다는 것을 의미한다. 상기 정의에 따르면, 항체는 이것이 무작위 비연관성 에피토프에 결합하는 것에 비해 더 쉽게 그 항원-결합 도메인을 통해 해당 에피토프에 쉽게 결합하는 경우, 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 것으로 불린다. 용어 "특이성"은 본 명세서에서 특정 항체가 특정 에피토프에 결합하는 상대적 친화도를 정량하기 위해 이용된다. 예를 들면, 항체 "A"가 항체 "B"에 비해 주어진 에피토프에 대해 더 높은 특이성을 갖는 것으로 간주될 수도 있고, 또는 항체 "A"가 연관된 에피토프 "D"에 대해 갖는 것에 비해 더 높은 특이성을 갖고 에피토프 "C"에 결합하는 것으로 불릴 수 있다.

[0198] 존재하는 경우, 용어 "면역학적 결합 특징" 또는 항체의 항원과의 다른 결합 특징은 그 모든 문법 형태에서 항체의 특이성, 친화도, 교차 반응성 및 다른 결합 특징을 나타낸다.

[0199] "우세하게 결합하는"이란 결합 분자, 예컨대 항체가 연관된, 유사한, 상동성 또는 유사한 에피토프에 결합하는 것보다 더 쉽게 에피토프에 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 따라서 주어진 에피토프에 "우세하게 결합하는" 항체는 이러한 항체가 연관된 에피토프와 교차 반응할 수 있는 경우라도, 연관된 에피토프에 비해 해당 에피토프에 더 잘 결합할 것이다.

[0200] 비제한적 예로서, 결합 분자, 예컨대 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 K_D 보다 작은 해리 상수(K_D)로 상기 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 에피토프에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 K_D 보다 적어도 한 단위 크기가 작은 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 항원에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 K_D 보다 적어도 2 단위가 작은 크기의 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 에피토프에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0201] 다른 비제한적 예에서, 결합 분자, 예컨대 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 $k(off)$ 보다 작은 오프율($k(off)$)로 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 에피토프에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 $k(off)$ 보다 적어도 한 단위가 작은 크기의 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 에피토프에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 항체는 이것이 제2 에피토프에 대한 항체의 $k(off)$ 보다 적어도 2 단위가 작은 크기의 친화도로 제1 에피토프에 결합하는 경우 제1 에피토프에 우세하게 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0202] 본 명세서에 개시된 결합 분자, 예컨대 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 $5 \times 10^{-2} \text{ 초}^{-1}$, 10^{-2} 초^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ 초}^{-1}$ 또는 10^{-3} 초^{-1} 이하의 오프율($k(off)$)로 DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특정 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다. 보다 바람직하게는 본 발명의 항체는 $5 \times 10^{-4} \text{ 초}^{-1}$, 10^{-4} 초^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ 초}^{-1}$, 또는 10^{-5} 초^{-1} $5 \times 10^{-6} \text{ 초}^{-1}$, 10^{-6} 초^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ 초}^{-1}$ 또는 10^{-7} 초^{-1} 이하의 오프율($k(off)$)로 DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특정 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 DPR은 C9ORF72와 연관된 DPR, 즉 C9ORF72-DPR이다.

[0203] 본 명세서에 개시된 결합 분자, 예컨대 항체 또는 항원-결합 절편, 변이체, 또는 유도체는 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 또는 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 이상의 속도($k(on)$)로 DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특정 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 항체는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, 또는 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 또는 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 이상의 속도($k(on)$)로 DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특정 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다. 한 구현예에서, 상기 결합 분자는 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 또는 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 이상의 속도($k(on)$)로 C9ORF72-DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특이적 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 항체는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$, 또는 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 또는 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 초}^{-1}$ 이상의 속도($k(on)$)로 C9ORF72-DPR 또는 그의 절편, 변이체 또는 특이적 입체형태에 결합하는 것으로 불릴 수 있다.

[0204] 결합 분자, 예컨대 항체는 에피토프에 대한 기준 항체(reference antibody)의 결합을 어느 정도 차단하는 정도로 해당 에피토프에 우세하게 결합하는 경우, 주어진 에피토프에 대해 기준 항체의 결합을 경쟁적으로 저해하는 것으로 불린다. 경쟁적 저해는 본 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면 경쟁 ELISA 분석에 의해 결정될

수 있다. 항체는 주어진 에피토프에 대해 기준 항체의 결합을 적어도 90%, 적어도 80%, 적어도 70%, 적어도 60%, 또는 적어도 50%만큼 경쟁적으로 저해하는 것으로 불릴 수 있다.

[0205] 본 명세서에서 이용되는 용어 "친화도"는 결합 분자, 예컨대 면역글로불린 분자의 CDR과 개별 에피토프의 결합 강도의 척도를 나타낸다; 예컨대, [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), pages 27-28] 참조. 본 명세서에서 이용되는 용어 "결합력"은 면역글로불린 모집단 및 항원 사이의 복합체의 전체적 안정성, 즉 항원과 면역글로불린 혼합물의 기능적 조합 강도를 나타낸다; 예컨대, [Harlow, pages 29-34] 참조. 결합력은 특정 에피토프와 모집단 내 개별 면역글로불린 분자의 친화도 및 또한 항원과 면역글로불린의 가수에 모두 연관된다. 예를 들면, 2가 모노클론 항체 및 고도 반복 에피토프 구조, 예컨대 중합체를 갖는 항원 간의 상호작용이 높은 결합력 중 하나일 것이다. 항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합력은 임의의 적합한 방법을 이용하여 실험적으로 결정될 수 있다: 예를 들면 [Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992)], 및 본 명세서에 기재된 방법 참조. 항원에 대한 항체의 친화도 측정을 위한 일반 기법에는 ELISA, RIA, 및 표면 플라즈몬 공명이 포함된다. 특정한 항체-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건, 예컨대 염 농도, pH 하에 측정되는 경우, 변할 수 있다. 따라서 친화도 및 다른 항원-결합 파라미터, 예컨대 K_D , IC_{50} 의 측정은 바람직하게는 표준화된 항체 및 항원 용액 및 표준화된 버퍼로 수행된다.

[0206] 본 발명의 결합 분자, 예컨대 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 또한 그의 교차 반응성의 관점에서 기재되거나 특정될 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 용어 "교차 반응성"은 한 항원에 특이적인 항체가 제2 항원과 반응하는 능력; 두 상이한 항원 물질 간의 관련성 척도를 나타낸다. 따라서 항체는 이것이 그 형태를 유도한 것과 다른 에피토프에 결합하는 경우, 교차 반응성이다. 교차 반응성 에피토프는 일반적으로 유도 에피토프와 동일한 여러 상보적 구조 특징을 함유하며, 일부 경우 실제로 원래보다 더 잘 맞을 수도 있다.

[0207] 예를 들면, 특정 항체는 이들이 관련되었지만 동일하지 않은 에피토프, 예컨대 기준 에피토프에 대해 적어도 95%, 적어도 90%, 적어도 85%, 적어도 80%, 적어도 75%, 적어도 70%, 적어도 65%, 적어도 60%, 적어도 55%, 및 적어도 50% 동일성(본 기술분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 계산됨)을 갖는 에피토프에 결합한다는 점에서 어느 정도 교차 반응성을 갖는다. 항체는 이것이 기준 에피토프에 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 75% 이하, 70% 이하, 65% 이하, 60% 이하, 55% 이하, 및 50% 이하 동일성(본 기술분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 계산됨)을 갖는 에피토프에 결합하지 않는 경우 교차 반응성이 적거나 없는 것으로 불릴 수 있다. 항체는 이것이 임의의 다른 유사체, 오르소로그, 또는 해당 에피토프의 상동체에 결합하지 않는 경우, 특정 에피토프에 대해 "고도로 특이적"인 것으로 간주될 수 있다.

[0208] 본 발명의 결합 분자, 예컨대 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 또한 DPR 및/또는 C9ORF72-DPR을 보여주는 돌연변이화 C9ORF72 중 및/또는 그의 절편에 대한 그의 결합 친화도의 관점에서 기재되거나 특정될 수 있다. 바람직한 결합 친화도에는 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, 또는 10^{-15} M 이하의 해리 상수 또는 K_d 를 갖는 것들이 포함된다.

[0209] 이전에 나타난 것과 같이, 다양한 면역글로불린 클래스의 불변 영역의 서브유닛 구조 및 3 차원 배치는 널리 공지되어 있다. 본 명세서에서 이용되는 용어 " V_H 도메인"에는 면역글로불린 중쇄의 아미노 말단 가변 도메인이 포함되며, 용어 "CH1 도메인"에는 면역글로불린 중쇄의 제1(최아미노 말단) 불변 영역 도메인이 포함된다. CH1 도메인은 V_H 도메인에 인접하며 면역글로불린 중쇄 분자의 힌지 영역에 대해 아미노 말단이다.

[0210] 본 명세서에서 이용되는 용어 "CH2 도메인"에는 통상적인 번호지정 방식을 이용해서 항체의 잔기 약 244 내지 잔기 360으로 연장되는 중쇄 분자 부분이 포함된다(잔기 244 내지 360, Kabat 번호지정 시스템; 및 잔기 231-340, EU 번호지정 시스템; Kabat EA et al., op. cit 참조). CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접히 패어링되지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려 두 N-연관된 분기쇄 탄수화물 사슬이 온전한 천연 IgG 분자의 두 CH2 도메인 사이에 배치된다. 또한 CH3 도메인은 CH2 도메인으로부터 IgG 분자의 C-말단으로 연장되며 약 108개 잔기를 포함하는 것이 잘 보고되어 있다.

[0211] 본 명세서에서 이용되는 용어 "힌지 영역"에는 CH1 도메인을 CH2 도메인으로 연결하는 중쇄 분자 부분이 포함된

다. 상기 힌지 영역은 약 25개 잔기를 포함하며 가요성이므로, 두 N-말단 항원-결합 영역이 독립적으로 움직일 수 있게 한다. 힌지 영역은 3 개별 도메인: 상부, 중앙, 및 하부 힌지 도메인으로 하위 구분될 수 있다; [Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090] 참조.

[0212] 본 명세서에서 이용되는 용어 "이황화 결합"에는 두 황 원자 간에 형성된 공유 결합이 포함된다. 아미노산 시스테인은 제2 티올기와 이황화 결합 또는 가교를 형성할 수 있는 티올기를 포함한다. 대부분의 천연 생성 IgG 분자에서, CH1 및 CL 영역은 이황화 결합에 의해 연결되며, 두 중쇄는 Kabat 번호지정 시스템을 이용해서 239 내지 242(위치 226 또는 229, EU 번호지정 시스템)에 대응하는 위치에서 두 이황화 결합에 의해 연결된다.

[0213] 본 명세서에서 이용되는 용어 "연결된", "융합된" 또는 "융합"은 상호교환적으로 이용된다. 이들 용어는 화학적 접합 또는 재조합 수단을 포함하는 어떠한 수단에 의해서든 둘 이상의 요소 또는 성분을 함께 연결하는 것을 나타낸다. "틀내 융합(in-frame fusion)"은 원래 ORF(open reading frame)의 정확한 번역 해독들을 유지하는 방식으로 연속적이고 더 긴 ORF를 형성하기 위한 둘 이상의 폴리뉴클레오티드 개방 해독들(ORF)의 연결을 나타낸다. 따라서 재조합 융합 단백질은 원래 ORF에 의해 암호화된 폴리펩티드에 대응하는 둘 이상의 절편(이 절편이 보통 자연적으로 이렇게 연결되지 않음)을 함유하는 단일 단백질이다. 따라서 해독들은 융합된 절편을 통해 연속적으로 제조되지만, 절편은 예를 들면 틀내 링커 서열에 의해 물리적으로 또는 공간적으로 분리될 수 있다. 예를 들면, 면역글로불린 가변 영역의 CDR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 틀내 융합될 수 있지만, "융합된" CDR이 연속적 폴리펩티드의 일부로 공-번역되는 한, 적어도 하나의 면역글로불린 골격 영역 또는 추가적인 CDR 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다.

[0214] 본 명세서에서 이용되는 용어 "발현"은 유전자가 생화학 물질, 예를 들면 RNA 또는 폴리펩티드를 생산하는 절차를 나타낸다. 이 절차에는 비제한적으로 유전자 낙다운(knockdown)뿐만 아니라 일시적 발현 및 안정한 발현 모두를 포함하는, 세포 내에서 유전자의 기능적 존재의 임의의 표시가 포함된다. 이는 비제한적으로 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 작은 헤어핀(small hairpin) RNA(shRNA), 작은 간섭(small interfering) RNA(siRNA) 또는 임의의 다른 RNA 생성물로의 전사 및 mRNA의 폴리펩티드(들)로의 번역이 포함된다. 원하는 최종 생성물이 생화학 물질인 경우, 발현에는 해당 생화학 물질 및 임의의 전구체의 생성이 포함된다. 유전자의 발현은 "유전자 생성물"을 생산한다. 본 명세서에서 이용되는 유전자 생성물은 핵산, 예컨대 유전자의 전사에 의해 생산되는 메신저 RNA, 또는 전사체로부터 번역되는 폴리펩티드일 수 있다. 본 명세서에 기재된 유전자 생성물에는 전사 후 변형, 예컨대 폴리아데닐화를 갖는 핵산 또는 번역 후 변형, 예컨대 메틸화, 글리코실화, 지질 부가, 다른 단백질 서브유닛과의 연관, 단백질분해 절단 등을 갖는 폴리펩티드가 추가로 포함된다.

[0215] 본 명세서에서 이용되는 용어 "샘플"은 대상체 또는 환자로부터 수득된 임의의 생물학적 물질을 나타낸다. 한 측면에서, 샘플은 혈액, 복수, CSF, 침 또는 소변을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 혈액 샘플에서 농축된 B 세포 및 배양된 세포(예컨대, 대상체로부터의 B 세포)를 포함할 수 있다. 샘플에는 또한 생검 또는 신경 조직을 포함하는 조직 샘플이 포함될 수 있다. 다른 측면에서, 샘플은 전체 세포 및/또는 세포의 용해물을 포함할 수 있다. 혈액 샘플은 본 기술분야에 공지된 방법에 의해 수집될 수 있다.

[0216] 질환:

[0217] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "장애(disorder)" 및 "질환(disease)"은 본 명세서에서 상호교환적으로 이용되며, 대상체, 동물, 단리된 기관, 조직 또는 세포/세포 배양에서 임의의 원하지 않는 생리적 변화를 포함한다.

[0218] 전두측두엽 퇴화(FTLD)는 뇌의 전두엽 및 측두엽에서의 위축과 연관된 발병과정이다. 추가로, 50%의 FTLD 환자는 또한 양성 가족력을 갖는 것으로 나타났고, 근위축성 측삭 경화증(ALS)과 비교되었다. 이미 전술한 것과 같이, 발병과정의 공통된 기저 원인은 FTLD 및 ALS 환자의 C9orf72 내에 위치하는 이형접합 확장된 헥사뉴클레오티드 반복체인 것으로 보인다. 특히, 결과물인 2개 아미노산의 반복 단위(디펩티드 반복체, DPR)인 것으로 나타났다.

[0219] 그러나, 2개의 아미노산이 반복(DPR)하게 되는 확장된 헥사뉴클레오티드 반복체는 또한 몇 가지 다른 질환 및/또는 장애에서도 보고되었다. 상기 질환은 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS 및/또는 척수소뇌성 실조증 타입 36 및 그와 연관된 징후를 비제한적으로 포함한다.

[0220] 본 발명의 항체는 FTLD 환자의 조직 섹션에서 DPR, 특히 C9orf72-DPR에 결합할 수 있는 것으로 나타났으므로(예컨대, 실시예 12 및 도 14 참조), 상기 인간-유래의 항체 및 그의 생물공학적 유도체는 FTLD 및 DPR과 연관된 다른 질환 및/또는 장애 및 그의 징후의 치료 및 진단 모두에 유용하다. 특히, 질환 진행을 조절함에 있어서의 본 발명의 항체의 시험관내 및 생체내 치료 잠재력은 각각 세포-기반의 모델 또는 선택된 C9orf72 헥사뉴클레오티드

티드 반복체 확장 마우스 모델에서 평가된다; 예컨대, 실시예 14 및 실시예 15 참조.

[0221] 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 항체, 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 결합 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포는 DPR과 연관된 질환의 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조, 질환 진행 및/또는 치료 반응의 모니터링, 및 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS 및/또는 척수소뇌성 실조증 타입 36을 포함하는 DPR 아밀로이드증과 연관된 질환의 진단을 위해 사용된다.

[0222] 실시예 12 및 실시예 13 뿐만 아니라 도 14 및 도 15에 나타난 것과 같이, 본 발명의 항체는 FTLD 환자에서 병리적 C9ORF72-디펩티드 반복체 단백질 응집체에 결합한다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 항체, 그의 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 결합 분자, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포는 C9ORF72-DPR과 연관된 질환의 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조, 질환 진행 및/또는 치료 반응의 모니터링, 및 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS 및/또는 그와 연관된 징후를 포함하는 C9ORF72-DPR과 연관된 질환의 진단을 위해 사용된다.

[0223] 치료:

[0224] 본 명세서에서 이용되는 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 조치를 모두 나타내며, 여기서 목적은 원하지 않는 생리적 변화 또는 장애, 예컨대 심장 결합의 발생을 예방하거나 완화(경감)시키는 것이다. 유익하거나 원하는 임상적 결과에는 비제한적으로 검출 가능하긴 검출 불가능하긴, 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 안정화(즉 악화되지 않는) 질환 상태, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 완화 또는 경감, 및 진정(부분적이건 전체적이건)이 포함된다. "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우 예상되는 생존에 대비한 생존의 연장을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 자들에는 이미 상태 또는 장애를 갖는 자들뿐만 아니라 상태 또는 장애를 갖기 쉬운 자들 또는 상태 또는 장애의 발현이 예방되어야 하는 자들이 포함된다.

[0225] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "약물", "의약" 또는 "약제"는 본 명세서에서 상호교환적으로 이용되며, 비제한적으로 모든 (A) 내용 또는 외용을 위한, 인간 또는 다른 동물의 질환의 진단, 치유, 완화, 치료, 또는 예방을 위해 이용되기 위한 물질, 의약 및 제조물 및 임의의 물질 또는 물질의 혼합물; 및 (B) 인간 또는 다른 동물의 신체 구조 또는 임의의 기능에 영향을 미치기 위한 물질, 의약 및 제조물(음식 이외); 및 (C) 조항 (A) 및 (B)에 명시된 임의의 물질의 성분으로 이용하기 위한 물질이 포함되어야 한다. 용어 "약물", "의약" 또는 "약제"에는 충전제, 봉해제, 운환제, 활택제, 결합제로서 하나 이상의 "제제", "화합물", "물질" 또는 "(화학적) 조성물"을 또는 일부 다른 문맥에서는 다른 약학적 불활성 부형제를 함유하거나 인간 또는 다른 동물의 신체 내의 의도하는 표적 위치, 예컨대 피부, 위 또는 내장에서 "약물", "의약" 또는 "약제"의 용이한 수송, 봉해, 분해, 용해 및 생물학적 이용 가능성을 보장하는 인간 또는 다른 동물에서의 이용을 위한 제조물의 전체 제형물이 포함되어야 한다. 용어 "제제", "화합물", 또는 "물질"은 본 명세서에서 상호교환적으로 이용되며, 보다 구체적인 문맥에서는 비제한적으로 모든 약리 활성 제제, 즉 원하는 생물학적 또는 약리적 효과를 유도하거나 본 발명의 방법에 의해 이러한 가능한 약리적 효과를 유도할 가능성에 대해 연구되거나 평가되는 제제가 포함되어야 한다.

[0226] "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자" 또는 "포유류"는 그에 대한 진단, 예진, 예방, 또는 치료법을 원하는 임의의 대상체, 특히 포유류 대상체, 예컨대 인간 환자를 의미한다.

[0227] 약학적 담체:

[0228] 약학적으로 허용가능한 담체 및 투여 경로는 본 기술분야의 기술자에게 공지된 해당 문헌에서 취해질 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 기술분야에 널리 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다; 예를 들면 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols. 2nd Edition by Robinson et al., Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2nd Edition by Taylor and Francis (2006), ISBN: 0-8493-1630-8] 참조. 적합한 약학적 담체의 예는 본 기술분야에 널리 공지되어 있고 포스페이트 버퍼화 식염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대 오일/물 에멀전, 다양한 유형의 수화제, 멸균 용액 등이 포함된다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화될 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 적합한 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 적합한 조성물의 투여는 상이한 방식으로 시행될 수 있다. 예에는 경구, 비강내, 직장, 국소, 복강내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 경피, 수막내 및 두개내 방법을 통한 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 조성물의 투여가 포함된다. 에어로졸 제형, 예컨대 비강 스프레이 제형에는 활성 제제의 정제된 수성 또는 다른 용액이 보존제 및 등장화제와 함께 포함된다.

다. 이러한 제형은 바람직하게는 비강 점막에 상용성인 pH 및 등장성 상태로 조정된다. 경구 투여를 위한 약학적 조성물, 예컨대 단일 도메인 항체 분자(예컨대, "nanobodiesTM") 등도 본 발명에서 고려된다. 이러한 경구 제형은 정제, 캡슐, 분말, 액체 또는 반고체 형태일 수 있다. 정제는 고형 담체, 예컨대 젤라틴 또는 보강제를 포함할 수 있다. 직장 또는 질 투여를 위한 제형은 적합한 담체와의 좌약으로 제공될 수 있다; 또한 [O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735] 참조. 다양한 투여 유형에 적합한 제형에 관한 추가 지침은 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)] 및 해당 업데이트에서 찾아볼 수 있다. 약물 전달을 위한 방법의 간략한 리뷰에 대해서는 [Langer, Science 249 (1990), 1527-1533] 참조.

II. 본 발명의 항체

본 발명은 일반적으로 인간-유래의 항-DPR, 바람직하게는 항-C9ORF72-DPR 항체 및 그의 항원-결합 절편뿐만 아니라 생물공학적 유도체에 관한 것으로, 이는 바람직하게는 실시예에 예시된 항체에 대해 개요된 것과 같은 면역학적 결합 특징 및/또는 생물학적 특성을 나타낸다. 본 발명에 따르면, DPR에 특이적인 인간 모노클론 항체가 건강한 인간 대상체 풀로부터 클로닝되었다. 그러나, 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 인간 모노클론 항-DPR 항체는 또한 DPR 응집과 연관된 질환 및/또는 장애의 징후를 보여주는 환자로부터 클로닝될 수 있다.

본 발명에 따라 수행된 실험 과정에서, 먼저 DPR 결합에 대해 스크리닝된 배양된 인간 메모리 B 세포의 컨디셔닝된 배지 내에 존재하는 항체로부터 유래되는 재조합 IgG 항체는 DPR 및 소 혈청 알부민(BSA)을 포함하는 다른 단백질에 대해 결합하는 능력에 대해 평가되었다; 실시예 3 내지 7 뿐만 아니라 도 2 내지 6 참조. 스크리닝에서 상기 DPR 단백질에는 결합하지만 어떠한 다른 단백질에도 결합하지 않는 B-세포 상등액만이 항체의 클래스 및 경쇄의 서브클래스의 결정을 포함하는 추가적인 분석을 위해 선택되었다. 이후, 선택된 B-세포를 항체 클로닝을 위해 처리하였다; 실시예 1 내지 12 뿐만 아니라 도 14 참조.

간략하게, 상기 클로닝 방법은 상기 선택된 B-세포로부터의 메신저 RNA의 추출, RT-PCR에 의한 역전사, PCR에 의한 항체-코딩 영역의 증폭, 플라스미드 벡터 내로의 클로닝 및 서열분석으로 이루어진다. 이후, 선택된 인간 항체는 HEK293 또는 CHO 세포에서의 재조합 발현에 의해 생산 및 정제되고, 이어서 인간 DPR 단백질에 결합하는 능력에 대해 특징분석된다. 다양한 테스트들의 조합, 예컨대 HEK293 또는 CHO 세포에서의 항체의 재조합 발현 및 후속하는 인간 DPR 단백질에 대한 결합 특이성의 특징분석, 및 그의 병리적으로 돌연변이화 및/또는 응집된 형태에 대한 구별된 결합은 처음으로 DPR에 대해 매우 특이적이고, DPR 단백질, 예를 들면 C9ORF72-DPR의 병리적으로 응집된 형태를 구별적으로 인식하고 선택적으로 결합하는 인간 항체가 클로닝되었음을 확인하였다. 어떤 경우에 있어서, 본 발명의 인간 항체의 가변 도메인에 기초하여 마우스 키메라 항체가 또한 생성되었다.

따라서, 본 발명은 일반적으로 재조합 인간-유래의 모노클론 항-DPR 항체 및 그의 DPR-결합 절편, 합성 및 생물공학적 유도체 및 변이체에 관한 것이다. 본 발명의 한 구현예에서, 상기 항체는 C9ORF72-DPR에 결합할 수 있다.

본 발명의 한 구현예에서, 상기 항체는 DPR 단백질 또는 펩티드에 결합하며, 반복 수는 C9ORF72의 GA, GP, GR, PR 및 PA에 대한 실시예에서 사용된 것과 같이 약 10 내지 20, 바람직하게는 15이다; 예컨대, 실시예 8 및 실시예 9 뿐만 아니라 도 7 및 도 8 참조. 상기 DPR 단백질은 DPR 만으로 본질적으로 이루어지거나, 예를 들면 C9ORF72 내의 엑손 1에서의 GA 또는 GP 반복체와 같이 더 큰 폴리펩티드 내에서 N-말단, C-말단 또는 그 사이에 상기 DPR을 포함할 수 있다.

또한, 실시예 12 및 실시예 13에 나타내고 도 14 및 도 15에 보여진 것과 같이, 본 발명의 인간-유래의 모노클론 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1 항-DPR 항체는 병리적 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR에 특이적으로 결합하고 생리적 형태에서 C9ORF72는 실질적으로 인식하지 않는 것을 특징으로 한다; 예컨대, 도 14 및 도 15 참조. 따라서, 본 발명은 특히 진단 및 치료 목적에 유용한 결합 특성을 갖는 인간 항-DPR 항체의 세트를 제공한다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명은 DPR 단백질, 예를 들면 C9ORF72-DPR의 병리적으로 응집된 형태에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 제공한다.

한 구현예에서, 본 발명의 항체는 실시예에 기재된 것과 같이 예시적인 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10 항체 중 어느 하나의 결합 특성을 나타낸다. 본 발명의 항-DPR 항체는 생리적 C9ORF72 보다는 병리적으로 변경된 C9ORF72, 예컨대 C9ORF72-DPR 중 및 그의 절편을 우세하게 인식한다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 생리적 C9ORF72 중을 실질적으로 인식하지 않는다.

- [0237] 용어 "실질적으로 인식하지 않는다"는 본 출원에서 항체, 그의 절편 또는 특정 표적 분자, 항원 및/또는 표적 분자 및/또는 항원의 입체형태에 특이적인 결합 분자를 포함하는 그룹의 분자의 결합 친화도를 설명하기 위해 이용되는 경우, 전술한 그룹의 분자가 다른 분자, 항원 및/또는 입체형태에 결합하기 위한 전술한 그룹의 분자의 결합 친화도에 비해 적어도 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배 또는 9 배 더 작은 결합 친화도로 상기 분자, 항원 및/또는 입체형태에 결합함을 의미한다. 매우 자주 해리 상수(KD)가 상기 결합 친화도의 측정으로서 사용된다. 때때로, 이것은 예를 들면 결합 친화도의 측정으로서 사용되는 ELISA 분석과 같은 특정 분석에서의 EC₅₀이다. 바람직하게는 용어 "실질적으로 인식하지 않는다"는 본 출원에서 이용되는 경우, 전술한 그룹의 분자가 다른 분자, 항원 및/또는 입체형태에 결합하기 위한 전술한 그룹의 상기 분자의 결합 친화도에 비해 적어도 10 배, 20 배, 50 배, 100 배, 1,000 배 또는 10,000 배 이하인 결합 친화도로 상기 분자, 항원 및/또는 입체형태에 결합함을 의미한다.
- [0238] 전술한 것과 같이, FTLN 및 ALS에서 C9ORF72가 응집되는 가장 흔한 유전적 원인은 상기 C9ORF72 유전자의 비코딩 엑손 1a 및 1b 사이에 위치하는 이형접합 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체(GGGGCC)로 인한 것으로 나타났다. 특히, 즉, 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체의 3가지 교대 해독틀 내에서 상기 센스 전사체의 전통적이지 않은 비-ATG 번역의 결과 각각 2개 아미노산의 반복 단위(디펩티드 반복체, DPR), 즉 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP), 및/또는 폴리-(Gly-Arg; GR)를 포함하는 상이한 폴리펩티드가 생산, 생성 및 응집된다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 DPR은 폴리-글리신-알라닌(Gly-Ala; GA), 폴리-글리신-프롤린(Gly-Pro; GP) 또는 폴리-글리신-아르기닌(Gly-Arg; GR) 반복체를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 상기 DPR은 폴리-글리신-알라닌(Gly-Ala; GA) 또는 폴리-글리신-프롤린(Gly-Pro; GP) 반복체로 이루어진다.
- [0239] 상기 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체가 C9ORF72의 비코딩 엑손 1a 및 1b 사이에 위치한다는 사실과, 상기 돌연변이화 C9ORF72가 개시 코돈이 없다는 사실에도 불구하고, 모든 해독틀은 디펩티드-반복체(DPR) 단백질, 즉 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP) 및/또는 폴리-(Gly-Arg; GR)로 번역된다. 예비 연구는 또한 항체는 본 발명에 따라 수행된 실험에서 확인 및 클로닝되었고, 실시예 12 및 실시예 13 뿐만 아니라 도 14 및 도 15에 나타난 것과 같이, GA, GP 또는 GP-타입, 즉 센스 가닥 방향(센스 DPR)으로 번역된 C9ORF72-DPR과 연관된 소뇌의 과립 세포 층 내의 뉴런성 세포질 함유물, 뉴런성 핵내 함유물 및 이영양성 신경돌기뿐만 아니라, 양-방향성으로 번역된 DPR, 즉 그 안티센스 방향에서 번역된 디펩티드 반복체 단백질, 즉 폴리-(Pro-Arg; PR) 및/또는 폴리-(Pro-Ala; PA)를 인식할 수 있는 항체를 염색함을 보여준다. 따라서, 양쪽 가닥으로부터 유래된 C9ORF72 단백질 생성물, 즉 센스 및 안티센스 방향에서 번역된 C9ORF72의 엑손 1a 및 1b 사이의 비코딩 영역의 확장된 핵사뉴클레오타이드 반복체의 결과인 DPR의 응집을 확인 및 결합할 수 있는 항체가 제공된다. 따라서, 한 구현예에서, 상기 항-DPR 항체, 그의 DPR-결합 분자 또는 절편, 합성 또는 생물공학적 변이체는 그 센스 및/또는 안티센스 방향에서 C9ORF72 유전자로부터 번역된 DPR을 인식한다. 바람직한 구현예에서, 상기 DPR 항체는 폴리-(Gly-Ala; GA), 폴리-(Gly-Pro; GP), 폴리-(Gly-Arg; GR), 폴리-(Pro-Arg; PR) 및/또는 폴리-(Pro-Ala; PA) 타입의 DPR을 인식한다.
- [0240] 또한, 예비 실험에서, DPR 항체는 상이한 무리(constellation)의 DPR, 즉 상이한 아미노산 조성의 DPR 단백질에 결합할 수 있음이 확인되었다. 특히, (PA)_n 및 (GA)_n, (GP)_n 및 (GA)_n, (PR)_n 및 (GA)_n, 또는 (GR)_n 및 (GA)_n 및 (PR)_n 양쪽으로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 DPR 항체가 관찰되었다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 DPR 항체는 상이한 아미노산 조성을 보여주는 DPR 단백질의 조합으로 이루어지는 DPR 단백질을 인식할 수 있다. 따라서, 실시예에서 개시되고 도 2a 내지 도 2m 및 도 7a 내지 도 7p에 나타난 것과 같이, 동일한 크기의 제공수로 특이성을 갖는 2 또는 심지어 3개의 상이한 디펩티드 반복체를 인식하는 인간-유래의 항체가 수득된다. 바람직한 구현예에서, 상기 항-DPR 항체는 DPR 단백질의 조합으로 이루어지는 DPR 단백질을 인식할 수 있고, 상기 DPR 단백질은 (PA)_n 또는 (GA)_n, (GP)_n 또는 (GA)_n, (PR)_n 또는 (GA)_n, 또는 (GR)_n 또는 (GA)_n 또는 (PR)_n 이며, 즉 본 발명의 항-DPR 항체는 임의의 조합의 DPR, 바람직하게는 항체 NI-308.5G2에 대해 나타난 것과 같은 (GP)_n 및 (GA)_n(도 2a 및 도 2g 및 도 7a, 도 7b, 도 7j 및 도 7k 참조), 또는 항체 NI-308.6B11에 대해 나타난 것과 같은 (GR)_n, (GA)_n 및 (PR)_n(도 2a 및 도 2i 및 도 7a, 도 7c, 도 7l 및 도 7m 참조), 또는 항체 NI-308.4M1에 대해 나타난 것과 같은 (PA)_n 및 (GA)_n(도 2a 및 도 2k 및 도 7e 및 도 7p 참조), 또는 항체 NI-308.16C10에 대해 나타난 것과 같은 (PR)_n 및 (GA)_n(도 2a 및 도 2m 참조)을 인식할 수 있다.
- [0241] 다른 한편으로 또는 부가적으로, 본 발명의 항체는 적어도 제1 및 제2 항원-결합 부위, 즉 구별되는(distinct) 에피토프를 갖는 본 발명의 2가지 상이한 항체 유래의 가변 도메인을 포함하도록 조작될 수 있고, 바람직하게는

하나 또는 양쪽 가변 영역은 첨부된 실시예 및 도면에서 예시되고 본 명세서에서 추가로 개시된 것과 같은 대상 항체 중 임의의 하나로부터 유래된다. 예를 들면, 항체 NI-308.6B11 및 NI-308.4M1의 가변 영역의 조합 결과는 $(GA)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ 및 $(PA)_n$ 으로 이루어지는 DPR의 조합에 결합할 수 있는 항체가 될 것이다. 따라서, 상기 대상 항체는 임의의 조합의 DPR을 인식할 수 있는 항체를 제공할 수 있다. 양특이성 및 다중특이성 항체는 본 기술분야에 잘 알려진 방법, 예를 들면, 예컨대 [Brennan *et al.*, Science. 229 (1985), 81-83]에 의해 개시된 것과 같은 모노클론 면역글로불린 G1 절편의 화학적 조합, 또는 적절한 중쇄 및 경쇄의 재조합적 동시 공-발현 및 대응하는 페어링(pairing)에 의해 생성될 수 있다; 리뷰를 위해서는, 예컨대 [Kontermann, mAbs 4 (2012), 182-197] 및 [Kontermann and Brinkmann, Drug Discovery Today 20 (2015), 838-847] 참조.

[0242] 몇 가지 연구에서, 환자에서의 DPR의 응집은 주로 더 높은 수의 디펩티드 반복체를 갖는 환자에서 일어나는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 DPR 결합 분자는 더 높은 수의 반복체를 함유하는 DPR 단백질, 즉 $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ 또는 $(PA)_n$ 으로 이루어지는 DPR에 결합한다. 따라서, 상기 n은 반복체의 수를 나타내며, 예컨대 15개의 반복체를 갖는 DPR 단백질은 $(XX)_{15}$ 로 나타낼 것이고, 이는 또한, 예컨대 핵사뉴클레오티드 확장 G_4C_2 가 15회 반복됨을 의미한다. 바람직한 구현예에서, 상기 반복 수는 10 내지 30 $(XX')_{10-30}$ 이다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 반복 수는 $(XX')_{15}$ 이다.

[0243] 그러나, 이론에 구애받지 않고, 더 작은 반복 크기, 즉 <15 반복체, 바람직하게는 <10 반복체, 보다 바람직하게는 <5 반복체는 표면에 조밀하게 코팅시에 더 큰 펩티드를 모방할 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 DPR 단백질은 $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ 또는 $(PA)_n$ 으로 이루어지는 DPR에 결합하며, 상기 반복체의 수(n)는 10 반복체 이하이다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 DPR 항체는 $(GA)_n$, $(GP)_n$, $(GR)_n$, $(PR)_n$ 또는 $(PA)_n$ 으로 이루어지는 DPR에 결합하며, 상기 반복체의 수(n)는 5 반복체 이하이다. 예비 실험은 본 발명의 DPR 항체의 결합은 또한 단지 3 내지 4 반복체를 보여주는 DPR 단백질에도 가능함을 보여준다; 예컨대, 도 7 참조. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 3 내지 4개 반복체는 DPR 항체의 결합을 위해 충분하다. 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 전술한 디펩티드 반복체의 임의의 하나의 3개 이하($n < 3$)를 갖는 에피토프에 실질적으로 결합하지 않거나 단지 유의미하게 적은 정도로만 결합한다; 예컨대, 실시예 8 및 실시예 9 뿐만 아니라 도 7 및 도 8 참조.

[0244] 실시예, 특히 실시예 3 및 실시예 4에 나타난 것과 같이, 더 높은 수의 디펩티드 반복체를 보여주는 상이한 DPR 구조체가 디자인되었다. 특히, 15개 반복체, 즉 $(GA)_{15}$, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ 및 $(PR)_{15}$ 를 보여주는 DPR-구조체가 구축되었다. 상기 구조체를 이용하여, 본 발명에 따라 확인된 항체의 특징분석 연구가 수행되었다; 예컨대, 실시예 3 및 실시예 4 참조. 그 결과는 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1 및 NI-308.45C2는 높은 친화도로 C9ORF72-DPR $(GA)_{15}$ 에 특이적으로 결합하지만, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 로 이루어지는 DPR에는 결합하지 않음을 나타내었다; 예컨대, 도 2a, 도 2b, 도 2c, 도 2d 및 도 2e 뿐만 아니라 도 3a, 도 3b, 도 3c, 도 3d 및 도 3e 참조. 이와 대조적으로, 항체 NI-308.5G2, NI-308.12A3 및 NI-308.46E9는 높은 친화도로 C9ORF72-DPR $(GA)_{15}$ 및 $(GP)_{15}$ 를 특이적으로 인식하지만, $(GR)_{15}$, $(PA)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 로 이루어지는 DPR은 인식하지 않는다; 예컨대, 도 2a, 도 2g, 도 2h 및 도 2i 및 도 3a, 도 3g, 도 3h 및 도 3i 참조. 항체 NI-308.24E11은 C9ORF72-DPR $(PR)_{15}$ 만을 인식하지만, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$, $(GA)_{15}$ 또는 $(PA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR은 인식하지 않는다; 예컨대, 도 2a 및 도 2f 뿐만 아니라 도 3a 및 도 3f 참조. 이와 대조적으로, 항체 NI-308.16C10은 C9ORF72-DPR $(PR)_{15}$ 를 우세하게 인식하고 $(GA)_{15}$ 에도 결합하였지만, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 로 이루어지는 DPR은 인식하지 않았다; 도 2a 및 도 2m 뿐만 아니라 도 3a 및 도 3m 참조. 놀랍게도, 항체 NI-308.6B11 및 NI-308.46F8은 $(GR)_{15}$, $(GA)_{15}$ 및 $(PR)_{15}$ 에 대한 높은 친화도를 보였지만, $(GP)_{15}$ 또는 $(PA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR에는 친화도를 보이지 않았다; 예컨대, 도 2a, 도 2i 및 도 2j 뿐만 아니라 도 3a, 도 3i 및 도 3j 참조. 항체 NI-308.4M1은 C9ORF72-DPR $(PA)_{15}$ 및 $(GA)_{15}$ 를 인식하지만, $(GP)_{15}$, $(GR)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 로 이루어지는 DPR은 인식하지 않았다; 예컨대, 도 2a 및 도 2k 뿐만 아니라 도 3a 및 도 3k 참조. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 바람직하게는 $(GA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR 단백질을 인식한다. 다른 구현예에서, $(GA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 본 발명의 항체는 $(GP)_{15}$ 또는 $(GR)_{15}$ 또는 $(PA)_{15}$ 또는 $(PR)_{15}$ 로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 추가 구현예에서, 본 발명의 항체는 바람직하게는 $(GP)_{15}$ 또는 $(GA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하고, 바람직하게는 $(GP)_{15}$ 또는 $(GA)_{15}$ 로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 항체는 $(GR)_{15}$ 또

는 (PR)₁₅ 또는 (PA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 추가 구현예에서, (PR)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 본 발명의 항체는 (GA)₁₅, (GP)₁₅ 또는 (GR)₁₅ 또는 (PA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 다른 추가 구현예에서, (GA)₁₅, (GR)₁₅ 또는 (PR)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 본 발명의 항체는 (GP)₁₅ 또는 (PA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 추가 구현예에서, 본 발명의 항체는 바람직하게는 (PA)₁₅ 또는 (GA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하고, 바람직하게는 (PA)₁₅ 또는 (GA)₁₅로 이루어지는 DPR을 인식하는 항체는 (GP)₁₅ 또는 (GR)₁₅ 또는 (PR)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 다른 추가 구현예에서, 본 발명의 항체는 바람직하게는 (GA)₁₅ 또는 (PR)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하고, 바람직하게는 (PR)₁₅ 또는 (GA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 인식하는 항체는 (GP)₁₅ 또는 (GR)₁₅ 또는 (RA)₁₅로 이루어지는 DPR 단백질을 실질적으로 인식하지 않는다. 달리 말하면, 상기 구현예에서의 항체는 하나 또는 적어도 2개의 상이한 DPR 단백질에 결합할 수 있다; 예컨대, 실시예 3 및 실시예 4 뿐만 아니라 도 2 및 도 3에 도시된 것과 같은 예시적인 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI.308-16C10 참조.

[0245] 실시예에 개시된 것과 같은 구조체를 이용함으로써, 본 발명의 항-DPR 항체는 인간 C9ORF72-DPR (GA)₁₅ 또는 (GP)₁₅, 또는 (GR)₁₅, 또는 (PR)₁₅, 또는 (PA)₁₅에 결합하는 것으로 나타날 수 있다. 상기 문맥에서, 본 발명의 항-DPR 항체 또는 그의 생물공학적 유도체 중 임의의 하나의 결합 친화도는 도 2에서 예시적인 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10 항체에 대해 나타낸 것과 같은 범위일 수 있으며, 즉 BSA-(GA)₁₅, BSA-(GP)₁₅ 또는 BSA-(PA)₁₅ 구조체에 대해 약 0.1 nM 내지 200 nM, 바람직하게는 1 pM 내지 100 nM의 최대 절반 유효 농도(EC₅₀), 보다 바람직하게는 약 50 pM 내지 50 nM의 EC₅₀, 가장 바람직하게는 약 0.1 nM 내지 0.5 nM의 EC₅₀, 및 가장 바람직하게는 BSA-(PR)₁₅ 구조체에 대해 약 10 nM 내지 200 nM의 EC₅₀을 가질 수 있다; 예컨대, 도 3a 내지 도 3m 참조.

[0246] 바람직하게는, 상기 항-DPR 항체, 그의 DPR-결합 절편 또는 생물공학적 유도체는 DPR 단백질 (GA)₁₅, (GR)₁₅ 또는 (PR)₁₅의 결합에 대해 >200 nM, 바람직하게는 ≤100 nM, 보다 바람직하게는 ≤50 nM, 보다 더 바람직하게는 ≤10 nM 및 가장 바람직하게는 ≤0.5 nM, 또는 DPR 단백질 (GP)₁₅ 또는 (PA)₁₅의 결합에 대해 ≤10 nM, 바람직하게는 ≤2 nM, 보다 더 바람직하게는 ≤1 nM 및 가장 바람직하게는 ≤0.5 nM의 EC₅₀(절반 최대 유효 농도) 값에 해당하는 결합 친화도를 갖는다; 예컨대, 도 2a 내지 도 2m 참조.

[0247] 일부 항체는 광범위한 어레이의 생체분자, 예컨대 단백질에 결합한다. 본 기술분야의 기술자가 이해하는 것과 같이, 용어 "특이적"은 DPR이 아닌 다른 생체분자가 항원-결합 분자, 예컨대 본 발명의 항체 중 하나에 특이적으로 결합하지 않음을 나타내기 위해 본 명세서에서 이용된다. 바람직하게는 DPR 이외의 생체분자에 대한 결합 레벨은 각각 DPR에 대한 친화도의 단지 최대 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 2% 이하 또는 단지 1% 이하(즉 적어도 5, 10, 20, 50 또는 100 배 더 낮거나, 이를 상회하는 임의의 것)인 결합 친화도를 일으킨다; 예컨대, 실시예 3 내지 실시예 5 뿐만 아니라 도 2 내지 도 4 참조.

[0248] 한 구현예에서, 본 발명의 항-DPR 항체는 응집된 형태의 DPR, 예를 들면 C9ORF72-DPR 및/또는 그의 절편, 유도체, 피브릴 및/또는 올리고머에 우세하게 결합한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항-DPR 항체는 질환 및/또는 장애와 연관되지 않은 C9ORF72-DPR 및 병리적으로 응집된 형태의 C9ORF72-DPR 모두에 우세하게 결합한다; 예컨대, 실시예 10 뿐만 아니라 도 9 내지 도 12 참조. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항-DPR 항체는, 예를 들면 용액내에서 C9ORF72-DPR 및/또는 그의 절편, 유도체, 피브릴 및/또는 올리고머와 같은 형태의 DPR에 결합할 수 있다; 실시예 7 뿐만 아니라 도 6 참조. 상기 문맥에서, 본 발명의 항-DPR 항체 중 임의의 하나 또는 그의 생물공학적 유도체는 예시적인 항체 NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.45C2 및 NI-308.28G1에 대해 나타낸 것과 같이 용액내에서 폴리-GA DPR 단백질 펩티드를 포획할 수 있거나, 본 발명의 항-DPR 항체 중 임의의 하나 또는 그의 생물공학적 유도체는 예시적인 항체 NI-308.24E11 및 NI-308.6B11에 대해 나타낸 것과 같이 폴리-PR 및 폴리-GR을 침전시킬 수 있다; 예컨대, 도 6a 내지 도 6c 참조.

[0249] 도 14 및 도 15 뿐만 아니라 실시예 12 및 실시예 13에서, 본 발명의 항체는 DPR, 특히 C9ORF72-DPR 단백질의

응집체와 연관된 FTLD 환자의 소뇌의 과립 세포 층 내에서 병리적 뉴런성 세포질 함유물, 뉴런성 핵내 함유물 및 이영양성 신경돌기를 염색할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 인간 조직에서 응집된 C9ORF72에 결합할 수 있다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 항체는 인간 FTLD 조직에서 응집된 C9ORF72에 결합할 수 있다. 전술한 것과 같이, 응집된 C9ORF72는 전술한 것과 같이 그 비-코딩 영역 내에서 확장된 헥사뉴클레오타이드 반복체를 보이는 돌연변이화 C9ORF72를 의미한다. 전술한 것과 같이, 상기 반복체는 ATG 출발 측의 소실을 유도하고, 상기 반복체를 DPR로 번역한다.

- [0250] 전술한 것과 같이, 뇌의 전두엽 및 측두엽 내의 DPR 단백질 응집체는 신경퇴행성 장애인 FTLD의 특징이다. 소뇌의 과립 세포 층 내에 뉴런성 세포질 함유물, 뉴런성 핵내 함유물 및 이영양성 신경돌기 내에 DPR 응집체를 갖는 환자는, 본 발명의 도 14 및 도 15 뿐만 아니라 실시예 12 및 실시예 13에 나타난 것과 같이, 종종 변경된 인지 기능을 보인다. 특히, 전술한 것과 같이, FTLD를 갖는 환자는 전두 및 측두 피질의 퇴화로 인한 치매, 행동 및 성격의 변화, 언어 기능장애 및/또는 정신병을 보인다. 따라서, 한 구현예에서, 본 발명은 DPR과 연관된 질환 및/또는 장애의 치료에 유용하다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체는 FTLD 및 그의 징후의 치료에 유용하다.
- [0251] 본 발명은 또한 항체, 그의 항원-결합 절편, 생물공학적 변이체 및 유도체로 이어지며, 상기 항체는 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체와 동일한 항원-결합 도메인을 포함하거나, 예컨대 (GA)₁₅ 또는 (GP)₁₅ 또는 (GR)₁₅ 또는 (PR)₁₅ 또는 (PA)₁₅와 같은 DPR 결합을 위해 어느 하나 또는 모든 항체와 경쟁할 수 있다.
- [0252] 본 발명은 추가로 DPR을 인식하는 몇 가지 결합 분자, 예컨대 항체 및 그의 결합 절편을 추가로 예시하며, 이는 그의 가변 영역, 예컨대 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 도시된 아미노산 서열 중 임의의 하나를 포함하는 V_H 및/또는 V_L 가변 영역의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)의 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0253] 상기 확인된 가변 영역을 암호화하는 대응 뉴클레오타이드 서열을 아래의 표 2에 나타낸다. V_H 및/또는 V_L 영역의 상기 아미노산 서열의 CDR의 예시적인 세트를 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 도시한다. 그러나, 아래에서 논의되는 것과 같이, 본 기술분야의 기술자는 부가적으로 또는 대안적으로 CDR2 및 CDR3의 경우 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 나타난 그의 아미노산 서열이 1, 2, 3 또는 더 많은 아미노산만큼 상이한 CDR이 이용될 수 있다는 사실을 잘 인지한다. 따라서 한 구현예에서, 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR) 및/또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 그의 하나 이상의 CDR을 그 가변 영역에 포함하는 본 발명의 항체, 또는 그의 생물공학적 유도체 또는 DPR-결합 절편이 제공된다.
- [0254] 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역 또는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 그의 V_H 및/또는 V_L 영역의 아미노산 서열을 포함하는 항체 중 임의의 하나이다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 인간 B-세포에 존재하는 것과 같은 중쇄 및 경쇄의 인지체 페어링의 보존을 특징으로 한다.
- [0255] 본 발명의 추가 구현예에서, 상기 항-DPR 항체, DPR-결합 절편, 그의 합성 또는 생물공학적 변이체는 표적에 대한 적절한 결합 친화도 및 약동학적 및 안정성 특성을 갖도록 최적화될 수 있다. 따라서, 글리코실화, 산화, 탈아민화, 펩티드 결합 절단, 이소-아스파테이트 형성 및/또는 쌍이없는 시스테인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형이 되기 쉬운 CDR 또는 가변 영역 내의 적어도 하나의 아미노산은 이러한 변경이 없는 돌연변이된 아미노산에 의해 치환되거나, 적어도 하나의 탄수화물 모이어티가 결실 또는 화학적 또는 효소적으로 항체에 부가된다; 예컨대, [Liu *et al.*, J. Pharm. Sci. 97(7) (2008), 2426-2447]; [Beck *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 10 (2010), 345-352]; [Habegger *et al.*, MAbs. 6 (2014), 327-339] 참조.
- [0256] 다른 한편으로, 본 발명의 항체는 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 생물공학적 유도체 또는 변이체이며, 이는 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 도시된 것과 같은 V_H 및/또는 V_L 영역을 갖는 항체의 적어도 하나와 DPR에 대한 결합에 대해 경쟁한다.
- [0257] 도 4 및 실시예 5에 제공된 실험 결과는 본 발명의 항-DPR 항체 중 일부가 다른 아밀로이드 형성 단백질보다 C9ORF72-DPR과 같이 질환을 유도하는 응집된 형태의 DPR에 우세하게 결합함을 제시한다. 따라서, 한

구현예에서, 본 발명의 항체는 아밀로이드 형성 단백질보다 C9ORF72-DPR을 우세하게 인식한다.

- [0258] 본 발명의 한 구현예에서, 상기 항-DPR 항체, 그의 DPR-결합 절편, 합성 또는 생물공학적 유도체는 생리적 C9ORF72보다 돌연변이화 및/또는 응집된 형태의 C9ORF72-DPR을 우세하게 인식한다.
- [0259] 본 발명의 항체는 인간-유래의, 특히 치료적 적용을 위한 것일 수 있다. 다른 한편으로, 본 발명의 항체는 특히 동물에서 진단 방법 및 연구에 유용한 설치류, 설치류화된 또는 키메라 설치류-인간 항체, 바람직하게는 쥐과, 쥐과화된 또는 키메라 쥐과-인간 항체 또는 래트, 래트화된 또는 키메라 래트-인간 항체이다. 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 키메라 설치류-인간 또는 설치류화된 항체이다.
- [0260] 또한, 한 구현예에서, 인간 항체의 가변 도메인 및 일반적인 쥐과 경쇄 및 중쇄 불변 도메인을 포함하는 본 발명의 키메라 항체는 인간 DPR에 높은 친화도로 결합한다. 바람직하게는, 키메라 항체의 결합 친화도는 그의 인간-유래의 대응물과 유사하다.
- [0261] 한 구현예에서, 배양된 단일 또는 올리고클론 B-세포의 배양에 의해 본 발명의 항체가 제공되며, 상기 B-세포에 의해 생산된 항체를 함유하는 배양 상등액이 내부의 항-DPR 항체의 존재 및 친화도에 대해 스크리닝된다. 스크리닝 절차는 합성 전장 hDPR 펩티드에서 유래되거나, 예컨대 인간 혈장으로부터 정제되거나 재조합 발현된 hDPR의 천연 모노머, 피브릴성 또는 비-피브릴성 응집체, 예컨대 올리고머에 대한 결합에 대한 스크리닝을 포함한다.
- [0262] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 또한 일반적으로 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 또는 그의 절편에 대한 특이적인 결합에 대해 본 발명의 인간 모노클론 항체와 경쟁하는 항-DPR 항체 및 DPR-결합 분자까지 확장된다.
- [0263] 항체 간의 경쟁은 시험 하의 면역글로불린이 공통 항원, 예컨대 DPR에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 저해하는 분석에 의해 결정된다. 여러 유형의 경쟁적 결합 분석, 예를 들면 하기가 공지되어 있다: 고상 직접적 또는 간접적 방사선면역분석(RIA), 고상 직접적 또는 간접적 효소 면역분석(EIA), 샌드위치 경쟁 분석; [Stahli et al., Methods in Enzymology 9 (1983), 242-253] 참조; 고상 직접적 바이오틴-아비딘 EIA; [Kirkland et al., J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619 및 Cheung et al., Virology 176 (1990), 546-552] 참조; 고상 직접적 표지 분석, 고상 직접적 표지 샌드위치 분석; [Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)] 참조; I^{125} 표지를 이용하는 고상 직접적 표지 RIA; [Morel et al., Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 및 Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82] 참조. 전형적으로 이러한 분석에는 정제된 DPR 또는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR, 예컨대 이들 미표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 기준 면역글로불린, 즉 본 발명의 인간-유래의 모노클론 항체를 보유하는 고형 표면 또는 세포에 결합된 그의 올리고머 및/또는 피브릴의 이용이 관여된다. 경쟁적 저해는 시험 면역글로불린의 존재 하에 고형 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양 결정에 의해 측정된다. 보통 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 바람직하게는 경쟁적 결합 분석은 첨부된 실시예에서 ELISA 분석에 대해 기재된 것과 같은 조건 하에 수행된다. 경쟁적 분석에 의해 확인된 항체(경쟁 항체)에는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애가 일어나도록 기준 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체가 포함된다. 보통 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 적어도 50% 또는 75% 저해할 것이다. 따라서, 본 발명은 추가로 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에 관한 것으로, 상기 항체는 DPR에 대한 결합으로부터 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기준 항체를 경쟁적으로 저해한다.
- [0264] 본 발명은 추가로 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에 관한 것으로, 상기 항체는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 또는 그의 절편에 대한 결합으로부터 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기준 항체를 경쟁적으로 저해한다.
- [0265] 다른 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 중쇄 가변 영역의 V_H -CDR의 적어도 하나 또는 중쇄 가변 영역의 V_H -CDR의 적어도 둘은 본 명세서에 개시된 항체의 기준 중쇄 V_H -CDR1, V_H -CDR2 또는 V_H -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 다른 한편으로, V_H 의 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 영역은 본 명

세서에 개시된 항체의 기준 중쇄 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 따라서 상기 구현예에 따르면, 본 발명의 중쇄 가변 영역은 각각 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 군과 연관된 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다. 도 1a 내지 도 1l은 Kabat 시스템에 의해 정의된 V_H -CDR을 나타내지만, 다른 CDR 정의, 예컨대 Chothia 시스템에 의해 정의된 V_H -CDR도 본 발명에 포함되며, 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 데이터를 이용해서 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0266] 다른 구현예에서, 본 발명은 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 영역이 각각 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 군과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0267] 다른 구현예에서, 본 발명은 임의의 한 V_H -CDR에서의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 아미노산 치환을 제외하고는 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 영역이 각각 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 V_H -CDR1, V_H -CDR2 및 V_H -CDR3 군과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 어떤 구현예에서, 아미노산 치환은 보존적이다.

[0268] 다른 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공하며, 여기서 경쇄 가변 영역의 V_L -CDR의 적어도 하나 또는 경쇄 가변 영역의 V_L -CDR의 적어도 둘은 본 명세서에 개시된 항체의 기준 경쇄 V_L -CDR1, V_L -CDR2 또는 V_L -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 다른 한편으로, V_L 의 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 영역은 본 명세서에 개시된 항체의 기준 경쇄 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 따라서 상기 구현예에 따르면, 본 발명의 경쇄 가변 영역은 각각 도 1a 내지 도 1j 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드와 연관된 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다. 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나는 Kabat 시스템에 의해 정의된 V_L -CDR을 나타내지만, 다른 CDR 정의, 예컨대 Chothia 시스템에 의해 정의된 V_L -CDR도 본 발명에 포함된다.

[0269] 다른 구현예에서, V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 영역이 각각 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 군과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공한다.

[0270] 다른 구현예에서, 본 발명은 임의의 한 V_L -CDR에서의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산 치환을 제외하고는 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 영역이 각각 도 1a 내지 도 1l 중 어느 하나에 나타난 V_L -CDR1, V_L -CDR2 및 V_L -CDR3 군과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 단리된 폴리펩티드를 제공한다. 어떤 구현예에서, 아미노산 치환은 보존적이다.

[0271] 면역글로불린 또는 그 암호화 cDNA는 추가 변형될 수 있다. 따라서 추가 구현예에서, 본 발명의 방법은 키메라 항체, 귀화항체, 단일쇄 항체, Fab-절편, 이중-특이적 항체, 융합 항체, 표지된 항체 또는 이들 중 임의의 하나의 유사체의 생산 단계(들) 중 임의의 하나를 포함한다. 해당 방법은 본 기술분야의 기술자에게 공지되어 있고, 예컨대 [Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988)]에 기재된다. 상기 항체의 유도체가 파지 디스플레이 기법에 의해 수득되는 경우, BIAcore 시스템에서 채용된 것과 같은 표면 플라즈몬 공명이 본 명세서에 기재된 항체의 임의의 하나에서와 동일한 에피토프에 결합하는 파지 항체의 효율을 증가시키기 위해 이용될 수 있다[Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13]. 키메라 항체의 생산은, 예를 들면 국제 출원 W089/09622에 기재된다. 인간화된 항체의 생산 방법은, 예컨대 유럽 출원 EP-A1 0 239 400 및 국제 출원 W090/07861에 기재된다. 본 발명에 따라 이용될 항체의 추가 원천은 소위 이중발생 항체이다. 이중발생 항체, 예컨대 마우스에서의 인간-유사 항체의 생산을 위한 일반 원칙은 예컨대 국제 출원 W091/10741, W094/02602, W096/34096 및 W096/33735에 기재된다. 상기 논의된 것과 같이, 본 발명의 항체는 완전 항체에 더하여, 예를 들면 Fv, Fab 및 F(ab)₂뿐만 아니라 단일쇄를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다; 예컨대, 국제 출원 W088/09344 참조. 따

라서 한 구현예에서, 단일쇄 Fv 절편(scFv), F(ab') 절편, F(ab) 절편, 및 F(ab')₂ 절편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 본 발명의 항체가 제공된다.

[0272] 본 발명의 항체 또는 그의 대응하는 면역글로불린 사슬(들)은 본 기술분야에 공지된 통상적 기법을 이용하여, 예를 들면 아미노산 결실(들), 삽입(들), 치환(들), 부가(들), 및/또는 재조합(들) 및/또는 본 기술분야에 공지된 임의의 다른 변형(들)을 단독으로 또는 조합으로 이용함으로써 추가 변형될 수 있다. 면역글로불린 사슬의 아미노산 서열의 근본이 되는 DNA 서열에 이러한 변형을 도입하기 위한 방법은 본 기술분야의 기술자에게 널리 공지되어 있다; 예컨대, [Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. 및 Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)] 참조. 본 발명의 항체의 변형에는 아세틸화, 히드록실화, 메틸화, 아마이드화 및 탄수화물 또는 지질 모이어티, 보조 인자의 부착 등을 포함하는 측쇄 변형, 골격 변형 및 N- 및 C-말단 변형을 포함하는 하나 이상의 구성 아미노산에서의 화학적 및/또는 효소적 유도체화가 포함된다. 마찬가지로, 본 발명은 이중성 분자, 예컨대 카르복실 말단에서의 면역자극 리간드에 융합된 아미노 말단에 기재된 항체 또는 그의 일부 절편을 포함하는 키메라 단백질의 생산을 포괄한다; 예컨대, 해당하는 기술적 세부사항에 대해서는 국제 출원 WO00/30680 참조.

[0273] 본 발명의 항체는 또한 그 치료적 잠재력을 최적화하는 추가적인 변형을 포함할 수 있다. 상기 변형은 항체의 아미노산 서열(예컨대, 가변 영역)에 대한 변형 및 번역후 변형을 비제한적으로 포함한다. 번역후 변형(post-translational modification, PTM)은 기능적 프로테오믹스에서 중요한 역할을 하는 화학적 변형인데, 그 이유는 이들이 단백질, 핵산, 지질 및 코팩터(cofactor)와 같은 다른 세포성 분자들과의 활성, 국소화 및 상호작용을 조절하기 때문이다. 따라서, 상기 항체의 최적화는, 예컨대 [Igawa *et al.*, *MAbs* 3 (2011), 243-52]에 나타낸 것과 같이, 보관 동안의 개선된 안정성뿐만 아니라 항체의 생체내 또는 시험관내 순환 시간, 증가된 용해도, 안정성, 표적에 대한 증가된 친화도, 감소된 오프-속도(off-rate), 불변 영역(Fc 영역)의 개선된 이펙터(effector) 기능 및 감소된 면역원성 또는 번역후 변형에 대한 감소된 감수성과 같은 항체의 안전성 프로필과 같은 약동학적 및/또는 약력학적 프로필과 같은 몇 가지 이점을 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 구현예에서, 상기 항-DPR 항체, 그의 DPR-결합 절편, 합성 또는 생물공학적 변이체는 최적화될 수 있고, 여기서 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아마이드화, 디아미드화, 플라빈의 공유결합성 부착, 헴 모이어티의 공유결합성 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유결합성 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유결합성 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유결합성 부착, 가교결합, 사이클화, 이황화 결합 형성, 아이소머화, 탈메틸화, 공유결합성 가교결합의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, γ-카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 히드록실화, 가수분해, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 폐길화, 단백질분해성 가공, 포스포릴화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 아르기닐화화 같이 단백질에 대한 아미노산의 운반-RNA 매개성 부가 및 유비퀴틴화(예컨대, [Creighton, "Proteins: Structures and Molecular Properties," 2nd eds., Freeman and Co., N.Y., 1992; "Postranslational Covalent Modification of Proteins," Johnson, eds., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan *et al.*, *Ann. NY. Acad. Sci.* 663 (1992) 48-62] 참조)를 비제한적으로 포함하는 변형이 되기 쉬운 CDR 또는 가변 영역 내의 적어도 하나의 아미노산은 이러한 변경이 없는 돌연변이화 아미노산에 의해 치환되거나, 적어도 하나의 탄수화물 모이어티가 결실되거나 화학적 또는 효소적으로 상기 항체에 추가된다. 바람직한 구현예에서, 상기 변형은 글리코실화, 산화, 탈아미드화, 펩티드 결합 절단, 이소-아스파테이트 형성 및/또는 쌍이없는 시스테인으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치료제로서 상기 DPR-항체 또는 등가의 결합 분자의 유용성을 최적화하는 추가적인 변형은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함된 [Igawa *et al.*, *MAbs* 3 (2011), 243-52]에 개시되어 있다. 탄수화물 모이어티를 추가 또는 결실시키는 방법은 화학적 또는 효소적으로 달성될 수 있으며, 예컨대 [Berg *et al.* "Biochemistry" 5th eds W H Freeman, New York 2002; WO 87/05330; Aplin *et al.*, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22 (1981), 259-306; Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259 (1987), 10-52; Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118 (1981), 131; Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138. (1987), 350]에 상세히 개시되어 있다.

[0274] 추가적으로, 중쇄 CDR3(HCDR3)이 항원-항체 상호작용의 우선적 참여 및 더 큰 정도의 변동성을 갖는 영역임이 빈번하게 관찰되었으므로, 본 발명은 상술된 것과 같은 결합 분자를 함유하는, 예를 들면 전술한 항체 중 임의의 하나의 가변 영역의 CDR3 영역, 특히 중쇄의 CDR3를 함유하는 펩티드를 포괄한다. 이러한 펩티드는 쉽게 합성되거나 본 발명에 따라 유용한 결합 체제를 생산하기 위한 재조합 수단에 의해 생산될 수 있다. 이러한 방법은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 펩티드는, 예를 들면 시판되는 자동화된 펩티드 합성

장치를 이용해서 합성될 수 있다. 펩티드는 또한 펩티드를 발현하는 DNA를 발현 벡터 내에 도입하고 세포를 펩티드를 생산하기 위한 발현 벡터로 형질전환함으로써 재조합 기법에 의해 생산될 수 있다.

[0275] 따라서, 본 발명은 본 발명의 항-DPR 항체에 대해 배향되고 다른 정상 단백질, 예를 들면 C9orf72-DPR 중 및/또는 그의 절편 내에 존재할 수 있는 응집된 DPR에 결합할 수 있는 임의의 결합 분자, 예컨대 항체 또는 그의 결합 절편에 관한 것이다. 이러한 항체 및 결합 분자는 본 명세서에 개시된 것과 같은 ELISA, SDS-PAGE 및 면역조직화학에 의해 그의 결합 특이성 및 친화도에 대해 시험될 수 있으며, 예컨대 실시예 3 내지 실시예 13 참조. 항체 및 결합 분자의 이러한 특징은 웨스턴 블롯으로도 시험될 수 있다; 특히 실시예 6 및 도 5 참조.

[0276] B 세포 또는 메모리 B 세포의 배양에서 직접 면역글로불린을 수득하기 위한 대안으로, 세포가 후속 발현 및/또는 유전적 조작을 위해 재배열된 중쇄 및 경쇄 유전자위의 원천으로 이용될 수 있다. 재배열된 항체 유전자는 적절한 mRNA로부터 역전사되어 cDNA를 생산할 수 있다. 원하는 경우, 중쇄 불변 영역은 상이한 이소타입에 관한 것으로 교환되거나 모두 제거될 수 있다. 가변 영역이 단일쇄 Fv 영역을 암호화하기 위해 연결될 수 있다. 다중 Fv 영역은 둘 이상의 표적에 대해 결합력을 부여하기 위해 연결될 수 있고, 또는 키메라 중쇄 및 경쇄 조합이 채용될 수 있다. 유전 물질을 이용 가능한 경우, 원하는 표적에 결합하는 그의 능력을 모두 보유하는 상술된 것과 같은 유사체의 설계가 수월하다. 항체 가변 영역의 클로닝 및 재조합 항체의 생성을 위한 방법은 본 기술분야의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들면 [Gilliland et al., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792]에 기재되어 있다.

[0277] 적절한 유전 물질이 수득되고 원하는 경우 유사체를 암호화하기 위해 변형되면, 최소한 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 것을 포함하는 코딩 서열이 표준 재조합 숙주 세포 내로 전달감염될 수 있는 벡터 상에 함유된 발현 시스템 내로 삽입될 수 있다. 다양한 상기 숙주 세포가 이용될 수 있다: 그러나 효율적인 가공을 위해서는 포유류 세포가 바람직하다. 상기 목적을 위해 유용한 전형적인 포유류 세포주에는 비제한적으로 CHO 세포, HEK 293 세포, 또는 NSO 세포가 포함된다.

[0278] 이어서 항체 또는 유사체의 생산은 숙주 세포의 성장 및 코딩 서열의 발현을 위해 적절한 배양 조건 하에 변형된 재조합 숙주를 배양함으로써 수행된다. 이어서 항체는 이들을 배양으로부터 단리함으로써 회수된다. 발현 시스템은 바람직하게는 생성 항체가 배지 내로 분비되도록 신호 펩티드를 포함하게 설계된다; 그러나 세포내 생산도 가능하다.

[0279] 상기에 따라, 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 등가의 결합 분자를, 항체의 경우에는 바람직하게는 적어도 상술된 항체의 면역글로불린 사슬의 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 전형적으로, 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 상기 가변 영역은 상기 항체의 가변 영역의 V_H 및/또는 V_L 의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다.

[0280] 본 기술분야의 기술자는 상술된 가변 도메인을 갖는 항체의 가변 도메인이 원하는 특이성 및 생물학적 기능의 다른 폴리펩티드 또는 항체의 구축을 위해 이용될 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 따라서 본 발명은 또한 상술된 가변 도메인의 적어도 하나의 CDR을 포함하고 유리하게는 첨부된 실시예에 기재된 항체와 실질적으로 동일하거나 유사한 결합 특성을 갖는 폴리펩티드 및 항체를 포괄한다. 본 기술분야의 기술자는 결합 친화도가 Kabat에 의해 정의된 것과 같은 CDR과 부분적으로 중복되는 고가변 루프[Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917] 내에서 또는 CDR 내에서 아미노산 치환을 수행하여 증강될 수 있음을 안다; 예컨대, [Riechmann, et al., Nature 332 (1988), 323-327] 참조. 따라서 본 발명은 또한 하나 이상의 전술한 CDR이 하나 이상의, 바람직하게는 둘 이하의 아미노산 치환을 포함하는 항체에 관한 것이다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 나타난 것과 같은 가변 영역의 2개 또는 전체 3개의 CDR을 그 면역글로불린 사슬 중 하나 또는 둘 다에 포함한다.

[0281] 본 기술분야의 통상의 기술자에게 알려진 것과 같이, 본 발명의 결합 분자, 예컨대 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 합성 또는 생물공학적인 변이체 또는 유도체는 하나 이상의 효과인자 기능을 매개하는 불변 영역을 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체 불변 영역에 대한 보체의 C1 성분의 결합은 보체 시스템을 활성화할 수 있다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 흡수 및 용해에서 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하며, 자가면역 과민증에도 관여될 수 있다. 또한 항체는 Fc 영역을 통해 다양한 세포 상의 수용체에 결합하고, 항체 Fc 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위가 세포 상의 Fc 수용체(FcR)에 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(엡실론 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)을 포함하는 상이한 항체 클래스에 특이적인 여러 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체 코팅된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러 세포에 의한 항체 코팅된 표적 세포의 용해(항체 의존적 세포 매개 세포독성 또는 ADCC로 불림), 염증 매개체의

방출, 태반 수송 및 면역글로불린 생산 제어를 포함하는 여러 중요하고 다양한 생물학적 반응을 유발한다.

[0282] 따라서 본 발명의 어떤 구현예에는 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체가 포함되며, 여기서 불변 영역 도메인의 하나 이상의 적어도 분획은 원하는 생화학적 특징, 예컨대 거의 동일한 면역원성의 전체 미 변형된 항체에 비교되는 경우, 감소된 효과인자 기능, 비공유적으로 이량체화하는 능력, DPR 단백질 응집 및 침적 부위에서의 증가된 편재 능력, 감소된 혈청 반감기 또는 증가된 혈청 반감기를 제공하기 위해 결실되거나 달리 변형되었다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 진단 및 치료 방법에서 이용하기 위한 특정 항체는 면역글로불린 중쇄와 유사한 폴리펩티드 사슬을 포함하지만 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 일부가 없는 도메인 결실된 항체이다. 예를 들면 특정 항체에서, 변형된 항체의 불변 영역의 하나의 전체 도메인이 결실될 것이다, 예를 들면 CH2 도메인의 전부 또는 일부가 결실될 것이다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 진단 및 치료 방법에서 이용하기 위한 특정 항체는 본 명세서에서 다른 곳에서 비글리코실화된 또는 "agly" 항체로 불리는 글리코실화를 제거하기 위해 변형된 불변 영역, 예컨대 IgG 중쇄 불변 영역을 갖는다. 이러한 "agly" 항체는 효소적으로 뿐만 아니라 불변 영역에서 공통 글리코실화 부위(들)의 조작에 의해 제조될 수 있다. 이론에 구애받지 않고, "agly" 항체는 생체내 개선된 안전성 및 안정성 프로필을 가질 수 있는 것으로 여겨진다. 원하는 효과인자 기능을 갖는 비글리코실화된 항체의 생산 방법은, 예를 들면 그 전문이 참조로 포함된 국제 출원 W02005/018572에서 확인된다.

[0283] 본 명세서에 기재된 특정 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분은 본 기술분야에 공지된 기법을 이용하여 효과인자 기능을 감소시키기 위해 돌연변이될 수 있다. 예를 들면, (점 돌연변이 또는 다른 수단을 통한) 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화는 순환하는 변형된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시켜서 DPR 단백질 편재를 증가시킬 수 있다. 다른 경우, 본 발명에 일치하는 불변 영역 변형은 보체 결합을 완화하고 이에 따라 혈청 반감기 및 접합된 세포독소의 비특이적 연관을 감소시킬 수 있다. 불변 영역의 다른 변형이 증가된 항원 특이성 또는 항체 유연성으로 인해 증강된 편재를 허용하는 이황화 연결 또는 올리고당 모이어티를 변형하기 위해 이용될 수 있다. 변형의 생성되는 생리적 프로필, 생체이용률 및 다른 생화학적 효과, 예컨대 DPR 단백질 편재, 생체분포 및 혈청 반감기는 과도한 실험 없이 널리 공지된 면역학적 기법을 이용하여 쉽게 측정되고 정량될 수 있다.

[0284] 본 명세서에 기재된 특정 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분은 예로서 Fc γ 수용체, LRP, 또는 Thy1 수용체를 통한 항체의 수용체-매개된 세포내 섭취를 증강시킴으로써, 또는 항체가 살아있는 세포에 해를 끼치지 않고 내부로 들어갈 수 있도록 한다는 'SuperAntibody 기술[Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241]에 의해 항체의 세포 섭취를 증가시키기 위해 대안적인 단백질 서열로 돌연변이되거나 교환될 수 있다. 예를 들면, DPR에 결합하는 특이적 서열을 갖는 세포 표면 수용체 또는 이중- 또는 다중-특이적 항체 뿐만 아니라 세포 표면 수용체의 인지체 단백질 리간드 및 항체 결합 영역의 융합 단백질의 생성은 본 기술분야에 공지된 기법을 이용하여 조작될 수 있다.

[0285] 본 명세서에 기재된 특정 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에서, Fc 부분은 대안적인 단백질 서열로 돌연변이되거나 교환될 수 있고, 또는 항체가 그 혈액 내 장벽 침투를 증가시키기 위해 화학적으로 변형될 수 있다.

[0286] 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체의 변형된 형태는 본 기술분야에 공지된 기법을 이용하여 전체 전구체 또는 모체 항체로부터 제조될 수 있다. 예시적인 기법은 본 명세서에서 보다 상세히 논의된다. 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 본 기술분야에 공지된 기법을 이용해서 제조되거나 제작될 수 있다. 어떤 구현예에서, 항체 분자 또는 그의 절편은 "재조합적으로 생산되며", 즉 재조합 DNA 기술을 이용해서 생산된다. 항체 분자 또는 그의 절편을 제조하기 위한 예시적인 기법은 본 명세서에서 다른 곳에서 보다 상세히 논의된다.

[0287] 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 생물공학적인 변이체 또는 유도체에는 또한, 예컨대 공유 부착이 항체의 그 인지체 에피토프에 대한 특이적 결합을 방지하지 않도록 항체에 대한 임의의 유형의 분자의 공유 부착에 의해 변형된 유도체가 포함된다. 비제한적으로 예를 들면, 항체 유도체에는, 예컨대 글리코실화, 아세틸화, peg화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형된 항체가 포함된다. 임의의 여러 화학적 변형이 비제한적으로 특정한 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하는 공지된 기법에 의해 수행될 수 있다. 추가적으로 유도체는 하나 이상의 비전통적인 아미노산을 함유할 수 있다.

[0288] 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 치료될 동물, 예

컨대 인간에서 해로운 면역 반응을 일으키지 않을 것이다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 결합 분자, 예컨대 항체, 또는 그의 항원-결합 절편은 환자, 예컨대 인간 환자로부터 유래되며, 이후 이들이 유래된 동일한 종, 예컨대 인간에서 해로운 면역 반응의 발생을 완화하거나 최소화하는데 이용된다.

[0289] 탈면역화가 또한 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 용어 "탈면역화"에는 T 세포 에피토프를 변형하기 위한 항체의 변형이 포함된다; 예컨대, 국제 출원 W098/52976 및 W000/34317 참조. 예를 들면, 출발 항체의 V_H 및 V_L 서열이 분석되고, 서열 내에서 상보성 결정 영역(CDR) 및 다른 주요 잔기에 대해 에피토프의 위치를 나타내는 각각의 V 영역으로부터 인간 T 세포 에피토프가 "맵핑"된다. T 세포 에피토프 지도로부터의 개별 T 세포 에피토프는 최종 항체의 활성 변형 위험이 낮은 대안적 아미노산 치환을 확인하기 위해 분석된다. 아미노산 치환의 조합을 포함하는 다양한 대안적 V_H 및 V_L 서열이 설계되며, 이들 서열은 이후 다양한 결합 폴리펩티드, 예컨대 본 명세서에 개시된 진단 및 치료 방법에 이용하기 위한 DPR-특이적 항체 또는 그의 면역특이적 절편 내로 도입되고, 이어서 기능에 대해 시험된다. 전형적으로, 12 내지 24개의 변이체 항체가 생성되고 시험된다. 이어서 변형된 V 및 인간 C 영역을 포함하는 전체 중쇄 및 경쇄 유전자가 발현 벡터 내로 클로닝되고, 이후 플라스미드가 전체 항체의 생산을 위해 세포주 내로 도입된다. 이어서 항체가 적절한 생화학적 및 생물학적 분석에서 비교되고, 최적 변이체가 확인된다.

[0290] 모노클론 항체는 하이브리도마, 재조합, 및 파지 디스플레이 기술 또는 그의 조합의 이용을 포함하는 본 기술분야에 공지된 매우 다양한 기법을 이용해서 제조될 수 있다. 예를 들면, 모노클론 항체는, 예를 들면 그의 전문이 참조로 포함된 [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981)]에 교시되고 본 기술분야에 공지된 것들을 포함하는 하이브리도마 기법을 이용해서 생산될 수 있다. 본 명세서에서 이용되는 용어 "모노클론 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 제한되지 않는다. 용어 "모노클론 항체"는 임의의 진행, 원핵 또는 파지 클론을 포함하여 단일 클론에서 유래된 항체를 나타내며, 이것이 생산된 방법을 나타내지 않는다. 따라서 용어 "모노클론 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 제한되지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 항체는 본 명세서에 개시된 것과 같이 엡스타인-바 바이러스를 이용한 형질전환을 통해 항체 생산용으로 유도된 인간 B 세포로부터 유래된다.

[0291] 널리 공지된 하이브리도마 절차[Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495]에서, 상대적으로 짧게 생존하거나 유한한 포유류로부터의 림프구, 예컨대 본 명세서에 개시된 것과 같은 인간 대상체로부터 유래된 B 세포가 불멸 종양 세포주(예컨대, 골수종 세포주)와 융합되고, 이에 따라 불멸이고 B 세포의 유전적으로 코딩된 항체를 생산할 수 있는 하이브리드 세포 또는 "하이브리도마"를 생산한다. 생성되는 하이브리드는 선택, 희석 및 단일 항체의 형성을 위해 특정 유전자를 포함하는 각각의 개별 계통(strain)으로의 재성장(재배양)에 의해 단일 유전 계통으로 분리된다. 이들은 항체를 생산하며, 이는 원하는 항원에 대해 동종성이고, 그의 순수한 유전적 혈통에 대해 "모노클론"로 불린다.

[0292] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포는 바람직하게는 융합되지 않은 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지로 접종되고 성장된다. 본 기술분야의 기술자는 하이브리도마의 형성, 선택 및 성장을 위한 시약, 세포주 및 배지가 여러 공급원에서 시판되며, 표준화된 프로토콜이 잘 확립되어 있음을 이해할 것이다. 일반적으로, 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 원하는 항원에 대한 모노클론 항체의 생산에 대해 분석된다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클론 항체의 결합 특이성은 시험관 내 분석, 예컨대 본 명세서에 개시된 것과 같은 면역침전, 방사선면역분석(RIA) 또는 효소-연관된 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 결정된다. 하이브리도마 세포가 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 것이 확인된 후, 클론은 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝되고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다; 예컨대, [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 59-103] 참조. 서브클론에 의해 분리된 모노클론 항체가 통상적인 정제 절차, 예컨대 단백질-A, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수 또는 혈청으로부터 분리될 수 있음이 추가로 이해될 것이다.

[0293] 다른 구현예에서, 림프구가 마이크로조작에 의해 선택되고 가변 유전자가 분리될 수 있다. 예를 들면, 말초 혈액 단핵구는 면역화되거나 자연적으로 면역인 포유류, 예컨대 인간으로부터 분리되고, 시험관내에서 약 7 일 동안 배양될 수 있다. 배양은 스크리닝 요건에 부합하는 특이적 IgG에 대해 스크리닝될 수 있다. 양성 웰로부터 세포가 분리될 수 있다. 개별 Ig-생산 B 세포는 FACS에 의해 또는 이들을 보체 매개된 용혈 플라크 분석에서 확인함으로써 분리될 수 있다. Ig-생산 B 세포가 튜브 내로 마이크로조작될 수 있고, V_H 및 V_L 유전자는, 예컨대

RT-PCR을 이용해서 증폭될 수 있다. V_H 및 V_L 유전자는 항체 발현 벡터 내로 클로닝되고 발현을 위해 세포(예컨대, 진핵 또는 원핵 세포) 내로 전달감염될 수 있다.

[0294] 다른 한편으로, 항체-생산 세포주는 본 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 기법을 이용해서 선택되고 배양될 수 있다. 이러한 기법은 다양한 실험실 매뉴얼 및 주요 공보에 기재되어 있다. 이와 관련하여, 아래 기재된 것과 같이 본 발명에서 이용하기 적합한 기법은 그 전문이 보충물을 포함하여 본 명세서에 참조로 포함되는 [Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)]에 기재된다.

[0295] 특정 에피토프를 인식하는 항체 절편이 공지된 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, Fab 및 $F(ab')_2$ 절편은 효소, 예컨대 (Fab 절편을 생산하기 위한) 파파인 또는 ($F(ab')_2$ 절편을 생산하기 위한) 펩신을 이용해서 면역글로불린 분자의 단백질분해 절단에 의해 또는 재조합적으로 생산될 수 있다. $F(ab')_2$ 절편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유한다. 이러한 절편은, 예를 들면 시약, 예컨대 방사성동위원소를 검출하기 위해 면역글로불린의 면역특이적 부분의 커플링이 관여되는 면역진단 절차에서 이용하기에 충분하다.

[0296] 한 구현예에서, 본 발명의 항체는 항체 분자의 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 2개의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 3개의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 4개의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 5개의 CDR을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 항체는 하나 이상의 항체 분자로부터의 적어도 6개의 CDR을 포함한다. 대상 항체에 포함될 수 있는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 예시적인 항체 분자가 본 명세서에 기재된다.

[0297] 본 발명의 항체는 항체의 합성을 위해 본 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 특히 화학적 합성에 의해 또는 바람직하게는 본 명세서에 개시된 것과 같은 재조합 발현 기법에 의해 생산될 수 있다.

[0298] 한 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전체적으로 결실된 합성 불변 영역을 포함한다("도메인-결실된 항체"). 어떤 구현예에서, 상용성의 변형 항체는 전체 CH2 도메인이 제거된 도메인 결실된 구조체 또는 변이체를 포함할 것이다(Δ CH2 구조체). 다른 구현예에 있어서, 짧은 연결 펩티드가 가변 영역에 대해 가요성 및 이동의 자유를 제공하기 위해 결실된 도메인에 대해 치환될 수 있다. 본 기술분야의 기술자는 이러한 구조체가 항체의 이화 속도에 대한 CH2 도메인의 조절 특성으로 인해 특히 바람직하다는 것을 이해할 것이다. 도메인 결실된 구조체는, IgG₁ 인간 불변 도메인을 암호화하는 벡터를 이용해서 유도될 수 있고, 예컨대 국제 출원 W002/060955 및 W002/096948A2 참조. 상기 벡터는 CH2 도메인을 결실시키고 도메인 결실된 IgG₁ 불변 영역을 발현하는 합성 벡터를 제공하기 위해 조작된다.

[0299] 어떤 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 미니바디이다. 미니바디는 본 기술분야에 기재된 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 예컨대 US 특허 제5,837,821호 또는 국제 출원 W094/09817 참조.

[0300] 한 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 이것이 모노머성 서브유닛 사이의 연관을 허용하는 한 소수의 또는 심지어 하나의 아미노산의 결실 또는 치환을 갖는 면역글로불린 중쇄를 포함한다. 예를 들면, CH2 도메인의 선택된 영역에서의 단일 아미노산 돌연변이가 실질적으로 Fc 결합을 감소시키고 이에 따라 DPR 단백질 편재를 증가시키기 충분할 수 있다. 유사하게, 조정될 효과인자 기능(예컨대, 보체 결합)을 제어하는 하나 이상의 불변 영역 도메인의 일부를 단순 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 불변 영역의 부분적 결실은 대상체 불변 영역 도메인에 연관된 다른 바람직한 기능은 온전히 놔두면서 항체의 선택된 특징(혈청 반감기)은 개선할 수 있다. 또한, 상기 암시된 것과 같이, 개시된 항체의 불변 영역은 생성 구조체의 프로필을 증강시키는 하나 이상의 아미노산의 치환 또는 돌연변이를 통해 합성될 수 있다. 상기 측면에서, 변형된 항체의 구조 및 면역원성 프로필을 실질적으로 유지하면서 보존된 결합 부위에 의해 제공되는 활성(예컨대, Fc 결합)을 손상시키는 것이 가능할 수 있다. 다른 구현예는 바람직한 특징, 예컨대 효과인자 기능을 증강시키거나 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 부착을 제공하기 위해 불변 영역에 하나 이상의 아미노산 부가를 포함한다. 이러한 구현예에서, 선택된 불변 영역 도메인으로부터 유래된 특이적 서열을 삽입하거나 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0301] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 항체 분자(예컨대, V_H 영역 및/또는 V_L 영역)의 변이체(유도체 포함)를 포함

하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 항체를 제공하며, 이 항체 또는 그의 절편은 DPR에 면역특이적으로 결합한다. 비제한적으로 아미노산 치환을 일으키는 부위 지정된 돌연변이화 및 PCR-매개된 돌연변이화를 포함하는 본 기술분야의 기술자에게 공지된 표준 기법을 이용하여 항체를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이를 도입할 수 있다. 바람직하게는, 변이체(유도체 포함)는 기준 V_H 영역, V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, V_L 영역, V_L -CDR1, V_L -CDR2, 또는 V_L -CDR3에 비해 50개 이하의 아미노산 치환, 40개 이하의 아미노산 치환, 30개 이하의 아미노산 치환, 25개 이하의 아미노산 치환, 20개 이하의 아미노산 치환, 15개 이하의 아미노산 치환, 10개 이하의 아미노산 치환, 5개 이하의 아미노산 치환, 4개 이하의 아미노산 치환, 3개 이하의 아미노산 치환, 또는 2개 이하의 아미노산 치환을 암호화한다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 전하의 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 전하의 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 패밀리는 본 기술분야에 정의되어 있다. 이들 패밀리에겐 염기성 측쇄(예컨대, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예컨대, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예컨대, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분기된 측쇄(예컨대, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산이 포함된다. 다른 한편으로, 돌연변이는 예컨대 포화 돌연변이화에 의해 코딩 서열의 전부 또는 일부에 따라 무작위 도입될 수 있고, 생성 돌연변이체는 활성(예컨대, DPR 및/또는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 및/또는 그의 절편에 결합하는 능력)을 보유하는 돌연변이체를 확인하기 위해 생물학적 활성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0302] 예를 들면, 항체 분자의 골격 영역에만 또는 CDR 영역에만 돌연변이를 도입할 수 있다. 도입된 돌연변이는 침묵 또는 중성 미스센스 돌연변이일 수 있다, 예컨대, 항원에 결합하는 항체의 능력에 전혀 또는 거의 효과를 갖지 않을 수 있고, 실제로 이러한 돌연변이의 일부는 아미노산 서열을 어떻게든 변형하지 않는다. 이러한 유형의 돌연변이는 코돈 이용을 최적화하거나 하이브리도마의 항체 생산을 개선하기 위해 유용할 수 있다. 본 발명의 항체를 암호화하는 코돈 최적화된 코딩 영역은 본 명세서에서 다른 곳에 개시된다. 다른 한편으로, 비중성 미스센스 돌연변이는 항원에 결합하는 항체의 능력을 변형시킬 수 있다. 가장 침묵하며 중성인 미스센스 돌연변이의 위치는 골격 영역에 있을 가능성이 높은 반면 가장 비중성인 미스센스 돌연변이의 위치는 CDR에 있을 가능성이 높지만, 이것이 절대적인 조건인 것은 아니다. 본 기술분야의 기술자는 원하는 특성을 갖는, 예컨대 항원-결합 활성에 변형이 없는 또는 결합 활성에 변형이 있는(예컨대, 항원-결합 활성의 개선 또는 항체 특이성의 변화) 돌연변이체 분자를 설계하고 시험할 수 있을 것이다. 돌연변이화에 이어, 암호화된 단백질이 일상적으로 발현될 수 있고, 암호화된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성(예컨대, DPR 및/또는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 및/또는 그의 절편 중 적어도 하나의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 능력)이 본 기술분야에 공지된 기법을 일상적으로 변형하여 또는 본 명세서에 기재된 기법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0303] III. 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드

[0304] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 임의의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오타이드로 이루어질 수 있으며, 이는 변형되지 않은 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. 예를 들면, 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 단일- 및 이중-가닥 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 및 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥, 또는 보다 전형적으로 이중-가닥, 또는 단일-가닥 및 이중-가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자로 이루어질 수 있다. 또한, 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA 둘 다를 포함하는 삼중-가닥 영역으로 이루어질 수 있다. 또한 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 안정성 또는 다른 이유를 위해 변형된 DNA 또는 RNA 골격 또는 하나 이상의 변형된 염기를 함유할 수 있다. "변형된" 염기에는, 예를 들면 트리플화된 염기 및 비일반적인 염기, 예컨대 이노신이 포함된다. 다양한 변형이 DNA 및 RNA에 수행될 수 있다; 따라서 "폴리뉴클레오타이드"는 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태를 포괄한다.

[0305] 면역글로불린으로부터 유래된 폴리펩티드(예컨대, 면역글로불린 중쇄 부분 또는 경쇄 부분)의 비천연 변이체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실이 암호화된 단백질 내로 도입되도록 면역글로불린의 뉴클레오타이드 서열 내에 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 부가 또는 결실을 도입함으로써 생성될 수 있다. 돌연변이는 표준 기법, 예컨대 부위 지정된 돌연변이화 및 PCR-매개된 돌연변이화에 의해 도입될 수 있다. 바람직하게는, 보존적 아미노산 치환이 하나 이상의 비필수 아미노산 잔기에서 수행된다.

- [0306] 널리 공지된 것과 같이, RNA는 표준 기법, 예컨대 구아니디늄 이소티오시아네이트 추출 및 침전 후 원심분리 또는 크로마토그래피에 의해 원래 B 세포, 하이브리도마 세포 또는 다른 형질전환된 세포로부터 분리될 수 있다. 원하는 경우, mRNA는 표준 기법, 예컨대 올리고 dT 셀룰로오스 상의 크로마토그래피에 의해 전체 RNA로부터 분리될 수 있다. 적합한 기법은 본 기술분야에서 친숙하다. 한 구현예에서, 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 동시에 또는 별도로, 널리 공지된 방법에 따라 역전사효소 및 DNA 중합효소를 이용하여 제조될 수 있다. PCR은 공개된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열에 기반하여 보다 특이적인 프라이머에 의해 또는 공통 불변 영역 프라이머에 의해 개시될 수 있다. 상기에서 논의된 것과 같이, PCR은 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA 클론을 분리하기 위해 이용될 수 있다. 이러한 경우, 라이브러리는 공통 프라이머 또는 더 큰 상동성 탐침, 예컨대 인간 불변 영역 탐침에 의해 스크리닝될 수 있다.
- [0307] DNA, 전형적으로 플라스미드 DNA는 본 기술분야에 공지된 기법을 이용해서 세포로부터 분리되고, 예컨대 재조합 DNA 기법과 연관된 상기 참고문헌에서 상세히 나타난 표준의 널리 공지된 기법에 따라 제한효소 맵핑되고 서열 분석될 수 있다. 물론, DNA는 분리 절차 또는 후속 분석 동안의 임의의 시점에 본 발명에 따라 합성될 수 있다.
- [0308] 상기 문맥에서, 본 발명은 또한 본 발명의 항체의 면역글로불린 사슬의 적어도 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 한 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H)을 암호화하는 핵산을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 중쇄 가변 영역의 적어도 하나의 CDR 또는 중쇄 가변 영역의 적어도 2개의 V_H -CDR은 본 명세서에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 또는 V_H -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 다른 한편으로, V_H 의 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 또는 V_H -CDR3 영역은 본 명세서에 개시된 항체로부터의 기준 중쇄 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 및 V_H -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 따라서 상기 구현예에 따르면, 본 발명의 중쇄 가변 영역은 도 1에 나타난 폴리펩티드 서열과 연관된 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 또는 V_H -CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다.
- [0309] 다른 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 경쇄 가변 영역(V_L)을 암호화하는 핵산을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 경쇄 가변 영역의 적어도 하나의 V_L -CDR 또는 경쇄 가변 영역의 적어도 2개의 V_L -CDR은 본 명세서에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 V_L -CDR1, V_L -CDR2, 또는 V_L -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 다른 한편으로, V_L 의 V_L -CDR1, V_L -CDR2, 또는 V_L -CDR3 영역은 본 명세서에 개시된 항체로부터의 기준 경쇄 V_L -CDR1, V_L -CDR2, 및 V_L -CDR3 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일하다. 따라서 상기 구현예에 따르면, 본 발명의 경쇄 가변 영역은 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드 서열과 연관된 V_L -CDR1, V_L -CDR2, 또는 V_L -CDR3 폴리펩티드 서열을 갖는다.
- [0310] 다른 구현예에서, 본 발명은 면역글로불린 중쇄 가변 영역(V_H)을 암호화하는 핵산을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 및 V_H -CDR3 영역은 도 1a 내지 도 11 중 어느 하나에 나타난 V_H -CDR1, V_H -CDR2, 및 V_H -CDR3 그룹과 동일한 폴리펩티드 서열을 갖는다.
- [0311] 본 기술분야에 공지된 것과 같이, 두 폴리펩티드 또는 두 폴리뉴클레오티드 간의 "서열 동일성"은 한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 아미노산 또는 핵산 서열을 제2 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 서열과 비교함으로써 결정된다. 본 명세서에서 논의되는 경우, 임의의 특정 폴리펩티드가 다른 폴리펩티드와 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한지 여부는 본 기술분야에 공지된 방법 및 컴퓨터 프로그램/소프트웨어, 예컨대 비제한적으로 BESTFIT 프로그램(Wisconsin 서열 분석 패키지, 유닉스용 버전 8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 이용해서 결정될 수 있다. BESTFIT은 두 서열 사이의 최적 상동성 절편을 찾기 위해 Smith 및 Waterman의 국소 상동성 알고리즘[Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489]을 이용한다. 특정 서열이, 예를 들면 본 발명에 따른 기준 서열과 95% 동일한지 여부를 결정하기 위해 BESTFIT 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램 이용하는 경우, 파라미터는 물론 동일성 백분율이 기준 폴리펩티드 서열의 전장에 걸쳐 계산되고 기준 서열에서 총 아미노산 수의 최대 5%의 상동성 내 갭이 허용되도록 설정된다.

[0312] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 표 2에 도시된 것과 같은 항-DPR 항체의 V_H 또는 V_L 영역의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 상기 측면에서, 본 기술분야의 기술자는 경쇄 및/또는 중쇄의 적어도 가변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 두 면역글로불린 사슬 모두 또는 하나만의 가변 도메인을 암호화할 수 있음을 쉽게 이해할 것이다. 따라서, 한 구현예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 표 2에 도시된 것과 같은 항-DPR 항체 및/또는 그의 절편의 V_H 및 V_L 영역의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

표 2

[0313] DPR, 바람직하게는 C9ORF72-DPR을 인식하는 항체의 V_H 및 V_L 영역의 뉴클레오티드 서열

항체	가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)의 뉴클레오티드 서열
NI-308.18F7 V_H	tgccaggtgcagctgcaggagtcgggccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccgtcacgtgcactgtctctgg tggctccatcaatgattactactggaactggatccggcagcccgagggaaggagctggagtggatgggcgtatatatg ccagtgaggaccatcaattacaaccttccctccagagtcgagtcaccatgtcaattgacacgtccaagaaccagttctcc ctagacctcatctctgtgtccgcgcggacacggccgtctactattgtgcagatggggccagggtggtcggggactacta ctacgggatggacgtctggggccaggggaccacggtcacgtctcctcg 서열번호 1
NI-308.18F7 V_K	tgcgaattgtgtgactcagctctccactctccctgtccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtctag tcagagcctccaacatacaaatggatacaattacttggattggtacctgctgaagccagggcagctctccaaactcctaa tcttcttgacttctaactcgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacaaattttacactgaaa atcagcagagtgagggtgaggatgttggggtctattatgcatggaaggtatacaattgtggacgttcggccaaggga caagctggagatcaaa 서열번호 3
NI-308.18F7 V_K - PIMC	tgcgacatcgtgatgaccagctctccactctccctgtccgtcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtctag tcagagcctccaacatacaaatggatacaattacttggattggtacctgctgaagccagggcagctctccaaactcctaa tcttcttgacttctaactcgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacaaattttacactgaaa atcagcagagtgagggtgaggatgttggggtctattatgcatggaaggtatacaattgtggacgttcggccaaggga caaggtggagatcaaa 서열번호 5
NI-308.1507 V_H	tgccaggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtagtccagcctgggaggtccctgagactgtcctgtgcagcctctgg attcaccttcagtaaatcatgctatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagtatatcat atgatggcgagaacacatatatgcagactccattgaggggcgtatcaccatttcagagacaatttcaagaacacactc tttctacaatgtacagcctgacagctgatgacacggctatgtacttctgtgcgagagggggccgtcgggggcacttcac ctcatactaccttgactactggggccagggaacccctggtcacgtctcctcg 서열번호 7
NI-308.1507 V_K	tgcgacatccagatgaccagctctccatctcctgtctgcatctgtaggagacagagtaccatcacttgccgggcaag ccagaacatagacaagtacttaaatgggtatcagcagataccggggaagccctaaagtcctgatctatgctgcatcga gtttgcacagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctgggacagatttctctctcaccatcagcagctctgcaa cctgaagattttgcaatttactactgtcaacagagttacagttccttccggacgttcggccaagggaaccaagctggagat caaa 서열번호 9
NI-308.1507 V_K - PIMC	tgcgacatccagatgaccagctctccgtctcctgtctgcatctgtaggagacagagtaccatcacttgccgggcaag ccagaacatagacaagtacttaaatgggtatcagcagataccggggaagccctaaagtcctgatctatgctgcatcga gtttgcacagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctgggacagatttctctctcaccatcagcagctctgcaa cctgaagattttgcaatttactactgtcaacagagttacagttccttccggacgttcggccaagggaaccaaggtggagat caaa 서열번호 11
NI-308.5G2 V_H	tgcgaggtgcagctggtgcagctctggggctgacttgcggaacctggggcctcagtgacggtttcctgcacggcttctgg ataccatttcgctgacaatgctataaactggctgcgcagggcccccggacaaaggcttgagtggatggggtggatcaaca tttacagtggttaacacaaaatatccagaaacttcagggcagagtcacctttaccagaacacatccgcgagcacagcc ttcatgcacctgcgcagcctgagatcagaagacacggctgtgtatttctgtgcgagagaccctgatagcagtggtatata cttggcctattttgactactggggccaaggaaacctggtcacgtctcctcg 서열번호 13
NI-308.5G2 V_K	tgcgacatccagttgaccagctctccagactcctgactttgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccag ccagagtgttttctacaactccaacaataagaactacttagcttggatcagcagaaaccaggacagcctcctaagtgc tcatgtactgggcatctaccgggagtcgggggtcactgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagattttactctc accattaccaacctgcaggctgaagatgtggcagctctattatgtcagcaattttatagtctcctctcactttcgccgg agggaaccaaggtggagatcaaa 서열번호 15

NI-308.5G2 V_H - PIMC	tgccaggtgcagctgggtgcaatctggggctgacttgcggaacctggggcctcagtgcaggtttcctgcacggcttctgg ataccatttcgctgacaatgctataaactggctgcgccaggcccccggacaaaggcttgagtggatgggtggatcaaca tttacagtggtaacacaaaatattcacagaacttcagggcagagtcacctttaccagaacacatccgcgacacagcc ttcatgcacctgcgcagcctgagatcagaagacacggctgtgtatttctgtgcgagagacctgatagcagtggtatata cttgccctattttgactactggggccaaggaacctgggtcacctgtcctcg 서열번호 17
NI-308.5G2 V_K - PIMC	tgcgacatcgtgatgacccagtcctccagactccctgactttgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtcag ccagagtggttttctacaactccaacaataagaactacttagcttggatcagcagaaccaggacagcctcctaagttgc tcatgtactgggcatctaccgggagtcggggctcactgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagattttactctc accattaccaactgcaggctgaagatgtggcagtcctatttgcagcaattttatagttctcctctcactttcgccgg agggaccaaggtggagatcaaa 서열번호 19
NI-308.28G1 V_H	Tgccaggtgcagctgcaggagtcgggcccagactggtgaagccctcgagagacctgtcgctcacgtgcactgtcgctgg cggtccgtcaatagttactattggacctggatccagcagtcctccgggaaggagactggagtggcttgggcgtatctata tcgctgggaggaccaactataaacctccctcacgagtcgaatcgccctgtcagtggcacagtcaggaaaccagttgtcc ctgaagctgacgtctgtgaccgccgcggacacggccatataatttgcgagatggggagcggagagtggtgactacta ctatggagtggacgtctggggcccaggcacctgggtcacctgtcctcg 서열번호 21
NI-308.28G1 V_K	tgcgaaattgtgatgacgcagtcctcactctccctgcccgctcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtcag tgagggactcctgcatagtaatgggttacacctatttggattggtaacctgcagaagccagggcaggctccgcagctcctga tctttctggcttctaatacgggccgcggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacagattttacactgaag atcagcagagtgaggctgaggatgttggcgtttattactgcatgaggctatacaaaagtccttggacgttcggcccagg gaccaaggtggaatacaaa 서열번호 23
NI-308.28G1 V_H - PIMC	tgccaggtgcagctgcaggagtcgggcccagactggtgaagccctcgagagacctgtcgctcacgtgcactgtcgctgg cggtccgtcaatagttactattggacctggatccagcagtcctccgggaaggagactggagtggcttgggcgtatctata tcgctgggaggaccaactataaacctccctcacgagtcgaatcgccctgtcagtggcacagtcaggaaaccagttgtcc ctgaagctgacgtctgtgaccgccgcggacacggccatataatttgcgagatggggagcggagagtggtgactacta ctatggagtggacgtctggggcccagggaccacgggtcacctgtcctca 서열번호 25
NI-308.28G1 V_K - PIMC	tgcgatattgtgatgactcagtcctcactctccctgcccgctcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtcag tgagggactcctgcatagtaatgggttacacctatttggattggtaacctgcagaagccagggcaggctccgcagctcctga tctttctggcttctaatacgggccgcggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacagattttacactgaag atcagcagagtgaggctgaggatgttggcgtttattactgcatgaggctatacaaaagtccttggacgttcggcccagg gaccaaggtggaatacaaa 서열번호 27
NI-308.45C2 V_H	Tgccagctgcagctgcaggagtcgggtccaggactggtgaagccctcgagatcctctcactcacctgtgccatctccgg ggacagtgcttcagcaacagtgctgcttggaaactggatcaggcagtcctccatcgagaggccttgagtggctgggaagga catactacaggtccaagtgggataatgattatgcacatctgtgaaaagtcgaataagtatcaaccagacacatccaag aaccagttctccctgcagttgaattctgtgactcccaggacacggctgtgtatttgcgaaagagaggtcgcatatg tggtggtgactgctattctgtttcctttgactactggggccagggaacctgggtcacctgtcctcctcg 서열번호 29
NI-308.45C2 V_K	tgcgaaattgtgatgacacagtcctcactctccctgcccgctcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtcag tcagagcctcctccagagtaatggatacacctatttggattggtaacctgcagaagccagggcagtcctccacagctcctga tctatttgggttctaatacgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacagattttacactgaaa atcagcagagtgaggctgaggatgttggggtttattactgcatgcaagctctacaaactccgctcactttcgccggagg gaccaaggtggagatcaaa 서열번호 31
NI-308.45C2 V_H - PIMC	tgccagctgcagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgagatcctctcactcacctgtgccatctccgg ggacagtgcttcagcaacagtgctgcttggaaactggatcaggcagtcctccatcgagaggccttgagtggctgggaagga catactacaggtccaagtgggataatgattatgcacatctgtgaaaagtcgaataagtatcaaccagacacatccaag aaccagttctccctgcagttgaattctgtgactcccaggacacggctgtgtatttgcgaaagagaggtcgcatatg tggtggtgactgctattctgtttcctttgactactggggccagggaacctgggtcacctgtcctcctcg 서열번호 33
NI-308.45C2 V_K - PIMC	tgcgatattgtgatgactcagtcctcactctccctgcccgctcacccctggagagccggcctccatctcctgcaagtcag tcagagcctcctccagagtaatggatacacctatttggattggtaacctgcagaagccagggcagtcctccacagctcctga tctatttgggttctaatacgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggtcaggcacagattttacactgaaa atcagcagagtgaggctgaggatgttggggtttattactgcatgcaagctctacaaactccgctcactttcgccggagg gaccaaggtggagatcaaa 서열번호 35

NI-308.24E11 V _H	tgccagggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcactgcactgtctctac tacttccctcagaagtatttctggagttggatccggcagccccagggaaagggctggagtggtatgggtatgtctatt acagtgggagtagcatctacaatccgtccctcaagaatcgagtcaccatccatagacagctccaagaaccagttctcc ctgaacctgcgctctgtgaccgctgcggatcggccatgtatttctgtgcgagaggcgtcccgctgagactgatgcgcg ggacttccgcctactactttgatcactggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 37
NI-308.24E11 V _K	tgcgacatccagttgaaccagttccatcctcctgtctgcgtcagtaggaaacagaatcaccttcacttgccaggcgag tcaggacattagatattatttaaattgggtatcagcagaaccagggaaagccccctaaactcctgatctacgatgtgtcca atttggatcacaggggtgccaccaaggttcagtggagtggtatctgggacaaatttcactttaccatcagcagcctgcag cctgaagatattgcagttatttactgtcaacagtatgaaggactcctgtgaccttcggcggggggaccaaaggtggagat caaa 서열번호 39
NI-308.24E11 V _K - PIMC	tgcgacatccagatgaccagttccatcctcctgtctgcgtcagtaggaaacagaatcaccttcacttgccaggcgag tcaggacattagatattatttaaattgggtatcagcagaaccagggaaagccccctaaactcctgatctacgatgtgtcca atttggatcacaggggtgccaccaaggttcagtggagtggtatctgggacaaatttcactttaccatcagcagcctgcag cctgaagatattgcagttatttactgtcaacagtatgaaggactcctgtgaccttcggcggggggaccaaaggtggagat caaa 서열번호 41
NI-308.46E9 V _H	tgccagggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacttgcaactgtctctgg tgctccatcagcggtagtacctactactggggtggatccgcagccccagggaaagggctggagtatattgggagaa tctactatagtgaggagcacctactacaaccctcctcaagagtcgagccaccatctctgtagacagctccaagaaccag ctctcctgacactgagttctgtgaccgcccagatcggctgtgtattattgtgtgagaccttttacgtggttcggg gaactccccctttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 43
NI-308.46E9 V _K	tgcgaaattgtgctgactcagttccagccaccgtgtctgtgtctccaggggagagagccaccctctcctgcagggccag ccagagtgtagcaccaacttagcctggtagcagcagaacctggccagcctccaggctcctcatttatggatgcatcca ccagggccactggtatcccagccaggttcagtggcagtggtctggggcagagttcacctcaccatcagcagcctgcag tctgaagattttgtgtttatttactgtcagcaatataataactggcctccggctttcggcggaggggaccaaggtggagat caaa 서열번호 45
NI-308.46E9 V _H - PIMC	tgccagctgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacttgcaactgtctctgg tgctccatcagcggtagtacctactactggggtggatccgcagccccagggaaagggctggagtatattgggagaa tctactatagtgaggagcacctactacaaccctcctcaagagtcgagccaccatctctgtagacagctccaagaaccag ctctcctgacactgagttctgtgaccgcccagatcggctgtgtattattgtgtgagaccttttacgtggttcggg gaactccccctttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 47
NI-308.46E9 V _K - PIMC	Tgcgaaatagtgatgacgcagttccagccaccgtgtctgtgtctccaggggagagagccaccctctcctgcagggccag ccagagtgtagcaccaacttagcctggtagcagcagaacctggccagcctccaggctcctcatttatggatgcatcca ccagggccactggtatcccagccaggttcagtggcagtggtctggggcagagttcacctcaccatcagcagcctgcag tctgaagattttgtgtttatttactgtcagcaatataataactggcctccggctttcggcggaggggaccaaggtggagat caaa 서열번호 49
NI-308.6B11 V _H	tgcgagggtgcagctggtgcagcttggggctgaggtgaagaggcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccgg atacaccctcactgaattatccatgcactgggtgcgacaggctcctggaaaagggttgagtggtatgggaggttttgatc ctgaagatggtgaaacagttacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgaggacacatctacagacacagcc tacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccttgtatcactgtgcaacatcggcagcagctggcactggaa tgagggaaatgaggggtcctactactttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 51
NI-308.6B11 V _K	tgcgacatccagatgaccagttccatcctcctgtctgcactgttaggagacagagtcacatcacttgccaggcgag tcaggacattagcatttatatttaaattgggtatcagcaaaaaccagggaaagccccctaaactcctgatctacgatgcatcca atttggaaacaggggtcccatcaaggttcagtggagtggtatctgggacagattttactttaccatcagcggcctgcag cctgaagatggtgcaagatatttctgtcaacagtatgatctcccatcaccttcggccaaggggacacgactggagat taaa 서열번호 53
NI-308.6B11 V _H - PIMC	tgccagggtccagctggtacagcttggggctgaggtgaagaggcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccgg atacaccctcactgaattatccatgcactgggtgcgacaggctcctggaaaagggttgagtggtatgggaggttttgatc ctgaagatggtgaaacagttacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccgaggacacatctacagacacagcc tacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccttgtatcactgtgcaacatcggcagcagctggcactggaa tgagggaaatgaggggtcctactactttgactactggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 55

NI-308.46F8 V _H	Tgccaggtgcagctggaggagtctgggggaggtgtggtaggcctggggggtccctgagactctcctgtacagcctctggattcacgtttgatgaatatggcatgagctgggtccgccaagttccagggaaggggctggagtggtctctggcatttaattggaatggagcaaccacacgttatgcagactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacccaagaactccctctatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggccttgtatcactgtgagagagatgggtgtaggaataccagctgctatatctgggactggttcgatccctggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 57
NI-308.46F8 V _L	tgccagtctgtgtgacgcagccgcctcagtgtctgcggccccaggacagaaggtcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattggaataatattgtatgctggtaccagaacctcccagggaacagccccaaactcctcatattatgacgataataagcgacctcagggatctctgacctatctctggctccaagctggcacgtcagccacctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccgattattactgcggaacatgggacagcagcctgagtgttgtggtattcgccggagggaacaa gctgacctctcta 서열번호 59
NI-308.46F8 V _H - PIMC	tgcgaggtgcagctggaggagtctgggggaggtgtggtaggcctggggggtccctgagactctcctgtacagcctctggattcacgtttgatgaatatggcatgagctgggtccgccaagttccagggaaggggctggagtggtctctggcatttaattggaatggagcaaccacacgttatgcagactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacccaagaactccctctatctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggccttgtatcactgtgagagagatgggtgtaggaataccagctgctatatctgggactggttcgatccctggggccagggaacccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 61
NI-308.4M1 V _H	tgcgaggtgcagctggaggagactgggggagggcgtggtagccgggggggtccctgagactctcctgtgaagcctctggattcaccatcgccacctatgccatgcactgggtccgccagttccagggaaggggctggattgggtggcagtaatatcgttcgatggaactactgagtactacacagacgccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaacacactgtatctgcaaatgaactactgagaggtgacgacacggctatatattctgtgcgcgagattcacctcctcgggggagaccggttcgtggacacaagtacctgatctctggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 63
NI-308.4M1 V _K	TGCGAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACGCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTACTAAATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGTATCTTACAGGGCCGCTGGCACCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTACCAACGTAGCAGTGGCCTCCGGTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGA GATCAAA 서열번호 65
NI-308.4M1 V _H - PIMC	tgccaggtgcagctggaggagtctgggggagggcgtggtagccgggggggtccctgagactctcctgtgaagcctctggattcaccatcgccacctatgccatgcactgggtccgccagttccagggaaggggctggattgggtggcagtaatatcgttcgatggaactactgagtactacacagacgccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaacacactgtatctgcaaatgaactactgagaggtgacgacacggctatatattctgtgcgcgagattcacctcctcgggggagaccggttcgtggacacaagtacctgatctctggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 67
NI-308.4M1 V _K - PIMC	tgcgaaattgtgtgacacagctctccagccacctgtctctgtctccaggggaaagagccacgtctcctgcaggggccagtcagagtggtactaaatacttagcctggtagcaacagaacctggccaggctccaggctcctcatctatgatgtatctt acagggccgctggcacccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaactcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcaccaacgtagcagctggcctccgggtcactttcgccggagggaaccaaggtgga gatcaaa 서열번호 69
NI-308.12A3 V _H	tgcgaggtgcagctggaggagactgggggagggcttggtacagcctggagggtccctgagactctcctgcgtaggctctggatttctcttcagtgattttgaaatggactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgatttcataattagtggtgacggtaatatcatatatcagacagactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacccaagaattcactgtttctacaaatggacagcctgaccgtcgaggacacggctgtatattactgtgagagagacgccgtgaaaactgtggtggtgactgctattccacgtcctttgatttttggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 71
NI-308.12A3 V _K	TGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTCTTTTATACACTGCCAACAAATAGGAATACTTAGCCTGGTACCAGAAAAAAGCAGGACAGCCTCCTAAGCTCCTCATTCACTGGGCATCTACCCGGGCATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCATTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTTTGTCAACATTATTATAATTCTCCCCGACGTTCCGCCA AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA 서열번호 73
NI-308.12A3 V _H - PIMC	tgcgaggtgcagctggaggagtctgggggagggcttggtacagcctggagggtccctgagactctcctgcgtaggctctggatttctcttcagtgattttgaaatggactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgatttcataattagtggtgacggtaatatcatatatcagacagactctgtgaaggccgattcaccatctccagagacaacccaagaattcactgtttctacaaatggacagcctgaccgtcgaggacacggctgtatattactgtgagagagacgccgtgaaaactgtggtggtgactgctattccacgtcctttgatttttggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcg 서열번호 75

NI-308.12A3 V_K - PIMC	tgcgacatcgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgcaagtccagccagagctctttataactgccacaataaggaactacttagcctggtagcagaaaaagcaggacagcctcctaagctccattcactgggcatctaccgggcatccggggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcatctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatgtggcagttatTTTTgtcaacattattataattctccccggacgttcggccaaggaccaaaggtggagatcaaa 서열번호 77
NI-308.16C10 V_H	tgcgaggtgcagctggaggagactggggaggcgtgggtccagcctgggatgtccctgagcctctcctgtgcagcgactggattcaccttcagcagttatggcatgcactgggtccgccaaggtccaggcaaggggcccggagtgggtggcgggtatatggtagcatggaacaaataagttatggagactccgtgacgggcagagtcccatctccagagacaactccaagaacacgctgtttctgcaaatgatcaacgtgagagtcgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaggatgcagagcgcgtccagaaatgggctagtacattatggacgtgtggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcg 서열번호 79
NI-308.16C10 V_K	TGCGAAATGTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCATCTGTCTTTGTCTCGAGGGAATCGGGTCGCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCGGAGTGTAAATAGCAGCTACTTAAATTGGTACCAGCAAAAACAGGCCAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATGGTGCATCTAAAAGGGCCACTGGCATCTCAGACAGGTTCCGTGGCACTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCCGTCCGACAGCTGAGCCTGAAGATATTGCGGTTTACTACTGTGCAGCACTATGGTGCCTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA 서열번호 81
NI-308.16C10 V_H - PIMC	tgcaggtgcagctggaggagctgtggggaggcgtgggtccagcctgggatgtccctgagcctctcctgtgcagcgactggattcaccttcagcagttatggcatgcactgggtccgccaaggtccaggcaaggggcccggagtgggtggcgggtatatggtagcatggaacaaataagttatggagactccgtgacgggcagagtcccatctccagagacaactccaagaacacgctgtttctgcaaatgatcaacgtgagagtcgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaggatgcagagcgcgtccagaaatgggctagtacattatggacgtgtggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcg 서열번호 83
NI-308.16C10 V_K - PIMC	tgcgaaattgtgtgacgcagctccaggcacctgtctttgtctcgagggaatcgggtcgccctctcctgcagggccagtcggagtggttaatagcagctacttaattggtagcagcaaaaaccaggccaggctcccagactcctcatctatggtagcatctaaaaggccactggcatctcagacaggttcctggcactgggtctgggacagacttactctcaccgtcgccagactggagcctgaagatatgtaggtttactactgtcagcactatggtagccttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa 서열번호 85

[0314] 본 발명은 또한 다른 곳에 기재된 것과 같은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 절편을 포함한다. 추가적으로 본 명세서에 개시된 것과 같은 융합 폴리뉴클레오티드, Fab 절편, 및 다른 생물공학적 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드도 본 발명에 의해 고려된다.

[0315] 폴리뉴클레오티드는 본 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생산되거나 제조될 수 있다. 예를 들면, 항체의 뉴클레오티드 서열이 공지된 경우, 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 간략하게는 항체를 암호화하는 서열 부분을 함유하는 중복 올리고뉴클레오티드의 합성, 이들 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 결합, 이어서 결합된 올리고뉴클레오티드의 PCR에 의한 증폭이 관여되는 [Kutmeier et al., BioTechnique 17 (1994), 242]에 기재된 것과 같은 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있다.

[0316] 다른 한편으로, 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 원천의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 특정 항체를 암호화하는 핵산을 함유하는 클론을 이용할 수 없지만 항체 분자의 서열이 공지된 경우, 항체를 암호화하는 핵산은 화학적으로 합성되거나 적합한 원천(예컨대, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 바람직하게는 DPR-특이적 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포, 예컨대 항체를 발현하기 위해 선택된 하이브리도마 세포로부터 생성된 cDNA 라이브러리 또는 이로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리A⁺ RNA)으로부터 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화할 수 있는 합성 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 또는 예컨대 항체를 암호화하는 cDNA 라이브러리로부터의 cDNA 클론을 확인하기 위해 특정 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 탐침을 이용한 클로닝에 의해 획득될 수 있다. 이어서 PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산은 본 기술분야에 널리 공지된 임의의 방법을 이용하여 복제 가능한 클로닝 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0317] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체의 뉴클레오티드 서열 및 대응하는 아미노산 서열이 결정되면, 그 뉴클레오티드 서열은 뉴클레오티드 서열의 조작을 위해 본 기술분야에 널리 공지된 방법, 예컨대 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입을 생성하기 위해 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성하기 위한 재조합 DNA 기법, 부위 지정된 돌연변이화, PCR 등을 이용해서 조작될 수 있다(예를 들면, 둘 다 그의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된 [Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) 및 Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998)]에 기재된 기법을 참조).

[0318] **IV. 항체 폴리펩티드의 발현**

[0319] 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 제공하기 위한 단리된 유전 물질의 조작 후, 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 원하는 양의 항체를 생산하기 위해 이용될 수 있는 숙주 세포 내로의 도입을 위해 발현 벡터에 삽입된다. 항체, 또는 그의 절편, 유도체 또는 유사체, 예컨대 표적 분자에 결합하는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 재조합 발현이 본 명세서에 기재된다. 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그의 일부(바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 함유)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 수득되면, 항체 분자의 생산을 위한 벡터가 본 기술분야에 널리 공지된 기법을 이용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 수 있다. 따라서 항체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하기 위한 방법이 본 명세서에 기재된다. 본 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 방법이 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축하기 위해 이용될 수 있다. 이들 방법에는, 예를 들면 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체내 유전적 재조합이 포함된다. 따라서 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 본 발명의 항체 분자, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터에는 항체 분자의 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 포함될 수 있고(예컨대, 국제 출원 WO 86/05807 및 WO 89/01036; 및 US 특허 제5,122,464호 참조), 항체의 가변 도메인은 전체 중쇄 또는 경쇄의 발현을 위한 이러한 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0320] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 본 명세서에서 숙주 세포 내로의 도입 및 원하는 유전자의 발현을 위한 운반체로 본 발명에 따라 이용되는 벡터를 의미하기 위해 이용된다. 본 기술분야의 기술자에게 공지된 것과 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 군으로부터 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로 본 발명과 상용성인 벡터는 원하는 유전자의 클로닝 및 진행 또는 원핵 세포로의 도입 및/또는 복제 능력을 촉진하기 위해 선택 마커, 적절한 제한효소 부위를 포함할 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 여러 발현 벡터 시스템이 채용될 수 있다. 예를 들면, 벡터의 한 클래스는 동물 바이러스, 예컨대 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배칼로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스로부터 유래된 DNA 요소를 이용한다. 다른 것에는 내부 리보솜 결합 부위를 갖는 폴리시스트론 시스템의 이용이 관여된다. 또한 그의 염색체 내에 통합된 DNA를 갖는 세포는 전달감염된 숙주 세포의 선택을 허용하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구 숙주에 대한 양성자성, 살생제 내성(예컨대, 항생제) 또는 중금속, 예컨대 구리에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결될 수도 있고, 또는 공-형질전환에 의해 동일한 세포 내에 도입될 수도 있다. 추가적인 요소가 또한 mRNA의 최적 합성을 위해 필요할 수 있다. 이들 요소에는 신호 서열, 스플라이스 신호뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서, 및 종료 신호가 포함될 수 있다.

[0321] 특히 바람직한 구현예에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의된 것과 같이 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(바람직하게는 인간)에 따라 발현 벡터 내에 삽입된다. 한 구현예에서, 이는 미국 특허 제6,159,730호에 개시되어 있고 NEOSPLA로 불리는 Biogen IDEC, Inc.의 사유물인(proprietary) 발현 벡터를 이용하여 달성된다. 상기 벡터는 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서, 마우스 베타 글로빈 주 프로모터, SV40 복제 기원, 소 성장호르몬 폴리아데닐화 서열, 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 엑손 1 및 엑손 2, 디히드로폴레이트 환원효소 유전자 및 리더 서열을 함유한다. 상기 벡터는 가변 및 불변 영역 유전자의 도입, CHO 세포에서의 전달감염 후 G418 함유 배지 중에서의 선택 및 메토타렉세이트 증폭시 매우 높은 항체 발현 레벨을 일으키는 것으로 나타났다. 물론 진행 세포에서 발현을 야기할 수 있는 임의의 발현 벡터가 본 발명에서 이용될 수 있다. 적합한 벡터의 예에는 비제한적으로 플라스미드 pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, 및 pZeoSV2(Invitrogen, San Diego, CA에서 공급), 및 플라스미드 pCI(Promega, Madison, WI에서 공급)가 포함된다. 일반적으로 면역글로불린 중쇄 및 경쇄가, 예를 들면 로보틱 시스템에 의해 수행될 수 있는 일상적 실험인 경우, 적합하게 고레벨을 발현하는 것들에 대해 다수의 형질전환된 세포를 스크리닝한다. 벡터 시스템은 또한 각각 그 전문이 본 명세서에 참조로 포함되는 US 특허 제5,736,137호 및 제5,658,570호에 교시된다. 상기 시스템은 높은 발현 레벨, 예컨대 >30pg/세포/일을 제공한다. 다른 예시적 벡터 시스템은, 예컨대 US 특허 제6,413,777호에 개시된다.

[0322] 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 폴리시스트론 구조체, 예컨대 US 특허 출원 공개 제2003-0157641 A1호에 개시되고 그 전문이 본 명세서에 도입된 것들을 이용해서 발현될 수 있다. 이들 발현 시스템에서, 여러 관심 유전자 생성물, 예컨대 항체의 중쇄 및 경쇄는 단일 폴리시스트론 구조체로부터 생산될 수 있다. 이들 시스템은 유리하게는 상대적으로 높은 레벨의 항체를 제공하기 위해 내부 리보솜 도입 부위(IRES)를 이용한다. 상용성 IRES 서열은 또한 본 명세서에 도입되는 US 특허 제

6,193,980호에 개시된다. 본 기술분야의 기술자는 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 항체의 전체 범위를 효과적으로 생산하기 위해 이용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 선택적으로 결합 분자의 다른 면역글로불린 사슬의 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와의 조합으로, 항체의 면역글로불린 사슬의 적어도 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0323] 보다 일반적으로, 항체의 모노머성 서브유닛을 암호화하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주 세포 내로의 플라스미드 도입은 본 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 다양한 기법에 의해 달성될 수 있다. 여기에는 비제한적으로 예로 Fugene® 또는 리포펙타민을 이용한 지질전달 감염을 포함하는 전달감염, 원형질체 융합, 칼슘 포스페이트 침전, 외피 보유 DNA를 이용한 세포 융합, 마이크로주입 및 온전한 바이러스를 이용한 감염이 포함된다. 전형적으로, 숙주 내로의 플라스미드 도입은 표준 칼슘 포스페이트 공침전 방법을 통한다. 발현 구조체를 보유하는 숙주 세포는 경쇄 및 중쇄 생산에 적절한 조건 하에 성장되며, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 분석된다. 예시적인 분석 기법에는 효소-연관된 면역흡착 분석(ELISA), 방사선 면역분석(RIA), 또는 형광 활성화된 세포 정렬기 분석(FACS), 면역조직화학 등이 포함된다.

[0324] 발현 벡터는 통상적인 기법에 의해 숙주 세포로 전달되고, 이어서 전달감염된 세포가 통상적인 기법에 의해 배양되어 본 명세서에 기재된 방법에서 이용하기 위한 항체를 생산한다. 따라서 본 발명에는 바람직하게는 이중성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 항체 또는 그의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그의 면역글로불린의 적어도 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 포함된다. 부가적으로 또는 대안적으로, 본 발명에는 또한 항체의 면역글로불린 사슬의 적어도 결합 도메인 또는 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를, 선택적으로 상기 결합 분자의 다른 면역글로불린 사슬의 가변 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드와의 조합으로 포함하는 상기 본 명세서에서 정의된 것과 같은 벡터를 포함하는 숙주 세포가 포함된다. 이중성 항체의 발현을 위한 바람직한 구현예에서, 중쇄 및 경쇄를 모두 암호화하는 단일 벡터 또는 벡터 들은 아래에 상세히 나타낸 것과 같이 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 공-발현될 수 있다.

[0325] 숙주 세포는 중쇄 유래된 폴리펩티드를 암호화하는 제1 벡터 및 경쇄 유래된 폴리펩티드를 암호화하는 제2 벡터 인 본 발명의 두 발현 벡터로 공-전달감염될 수 있다. 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등 발현을 가능케 하는 동일한 선택 가능 마커를 함유할 수 있다. 다른 한편으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 모두 암호화하는 단일 벡터가 이용될 수 있다. 이러한 상황에서, 경쇄는 유리하게는 과량의 독소가 없는 중쇄를 배제하기 위해 중쇄 앞에 배치된다; [Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197] 참조. 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0326] 본 명세서에서 이용되는 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기법을 이용해서 구축되고 적어도 하나의 이중성 유전자를 암호화하는 벡터를 보유하는 세포를 나타낸다. 재조합 숙주로부터 항체의 단리를 위한 절차의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양"은 이것에 명백히 달리 명시되지 않은 한, 항체 원천을 나타내기 위해 상호교환적으로 이용된다. 달리 말하면, "세포"로부터의 폴리펩티드의 회수는 배지 및 현탁된 세포를 둘 다 함유하는 세포 배양 으로부터 또는 전체 세포의 침강으로부터를 의미할 수 있다.

[0327] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 본 명세서에 기재된 방법에서 이용하기 위한 항체 분자를 발현하기 위해 이용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심 코딩 서열이 생산되고 후속 정제될 수 있는 운반체를 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 전달감염되는 경우, 원 위치에서 본 발명의 항체 분자를 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 여기에는 비제한적으로 미생물, 예컨대 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예컨대, *에스제리키아 콜라이*, *바실러스 서브틸리스*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예컨대, *사카로마이세스 피치아*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 배콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 재조합 플라스미드 발현 벡터(예컨대, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포의 게놈에서 유래된 프로모터(예컨대, 메탈로티오나인 프로모터) 또는 포유류 바이러스에서 유래된 프로모터(예컨대, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구조체를 보유하는 포유류 세포 시스템(예컨대, COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3 세포)이 포함된다. 바람직하게는 박테리아 세포, 예컨대 *E. 콜라이*, 및 보다 바람직하게는 진핵 세포, 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위한 것이 재조합 항체 분자의 발현을 위해 이용된다. 예를 들면, 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포는 벡터, 예컨대 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 주 증기-조기 유전자 프로모터 요소와 함께 항체를 위해 효과적인 발현 시스템이다; 예컨대, [Foecking et al., Gene 45

(1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2] 참조.

- [0328] 단백질 발현을 위해 이용되는 숙주 세포주는 종종 포유류 유래이다; 본 기술분야의 기술자는 내부에서 발현될 원하는 유전자 생성물에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 우세하게 결정하는 능력이 있다고 믿어진다. 예시적인 숙주 세포주에는 비제한적으로 CHO(중국 햄스터 난소), DG44 및 DUXB11(중국 햄스터 난소 세포주, DHFR-), HELA(인간 경부암종), CVI(원숭이 신장 세포주), COS(SV40 T 항원을 이용한 CVI의 유도체), VERY, BHK(아기 햄스터 신장), MDCK, WI38, R1610(중국 햄스터 섬유아세포), BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 신장 세포주), SP2/O(마우스 골수종), P3x63-Ag3.653(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(인간 림프구) 및 293(인간 신장)이 포함된다. CHO 및 293 세포가 특히 바람직하다. 숙주 세포주는 전형적으로 상업적 공급업체, 미국 조직 배양 은행(American Tissue Culture Collection) 또는 공개 문헌으로부터 이용 가능하다.
- [0329] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조정하거나 원하는 특정 방식으로 유전자 생성물을 변형하고 가공하는 숙주 세포 계통이 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예컨대, 글리코실화) 및 가공(예컨대, 절단)은 단백질의 기능을 위해 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 가공 및 변형을 위한 특징과 특정 기전을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 선택될 수 있다. 상기 목적을 위해, 일차 전사체의 적절한 가공, 유전자 생성물의 글리코실화 및 인산화를 위한 세포 기전을 보유하는 진핵 숙주 세포가 이용될 수 있다.
- [0330] 재조합 단백질의 장기적인 고수율 생산을 위해, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들면, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주가 가공될 수 있다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 이용하기보다, 숙주 세포가 적절한 발현 제어 요소(예컨대, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종료자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택 가능한 마커에 의해 제어되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입에 이어, 가공된 세포는 농축 배지 중에 1-2 일 동안 성장하도록 둘 수 있고, 이어서 선택 배지로 전환된다. 재조합 플라스미드 내의 선택 가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고 세포가 플라스미드를 그의 염색체 내로 안정하게 통합하고 다시 세포주 내로 클로닝되고 증식될 수 있는 초점을 형성하도록 클 수 있게 한다. 상기 방법은 유리하게는 항체 분자를 안정하게 발현하는 세포주를 가공하기 위해 이용될 수 있다.
- [0331] 비제한적으로 각각 tk-, hgp^{rt}- 또는 ap^{rt}-세포에서 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나아제[Wigler et al., Cell 11 (1977), 223], 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제[Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202], 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제[Lowy et al., Cell 22 (1980), 817] 유전자를 포함하는 여러 선택 시스템이 이용될 수 있다. 또한, 항-대사물질 내성이 하기 유전자에 대한 선택의 기반으로 이용될 수 있다; dhfr, 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여함[Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527]; gpt, 미코페놀산에 대한 내성을 부여함[Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072]; neo, 아미노글리코사이드 G-418에 대한 내성을 부여함[Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; 및 Morgan 및 Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215]; 및 hyg^{ro}, 히그로마이신에 대한 내성을 부여함[Santerre et al., Gene 30 (1984), 147]. 이용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 방법은 본 명세서에 그의 전문이 참조로 포함된 [Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 및 in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981)]에 기재된다.
- [0332] 항체 분자의 발현 레벨은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있으며, 리뷰를 위해서는 [Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987)] 참조. 항체를 발현하는 벡터 시스템 중의 마커가 증폭 가능한 경우, 숙주 세포의 배양에 존재하는 저해제 레벨의 증가는 마커 유전자의 복제수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역은 항체 유전자에 연관되므로, 항체의 생산도 증가할 것이다; [Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257] 참조. 시험관내 생산은 다량의 원하는 폴리펩티드를 제공하기 위해 스케일-업을 허용한다. 조직 배양 조건 하의 포유류 세포 배양을 위한 기법은 본 기술분야에 공지되어 있고, 예컨대 에어리프트 반응기 또는 연속 교반기 반응기에서의 동종성 현탁 배양, 또는 예컨대 증공사, 마이크로캡슐, 아가로오스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에서의 고정화되거나 트랩핑된 세포 배양이 포함된다. 필요하고/하거나 원하는 경우, 폴리펩티드 용액은, 예를 들면 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로오스에 걸친 크로

마토그래피 또는 (면역-)친화도 크로마토그래피에 의해, 예컨대 합성 힌지 영역 폴리펩티드의 우선적 생합성 이후 또는 본 명세서에 기재된 HIC 크로마토그래피 이전에 또는 이후에 정제될 수 있다.

[0333] 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 암호화하는 유전자는 또한 비-포유류 세포, 예컨대 박테리아 또는 곤충 또는 효모 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 핵산을 쉽게 섭취하는 박테리아에는 엔테로박테리아세에의 구성원, 예컨대 *E. 콜라이* 또는 *살모넬라* 균주; 바실라세에, 예컨대 *B. 서브틸리스*; *뉴모코커스*; *스트렙토코커스*, 및 *해모필러스 인플루엔자*가 포함된다. 박테리아에서 발현되는 경우, 이중성 폴리펩티드가 전형적으로 봉입체의 일부가 됨이 추가로 이해될 것이다. 이중성 폴리펩티드는 분리되고, 정제되고, 이어서 기능적 분자로 조립되어야 한다. 항체의 4가 형태를 원하는 경우, 서브유닛이 4가 항체로 자가 조립할 것이다; 예컨대, 국제 출원 W002/096948 참조.

[0334] 박테리아 시스템에서, 여러 발현 벡터는 항체 분자가 발현되기 위한 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 항체 분자의 약학적 조성물의 생성을 위해 다량의 이러한 단백질이 생산되어야 하는 경우, 쉽게 정제되는 고레벨의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터에는 비제한적으로 항체 코딩 서열은 융합 단백질이 생산되도록 lacZ 코딩 영역의 틈에 놓인 벡터 내로 개별적으로 결합될 수 있는 *E. 콜라이* 발현 벡터 pUR278[Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791]; pIN 벡터[Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509] 등이 포함된다. pGEX 벡터가 또한 글루타치온 S-트랜스퍼라아제(GST)와의 융합 단백질로 외래 폴리펩티드를 발현하기 위해 이용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며 글루타치온-아가로오스 비드의 매트릭스에 대한 흡착 및 결합에 의해, 이어서 자유 글루타치온의 존재 하 용출에 의해 용해된 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0335] 원핵 미생물에 부가하여, 진핵 미생물도 이용될 수 있다. *사카로마이세스 세레비시iae* 또는 일반 빵 효모가 진핵 미생물 중 가장 일반적으로 이용되지만, 여러 다른 계통, 예컨대 *피치아 파스토리스*도 일반적으로 이용 가능하다. *사카로마이세스*에서의 발현을 위해, 예를 들면 플라스미드 YRp7[Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157]이 일반적으로 이용된다. 상기 플라스미드는 이미 트립토판에서 성장하는 능력이 없는 효모의 돌연변이체 계통, 예를 들면 ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자를 함유한다[Jones, Genetics 85 (1977), 12]. 이어서 효모 숙주 세포 계통의 특징으로 trp1 병소의 존재가 트립토판의 부재 하 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

[0336] 곤충 시스템에서, *오토그라파 캘리포니카* 핵 다면체 형성 바이러스(AcNPV)가 전형적으로 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로 이용된다. 바이러스는 스포둡테라 *프루기페르다* 세포에서 자란다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역(예를 들면 폴리헤드린 유전자) 내로 개별적으로 클로닝되고 AcNPV 프로모터(예를 들면 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 배치될 수 있다.

[0337] 본 발명의 항체 분자가 재조합적으로 발현된 경우, 본 발명의 전체 항체, 그의 이량체, 개별 경쇄 및 중쇄, 또는 다른 면역글로불린 형태는, 예를 들면 크로마토그래피에 의해(예컨대, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 및 크기분별 칼럼 크로마토그래피 후 특이적 항원에 대한 친화도에 의해), 원심분리, 차별적 용해도, 예컨대 암모늄 설페이트 침전 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기법을 포함하는 본 기술분야의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다; 예컨대, [Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982)] 참조. 다른 한편으로, 본 발명의 항체의 친화도를 증가시키기 위해 바람직한 방법은 US 특허 공보 2002-0123057 A1에 개시된다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 또한 하기를 포함하는, 항-DPR 항체 또는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 및/또는 그의 절편을 인식하는 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)의 제조 방법을 제공한다:

[0338] (a) 본 명세서에서 상기 정의된 것과 같은 숙주 세포를 배양하는 단계로, 세포는 이전에 본 명세서에 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 단계; 및

[0339] (b) 배양으로부터 상기 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)을 분리하는 단계.

[0340] 또한, 본 발명은 또한 본 명세서에 상기 정의된 바와 같거나 항-DPR 항체 또는 돌연변이화 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR 중 및/또는 그의 절편 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)을 제조하기 위한 상기 방법에 의해 수득가능한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 항체 또는 그의 면역글로불린 사슬(들)에 관한 것이다.

[0341] V. 융합 단백질 및 접합체

- [0342] 어떤 구현예에서, 항체 폴리펩티드는 보통 항체에 비연관성 아미노산 서열 또는 하나 이상의 모이어티를 포함한다. 예시적인 변형이 아래에 보다 상세히 기재된다. 예를 들면, 본 발명의 단일쇄 Fv 항체 절편은 유연한 링커 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기능적 모이어티(예컨대, PEG, 약물, 독소, 또는 표지, 예컨대 형광, 방사활성, 효소, 핵 자기, 중금속 등)를 부가하기 위해 변형될 수 있다.
- [0343] 본 발명의 항체 폴리펩티드는 융합 단백질을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어질 수 있다. 융합 단백질은, 예를 들면 적어도 하나의 표적 결합 부위, 및 적어도 하나의 이종성 부분, 즉 자연에서 천연 연결되지 않는 부분을 갖는 면역글로불린 DPR-결합 도메인을 포함하는 키메라 분자이다. 아미노산 서열은 보통 융합 폴리펩티드에서 함께 오는 별도의 단백질로 존재할 수 있거나 이들은 보통 동일한 단백질에 존재할 수 있지만 융합 폴리펩티드에서 새로운 배열로 배치된다. 융합 단백질은, 예를 들면 화학적 합성에 의해 또는 펩티드 영역이 원하는 관계로 암호화되는 폴리뉴클레오티드를 생성하고 번역함으로써 생성될 수 있다.
- [0344] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드에 적용되는 용어 "이종성"은 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 비교되는 대상의 나머지와 다른 대상으로부터 유래됨을 의미한다. 예를 들면 본 명세서에서 이용되는 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체, 또는 유사체에 융합될 "이종성 폴리펩티드"는 동일한 종의 비-면역글로불린 폴리펩티드, 또는 상이한 종의 면역글로불린 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드에서 유래된다.
- [0345] 본 명세서에서 다른 곳에서 보다 상세히 논의된 것과 같이, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 추가로 N- 또는 C-말단에서 이종성 폴리펩티드에 재조합적으로 융합되거나 폴리펩티드 또는 다른 조성물에 화학적으로 접합될 수 있다(공유 및 비공유 접합 포함). 예를 들면, 항체는 검출 분석에서 표지 및 표적 인자 분자, 예컨대 이종성 폴리펩티드, 약물, 방사선헌종 또는 독소로 유용한 분자에 재조합적으로 융합되거나 접합될 수 있다; 예컨대, 국제 출원 W092/08495; W091/14438; W089/12624; US 특허 제5,314,995호; 및 유럽 특허 출원 EP 0 396 387 참조.
- [0346] 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 서로 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산, 즉 펩티드 동배체로 이루어질 수 있고, 20 가지 유전자 암호화된 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 항체는 천연 절차, 예컨대 번역 후 가공에 의해 또는 본 기술분야에 널리 공지된 화학적 변형 기법에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기본 교과서 및 보다 상세한 단행본뿐만 아니라 많은 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 변형은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하는 항체 중 또는 모이어티, 예컨대 탄수화물 상 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 동일한 유형의 변형이 주어진 항체에서 몇 가지 부위에 동일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 주어진 항체는 여러 유형의 변형을 함유할 수 있다. 항체는, 예를 들면 유비퀴틴화의 결과 분기화될 수 있고, 이들은 분기를 포함하거나 포함하지 않고 고리형일 수 있다. 고리형, 분기화 및 분기화 고리형 항체는 번역 후 천연 절차로부터 야기될 수도 있고 또는 합성 방법에 의해 제조될 수도 있다. 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헵 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스파티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 글리코실화, GPI 부착 형성, 히드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, peg화, 단백질분해 가공, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황화, 전달 RNA 매개된 아미노산의 단백질에 대한 부가, 예컨대 아르기닐화 및 유비퀴틴화가 포함된다; 예컨대, [Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, (1983) 1-12; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62]] 참조.
- [0347] 본 발명은 또한 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체, 및 이종성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 한 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 본 발명의 항체의 임의의 하나 이상의 V_H 영역의 아미노산 서열 또는 본 발명의 항체의 임의의 하나 이상의 V_L 영역 또는 그의 절편 또는 변이체의 아미노산 서열, 및 이종성 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 진단 및 치료 방법에서 이용하기 위한 융합 단백질은 항체, 또는 그의 절편, 변이체, 또는 유도체의 임의의 1, 2, 3개의 V_H -CDR의 아미노산 서열 또는 항체, 또는 그의 절편, 변이체, 또는 유도체의 임의의 1, 2, 3개의 V_L -CDR의 아미노산 서열, 및 이종성 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 한 구현예에서, 융합 단백질은 본 발명의

항체, 또는 그의 절편, 유도체, 또는 변이체의 V_H -CDR3의 아미노산 서열 및 이중성 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 융합 단백질은 DPR 단백질 또는 펩티드에 특이적으로 결합한다. 다른 구현예에서, 융합 단백질은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 V_H 영역의 아미노산 서열 및 본 발명의 항체, 또는 그의 절편, 유도체 또는 변이체의 적어도 하나의 V_L 영역의 아미노산 서열, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 융합 단백질의 V_H 및 V_L 영역은 DPR에 특이적으로 결합하는 단일 원천 항체(또는 scFv 또는 Fab 절편)에 대응한다. 다른 구현예에서, 본 명세서에 개시된 진단 및 치료 방법에서 사용하기 위한 융합 단백질은 항체의 임의의 1, 2, 3개 이상의 V_H CDR의 아미노산 서열 및 항체, 또는 그의 절편 또는 변이체의 임의의 1, 2, 3개 이상의 V_L CDR의 아미노산 서열, 및 이중성 폴리펩티드 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직하게는 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 V_H -CDR(들) 또는 V_L -CDR(들)은 본 발명의 단일 원천 항체(또는 scFv 또는 Fab 절편)에 대응한다. 이들 융합 단백질을 암호화하는 핵산 분자가 또한 본 발명에 포괄된다.

[0348] 문헌에 보고된 예시적인 융합 단백질에는 T 세포 수용체[Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2936-2940]; CD4[Capon et al., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; 및 Byrn et al., Nature 344 (1990), 667-670]; L-셀렉틴(귀소 수용체)[Watson et al., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; 및 Watson et al., Nature 349 (1991), 164-167]; CD44[Aruffo et al., Cell 61 (1990), 1303-1313]; CD28 및 B7[Linsley et al., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730]; CTLA-4[Lisley et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569]; CD22[Stamenkovic et al., Cell 66 (1991), 1133-1144]; TNF 수용체[Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; 및 Poppel et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991)]; 및 IgE 수용체 a[Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Abstract No. 1448]의 융합이 포함된다.

[0349] 본 명세서에서 다른 곳에 논의된 것과 같이, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 폴리펩티드의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 또는 본 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 면역분석에서 이용하기 위해 이중성 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 예를 들면 한 구현예에서, PEG는 그의 생체내 반감기를 증가시키기 위해 본 발명의 항체에 접합될 수 있다; 예컨대, [Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; 또는 Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512] 참조.

[0350] 또한, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 합성 변이체 또는 생물공학적 유도체는 그의 정제 또는 검출을 촉진하게 위해 마커 서열, 예컨대 펩티드에 융합될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 마커 아미노산 서열은 다수가 시판되는 것들 중에서 핵사-히스티딘 펩티드(HIS), 예컨대 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311)에서 제공되는 태그이다. 예를 들면, [Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824]에 기재된 것과 같이, 핵사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그에는 비제한적으로 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질에서 유래된 에피토프에 대응하는 "HA" 태그[Wilson et al., Cell 37 (1984), 767], GST, c-myc 및 "flag" 태그가 포함된다; 에피토프 태그화 기법의 리뷰에 대해서는, 예컨대 그 요지가 본 명세서에 명시적으로 참조로 포함되는 [Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695] 및 여기서 페이지 694의 표 1에서 본 발명에서 이용 가능한 가장 일반적인 에피토프 태그의 목록 참조.

[0351] 융합 단백질은 본 기술분야에 널리 공지된 방법을 이용해서 제조될 수 있다; 예를 들면 US 특허 제5,116,964호 및 제5,225,538호 참조. 융합이 일어나는 정확한 부위는 융합 단백질의 분비 또는 결합 특징을 최적화하기 위해 실험적으로 선택될 수 있다. 이어서 융합 단백질을 암호화하는 DNA가 발현을 위해 숙주 세포 내로 전달감염되고, 이는 이전에 본 명세서에 개시된 것과 같이 수행된다.

[0352] 본 발명의 항체는 접합되지 않은 형태로 이용될 수도 있고, 또는 예컨대 분자의 치료적 특성을 개선하기 위해, 표적 검출을 촉진하기 위해, 또는 환자의 이미징 또는 치료법을 위해 적어도 하나의 다양한 분자에 접합될 수도 있다. 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 정제가 수행되는 경우, 정제 이전 또는 이후에 표지되거나 접합될 수 있다. 특히, 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 치료 제제, 전구약물, 펩티드, 단백질, 효소, 바이러스, 지질, 생물학적 반응 변형제, 약학적 제제 또는 PEG에 접합될 수 있다.

[0353] 통상적인 항체를 포함하는 면역독소인 접합체는 본 기술분야에서 널리 설명되었다. 독소는 통상적인 커플링 기

법에 의해 항체에 커플링될 수도 있고 또는 단백질 독소 부분을 함유하는 면역독소가 융합 단백질로 생산될 수도 있다. 본 발명의 항체는 이러한 면역독소를 수득하기 위해 해당 방식에서 이용될 수 있다. 이러한 면역독소의 예는 [Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 및 Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54]에 기재된 것들이다.

[0354] 본 기술분야의 기술자는 접합체가 또한 접합될 선택된 제제에 따라 다양한 기법을 이용해서 조립될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 바이오틴과의 접합체는, 예컨대 DPR-결합 폴리펩티드를 바이오틴의 활성화된 에스테르, 예컨대 바이오틴 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시킴으로써 제조된다. 유사하게, 형광 마커와의 접합체는 커플링 제제, 예컨대 본 명세서에 개시된 것들의 존재 하에 또는 이소티오시아네이트, 바람직하게는 플루오레신-이소티오시아네이트와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체의 접합체는 유사한 방식으로 제조된다.

[0355] 본 발명은 진단제 또는 치료제에 접합된 본 발명의 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체를 추가로 포괄한다. 항체는, 예를 들면 DPR의 존재를 나타내어 DPR과 연관된, 바람직하게는 DPR을 형성하는 돌연변이화 C9ORF72, 즉 C9ORF72-DPR과 연관된 질환 또는 장애를 얻을 위험을 시사하기 위해, 이러한 질환, 예컨대 주어진 치료 및/또는 예방 방식의 유효성을 결정하기 위한 임상적 평가 절차의 일환으로 응집된 DPR의 발생을 나타내거나 이와 연관된 질환의 발생 또는 질환을 모니터링하기 위해 진단적으로 이용될 수 있다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 검출 가능하게 표지된 항체에 관한 것이다. 또한 한 구현예에서, 본 발명은 약물에 부착된 항체에 관한 것이다. 검출은 검출 가능한 물질에 대한 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체의 커플링에 의해 촉진될 수 있다. 검출 가능한 물질 또는 표지는 일반적으로 효소; 중금속, 바람직하게는 금; 염료, 바람직하게는 형광 또는 발광 염료; 또는 방사활성 표지일 수 있다. 검출 가능한 물질의 예에는 다양한 효소, 보철기, 형광 물질, 발광 물질, 생체발광 물질, 방사활성 물질, 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용한 양전자 방출 금속, 및 비방사활성 상자성 금속 이온이 포함된다; 예컨대, 본 발명에 따른 진단제로 사용하기 위해 항체에 접합될 수 있는 금속 이온에 대해서는 US 특허 제4,741,900호 참조. 적합한 효소의 예에는 홀스래디쉬 페록시다아제, 알칼린 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제 또는 아세틸콜린에스테라아제가 포함되며; 적합한 보철기 복합체의 예에는 스트렙타비딘/바이오틴 및 애비딘/바이오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예에는 움벨리페론, 플루오레신, 플루오레신 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레신, 단일 클로라이드 또는 피코에리트린이 포함되고; 발광 물질의 예에는 루미놀이 포함되고; 생체발광 물질의 예에는 루시페라아제, 루시페린 및 애쿠오린이 포함되고; 적합한 방사활성 물질의 예에는 ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In 또는 ⁹⁹Tc가 포함된다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 검출 가능하게 표지된 항체를 제공하며, 여기서 검출 가능한 표지는 효소, 방사선동위원소, 형광단 및 중금속으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0356] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 또한 이를 화학발광 화합물에 커플링하여 검출 가능하게 표지될 수 있다. 이어서 화학발광 태그된 항체의 존재는 화학 반응 과정 동안 일어나는 발광의 존재를 검출함으로써 결정된다. 특히 유용한 화학발광 표지 화합물의 예는 루미놀, 이소루미놀, 써로마틱 아크리디늄 에스테르, 이미다졸, 아크리디늄 염 및 옥살레이트 에스테르이다.

[0357] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체가 검출 가능하게 표지될 수 있는 방식의 하나는 이를 효소에 연결하고 연결된 생성물을 효소 면역분석(EIA)에서 이용하는 것이다[Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7; Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, et al., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokyo (1981)]. 항체에 결합된 효소는, 예를 들면 분광측정, 형광측정 또는 시각적 수단에 의해 검출될 수 있는 화학적 모이어티를 생산하는 방식으로 적절한 기질, 바람직하게는 발색 기질과 반응할 것이다. 항체를 검출 가능하게 표지하기 위해 이용될 수 있는 효소에는 비제한적으로 말레이트 탈수소효소, 스타필로코커스 뉴클레아제, 델타-5-스테로이드 이소머라아제, 효모 알코올 탈수소효소, 알파-글리세로포스페이트, 탈수소효소, 트리오스 포스페이트 이소머라아제, 홀스래디쉬 페록시다아제, 알칼린 포스파타아제, 아스파라기나아제, 글루코오스 옥시다아제, 베타-갈락토시다아제, 리보뉴클레아제, 유레아제, 카탈라아제, 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소, 글루코아밀라아제 및 아세틸콜린에스테라아제가 포함된다. 추가적으로, 검출은 효소에 대한 발색 기질을 채용하는 비색 방법에 의해 달성될 수 있다. 검출은 또한 유사하게 제조된 표준물질과 비교하여 기질의 효소 반응 정도의 시각적 비교에 의해 달성될 수 있다.

[0358] 검출은 또한 임의의 다양한 다른 면역분석을 이용해서 달성될 수 있다. 예를 들면, 항체, 또는 그의 항원-결합

절편, 변이체 또는 유도체를 방사활성적으로 표지함으로써, 방사선 면역분석(RIA)의 이용을 통해 항체를 검출할 수 있다(예를 들면, 본 명세서에 참조로 포함되는 [Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (March, 1986)] 참조). 방사활성 동위원소는 비제한적으로 감마 계측기, 신틸레이션 계측기 또는 자가방사선촬영을 포함하는 수단에 의해 검출될 수 있다.

[0359] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체는 또한 형광 방출 금속, 예컨대 ¹⁵²Eu, 또는 란타넘 계열의 다른 것들을 이용해서 검출 가능하게 표지될 수 있다. 이들 금속은 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 금속 킬레이트기를 이용해서 항체에 부착될 수 있다.

[0360] 항체, 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 유도체에 대한 다양한 모이어티의 접합을 위한 기법은 널리 공지되어 있으며, 예컨대 [Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56(Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press (1985) 303-16, 및 Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62 (1982), 119-158] 참조.

[0361] 전술한 것과 같이, 어떤 구현예에서 결합 분자, 예컨대 결합 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 그의 면역특이적 절편의 안정성 또는 유효성을 증강시키는 모이어티가 접합될 수 있다. 예를 들면 한 구현예에서, PEG는 그의 생체 내 반감기를 증가시키기 위해 본 발명의 결합 분자에 접합될 수 있다[Leong et al., *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; 또는 Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512].

[0362] VI. 조성물 및 이용 방법

[0363] 본 발명은 전술한 본 발명의 DPR-결합 분자, 예컨대 항체 또는 그의 항원-결합 절편, 변이체 또는 생물공학적으로 유도체, 또는 이전에 본 명세서에 정의된 것과 같은 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 약학적 조성물이며, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 의도된 이용에 따라 추가 제제, 예컨대 인테루킨 또는 인테페론을 포함할 수 있다. 응집된 DPR, 특히 C9ORF72-DPR의 발생을 나타내거나 이와 연관된 질환 또는 장애, 예컨대 FTLD의 치료에서의 이용을 위해, 추가적인 제제는 작은 유기 분자, 항-DPR 항체, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 따라서 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명은 DPR-결합 분자, 예컨대 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 절편 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 결합 분자, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포의 DPR 단백질과 연관된 질환 또는 장애의 예방적 및 치료적 처치, 대상체에서 DPR 단백질 및/또는 응집된 C9ORF72와 연관된 질환 또는 장애의 진행 또는 DPR 치료에 대한 반응을 모니터링, 또는 대상체의 DPR 단백질 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR과 연관된 질환 또는 장애 발생 위험을 결정하기 위한 약학적 또는 진단적 조성물의 제조를 위한 용도에 관한 것이다.

[0364] 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 DPR 및 C9ORF72-DPR로 인한 응집된 C9ORF72와 같은 DPR 단백질의 비정상적 축적 및/또는 침적에 의해 특징되는 질환 또는 장애의 치료 방법에 관한 것으로, 이 방법은 본 발명의 상술된 DPR-결합 분자, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 세포 중 임의의 하나의 치료적 유효량을 이들을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0365] 본 발명의 치료적 접근의 특정한 이점은 본 발명의 재조합 항체가 응집된 DPR의 발생을 나타내거나 이와 연관된 질환의 증세 또는 징후, 예컨대 징후없는 돌연변이 및/또는 돌연변이들을 갖지 않고, 따라서 DPR, 예컨대 C9ORF72 단백질에서 디펩티드 반복체(DPR)를 형성하게 되는 확장된 헥사뉴클레오티드 반복체를 갖는 돌연변이화 C9ORF72인 C9ORF72-DPR로 인한 응집된 C9ORF72와 연관된 질환을 임상적으로 발현하는 것을 예방하거나 질환 또는 장애의 임상적 발현의 발생 위험을 감소시키거나, 또는 질환 또는 장애의 임상적 발현의 개시 또는 진행을 지연시킬 수 있는 특정한 개연성을 갖는 건강한 인간 대상체로부터의 B 세포 또는 B 메모리 세포로부터 유래된다는 점에 있다. 전형적으로, 본 발명의 항체는 또한 이미 체세포 성숙, 즉 항체의 가변 영역의 체세포 변이에

의해 표적 DPR 분자에 대해 고친화도 결합에서 선택성 및 효과에 대해 최적화를 성공적으로 거쳤다.

[0366] 생체내, 예컨대 인간에서 이러한 세포가 자가면역 또는 알러지 반응의 관점에서 관련되거나 다른 생리적 단백질 또는 세포 구조에 의해 활성화되지 않았다는 지식은 이것이 임상 평가상을 통해 성공적으로 유지될 상당히 증가된 확률을 나타내므로, 또한 커다란 의학적 중요성을 갖는다. 말하자면, 효율성, 허용 가능성 및 내성이 이미 적어도 하나의 인간 대상체에서 예방적 또는 치료적 항체의 전임상 및 임상 개발 전에 이미 드러났다. 따라서 본 발명의 인간-유래의 항-DPR 항체는 치료 제제로서의 그 높은 표적 구조-특이적 친화도 및 그 감소된 부작용의 개연성이 모두 그 임상적 성공 개연성을 크게 증가시키는 것으로 예상될 수 있다.

[0367] 본 발명은 또한 상술된 성분의 하나 이상, 예컨대 본 발명의 항-DPR 항체, 그의 결합 절편, 생물공학적 유도체 또는 변이체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포가 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 각각의 약학적 및 진단적 팩 또는 키트를 제공한다. 이러한 용기(들)에는 인간 투여를 위한 제조, 이용 또는 판매 에이전시에 의한 승인을 반영하는 고지인 약학적 또는 생물학적 제품의 제조, 이용 또는 판매를 규제하는 정부 에이전시에 의해 처방되는 형태의 고지가 연관될 수 있다. 부가적으로 또는 대안적으로, 키트는 적절한 진단 분석에 사용하기 위한 시약 및/또는 지침을 포함한다. 본 발명의 조성물, 예컨대 키트는 물론 DPR의 존재에 수반되는 질환 또는 장애의 위험 평가, 진단, 예방 및 치료에 특히 적합하며, 특히 일반적으로 DPR의 존재에 의해 특징되는 장애의 치료에 적용가능하다. 특히, 상기 조성물은 DPR 응집, 예를 들면 C9ORF72-DPR로 인한 응집된 C9ORF72를 형성하게 되는 확장된 헥사뉴클레오타이드 반복체를 갖는 돌연변이화 C9ORF72와 연관된 장애의 치료에 유용하다. DPR과 연관된 질환 및/또는 장애는 전두측두엽 퇴화(FTLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), FTLD-ALS 및/또는 척수소뇌성 실조증 타입 36을 비제한적으로 포함한다.

[0368] 본 발명의 약학적 조성물은 본 기술분야에 널리 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다; 예를 들면 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472] 참조. 적합한 약학적 담체의 예는 본 기술분야에 널리 공지되어 있고, 포스포이트 버퍼화 식염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대 오일/물 에멀전, 다양한 유형의 수화제, 멸균 용액 등이 포함된다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화될 수 있다. 이들 약학적 조성물은 적합한 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 적합한 조성물의 투여는 상이한 방식, 예컨대 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 비강내, 국소 또는 피내 투여 또는 돌기 또는 뇌 전달에 의해 수행될 수 있다. 에어로졸 제형, 예컨대 비강 스프레이 제형에는 활성 제제의 정제된 수용액 또는 다른 용액과 보존제 및 등장화제가 포함된다. 이러한 제형은 바람직하게는 비강 점막에 상용성인 pH 및 등장 상태로 조정된다. 직장 또는 질 투여를 위한 제형은 적합한 담체와 함께 좌약으로 제공될 수 있다.

[0369] 투여 요법은 주치의 및 임상적 요인에 의해 결정될 것이다. 의학 분야에서 널리 공지된 것과 같이, 임의의 환자에 대한 투여량은 환자의 체격, 신체 표면적, 연령, 투여될 특정 화합물, 성별, 투여 시점 및 경로, 일반 건강 및 동시 투여되는 다른 약물을 포함하는 여러 요인에 의존한다. 전형적인 용량은, 예를 들면 0.001 내지 1,000 μg 범위일 수 있다(또는 상기 범위의 핵산 발현을 위해 또는 발현 저해를 위해); 그러나 상기 예시적인 범위 이하 또는 이상의 용량이 특히 전술한 요인을 고려하여 계획된다. 일반적으로 투여량은, 예컨대 숙주 체중을 기준으로 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 일반적으로 0.01 내지 5 mg/kg(예컨대, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg 등)의 범위일 수 있다. 예를 들면 투여량은 체중을 기준으로 1 mg/kg 또는 10 mg/kg 또는 1-10 mg/kg의 범위 내, 바람직하게는 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 상기 범위의 중간 용량도 본 발명의 범위 내인 것으로 의도된다. 대상체에는 이러한 용량이 매일, 또는 수 일마다, 매주, 또는 실험적 분석에 의해 결정된 임의의 다른 일정에 따라 투여될 수 있다. 예시적인 치료는 연장된 기간, 적어도 6개월에 걸친 다중 투여량으로의 투여를 수반한다. 추가적인 예시적인 치료 요법은 2 주마다 또는 1개월마다 또는 3 내지 6개월마다 1 회 투여를 수반한다. 예시적인 투여 일정에는 연속일로 1-10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 수 일마다의 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg이 포함된다. 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 둘 이상의 모노클론 항체가 동시에 투여되며, 이 경우 투여되는 각 항체의 투여량은 나타난 범위 내에 속한다. 진행은 주기적 평가에 의해 모니터링될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제조물에는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 및 에멀전이 포함된다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일 및 주사 가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레이트이다. 수성 담체에는 식염수 및 버퍼화 배지를 포함하는 물, 알코올계/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액이 포함된다. 비경구 운반체에는 나트륨 클로라이드 용액, 링거 텍스트로오스, 텍스트로오스 및 나트륨 클로라이드, 락테이트화 링거, 또는 고정 오일이 포함된다. 정맥내 운반체에는 유체 및 영양분 보충제, 전해질 보충제(예컨대 링거 텍스트로오스에 기반한 것들) 등이 포함된다. 보존제 및 다른 첨가제, 예컨대 항균제, 항산화제, 킬레이트제 및 불활성 기체 등이 또한 존재할 수 있다. 또한, 본

발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 의도하는 용도에 따라 추가 제제, 예컨대 도파민 또는 정신약리적 약물을 포함할 수 있다.

- [0370] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에서, 약학적 조성물은 예를 들면 본 발명의 약학적 조성물이 수동 번역화를 위해 항-DPR 항체 또는 그의 DPR-결합 절편, 또는 합성 또는 생물공학적 변이체 또는 유도체를 포함하는 경우, 백신으로 제형화될 수 있다. 배경 섹션에 언급된 것과 같이, 응집된 DPR 중은 FTLD 및 ALS와 같은 질환 및/또는 장애의 주요 유발자이다. 따라서, 본 발명의 인간-유래의 항-DPR 항체 및 등가의 DPR-결합 분자를 이용한 수동 번역화가 능동 번역화 치료법 개념의 몇 가지 역효과 우회를 돕고 DPR의 감소된 응집을 유도할 것임을 예상하는 것이 신중하다. 따라서 본 발명의 항-DPR 항체 및 그의 등가물은 응집된 DPR, 특히 FTLD와 같은 C9ORF72-DPR의 존재를 보여주거나 이것에 의해 유발되는 질환 또는 장애를 예방 또는 개선하기 위한 백신으로 특히 유용할 것이다.
- [0371] 한 구현예에서, 본 발명의 항체의 재조합 Fab(rFab) 및 단일쇄 절편(scFv)를 이용하는 것이 유익할 수 있으며, 이는 세포막을 보다 쉽게 침투할 수 있다. 예를 들면, 온라인에 먼저 공개된 [Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134]는 Abeta의 N-말단 영역에서 에피토프를 인식하는 모노클론 항체 WO-2의 키메라 재조합 Fab(rFab) 및 단일쇄 절편(scFv)의 이용을 기재한다. 가공된 절편은 효율적으로 (i) 아밀로이드 피브릴화를 예방하고, (ii) 사전 형성된 Abeta1-42 피브릴을 분해하고, (iii) 전체 IgG 분자만큼 시험관내 Abeta1-42 올리고머-매개된 신경독성을 저해할 수 있었다. 효과인자 기능이 없는 작은 Fab 및 scFv 가공된 항체 포맷을 이용하는 인지되는 장점에는 혈액-뇌 장벽에 걸친 보다 효율적인 통과 및 염증성 부작용의 유발 위험 최소화가 포함된다. 또한 scFv 및 단일-도메인 항체는 전장 항체의 결합 특이성을 보유하는데 더하여, 이들이 단일 유전자로 그리고 인트라다로서 포유류 세포에서 세포내 발현될 수 있고, 그의 표적의 접합, 상호작용, 변형 또는 세포하 편재의 변형 가능성을 갖는다; 리뷰에 대해서는, 예컨대 [Miller and Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401] 참조.
- [0372] 상이한 접근에서 [Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241]는 소위 'SuperAntibody 기술'이라는 기술 플랫폼을 설명하며, 이는 항체가 살아있는 세포에 해를 끼치지 않고 내부로 들어갈 수 있도록 만든다고 한다. 이러한 세포-침투 항체는 새로운 진단 및 치료 관점을 열어준다. 용어 '트랜스맵(TransMap)'이 이들 항체에 대해 새로 만들어졌다.
- [0373] 추가 구현예에서, DPR, 특히 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR의 발생과 연관된 질환, 장애 또는 징후의 치료에 유용한 다른 항체의 공-투여 또는 순차적 투여가 바람직할 수 있다. 한 구현예에서, 추가적인 항체가 본 발명의 약학적 조성물에 포함된다. 대상체를 치료하기 위해 이용될 수 있는 항체의 예에는 비제한적으로 CD33, SGLT2, IL-6 및 IL-1을 표적으로 하는 항체가 포함된다.
- [0374] 추가 구현예에서, DPR, 특히 돌연변이화 C9ORF72, 즉 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR과 연관된 질환, 장애 또는 징후의 치료에 유용한 다른 제제의 공-투여 또는 순차적 투여가 바람직할 수 있다. 한 구현예에서, 추가적인 제제가 본 발명의 약학적 조성물에 포함된다. 대상체를 치료하기 위해 이용될 수 있는 제제의 예에는 비제한적으로 하기가 포함된다: 디폴루시날, 콜티코스테로이드, 2-(2,6-디클로라닐리노)페닐아세트산(디클로페낙), 이소부틸-프로판노익-페놀산(이부프로펜)과 같은 항-염증제와 같은 불수의 근육 운동을 표적화하는 VMAT2 저해제; 이노제, 에피갈로카테킨 갈레이트, 멜팔란 히드로클로라이드, 텍사메타손, 보르테조밋, 보르테조밋-멜팔라, 보르테조밋-텍사메타손, 멜팔란-텍사메타손, 보르테조밋-멜팔란-텍사메타손; 항우울제, 정신병약, 신경이완제, 항-치매제(예컨대, NMDA-레셉터 길항제 메난틴), 아세틸콜린에스테라아제 저해제(예컨대, 도네페질, HCI, 리바스티그민, 갈란타민), 글루타맷-길항제 및 다른 항정신성 혈압 약물(예컨대, 디히드랄라진, 메틸도파), 세포분열 억제제, 글루코코르티코이드, 안지오텐신-전환-효소(angiotensin-converting-enzyme, ACE) 저해제; 항-염증제 또는 이들의 임의의 조합.
- [0375] 치료 유효 용량 또는 양은 증상 또는 상태를 완화하기 충분한 활성 성분의 양을 나타낸다. 이러한 화합물의 치료적 유효성 및 독성은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 절차, 예컨대 ED₅₀(모집단의 50%에서 치료적으로 유효한 용량) 및 LD₅₀(모집단의 50%에 대한 치사 용량)에 의해 결정될 수 있다. 치료 및 독성 효과 간의 용량비는 치료 지수이며, 비 LD₅₀/ED₅₀으로 표현될 수 있다.
- [0376] 상기로부터, 본 발명이 특히 전술한 것과 같은 DPR, 특히 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR 종과 연관된 질환, 예컨대 FTLD의 진단 및/또는 치료를 위한, 상술된 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 DPR-결합 분자의 임의의 용도를 포괄함이 자명하다. 바람직하게는, 상기 결합 분자는 본 발명의 항체 또는 그의 생물공학적 유도체이다.

또한, 본 발명은 이전에 본 명세서에 기재된 전술한 항체 중 임의의 하나의 항-이디오타입 항체에 관한 것이다. 이들은 항원-결합 부위 근처의 항체의 가변 영역 상에 위치하는 독특한 항원성 펩티드 서열에 결합하며, 예컨대 대상체로부터 수득되는 샘플 중 항-DPR 항체의 검출을 위해 유용한 항체 또는 다른 결합 분자이다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 DPR과 연관된 장애의 예방적 처치, 치료적 처치 및/또는 진행 또는 치료에 대한 반응 모니터링에서 이용하기 위한 상지에서 본 명세서에 그리고 아래에 정의된 것과 같은 항체 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 HTT-결합 분자, 본 명세서에 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포 또는 이들 중 임의의 하나를 포함하는 약학적 또는 진단적 조성물을 제공한다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 질환 및/또는 장애는 응집된 DPR과 연관된다. 특히 바람직한 구현예에서, 상기 질환 및/또는 장애는 FTLD 및 ALS와 같이 C9ORF72-DPR과 연관된다.

[0377] 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 상술된 DPR-결합 분자, 항체, 항원-결합 절편, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포 중 임의의 하나 및 선택적으로 검출에 적합한 수단, 예컨대 면역- 또는 핵산-기반 진단 방법에서 통상적으로 이용되는 시약을 포함하는 진단적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항체는, 예를 들면 이들이 액상으로 이용되거나 고상 담체에 결합될 수 있는 면역분석에서 이용하기 적합하다. 본 발명의 항체를 이용할 수 있는 면역분석의 예는 직접적 또는 간접적 포맷의 경쟁적 및 비경쟁적 면역분석이다. 이러한 면역분석의 예는 방사선 면역분석(RIA), 샌드위치(면역계측 분석), 유세포 측정 및 웨스턴 블롯 분석이다. 본 발명의 항원 및 항체는 여러 상이한 담체에 결합되고 이에 특이적으로 결합된 세포를 분리하기 위해 이용될 수 있다. 널리 공지된 담체의 예에는 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트, 텍스트란, 나일론, 아밀로오스, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 아가로오스 및 마그네타이트가 포함된다. 담체의 성질은 본 발명의 목적을 위해 가용성 또는 불용성일 수 있다. 본 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 여러 상이한 표지 및 표지 방법이 존재한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 표지 유형의 예에는 효소, 방사성동위원소, 콜로이드성 금속, 형광 화합물, 화학발광 화합물 및 생체발광 화합물이 포함된다; 또한 상기 본 명세서에 논의된 구현예 참조.

[0378] 추가 구현예에 의해, DPR-결합 분자, 특히 본 발명의 항체는 또한 혈액 샘플, 혈장 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 임의의 다른 체액 샘플, 예컨대 침 또는 소변 샘플일 수 있는 시험된 개체로부터의 체액 샘플을 수득하고 체액 샘플을 항체-항원 복합체 형성을 가능케 하는 조건 하에 본 발명의 항체와 접촉시킴으로써 개체에서 질환 또는 장애의 진단 방법에서 이용될 수 있다. 이어서 이러한 복합체의 레벨이 당 분야에 공지된 방법에 의해 결정되고, 결정되고, 대조군 샘플에서 형성된 것보다 유의미하게 더 높은 레벨은 시험된 개체에서 질환 또는 장애를 시사한다. 동일한 방식으로, 본 발명의 항체에 의해 결합된 특정 항원이 또한 이용될 수 있다. 따라서 본 발명은 결합 분자, 예컨대 본 발명의 항체 또는 그의 항원-결합 절편을 포함하는 시험관내 면역분석에 관한 것이다.

[0379] 본 발명의 추가 구현예에서, DPR-결합 분자, 특히 본 발명의 항체는 또한 테스트된 개체로부터의 검체를 수득함으로써 개체에서 질환 또는 장애의 진단 방법에 사용될 수 있다.

[0380] 상기 문맥에서, 본 발명은 또한 상기 목적을 위해 특이적으로 설계된 수단에 관한 것이다. 예를 들면, 항체-기반 어레이가 이용될 수 있고, 여기에는 예를 들면 DPR을 특이적으로 인식하는 본 발명의 항체 또는 등가의 항원-결합 분자가 로딩된다. 마이크로어레이 면역분석의 설계는 [Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696]에 요약된다. 따라서 본 발명은 또한 본 발명에 따라 확인된 DPR-결합 분자가 로딩된 마이크로어레이에 관한 것이다.

[0381] 한 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 DPR, 특히 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR 종과 연관된 질환 또는 장애의 진단 방법에 관한 것으로, 이 방법은 진단받을 대상체 유래의 샘플에서 각각 DPR 및 응집된 DPR의 존재를 본 발명의 적어도 하나의 항체, 그의 DPR-결합 절편 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR-결합 분자로 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 병리적으로 응집된 DPR, 바람직하게는 C9ORF72-DPR의 존재는 FTLD 및/또는 ALS를 시사하며, 반복 영역의 DPR 단백질로의 번역을 보이지 않는 생리적 C9ORF72의 레벨에 비해 병리적으로 응집된 DPR, 특히 C9ORF72-DPR의 레벨 증가는 상기 대상체에서 FTLD 및/또는 ALS의 진행을 시사한다.

[0382] 진단받을 대상체는 무증상이거나 질환에 대해 임상 전 단계일 수 있다. 바람직하게는, 대조군 대상체는 DPR, 응집된 DPR, 바람직하게는 C9ORF72-DPR과 연관된 질환, 예컨대 전술한 것과 같은 FTLD, ALS 및 FTLD-ALS 및 다른 것들을 가지며, 여기서 DPR, 예컨대 응집된 C9ORF72-DPR의 레벨 및 기준 표준 사이의 유사성은 진단받을 대상체가 FTLD, ALS 및/또는 FTLD-ALS를 갖고 있거나 DPR 응집과 연관된 질환 및/또는 장애가 발생할 위험이 있다는

것을 시사한다. 제2 대조군으로서 대안적으로, 또는 부가적으로, 대조군 대상체는 DPR 응집을 갖지 않으며, 여기서 생리적 C9ORF72 또는 돌연변이화 C9ORF72 유전자 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR과 같이 그 유전자 내에서의 돌연변이로 인해 삽입된 DPR을 갖는 경향이 있는 다른 단백질의 레벨 및 기준 표준 사이의 차이는 진단받을 대상체가 DPR과 연관된 질환 및/또는 장애, 예컨대 FTLN, ALS 및/또는 FTLN-ALS를 갖거나 DPR과 연관된 질환 및/또는 장애가 발생할 위험이 있다는 것을 시사한다. 바람직하게는, 진단받을 대상체 및 대조군 대상체(들)는 연령 매치된다. 분석될 샘플은 응집된 C9ORF72-DPR과 같은 병리적 DPR 단백질을 함유하는 것으로 추정되는 임의의 체액, 예를 들면 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 복수, 침 또는 뇌척수액(CSF)일 수 있다.

[0383] 생리적 C9ORF72 또는 유사한 단백질 및/또는 C9ORF72-DPR과 같은 응집된 DPR의 레벨은, 예컨대 웨스턴 블롯, 면역침전, 효소-연관된 면역 흡착 분석(ELISA), 방사선 면역분석(RIA), 형광 활성화된 세포 정렬(FACS), 2 차원 겔 전기영동, 질량 분광측정(MS), 매트릭스-보조된 레이저 탈착/이온화-비행시간-MS(MALDI-TOF), 표면 증강된 레이저 탈착 이온화-비행시간(SELDI-TOF), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC), 다차원 액체 크로마토그래피(LC)에 이은 직렬 질량 분광측정(MS/MS), 및 레이저 밀도측정에서 선택된 하나 이상의 기법에 의한 DPR 및/또는 C9ORF72와 같은 DPR을 포함하는 단백질의 분석을 포함하는 본 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있다. 바람직하게는, DPR의 상기 생체내 이미징은 신티그래피, 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 단층촬영(SPECT), 근적외선(NIR) 광학 이미징 또는 자기 공명 이미징(MRI)을 포함한다.

[0384] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR-결합 분자, 상기 본 명세서에서 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 세포 또는 이들 중 임의의 하나를 포함하는 약학적 또는 진단적 조성물이 응집된 DPR 단백질과 연관된 질환 또는 장애의 예방적 처치, 치료적 처치 및/또는 진행 또는 치료에 대한 반응의 모니터링에서의 이용을 위해 제공된다. 따라서, 본 발명은 또한 대상체에서 DPR 단백질과 연관된 질환 또는 장애(예컨대 FTLN 및 ALS)의 진단 또는 진행 모니터링 방법에 관한 것이며, 이 방법은 진단받을 대상체 유래의 샘플 중 DPR 단백질의 존재를 본 발명의 적어도 하나의 항체 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR-결합 분자로 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 돌연변이화 C9ORF72 및 응집된 C9ORF72-DPR 종과 같은 DPR의 존재는 질환 또는 장애를 시사한다. 한 구현예에서, 대상체에서 DPR 연관성 질환 및/또는 장애의 진단 또는 진행을 모니터링하는 방법이 제공되며, 이 방법은 진단받을 대상체 유래의 샘플 중 돌연변이화 C9ORF72 및 그의 응집된 형태와 같은 DPR의 존재를 본 발명의 적어도 하나의 항체 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR-결합 분자로 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 돌연변이화 C9ORF72 및/또는 응집된 C9ORF72-DPR과 같은 DPR의 절편의 존재는 DPR과 연관된 전증상, 전구기 또는 임상적 질환 및/또는 장애를 시사하고, DPR이 없는 생리적 C9ORF72 레벨에 비해 또는 건강한 대조군 대상체 또는 동일한 대상체 유래의 대조군 샘플로부터 유래된 기준 샘플에 비해 DPR 응집체, 특히 C9ORF72-DPR의 레벨 증가는 FTLN 및 ALS와 같이 전증상, 전구기 또는 확립된 DPR과 연관된 질환 및/또는 장애를 시사한다. 본 기술분야의 기술자는 한 구현예에서 상기 방법이 상기 본 명세서에 정의된 것과 같이 각각 DPR 및 DPR을 함유하는 단백질과 연관된 장애군으로부터의 임의의 다른 질환 또는 장애의 진단 또는 진행 모니터링에도 이용됨을 이해할 것이다.

[0385] 상기 나타난 것과 같이, 본 발명의 항체, 상기 항체와 동일한 결합 특이성을 갖는 분자가 시험관내뿐만 아니라 생체내에서도 이용될 수 있으며, 진단에 더하여 치료적 적용도 추구될 수 있다. 따라서 한 구현예에서, 본 발명은 또한 인간 또는 동물 신체에서 DPR, 바람직하게는 C9ORF72-DPR에 대한 치료제 및/또는 진단제의 생체내 검출 또는 표적화를 위한 조성물의 제조를 위한 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 DPR-결합 분자에 관한 것이다. 잠재적인 치료제 및/또는 진단제는 DPR과 연관된 질환 및/또는 장애의 치료에 유용한 치료 제제 및 이전에 본 명세서에 나타난 것과 같은 잠재적 표지의 비제한적 열거로부터 선택될 수 있다. 생체내 이미징에 대한 한 바람직한 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR을 포함하는 상기 DPR-결합 분자를 제공하며, 여기서 상기 생체내 이미징은 신티그래피, 양전자 방출 단층촬영(PET), 단일 광자 방출 단층촬영(SPECT), 근적외선(NIR) 광학 이미징 또는 자기 공명 이미징(MRI)을 포함한다. 추가 구현예에서, 본 발명은 또한 상기 본 명세서에 정의된 것과 같은, 대상체에서 DPR 단백질과 연관된 질환 또는 장애의 진단 또는 진행 모니터링 방법에 이용하기 위해 상기 특정된 생체내 이미징 방법을 위한 조성물의 제조를 위한 본 발명의 항체의 적어도 하나의 CDR, 또는 상기 분자를 포함하는 상기 DPR-결합 분자를 제공한다.

[0386] 상기 문맥에서, 본 발명은 또한 DPR 및 DPR 함유 단백질과 연관된 질환 및/또는 장애의 진단 또는 진행 모니터링에 유용한 키트에 관한 것이며, 상기 키트는 본 발명의 적어도 하나의 항체 또는 이들 중 임의의 하나와 실질적으로 동일한 결합 특이성을 갖는 DPR-결합 분자, 각각 이전에 본 명세서에 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오타이드

드, 벡터 또는 세포 및/또는 펩티드를 선택적으로 시약 및/또는 사용 지침과 함께 포함한다.

[0387] 상기 개시는 본 발명을 일반적으로 설명한다. 달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 용어는 2000 년 개정되고 2003 년 재인쇄된 [Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, ISBN 0 19 850673 2]에 제공된 것과 같은 정의로 주어진다. 몇 가지 문헌이 본 명세서의 텍스트에 걸쳐 인용된다. 전체 서지학적 인용은 특허청구범위 바로 앞에 있는 명세서 말단에서 확인될 수 있다. 모든 인용된 참고문헌의 내용(배경기술 항목을 포함하여 본 출원에 걸쳐 인용된 문헌 참조, 허여된 특허, 공개된 특허 출원 및 제조업체의 사양, 지침 등 포함)은 본 명세서에 명시적으로 참조로 포함된다; 그러나 인용된 임의의 문헌이 본 발명에 대해 실제로 선행 기술임을 승인하는 것은 아니다.

[0388] 보다 완벽한 이해는 본 발명의 범위를 제한하려 하지 않고 단지 예시적인 목적으로 본 명세서에 제공되는 하기 특정 실시예를 참조하여 수득될 수 있다.

[0389] 실시예

[0390] 실시예 1: 항-디펩티드 반복체(DPR) 단백질 항체의 단리 및 확인

[0391] 디펩티드 반복체(DPR) 단백질, 그의 절편, C9ORF72-DPR 및/또는 그의 절편을 표적화하는 인간-유래의 항체는 그 개시 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 국제 출원 WO2008/081008에 개시되어 있는 방법을 변형해 이용하여 확인하였다. 특히, Schafer-N(Copenhagen, Denmark): GA₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; GP₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; GR₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH에 의해 디펩티드 반복체 단백질을 합성 및 정제하였다. 이후, 디펩티드 반복체 단백질을 양기능성 링커(SMCC)를 통해 소 혈청 알부민(BSA)에 접합시켰다. 이어서, 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 5 µg/ml의 농도로 비-접합된 또는 BSA-접합된 디펩티드 반복체 단백질 또는 BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)로 코팅된 96-웰 마이크로플레이트(Corning)를 이용하여 직접 ELISA를 수행하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. B 세포 조정 배지(conditioned medium)를 메모리 B 세포 배양 플레이트로부터 ELISA 플레이트로 전달하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fcγ-특이적 항체 및 HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 염소 항-인간 IgA 특이적 항체로 인큐베이션하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. BSA가 아니라 DPR에 대한 배지 내에 함유된 항체의 결합을 보여주는 B 세포 배양물에 대해서만 항체 클로닝을 하였다.

[0392] 실시예 2: 항체 서열의 결정

[0393] 상기 확인된 항-DPR 항체의 가변 영역의 아미노산 서열을 그 mRNA 서열에 기초하여 결정하였다: 도 1a 내지 도 1j 참조. 간략하게, 선택된 비-불멸화된 메모리 B 세포 배양액으로부터 살아있는 B 세포를 수확하였다. 이어서, 선택된 항-DPR 항체를 생산하는 세포로부터 mRNA를 추출하였고, cDNA로 전환시켰으며, 항체의 가변 영역을 암호화하는 서열을 PCR에 의해 증폭하였고, 플라스미드 벡터 내로 클로닝하였으며, 서열분석하였다. 간략하게, 인간 면역글로불린 생식선 레퍼토리의 모든 서열 패밀리를 나타내는 프라이머들의 조합을 사용하여 리더(leader) 펩티드, V-세그먼트 및 J-세그먼트를 증폭하였다. 5'-말단에서 리더 펩티드-특이적 프라이머 및 3'-말단에서 불변 영역-특이적 프라이머를 이용하여 제1 라운드의 증폭을 수행하였다[Smith *et al.*, Nat Protoc. 4 (2009), 372-384]. 중쇄 및 카파 경쇄의 경우, 5'-말단에서 V-세그먼트-특이적 프라이머 및 3'-말단에서 J-세그먼트-특이적 프라이머를 이용하여 제2 라운드의 증폭을 수행하였다. 람다 경쇄의 경우, 5'-말단에서 V-세그먼트-특이적 프라이머 및 3'-말단에서 C-영역-특이적 프라이머를 이용하여 제2 라운드의 증폭을 수행하였다[Marks *et al.*, Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard *et al.*, J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230].

[0394] 원하는 특이성을 갖는 항체 클론의 확인은 완전한 항체의 재조합 발현에 대해 ELISA 상에서 재-스크리닝함으로써 수행하였다. 완전한 인간 IgG1 항체의 재조합 발현은 "올바른 해독틀" 내의 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 5'-말단에서 리더 펩티드를 암호화하는 서열로, 그리고 3'-말단에서 적절한 불변 도메인(들)을 암호화하는 서열로 가변 영역 서열을 보완하는 발현 벡터 내로 삽입함으로써 달성하였다. 이를 위하여, 프라이머들은 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 항체 발현 벡터 내로 클로닝하는 것을 촉진하도록 디자인된 제한 부위를 포함하였다. 중쇄 면역글로불린은 프레임 내의 면역글로불린 중쇄 RT-PCR 생성물을 인간 또는 마우스 면역글로불린 감마 1의 신호 펩티드 및 불변 도메인을 갖고 있는 중쇄 발현 벡터 내로 삽입함으로써 발현시켰다. 카파 경쇄 면역글로불린은 프레임 내의 카파 경쇄 RT-PCR 생성물을 인간 카파 경쇄 면역글로불린의 신호 펩티드 및 불변 도메인을 제공하는 경

쇄 발현 벡터 내로 삽입함으로써 발현시켰다. 람다 경쇄 면역글로불린은 프레임 내의 람다 경쇄 RT-PCR 생성물을 인간 또는 마우스 람다 경쇄 면역글로불린의 신호 펩티드 및 불변 도메인을 제공하는 람다 경쇄 발현 벡터 내로 삽입함으로써 발현시켰다.

[0395] 기능적 재조합 모노클론 항체를 Ig-중쇄 발현 벡터 및 카파 또는 람다 Ig-경쇄 발현 벡터의 HEK 293 또는 CHO 세포(또는 인간 또는 마우스 기원의 임의의 다른 적절한 수용 세포주) 내로 동시-전달감염(co-transfection)시킴으로써 획득하였다. 이어서, 재조합 인간 모노클론 항체를 표준 단백질 A 컬럼 정제를 이용하여 조건 배지로부터 정제하였다. 재조합 인간 모노클론 항체는 일시적으로 또는 안정하게 전달감염된 세포를 이용하여 무제한적인 양으로 생산할 수 있다. 재조합 인간 모노클론 항체를 생산하는 세포주는 Ig-발현 벡터를 직접 이용하거나 Ig-가변 영역을 상이한 발현 벡터 내로 재-클로닝함으로써 확립될 수 있다. F(ab), F(ab)₂ 및 scFv와 같은 유도체는 또한 상기 Ig-가변 영역으로부터 생성될 수 있다.

[0396] 골격 및 상보성 결정 영역은 Abysis(<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>)와 같은 데이터베이스에서 이용가능한 기준 항체 서열과 비교함으로써 결정하였고, Kabat 번호지정 방식(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)을 이용하여 할당하였다.

[0397] 실시예 3: C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 ELISA EC₅₀ 분석

[0398] C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 재조합 인간-유래의 C9orf72 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10의 결합 특이성 및 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 결정하기 위하여, ELISA EC₅₀ 분석을 수행하였다. 간략히, Schafer-N(Copenhagen, Denmark): (GA)₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH에 의해 디펩티드 반복체 단백질을 합성 및 정제하였다. 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 5 µg/ml 또는 20 µg/ml의 농도로 디펩티드 반복체 단백질 펩티드로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항체를 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)로 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체로 인큐베이션하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다. C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드 (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ 및 (PR)₁₅에 대한 인간-유래의 항체의 결합 특이성 및 EC₅₀을 간접 ELISA에 의해 결정하였다. 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2 및 NI-308.18F7는 서브나노몰 또는 낮은 나노몰 범위의 결합 친화도로 폴리-GA DPR 단백질을 배타적으로 인식하였다(도 2a 내지 도 2e). 항체 NI-308.24E11은 낮은 나노몰 EC₅₀으로 폴리-PR DPR 단백질에 특이적으로 결합하였지만(도 2a 및 도 2f), 항체 NI-308.16C10은 낮은 나노몰 EC₅₀으로 DPR 단백질 폴리-PR을 우세하게 인식하였고, 또한 폴리-GA DPR 단백질에 낮은 친화도로 결합하였다(도 2a 및 도 2m). 항체 NI-308.5G2, NI-308.12A3 및 NI-308.46E9는 각각 서브나노몰 및 낮은 나노몰 EC₅₀으로 DPR 단백질 폴리-GP를 우세하게 인식하였고, 또한 폴리-GA DPR에 낮은 친화도로 결합하였다(도 2a, 도 2g, 도 2i 및 도 2h). 항체 NI-308.6B11은 복수의 DPR 단백질에 대한 결합을 보였고, 폴리-GR, 폴리-GA 및 폴리-PR을 표적화하였으며, 폴리-GR DPR 단백질에 대한 가장 높은 친화도를 가졌다(도 2a 및 도 2i). 친화도는 낮았지만 NI-308.46F8에 대해 유사한 결합 패턴이 관찰되었다(도 2a 및 도 2j). 항체 NI-308.4M1은 서브나노몰 EC₅₀으로 DPR 단백질 폴리-PA를 우세하게 인식하였고, 또한 낮은 친화도로 폴리-GA DPR 단백질에 결합하였다(도 2a 및 도 2k). 결론적으로, RTM™ 스크리닝에 의한 건강한 고령의 인간 자원자 모집단의 고성능 면역 레퍼토리 분석은 C9orf72 핵사뉴클레오타이드 확장-연관성 DPR을 높은 친화도로 표적화하는 인간 모노클론 항체의 성공적인 클로닝 및 재조합 생산을 유도하였다. 상기 재조합 인간 항체는 - 잠재적으로 반복체 내의 공통의 공유된 아미노산으로 인하여 - 단일 DPR에 대해 선택적이거나 복수 중을 표적화한다.

[0399] 실시예 4: BSA-커핑된 DPR 펩티드에 대한 결합 친화도

[0400] 소 혈청 알부민(BSA)에 커핑된 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 재조합 인간-유래의 C9orf72 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11,

NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10의 결합 특이성 및 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 결정하기 위하여, ELISA EC₅₀ 분석을 수행하였다. 간략히, Schafer-N(Copenhagen, Denmark): (GA)₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH에 의해 디펩티드 반복체 단백질을 합성 및 정제하였다. 이후, DPR 단백질 펩티드를 양기능성 링커(SMCC)를 통해 소 혈청 알부민(BSA)에 접합하였다. 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 5 µg/ml 또는 20 µg/ml의 농도로 BSA-커플링 또는 비-커플링된 디펩티드 반복체 단백질 펩티드로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항체를 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)로 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체로 인큐베이션하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다. 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.4M1 및 NI-308.12A3에 대하여 BSA-커플링 및 비-커플링된 DPR에 대한 비교가능한 결합 친화도를 결정하였다(도 3a 내지 도 3d, 도 3g, 도 3h, 도 3k, 도 3l). 항체 NI-308.45C2, NI-308.24E11 및 NI-308.16C10은 해당 BSA-커플링된 DPR 펩티드에 대해 감소된 친화도를 보였지만(도 3a, 도 3e, 도 3f 및 도 3m), 항체 NI-308.6B11 및 NI-308.46F8은 상기 실험 조건 하에서 BSA-커플링된 DPR에 결합하지 않았다(도 3a, 도 3i 및 도 3j). 결론적으로, 대부분의 인간 DPR 항체는 소수성 코팅된 펩티드에 대하여 비교가능한 친화도로 BSA 담체 단백질에 커플링된 DPR 펩티드를 인식할 수 있다. 개별 후보자에 대해 관찰된 낮은 결합 친화도는 BSA에 대한 개별 DPR 펩티드의 빈약한 커플링 효율, BSA 커플링에 대한 상이한 입체형태 또는 담체에 대한 위치-지향 화학적 커플링에 따른 에피토프의 입체적 접근불능으로 인한 것일 수 있다.

[0401] 실시예 5: 비연관성 아미로이드생성 단백질에 대한 결합 친화도 분석

[0402] NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 및 NI-308.46F8 재조합 항체의 표적 특이성을 결정하기 위하여, 다음과 같이 간접 ELISA를 수행하였다. 96-웰 마이크로플레이트(Corning)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 1-10 µg/ml의 농도로 상이한 표적 단백질로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 및 NI-308.46F8 항체를 20 nM 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 인큐베이션하였다. HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체를 이용하고, 이어서 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. 표적 단백질에 대한 신호를 평균 이상의 배수 증가로 계산하였다. 간접 ELISA에 의한 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11 및 NI-308.46F8 인간-유래의 항체의 표적 특이성의 결정은 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 및 6가지 비연관성 아미로이드-형성 단백질(PHFTau, Tau, TDP-43, TTR, f1APP 및 HTT)에 대한 항체 결합을 평가하였다. 도 4에 나타난 것과 같이, 인간-유래의 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.6B11 및 NI-308.46F8은 대부분의 후보자의 경우에 비연관성 아미로이드생성 단백질에 대해 교차-반응성이 없거나 최소로 DPR 펩티드에 대한 높은 결합 특이성을 나타내었다(도 4a 내지 도 4f, 도 4h 및 도 4i). 항체 NI-308.46E9의 경우, 몇 가지 분석물에 대해 상승된 오프-표적 신호가 검출되었다(도 4g).

[0403] 실시예 6: C9orf72 디펩티드 반복체 단백질의 웨스턴 블롯 분석

[0404] C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 재조합 인간-유래의 C9orf72 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, NI-308.46F8, NI-308.4M1, NI-308.12A3 및 NI-308.16C10의 결합 특이성을 결정하기 위하여, 면역블롯 분석을 수행하였다. chafer-N(Copenhagen, Denmark): (GA)₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH에 의해 디펩티드 반복체 단백질 펩티드를 합성 및 정제하였다. 이후, DPR 단백질 펩티드를 양기능성 링커(SMCC)를 통해 소 혈청 알부민(BSA)에 접합시켰다. 간략히, BSA-접합된 디펩티드 반복체 단백질 펩티드(0.5 µg)를 항산화제(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)로 보충된 Novex[®]

NuPAGE[®] MES SDS 구동 버퍼를 이용하여 농도구배 SDS-PAGE(Novex[®] Bis-Tris NuPAGE[®] 4-12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)에 의해 분할하였다. 이후, Novex[®] NuPAGE[®] 전달 버퍼 2x(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)를 이용함으로써 분할된 단백질을 메탄올-활성화된 PVDF 멤브레인(Immobilon[®]-P Transfer Membrane, Merck & Cie, Schaffhausen, Switzerland) 상에서 전기블롯하였다(Novex[®] Semi-Dry Blotter, 1 h, 25V). 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20(PBST)으로 4℃에서 밤새(또는 대안적으로 실온에서 1시간 동안) 차단하였다. NI-308 항체를 10 nM 또는 100 nM 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안(또는 대안적으로 4℃에서 밤새) 인큐베이션하였다. 멤브레인을 실온에서 15분 동안 PBST 내에서 3회 세척한 후, HRP(1:20,000 또는 1:10,000 희석, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)로 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. ECL 및 ImageQuant 350 검출(GE Healthcare, Otelfingen, Switzerland)을 이용한 멤브레인 현상에 의해 항체 결합을 결정하였다.

[0405] BSA-커플링된 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 (GA)₁₅, (GP)₁₅, (GR)₁₅, (PA)₁₅ 및 (PR)₁₅에 대한 인간-유래의 항체의 결합 특이성을 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정하였다. 항체 NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.28G1 및 NI-308.45C2는 DPR 단백질 폴리-GA를 배타적으로 인식하였다(도 5a 내지 도 5d). 항체 NI-308.24E11 및 NI-308.16C10은 단일 DPR 단백질 폴리-PR에 특이적으로 결합하였고(도 5e 및 도 5j), 항체 NI-308.16C10은 폴리-GA DPR을 추가로 인식하였다(도 5j). 항체 NI-308.5G2, NI-308.12A3 및 NI-308.46E9는 폴리-GP를 특이적으로 표적화하였고(도 5f, 도 5g 및 도 5j), NI-308.5G2는 폴리-GA DPR을 추가로 인식하였다(도 5f). 항체 NI-308.4M1은 DPR 단백질 폴리-PA를 배타적으로 인식하였다(도 5h). 항체 NI-308.6B11 및 NI-308.46F8의 경우, 선택된 실험 조건 하에서 웨스턴 블롯에 의해 BSA-커플링된 DPR에 대한 결합이 검출되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 결론적으로, 대부분의 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체는 SDS PAGE 및 웨스턴 블롯팅에 따라 BSA-커플링된 DPR 펩티드를 인식할 수 있다. 관찰된 결합 패턴은 ELISA 분석에 의해 수득된 결과와 일치한다.

[0406] 실시예 7: 면역침전에 의한 C9orf72 DPR에 대한 용액내 결합 분석

[0407] 제조한 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11 및 NI-308.6B11의 용액내 결합을 평가하기 위하여, 면역침전을 수행하였다. 간략히, Schafer-N(Copenhagen, Denmark): (GA)₁₅: H-CHHHHHH(GA)₁₅-OH; (GP)₁₅: H-C(GP)₁₅-OH; (GR)₁₅: H-C(GR)₁₅-OH; (PA)₁₅: H-C(PA)₁₅-OH; (PR)₁₅: H-C(PR)₁₅-OH에 의해 디펩티드 반복체 단백질을 합성 및 정제하였다. 5 μg의 BSA-비-커플링된 디펩티드 반복체 단백질을 10 μg/ml의 최종 농도로 500 μl PBS, pH 7.4(Gibco[®], Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland) 내에 희석하였다. DPR 단백질 펩티드 샘플을 회전하는 플랫폼 상에서 4℃에서 30분 동안 인큐베이션함으로써 25 μl의 Dynabeads[®] 단백질 A (Novex[®]; Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)로 사전흡착시켰다. 1 또는 10 μg의 선택된 항체를 상기 사전흡착된 샘플에 첨가하였고, 회전하는 플랫폼 상에서 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 25 μl의 단백질 A-Dynabead의 첨가에 의해 면역-복합체를 포획하였고, 회전하는 플랫폼 상에서 4℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 비드를 제조사의 설명서에 따라 세척하였고, 샘플 버퍼 내에 현탁하였으며, 95℃에서 3분 동안 가열하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위하여, 면역-복합체 및 비-커플링된 DPR 단백질 펩티드(500 ng)를 비-환원 조건 하에 Novex[®] NuPAGE[®] MES SDS 구동 버퍼(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)를 이용한 SDS-PAGE(Novex[®] Bis-Tris NuPAGE[®] 12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)에 의해 분할하였다. Novex[®] NuPAGE[®] 전달 버퍼(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland) 내에서 분할된 단백질을 메탄올-활성화된 PVDF 멤브레인(Immobilon[®]-P Transfer Membrane, Merck & Cie, Schaffhausen, Switzerland) 상에서 전기블롯하였다(Novex[®] Semi-Dry Blotter, 1 h, 25V). 비-특이적 결합 부위를 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20(PBST)으로 4℃에서 밤새 차단하였다. DPR 단백질을 다음의 검출 항체로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 나타내었다: (GA)₁₅: NI-308.28G1, 10 nM; (PR)₁₅: NI-308.24E11, 100 nM; (GR)₁₅: 항-C9ORF72/C9RANT 클론 5A5, 1:5,000 희석(MABN778, Merck & Cie, Schaffhausen, Switzerland). 멤브레인을 실온에서 15분 동안 PBST 내에서 3회 세척하였고, HRP(1:10,000 희석, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체 또는 HRP(1:10,000 희석,

SouthernBiotech, Birmingham, USA)와 접합된 마우스 항-라트 카파 항체로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. ECL 및 ImageQuant 350 검출(GE Healthcare, Otelfingen, Switzerland)을 이용하여 멤브레인을 현상하였다. 항체 NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.45C2 및 NI-308.28G1은 용액내에서 폴리-GA DPR 단백질 펩티드를 포획하였지만(도 6a), 항체 NI-308.24E11 및 NI-308.6B11은 각각 폴리-PR 및 폴리-GR을 침전시켰다(도 6b 및 도 6c). 상기 NI-43A11 이소타입 대조군 항체는 테스트된 임의의 DPR 단백질 펩티드를 침전시켰다(도 6a 내지 도 6c). 결론적으로, 상기 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체는 용액내에서 DPR 단백질 펩티드에 결합 및 침전시킬 수 있다.

[0408] 실시예 8: 간접 ELISA에 의한 반복체-길이 의존적 결합의 특징분석

[0409] 상이한 반복체 크기의 C9orf72 DPR에 대한 재조합 인간-유래의 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.45C2, NI-308.18F7, NI-308.24E11, NI-308.5G2, NI-308.46E9, NI-308.6B11, 및 NI-302.4M1의 결합 친화도를 결정하기 위하여, ELISA EC₅₀ 분석을 수행하였다. 간략히, Schafer-N(Copenhagen, Denmark): GA₂₀: H-(GA)₂₀HHHHHH-NH₂; GA₁₀: H-(GA)₁₀HHHHHH-NH₂; GA₆: H-(GA)₆HHHHHH-NH₂; GA₅: H-(GA)₅HHHHHH-NH₂; GA₄: H-(GA)₄HHHHHH-NH₂; GA₃: H-(GA)₃HHHHHH-NH₂; GA₂: H-(GA)₂HHHHHH-NH₂; GP₂₀: H-(GP)₂₀HHHHHH-NH₂; GP₁₀: H-(GP)₁₀HHHHHH-NH₂; GP₆: H-(GP)₆HHHHHH-NH₂; GP₅: H-(GP)₅HHHHHH-NH₂; GP₄: H-(GP)₄HHHHHH-NH₂; GP₃: H-(GP)₃HHHHHH-NH₂; GP₂: H-(GP)₂HHHHHH-NH₂; GR₂₀: H-(GR)₂₀HHHHHH-NH₂; GR₁₀: H-(GR)₁₀HHHHHH-NH₂; GR₆: H-(GR)₆HHHHHH-NH₂; GR₅: H-(GR)₅HHHHHH-NH₂; GR₄: H-(GR)₄HHHHHH-NH₂; GR₃: H-(GR)₃HHHHHH-NH₂; GR₂: H-(GR)₂HHHHHH-NH₂; PA₂₀: H-(PA)₂₀HHHHHH-NH₂; PA₁₀: H-(PA)₁₀HHHHHH-NH₂; PA₆: H-(PA)₆HHHHHH-NH₂; PA₅: H-(PA)₅HHHHHH-NH₂; PA₄: H-(PA)₄HHHHHH-NH₂; PA₃: H-(PA)₃HHHHHH-NH₂; PA₂: H-(PA)₂HHHHHH-NH₂; PR₂₀: H-(PR)₂₀HHHHHH-NH₂; PR₁₀: H-(PR)₁₀HHHHHH-NH₂; PR₆: H-(PR)₆HHHHHH-NH₂; PR₅: H-(PR)₅HHHHHH-NH₂; PR₄: H-(PR)₄HHHHHH-NH₂; PR₃: H-(PR)₃HHHHHH-NH₂; PR₂: H-(PR)₂HHHHHH-NH₂에 의해 디펩티드 반복체 단백질을 합성 및 정제하였다. 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 50 µg/ml의 농도로 디펩티드 반복체 단백질 펩티드로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항체를 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체로 인큐베이션하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다.

[0410] 상이한 반복체 길이를 갖는 C9orf72 DPR 단백질에 대한 선택된 NI-308 항체의 결합 친화도를 간접 ELISA에 의한 소수성 펩티드 코팅에 따라 결정하였다. >100 nM EC₅₀에서 첫 번째 검출가능한 낮은 친화도 결합을 위하여, 항체 NI-308.1507 및 NI-308.28G1은 최소 5개의 GA 디펩티드 반복체를 필요로 하였지만, 항체 NI-308.18F7 및 NI-308.45C2는 적어도 6개의 GA 반복체를 필요로 하였다(도 7a, 도 7f 내지 도 7i). 10 또는 20개 (GA)-반복체를 갖는 폴리-GA DPR에 대해 높은 친화도 결합이 검출되었고, 서브나노몰 또는 낮은 나노몰 범위로 EC₅₀에 반영되었다(도 7a, 도 7c 내지 도 7i). 항체 NI-308.5G2 및 NI-308.46E9는 각각 최소 5 및 10개의 GP-반복체를 필요로 하였다(도 7b, 도 7j 및 도 7n). 후자의 2가지 항체에 대한 높은 친화도 결합은 10 및 20개 반복체를 갖는 폴리-GP DPR 단백질 펩티드에 대해 확장된 반복체 길이에서만 검출되었다. 또한, >100 nM EC₅₀에서 첫 번째 검출가능한 낮은 친화도 결합을 위하여, 항체 NI-308.5G2는 최소 6개 GA 디펩티드 반복체를 필요로 하였다(도 7a 및 도 7k). 10 또는 20개 (GA)-반복체를 갖는 폴리-GA DPR에 대해 높은 친화도 결합이 검출되었고, 낮은 나노몰 범위로 EC₅₀에 반영되었다(도 7a 및 도 7k). 항체 NI-308.6B11은 최소 3개 GR-반복체를 필요로 하였다(도 7c 및 도 7l). 상기 항체에 대한 높은 친화도 결합은 적어도 5개 GR 디펩티드 반복체를 갖는 폴리-GR DPR 단백질 펩티드에 대해 검출되었다(도 7c 및 도 7l). 또한, >100 nM EC₅₀에서 첫 번째 검출가능한 낮은 친화도 결합을 위하여, 항체 NI-308.6B11은 최소 6개 GA 디펩티드 반복체를 필요로 하였다(도 7a 및 도 7m). 10 또는 20 (GA)-반복체를 갖는 폴리-GA DPR에 대해 높은 친화도 결합이 검출되었고, 낮은 나노몰 범위로 EC₅₀에 반영되었다(도 7a 및 도 7m). 각각 >100 nM EC₅₀에서 첫 번째 검출가능한 낮은 친화도 결합 또는 2 자리(two-digit) 나노몰 결합 친화도를 위하여, 항체 NI-308.24E11은 최소 6개 PR 디펩티드 반복체를 필요로 하였지만(도 7d 및 도 7o), 항체

NI-308.4M1은 적어도 5개 PA 반복체를 필요로 하였다(도 7e 및 도 7p). 후자의 2가지 항체에 대한 높은 친화도 결합은 각각 10 또는 20개 반복체를 갖는 폴리-PR 및 폴리-PA DPR에 대해 확장된 반복체 길이에서만 검출되었고, 낮은 나노몰 또는 서브나노몰 범위로 EC₅₀에 반영되었다(도 7d, 도 7e, 도 7o 및 도 7p). 결론적으로, 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체는 짧은 반복 크기에 대한 결합 부재와 확장된 디펩티드 반복체에 대한 우세한 높은 친화도 결합으로 DPR에 대한 반복체-길이 의존적 결합을 나타내었다.

[0411] **실시예 9: 샌드위치 ELISA에 의한 반복체-길이 의존적 결합의 특징분석**

[0412] 상이한 반복체 크기의 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 재조합 인간-유래의 항체 NI-308.1507, NI-308.28G1, NI-308.18F7 및 NI-308.5G2의 결합 친화도를 결정하였다. 간략히, His-태그된 디펩티드 반복체 단백질 펩티드를 Schafer-N(Copenhagen, Denmark): GA₂₀: H-(GA)₂₀HHHHHH-NH₂; GA₁₀: H-(GA)₁₀HHHHHH-NH₂; GA₆: H-(GA)₆HHHHHH-NH₂; GA₅: H-(GA)₅HHHHHH-NH₂; GA₄: H-(GA)₄HHHHHH-NH₂; GA₃: H-(GA)₃HHHHHH-NH₂; GA₂: H-(GA)₂HHHHHH-NH₂; GP₂₀: H-(GP)₂₀HHHHHH-NH₂; GP₁₀: H-(GP)₁₀HHHHHH-NH₂; GP₆: H-(GP)₆HHHHHH-NH₂; GP₅: H-(GP)₅HHHHHH-NH₂; GP₄: H-(GP)₄HHHHHH-NH₂; GP₃: H-(GP)₃HHHHHH-NH₂; GP₂: H-(GP)₂HHHHHH-NH₂에 의해 합성 및 정제하였다. 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 10 µg/ml의 농도로 모노클론 마우스 항-His 태그 항체(Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 세척 단계 후, His-태그된 C9orf72 DPR 단백질 펩티드를 PBS(pH 7.4) 내에서 1 µM 또는 5 µM의 동일한 농도로 실온에서 1시간 동안 항-His 태그 항체에 의한 표적-트랩을 위해 첨가하였다. 추가 세척 단계 후, NI-308 항체를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20 내에 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. DPR 단백질 펩티드에 대한 항체 결합을 1:5,000 희석으로 HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체에 의해 실온에서 1시간 동안 검출하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다. 상이한 반복체 길이를 갖는 C9orf72 DPR 단백질에 대한 선택된 NI-308 항체의 결합 친화도를 샌드위치 ELISA에 의한 DPR 단백질의 His-태그 포획에 따라 결정하였다. 항체 NI-308.1507, NI-308.18F7, NI-308.28G1은 폴리-GA DPR 단백질 펩티드에 대한 용액내 결합을 위해 최소 10개 GA-반복체를 필요로 하였다(도 8a, 도 8c 내지 도 8e). 항체 NI-308.18F7 및 NI-308.28G1에 대한 결합 친화도는 서브나노몰 범위였고, (GA)₁₀ 및 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 모두에 대해 증가하였다(도 8a, 도 8d 및 도 8e). 항체 NI-308.1507은 확장된 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드에 대해서만 높은 친화도 결합을 보였다(도 8a 및 도 8c). 항체 NI-308.5G2는 확장된 폴리-GP DPR 반복체 길이에 대해 유사한 결합 의존성을 보였고, 20개 GP-반복체에서 시작할 때만 현저한 결합을 보였다(도 8b 및 도 8f). 결론적으로, 인간-유래의 C9orf72 DPR 항체는 짧은 반복체에 대한 결합 부재와 확장된 디펩티드 반복체에 대한 우세한 높은 친화도 결합으로 DPR에 대한 현저한 반복체-길이 의존적 결합을 나타내었다.

[0413] **실시예 10: 모노머성 및 응집된 C9orf72 DPR에 대한 결합 분석**

[0414] 모노머성 및 응집된 GA C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 재조합 인간-유래의 NI-308.18F7 및 NI-308.1507 항체의 결합 특이성 및 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 결정하였다.

[0415] 방법

[0416] *C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 펩티드*

[0417] 디펩티드 반복체 단백질 (GA)₂₀(H-(GA)₂₀HHHHHH-NH₂)을 Schafer-N(Copenhagen, Denmark)에 의해 합성 및 정제하였다. 동결건조된 펩티드를 DMSO(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) 내에 10 mg/ml의 농도로 용해시켰다.

[0418] *(GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드의 모노머성 및 피브릴성 응집된 제조물의 생성*

[0419] 모노머성 DPR 단백질 제조물을 수득하기 위하여, (GA)₂₀ 펩티드를 카보네이트 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에 200 µg/ml의 농도로 용해시켰고, 즉시 -80℃에서 동결시켰다. DPR 응집체를 수득하기 위하여,

(GA)₂₀ 펩티드를 나트륨 아세테이트 버퍼(50 mM C₂H₃O₂Na, 100 mM KCl 및 1 mM EDTA, pH 3.0) 내에서 200 µg/ml의 농도로 용해시켰고, 교반하면서(600 rpm) 실온에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 펩티드 제조물은 사용시까지 -80℃에 보관하였다.

[0420] 투과 전자현미경

[0421] 샘플을 글로우-방전된(glow-discharged) 탄소-코팅 구리 그리드(grid) 상에 흡착시켰다. 과량의 샘플을 여과지에 블롯팅함으로써 제거하였다. 그리드를 2%(w/v) 우라닐 아세테이트로 1분 동안 염색하였고, 과량의 우라닐 아세테이트를 증류된 탈이온수로 세척하였다. 그리드를 공기-건조시켰고, Philips CM100 투과전자현미경을 이용해 100 kV의 가속 전압으로 이미지화하였다.

[0422] 간접 ELISA

[0423] 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 5 µg/ml의 농도로 모노머성 및 응집된 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물로 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항체를 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체로 인큐베이션하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다.

[0424] 샌드위치 ELISA

[0425] 96-웰 마이크로플레이트(Corning Incorporated, Corning, USA)를 코팅 버퍼(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) 내에서 10 µg/ml의 농도로 모노클론 마우스 항-His 태그 항체(Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France)로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 비-특이적 결합 부위를 2% BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 세척 단계 후, 항-His 태그 항체에 의한 표적-트래핑을 위하여 PBS(pH 7.4) 내에서 5 µM의 동일한 농도로 His-태그된 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물을 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 추가 세척 단계 후, NI-308 항체를 2% BSA(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 함유하는 PBS/0.1% Tween[®]-20 내에 표시된 농도로 희석하였고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. DPR 단백질 펩티드에 대한 항체 결합을 1:5,000 희석된 HRP(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA)와 접합된 당나귀 항-인간 IgG Fc γ-특이적 항체에 의해 실온에서 1시간 동안 검출하였다. 표준 비색 분석에서 HRP 활성을 측정함으로써 결합을 결정하였다. GraphPad Prism 소프트웨어(San Diego, USA)를 이용한 비-선형 회귀에 의해 EC₅₀ 값을 추정하였다.

[0426] 그 결과, C9orf72 (GA)₂₀ 디펩티드 반복체 단백질은, 투과 전자현미경 분석에 의해 나타난 것과 같이, 산성 조건 하에 에이징시 아밀로이드 피브릴을 닮은 구조로 즉시 응집되었다(도 10b). 이와 대조적으로, 염기성 조건 하에, (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드는 피브릴성 응집체를 형성하지 않았고, 모노머성 상태와 같이 유지하였다(도 10a). 모노머성 및 응집된 C9orf72 (GA)₂₀ DPR 단백질 펩티드 제조물에 대한 간-유래의 항체 NI-308.18F7 및 NI-308.1507의 결합 특이성 및 결합 친화도(EC₅₀)를 간접 및 샌드위치 ELISA 결합 분석에 의해 결정하였다. 양쪽 항체는 모노머성 뿐만 아니라 응집된 (GA)₂₀-DPR 단백질 펩티드 제조물을 상당한 결합 친화도로 인식하였다(도 9, 도 11 및 도 12). 상기 폴리-GA 디펩티드 반복체 단백질은 C9orf72-FTLD에서 가장 일반적인 펩티드 종인 것으로 보고되었다(Mori et al., Acta Neuropathol. 2013). (GA)₂₀ 디펩티드 반복체 단백질은 염기성 조건이 아니라 산성 조건 하에 에이징시 아밀로이드-유사 피브릴성 구조로 즉시 응집되었다. 인간-유래의 항체 NI-308.18F7 및 NI-308.1507은 2가지 독립적인 결합 분석에서 모노머성 뿐만 아니라 응집된 (GA)₂₀-DPR 제조물을 상당한 결합 친화도로 인식한다. 따라서, 상기 항체는 가용성 뿐만 아니라 불용성 입체형태에서 병리적 GA DPR 단백질을 표적화하기 위한 적합한 후보자이다.

[0427] 실시예 11: SDS PAGE에 의한 항체 온전성 분석

[0428] 제조한 인간 NI-308 항체의 순도 및 온전성을 평가하였다. 간략히, CHO-S 세포의 일시적 전달감염에 의해 인간

NI-308 항체를 발현시켰고, FPLC 시스템(AKTApurifier; GE Healthcare Life Sciences) 상에서 단백질 A 친화도 정제에 의해 정제하였다. PD-10 컬럼(GE Healthcare Life Sciences) 탈염 후, 항체를 PBS 내에 제형화하였다. 5 μ g의 정제된 재조합 인간 NI-308 항체를 환원 조건 하에 항산화제(Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)로 보충된 Novex[®] NuPAGE[®] MES SDS 구동 버퍼를 이용한 농도구배 SDS-PAGE(Novex[®] Bis-Tris NuPAGE[®] 4-12%; Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)와 이후의 쿠마시 블루 염색(Novex[®] SimplyBlueTM SafeStain, Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)에 의해 분할하였다. 그 결과, 재조합 인간 NI-308 항체의 환원 조건 하의 SDS-PAGE 분석은 예측된 크기의 항체 중쇄 및 경쇄에 대응하는 2개의 주요 밴드를 나타내었다. 현저한 오염이나 단백질분해성 분해 생성물은 검출가능하지 않았다(도 13).

[0429] **실시예 12: 사후 인간 C9orf72-FTLD 및 비-신경학적 대조군 뇌 조직에서 DPR 응집체 병리에 대한 결합 분석**

[0430] 인간 C9orf72-FTLD 환자 및 비-신경학적 대조군으로부터 유래된 사후 소뇌 조직에서 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1의 결합을 평가하였다. 간략히, C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장을 갖는 3명의 FTLD 환자 및 1명의 비-신경학적 대조군 대상체로부터 유래된 소뇌(BiOBANC HCB-IDIBAPS, Barcelona, Spain)의 포르말린 고정되고 파라핀-포매된 5 μ m 섹션(section)을 1 mM EDTA 버퍼, pH 8.3에서 쿡킹하고 12분 동안 전자레인지 조사(600 W)함으로써 항원 회수(antigen retrieval)를 위해 전처리하였다. 메탄올 내의 3% H₂O₂로 실온에서 10분 동안 처리함으로써 내인성 퍼옥시다아제 활성의 퀀칭(quenching)을 달성하였다. 비-특이적 결합 부위를 PBS/5% 혈청(말/염소)/4% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 상기 차단 단계 후, 섹션을 5 nM 농도에서 인간-유래의 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1 항체로, 또는 1:5,000 희석(Novus Biologicals, Littleton, USA)에서 C9RANT 대조군 항체로 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 바이오틴화 당나귀 항-인간 IgG(H+L)(1:350 희석, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA) 또는 항-토끼 2차 항체(1:250 희석, Vector Laboratories; Burlingame, USA)로 검출을 수행하였고, Vectastain Elite ABC 키트(Vector Laboratories, Burlingame, USA)로 항체 신호를 증폭하였으며, 디아미노벤진딘(DAB, Thermo Scientific, Rockford, USA)으로 검출하였다. 슬라이드를 Eukitt[®] 마운팅 배지(O. Kindler GmbH; Freiburg, Germany)로 마운팅하였다. Dotslide VS120 슬라이드 스캐너(Olympus Schweiz AG, Switzerland)를 이용하여 밝은-필드 이미지를 수행하였다. FTLD를 갖는 환자 및 비-신경학적 대조군 대상체로부터 소뇌 섹션의 면역조직화학 분석에 의해 병리적 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질에 대한 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1의 결합을 평가하였다. 도 14a 및 도 14b에 나타난 것과 같이, 인간-유래의 NI-308.18F7, NI-308.1507 및 NI-308.5G2 항체는 테스트된 모든 3가지 C9orf72-FTLD 증례의 소뇌의 과립 세포 층 내에 현저한 뉴런성 세포질 함유물, 뉴런성 핵 내 함유물 및 이영양성 신경돌기를 나타내었다. 이와 대조적으로, 비-신경학적 대조군 소뇌는 테스트된 모든 항체에 대해 음성이었다(도 14a). 도 14c에 나타난 것과 같이, 항체 NI-308.4M1은 비-신경학적 대조군 증례가 아니라 C9orf72-FTLD 증례의 소뇌의 과립 세포 층 내에 뉴런성 세포질 함유물 및 뉴런성 핵 내 함유물을 나타내었다. 결론적으로, 인간-유래의 항체 NI-308.18F7, NI-308.1507, NI-308.5G2 및 NI-308.4M1은 C9orf72-FTLD 증례의 소뇌의 과립 세포 층 내에 C9orf72 디펩티드 반복체 단백질 응집체를 특이하게 검출하였지만, 대조군 소뇌에서는 염색이 관찰되지 않았고, 이는 상기 항체의 높은 표적 특이성을 나타낸다.

[0431] **실시예 13: FTLD에서 공-응집된 DPR 중에 대한 인간 항체 결합**

[0432] C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장을 갖는 인간 FTLD 환자로부터 유래된 사후 소뇌 조직에서 C9orf72 DPR 단백질의 구별된 종의 편재화를 평가하였다. 간략히, 제조사의 설명서에 따라 Atto 488 단백질 표지 키트(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 사용함으로써 항체 NI-308.18F7을 형광 염료 Atto 488에 직접 접합시켰다. 제조사의 설명서에 따라 Atto 550 단백질 표지 키트(Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)를 사용함으로써 항체 NI-308.5G2를 Atto 550에 직접 접합시켰다. 면역형광 조직화학 실험을 위하여, C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장을 갖는 FTLD 환자로부터 유래된 소뇌(BiOBANC HCB-IDIBAPS, Barcelona, Spain)의 포르말린 고정되고 파라핀-포매된 5 μ m 섹션을 1 mM EDTA 버퍼, pH 8.3에서 쿡킹하고 12분 동안 전자레인지 조사(600 W)함으로써 항원 회수를 위해 전처리하였다. 비-특이적 결합 부위를 PBS/5% 혈청(말/염소)/4% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 상기 차단 단계 후, 섹션을 5 nM에서 인간 항체 NI-308.18F7-Atto 488 및 NI-308.5G2-Atto 550로 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 면역염색 후, 조직 섹션을 0.1% Sudan Black B 용액으로 실온에서 10분 동안 인큐베이션하여 조직 자가형광을 감소시켰다. DAPI 핵산 염색(5 mg/ml 스톡(stock) 용액의 1:1,000 희석, Molecular Probes[®], Life Technologies Europe B.V., Zug, Switzerland)을 사용함으로써 핵의 대비염색을 수행하였다. Hydromount(National Diagnostics, Atlanta, USA) 배지를 사용하여 슬라이드를 마운팅

하였다. Dotslide VS120 슬라이드 스캐너(Olympus Schweiz AG, Switzerland)를 이용하여 형광 이미징을 수행하였다.

[0433] C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장을 갖는 인간 FTLD 환자의 소뇌의 과립 층 내의 C9orf72 폴리-GA 및 폴리-GP DPR 단백질의 편재화는 형광 현미경에 의해 평가하였다. 도 15에 나타난 것과 같이, 항체 NI-308.18F7은 광범위한 뉴런성 세포질 및 핵내 C9orf72 폴리-GA 함유물을 인식하였다(왼쪽 패널, 녹색 염색 신호). 상기 실험 조건 하에, 선택된 NI-308.5G2는 세포질 및 핵내 폴리-GP 함유물의 병리를 보다 희박하게 검출하였다(중앙 패널, 적색 염색 신호). 폴리-GP DPR 단백질 응집체의 상당한 분획은 폴리-GA DPR 단백질 응집체와 공-편재되었는데(왼쪽 패널, 황색 염색 신호), 이는 양쪽 DPR 단백질이 병리적 함유물 내에 공-응집될 수 있음을 제시한다.

[0434] **실시예 14: C9orf72 DPR 단백질의 병리적 메커니즘 연구를 위한 세포-기반의 모델**

[0435] 최근에 나타난 세포 배양 및 동물 모델의 보고는 비정상 C9orf72 DPR 단백질의 독성에 대한 증거를 제공하였다. 예를 들면, 파리 및 일부 세포 배양 모델에서, 특히 아르기닌-풍부 DPR 단백질(폴리-GR 및 폴리-PR)은 핵 함유물 및 핵인(nucleolar) 스트레스를 유도함으로써 독성이 있는 것으로 나타났지만(Kwon *et al.*, Science 345 (2014), 1139-1145; Mizielska *et al.*, Science 345 (2014), 1192-1194; Tao *et al.*, Hum. Mol. Genet. 24 (2015), 2426-2441; Wen *et al.*, Neuron 84 (2014), 1213-1225; Yang *et al.*, Acta Neuropathol. 130 (2015), 525-535), 다른 문헌에서는 세포 배양 시스템에서 세포질 폴리-GA 응집체에 대한 독성이 보고되었다(May *et al.*, Acta Neuropathol. 128 (2014), 485-503; Zhang *et al.*, Acta Neuropathol. 128 (2014), 505-524).

[0436] tau(Yanamandra *et al.*, Ann. Clin. Transl. Neurol. 2 (2013), 278-288) 및 α -synuclein(Tran *et al.*, Cell Rep. 7 (2014), 2054-2065)에 대해 나타난 것과 같이, 본 발명의 항체의 치료에 의해 DPR 병리의 확산이 방지될 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, 유사한 종류의 시험관내 C9orf72 DPR 독성 분석이 사용된다. 특히, ATG-의 존적 번역에서 150개 디펩티드 반복체를 갖는 개별 DPR 단백질의 발현을 추진하기 위하여 합성 DNA 서열을 생성하였다. 무작위 코돈 전략을 도입하여 선택된 개별 DPR 단백질 서열만의 발현을 보증하였다. H-SY5Y, NSC-34, Neuro-2a, iPSC-유래의 뉴런 및 1차 뉴런과 같은 뉴런성 세포 내에서 DPR 단백질의 발현을 추진하기 위하여, 상기 합성 DNA 서열을 뉴런 특이적 Thy 1.2 프로모터에 의해 조절되는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. HEK293T, U-2 OS, HeLa 및 Cos 세포와 같은 넓은 범위의 진핵 세포에서의 높은-레벨의 발현을 위하여, 상기 합성 DNA 서열을 CMV 프로모터에 의해 조절되는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 인간 iPSC-유래의 뉴런 및 C9orf72 환자 섬유아세포 유래의 트랜스-분화된 뉴런(iNeurons)은 추가적인 C9orf72 DPR 단백질 세포 배양 모델을 나타낸다.

[0437] 상기 세포 모델은 본 발명의 항체의 치료적 유용성을 테스트하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 항체의 치료 효과의 평가 및 확인은 미토콘드리아 및/또는 카스파아제 활성 분석에 의한 세포 생존력, 세포용해 및/또는 멤브레인 누출 분석에 의한 세포 독성, 및 면역조직화학 분석에 의한 세포성 DPR 단백질 확산의 억제를 모니터링함으로써 수행될 수 있다.

[0438] **실시예 15: C9orf72 DPR 단백질의 병리적 메커니즘 연구를 위한 유전자이식 마우스 모델**

[0439] 응집-용이성 및/또는 접힘유화 단백질에 대해 개발된 면역치료 접근법은 몇 가지 신경퇴행성 질환의 전임상 및 임상 연구에서 전망이 좋은 결과를 생성하였다. C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장-매개성 ALS/FTLD의 병리적 특성을 되풀이하는 유전자이식 마우스 모델이 최근 개발되었다((Chew *et al.*, Science 348 (2015), 1151-1154); 및 국제 출원 WO2014/159247 A1). 상기 마우스 모델을 생성하기 위하여, 전장 또는 절단된 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장된 C9orf72 유전자(~450 내지 500 핵사뉴클레오타이드 반복체 사이)을 갖는 박테리아 인공 염색체 구조체 또는 66개 C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 서열을 갖는 아데노-연관성 바이러스 벡터를 사용하였다. 상기 마우스 모델에서, 핵 RNA 포커스 및 DPR 단백질의 C9orf72 핵사뉴클레오타이드 반복체 확장-매개성 축적이 중추신경계 내에 검출되었다. 또한, 뉴런성 소실, 행동 이상, 운동 결핍 및 감소된 생존율과 같은 C9orf72 질환의 병리적 특징이 상이한 유전자이식 마우스 모델에서 관찰되었다. 상기 마우스 모델은 본 발명의 항체의 치료적 유용성을 테스트하기 위해 사용될 수 있다. 특히, 스크리닝되는 항체는 복강내 항체 주사, 두개내 주사, 뇌실내 뇌 주입과 같은 다양한 가능한 경로로 동물에 적용될 수 있고, 치료 효과를 테스트할 수 있다.

[0440] 진화적 최적화 및 인간 면역 시스템 내의 진화도 성숙으로 인하여, 본 발명의 항체는 건강한 인간 대상체로부터 단리되고 뛰어난 안전성 프로필 및 면역원성의 부재에 대한 가능성이 높음으로 인해 가치있는 치료적 도구를 제공한다. 이러한 예상되는 치료 효과의 확인은 마우스 대신에 인간 항체로 전술한 문헌들에 개시된 것과 같은 테스트 방법에 의해 제공될 수 있다.

도면

도면1a

(A) NI-308.18F7 VH (가변 중쇄 서열 VH) (NI-308.A VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 CQVQLQESGPGLVKPSSETLSVTCTVSGGSINDYYWNWIRQPAGKGLEWIGRIYASGTINYNP
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 SLQSRVTMSIDTSKNQFSLDLISVSAADTAVYYCARWGQVVGDDYYGMDVWGQGTITVTVSS

NI-308.18F7 VK (가변 경쇄 서열 VK) (NI-308.A VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 CEIVLTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLQHTNGYNYLDWYLLKPGQSPQLLI~~FLTSNRAS~~
 FR3-----CDR3--FR4-----
 GVPDRFSGSGSGTNFTLKISRVEAEDVGVYYCMEGIQLWTFGQGTKLEIK

NI-308.18F7 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK) (NI-308.A VK-PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 C~~D~~IVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLQHTNGYNYLDWYLLKPGQSPQLLI~~FLTSNRAS~~
 FR3-----CDR3--FR4-----
 GVPDRFSGSGSGTNFTLKISRVEAEDVGVYYCMEGIQLWTFGQGTK~~V~~EIK

도면1b

(B) NI-308.15O7 VH (가변 중쇄 서열 VH) (NI-308.B VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 CQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSN~~HAMHWRQ~~APGKGLEWVAVISYDGENTYYA
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 DSIEGRFTISRDNFKNTLFLQMYSLTADDTAMYFCARGGRRGHFTSY~~YLDYWGQ~~GLTVTVSS

NI-308.15O7 VK (가변 경쇄 서열 VK) (NI-308.B VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
 CDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~NIDKYL~~NWYQQIPGKAPKLLIYA~~AASSLHSGVPSR~~
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTDFSLTISSLPEDFAIYYCQ~~QSYSSFR~~TFGQGTKLEIK

NI-308.15O7 VK-PIMC (가변 경쇄 서열 VK) (NI-308.B VK-PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
 CDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ~~NIDKYL~~NWYQQIPGKAPKLLIYA~~AASSLHSGVPSR~~
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTDFSLTISSLPEDFAIYYCQ~~QSYSSFR~~TFGQGTK~~V~~EIK

도면1c

(C) NI-308.28G1 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVAGGSVNSYYWTWIIQQSPGKGLEWLGRIYIAGRTNYPN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
SLTSRIALSVDTSRNQLSLKLTSVTAADTAIYYCARWGAESGDYYYGVDVWGPGTLTVTVSS

NI-308.28G1 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSSEGLLHNSNGYTYLDWYLQKPGQAPQLLI FLASNRAA
FR3-----CDR3-----FR3-----
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAIQSPWTFGPGTKVEIK

NI-308.28G1 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPRLVKPSSETLSLTCTVAGGSVNSYYWTWIIQQSPGKGLEWLGRIYIAGRTNYPN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
SLTSRIALSVDTSRNQLSLKLTSVTAADTAIYYCARWGAESGDYYYGVDVWGPGT~~T~~TVTVSS

NI-308.28G1 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSSEGLLHNSNGYTYLDWYLQKPGQAPQLLI FLASNRAA
FR3-----CDR3-----FR3-----
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAIQSPWTFGPGTKVEIK

도면1d

(D) NI-308.45C2 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQLQLQESGPGLVKPSQILSLTCAISGDSVFSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWDN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DYAPSVKSRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVAYCGGDCYSVSFDYWGQGT

LTVTVSS

NI-308. 45C2 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLQSNNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
FR3-----CDR3-----FR4-----
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGGTKVEIK

NI-308.45C2 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQLQLQ~~Q~~SGPGLVKPSQILSLTCAISGDSVFSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWDN
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
DYAPSVKSRISINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVAYCGGDCYSVSFDYWGQGT

LTVTVSS

NI-308. 45C2 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLQSNNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
FR3-----CDR3-----FR4-----
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGGTKVEIK

도면1e

(E) NI-308.24E11 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSTSLRSYFWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSTIYNP
 -----FR3-----CDR3-----FR3-----
 SLKNRVTISIDTSKNQFSLNLRSVTAADTAMYFCARGVPAETDARDFPPYYFDHWGQGLVTVT

 VSS

NI-308. 24E11 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 CDIQLTQSPSSLSASVGNRITFTCQASQDIRYYLNWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLDTGVPPR
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTNFTFTISSLPEDIAVYYCQQYEGLPVTFGGGKVEIK

NI-308. 24E11 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 CDIQMTQSPSSLSASVGNRITFTCQASQDIRYYLNWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLDTGVPPR
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTNFTFTISSLPEDIAVYYCQQYEGLPVTFGGGKVEIK

도면1f

(F) NI-308.5G2 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 CEVQLVQSGADLRNPGASVTVSCTASGYHFAFNAINWLRQAPGQRLEWMGWINIYSGNTKYS
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 QNFQGRVTFTRNTSASTAFMHLRSLRSEDVAVYFCARDPDSSGYLPPYFDYWGQGLVTVSS

NI-308.5G2 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 CDIQLTQSPDSLTLTLGERATINCKSSQSVFYNSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYWASTRE
 -FR3-----CDR3-----FR4-----
 SGVTDRFSGSGSGTDFTLTITNLQAEDVAVYYCQQFYSSPLTFGGGKVEIK

NI-308.5G2 VH-PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 CQVQLVQSGADLRNPGASVTVSCTASGYHFAFNAINWLRQAPGQRLEWMGWINIYSGNTKYS
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 QNFQGRVTFTRNTSASTAFMHLRSLRSEDVAVYFCARDPDSSGYLPPYFDYWGQGLVTVSS

NI-308.5G2 VK-PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 CDI~~V~~MTQSPDSLTLTLGERATINCKSSQSVFYNSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYWASTRE
 -FR3-----CDR3-----FR4-----
 SGVTDRFSGSGSGTDFTLTITNLQAEDVAVYYCQQFYSSPLTFGGGKVEIK

도면1g

(G) NI-308.46E9 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISGSTYYWGWIROPKPGLEYIGRIYYSGSTYY
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
NPSLKSRTATISVDTSKNQLSLTLSSVTAADTAVYYCVRPFYAGSGNSPFDYWGQGLTVTVSS

NI-308.46E9 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3--
CEIVLTQSPATVSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRATGIPAR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGAEFTLTISLQSEDFVYYCQQYNWPPAFGGGKVEIK

NI-308.46E9 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISGSTYYWGWIROPKPGLEYIGRIYYSGSTYY
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
NPSLKSRTATISVDTSKNQLSLTLSSVTAADTAVYYCVRPFYAGSGNSPFDYWGQGLTVTVSS

NI-308.46E9VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3--
CEIVMTQSPATVSVSPGERATLSCRASQSVSTNLAWYQQKPGQPRLLIYGASTRATGIPAR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGAEFTLTISLQSEDFVYYCQQYNWPPAFGGGKVEIK

도면1h

(H) NI-308.6B11 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CEVQLVQSGAEVKRPGASVKVCKVSGYTLTTELSMHVVRQAPGKLEWMGGFDPEDGETVYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
QKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYALYHCATYGSWSHWNEGNEGSYYFDYWGQGLT

VTVSS

NI-308. 6B11 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3--
CDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQDISIYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSR
-----CDR3-----FR4-----
FSGSGSGTDFTFTISGLQPEDVARYYCQQYDDLPIITFGQGTREIK

NI-308.6B11 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
CQVQLVQSGAEVKRPGASVKVCKVSGYTLTTELSMHVVRQAPGKLEWMGGFDPEDGETVYA
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
QKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYALYHCATYGSWSHWNEGNEGSYYFDYWGQGLT

VTVSS

도면1i

(I) NI-308.46F8 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 CQVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCTASGFTFDEYGMSSWVRQVPKGLEWVSGINWNGATTRYA
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARDGCRNTSCYIWDWFD¹DPWGQGLVTV
 --
 SS

NI-308.46F8 VL (가변 경쇄 서열 VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-
 CQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVCWYQNLPGTAPKLLIYDDNKRPSGIPD
 -----CDR3-----FR4-----
 RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC²GTWDSSLSVVVFGGGTKLTVL

NI-308.46F8 VH-PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 CEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCTASGFTFDEYGMSSWVRQVPKGLEWVSGINWNGATTRYA
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
 DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARDGCRNTSCYIWDWFD¹DPWGQGLVTV
 --
 SS

도면1j

(J) NI-308.4M1 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-³FR2-----CDR2-----
 CEVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCEASGFTIGTYAMHWVRQFPKGGLDWVAVISFDGTTEYYT
 ---FR3-----CDR3-----FR4-----
 DAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNYLRGDDTAIFYCARDFTSSGETGSWTQVPDLWGQGLVTV

 VSS

NI-308.4M1 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
 CEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTKYLAWYQQKPGQAPRLLIYDVSYRAAGTPAR
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCHQRSSWPPVTFGGGTKVEIK

(J) NI-308.4M1 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-³FR2-----CDR2-----
 CQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCEASGFTIGTYAMHWVRQFPKGGLDWVAVISFDGTTEYYT
 ---FR3-----CDR3-----FR4-----
 DAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNYLRGDDTAIFYCARDFTSSGETGSWTQVPDLWGQGLVTV

 VSS

NI-308.4M1 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3--
 CEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTKYLAWYQQKPGQAPRLLIYDVSYRAAGTPAR
 -----CDR3-----FR4-----
 FSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCHQRSSWPPVTFGGGTKVEIK

도면1k

(K) NI-308.12A3 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 CEVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCVGSGLFSDFEMDWVRQAPGKGLEWISYISGDGNIYYQT
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMDSLTVEDTAVYYCARDARENCGGDCYSTSFDFWGQGLVT

 VSS

NI-308.12A3 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 CDIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYTANNRNYLAWYQKKAGQPPKLLIHWASTRA
 -FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVPDRFSGSGSGTDFILTISSLAEDVAVYFCQHYYNRPRTFGQGTKVEIK

NI-308.12A3 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 CEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVGSGLFSDFEMDWVRQAPGKGLEWISYISGDGNIYYQT
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVKGRFTISRDNKNSLFLQMDSLTVEDTAVYYCARDARENCGGDCYSTSFDFWGQGLVT

 VSS

NI-308.12A3 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---
 CDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYTANNRNYLAWYQKKAGQPPKLLIHWASTRA
 -FR3-----CDR3-----FR4-----
SGVPDRFSGSGSGTDFILTISSLAEDVAVYFCQHYYNRPRTFGQGTKVEIK

도면1l

(L) NI-308.16C10 VH (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
 CEVQLVETGGGVVQPGMSLSLSAATGFTFSSYGMHWVRQGPKGPEWVAGIWDGNTKYYG
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVTGRVTISRDNKNTLFLQMINVRVEDTAVYYCVKDAERVQKWASYIMDVWGQGTTVTVS
 -
 S

NI-308.16C10 VK (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-
 CEIVLTQSPGILSLSRGNRVALSCRASRVNSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASKRATGISD
 -----CDR3---FR4-----
RFRGTGSGTDFTLTVARLEPEDIAVYYCQHYGAFGQGTKLEIK

NI-308.16C10 VH - PIMC (가변 중쇄 서열 VH)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
 CQVQLVESGGGVVQPGMSLSLSAATGFTFSSYGMHWVRQGPKGPEWVAGIWDGNTKYYG
 -----FR3-----CDR3-----FR4-----
DSVTGRVTISRDNKNTLFLQMINVRVEDTAVYYCVKDAERVQKWASYIMDVWGQGTTVTVS
 -
 S

NI-308.16C10 VK - PIMC (가변 경쇄 서열 VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-
 CEIVLTQSPGILSLSRGNRVALSCRASRVNSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYGASKRATGISD
 -----CDR3---FR4-----
RFRGTGSGTDFTLTVARLEPEDIAVYYCQHYGAFGQGTKVEIK

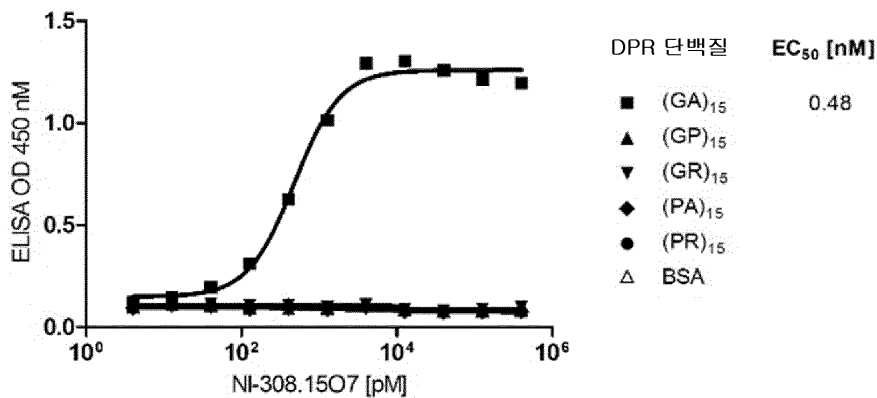
도면2a

(A)

항체	EC ₅₀ [nM]				
	(GA) ₁₅	(GP) ₁₅	(GR) ₁₅	(PR) ₁₅	(PA) ₁₅
NI-308.15O7	0.48	-	-	-	-
NI-308.28G1	1.1	-	-	-	-
NI-308.45C2	1.1	-	-	-	-
NI-308.18F7	1.5	-	-	-	-
NI-308.24E11	-	-	-	12.8	-
NI-308.16C10	55.1	-	-	3.5	-
NI-308.5G2	15.3	0.88	-	-	-
NI-203.12A3	19.0	2.2	-	-	-
NI-308.46E9	> 200	13.9	-	-	-
NI-308.6B11	38.4	-	0.94	119	-
NI-308.46F8	108	-	40.6	> 200	-
NI-308.4M1	> 200	-	-	-	0.10

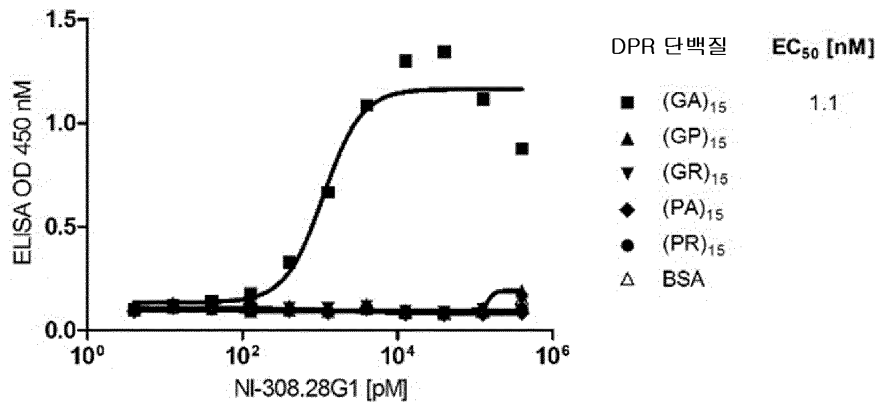
도면2b

(B) NI-308.15O7



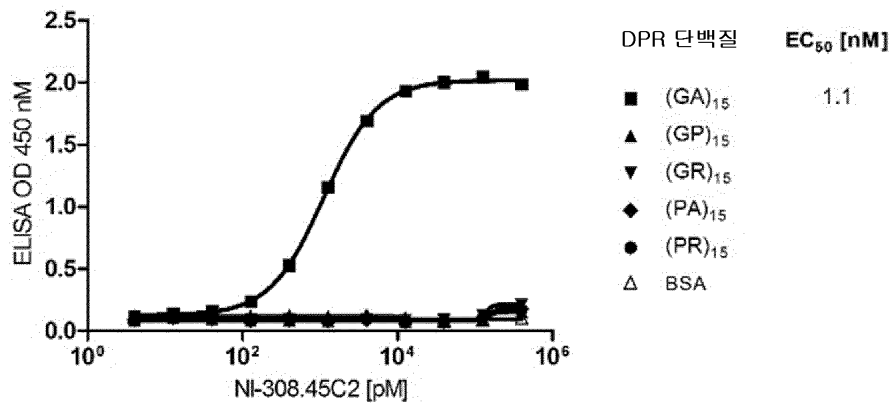
도면2c

(C) NI-308.28G1



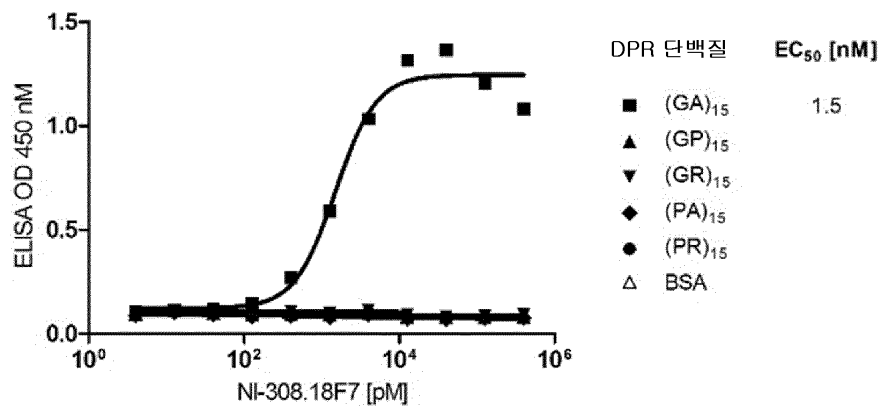
도면2d

(D) NI-308.45C2



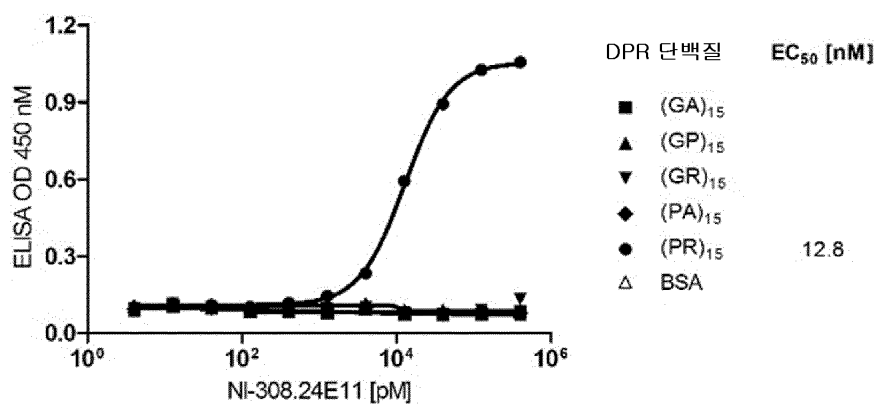
도면2e

(E) NI-308.18F7



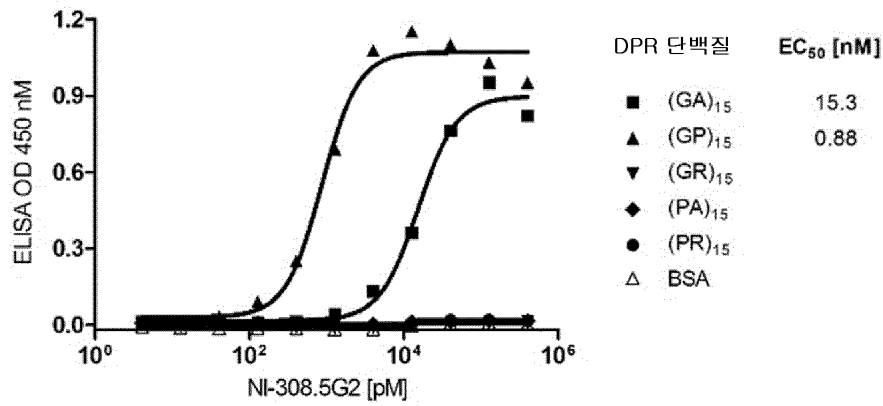
도면2f

(F) NI-308.24E11



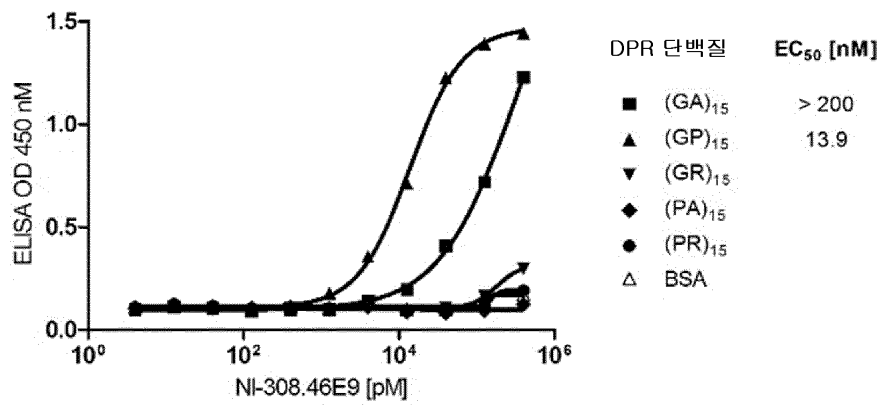
도면2g

(G) NI-308.5G2



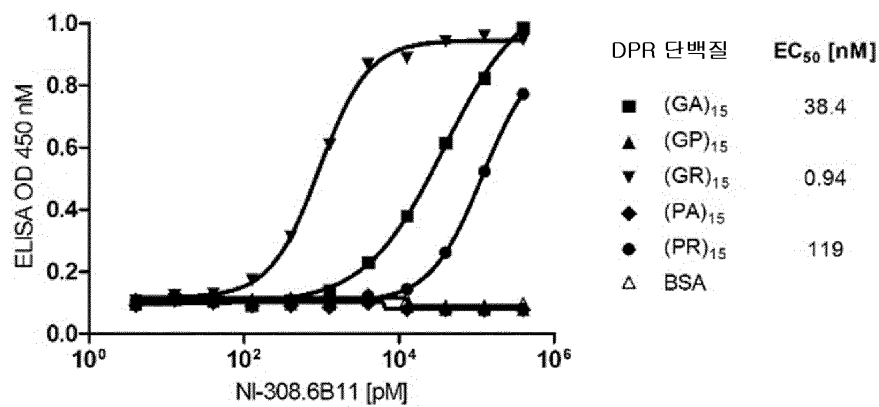
도면2h

(H) NI-308.46E9



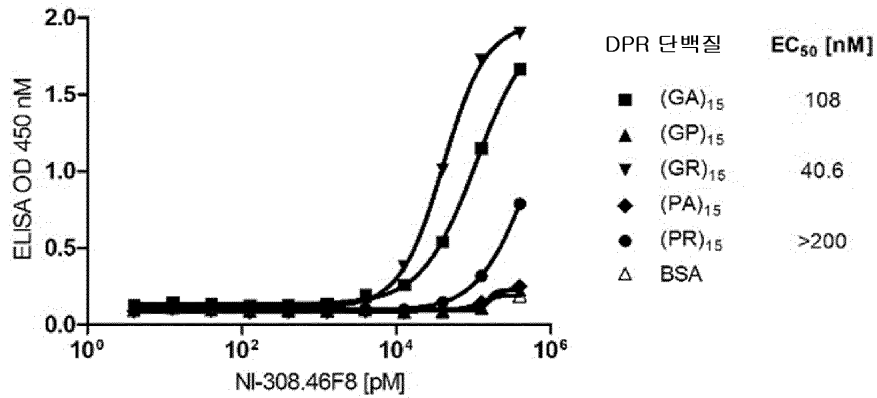
도면2i

(I) NI-308.6B11



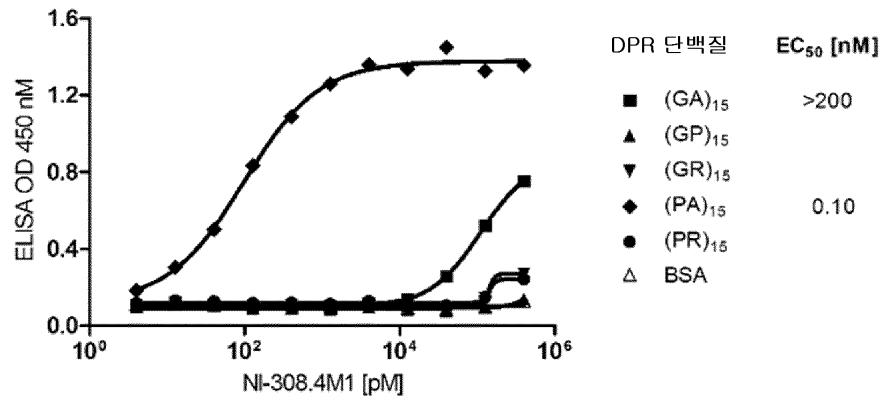
도면2j

(J) NI-308.46F8



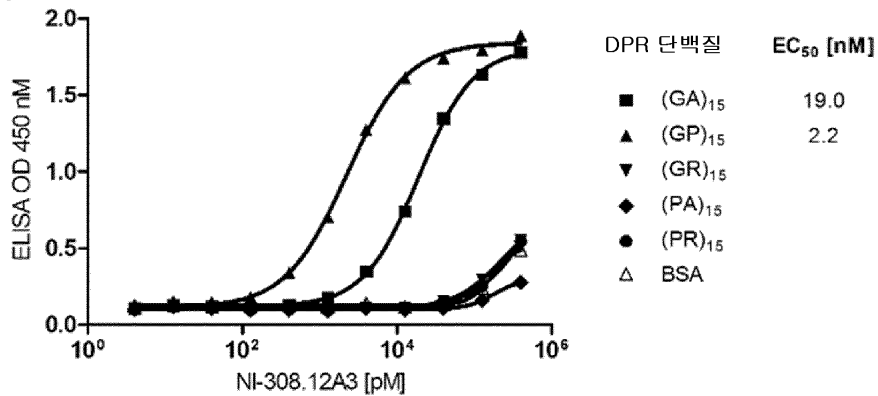
도면2k

(K) NI-308.4M1



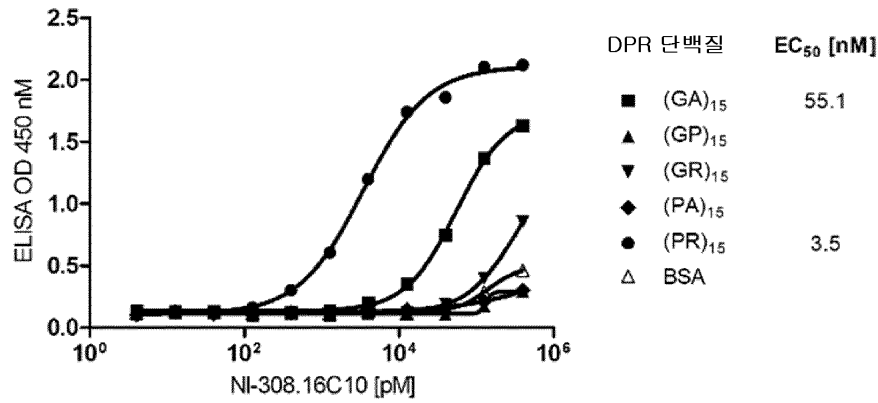
도면2l

(L) NI-308.12A3



도면2m

(M) NI-308.16C10



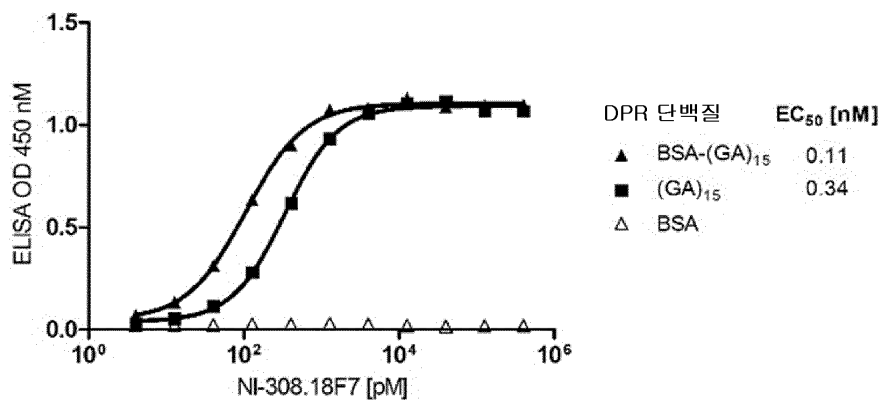
도면3a

(A)

항체	펩티드	EC ₅₀ [nM]	
		BSA-커플링된 펩티드	비-커플링된 펩티드
NI-308.18F7	(GA) ₁₅	0.11	0.34
NI-308.15O7	(GA) ₁₅	0.41	0.18
NI-308.28G1	(GA) ₁₅	0.66	2.0
NI-308.45C2	(GA) ₁₅	15.2	1.1
NI-308.24E11	(PR) ₁₅	> 200	11.3
NI-308.16C10	(PR) ₁₅	91.1	3.5
NI-308.5G2	(GP) ₁₅	0.21	0.40
NI-308.12A3	(GP) ₁₅	6.1	2.2
NI-308.46E9	(GP) ₁₅	12.1	22.0
NI-308.6B11	(GR) ₁₅	NA	1.3
NI-308.46F8	(GR) ₁₅	NA	90.3
NI-308.4M1	(PA) ₁₅	0.14	0.10

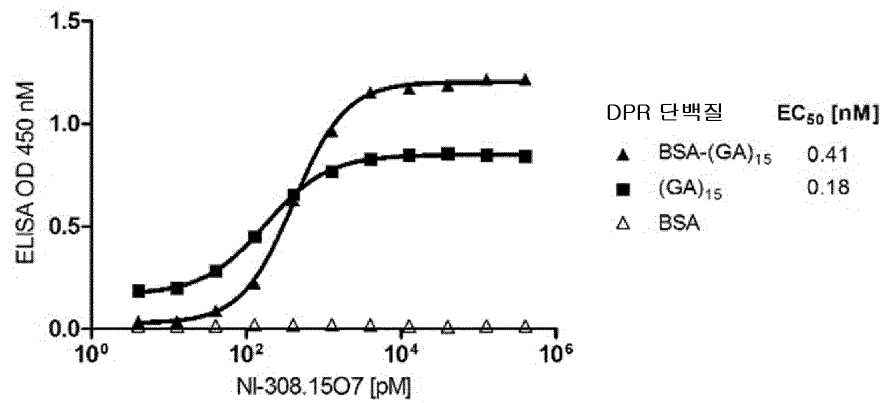
도면3b

(B) NI-308.18F7



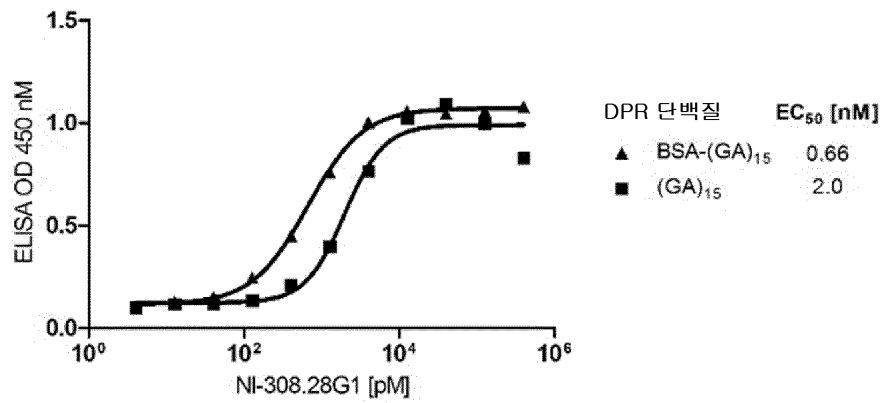
도면3c

(C) NI-308.1507



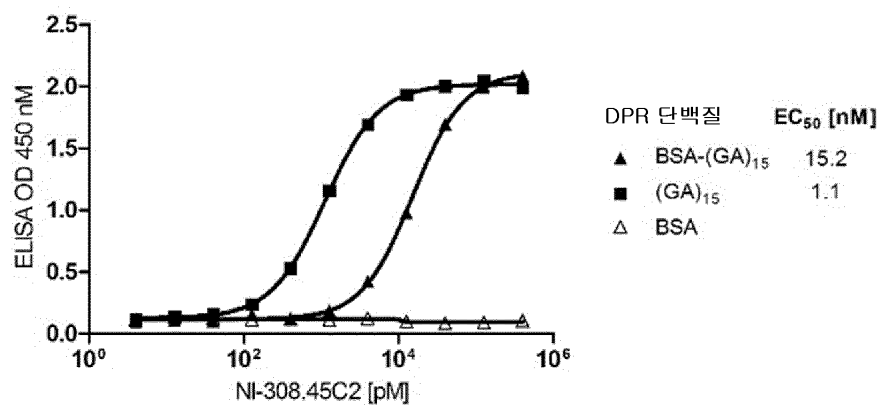
도면3d

(D) NI-308.28G1



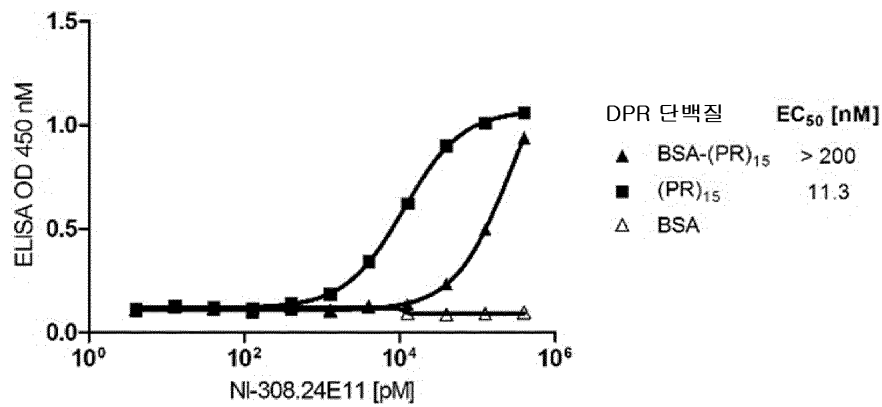
도면3e

(E) NI-308.45C2



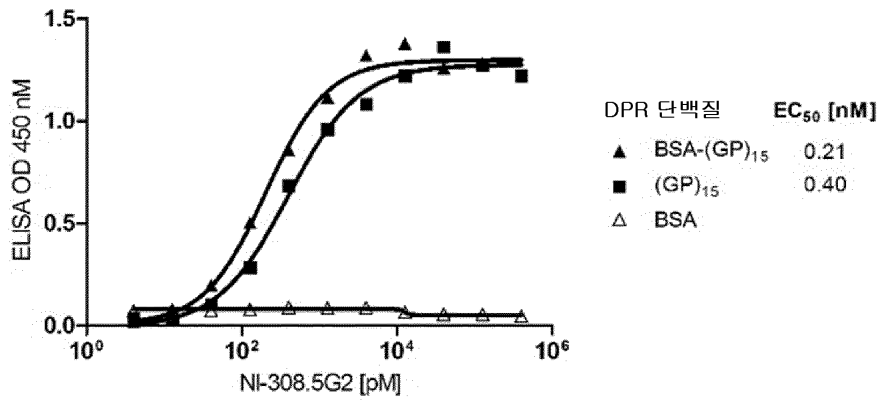
도면3f

(F) NI-308.24E11



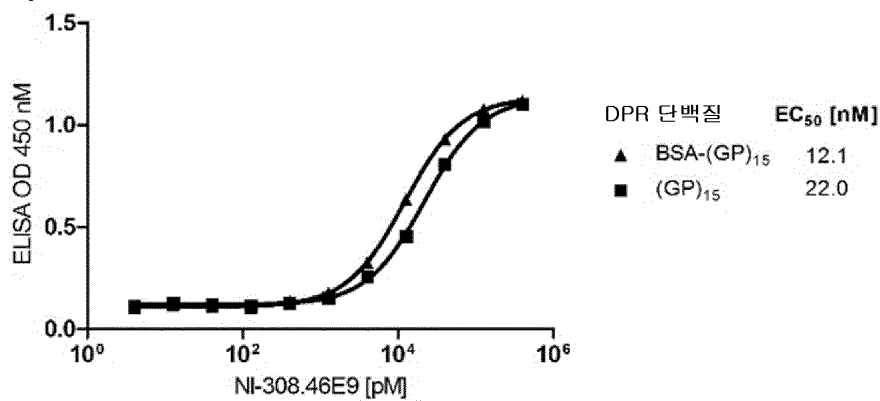
도면3g

(G) NI-308.5G2



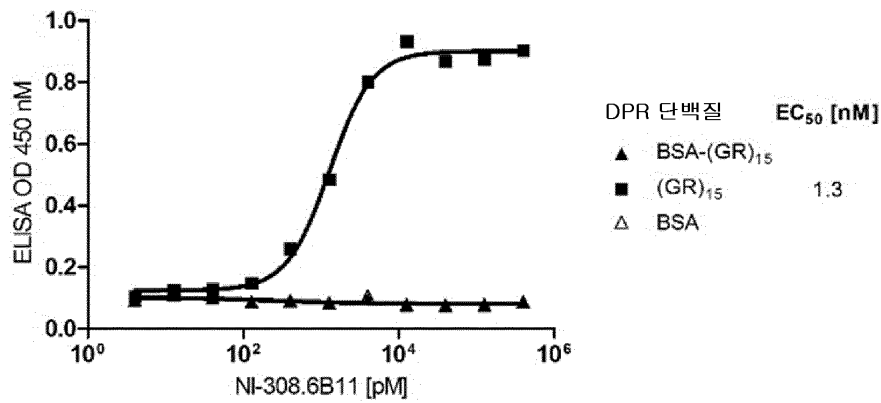
도면3h

(H) NI-308.46E9



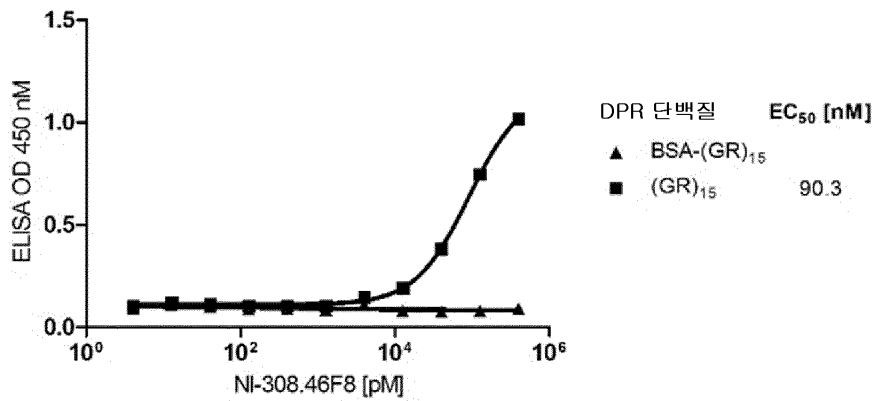
도면3i

(I) NI-308.6B11



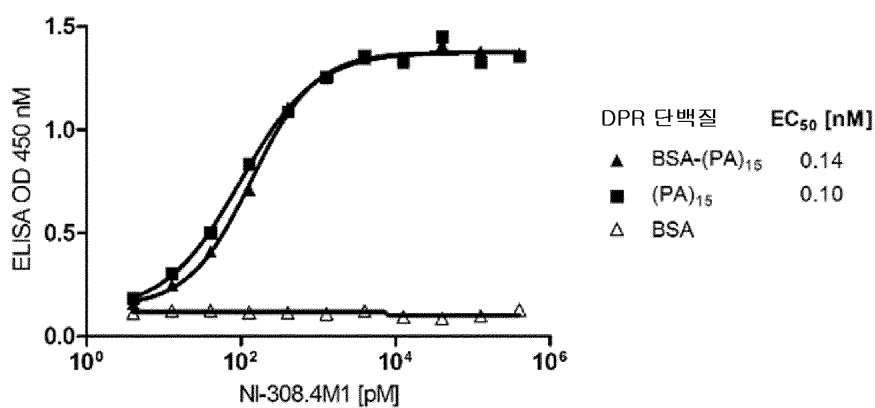
도면3j

(J) NI-308.46F8



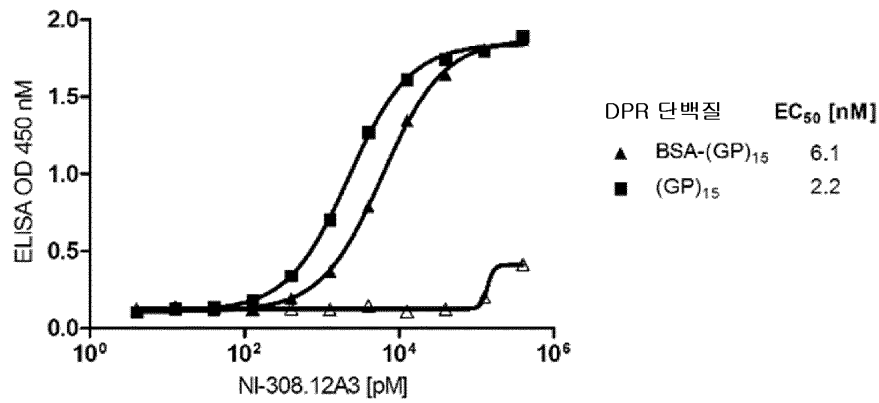
도면3k

(K) NI-308.4M1



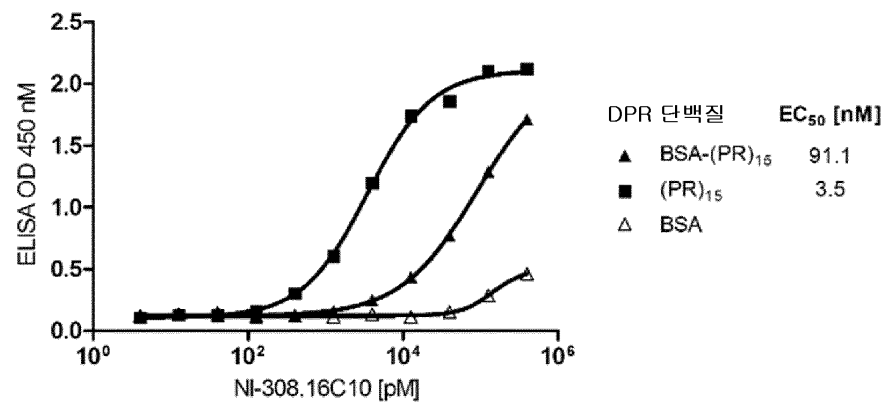
도면3l

(L) NI-308.12A3

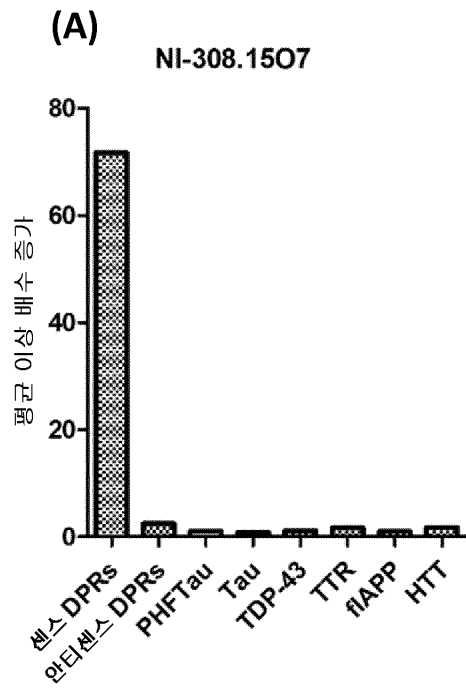


도면3m

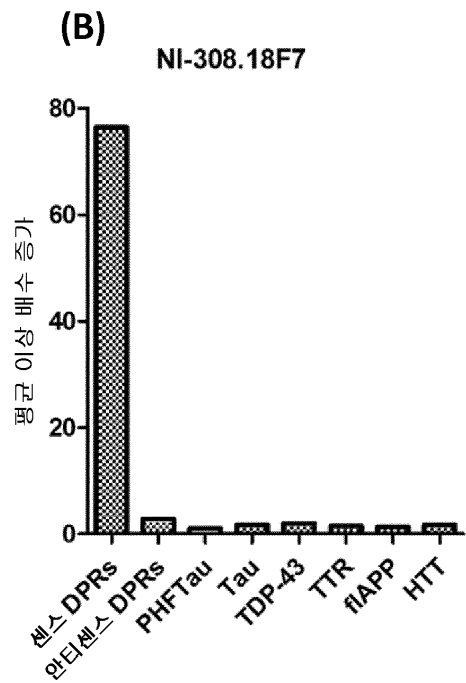
(M) NI-308.16C10



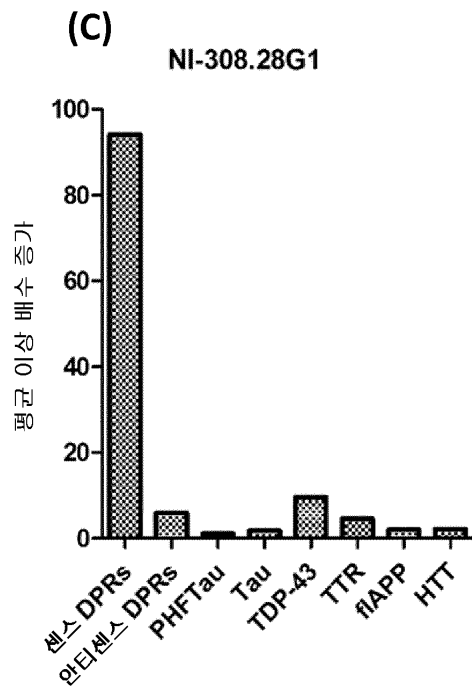
도면4a



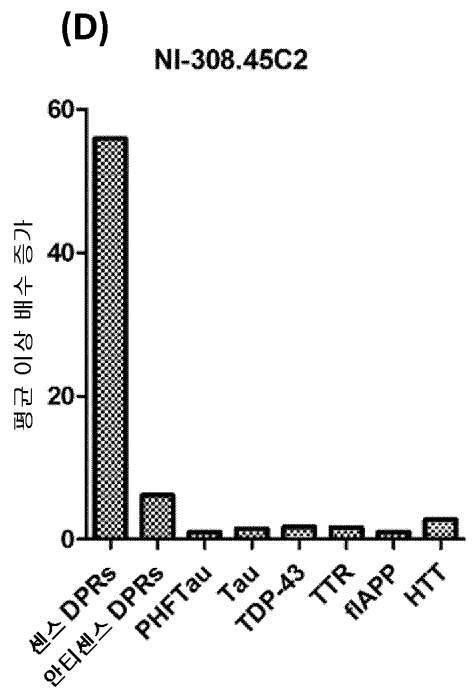
도면4b



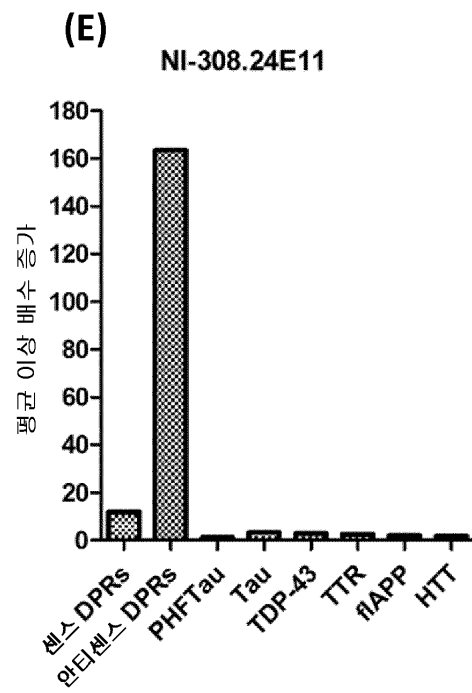
도면4c



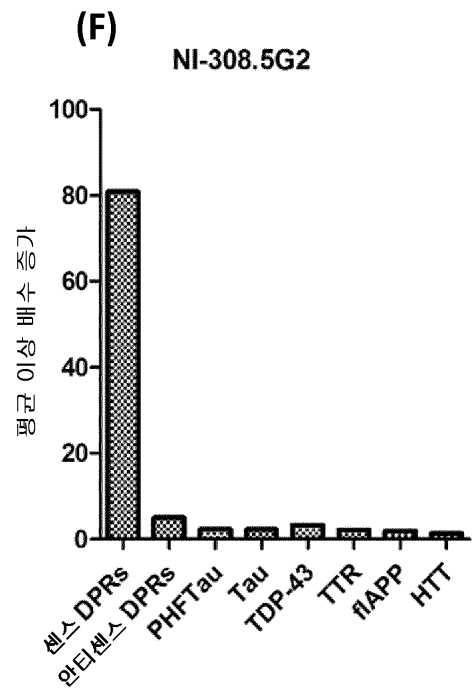
도면4d



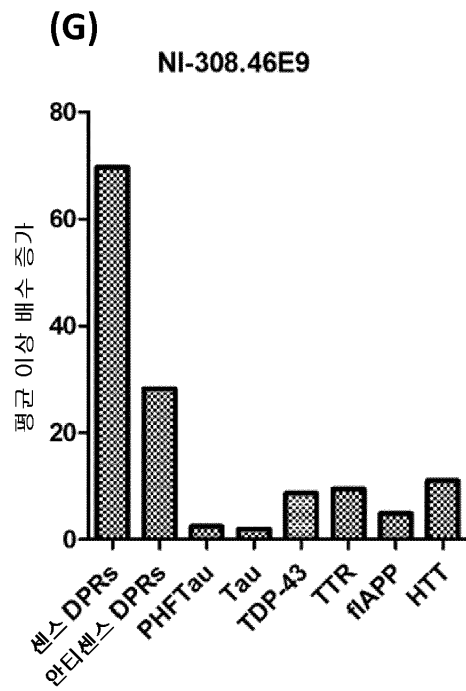
도면4e



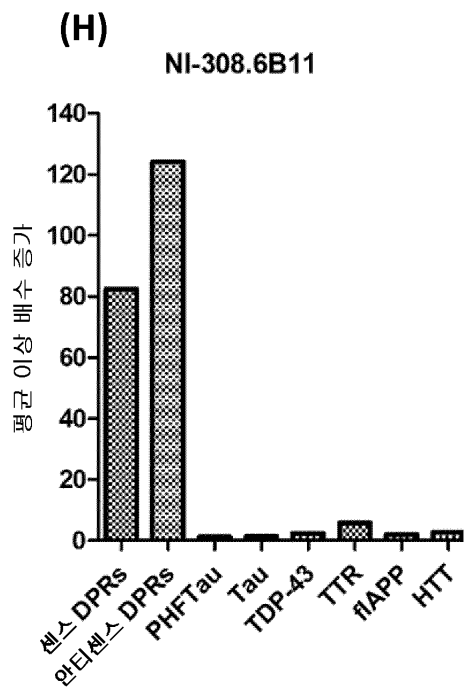
도면4f



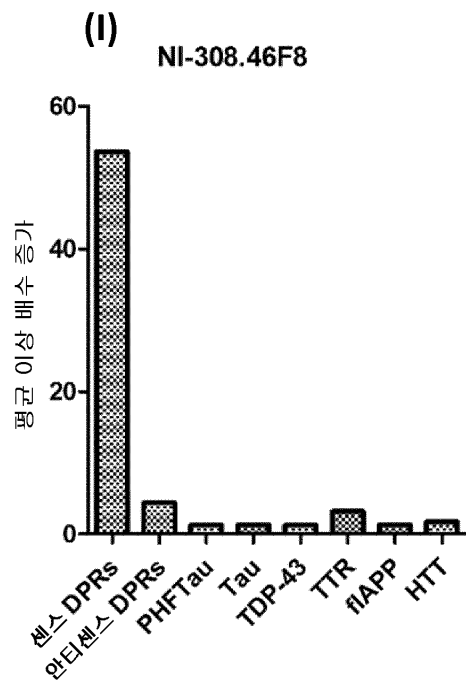
도면4g



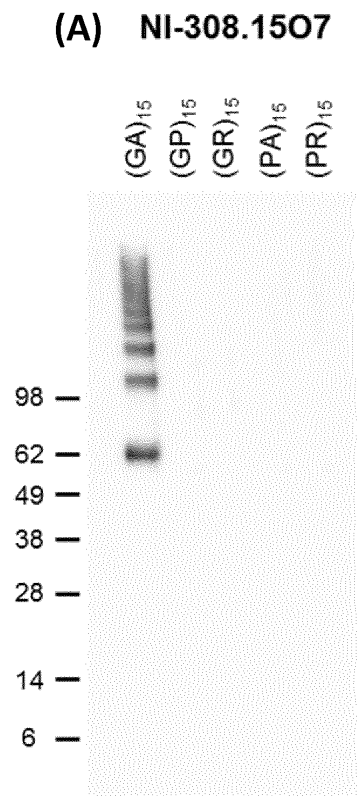
도면4h



도면4i

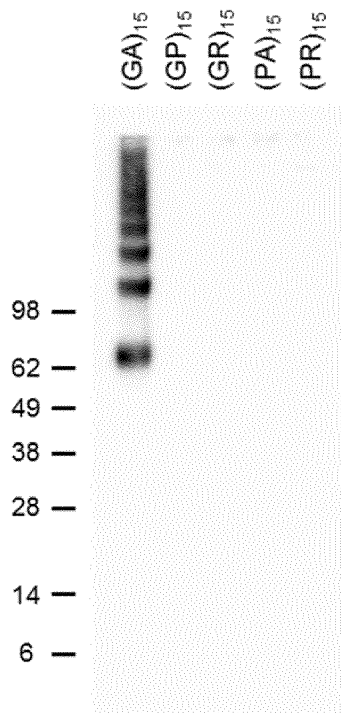


도면5a



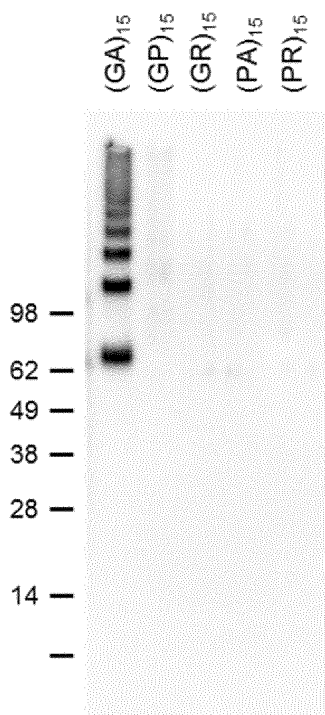
도면5b

(B) NI-308.18F7



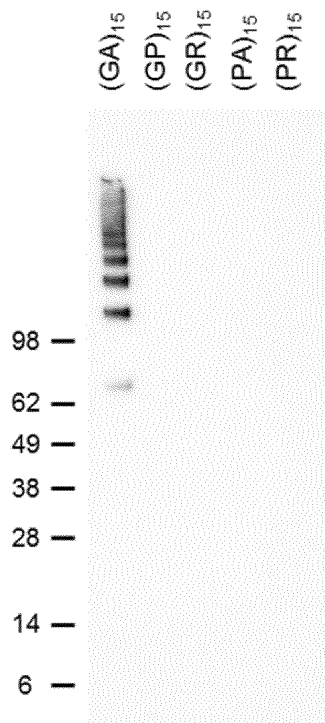
도면5c

(C) NI-308.28G1



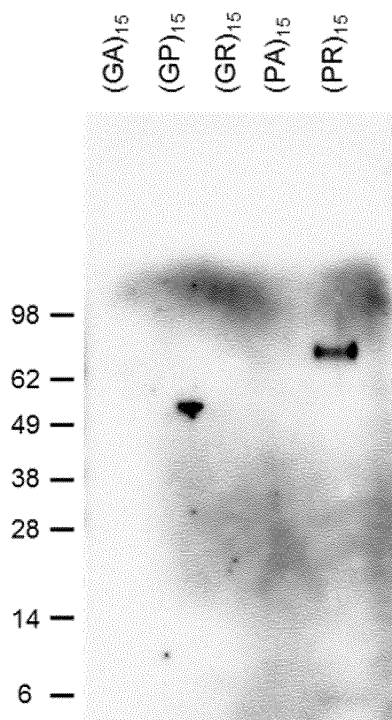
도면5d

(D) NI-308.45C2



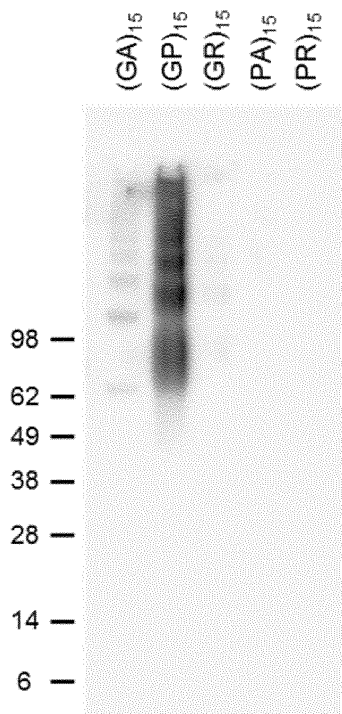
도면5e

(E) NI-308.24E11



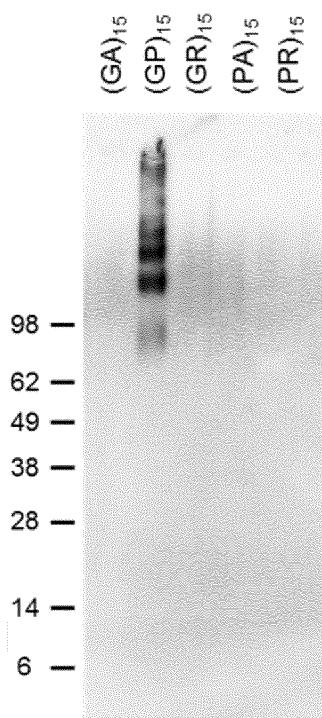
도면5f

(F) NI-308.5G2



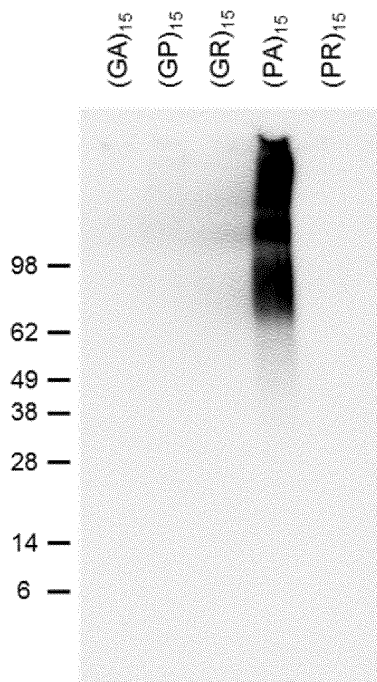
도면5g

(G) NI-308.46E9



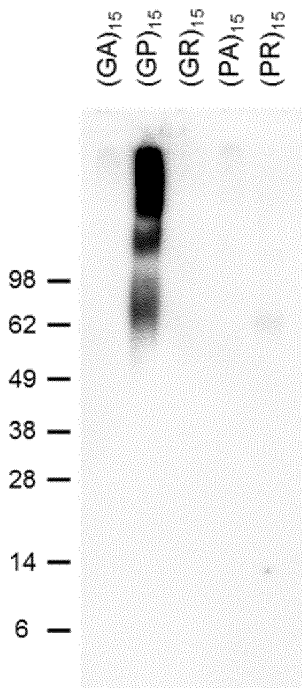
도면5h

(H) NI-308.4M1



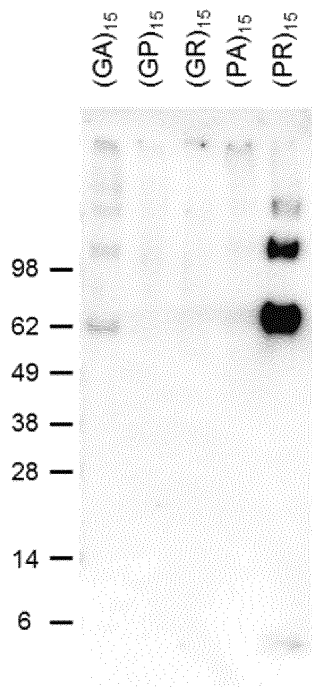
도면5i

(I) NI-308.12A3



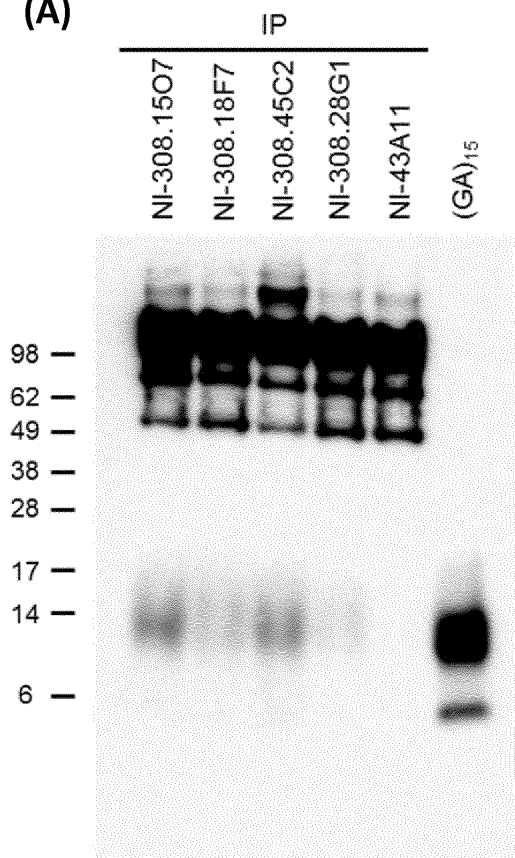
도면5j

(J) NI-308.16C10

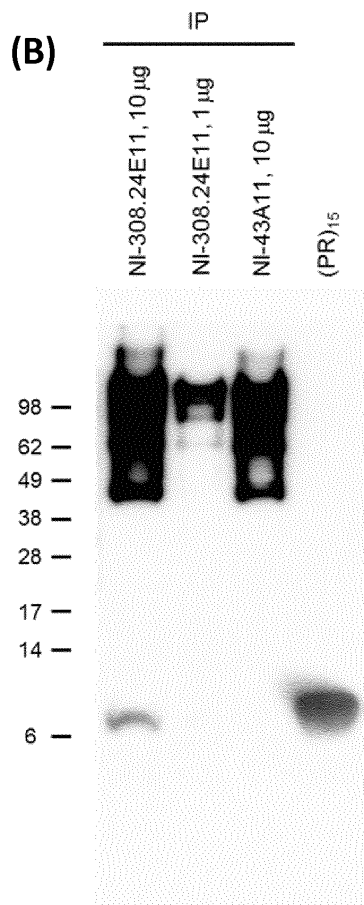


도면6a

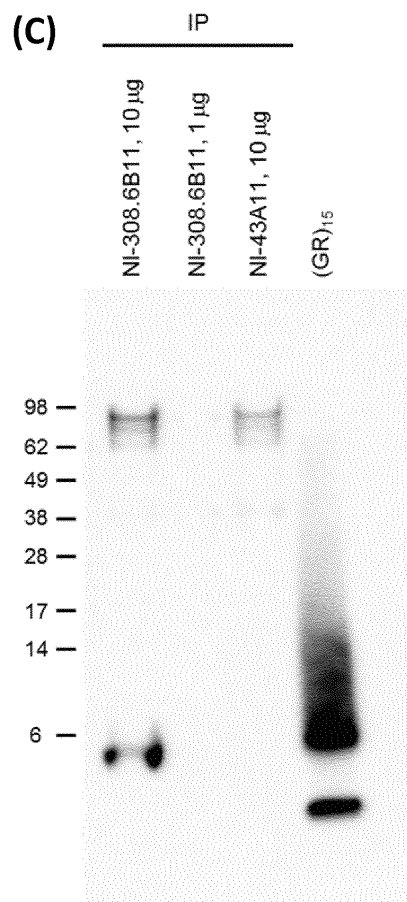
(A)



도면6b



도면6c



도면7a

(A)

항체	EC ₅₀ [nM]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.15O7	-	-	-	>150	7.9	0.37	0.54
NI-308.18F7	-	-	-	-	>200	0.78	0.83
NI-308.28G1	-	-	-	>200	6.3	0.9	1.1
NI-308.45C2	-	-	-	-	>200	7.6	9.6
NI-308.6B11	-	-	-	-	>200	27.7	33.6
NI-308.5G2	-	-	-	-	>200	5.7	18.2

도면7b

(B)

항체	EC ₅₀ [nM]						
	(GP) ₂	(GP) ₃	(GP) ₄	(GP) ₅	(GP) ₆	(GP) ₁₀	(GP) ₂₀
NI-308.5G2	-	-	-	>200	26.8	0.94	0.47
NI-308.46E9	-	-	-	-	-	63.3	15.5

도면7c

(C)

항체	EC ₅₀ [nM]						
	(GR) ₂	(GR) ₃	(GR) ₄	(GR) ₅	(GR) ₆	(GR) ₁₀	(GR) ₂₀
NI-308.6B11	-	14.3	13.2	0.47	0.33	1.3	0.25

도면7d

(D)

항체	EC ₅₀ [nM]						
	(PR) ₂	(PR) ₃	(PR) ₄	(PR) ₅	(PR) ₆	(PR) ₁₀	(PR) ₂₀
NI-308.24E11	-	-	-	-	>200	31.7	11.3

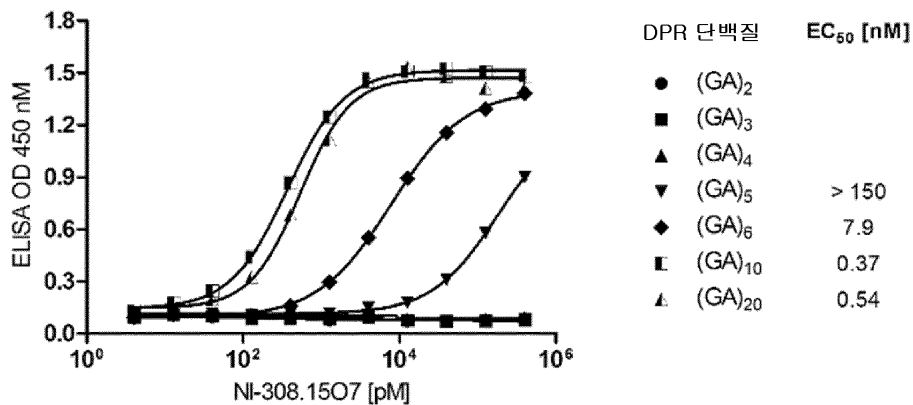
도면7e

(E)

항체	EC ₅₀ [nM]						
	(PA) ₂	(PA) ₃	(PA) ₄	(PA) ₅	(PA) ₆	(PA) ₁₀	(PA) ₂₀
NI-308.4M1	-	-	-	26.9	4.3	0.06	0.06

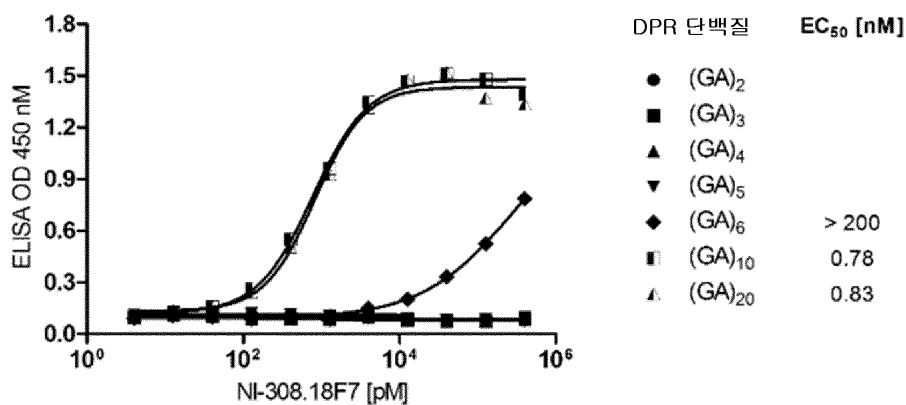
도면7f

(F) NI-308.15O7



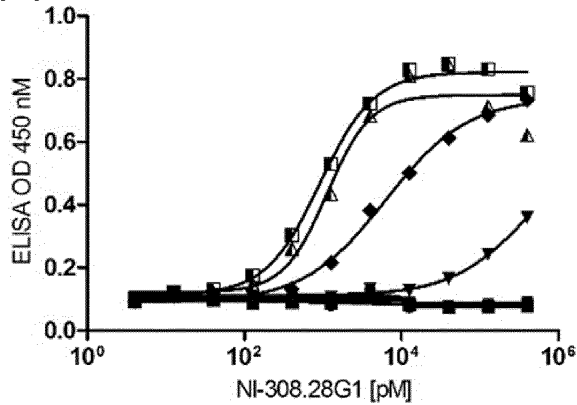
도면7g

(G) NI-308.18F7



도면7h

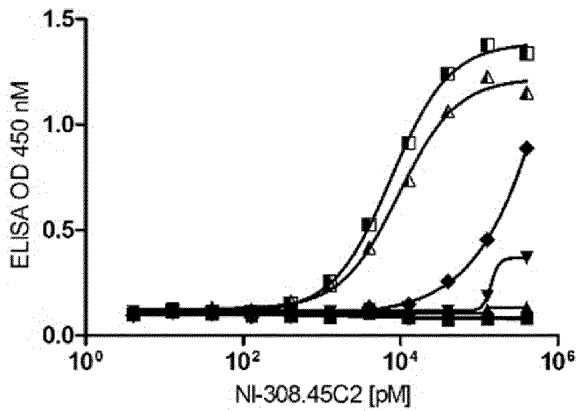
(H) NI-308.28G1



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GA) ₂	
■ (GA) ₃	
▲ (GA) ₄	
▼ (GA) ₅	>200
◆ (GA) ₆	6.3
▣ (GA) ₁₀	0.9
△ (GA) ₂₀	1.1

도면7i

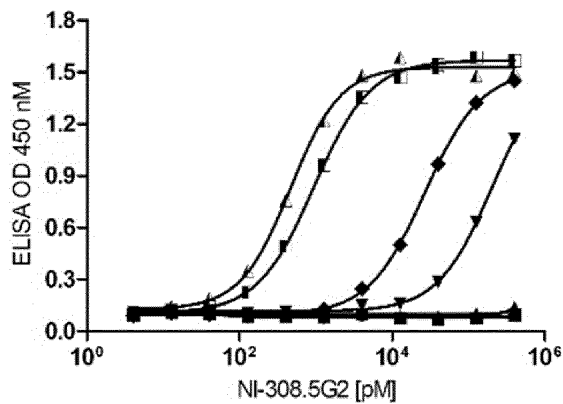
(I) NI-308.45C2



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GA) ₂	
■ (GA) ₃	
▲ (GA) ₄	
▼ (GA) ₅	
◆ (GA) ₆	>200
▣ (GA) ₁₀	7.6
△ (GA) ₂₀	9.6

도면7j

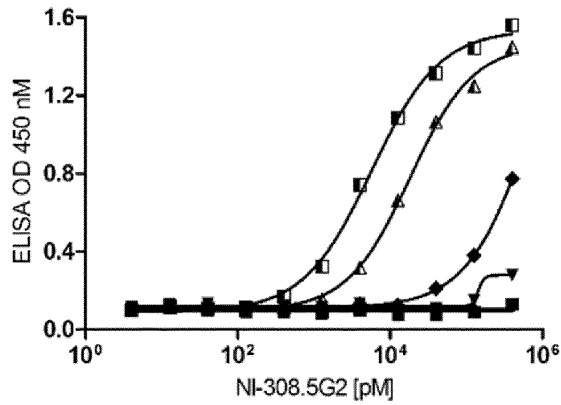
(J) NI-308.5G2



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GP) ₂	
■ (GP) ₃	
▲ (GP) ₄	
▼ (GP) ₅	> 200
◆ (GP) ₆	26.8
▣ (GP) ₁₀	0.94
△ (GP) ₂₀	0.47

도면7k

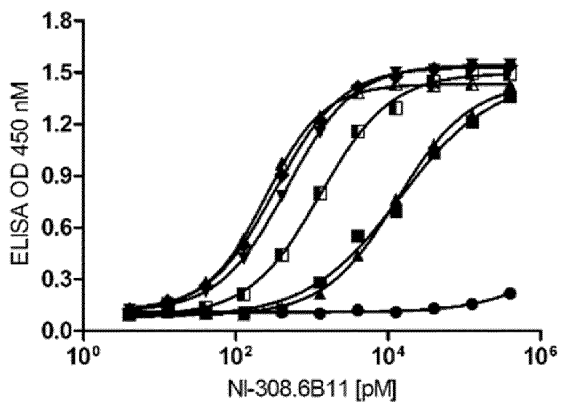
(K) NI-308.5G2



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GA) ₂	
■ (GA) ₃	
▲ (GA) ₄	
▼ (GA) ₅	
◆ (GA) ₆	>200
□ (GA) ₁₀	5.7
△ (GA) ₂₀	18.2

도면7l

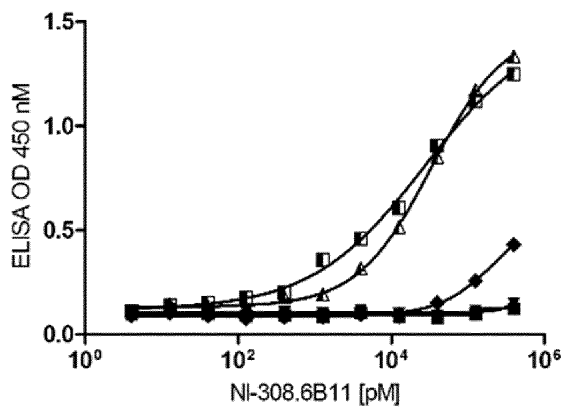
(L) NI-308.6B11



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GR) ₂	
■ (GR) ₃	14.3
▲ (GR) ₄	13.2
▼ (GR) ₅	0.47
◆ (GR) ₆	0.33
□ (GR) ₁₀	1.28
△ (GR) ₂₀	0.25

도면7m

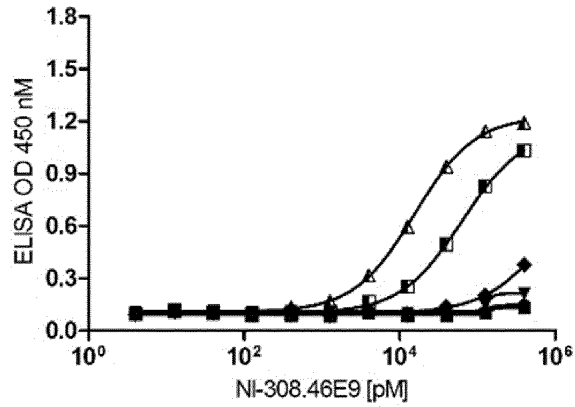
(M) NI-308.6B11



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GA) ₂	
■ (GA) ₃	
▲ (GA) ₄	
▼ (GA) ₅	
◆ (GA) ₆	>200
□ (GA) ₁₀	27.7
△ (GA) ₂₀	33.6

도면7n

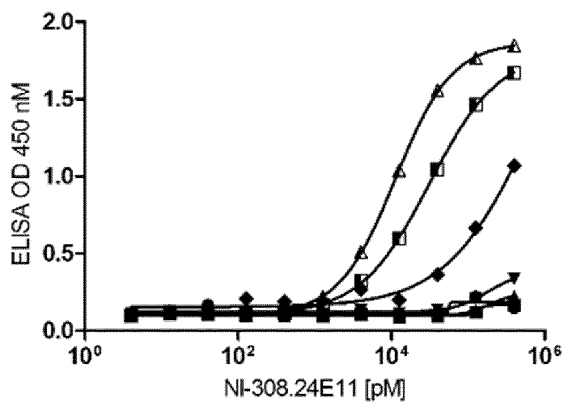
(N) NI-308.46E9



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (GP) ₂	
■ (GP) ₃	
▲ (GP) ₄	
▼ (GP) ₅	
◆ (GP) ₆	>200
▣ (GP) ₁₀	63.3
△ (GP) ₂₀	15.5

도면7o

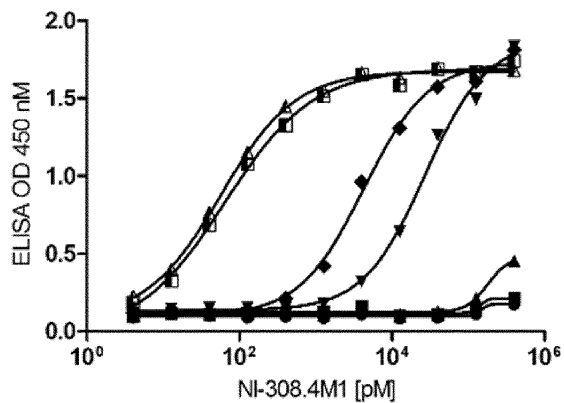
(O) NI-308.24E11



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (PR) ₂	
■ (PR) ₃	
▲ (PR) ₄	
▼ (PR) ₅	
◆ (PR) ₆	>200
▣ (PR) ₁₀	31.7
△ (PR) ₂₀	11.3

도면7p

(P) NI-308.4M1



DPR 단백질	EC ₅₀ [nM]
● (PA) ₂	
■ (PA) ₃	
▲ (PA) ₄	
▼ (PA) ₅	26.9
◆ (PA) ₆	4.3
▣ (PA) ₁₀	0.06
△ (PA) ₂₀	0.06

도면8a

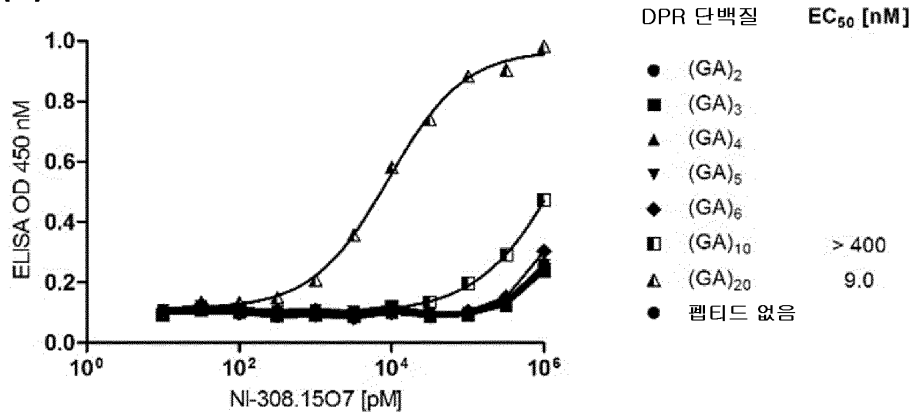
(A)	EC ₅₀ [nM]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.15O7	-	-	-	-	-	>400	9.0
NI-308.18F7	-	-	-	-	-	0.34	0.45
NI-308.28G1	-	-	-	-	-	0.46	0.40

도면8b

(B)	EC ₅₀ [nM]						
	(GA) ₂	(GA) ₃	(GA) ₄	(GA) ₅	(GA) ₆	(GA) ₁₀	(GA) ₂₀
NI-308.5G2	-	-	-	-	-	-	38.2

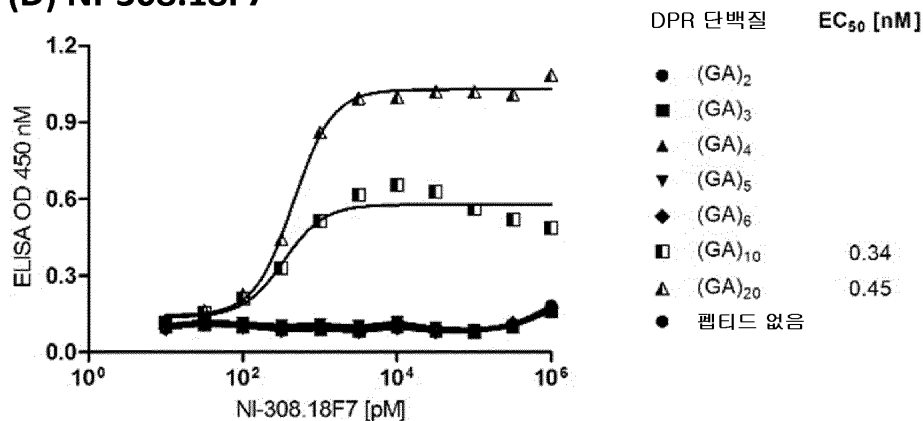
도면8c

(C) NI-308.15O7



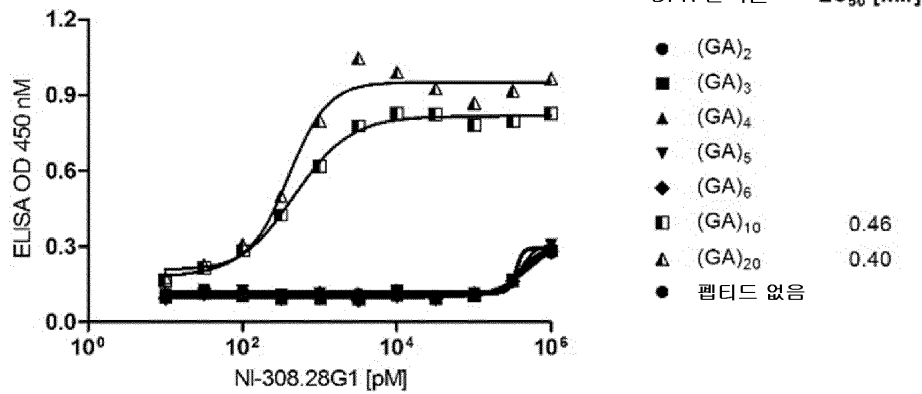
도면8d

(D) NI-308.18F7



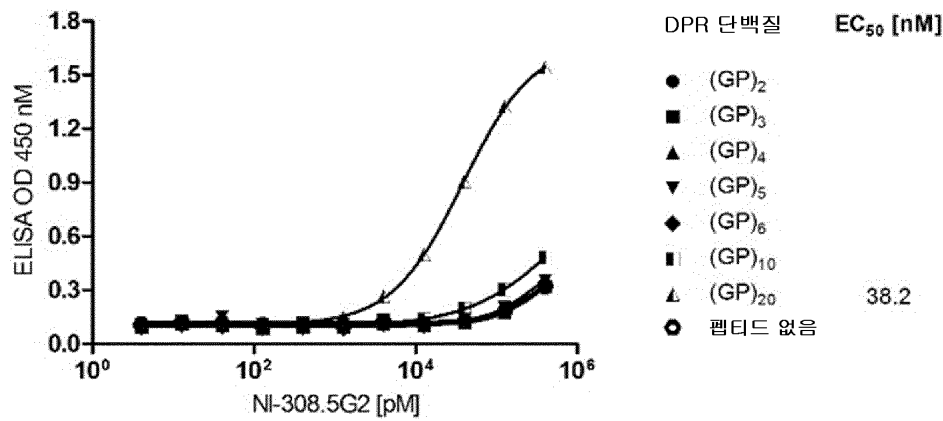
도면8e

(E) NI-308.28G1



도면8f

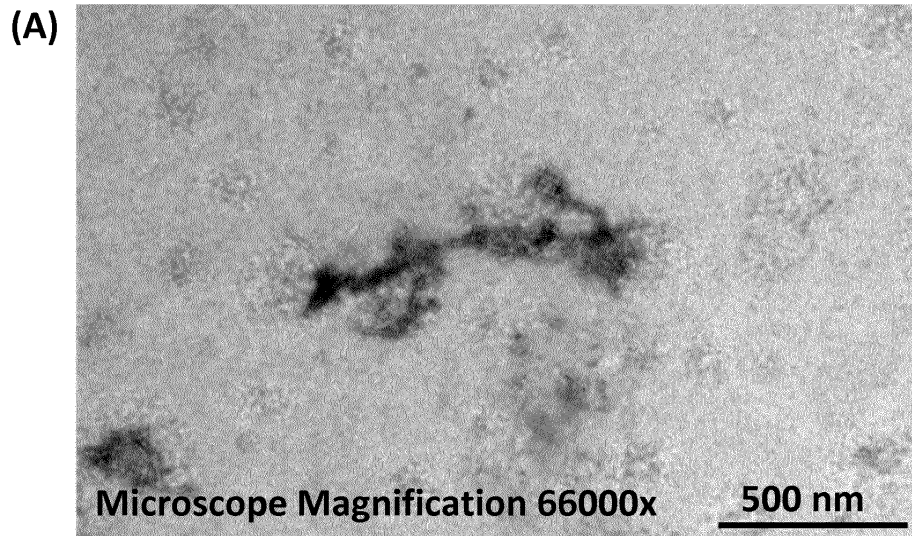
(F) NI-308.5G2



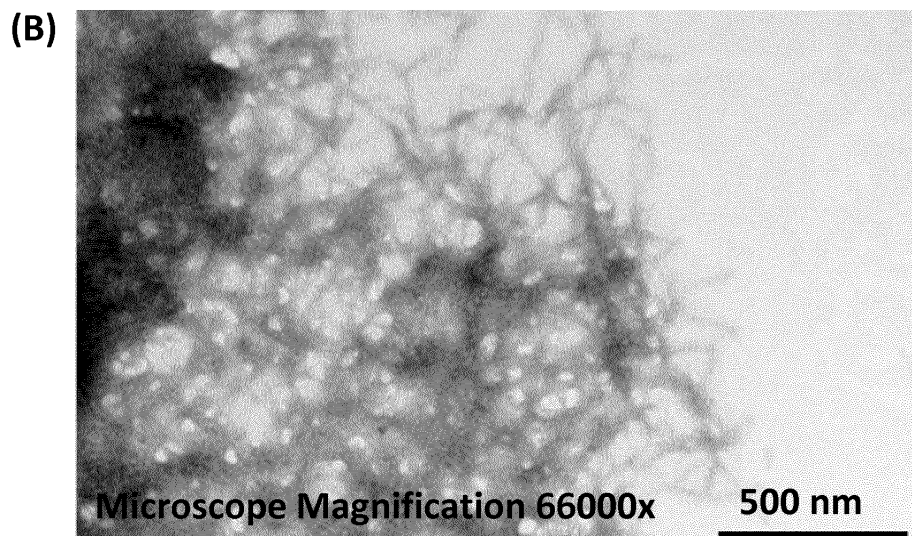
도면9

항체	EC_{50} [nM]			
	간접 ELISA		샌드위치 ELISA	
	모노머성 (GA) ₁₅	응집된 (GA) ₁₅	모노머성 (GA) ₁₅	응집된 (GA) ₁₅
NI-308.18F7	0.87	0.89	0.64	2.9
NI-308.15O7	0.53	0.78	6.3	8.1

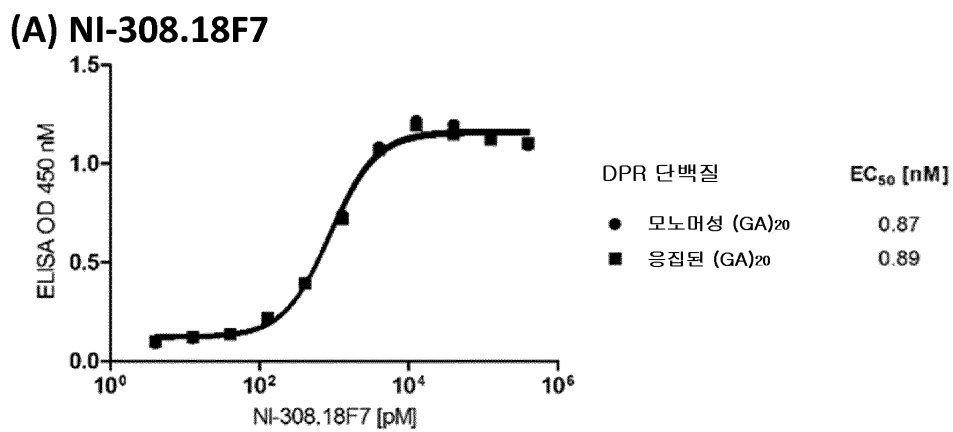
도면10a



도면10b

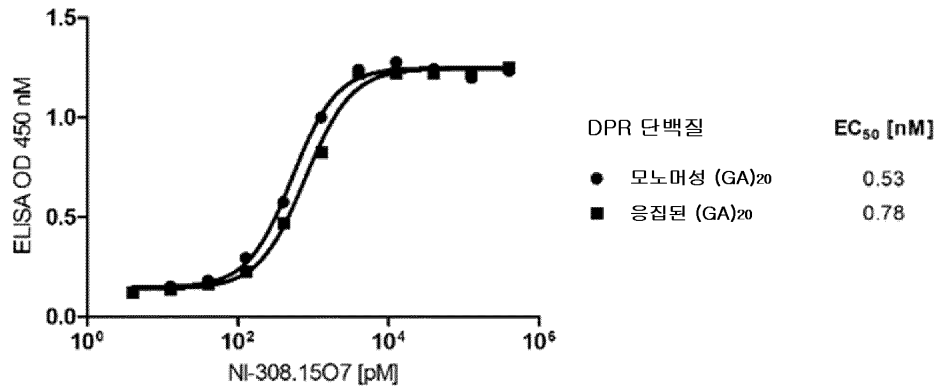


도면11a



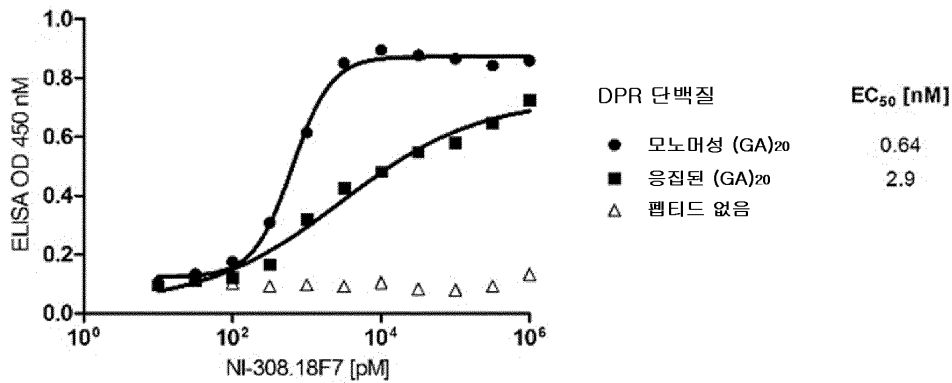
도면11b

(B) NI-308.15O7



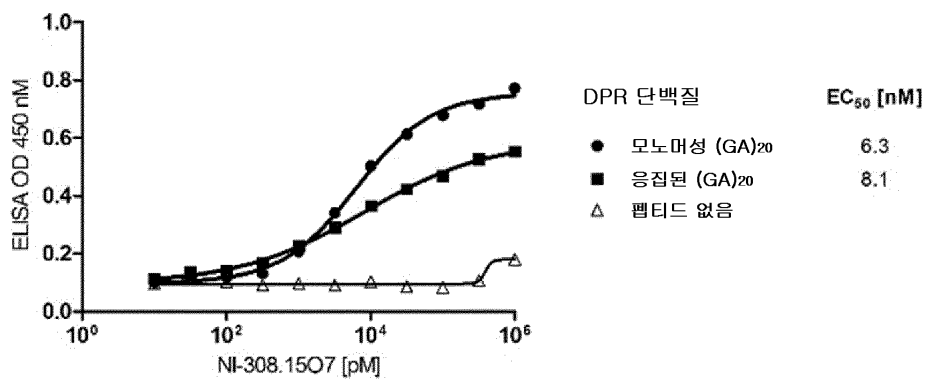
도면12a

(A) NI-308.18F7

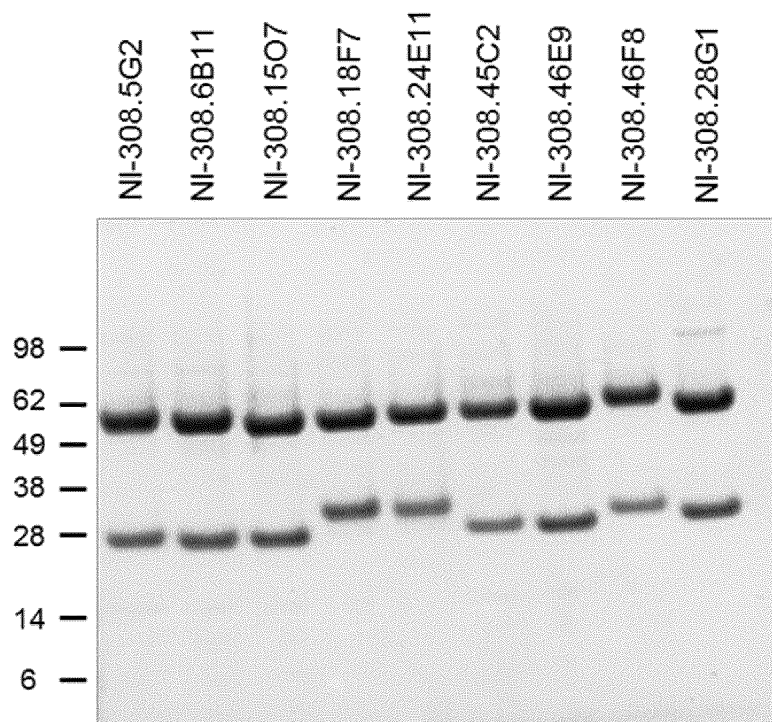


도면12b

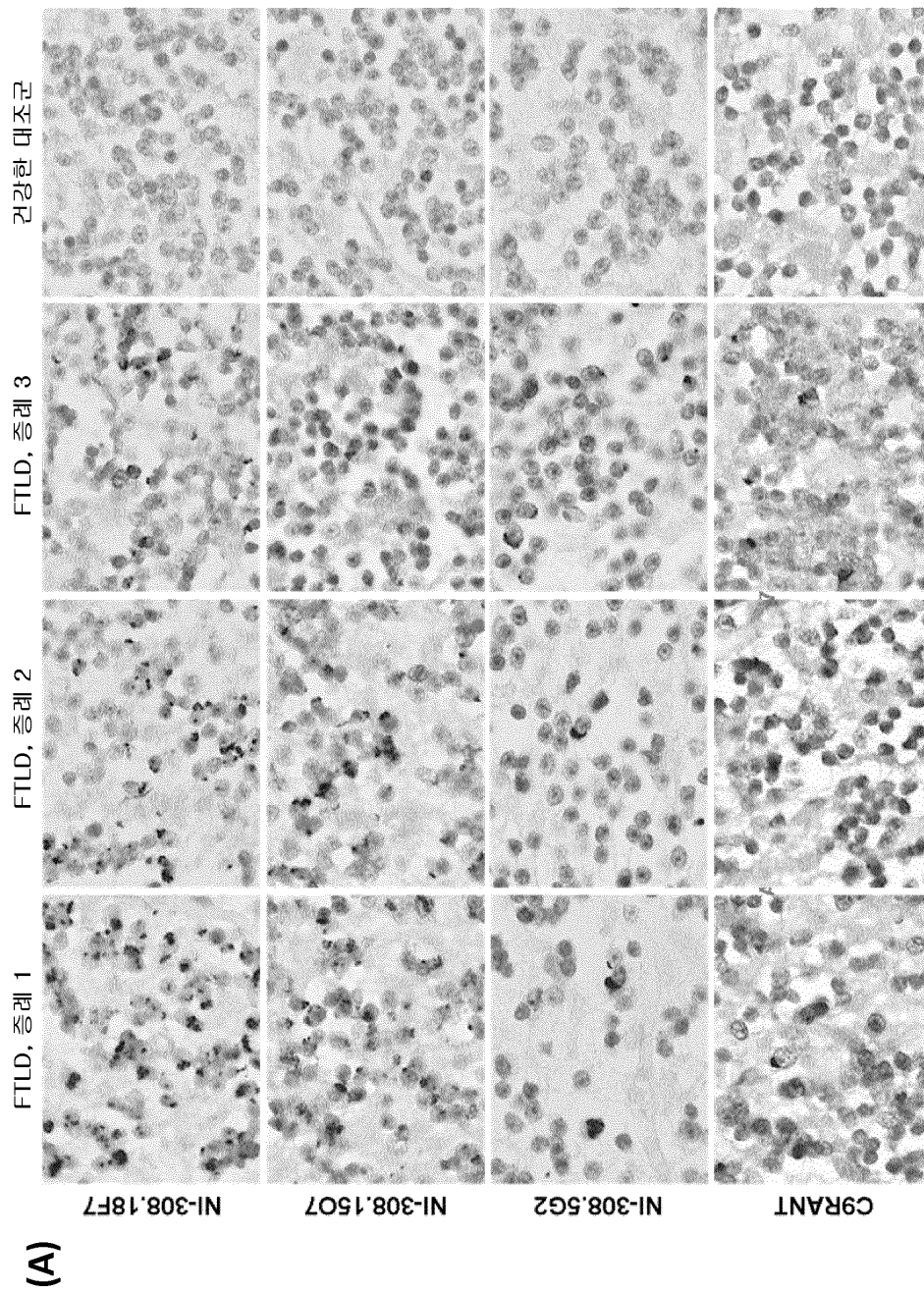
(B) NI-308.15O7



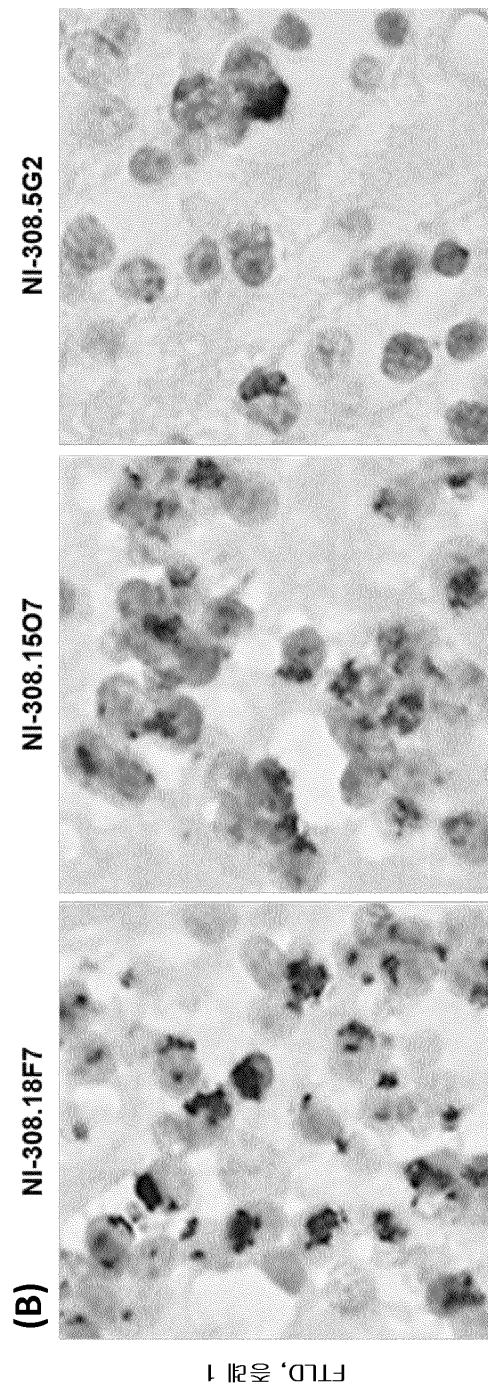
도면13



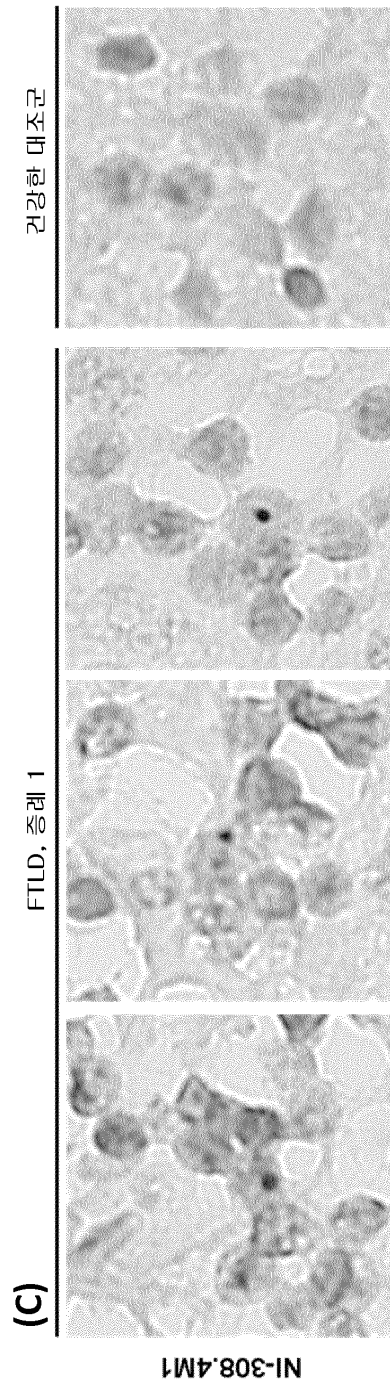
도면14a



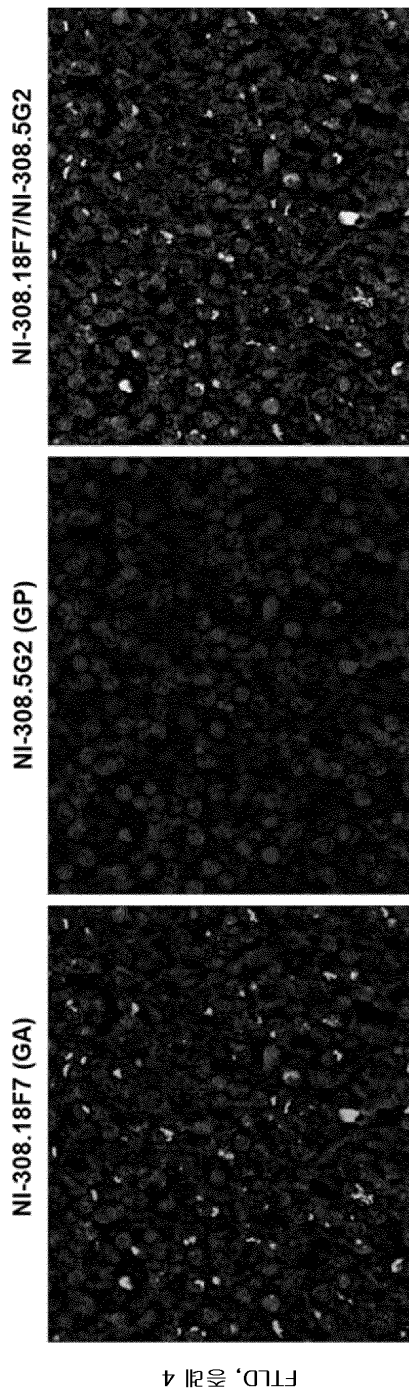
도면14b



도면14c



도면15



서열 목록

- <110> Neurimmune Holding AG
- <120> HUMAN-DERIVED ANTI-DIPEPTIDE REPEATS (DPRs) ANTIBODY
- <130> 2017-FPA-8010
- <150> EP14187180.6
- <151> 2014-09-30
- <150> EP15180310.3

<151> 2015-08-07
 <160> 86
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <223> NI-308.18F7-VH variable heavy chain (VH) sequence
 <220><221> V_region
 <222> (94)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (151)..(198)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (295)..(336)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 1

tgc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg 48

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

1 5 10 15

gag acc ctg tcc gtc acg tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc aat gat 96

Glu Thr Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Asp

20 25 30

tac tac tgg aac tgg atc cgg cag ccc gcc ggg aag gga ctg gag tgg 144

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

35 40 45

att ggg cgt ata tat gcc agt ggg acc atc aat tac aac cct tcc ctc 192

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

50 55 60

cag agt cga gtc acc atg tca att gac acg tcc aag aac cag ttc tcc 240
Gln Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
cta gac ctc atc tct gtg tcc gcc gcg gac acg gcc gtc tac tat tgt 288
Leu Asp Leu Ile Ser Val Ser Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga tgg ggc cag gtg gtc ggg gac tac tac tac ggg atg gac gtc 336

Ala Arg Trp Gly Gln Val Val Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110
tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 369
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> NI-308.18F7 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region
<222> (73)..(120)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
<220><221> V_region
<222> (166)..(186)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
<220><221> V_region
<222> (283)..(300)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
<400> 3
tgc gaa att gtg ctg act cag tct cca ctc tcc ctg tcc gtc acc cct 48
Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro
1 5 10 15

gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aag tct agt cag agc ctc caa cat 96
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Gln His
 20 25 30

aca aat gga tac aat tac ttg gat tgg tac ctg ctg aag cca ggg cag 144
 Thr Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Leu Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

tct cca caa ctc cta atc ttc ttg act tct aat cgg gcc tcc ggg gtc 192

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Thr Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60

cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca aat ttt aca ctg aaa 240
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtc tat tat tgc atg gaa 288
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Glu
 85 90 95

ggt ata caa ttg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Gly Ile Gln Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> NI-308.18F7 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence
 after correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (73)..(120)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (166)..(186)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (283)..(300)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 5

tgc gac atc gtg atg acc cag tct cca ctc tcc ctg tcc gtc acc cct 48

Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro

1 5 10 15

gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aag tct agt cag agc ctc caa cat 96

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Gln His

20 25 30

aca aat gga tac aat tac ttg gat tgg tac ctg ctg aag cca ggg cag 144

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

35 40 45

tct cca caa ctc cta atc ttc ttg act tct aat cgg gcc tcc ggg gtc 192

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

50 55 60

cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca aat ttt aca ctg aaa 240

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

65 70 75 80

atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtc tat tat tgc atg gaa 288

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

85 90 95

ggt ata caa ttg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 336

Gly Ile Gln Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 7

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(372)

<223> NI-308.1507 VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(201)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (298)..(339)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 7

tgc cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gta gtc cag cct ggg 48

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

1 5 10 15

agg tcc ctg aga ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat 96

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

20 25 30

cat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg 144

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

35 40 45

gtg gca gtt ata tca tat gat ggc gag aac aca tat tat gca gac tcc 192

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

50 55 60

att gag ggc cga ttc acc att tcc aga gac aat ttc aag aac aca ctc 240

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

65 70 75 80

ttt cta caa atg tac agc ctg aca gct gat gac acg gct atg tac ttc 288

Phe Leu Gln Met Tyr Ser Leu Thr Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe

85 90 95

tgt gcg aga ggg ggc cgt cgg ggg cac ttc acc tca tac tac ctt gac 336

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

100 105 110

tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.1507 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 9

tgc gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta 48

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

1 5 10 15

gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agc cag aac ata gac aag 96

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

20 25 30

tac tta aat tgg tat cag cag ata ccg ggg aaa gcc cct aag ctc ctg 144

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

35 40 45

atc tat gct gca tcg agt ttg cac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt 192

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

50 55 60

ggc agt gga tct ggg aca gat ttc tct ctc acc atc agc agt ctg caa 240

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

65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca att tac tac tgt caa cag agt tac agt tcc ttc 288

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

85 90 95

cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa 324

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.1507 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence
after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 11

tgc gac atc cag atg acc cag tct ccg tcc tcc ctg tct gca tct gta 48

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

1 5 10 15

gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agc cag aac ata gac aag 96

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

20 25 30
tac tta aat tgg tat cag cag ata ccg ggg aaa gcc cct aag ctc ctg 144

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
atc tat gct gca tcg agt ttg cac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt 192

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
ggc agt gga tct ggg aca gat ttc tct ctc acc atc agc agt ctg caa 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca att tac tac tgt caa cag agt tac agt tcc ttc 288
Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Phe
85 90 95

cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 324
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS

<222> (1)..(372)
<223> NI-308.5G2-VH variable heavy chain (VH) sequence
<220><221> V_region
<222> (79)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
<220><221> V_region
<222> (94)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983
<220><221> V_region
<222> (151)..(201)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (298)..(339)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<400> 13

tgc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gac ttg cgg aac cct ggg 48

Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Leu Arg Asn Pro Gly

1 5 10 15

gcc tca gtg acg gtt tcc tgc acg gct tct gga tac cat ttc gct gac 96

Ala Ser Val Thr Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr His Phe Ala Asp

20 25 30

aat gct ata aac tgg ctg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg 144

Asn Ala Ile Asn Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp

35 40 45

atg ggg tgg atc aac att tac agt ggt aac aca aaa tat tca cag aac 192

Met Gly Trp Ile Asn Ile Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Asn

50 55 60

ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc aga aac aca tcc gcg agc aca gcc 240

Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asn Thr Ser Ala Ser Thr Ala

65 70 75 80

ttc atg cac ctg cgc agc ctg aga tca gaa gac acg gct gtg tat ttc 288

Phe Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

85 90 95

tgt gcg aga gac cct gat agc agt gga tat tac ttg ccc tat ttt gac 336

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

100 105 110

tac tgg ggc caa gga acc ctg gtc acc gtc tcc tgc 372

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(342)

<223> NI-308.5G2 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(123)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (169)..(189)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (286)..(312)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 15

tgc gac atc cag ttg acc cag tct cca gac tcc ctg act ttg tct ctg 48

Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Leu Ser Leu

1 5 10 15

ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt ttc tac 96

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Tyr

20 25 30

aac tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tat cag cag aaa cca gga 144

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

35 40 45

cag cct cct aag ttg ctc atg tac tgg gca tct acc cgg gag tcc ggg 192

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

50 55 60

gtc act gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttt act ctc 240

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

65 70 75 80

acc att acc aac ctg cag gct gaa gat gtg gca gtc tat tat tgt cag 288

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

85	90	95	
caa ttt tat agt tct cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag			336
Gln Phe Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu			
100	105	110	
atc aaa			342
Ile Lys			
<210> 17			
<211> 372			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220><221> CDS			
<222> (1)..(372)			
<223> NI-308.5G2 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after			
correction of primer induced mutations			
<220><221> V_region			
<222> (79)..(108)			
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1			
<220><221> V_region			
<			
222> (94)..(108)			
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the			
numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983			
<220><221> V_region			
<222> (151)..(201)			
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2			
<220><221> V_region			
<222> (298)..(339)			
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3			
<400> 17			
tgc cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg gct gac ttg cgg aac cct ggg			48
Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Leu Arg Asn Pro Gly			
1	5	10	15
gcc tca gtg acg gtt tcc tgc acg gct tct gga tac cat ttc gct gac			96

Ala Ser Val Thr Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr His Phe Ala Asp
20 25 30
aat gct ata aac tgg ctg cgc cag gcc ccc gga caa agg ctt gag tgg 144
Asn Ala Ile Asn Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp
35 40 45
atg ggg tgg atc aac att tac agt ggt aac aca aaa tat tca cag aac 192

Met Gly Trp Ile Asn Ile Tyr Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Asn
50 55 60
ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc aga aac aca tcc gcg agc aca gcc 240
Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Arg Asn Thr Ser Ala Ser Thr Ala
65 70 75 80
ttc atg cac ctg cgc agc ctg aga tca gaa gac acg gct gtg tat ttc 288
Phe Met His Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

tgt gcg aga gac cct gat agc agt gga tat tac ttg ccc tat ttt gac 336
Cys Ala Arg Asp Pro Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Leu Pro Tyr Phe Asp
100 105 110
tac tgg ggc caa gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS

<222> (1)..(342)
<223> NI-308.5G2 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence after
correction of primer induced mutations
<220><221> V_region
<222> (73)..(123)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
<220><221> V_region

<222> (169)..(189)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (286)..(312)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 19

tgc gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg act ttg tct ctg 48

Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Leu Ser Leu

1 5 10 15

ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt ttc tac 96

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Tyr

20 25 30

aac tcc aac aat aag aac tac tta gct tgg tat cag cag aaa cca gga 144

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

35 40 45

cag cct cct aag ttg ctc atg tac tgg gca tct acc cgg gag tcc ggg 192

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

50 55 60

gtc act gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttt act ctc 240

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

65 70 75 80

acc att acc aac ctg cag gct gaa gat gtg gca gtc tat tat tgt cag 288

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

85 90 95

caa ttt tat agt tct cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag 336

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

100 105 110

atc aaa 342

Ile Lys

<210> 21

<211> 369

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(369)

<223> NI-308.28G1-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region

<222> (79)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region

<222> (151)..(198)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (295)..(336)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 21

tgc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca aga ctg gtg aag ccc tgc	48
Cys Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser	
1 5 10 15	
gag acc ctg tgc ctc acg tgc act gtc gct ggc ggc tcc gtc aat agt	96
Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ala Gly Gly Ser Val Asn Ser	
20 25 30	
tac tat tgg acc tgg atc cag cag tcc ccc ggg aag gga ctg gag tgg	144
Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Gln Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
ctt ggg cgt atc tat atc gct ggg agg acc aac tat aac ccc tcc ctc	192
Leu Gly Arg Ile Tyr Ile Ala Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu	
50 55 60	
acg agt cga atc gcc ctg tca gtg gac acg tcc agg aac cag ttg tcc	240

Thr Ser Arg Ile Ala Leu Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Leu Ser
65 70 75 80
ctg aag ctg acg tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc ata tat tat tgt 288
Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga tgg gga gcg gag agt ggt gac tac tac tat gga gtg gac gtc 336
Ala Arg Trp Gly Ala Glu Ser Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val
100 105 110

tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 369
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 23
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(339)
<223> NI-308.28G1 VK variable light-kappa chain (VK) sequence
<220><221> V_region
<222> (73)..(120)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
<220><221> V_region

<222> (166)..(186)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
<220><221> V_region
<222> (283)..(309)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
<400> 23
tgc gaa att gtg atg acg cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct 48
Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15
gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aag tct agt gag gga ctc ctg cat 96

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Glu Gly Leu Leu His

20	25	30	
agt aat ggt tac acc tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag			144
Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln			
35	40	45	
gct ccg cag ctc ctg atc ttt ctg gct tct aat cgg gcc gcc ggg gtc			192
Ala Pro Gln Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Arg Ala Ala Gly Val			
50	55	60	
cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aag			240

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	
65	70
atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggc gtt tat tac tgc atg cag	288
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln	
85	90
gct ata caa agt cct tgg acg ttc ggc cca ggg acc aag gtg gaa atc	336
Ala Ile Gln Ser Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile	
100	105
	110

aaa 339

Lys

<210> 25
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(369)
 <223> NI-308.28G1 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
 correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (79)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
 <220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region

<222> (151)..(198)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (295)..(336)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 25

tgc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca aga ctg gtg aag ccc tgc 48

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

1 5 10 15

gag acc ctg tgc ctc acg tgc act gtc gct ggc ggc tcc gtc aat agt 96

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ala Gly Gly Ser Val Asn Ser

20 25 30

tac tat tgg acc tgg atc cag cag tcc ccc ggg aag gga ctg gag tgg 144

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

35 40 45

ctt ggg cgt atc tat atc gct ggg agg acc aac tat aac ccc tcc etc 192

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

50 55 60

acg agt cga atc gcc ctg tca gtg gac acg tcc agg aac cag ttg tcc 240

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

65 70 75 80

ctg aag ctg acg tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc ata tat tat tgt 288

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

85 90 95

gcg aga tgg gga gcg gag agt ggt gac tac tac tat gga gtg gac gtc 336

Ala Arg Trp Gly Ala Glu Ser Gly Asp Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val

100 105 110

tgg ggc cca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 369

Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(339)

<223> NI-308.28G1 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence
after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region

<222> (73)..(120)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (166)..(186)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (283)..(309)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 27

tgc gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct 48

Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro

1 5 10 15

gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aag tct agt gag gga ctc ctg cat 96

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Glu Gly Leu Leu His

20 25 30

agt aat ggt tac acc tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag 144

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

35 40 45

gct ccg cag ctc ctg atc ttt ctg gct tct aat cgg gcc gcc ggg gtc 192

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

50 55 60

cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aag 240
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggc gtt tat tac tgc atg cag 288

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 gct ata caa agt cct tgg acg ttc ggc cca ggg acc aag gtg gaa atc 336
 Ala Ile Gln Ser Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

aaa 339

Lys

<210> 29

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(387)

<223> NI-308.45C2-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region

<222> (79)..(114)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (94)..(114)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
 numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region

<222> (157)..(210)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (307)..(354)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 29

tgc cag ctg cag ctg cag gag tcg ggt cca gga ctg gtg aag ccc tcg	48
Cys Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser	
1 5 10 15	
cag atc ctc tca ctc acc tgt gcc atc tcc ggg gac agt gtc ttc agc	96
Gln Ile Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Phe Ser	
20 25 30	
aac agt gct gct tgg aac tgg atc agg cag tcc cca tcg aga ggc ctt	144
Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu	
35 40 45	
gag tgg ctg gga agg aca tac tac agg tcc aag tgg gat aat gat tat	192
Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asp Asn Asp Tyr	
50 55 60	
gca cca tct gtg aaa agt cga ata agt atc aac cca gac aca tcc aag	240
Ala Pro Ser Val Lys Ser Arg Ile Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys	
65 70 75 80	
aac cag ttc tcc ctg cag ttg aat tct gtg act ccc gag gac acg gct	288
Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala	
85 90 95	
gtg tat tat tgt gca aga gag gtc gca tat tgt ggt ggt gac tgc tat	336
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Ala Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr	
100 105 110	
tct gtt tcc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc	384
Ser Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
115 120 125	
tcg	387
Ser	
<210> 31	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><221> CDS	
<222> (1)..(339)	

<223> NI-308.45C2 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(120)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (166)..(186)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (283)..(309)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 31

tgc gaa att gtg atg aca cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct 48

Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro

1 5 10 15

gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctc cag 96

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln

20 25 30

agt aat gga tac acc tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag 144

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

35 40 45

tct cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc 192

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa 240

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

65 70 75 80

atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa 288

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

85 90 95

gct cta caa act ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc 336

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

	100	105	110	
aaa				339
Lys				
<210>	33			
<211>	387			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220><221>	CDS			
<222>	(1)..(387)			
<223>	NI-308.45C2 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after			
	correction of primer induced mutations			
<220><221>	V_region			
<222>	(79)..(114)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR1			
<220><221>	V_region			
<222>	(94)..(114)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the			
	numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983			
<220><221>	V_region			
<222>	(157)..(210)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR2			
<220><221>	V_region			
<222>	(307)..(354)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR3			
<400>	33			
tgc cag ctg cag ctg cag cag tca ggt cca gga ctg gtg aag ccc tcg				48
Cys Gln Leu Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser				
1 5 10 15				
cag atc ctc tca ctc acc tgt gcc atc tcc ggg gac agt gtc ttc agc				96
Gln Ile Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Phe Ser				
20 25 30				
aac agt gct gct tgg aac tgg atc agg cag tcc cca tcg aga ggc ctt				144

Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu
35 40 45
gag tgg ctg gga agg aca tac tac agg tcc aag tgg gat aat gat tat 192
Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Asp Asn Asp Tyr
50 55 60
gca cca tct gtg aaa agt cga ata agt atc aac cca gac aca tcc aag 240
Ala Pro Ser Val Lys Ser Arg Ile Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys
65 70 75 80

aac cag ttc tcc ctg cag ttg aat tct gtg act ccc gag gac acg gct 288
Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala
85 90 95
gtg tat tat tgt gca aga gag gtc gca tat tgt ggt ggt gac tgc tat 336
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Ala Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr
100 105 110
tct gtt tcc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 384

Ser Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125
tcg 387
Ser
<210> 35
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(339)
<223> NI-308.45C2 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence
after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region
<222> (73)..(120)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
<220><221> V_region
<222> (166)..(186)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (283)..(309)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
 <400> 35
 tgc gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct 48
 Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15
 gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctc cag 96
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln
 20 25 30
 agt aat gga tac acc tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag 144
 Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 tct cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc 192
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa 240
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa 288
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 gct cta caa act ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc 336
 Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 aaa 339
 Lys
 <210> 37
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220><221> CDS
 <222> (1)..(381)
 <223> NI-308.24E11-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region
 <222> (79)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (94)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region
 <222> (151)..(189)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region
 <222> (295)..(348)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 37

tgc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg	48
Cys Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser	
1 5 10 15	
gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct act act tcc ctc aga agt	96
Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Thr Thr Ser Leu Arg Ser	
20 25 30	
tat ttc tgg agt tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg	144
Tyr Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
att ggg tat gtc tat tac agt ggg agt acc atc tac aat ccg tcc ctc	192
Ile Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu	
50 55 60	
aag aat cga gtc acc ata tcc ata gac acg tcc aag aac cag ttc tcc	240
Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser	

65	70	75	80	
ctg aac ctg cgc tct gtg acc gct gcg gat acg gcc atg tat ttc tgt				288
Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys				
	85	90	95	
gcg aga ggc gtc ccg gct gag act gat gcg cgg gac ttc ccg ccc tac				336
Ala Arg Gly Val Pro Ala Glu Thr Asp Ala Arg Asp Phe Pro Pro Tyr				
	100	105	110	
tac ttt gat cac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg				381
Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120	125	
<210>	39			
<211>	324			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220><221>	CDS			
<222>	(1)..(324)			
<223>	NI-308.24E11 VK variable light-kappa chain (VK) sequence			
<220><221>	V_region			
<222>	(73)..(105)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR1			
<220><221>	V_region			
<222>	(151)..(171)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR2			
<220><221>	V_region			
<222>	(268)..(294)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR3			
<400>	39			
tgc gac atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gcg tca gta				48
Cys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val				
	1	5	10	15
gga aac aga atc acc ttc act tgc cag gcg agt cag gac att aga tat				96
Gly Asn Arg Ile Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Tyr				

20	25	30	
tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg			144
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu			
35	40	45	
atc tac gat gtg tcc aat ttg gat aca ggg gtg cca cca agg ttc agt			192
Ile Tyr Asp Val Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser			
50	55	60	
gga agt gga tct ggg aca aat ttc act ttc acc atc agc agc ctg cag			240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln			
65	70	75	80
cct gaa gat att gca gtt tat tac tgt caa cag tat gaa gga ctc cct			288
Pro Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Gly Leu Pro			
85	90	95	
gtg acc ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa			324
Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

<210> 41

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.24E11 VK-P1MC variable light-kappa chain (VK) sequence
after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 41

tgc gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gcg tca gta 48

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

1 5 10 15

gga aac aga atc acc ttc act tgc cag gcg agt cag gac att aga tat 96

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

20 25 30

tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg 144

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

35 40 45

atc tac gat gtg tcc aat ttg gat aca ggg gtg cca cca agg ttc agt 192

Ile Tyr Asp Val Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser

50 55 60

gga agt gga tct ggg aca aat ttc act ttc acc atc agc agc ctg cag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

cct gaa gat att gca gtt tat tac tgt caa cag tat gaa gga ctc cct 288

Pro Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Gly Leu Pro

85 90 95

gtg acc ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa 324

Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 43

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(372)

<223> NI-308.46E9-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region

<222> (79)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region

<222> (157)..(204)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (301)..(339)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 43

tgc cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tgc 48

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

1 5 10 15

gag acc ctg tcc ctc act tgc act gtc tct ggt gcc tcc atc agc ggt 96

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

20 25 30

agt acc tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg 144

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

35 40 45

gag tat att ggg aga atc tac tat agt ggg agc acc tac tac aac ccg 192

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

50 55 60

tcc ctc aag agt cga gcc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag 240

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

65 70 75 80

ctc tcc ctg aca ctg agt tct gtg acc gcc gca gat acg gct gtg tat 288

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

85 90 95

tat tgt gtg aga ccc ttt tac gct ggt tgc ggg aac tcc ccc ttt gac 336

Tyr Cys Val Arg Pro Phe Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Ser Pro Phe Asp
100 105 110

tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.46E9 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 45

tgc gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc gtg tct gtg tct cca 48

Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Val Ser Val Ser Pro
1 5 10 15

ggg gag aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agc cag agt gtt agc acc 96

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr

20 25 30

aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag cct ccc agg ctc ctc 144

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu
35 40 45

att tat ggt gca tcc acc agg gcc act ggt atc cca gcc agg ttc agt 192

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggc agt ggg tct ggg gca gag ttc acc ctc acc atc agc agc ctg cag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 tct gaa gat ttt gtt gtt tat tac tgt cag caa tat aat aac tgg cct 288
 Ser Glu Asp Phe Val Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
 85 90 95
 ccg gct ttc ggc gga ggg acc aag gtg gaa atc aaa 324
 Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 47
 <211> 372
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(372)
 <223> NI-308.46E9 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
 correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (79)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
 <220><221> V_region
 <222> (94)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
 numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983
 <220><221> V_region
 <222> (157)..(204)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (301)..(339)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 47

tgc cag ctg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg 48

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

1 5 10 15

gag acc ctg tcc ctc act tgc act gtc tct ggt gcc tcc atc agc ggt 96

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

20 25 30

agt acc tac tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg 144

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

35 40 45

gag tat att ggg aga atc tac tat agt ggg agc acc tac tac aac ccg 192

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

50 55 60

tcc ctc aag agt cga gcc acc ata tct gta gac acg tcc aag aac cag 240

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

65 70 75 80

ctc tcc ctg aca ctg agt tct gtg acc gcc gca gat acg gct gtg tat 288

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

85 90 95

tat tgt gtg aga ccc ttt tac gct ggt tgc ggg aac tcc ccc ttt gac 336

Tyr Cys Val Arg Pro Phe Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Ser Pro Phe Asp

100 105 110

tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 372

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 49

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.46E9 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence

after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 49

tgc gaa ata gtg atg acg cag tct cca gcc acc gtg tct gtg tct cca 48

Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Val Ser Val Ser Pro

1 5 10 15

ggg gag aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agc cag agt gtt agc acc 96

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr

20 25 30

aac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag cct ccc agg ctc ctc 144

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

35 40 45

att tat ggt gca tcc acc agg gcc act ggt atc cca gcc agg ttc agt 192

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

ggc agt ggg tct ggg gca gag ttc acc ctc acc atc agc agc ctg cag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

65 70 75 80

tct gaa gat ttt gtt gtt tat tac tgt cag caa tat aat aac tgg cct 288

Ser Glu Asp Phe Val Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro

85 90 95

ccg gct ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 324

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

100

105

<210> 51

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(387)

<223> NI-308.6B11-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region

<222> (79)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region

<222> (151)..(201)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (298)..(354)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 51

tgc gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag agg cct ggg 48

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

1

5

10

15

gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ctc act gaa 96

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

20

25

30

tta tcc atg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt gag tgg 144

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

35

40

45

atg gga ggt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca gtc tac gca cag aag 192

Met Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys

50 55 60

ttc cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc 240

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala

65 70 75 80

tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc ttg tat cac 288

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His

85 90 95

tgt gca aca tac ggc agc agc tgg cac tgg aat gag gga aat gag ggg 336

Cys Ala Thr Tyr Gly Ser Ser Trp His Trp Asn Glu Gly Asn Glu Gly

100 105 110

tcc tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 384

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

115 120 125

tcg 387

Ser

<210> 53

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> NI-308.6B11 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(105)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (151)..(171)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(294)

<

223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 53

tgc gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta 48

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

1 5 10 15

gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag gac att agc att 96

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

20 25 30

tat tta aat tgg tat cag caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg 144

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

35 40 45

atc tac gat gca tcc aat ttg gaa aca ggg gtc cca tca agg ttc agt 192

Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

50 55 60

gga agt gga tct ggg aca gat ttt act ttc acc atc agc ggc ctg cag 240

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

65 70 75 80

cct gaa gat gtt gca aga tat tat tgt caa cag tat gat gat ctc ccc 288

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

85 90 95

atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 324

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 55

<211> 387

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(387)

<223> NI-308.6B11 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
correction of primer induced mutations

<220><221> V_region
 <222> (79)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
 <220><221> V_region
 <222> (94)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
 numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983
 <220><221> V_region
 <222> (151)..(201)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region
 <222> (298)..(354)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3
 <400> 55

tgc cag gtc cag ctg gta cag tct ggg gct gag gtg aag agg cct ggg 48

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

1 5 10 15

gcc tca gtg aag gtc tcc tgc aag gtt tcc gga tac acc ctc act gaa 96

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

20 25 30

tta tcc atg cac tgg gtg cga cag gct cct gga aaa ggg ctt gag tgg 144

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

35 40 45

atg gga ggt ttt gat cct gaa gat ggt gaa aca gtc tac gca cag aag 192

Met Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Val Tyr Ala Gln Lys

50 55 60

ttc cag ggc aga gtc acc atg acc gag gac aca tct aca gac aca gcc 240

Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala

65 70 75 80

tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc ttg tat cac 288

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His

85 90 95

tgt gca aca tac ggc agc agc tgg cac tgg aat gag gga aat gag ggg 336
Cys Ala Thr Tyr Gly Ser Ser Trp His Trp Asn Glu Gly Asn Glu Gly
100 105 110

tcc tac tac ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 384
Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

tcg 387
Ser

<210> 57
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(378)
<223> NI-308.46F8-VH variable heavy chain (VH) sequence

<220><221> V_region
<222> (79)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
<220><221> V_region
<222> (94)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983

<220><221> V_region
<222> (151)..(201)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
<220><221> V_region
<222> (298)..(345)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 57
tgc cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct ggg 48
Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt aca gcc tct gga ttc acg ttt gat gaa 96
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu
 20 25 30
 tat ggc atg agc tgg gtc cgc caa gtt cca ggg aag ggg ctg gag tgg 144
 Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 gtc tct ggc att aat tgg aat gga gca acc aca cgt tat gca gac tct 192
 Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Ala Thr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctc 240
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 tat ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gcc ttg tat cac 288
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His
 85 90 95
 tgt gcg aga gat ggg tgt agg aat acc agc tgc tat atc tgg gac tgg 336
 Cys Ala Arg Asp Gly Cys Arg Asn Thr Ser Cys Tyr Ile Trp Asp Trp
 100 105 110
 ttc gat ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 378
 Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 59
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(333)
 <223> NI-308.46F8 VK variable light-lambda chain (VL) sequence
 <220><221> V_region
 <222> (70)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VL-CDR1
 <220><221> V_region

<222> (154)..(174)

<223> complementarity determining region (CDR) VL-CDR2

<220><221> V_region

<222> (271)..(303)

<223> complementarity determining region (CDR) VL-CDR3

<400> 59

tgc cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga 48

Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly

1 5 10 15

cag aag gtc acc atc tcc tgc tct gga agc agc tcc aac att gga aat 96

Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn

20 25 30

aat tat gta tgc tgg tac cag aac ctc cca gga aca gcc ccc aaa ctc 144

Asn Tyr Val Cys Trp Tyr Gln Asn Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

ctc att tat gac gat aat aag cga ccc tca ggg att cct gac cga ttc 192

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

50 55 60

tct ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc gga ctc 240

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

cag act ggg gac gag gcc gat tat tac tgc gga aca tgg gac agc agc 288

Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser

85 90 95

ctg agt gtt gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 333

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

100 105 110

<210> 61

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS
 <222> (1)..(378)
 <223> NI-308.46F8 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
 correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (79)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
 <220><221> V_region
 <222> (94)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1 according to the
 numbering conventions set forth by Kabat et al. 1983
 <220><221> V_region
 <222> (151)..(201)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (298)..(345)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3
 <400> 61
 tgc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct ggg 48
 Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt aca gcc tct gga ttc acg ttt gat gaa 96
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu
 20 25 30
 tat ggc atg agc tgg gtc cgc caa gtt cca ggg aag ggg ctg gag tgg 144
 Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 gtc tct ggc att aat tgg aat gga gca acc aca cgt tat gca gac tct 192
 Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Ala Thr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc etc 240
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu

65	70	75	80	
tat ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gcc ttg tat cac				288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His				
	85	90	95	
tgt gcg aga gat ggg tgt agg aat acc agc tgc tat atc tgg gac tgg				336
Cys Ala Arg Asp Gly Cys Arg Asn Thr Ser Cys Tyr Ile Trp Asp Trp				
	100	105	110	
ttc gat ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg				378
Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120	125	
<210>	63			
<211>	381			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<220><221>	CDS			
<222>	(1)..(381)			
<223>	NI-308.4M1-VH variable heavy chain (VH) sequence			
<220><221>	V_region			
<222>	(94)..(108)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR1			
<220><221>	V_region			
<222>	(155)..(195)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR2			
<220><221>	V_region			
<222>	(298)..(348)			
<223>	complementarity determining region (CDR) VH-CDR3			
<400>	63			
tgc gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga ggc gtg gtc cag ccg ggg				48
Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly				
1	5	10	15	
ggg tcc ctg cga ctc tcc tgt gaa gcc tct gga ttc acc atc ggc acc				96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Ile Gly Thr				

20	25	30	
tat gcc atg cac tgg gtc cgc cag ttt cca ggc aag ggc ctg gat tgg			144
Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp			
35	40	45	
gtg gca gta ata tcg ttc gat gga act act gag tac tac aca gac gcc			192
Val Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Thr Thr Glu Tyr Tyr Thr Asp Ala			
50	55	60	
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac aca ctg			240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu			
65	70	75	80
tat ctg caa atg aac tac ttg aga ggt gac gac acg gct ata tat ttc			288
Tyr Leu Gln Met Asn Tyr Leu Arg Gly Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe			
85	90	95	
tgt gcg cga gat ttc acc tcc tcg ggg gag acc ggt tcg tgg aca caa			336
Cys Ala Arg Asp Phe Thr Ser Ser Gly Glu Thr Gly Ser Trp Thr Gln			
100	105	110	
gta cct gat ctc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg			381
Val Pro Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	
<210>	65		
<211>	327		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	CDS		
<222>	(1)..(327)		
<223>	NI-308.4M1 VK variable light-kappa chain (VK) sequence		
<220><221>	V_region		
<222>	(73)..(105)		
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR1		
<220><221>	V_region		
<222>	(151)..(171)		
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR2		

<220><221> V_region

<222> (268)..(297)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 65

tgc gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ctg tct cca 48

Cys Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro

1 5 10 15

ggg gaa aga gcc acg ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt act aaa 96

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

20 25 30

tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144

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

35 40 45

atc tat gat gta tct tac agg gcc gct ggc acc cca gcc agg ttc agt 192

Ile Tyr Asp Val Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser

50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag 240

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

65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cac caa cgt agc agc tgg cct 288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro

85 90 95

ccg gtc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 327

Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 67

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(381)

<223> NI-308.4M1 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after

correction of primer induced mutations

<220><221> V_region

<222> (94)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region

<222> (155)..(195)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2

<220><221> V_region

<222> (298)..(348)

<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 67

tgc cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag ccg ggg 48

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

1 5 10 15

ggg tcc ctg cga ctc tcc tgt gaa gcc tct gga ttc acc atc ggc acc 96

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

20 25 30

tat gcc atg cac tgg gtc cgc cag ttt cca ggc aag ggc ctg gat tgg 144

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp

35 40 45

gtg gca gta ata tcg ttc gat gga act act gag tac tac aca gac gcc 192

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

50 55 60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac aca ctg 240

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

65 70 75 80

tat ctg caa atg aac tac ttg aga ggt gac gac acg gct ata tat ttc 288

Tyr Leu Gln Met Asn Tyr Leu Arg Gly Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe

85 90 95

tgt gcg cga gat ttc acc tcc tcg ggg gag acc ggt tcg tgg aca caa 336

Cys Ala Arg Asp Phe Thr Ser Ser Gly Glu Thr Gly Ser Trp Thr Gln

100	105	110	
gta cct gat ctc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg			381
Val Pro Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	
<210>	69		
<211>	327		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<220><221>	CDS		
<222>	(1)..(327)		
<223>	NI-308.4M1 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence after		
	correction of primer induced mutations		
<220><221>	V_region		
<222>	(73)..(105)		
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR1		
<220><221>	V_region		
<222>	(151)..(171)		
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR2		
<220><221>	V_region		
<222>	(268)..(297)		
<223>	complementarity determining region (CDR) VK-CDR3		
<400>	69		
tgc gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ctg tct cca			48
Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro			
1	5	10	15
ggg gaa aga gcc acg ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt act aaa			96
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Lys			
20	25	30	
tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc			144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
atc tat gat gta tct tac agg gcc gct ggc acc cca gcc agg ttc agt			192

Ile Tyr Asp Val Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80
cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cac caa cgt agc agc tgg cct 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Pro
85 90 95

ccg gtc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 327
Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 71
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS
<222> (1)..(375)
<223> NI-308.12A3-VH variable heavy chain (VH) sequence
<220><221> V_region
<222> (91)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
<220><221> V_region

<222> (151)..(208)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
<220><221> V_region
<222> (298)..(342)
<223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3
<400> 71
tgc gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga ggc ttg gta cag cct gga 48
Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
ggg tcc ctg aga ctc tcc tgc gta ggc tct gga ttt ctc ttc agt gat 96

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Leu Phe Ser Asp

20 25 30

ttt gaa atg gac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg 144

Phe Glu Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

att tca tat att agt ggt gac ggt aat atc ata tat cag aca gac tct 192

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

50 55 60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat tca ctg 240

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

65 70 75 80

ttt cta caa atg gac agc ctg acc gtc gag gac acg gct gta tat tac 288

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

85 90 95

tgt gcg aga gac gcc cgt gaa aac tgt ggt ggt gac tgc tat tcc acg 336

Cys Ala Arg Asp Ala Arg Glu Asn Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Ser Thr

100 105 110

tcc ttt gat ttt tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcctc 380

Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120 125

g 381

<210> 73

<211> 342

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(315)

<223> NI-308.12A3 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (154)..(174)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (268)..(285)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
 <400> 73
 tgc gac atc cag atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 48
 Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt ctt tta tac 96
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr
 20 25 30
 act gcc aac aat agg aac tac tta gcc tgg tac cag aaa aaa gca gga 144
 Thr Ala Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Ala Gly
 35 40 45
 cag cct cct aag ctc ctc att cac tgg gca tct acc cgg gca tcc ggg 192
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly
 50 55 60
 gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc att ctc 240
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu
 65 70 75 80
 acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat ttt tgt caa 288
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln
 85 90 95
 cat tat tat aat tct ccc cgg acg ttc ggcca agggaccaag gtggagatca 340
 His Tyr Tyr Asn Ser Pro Arg Thr Phe
 100 105
 aa 342
 <210> 75
 <211> 381
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(375)
 <223> NI-308.12A3 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
 correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (91)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (151)..(201)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (298)..(342)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3
 <400> 75

tgc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct gga 48
 Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 ggg tcc ctg aga ctc tcc tgc gta ggc tct gga ttt ctc ttc agt gat 96

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Leu Phe Ser Asp
 20 25 30
 ttt gaa atg gac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg 144
 Phe Glu Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 att tca tat att agt ggt gac ggt aat atc ata tat cag aca gac tct 192
 Ile Ser Tyr Ile Ser Gly Asp Gly Asn Ile Ile Tyr Gln Thr Asp Ser
 50 55 60

gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat tca ctg 240
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 ttt cta caa atg gac agc ctg acc gtc gag gac acg gct gta tat tac 288
 Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95
tgt gcg aga gac gcc cgt gaa aac tgt ggt ggt gac tgc tat tcc acg 336

Cys Ala Arg Asp Ala Arg Glu Asn Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Ser Thr
100 105 110
tcc ttt gat ttt tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcctc 380

Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
115 120 125
g 381

<210> 77
<211> 342
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220><221> CDS

<222> (1)..(315)
<223> NI-308.12A3 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence
after correction of primer induced mutations
<220><221> V_region
<222> (73)..(108)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
<220><221> V_region
<222> (154)..(174)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
<220><221> V_region
<222> (268)..(285)
<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
<400> 77

tgc gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg 48

Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt ctt tta tac 96
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr
20 25 30

act gcc aac aat agg aac tac tta gcc tgg tac cag aaa aaa gca gga 144
 Thr Ala Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Ala Gly
 35 40 45

cag cct cct aag ctc ctc att cac tgg gca tct acc cgg gca tcc ggg 192
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly
 50 55 60

gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc att ctc 240
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu
 65 70 75 80

acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat ttt tgt caa 288

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

cat tat tat aat tct ccc cgg acg ttc ggcca agggaccaag gtggagatca 340
 His Tyr Tyr Asn Ser Pro Arg Thr Phe
 100 105

aa 342

<210> 79
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS

<222> (1)..(375)
 <223> NI-308.16C10-VH variable heavy chain (VH) sequence
 <220><221> V_region
 <222> (91)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1
 <220><221> V_region
 <222> (151)..(201)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (298)..(342)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3

<400> 79

tgc gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg 48

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

1 5 10 15

atg tcc ctg agc ctc tcc tgt gca gcg act gga ttc acc ttc agc agt 96

Met Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser

20 25 30

tat ggc atg cac tgg gtc cgc caa ggt cca ggc aag ggg ccg gag tgg 144

Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp

35 40 45

gtg gcg ggt ata tgg tac gat gga aca aat aag tat tat gga gac tcc 192

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

50 55 60

gtg acg ggc aga gtc acc atc tcc aga gac aac tcc aag aac acg ctg 240

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

65 70 75 80

ttt ctg caa atg atc aac gtg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac 288

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

85 90 95

tgt gtg aag gat gca gag cgc gtc cag aaa tgg gct agt tac att atg 336

Cys Val Lys Asp Ala Glu Arg Val Gln Lys Trp Ala Ser Tyr Ile Met

100 105 110

gac gtg tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 375

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 81

<211> 315

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(315)

<223> NI-308.16C10 VK variable light-kappa chain (VK) sequence

<220><221> V_region

<222> (73)..(108)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1

<220><221> V_region

<222> (154)..(174)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2

<220><221> V_region

<222> (268)..(285)

<223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3

<400> 81

tgc gaa att gtg ctg act cag tct cca ggc atc ctg tct ttg tct cga 48

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

1 5 10 15

ggg aat cgg gtc gcc ctc tcc tgc agg gcc agt cgg agt gtt aat agc 96

Gly Asn Arg Val Ala Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Asn Ser

20 25 30

agc tac tta aat tgg tac cag caa aaa cca ggc cag gct ccc aga ctc 144

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

35 40 45

ctc atc tat ggt gca tct aaa agg gcc act ggc atc tca gac agg ttc 192

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

50 55 60

cgt ggc act ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc gtc gcc aga ctg 240

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

65 70 75 80

gag cct gaa gat att gcg gtt tac tac tgt cag cac tat ggt gcc ttc 288

Glu Pro Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ala Phe

85 90 95

ggc caa ggg acc aag ctg gag atc aaa 315

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 83
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(375)
 <223> NI-308.16C10 VH-PIMC variable heavy chain (VH) sequence after
 correction of primer induced mutations
 <220><221> V_region
 <222> (91)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR1

<220><221> V_region
 <222> (151)..(201)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (298)..(342)
 <223> complementarity determining region (CDR) VH-CDR3
 <400> 83

tgc cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg 48

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

1 5 10 15

atg tcc ctg agc ctc tcc tgt gca gcg act gga ttc acc ttc agc agt 96

Met Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ser

20 25 30

tat ggc atg cac tgg gtc cgc caa ggt cca ggc aag ggg ccg gag tgg 144

Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp

35 40 45

gtg gcg ggt ata tgg tac gat gga aca aat aag tat tat gga gac tcc 192

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

50 55 60

gtg acg ggc aga gtc acc atc tcc aga gac aac tcc aag aac acg ctg 240

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

65 70 75 80
 ttt ctg caa atg atc aac gtg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac 288
 Phe Leu Gln Met Ile Asn Val Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95
 tgt gtg aag gat gca gag cgc gtc cag aaa tgg gct agt tac att atg 336

Cys Val Lys Asp Ala Glu Arg Val Gln Lys Trp Ala Ser Tyr Ile Met
 100 105 110
 gac gtg tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 375
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125
 <210> 85
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(315)
 <223> NI-308.16C10 VK-PIMC variable light-kappa chain (VK) sequence

after correction of primer induced mutations

<220><221> V_region
 <222> (73)..(108)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR1
 <220><221> V_region
 <222> (154)..(174)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR2
 <220><221> V_region
 <222> (268)..(285)
 <223> complementarity determining region (CDR) VK-CDR3
 <400> 85

tgc gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cga 48
 Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Arg

1 5 10 15
 ggg aat cgg gtc gcc ctc tcc tgc agg gcc agt cgg agt gtt aat agc 96

Gly Asn Arg Val Ala Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Asn Ser	
20 25 30	
agc tac tta aat tgg tac cag caa aaa cca ggc cag gct ccc aga ctc	144
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu	
35 40 45	
ctc atc tat ggt gca tct aaa agg gcc act ggc atc tca gac agg ttc	192
Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe	
50 55 60	
cgt ggc act ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc gtc gcc aga ctg	240
Arg Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ala Arg Leu	
65 70 75 80	
gag cct gaa gat att gcg gtt tac tac tgt cag cac tat ggt gcc ttc	288
Glu Pro Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Ala Phe	
85 90 95	
ggc caa ggc acc aag gtg gaa atc aaa	315
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	