



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0128707
 (43) 공개일자 2015년11월18일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/48</i> (2006.01) <i>C07K 16/28</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/395</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/3955</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7024799</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년09월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026588</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/151866
 국제공개일자 2014년09월25일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/789,475 2013년03월15일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자
 프렌치, 도로시
 미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 마이클 코
 트 23
 헌트지커, 에릭
 미국 94560 캘리포니아주 뉴어크 칼라이스 플레이
 스 7195
 시벨, 크리스티안 더블유.
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
 엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 이귀동</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 291 항

(54) 발명의 명칭 **간암의 진단 및 치료를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 Notch 신호전달 억제제를 사용하여 간암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 간암의 치료를 위한 조성물 및 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/48561 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/567 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

간암의 치료를 필요로 하는 개체에 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 간암이 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제가 항체, siRNA 및 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 항체가 Notch2 이외의 Notch 패밀리 구성원에는 유의하게 결합하지 않는 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 항체가 마우스 Notch2 NRR 및 인간 Notch2 NRR에 결합하는 것인 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 항체가 Notch2 NRR에 ≤ 10 nM의 Kd로 결합하는 것인 방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제3항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

(e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

(f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 도 18의 huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 도 18의 huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 도 19의 huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 도 19의 huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제3항에 있어서, 항체가

(a) 서열 93의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열;

(b) 서열 96의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

(c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열

을 포함하는, Jag1에 결합하는 단리된 항체인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 항체가 서열 93의 VH 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 항체가 서열 96의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 항체가 서열 93의 VH 서열 및 서열 96의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제3항에 있어서, 항체가

(a) 서열 94의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열;

(b) 서열 97의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

(c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열

을 포함하는, Jag1에 결합하는 단리된 항체인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 항체가 서열 94의 VH 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 항체가 서열 97의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 항체가 서열 94의 VH 서열 및 서열 97의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제3항에 있어서, 항체가

(a) 서열 95의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열;

(b) 서열 98의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는

(c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열

을 포함하는, Jag1에 결합하는 단리된 항체인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 항체가 서열 95의 VH 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 항체가 서열 98의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 항체가 서열 95의 VH 서열 및 서열 98의 VL 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 전장 IgG1 또는 IgG2a 항체인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 39

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 암 세포 사멸을 유발하는 것인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 화학요법제인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 추가의 치료제가 항체인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 EpCAM, AFP, Notch2, Jag1, Sox9, CK19, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glu1 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 간암이 핵 Notch2를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 간암이 활성화 Ras를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 간암이 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하고, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 세포에서 EpCAM 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 간암이 AFP를 발현하는 세포를 포함하고, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 세포에서 AFP 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 50

제45항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이, 억제제를 투여하기 전의 발현과 비교하여, 간암에서 Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 51

제45항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성하는 것인 방법.

청구항 52

간암을 가질 위험이 있는 개체에 유효량의 항-Jag1 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 예방하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 56

제52항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 57

제52항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 58

제52항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 59

제52항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 60

제52항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 61

제52항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 62

제52항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제52항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 추가의 치료제가 항체인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 추가의 치료제가 항-Notch2 길항제 항체인 방법.

청구항 69

제 항에 있어서, 개체가 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식 증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는 것인 방법.

청구항 70

분비된 인단백질1 (SPP1)을 발현하는 간암 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시켜 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암 세포에서 SPP1 발현을 감소시키는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암 세포에서 SPP1 발현을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 감소시키는 것인 방법.

청구항 73

제70항에 있어서, 발현이 폴리머라제 연쇄 반응 분석을 사용하여 결정되는 것인 방법.

청구항 74

제70항에 있어서, SPP1 단백질이 도 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제70항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제가 Notch2 및 Jag1로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질에 결합하는 항체인 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제75항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제80항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 85

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 86

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 87

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 88

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 90

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 91

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 92

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 세포 사멸을 유도하는 것인 방법.

청구항 93

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 EpCAM을 발현하는 것인 방법.

청구항 94

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 AFP를 발현하는 것인 방법.

청구항 95

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 AFP 및 EpCAM을 발현하는 것인 방법.

청구항 96

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 Notch2를 발현하는 것인 방법.

청구항 97

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 Jag1을 발현하는 것인 방법.

청구항 98

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 Notch2 및 Jag1을 발현하는 것인 방법.

청구항 99

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 핵 Notch2를 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 간암 세포가 활성화 Ras를 포함하는 것인 방법.

청구항 101

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 항체와 접촉시키는 것이 세포에 의한 EpCAM, AFP, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 102

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 항체와 접촉시키는 것이 세포에 의한 Wnt2, Axin2 및 Glu1

중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성하는 것인 방법.

청구항 103

제70항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 개체 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 104

도 11에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 Spp1 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 간암을 가진 포유동물에게 치유 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치유적으로 치료하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 간암이 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 107

제104항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제가 항체, siRNA 및 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 111

제107항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 114

제112항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 115

제112항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 116

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 117

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 118

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 119

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 120

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 121

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 123

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 124

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 125

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 암 세포 사멸을 유발하는 것인 방법.

청구항 126

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 127

제126항에 있어서, 추가의 치료제가 화학요법제인 방법.

청구항 128

제127항에 있어서, 추가의 치료제가 항체인 방법.

청구항 129

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 130

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 AFP를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 간암이 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 132

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 133

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 134

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2 및 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 135

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 핵 Notch2를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 136

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 활성화 Ras를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 137

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 EpCAM 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 138

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 AFP 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 139

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 140

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 SPP1 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 141

제104항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성하는 것인 방법.

청구항 142

제 항에 있어서, 발현이 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 유전자 발현 프로파일링, 폴리머라제 연쇄 반응, SAGE, 매스어레이 기술, 형광 계내 혼성화 및 웨스턴 블롯팅으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 143

도 8c에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질의 증가된 발현 또는 활성화와 연관된 간 세포 증식성 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Jag1 길항제 항체를 투여하여 간 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 상기 간 세포 증식성 장애를 치료하는 방법.

[청구항 143]

제143항에 있어서, 세포 증식성 장애가 암인 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 개체가 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는 것인 방법.

청구항 145

제143항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 146

제143항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 147

제143항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 148

제143항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 149

제148항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 150

제143항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 151

제150항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 152

제150항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

(e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
(f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 153

제150항에 있어서, 항체가

(a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
(b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
(c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
(d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
(e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
(f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 154

간암을 가진 개체에 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 개체에서 혈청 SPP1 수준을 감소시키는 것을 포함하는, 상기 개체에서 혈청 SPP1 단백질 수준을 감소시키는 방법.

청구항 155

제154항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 적어도 약 80 ng/ml인 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 약 80 ng/ml 내지 약 500 ng/ml인 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 약 86 ng/ml 내지 약 250 ng/ml인 방법.

청구항 158

제157항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 약 120 ng/ml 내지 약 170 ng/ml인 방법.

청구항 159

제154항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에 투여하는 것이 80 ng/ml 미만의 혈청 SPP1 단백질 수준을 생성하는 것인 방법.

청구항 160

제154항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 24시간 전의 것인 방법.

청구항 161

제154항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준이 효소-연결된 면역흡착 검정에 의해 결정된 것인 방법.

청구항 162

제154항에 있어서, 혈청 SPP1 단백질 수준이 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 1개월 후에 감소된 것인 방법.

청구항 163

제154항에 있어서, 혈청 SPP1 단백질 수준이 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 2개월 후에 감소된 것인 방법.

청구항 164

제154항에 있어서, 혈청 SPP1 단백질 수준이 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 3개월 후에 감소된 것인 방법.

청구항 165

제154항에 있어서, 간암이 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 166

제154항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제가 항체, siRNA 및 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 167

제166항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 항체가 마우스 Notch2 NRR 및 인간 Notch2 NRR에 결합하는 것인 방법.

청구항 170

제168항에 있어서, 항체가 Notch2 NRR에 ≤ 10 nM의 Kd로 결합하는 것인 방법.

청구항 171

제168항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 172

제166항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 173

제172항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 174

제173항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 175

제173항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 176

제173항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 177

제166항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 178

제166항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 179

제166항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 180

제166항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 181

제166항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 182

제166항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 184

제166항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 185

제166항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 186

Notch2 신호전달의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존하는 종양을 Notch2 또는 Jag1에 결합하는 항체와 접촉시켜 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 포유동물에서 간암을 치유적으로 치료하는 방법.

청구항 187

제186항에 있어서, 암에 대한 항체의 결합이 Notch2의 성장-강화 활성화에 길항작용하는 것인 방법.

청구항 188

제186항에 있어서, 간암이 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 189

제186항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 190

제189항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 항체가

(a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

- (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 192

제186항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 193

제192항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 195

제193항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
을 포함하는 것인 방법.

청구항 196

제193항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 방법.

청구항 197

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 198

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 199

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 200

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 201

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 202

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 204

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 205

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 206

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 암 세포 사멸을 유발하는 것인 방법.

청구항 207

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 개체에게 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, 추가의 치료제가 화학요법제인 방법.

청구항 209

제207항에 있어서, 추가의 치료제가 항체인 방법.

청구항 210

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 211

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 AFP를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 212

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 AFP 및 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 213

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 214

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 215

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2 및 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 216

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 핵 Notch2를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 217

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 활성화 Ras를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 218

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암에서 EpCAM 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 219

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암에서 AFP 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 220

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암에서 Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 221

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암에서 SPP1 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 222

제186항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 항체를 투여하는 것이 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성하는 것인 방법.

청구항 223

- (a) 간암을 가진 개체에게 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계; 및
- (b) Notch2 신호전달을 결정하는 단계

를 포함하며, 치료 전의 Notch2 신호전달과 비교하여 치료 후의 Notch2 신호전달에서의 감소는 개체에서의 간암의 감소를 나타내는 것인, 상기 개체를 치료하는 방법.

청구항 224

제223항에 있어서, Notch2 신호전달이 Notch2 ICD 핵 국재화를 측정함으로써 결정되는 것인 방법.

청구항 225

제223항에 있어서, Notch2 신호전달이 Notch2, Jag1, Hes 및 Hey1로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 측정함으로써 결정되는 것인 방법.

청구항 226

제223항에 있어서, 간암이 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 227

제223항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제가 항체, siRNA 및 소분자 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 228

제227항에 있어서, 항체가 항-Notch2 항체인 방법.

청구항 229

제228항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 231

제227항에 있어서, 항체가 항-Jag1 항체인 방법.

청구항 232

제231항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 방법.

청구항 233

제232항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 234

제232항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 235

제232항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 방법.

청구항 236

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 237

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 길항제 항체인 방법.

청구항 238

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 239

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 240

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 성장 억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 241

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 242

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 243

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 박테리아에서 생산된 것인 방법.

청구항 244

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CHO 세포에서 생산된 것인 방법.

청구항 245

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 암 세포 사멸을 유발하는 것인 방법.

청구항 246

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 247

제246항에 있어서, 추가의 치료제가 화학요법제인 방법.

청구항 248

제246항에 있어서, 추가의 치료제가 항체인 방법.

청구항 249

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 250

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 AFP를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 251

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 AFP 및 EpCAM을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 252

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2를 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 253

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 254

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 Notch2 및 Jag1을 발현하는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 255

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 핵 Notch2를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 256

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 간암이 활성화 Ras를 갖는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 257

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 EpCAM 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 258

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 AFP 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 259

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 260

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 SPP1 발현의 감소를 생성하는 것인 방법.

청구항 261

제223항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것이 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성하는 것인 방법.

청구항 262

포유동물 간암 세포를 Notch2 또는 Jag1에 대한 항체로 처리하는 것을 포함하는, 세포 증식을 억제하는 방법.

청구항 263

제262항에 있어서, 세포가 인간 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 264

제262항에 있어서, 세포가 배양 배지 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 265

(a) 용기; (b) 용기 내에 수용된, 항-Notch2 항체 또는 항-Jag1 항체 및 간암의 치료를 위한 담체를 포함하는 물질의 조성물; 및 (c) 간암의 치유적 치료 또는 진단 검출을 위한 물질의 조성물의 사용을 지시하는, 용기에 부착되어 있는 라벨 또는 용기와 함께 포함되어 있는 포장 삽입물을 포함하는 제조품.

청구항 266

간암의 치료에 사용하기 위한 항-Notch2 항체.

청구항 267

제267항에 있어서, 간암이 간세포성 암종인 항-Notch2 항체.

청구항 268

제267항에 있어서, 항-Notch2 길항제 항체인 항-Notch2 항체.

청구항 269

제268항에 있어서, 항-Notch2 NRR 항체인 항-Notch2 항체.

청구항 270

간암의 치료에 사용하기 위한 항-Jag1 항체.

청구항 271

제270항에 있어서, 간암이 간세포성 암종인 항-Jag1 항체.

청구항 272

제270항에 있어서, 항-Jag1 길항제 항체인 항-Jag1 항체.

청구항 273

제270항에 있어서,

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 항-Jag1 항체.

청구항 274

제273항에 있어서,

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 항체.

청구항 275

제273항에 있어서,

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항체.

청구항 276

제273항에 있어서,

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항체.

청구항 277

간암의 치유적 치료를 위한 의약의 제조에서의 항-Notch2 항체의 용도.

청구항 278

제277항에 있어서, 간암이 간세포성 암종인 용도.

청구항 279

제277항에 있어서, 항체가 항-Notch2 길항제 항체인 용도.

청구항 280

제277항에 있어서, 항체가 항-Notch2 NRR 항체인 용도.

청구항 281

제277항에 있어서, 항체가 Notch2 NRR에 ≤ 10 nM의 Kd로 결합하는 것인 용도.

청구항 282

제279항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 용도.

청구항 283

간암의 치유적 치료를 위한 의약의 제조에서의 항-Jagged1 항체의 용도.

청구항 284

제283항에 있어서, 암이 간세포성 암종인 용도.

청구항 285

제283항에 있어서, 항체가 항-Jag1 길항제 항체인 용도.

청구항 286

제283항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는 것인 용도.

청구항 287

제285항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 용도.

청구항 288

제285항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

을 포함하는 것인 용도.

청구항 289

제285항에 있어서, 항체가

- (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 것인 용도.

청구항 290

간암의 치료를 위한 의약의 제조에서의 제265항에 청구된 바와 같은 제조품의 용도.

청구항 291

간 세포 증식성 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서의 제265항에 청구된 바와 같은 제조품의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 가출원 번호 61/789,475의 이익을 주장하며, 그의 개시내용은 그 전문이 기재된 바와 같이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본원은 ASCII 포맷으로 전자문서로 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2014년 3월 13일에 생성된 상기 ASCII 카피는 P5570R1-WO_SL.txt로 명명되고, 크기는 115,666 바이트이다.
- [0005] 발명의 분야
- [0006] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 병리학적 간 상태, 예컨대 암의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 간암은 암 중에서 다섯 번째로 가장 흔한 형태이다. 매년 대략 750,000건의 케이스가 진단되고 약 700,000명의 사람들이 매년 이 질환으로 사망하여, 이는 세계에서 세 번째로 가장 흔한 암 사망 원인이다 (Ferlay et al., Int. J. Cancer 127:2893-2917 (2010)). 미국에서 원발성 간암 발생률이 높아지고 있고, 국부 질환의 검출 및 치료에서 일부 진전이 이루어지고 있지만, 말기 간암의 5년 생존율은 여전히 10% 훨씬 미만이다 (American-Cancer-Society, 2012. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society).
- [0008] 간암의 확립된 치료는 종양을 함유하는 간의 부분의 외과적 제거 (부분 간 절제술), 간 이식, 경관 동맥 화학색전술 (TACE), 고주파 절제 (RFA) 또는 냉동수술과 같은 다양한 방법에 의한 계내 종양 파괴, 및 소라페닙의 투여를 포함한다. 말기 간암 환자를 위한 치료 옵션은 제한된다. 따라서, 간암의 유효 치료는 유의한 미충족 의료 필요로 남아있다.
- [0009] 간암에서 Notch 신호전달의 역할은 잘 이해되지 않고 있다. 퀴(Qi) 등은 Notch1 신호전달이 세포 주기 정지 및 아포토시스를 유도함으로써 시험관내 및 생체내에서 인간 간세포성 암종 세포의 성장을 억제한다고 보고하였고 (Qi et al., Cancer Res. 63:8323 (2003)), 비아투르(Viatour) 등은 Notch1 세포내 도메인의 발현이 무린 및 인간 HCC 세포에서 증식을 감소시키고 아포토시스를 유도한다고 보고하였다 (Viatour et al., J. Exp. Med. 208(10):1963 (2011)). 기타, Notch1 소형 간섭 RNA (siRNA)가 세포 침습 및 이동을 감소시키지만 생존율은 감소시키지 않는 것으로 보고되어 있다 (Zhou et al. Dig. Dis. Sci.). 그 밖에, 개개의 Notch 경로 패밀리 구성원의 억제는 어떠한 효과도 없는 것으로 보고되어 있다. 종합하면, 간암에서 Notch 경로의 역할은 잘 이해

되지 않고 있다.

발명의 내용

- [0010] 간의 증식성 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 환자의 치료를 위한 Notch2 신호전달 억제제의 용도가 제공된다.
- [0011] 한 측면에서, 간암의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, 간세포성 암종은 전구-유사 또는 담관암종-유사 간 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 간암은 불응성 암이다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 치료제의 예는 화학요법제 및 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 간암은 EpCAM, AFP, Notch2, Jag1, Notch2 및 Jag1, 핵 Notch2 ICD, Sox9, CK19, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glul, 또는 그의 임의의 조합을 발현하는 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 간암은 AFP⁺ EpCAM⁺인 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 간암은 AFP⁺ EpCAM⁻, AFP⁺ EpCAM⁺ SPP1⁺, AFP⁻ EpCAM⁺, AFP⁻ EpCAM⁺ Notch2⁺, AFP⁺ EpCAM⁻ Notch2⁺, AFP⁺ EpCAM⁺ Sox9⁺ 및 AFP⁺ EpCAM⁺ Sox9⁺ 또는 AFP⁻ EpCAM⁺ SPP1⁺인 세포를 포함한다. 대안적인 마커 발현의 조합을 갖는 세포를 포함하는 간암이 특히 고려된다.
- [0014] 일부 실시양태에서, EpCAM, AFP, Notch2, Jag1, Sox9, CK19, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glul 단백질 발현 중 적어도 하나가 개체로부터의 샘플에서 면역조직화학 (IHC)을 사용하여 결정되었다. 일부 실시양태에서, 발현은 핵산 발현이다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 유전자 발현 프로파일링, 폴리머라제 연쇄 반응, SAGE, 매스 어레이 기술, 형광 계내 혼성화 및 웨스턴 블롯팅으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 결정된다.
- [0015] 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 EpCAM, AFP, Notch2, Notch2 ICD, Jag1, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glul 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성한다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 및 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.
- [0016] 상기 실시양태의 임의의 항체는 전장 IgG1 또는 IgG2a 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 암 세포 사멸, 예를 들어 간암 세포 사멸을 유발한다. 상기 실시양태에서 임의의 항체는 성장 억제제, 예를 들어 세포독성제에 접합될 수 있다. 세포독성제의 예는 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 실시양태에서 임의의 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 박테리아에서 또는 CHO 세포에서 생산될 수 있다.
- [0017] 한 측면에서, 간암을 가질 위험이 있는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 비-바이러스성/비-알콜성 지방간염, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 항-Jag1 항체, 예를 들어 항-Jag1 길항제 항체이다.
- [0018] 한 측면에서, 분비된 인단백질1 (SPP1)을 발현하는 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시켜 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, SPP1 단백질은 도 11에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 SPP1 발현을 감소시킨다. 예를 들어, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 SPP1 발현을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 감소시킨다. SPP1 mRNA 또는 단백질의 발현은 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 항-Notch2 항체, 예를 들어 항-Notch2 음성 조절 영역 (NRR) 항체, 예컨대 본원에 개시되어 있는 임의의 항-Notch2 NRR 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-Jag1 항체, 예컨대 본원에 개시되어 있는 임의의 항-Jag1 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포는 간암 세포이다. 일부 실시양태에서, 간암 세포는 EpCAM, AFP, AFP 및 EpCAM, Notch2, Jag1, Notch2 및 Jag1, 핵 Notch2 ICD, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2,

또는 Glu1, 또는 그의 임의의 조합을 발현한다. 일부 실시양태에서, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 EpCAM, AFP, Notch2, Notch2 ICD, Jag1, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 세포에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성한다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 및 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.

[0019] 한 측면에서, 분비된 인단백질1 (SPP1)을 발현하는 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시켜 세포의 증식을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다.

[0020] 한 측면에서, 도 11에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 Spp1 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 간암을 가진 포유동물에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 도 11에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SPP1 단백질을 발현한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, 간암은 불응성 암이다. 본원의 임의의 항체는 전장 IgG1 또는 IgG2a 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 암 세포 사멸, 예를 들어 간 세포 사멸을 유발한다. 본원의 임의의 항체는 성장 억제제, 예를 들어 세포독성제에 접합될 수 있다. 세포독성제의 예는 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵산분해 효소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원의 임의의 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 박테리아에서 또는 CHO 세포에서 생산될 수 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 치료제의 예는 화학요법제 및 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 일부 실시양태에서, 간암은 EpCAM, AFP, AFP 및 EpCAM, Notch2, Jag1, Notch2 및 Jag1, 핵 Notch2 ICD, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glu1, 또는 그의 임의의 조합을 발현하는 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 EpCAM, AFP, Notch2, Notch2 ICD, Jag1, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성한다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 및 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.

[0024] 한 측면에서, 도 8c에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질의 증가된 발현 또는 활성과 연관된 간 세포 증식성 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Jag1 길항제 항체를 투여하여 간 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 간 세포 증식성 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암, 예컨대 간암이다. 일부 실시양태에서 개체는 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는다.

[0025] 특정 실시양태에서, 항-Jag1 항체는 본원에 기재된 임의의 항-Jag1 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-Jag1 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 항체 단편이다.

[0026] 한 측면에서, 도 11에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질의 증가된 발현 또는 활성과 연관된 간 세포 증식성 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Jag1 길항제 항체를 투여하여 간 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 간 세포 증식성 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암, 예컨대 간암이다. 일부 실시양태에서 개체는 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는다.

[0027] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 개체에서 혈청 SPP1 수준을 감소시키는 것을 포함하는, 상기 개체에서 혈청 SPP1 단백질 수준을 감소시키는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 개체는 간암을 갖는다. 한 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 적어도 약 80 ng/ml이다. 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 약 80 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 86 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 120 ng/ml 내지 약 170

ng/ml, 또는 약 165 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하는 것은 80 ng/ml 미만의 혈청 SPP1 단백질 수준을 생성한다. 구체적 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 24시간 전의 것이다. Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전 또는 후의 혈청 SPP1 단백질 수준은 임의의 적절한 방법, 예컨대 효소-연결된 면역흡착 검정에 의해 결정될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 혈청 SPP1 단백질 수준은 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 1, 2, 3, 6 또는 12개월 후에 감소된다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 siRNA, 소분자 억제제 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 길항제 항체이다.

[0028] 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 항체 단편이다.

[0029] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 치료제의 예는 화학요법제 및 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 소라페닙이 추가의 치료제이다.

[0030] 일부 실시양태에서, 간암은 EpCAM, AFP, AFP 및 EpCAM, Notch2, Jag1, Notch2 및 Jag1, 핵 Notch2 ICD, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glul, 또는 그의 임의의 조합을 발현하는 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, Ras는 돌연변이체 Ras이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 EpCAM, AFP, Notch2, Notch2 ICD, Jag1, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 간암에서 Wnt2, Axin2 및 Glul 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성한다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 및 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.

[0031] 한 측면에서, 간 종양을 Notch2 또는 Jag1에 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 포유동물에서 간 종양을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 간 종양의 성장은 Notch2 신호전달의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존한다. 한 실시양태에서, 항체의 종양에 대한 결합은 Notch2의 성장-강화 활성화에 길항작용한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0032] 한 측면에서, 상승된 혈청 SPP1 단백질 수준을 갖는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 간암을 치료하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 개체의 혈청 SPP1 단백질 수준은 적어도 약 80 ng/ml이다. 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 약 80 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 86 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 120 ng/ml 내지 약 170 ng/ml, 또는 약 165 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하는 것은 80 ng/ml 미만의 혈청 SPP1 단백질 수준을 생성한다. 구체적 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 24시간 전의 것이다. Notch2 신호전달 억제제의 투여 전 또는 후의 혈청 SPP1 단백질 수준은 임의의 적절한 방법, 예컨대 효소-연결된 면역흡착 검정에 의해 결정될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 혈청 SPP1 단백질 수준은 개체에서 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 1, 2, 3, 6 또는 12개월 후에 감소된다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 siRNA, 소분자 억제제 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 길항제 항체, 예컨대 항-Notch2 길항제 항체 또는 항-Jag1 길항제 항체이다.

[0033] 일부 측면에서, 개체에게 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계; 및 Notch2 신호전달을 결정하는 단계를 포함하는 간암을 가진 개체를 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 치료 전의 Notch2 신호전달과 비교하여 치료 후의 Notch2 신호전달에서의 감소는 개체에서의 간암의 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달은, 예를 들어 개체로부터의 간암 샘플의 면역조직화학 분석에 의해, Notch2 ICD 핵 국재화를 측정함으로써 결정된다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달은 Notch2, Jag1, Hes 및 Hey1로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 측정함으로써 결정된다. 발현은 임의의 방법, 예를 들어 RT-PCR, 마이크로어레이, 및 RNAseq 분석에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 siRNA, 소분자 억제제 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 길항제 항체, 예컨대 항-Notch2 길항제 항체 또는 항-Jag1 길항제 항체이다.

- [0034] 일부 측면에서, 포유동물 간암 세포를 Notch2 또는 Jag1에 대한 항체로 치료함으로써 간암 세포의 증식을 억제하는 것을 포함하는, 세포 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 세포는 환자 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 세포는 배양 배지 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 세포는 간암 세포이다. 특정 실시양태에서, 항체는 본원에 기재된 바와 같은 항-Notch2 또는 항-Jag1 길항제 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 항체 단편이다.
- [0035] 본원의 임의의 방법에서, Notch2 신호전달 억제제는 이하의 억제제일 수 있다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 siRNA, 소분자 억제제 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 길항제 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-Notch2 항체, 예를 들어 항-Notch2 음성 조절 영역 (NRR) 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Notch2 이외의 Notch 패밀리 구성원에는 유의하게 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 마우스 Notch2 NRR 및 인간 Notch2 NRR에, 예를 들어 ≤ 10 nM의 Kd로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는
- [0036] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0037] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0038] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0039] (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0040] (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0041] (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- [0042] 을 포함한다.
- [0043] 추가 실시양태에서, 항체는 항-Jag1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0044] 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0045] 특정 실시양태에서, 본원의 실시양태의 임의의 항체는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 항체 단편이다.
- [0046] 추가 실시양태에서, 본원의 실시양태의 임의의 항체는 도 18의 huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4를 추가로 포함한다.
- [0047] 추가 실시양태에서, 본원의 실시양태의 임의의 항체는 도 18의 huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4를 추가로 포함한다.
- [0048] 추가 실시양태에서, 본원의 실시양태의 임의의 항체는 도 19의 huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 경쇄 가변 도메인 프레임워크 LC-FR1,

LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4를 추가로 포함한다.

[0049] 추가 실시양태에서, 본원의 실시양태의 임의의 항체는 도 19의 huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4의 아미노산 서열을 순서대로 포함하는 중쇄 가변 도메인 프레임워크 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4를 추가로 포함한다.

[0050] 특정 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 94의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 97의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는, Jag1에 결합하는 단리된 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 94의 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 97의 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 94의 VH 서열 및 서열 97의 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 95의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 98의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 95의 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 98의 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 95의 VH 서열 및 서열 98의 VL 서열을 포함한다.

[0051] 특정 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 93의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VH 서열; (b) 서열 96의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 VL 서열; 또는 (c) (a)에서와 같은 VH 서열 및 (b)에서와 같은 VL 서열을 포함하는, Jag1에 결합하는 단리된 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 93의 VH 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 96의 VL 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열 93의 VH 서열 및 서열 96의 VL 서열을 포함한다.

[0052] 한 측면에서, (a) 용기; (b) 용기 내에 수용된, 항-Notch2 항체 또는 항-Jagged1 항체 및 간암의 치료를 위한 담체를 포함하는 물질의 조성물; 및 (c) 간암의 치유적 치료 또는 진단 검출을 위한 물질의 조성물의 사용을 지시하는, 용기에 부착되어 있는 라벨 또는 용기와 함께 포함되어 있는 포장 삽입물을 포함하는 제조품이 제공된다.

[0053] 한 측면에서, 간암의 치료에 사용하기 위한 항-Notch2 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 간암은 간세포암종이다. 특정 실시양태에서, 항체는 항-Notch2 NRR 길항제 항체이다. 한 측면에서, 간암의 치료에 사용하기 위한 항-Jag1 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 간암은 간세포암종이다. 특정 실시양태에서, 항체는 항-Jag1 길항제 항체이다.

[0054] 한 측면에서, 간암의 치유적 치료를 위한 의약의 제조에서의 항-Notch2 항체의 용도가 제공된다. 한 측면에서, 간암의 치유적 치료를 위한 의약의 제조에서의 항-Jagged1 항체의 용도가 제공된다.

[0055] 한 측면에서, 간암의 치유적 치료를 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 제조품의 용도가 제공된다. 한 측면에서, 간 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 바와 같은 제조품의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1a-f는 AKT/Ras HTV 간암 모델에서 간암 마커 발현의 특성화를 예시한다. 도 1a-c는 AFP⁺EpCAM⁻ (도 1a), AFP⁺EpCAM⁺ (도 1b) 및 AFP⁻EpCAM⁺ (도 1c)인, 종양의 면역조직화학 염색을 도시한다. 도 1d는 총 세포의 백분율로 표현된, 마커 발현 출현율을 도시한다. 도 1f는 핵 내 Notch2 단백질의 국재화에 의해 표시된 Notch2 신호 전달의 활성화의 면역조직화학 염색을 도시한다. 도 1e는 핵 Notch2 염색을 갖는 세포 퍼센트를 도시한다.

도 2a-d는 항-Notch2 또는 항-Jag1 길항제 항체로 치료된 Ras/AKT HTV 마우스에서의 감소된 종양 부담을 예시한다. 도 2a는 HTV 일에 개시된 이소형 대조군 항체 (상부 좌측), 항-Notch2 항체 (상부 우측) 또는 항-Jag1 항체 (하부 좌측)로 치료된 HTV 마우스로부터 단리된 간을 도시한다. 도 2b는 체중 퍼센트로 표현된, HTV 주사 시점에 투여된 항체 치료 후의 Ras/AKT HTV 마우스 간 중량을 도시한다. 도 2c는 체중 퍼센트로 표현된, HTV 주사 2주 후에 투여된 항체 치료 후의 Ras/AKT HTV 마우스 간 중량을 도시한다 (p<0.05, n>8). 도 2d는 항체 치료 후의 Ras/AKT HTV 마우스 간 중량을 도시한다 (p<0.02, n>6).

도 3a-h는 Notch 억제 항체에 의한 AKT/Ras HTV 종양-보유 마우스의 치료가 넓은 범위의 종양 유형의 발달을 지연시킴을 예시한다. 도 3a는 항-Notch2, 항-Jag1 또는 이소형 대조군 항체로 치료된 AKT/Ras HTV 마우스의 간에서 AFP 및 EpCAM 발현의 면역형광 분석을 도시한다. 도 3b 및 c는 항-Notch2 및 항-Jag1 치료 후의 EpCAM⁺

(도 3b; $p < 0.007$, $n \geq 7$) 및 AFP⁺ (도 3c; $p < 0.03$, $n \geq 7$) 면적에서의 감소를 도시한다. 도 3d는 항-Notch1 항체로 치료된 AKT/Ras HTV 마우스의 간에서 AFP 및 EpCAM 발현의 면역형광 분석을 도시한다. 도 3e는 항-Notch1, 항-Notch2, 항-Notch3, 항-Jag1 또는 이소형 대조군 항체에 의한 AKT/Ras HTV 마우스 치료 후의 EpCAM⁺ 세포의 백분율을 도시한다. 도 3f는 항-Notch1, 항-Notch2, 항-Notch3, 항-Jag1 또는 이소형 대조군 항체에 의한 AKT/Ras HTV 마우스 치료 후의 시토케라틴 19 (CK19)의 상대적 발현을 도시한다. 도 3g는 항-Notch1, 항-Notch2, 항-Notch3, 항-Jag1 또는 이소형 대조군 항체에 의한 AKT/Ras HTV 마우스 치료 후의 Sox9의 RNA를 도시하고, 도 3h는 단백질 수준을 도시한다.

도 4a-e는 Notch 억제 항체에 의한 AKT/Ras HTV 마우스의 치료가 종양-보유 간에서 Notch 경로 활성화를 감소시키는 것을 예시한다. 도 4a는 세포의 개수로 표현된, Notch2 핵 면역조직화학 염색을 도시한다. 도 4b는 QRT-PCR에 의해 결정된, Notch2의 상대적 발현을 도시한다. 도 4c는 AKT/Ras HTV 종양-보유 간에서 Hes1에 대한 면역조직화학 염색을 도시한다. 도 4d는 면역조직화학에 의해 결정된, Hes1⁺ 세포의 분획을 도시한다. 도 4e는 QRT-PCR에 의해 결정된, HeyL의 상대적 발현을 도시한다.

도 5a-i는 간암의 AKT/Ras 모델에서 Notch 신호전달 경로 성분의 발현에 대한 Notch 억제 항체의 효과를 예시한다. AKT/Ras HTV 마우스를 Notch1, Notch2, Notch3, 또는 Jag1에 대한 길항 항체, 또는 항-웨이풀 음성 대조항체로 치료하고, 5주 후에 간으로부터 단리된 RNA에 대해 Notch1 (도 5a), Notch2 (도 5b), Notch3 (도 5c), Notch4 (도 5d), Jag1 (도 5e), Jag2 (도 5f), DLL1 (도 5g), DLL3 (도 5h), DLL4 (도 5i)에 대한 정량적 실시간 PCR을 수행하였다.

도 6a-i는 이소형 대조군, 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체로 치료된 AKT/Ras HTV 마우스로부터의 간의 RNAseq 분석 결과를 예시한다. Prom1 (도 6a), Spp1 (도 6b), FoxM1 (도 6c), Plk1 (도 6d), ccnb1 (도 6e), Aurkb (도 6f), Wnt2 (도 6g), Axin2 (도 6h) 및 글루타민 신테타제 (Glu1, 도 6i)에 대해 정규화된 카운트를 도시한다.

도 7a-b는 인간 HCC에서의 Notch2의 발현을 예시한다. 도 7a는 배양된 인간 HCC 세포주에서 RT-PCR에 의해 결정된, Notch1, Notch2 및 Notch3 발현을 도시한다. 도 7b는 Notch2, Jag1 및 Hes1에 대한 인간 HCC 종양의 면역조직화학 염색을 도시한다.

도 8a-d는 인간 (c) 및 뮤린 (d) Notch2 단백질 및 인간 (a) 및 뮤린 (b) Notch2 음성 조절 영역 (NRR)의 예시적인 아미노산 서열을 제시한다.

도 9는 인간 및 뮤린 Jagged 1 단백질의 예시적인 아미노산 서열을 제시한다.

도 10a-b는 파지 항체 라이브러리 스크리닝 및 선택에 사용된 펩티드의 아미노산 서열을 제시한다. 모든 단백질은 BEVS 세포에서 분비된 단백질로서 발현되었고, 그의 서열은 N-말단에서 C-말단 방향으로 열거된다. 도 10a는 발현된 단백질 뮤린 Jagged 1-DSL-EGF1-4 (Q34-D377)의 아미노산 서열을 제시한다. N-말단에서의 볼드체는 짧은 링커 서열 (ADLGS (서열 2))을 나타낸다. C-말단에서의 볼드체는 짧은 링커 서열 (EFG), 트롬빈 절단 부위 (LVPRGS (서열 26)), G 스페이스 및 6-His 태그 (서열 27)를 나타낸다. 도 10b는 발현된 단백질 인간 Jag1-DSL-EGF1-4의 아미노산 서열을 제시한다. Jag1 서열만이 제시되어 있지만, 항원은 또한 C-말단에 TEV 프로테아제 절단 부위 및 6-His 태그 (서열 27)을 또한 함유한다.

도 11은 인간 분비된 인단백질1 (SPP1)의 예시적인 아미노산 서열을 제시한다.

도 12는 항-Notch2 NRR 길항제 항체의 H1, H2, 및 H3 중쇄 초가변 영역 (HVR) 서열을 제시한다. 아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 13은 항-Notch2 NRR 길항제 항체의 L1, L2, 및 L3 경쇄 HVR 서열을 제시한다. 아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 14a-b는 항-Notch2 항체의 중쇄 가변 도메인에 대한 아미노산 서열의 정렬을 제시한다. 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산 위치가 표시된다.

도 15a-b는 항-Notch2 항체의 경쇄 가변 도메인에 대한 아미노산 서열의 정렬을 제시한다. 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산 위치가 표시된다.

도 16a-b는 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적인 수용자 인간 가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 서열을 제시한다. 서열 식별자는 다음과 같다:

- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 32, 33, 34, 35).
- 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 36, 37, 34, 35; 서열 36, 37, 38, 35; 및 서열 36, 37, 39, 35).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 40, 41, 42, 35).
- 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 43, 44, 42, 35; 서열 43, 44, 45, 35; 및 서열 43, 44, 46, 및 35).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 47, 48, 49, 35).
- 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 50, 51, 49, 35; 서열 50, 51, 52, 35; 및 서열 50, 51, 53, 35).
- 인간 VH 수용자 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 54, 48, 55, 35).
- 인간 VH 수용자 프레임워크 "B" 및 "C" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 50, 51, 55, 35; 및 서열 50, 51, 56, 35).
- 인간 VH 수용자 2 프레임워크 "A" 마이너스 카바트 CDR (서열 54, 48, 57, 35).
- 인간 VH 수용자 2 프레임워크 "B," "C," 및 "D" 마이너스 연장된 초가변 영역 (서열 50, 51, 57, 35; 서열 50, 51, 58, 35; 및 서열 50, 51, 59, 35).

도 17은 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적인 수용자 인간 가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 서열을 제시한다. 서열 식별자는 다음과 같다:

- 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v1$): 서열 60, 61, 62, 63
- 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v2$): 서열 64, 65, 66, 63
- 인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v3$): 서열 67, 68, 69, 63
- 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 ($\kappa v4$): 서열 70, 71, 72, 63.

도 18은 huMAb4D5-8 경쇄 및 중쇄의 프레임워크 영역 서열을 제시한다 (각각 출현 순서대로 서열 60, 61, 30, 63, 50, 51, 59 및 35). 위첨자의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 19는 huMAb4D5-8 경쇄 및 중쇄의 변형된/변이체 프레임워크 영역 서열을 도시한다 (각각 출현 순서대로 서열 60, 61, 62, 31, 50, 51, 53 및 35). 위첨자의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 20은 실시예에 기재된 바와 같은 항-Jagged 항체의 H1, H2, 및 H3 중쇄 초가변 영역 (HVR) 서열을 제시한다. 아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 21은 실시예에 기재된 바와 같은 항-Jagged 항체의 L1, L2, 및 L3 경쇄 HVR 서열을 제시한다. 아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 22는 항-Jagged 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 제시한다 (각각 출현 순서대로 서열 60, 61, 62, 77, 50, 99, 57 및 35). 위첨자의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 23a-b는 실시예에 기재된 Notch2 (서열 100) (B?), Notch1 (서열 101) (Y), Notch3 (서열 102) (W) 및 Jag1 (서열 103) (A-2)에 대한 항체의 중쇄 가변 도메인에 대한 아미노산 서열의 정렬을 제시한다.

도 24a-b는 실시예에 사용된 Notch2 (서열 104), Notch1 (서열 105), Notch3 (서열 106) 및 Jag1 (서열 107)에 대한 항체의 경쇄 가변 도메인에 대한 아미노산 서열의 정렬을 제시한다.

도 25a-b는 항-Jag1 항체의 중쇄 (도 25a) 및 경쇄 (도 25b) 가변 도메인에 대한 아미노산 서열의 정렬을 제시한다. 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산 위치가 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

본원의 목적상 "수용자 인간 프레임워크"는 하기 정의되는 바와 같은 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인

[0057]

[0058]

간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인 (VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인 (VH) 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열이 동일하다.

- [0059] "친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 지칭한다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 나타내어질 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 비롯하여, 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도 측정을 위한 구체적인 설명적 및 예시적 실시양태가 하기 기재된다.
- [0060] "친화도 성숙" 항체는 항원에 대한 항체의 친화도를 개선하는 변경을 갖지 않는 모 항체와 비교하여 하나 이상의 초가변 영역 (HVR)에서 하나 이상의 변경을 갖는 항체를 지칭한다.
- [0061] 용어 "항-Jag1 항체" 및 "Jag1에 결합하는 항체"는 항체가 Jag1을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 Jag1에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 비관련 비-Jag1 단백질에 대한 항 Jag1 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의한 측정 시 Jag1에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, Jag1에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-Jag1 항체는 상이한 종으로부터의 Jag1 사이에 보존된 Jag1의 에피토프에 결합한다.
- [0062] "항-Jag1 길항제 항체"는 감소된 Jag1-매개 신호전달, 예를 들어 Jag1-매개 Notch2 신호전달을 초래하는 항-Jag1 항체이다.
- [0063] 용어 "항-Notch2 항체" 및 "Notch2에 결합하는 항체"는 항체가 Notch2를 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도로 Notch2에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 비관련 비-Notch2 단백질에 대한 항-Notch2 항체의 결합의 정도는, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA)에 의한 측정 시 Notch2에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 실시양태에서, Notch2에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-Notch2 항체는 상이한 종으로부터의 Notch2 사이에 보존된 Notch2의 에피토프에 결합한다.
- [0064] "항-Notch2 길항제 항체"는 하기 정의된 바와 같은, 감소된 Notch2 신호전달을 초래하는 항-Notch2 항체이다 (항-Notch2 NRR 항체 포함).
- [0065] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 목적하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.
- [0066] "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는, 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어 scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는 항체"는 경쟁 검정에서 참조 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하고, 반대로 참조 항체는 경쟁 검정에서 항체의 그의 항원에 대한 결합을 50% 이상 차단한다. 예시적인 경쟁 검정이 본원에 제공된다.
- [0068] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 유의하게 (부분적으로 또는 완전히) 억제하는 것이다.
- [0069] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정한 공급원 또는 종으로부터 유래된 반면, 중쇄 및/또는

경계의 나머지가 다른 공급원 또는 종으로부터 유래된 항체를 지칭한다.

[0070] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 간암의 예는 간세포성 암종, 간세포암, 간모세포종, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 육종, 림프종 및 간 혈관육종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 간암은 또한 간에서 유래되고, 신체의 또 다른 부위로 전이된 암을 포함한다.

[0071] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상 세포 증식과 연관된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0072] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸로멜라민을 비롯한 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세토게닌 (특히 플라타신 및 플라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCAMTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토포신 (특히 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 돌라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코닥티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노베티킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네딘 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (예를 들어 문헌 [Nicolau et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 디네미신 A를 비롯한 디네미신; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL)®), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)®), PEG화 리포솜 독소루비신 (케릭스(CAELYX)®), 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)®), 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)®), 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 플록수리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타틴; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라큐린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포프로판; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®); 클로람부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 작용제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)®, 및 카르보플라틴; 빈블라스타틴 (벨반(VELBAN)®), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®), 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®)을 비롯한, 튜블린 중합이 미세관

을 형성하는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스포미드; 미톡산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 백사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®)을 비롯한 레티노산; 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드론네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 킬루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®) 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관련된 신호전달 경로에서의 유전자 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신, 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트(SUTENT)®, 화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어 셀레콕시브 또는 에토티콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어 PS341); 보르테조미드 (벨케이드(VELCADE)®); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 소듐 (제나센스(GENASENSE)®); 퍽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮌(RAPAMUNE)®); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2종 이상의 조합, 예컨대 시클로포스포미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP; 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)에 의한 치료 요법에 대한 약어인 FOLFOX를 포함한다.

[0073]

본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이는 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)®), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 풀베스트란트 (파슬로텍스(FASLODEX)®) 및 EM800 (이러한 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 억제할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®) 및 아미노글루테티미드, 및 다른 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)®) 및 엘리가드(ELIGARD)®, 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스틴, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸stil베스트롤 및 프레마린, 및 안드로젠/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산 및 펜테티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로젠, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2종 이상의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0074]

항체의 "부류"는 그의 중쇄가 보유하는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5종의 주요 부류의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, 및 IgA₂로 추가로 나뉘어질 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다.

[0075]

"보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 전형적인 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합되는 (적절한 하위부류의) 항체에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 변이체 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0076]

본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물

질을 지칭한다. 세포독성제는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학요법제 또는 약물 (예를 들어, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삽입제); 성장 억제제; 효소 및 그의 단편, 예컨대 핵산분해 효소; 항생제; 독소, 예컨대 그의 단편 및/또는 변이체를 비롯한, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소적 활성 독소; 및 하기 개시되는 다양한 항증양제 또는 항암제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0077] 용어 "세포증식억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 성장을 정지시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 세포증식억제제는 S 기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 세포증식억제제의 추가의 예는 G0/G1 정지 또는 M-기 정지를 유도함으로써 세포 주기 진행을 차단하는 작용제를 포함한다. 인간화 항-Her2 항체 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®)은 G0/G1 정지를 유도하는 세포증식억제제의 예이다. 전형적인 M-기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 특정 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), e.g., p. 13]에서 찾아볼 수 있다. 타산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®, 롱-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®, 브리스톨-마이어스 스킵(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세관을 안정화시켜, 세포에서의 유사분열 억제를 야기한다.

[0078] "이펙터 기능"은 항체 이소형에 따라 달라지는, 항체의 Fc 영역에서 기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0079] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 목적하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.

[0080] 용어 "발현"은 유전자 내에 코딩된 정보가 메신저 RNA (mRNA)로, 이어서 단백질로 전환되는 것을 지칭한다.

[0081] 본원에서, 관심 단백질을 "발현하는" 샘플 또는 세포는 단백질을 코딩하는 mRNA, 또는 그의 단편을 비롯한 단백질이 샘플 또는 세포 내에 존재하는 것으로 결정된 것이다.

[0082] 본원에서 용어 "Fc 영역"은 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 상기 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 Cys226 또는 Pro230으로부터 중쇄의 카르복실-말단으로 연장된다. 그러나, Fc 영역의 C-말단 리신 (Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, Fc 영역 또는 불변 영역 내의 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991]에 기재된 바와 같은, EU 인덱스로도 지칭되는 EU 넘버링 시스템에 따른다.

[0083] "프레임워크" 또는 "FR"은 추가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0084] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0085] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포 (이러한 세포의 자손 포함)를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 일차 형질전환된 세포 및 계대배양 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝

또는 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.

- [0086] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나, 또는 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-코딩 서열을 사용하여 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 항체이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 구체적으로 제외된다.
- [0087] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택 시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우에 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0088] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 그것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 그것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열에서 초가변성 ("상보성 결정 영역" 또는 "CDR")이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하고/거나 항원-접촉 잔기 ("항원 접촉부")를 함유하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 예시적인 HVR은 본원에서 다음을 포함한다:
- [0090] (a) 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 발생한 초가변 루프 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));
- [0091] (b) 아미노산 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), 및 95-102 (H3)에서 발생한 CDR (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));
- [0092] (c) 아미노산 잔기 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 및 93-101 (H3)에서 발생한 항원 접촉부 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및
- [0093] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), 및 94-102 (H3)를 포함하는 (a), (b), 및/또는 (c)의 조합.
- [0094] 한 실시양태에서, HVR 잔기는 도 12, 13, 20 및 21에서 확인되는 것을 포함한다.
- [0095] 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.
- [0096] "면역접합체"는 세포독성제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 이중 분자(들)에 접합된 항체이다.
- [0097] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0098] "간암을 가질 위험이 있는 개체"는 평균보다 더 높은 간암에 걸릴 성향을 갖는 개체를 지칭한다. 간암을 가질 위험이 있는 개체의 예는, 제한 없이, 간염, 예를 들어 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증을 갖는 개체를 포함한다.
- [0099] 용어 "억제하다"는 참조와 비교하여 활성, 기능, 및/또는 양을 감소시키거나 낮추는 것을 의미한다.
- [0100] "세포 성장 또는 증식을 억제하다"는 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 감소시키는 것을 의미하고, 세포 사멸을 유도하는 것을 포함한다.

- [0101] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분에서 분리된 것이다. 일부 실시양태에서, 항체는 예를 들어 전기영동 (예를 들어, SDS-PAGE, 등전 포커싱 (IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의한 결정 시 95% 또는 99% 초과로 순도로서 정제된다. 항체 순도의 평가를 위한 방법의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)]을 참조한다.
- [0102] "단리된" 핵산은 그의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 핵산 분자를 지칭한다. 단리된 핵산은 핵산 분자를 통상적으로 함유하는 세포에 함유되어 있는 핵산 분자를 포함하지만, 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.
- [0103] "항-Jag1 항체를 코딩하는 단리된 핵산" 또는 "항-Notch2 항체를 코딩하는 단리된 핵산"은 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 단편)를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자 (단일 벡터 또는 개별 벡터 내의 이러한 핵산 분자(들) 및 숙주 세포에서 하나 이상의 위치에 존재하는 이러한 핵산 분자(들) 포함)를 지칭한다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "Jagged" 또는 "Jag"은 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 Jagged를 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 Jag 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 Jagged 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 Jagged의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "Jagged1" 또는 "Jag1"은 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 Jag1을 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 Jag1 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 Jag1 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 Jag1의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 예시적인 인간 및 뮤린 Jag1의 아미노산 서열이 도 9에 제시된다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "발현의 수준" 또는 "발현 수준"은 생물학적 샘플 내 폴리뉴클레오티드, mRNA 또는 아미노산 생성물 또는 단백질의 양을 지칭한다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 상기 집단을 구성하는 개개의 항체는, 일반적으로 소량으로 존재하는 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제조의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고, 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시되는 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제조와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제조의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로서 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 사용하는 방법을 포함하나 이에 제한되는 것은 다양한 기술에 의해 제조될 수 있고, 이러한 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다.
- [0108] "네이키드 항체"는 이중 모이어티 (예를 들어, 세포독성 모이어티) 또는 방사성표지에 접합되지 않은 항체를 지칭한다. 네이키드 항체는 제약 제제에 존재할 수 있다.
- [0109] "천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VH)에 이어서 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로도 불리는 가변 영역 (VL)에 이어서 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2가지 유형 중 1가지로 할당될 수 있다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "Notch"는 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 Notch를 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 Notch 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 Notch 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 Notch의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다.

- [0111] 본원에 사용된 용어 "Notch2"는 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 Notch2를 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 Notch2 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 Notch2 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 Notch2의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 예시적인 인간 Notch2의 아미노산 서열이 도 8에 제시된다.
- [0112] 용어 "Notch2 신호전달 억제제"는 상기 정의된 바와 같이 감소된 Notch2 신호전달을 초래하는 작용제를 지칭한다. Notch2 신호전달 억제제는 Notch2-특이적 길항제 및 Jag1-특이적 길항제를 포함한다. Notch2-특이적 길항제는 Notch2 신호전달을 감소시키고, 또 다른 Notch 수용체 (포유동물에서 Notch1, 3, 또는 4)에 의한 신호전달에는 유의하게 영향을 미치지 않는다. Notch2-특이적 길항제의 예는 Notch2 리간드에 대한 Notch2 결합을 차단하는 작용제를 포함한다. Jag1-특이적 길항제는 Jag1-매개 신호전달을 감소시킨다. Jag1-특이적 길항제의 예는 Notch2에 결합하는 작용제를 포함한다. 범-Notch 억제제, 예컨대 감마 세크레타제 억제제는 본원에 정의된 Notch2 신호전달 억제제에서 분명하게 제외된다.
- [0113] 용어 "포장 삽입물"은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 투여량, 투여, 조합 요법, 금기 및/또는 경고에 대한 정보가 담긴 이러한 치료 제품의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되어 있는 지침서를 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0114] 참조 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우에 최대 퍼센트 서열 동일성 달성을 위해 갭을 도입한 후 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않으면서 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 관련 기술분야 기술 내의 다양한 방식, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 통상의 기술자는 비교할 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 서열 정렬에 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네펜크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네펜크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터 공개적으로 입수가능하거나, 소스 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 디지털 UNIX V4.0D를 포함하여 UNIX 운영 시스템에서의 사용을 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.
- [0115] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에의, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에의, 주어진 아미노산 서열 B와의, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:
- [0116] X/Y 분율 x 100
- [0117] 여기서, X는 A 및 B의 프로그램 정렬 시 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않을 것임을 인식할 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 직전 단락에 기재한 바와 같이 취득한다.
- [0118] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하며, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0119] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0120] "재발"은 이전 질환 상태로의 환자의 질병의 회귀, 특히 명백한 회복 또는 부분적 회복 후 증상의 복귀를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 재발 상태는 화학요법 및 줄기 세포 이식 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 이전 치료 전의 질병으로 복귀하는 과정 또는 질병으로의 복귀를 지칭한다.

- [0121] "불응성"은 치료에 대한 질환 또는 상태의 내성 또는 비-반응성을 지칭한다 (예를 들어, 치료가 주어짐에도 불구하고 신생물성 형질 세포의 수가 증가함). 달리 나타내지 않는 한, 용어 "불응성"은 화학요법 및 줄기 세포 이식 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 이전 치료에 대한 내성 또는 비-반응성을 지칭한다.
- [0122] 본원에 사용된 용어 "분비된 인단백질1" 또는 "SPP1" 또는 "오스테오펀틴"은 달리 나타내지 않는 한 포유동물, 예컨대 영장류 (예를 들어 인간) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 비롯한 임의의 척추동물 공급원으로부터의 임의의 천연 SPP1을 지칭한다. 상기 용어는 "전장" 비프로세싱 SPP1 뿐만 아니라 세포에서의 프로세싱으로부터 생성된 임의의 SPP1 형태를 포괄한다. 상기 용어는 또한 SPP1의 자연 발생 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 포괄한다. 예시적인 인간 SPP1의 아미노산 서열이 도 11에 제시된다.
- [0123] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 통상의 기술자가 수치 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락에서 2개의 수치 값 사이의 차이를 통계적으로 유의한 것으로 간주하도록 하는, 2개의 수치 값 (일반적으로 하나는 분자와 연관되고, 다른 것은 참조/비교 분자와 연관됨) 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 지칭한다.
- [0124] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 통상의 기술자가 수치 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성의 맥락에서 2개의 수치 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계적으로 거의 유의하지 않거나 전혀 유의하지 않은 것으로 간주하도록 하는, 2개의 수치 값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 연관되고, 다른 것은 참조/비교 항체와 연관됨) 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 지칭한다.
- [0125] 용어 "중양"은 악성이든 또는 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "중양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.
- [0126] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 경감 또는 개선된 예후를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 늦추는데 사용된다.
- [0127] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브리리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "백터"는, 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 백터 뿐만 아니라, 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 백터를 포함한다. 특정 백터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터는 본원에서 "발현 백터"로 지칭된다.
- [0129] II. 조성물 및 방법
- [0130] 한 측면에서, 본 발명은 부분적으로, 간암의 치료를 위한 Notch 경로 성분의 억제제를 기반으로 한다.
- [0131] 한 측면에서, 간암의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포성 암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 또는 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, 간암은 불응성 암이다.
- [0132] Notch2 신호전달 억제제의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 가용성 Notch 수용체, 가용성 Notch 리간드 변이체, 예를 들어 우성 음성 리간드 변이체, Notch2 또는 Jag1에 결합하는 애타머 또는 올리고펩티드, Notch2 신호전달을 특이적으로 방해하는 유기 또는 무기 분자, 항-Notch2 길항제 항체 및 항-Jag1 길항제 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 일부 억제제가 본원에 예시된다. Notch2-특이적 길항제의 예는 미국 특허 출원 공개

번호 US 2010/0111958 및 문헌 [Sjoelund et al., J. Clin. Invest. 118(1):217-228 (2008)]에 기재되어 있는 것을 포함한다.

[0133] 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 항-Notch2 길항제 항체이다. 한 이러한 실시양태에서, 항-Notch2 길항제 항체는 Notch2의 세포외 도메인에 결합하는 항체이고, 감소된 Notch2 신호전달을 초래한다. 한 이러한 실시양태에서, 항-Notch2 길항제 항체는 항-Notch2 NRR 항체이다. 항-Notch2 NRR 항체는 그 전문이 본원에 명백하게 참조로 포함되는 국제 출원 공개 번호 WO2010039832에 개시되어 있는 임의의 항-Notch2 NRR 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 항체는 Notch2 NRR의 LNR-A 및 HD-C 도메인에 결합하는 항-Notch2 NRR 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 항-Notch2 NRR 항체는 본원에서 항체 B, 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3으로 지정된 모노클로날 항체이다. Notch2 NRR에 결합하는 항체 B는 파지 디스플레이로부터 단리되었다. 상기 항체는 친화도 성숙되어 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3을 생성하였다. 항체 B, 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3의 중쇄 및 경쇄 추가변 영역 (HVR)의 서열이 각각 도 12 및 13에 제시된다. 항체 B, 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 서열이 도 14 및 15에 제시된다. 항-Notch2 NRR 항체의 추가의 실시양태가 하기에 제공된다.

[0134] 한 측면에서,

[0135] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0136] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0137] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0138] (d) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0139] (e) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0140] (f) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0141] 으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 길항제 항체가 제공된다.

[0142] 추가 측면에서, 항체는 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3 및 상기 (a), (b), (d), (e), 및 (f)로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 HVR을 포함한다. 추가 측면에서, 항체는 상기 (a), (b), (c), (d), (e), 및 (f)를 포함한다. (a), (d), (e), 및 (f)와 관련하여, 하기 실시양태 중 어느 하나 이상이 고려된다: HVR-H1은 서열 1의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L1은 서열 5-8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L2는 서열 10-13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L3은 서열 15-18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0143] 또 다른 측면에서, 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.

[0144] 또 다른 측면에서, 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 하기 실시양태가 임의의 조합으로 고려된다: HVR-L1은 서열 5-8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L2는 서열 10-13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L3은 서열 15-18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, Notch2 NRR에 결합하는 항체는 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Notch2 NRR에 결합하는 항체는 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Notch2 NRR에 결합하는 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Notch2 NRR에 결합하는 항체는 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.

[0145] 한 실시양태에서,

[0146] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

- [0147] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0148] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0149] (d) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0150] (e) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0151] (f) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- [0152] 을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.
- [0153] 또 다른 실시양태에서,
- [0154] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0155] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0156] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0157] (d) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0158] (e) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0159] (f) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- [0160] 을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.
- [0161] 또 다른 실시양태에서,
- [0162] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0163] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0164] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0165] (d) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0166] (e) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0167] (f) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- [0168] 을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.
- [0169] 또 다른 실시양태에서,
- [0170] (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0171] (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0172] (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
- [0173] (d) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0174] (e) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0175] (f) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- [0176] 을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.
- [0177] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 항체는 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 및 VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크로부터 선택된 적어도 하나의 프레임워크를 추가로 포함한다.
- [0178] 특정 실시양태에서, 항-Notch2 NRR 항체는 친화도 성숙된다. 예를 들어, 표시된 HVR 위치 (카바트 넘버링됨)에서 하기 치환 중 어느 하나 이상이 임의의 조합으로 이루어질 수 있다:
- [0179] - HVR-L1 (서열 5)에서: S28N; I29N 또는 V; S30R 또는 K; S31R; Y32F
- [0180] - HVR-L2 (서열 10)에서: G50R; S53I 또는 T; A55E

- [0181] - HVR-L3 (서열 15)에서: S93I 또는 R; L96S 또는 H
- [0182] 본원에 개시된 특정 항체, 항체 B 뿐만 아니라 항체 B의 친화도 성숙 형태 (B-1, B-2, 및 B-3)는 추가로 친화도 성숙될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 임의의 항체의 친화도 성숙 형태가 제공된다.
- [0183] 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 항-Jag1 길항제 항체이다. 한 이러한 실시양태에서, 항-Jag1 길항제 항체는 Jag1의 세포외 도메인에 결합하는 항체이고, 감소된 Notch2 신호전달을 초래한다. 한 이러한 실시양태에서, 항-Jag1 길항제 항체는 항-Jag1 EGF1-4 항체이다. 항-Jag1 항체는 본원에 개시된 임의의 항-Jag1 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0184] 추가 실시양태에서, 항체는 항-Jag1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 84의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 HVR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0185] 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; (d) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (e) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (f) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0186] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 HVR 서열을 갖는 항-Notch2 NRR 항체 또는 항-Jag1 항체는 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 추가로 포함할 수 있지만, 단 Notch2 NRR 및 Jag1에 대한 결합 활성은 각각 실질적으로 보유하고 있다. 특정 실시양태에서, 항-Notch2 NRR 항체 또는 항-Jag1 항체는 도 16a 및 16b에 제시된 임의의 VH 컨센서스 프레임워크 서열에서와 같은 인간 가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 컨센서스 프레임워크 서열은 예를 들어 도 16a 및 16b에 제시된 바와 같은 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, VH 컨센서스 프레임워크 서열은 예를 들어 도 16a 및 16b에 제시된 바와 같은 "수용자 2" 프레임워크 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, VH 프레임워크 컨센서스 서열은 수용자 2B 또는 수용자 2D의 FR1-FR4를 포함하며, 여기서 FR4는 서열 35의 마지막 잔기 (S11)가 알라닌으로 임의로 치환된 서열 35 (도 16a 및 16b)를 포함한다. 추가의 특정한 실시양태에서, VH 프레임워크 컨센서스 서열은 서열 50; 51; 57 또는 59; 및 35의 서열을 포함하며, 여기서 서열 35의 S11은 알라닌으로 임의로 치환된다.
- [0187] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 HVR 서열을 갖는 항-Notch2 NRR 항체 또는 항-Jag1 항체는 도 17에 제시된 바와 같은 인간 가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, VL 컨센서스 프레임워크 서열은 예를 들어 도 17에 제시된 바와 같은 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (κ v1) 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, VL 프레임워크 컨센서스 서열은 도 18 또는 19에 제시된 바와 같은 huMAb4D5-8의 FR1-FR4를 포함한다. 특정한 실시양태에서, VL 프레임워크 컨센서스 서열은 서열 60, 61, 62, 및 63의 서열을 포함한다.
- [0188] 또 다른 측면에서, 항-Notch2 NRR 항체는 서열 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열과 비교하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-Notch2 NRR 항체는 Notch2 NRR에 결합하는 능력을 보유하고 있다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 20의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉 FR에서) 일어난다. 특정한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으

로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0189] 또 다른 측면에서, 서열 22-25로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열과 비교하여 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입, 또는 결실을 함유하지만, 그러한 서열을 포함하는 항-Notch2 NRR 항체는 Notch2 NRR에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 22-25로부터의 아미노산 서열에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 외부 영역에서 (즉 FR에서) 일어난다. 특정한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 9의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 14의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 19의 컨센서스 서열에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2, 또는 3개의 HVR을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 5-8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10-13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 15-18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 또 다른 이러한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 6의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 11의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 또 다른 이러한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 7의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 17의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 또 다른 이러한 실시양태에서, VL은 (a) 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다.

[0190] 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 HVR 내에서 일어날 수 있다. 이러한 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경이 HVR 내에서 이루어질 수 있다. 특정 경우에, HVR에서의 변경은 실제로 항체 친화도를 개선할 수 있다. 이러한 변경은 항체 친화도를 증가시키기 위해 HVR "핫스팟" (즉, 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪는 코돈에 의해 코딩된 잔기)에서 이루어질 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196, 2008] 참조.) 상기에서 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 보존되거나 (변경되지 않거나), 또는 하나 이하의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 함유한다.

[0191] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH, 및 서열 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR를 포함하고, VL은 (a) 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 15의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 서열 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 22의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0192] 또 다른 실시양태에서, Notch2 NRR에 특이적으로 결합하는 항-Notch2 NRR 항체는 서열 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 및 서열 23-25로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 3의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (c) 서열 4의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함하고, VL은 (a) 서열 6-8로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 11-13으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 16-18로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 서열 20의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 23-25로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

- [0193] 또 다른 측면에서, 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VH 및 상기 제공된 임의의 실시양태에서와 같은 VL을 포함하는, Jag1에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체는 서열 93-95로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH 및 서열 96-98로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함하고, VL은 (a) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 서열 93의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 96의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0194] 또 다른 실시양태에서, Jag1에 특이적으로 결합하는 항-Jag1 항체는 서열 94의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH, 및 서열 97의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 82의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (c) 서열 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함하고, VL은 (a) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 서열 94의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 97의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0195] 또 다른 실시양태에서, Jag1에 특이적으로 결합하는 항-Jag1 항체는 서열 95의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VH, 및 서열 98의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VL을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, VH는 (a) 서열 81의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (b) 서열 83의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2 및 (c) 서열 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함하고, VL은 (a) 서열 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및 (c) 서열 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 HVR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 서열 95의 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열 98의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0196] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 항체의 친화도 성숙 형태가 제공된다. 추가 실시양태에서, 임의의 상기 항체의 항원 결합 부위(들)를 포함하는, Notch2 NRR 또는 Jag1에 특이적으로 결합하는 제조합 단백질이 제공된다. 한 이러한 실시양태에서, 제조합 단백질은 상기 제공된 HVR 중 어느 하나 이상을 포함한다.
- [0197] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 한 실시양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 한 실시양태에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하고, 항체를 단리하는 것을 포함하는, 항-Notch2 NRR 항체를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0198] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 항체 B, 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3으로부터 선택된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항-Notch2 NRR 항체가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 B, 항체 B-1, 항체 B-2, 및 항체 B-3으로부터 선택된 항체와 결합을 경쟁하는 항-Notch2 NRR 항체를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, Notch2의 LNR-A 도메인 및 HD-C 도메인으로부터 선택된 적어도 1개의 도메인에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 한 이러한 실시양태에서, 항체는 LNR-A 도메인 및 HD-C 도메인 둘 다에 결합한다. 또 다른 이러한 실시양태에서, 항체는 LNR-B 및/또는 HD-N 도메인에 추가로 결합한다.
- [0199] 한 실시양태에서, 항체 A, 항체 A-1, 및 항체 A-2로부터 선택된 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항-Jag1 항체가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 A, 항체 A-1, 및 항체 A-2로부터 선택된 항체와 결합을 경쟁하는 항-Jag1 항체를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, Jag1의 DSL 도메인 및 EGF 도메인으로부터 선택된 적어도 1개의 도메인에 결합하는 단리된 항체가 제공된다. 한 이러한 실시양태에서, 항체는 Jag1의 EGF1-4에 결합한다.

- [0200] 본원에 제공된 임의의 Notch2 신호전달 억제제가 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다.
- [0201] 본 발명은 또한, 간암을 가진 환자로부터 수득한 샘플에서 Notch2, Jag1 및 SPP1 중 하나 이상의 발현을 결정하는 것을 포함하는, 환자에 대한 치유적 치료를 선택하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, Notch2, Jag1 및 SPP1 중 하나 이상의 발현이 환자 샘플에서 검출된 경우에 환자는 Notch2 신호전달 억제제에 의한 치료를 위해 선택된다. 일부 실시양태에서, 대조군과 비교하여 환자로부터 수득된 샘플에서 Notch2, Jag1 및 Spp1 중 하나 이상의 상승된 발현은 환자가 본원에 기재된 바와 같은 Notch2 신호전달 억제제로 치료받는데 적합함을 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제 치료를 받을 환자를 확인하는데 추가의 파라미터, 예컨대 예를 들어 의사에 의한 검사, 생검의 조직학적 평가, 간암을 특성화하는 혈청 수준의 결정이 사용된다.
- [0202] 일부 실시양태에서, 환자로부터의 샘플 또는 생검은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 방법, 예컨대 예를 들어 정량적 PCR 분석을 사용하여 Notch2, Jag1 및 Spp1 중 하나 이상의 mRNA 발현에 대해 분석되고, 대조군 개체로부터 수득된 생검에서의 동일한 유전자 또는 유전자들의 발현과 비교되거나 또는 참조값과 비교된다. 일부 실시양태에서, 발현은 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 사용하여 결정된다. 일부 실시양태에서, 환자로부터의 샘플 또는 생검은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 Notch2의 활성화 형태의 검출에 의해 Notch2 활성화에 대해 분석된다.
- [0203] 한 측면에서, 간암을 가질 위험이 있는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에서 간암을 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 개체는 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는다. 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 하나의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 치료제의 예는 성장 억제제, 예컨대 세포독성제, 펩티드, 소분자 및 항체를 포함한다.
- [0204] 또 다른 측면에서, 분비된 인단백질1 (SPP1)을 발현하는 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시켜 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, SPP1 단백질은 도 11에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 SPP1 발현을 감소시킨다. 예를 들어, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 SPP1 발현을 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 90% 감소시킨다. SPP1 mRNA 또는 단백질의 발현은 관련 기술분야의 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 간암 세포이다. 일부 실시양태에서, 간암 세포는 EpCAM, AFP, AFP 및 EpCAM, Notch2, Jag1, Notch2 및 Jag1, 핵 Notch2 ICD, Ras, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1, Aurkb, Wnt2, Axin2, 또는 Glu1, 또는 그의 임의의 조합을 발현한다. 일부 실시양태에서, 세포를 Notch2 신호전달 억제제와 접촉시키는 것은 세포에서 EpCAM, AFP, Notch2, Notch2 ICD, Jag1, Prom1, Spp1, FoxM1, Plk1, ccnb1 및 Aurkb 중 적어도 하나의 발현의 감소를 생성한다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것은 세포에서 Wnt2, Axin2 및 Glu1 중 적어도 하나의 발현의 증가를 생성한다. 일부 실시양태에서, 발현은 RNAseq, 마이크로어레이 분석, 면역조직화학, 효소-연결된 면역흡착 검정, 및 웨스턴 블롯팅에 의해 결정된다.
- [0205] 또 다른 측면에서, 도 11에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 Spp1 유전자를 발현하는 세포를 포함하는 간암을 가진 포유동물에게 치유 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치유적으로 치료하는 방법이 제공된다.
- [0206] 또 다른 측면에서, 도 8c에 제시된 폴리펩티드에 대해 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질의 증가된 발현 또는 활성화와 연관된 간 세포 증식성 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Jag1 길항제 항체를 투여하여 간 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 상기 간 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암, 예컨대 간암이다. 일부 실시양태에서 개체는 B형 또는 C형 간염, 간 경변증, 양성 간 종양, 혈관종, 간 선종 및 초점성 결절성 증식증으로 이루어진 군으로부터 선택된 간 상태를 갖는다.
- [0207] 한 측면에서, 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하여 개체에서 혈청 SPP1 수준을 감소시키는 것을 포함하는, 상기 개체에서 혈청 SPP1 단백질 수준을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 감소는 Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 개체에서의 혈청 SPP1 수준에 상대적인 것이다. 일부 실시양태에서, 감소는 참조 수준에 상대적인 것이다. 한 실시양태에서, 개체는 간암을 갖는다. 한 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 적어도 약 80 ng/ml이다. 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 약 80 ng/ml 내지 약 500

ng/ml, 약 86 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 120 ng/ml 내지 약 170 ng/ml, 또는 약 165 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하는 것은 80 ng/ml 미만의 혈청 SPP1 단백질 수준을 생성한다. 구체적 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 Notch2 신호전달 억제제를 투여하기 24시간 전의 것이다. Notch2 신호전달 억제제의 투여 전 또는 후의 혈청 SPP1 단백질 수준은 임의의 적절한 방법, 예컨대 효소-연결된 면역흡착 검정에 의해 결정될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 혈청 SPP1 단백질 수준은 Notch2 신호전달 억제제를 투여한 지 약 1, 2, 3, 6 또는 12개월 후에 감소된다.

[0208] 한 측면에서, Notch2 신호전달의 성장 강화 효과에 적어도 부분적으로 의존하는 간 종양을 Notch2 또는 Jag1에 결합하는 항체와 접촉시켜 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 포유동물에서 간 종양을 치유적으로 치료하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 항체의 종양에 대한 결합은 Notch2의 성장-강화 활성화에 대해 길항 작용한다.

[0209] 한 측면에서, 간암에 대해 치료받은 적이 있고 상승된 혈청 SPP1 단백질 수준을 갖는 개체에게 유효량의 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 간암의 재발을 예방하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 개체의 혈청 SPP1 단백질 수준은 적어도 약 80 ng/ml이다. 특정 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하기 전의 혈청 SPP1 단백질 수준은 약 80 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 86 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 120 ng/ml 내지 약 170 ng/ml, 또는 약 165 ng/ml이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제를 개체에게 투여하는 것은 80 ng/ml 미만의 혈청 SPP1 단백질 수준을 생성한다.

[0210] 일부 측면에서, 간암을 가진 개체에게 Notch2 신호전달 억제제를 투여하는 단계; 및 Notch2 신호전달을 결정하는 단계를 포함하며, 치료 전의 Notch2 신호전달과 비교하여 치료 후의 Notch2 신호전달에서의 감소는 개체에서의 간암의 감소를 나타내는 것인, 상기 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달은, 예를 들어 면역조직화학 분석에 의해, Notch2 ICD 핵 국제화를 측정함으로써 결정된다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달은 Notch2, Jag1, Hes 및 Hey1로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자의 발현을 측정함으로써 결정된다. 일부 실시양태에서, 간암은 간세포암종, 간세포암, 담관암종, 간모세포종, 간 암종, 간 혈관육종 및 전이성 간암이다. 일부 실시양태에서, Notch2 신호전달 억제제는 siRNA, 소분자 억제제 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 길항제 항체, 예컨대 항-Notch2 길항제 항체 또는 항-Jag1 길항제 항체이다.

[0211] 일부 측면에서, 포유동물 간암 세포를 Notch2 또는 Jag1에 대한 항체로 치료함으로써 간암 세포의 증식을 억제하는 것을 포함하는, 세포 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체는 본원에 기재된 바와 같은 항-Notch2 또는 항-Jag1 길항제 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 실시양태의 임의의 항체는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 세포는 환자 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 세포는 배양 배지 내에 존재한다.

[0212] 본 발명의 Notch2 신호전달 억제제, 예컨대 항-Notch2 및 항-Jag1 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 추가의 치료제와 공-투여될 수 있다.

[0213] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (여기서 2종 이상의 치료제는 동일한 또는 개별 제제에 포함됨) 및 개별 투여를 포괄하고, 이 경우에 본 발명의 길항제의 투여는 추가의 치료제 및/또는 아주반트의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 일어날 수 있다. 본 발명의 Notch2 신호전달 억제제는 또한 방사선 요법과 조합되어 사용될 수 있다.

[0214] 길항제는 임의의 공지된 방법, 예컨대 정맥내 투여에 의해, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 인간 환자에게 투여될 수 있다. Notch2 신호전달 억제제는 단백질로서 또는 단백질을 코딩하는 핵산으로서 투여될 수 있다 (예를 들어, 국제 출원 공개 번호 W096/07321 참조). 다른 치료 요법이 Notch2 신호전달 억제제의 투여와 조합될 수 있다. 조합 투여는 개별 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 공-투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 그의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다. 일부 실시양태에서, 이러한 조합 요법은 상승작용적 치료 효과를 생성한다.

[0215] 투여 용량 및 방식은 공지된 기준에 따라 의사에 의해 선택될 것이다. 항체 또는 다른 Notch2 신호전달 억제제의 적절한 투여량은 치료할 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 Notch2 신호전달 억제제에 대한 반응,

및 담당의의 판단에 의존할 것이다. Notch2 신호전달 억제제는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여될 수 있다.

[0216] 간암 치료의 성공은 간 기능 및 회복의 파라미터를 평가함으로써 모니터링될 수 있다. 이러한 파라미터는 개선된 간 기능 검사, (예를 들어, 혈청 알부민, 빌리루빈, 담즙산, 총 단백질, 응고 시간을 평가), 간 효소 (예를 들어, 알라닌 트랜스아미나제, 아스파르테이트 트랜스아미나제, 알칼리성 포스파타제, 감마 글루타밀 트랜스펩티다제), 조직학적 외관 (예를 들어, 개선된 간 아키텍처를 제시하는 바늘 생검), 및 영상화 양식 (예를 들어, 섬유증 및 간 크기에 대한 초음파, 자기 공명 영상화)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 치료의 성공은 또한 SPP1 단백질의 혈청 수준을 측정함으로써 모니터링될 수 있으며, 치료-전 수준과 비교하여 치료된 환자에서의 혈청 수준의 감소는 성공적인 치료를 나타낸다.

[0217] 추가 측면에서, Notch2 신호전달 억제제는 임의의 특성이 포함되어 있는 상기 임의의 실시양태에서 하기 섹션 1-7에 기재된 바와 같이 단독으로 또는 조합되어 사용되는 항체이다.

[0218] 1. 항체 친화도

[0219] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (예를 들어 10^{-8} M 이하, 예를 들어 10^{-8} M 내지 10^{-13} M , 예를 들어 10^{-9} M 내지 10^{-13} M)의 해리상수 (Kd)를 갖는다.

[0220] 한 실시양태에서, Kd는 방사성표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 한 실시양태에서, RIA는 관심 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도는 비표지된 항원의 적정 시리즈의 존재 하에 최소 농도의 (^{125}I)-표지된 항원으로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 측정한다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)] 참조). 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터(MICROTITER)® 멀티-웰 플레이트 (썬도 사이언티픽(Thermo Scientific))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (대략 23°C)에서 차단하였다. 비-흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서는 100 pM 또는 26 pM [^{125}I]-항원을 관심 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하지만; 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 약 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 이후에, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 폴리소르베이트 20 (트윈(TWEEN)-20®)으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (마이크로신티(MICROSCINT)-20™; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TOPCOUNT)™ 감마 계수기 (팩커드)로 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁적 결합 검정에 사용한다.

[0221] 또 다른 실시양태에 따르면, Kd는 비아코어(BIACORE)® 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용하여 측정된다. 예를 들어, 비아코어®-2000 또는 비아코어®-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 검정은 ~10 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 수행된다. 한 실시양태에서, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시수신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨, pH 4.8을 사용하여 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0.2 μM)로 희석한 후에 커플링된 단백질 대략 10 반응 단위 (RU)가 달성되도록 5 μl /분의 유량으로 주사한다. 항원의 주입 후, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응기를 차단한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석물 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25°C에서 0.05% 폴리소르베이트 20 (트윈-20™) 계면활성제를 갖는 PBS (PBST) 내에 주사한다. 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 회합 및 해리 센소그램을 동시에 피팅시켜 회합률 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})을 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)]을 참조한다. 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의한 회합률이 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하는 경우에, 회합률은 분광측정계, 예컨대 정지-유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 장착된 8000-시리즈 SLM-아민코(SLM-AMINCO)™ 분광광도계 (썬모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS, pH 7.2 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340

nm, 16 nm 대역-통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0222] 2. 항체 단편

[0223] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체 단편이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 및 scFv 단편, 및 하기 기재된 다른 단편을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]을 참조한다. scFv 단편의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)]을 참조하고; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체 내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편의 논의에 대해, 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0224] 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]을 참조한다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0225] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 윌섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조).

[0226] 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같은 무손상 항체의 단백질분해적 소화 뿐만 아니라 제조함 숙주 세포 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) 또는 과지)에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0227] 3. 키메라 및 인간화 항체

[0228] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 키메라 항체이다. 특정 키메라 항체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]에 기재되어 있다. 한 예에서, 키메라 항체는 비-인간 가변 영역 (예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 토끼 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 불변 영역을 포함한다. 추가의 예에서, 키메라 항체는 부류 또는 하위부류가 모 항체의 것으로부터 변화된 "부류 스위칭" 항체이다. 키메라 항체는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0229] 특정 실시양태에서, 키메라 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 비-인간 항체는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서 인간에 대한 면역원성이 감소되도록 인간화된다. 일반적으로, 인간화 항체는 HVR, 예를 들어 CDR (또는 그의 일부)이 비-인간 항체로부터 유래되고, FR (또는 그의 일부)이 인간 항체 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 또한 임의로 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 복원하거나 또는 개선하기 위해, 비-인간 항체 (예를 들어, HVR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0230] 인간화 항체 및 그의 제조 방법은 예를 들어 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)]에서 검토되었고, 예를 들어 문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)]; 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, 및 7,087,409; [Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)] (특이성 결정 영역 (SDR) 그래프팅 기재); [Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)] ("재표면화" 기재); [Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)] ("FR 서플링" 기재); 및 [Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 및 Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)] (FR 서플링에 대한 "유도 선택" 접근법 기재)에 추가로 기재되어 있다.

[0231] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최적-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 및 Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포 돌연변이) 프레임워크 영역 또는 인간 배선 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 FR 라이브러리 스크리닝으로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어,

문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0232] 4. 인간 항체

[0233] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0234] 인간 항체는 항원 접중에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로블린 유전자좌를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 또는 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로블린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로블린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 수득하는 방법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술을 기재하는 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; HuMab® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 5,770,429; K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 7,041,870, 및 벨로시마우스(VelociMouse)® 기술을 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0235] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조.) 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체의 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0236] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 목적하는 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다. 항체 라이브러리로부터 인간 항체를 선택하기 위한 기술은 하기 기재된다.

[0237] 5. 라이브러리-유래 항체

[0238] 본 발명의 항체는 목적하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 조합 라이브러리를 스크리닝하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 목적하는 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 검토되어 있고, 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)]에 추가로 기재되어 있다.

[0239] 특정 파지 디스플레이 방법에서, VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 개별적으로 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 클로닝되고, 파지 라이브러리에 무작위적으로 재조합되며, 이는 이어서 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 파지에 대해 스크리닝될 수 있다. 파지는 전형적으로 항체 단편을 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 또는 Fab 단편으로 디스플레이한다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 나이브 레퍼토리를 클로닝 (예를 들어, 인간으로부터)하여, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에

기재된 바와 같이 어떠한 번역화도 없이 광범위한 비-자기 및 또한 자기 항원에 대한 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하고 있는 특허 공개는 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373, 및 미국 특허 공개 번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, 및 2009/0002360을 포함한다.

[0240] 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 또는 항체 단편은 본원에서 인간 항체 또는 인간 항체 단편으로 간주된다.

[0241] 6. 다중특이적 항체

[0242] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체이다. 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 Jag1에 대한 것이고, 다른 것은 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 결합 특이성 중 하나는 Notch2에 대한 것이고, 다른 것은 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Jag1의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Notch2의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 세포독성제를 Jag1 및/또는 Notch2를 발현하는 세포에 국재화시키는데 사용될 수도 있다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로서 제조될 수 있다.

[0243] 다중특이적 항체를 제조하는 기술은 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 제조법 공발현 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)], WO 93/08829, 및 [Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)] 참조), 및 "노브-인-홀" 조작 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항체 Fc-이종이량체 분자를 제조하기 위해 정전기 스티어링 효과를 조작하는 것 (WO 2009/089004A1); 2개 이상의 항체 또는 단편을 가교시키는 것 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980, 및 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)] 참조); 이중특이적 항체를 생산하기 위해 류신 지퍼를 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)] 참조); 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위해 "디아바디" 기술을 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조); 및 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하는 것 (예를 들어 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조); 및 예를 들어 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]에 기재된 바와 같이 삼중특이적 항체를 제조하는 것에 의해 다중특이적 항체가 또한 제조될 수 있다.

[0244] "옥토퍼스 항체"를 비롯하여, 3개 이상의 기능적 항원 결합 부위를 갖는 조작된 항체가 또한 본원에 포함된다 (예를 들어, US 2006/0025576A1 참조).

[0245] 본원의 항체 또는 단편은 또한 Jag1 또는 Notch2 뿐만 아니라 또 다른 상이한 항원에 결합하는 항원 결합 부위를 포함하는 "이중 작용 FAb" 또는 "DAF"를 포함한다 (예를 들어, US 2008/0069820 참조).

[0246] 7. 항체 변이체

[0247] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 아미노산 서열 변이체가 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있고, 단 최종 구축물은 목적하는 특성, 예를 들어 항원-결합을 보유한다.

[0248] a) 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0249] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체가 제공된다. 치환 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 HVR 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 1에 제시된다. 보다 더 실질적인 변화는 "예시적인 치환"의 표제 하의 표 1에 아미노산 측쇄 부류에 관하여 하기 추가로 기재된 바와 같이 제공된다. 아미노산 치환은 관심 항체에 도입되고, 생성물은 목적 달성, 예를 들어 항원 결합 보유/개선, 면역원성 감소 또는 ADCC 또는 CDC 개선에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0250] <표 1>

원래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0251]

[0252] 아미노산은 공통적인 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다:

[0253] (1) 소수성 : 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0254] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0255] (3) 산성: Asp, Glu;

[0256] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0257] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0258] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0259] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0260] 치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 1개 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반한다. 일반적으로, 추가의 연구를 위해 선택된 생성된 변이체(들)는 모 항체에 비해 특정 생물학적 특성 (예를 들어, 증가된 친화도, 감소된 면역원성)의 변형 (예를 들어, 개선)을 가질 것이고/거나 모 항체의 특정 생물학적 특성을 실질적으로 보유할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 예를 들어 본원에 기재된 것과 같은 파지 디스플레이-기반 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성될 수 있는 친화도 성숙 항체이다. 간략하게, 1개 이상의 HVR 잔기가 돌연변이되고, 변이체 항체가 파지 상에 디스플레이되고, 특정한 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다.

[0261] 변경 (예를 들어, 치환)은 예를 들어 항체 친화도를 개선하기 위해 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 HVR "핫스팟", 즉 체세포 성숙 과정 동안 높은 빈도로 돌연변이를 겪은 코돈에 의해 코딩된 잔기 (예를 들어, 문헌 [Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)] 참조), 및/또는 항원 접촉 잔기에서 이루어질 수

있으며, 생성된 변이체 VH 또는 VL은 결합 친화도에 대해 시험된다. 2차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의한 친화도 성숙은 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))]에 기재되어 있다. 친화도 성숙의 일부 실시양태에서, 다양성은 임의의 다양한 방법 (예를 들어, 오류-유발 PCR, 섹서 풀링, 또는 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이 유발)에 의한 성숙을 위해 선택된 가변 유전자로 도입된다. 이어서, 2차 라이브러리가 생성된다. 이어서, 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 친화도를 갖는 임의의 항체 변이체를 확인한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR-지시된 접근법을 수반하며, 여기서 여러 HVR 잔기 (예를 들어, 한 번에 4-6개 잔기)가 무작위화된다. 항원 결합에 수반되는 HVR 잔기는 예를 들어 알려진 스캐닝 돌연변이 유발 또는 모델링을 사용하여 구체적으로 확인될 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3이 종종 표적화된다.

[0262] 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 이러한 변경이 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 하나 이상의 HVR 내에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 결합 친화도를 실질적으로 감소시키지 않는 보존적 변경 (예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 보존적 치환)이 HVR에서 이루어질 수 있다. 이러한 변경은 예를 들어 HVR 내 항원 접촉 잔기의 외부일 수 있다. 상기 제공된 변이체 VH 및 VL 서열의 특정 실시양태에서, 각각의 HVR은 변경되지 않거나, 또는 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 함유한다.

[0263] 문헌 [Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이, 돌연변이 유발을 위해 표적화될 수 있는 항체의 잔기 또는 영역의 확인에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"로 불린다. 이 방법에서, 잔기 또는 표적 잔기의 군 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu)이 확인되고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 항체와 항원과의 상호작용에 영향을 미치는지의 여부를 결정한다. 추가의 치환은 초기 치환에 대한 기능적 감수성이 입증된 아미노산 위치에 도입될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위한 항원-항체 복합체의 결정 구조. 이러한 접촉 잔기 및 이웃하는 잔기는 치환을 위한 후보로 표적화되거나 또는 제거될 수 있다. 변이체는 그들이 목적하는 특성을 함유하는지의 여부를 결정하기 위해 스크리닝될 수 있다.

[0264] 아미노산 서열 삽입은 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0265] b) 글리코실화 변이체

[0266] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0267] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지형 이중안테나 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997)]을 참조한다. 올리고사카라이드는 다양한 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산 뿐만 아니라 이중안테나 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.

[0268] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 갖는 항체 변이체가 제공된다. 예를 들어, 이러한 항체에서 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이 MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 Asn 297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 하이브리드 및 높은 만노스 구조물)의 합에 비해 Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균적인 양을 계산하여 결정된다. Asn297은 Fc 영역의 약 위치 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체의 부차적 서열 변이로 인해 위치 297의 약 ± 3 아미노산 상류 또는 하류, 즉 위치 294 및 300 사이에 위치할 수 있다. 이러한 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (프레스타, 엘.(Presta, L.)); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체와 관련된 공개 문헌의 예는 US 2003/0157108; WO

2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, 프레스타, 엘; 및 WO 2004/056312 A1, 아담스(Adams) 등, 특히 실시예 11에서) 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0269]

이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되며, 예를 들어 여기서 항체의 Fc 영역에 부착된 이중안테나 올리고사카라이드는 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이러한 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체의 예는, 예를 들어 WO 2003/011878 (장-마레(Jean-Mairet) 등); 미국 특허 번호 6,602,684 (우마나(Umana) 등); 및 US 2005/0123546 (우마나 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이러한 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등); WO 1998/58964 (라주, 에스.(Raju, S.)); 및 WO 1999/22764 (라주, 에스.)에 기재되어 있다.

[0270]

c) Fc 영역 변이체

[0271]

특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에 제공된 항체의 Fc 영역에 도입되어 Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0272]

특정 실시양태에서, 본 발명은, 항체의 생체내 반감기는 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)은 불필요하거나 해로운 적용에 대해 바람직한 후보가 되도록 하는, 전부가 아닌 일부 이펙터 기능을 보유하는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합이 결합되어 있지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 결합됨), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 단지 Fc γ RIII만을 발현하고, 반면에 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]의 464페이지의 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 [Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)]; 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 사용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 시토크스 96(CytoTox 96)[®] 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 검정을 수행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고 따라서 CDC 활성이 결합되어 있는지를 확인할 수 있다. 예를 들어, WO 2006/029879 및 WO 2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 클리어런스/반감기 결정을 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).

[0273]

감소된 이펙터 기능을 갖는 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 이러한 Fc 돌연변이체는 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 갖는 소위 "DANA" Fc 돌연변이체 (미국 특허 번호 7,332,581)를 비롯하여, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상에서 치환을 갖는 Fc 돌연변이체를 포함한다.

- [0274] FcR에 대해 개선되거나 감소된 결합을 갖는 특정 항체 변이체가 기재되어 있다. (예를 들어, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조.)
- [0275] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다.
- [0276] 일부 실시양태에서, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]에 기재된 바와 같이 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 생성하는 변경이 Fc 영역에서 이루어진다.
- [0277] 증가된 반감기, 및 모체 IgG를 태아에게 전달하는 역할을 하는 네오나탈 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 개선된 결합을 갖는 항체 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))가 US2005/0014934A1 (힌톤(Hinton) 등)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선하는 내부의 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서 치환, 예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환을 갖는 것을 포함한다 (미국 특허 번호 7,371,826).
- [0278] Fc 영역 변이체의 다른 예에 관하여 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조한다.
- [0279] d) 시스테인 조작된 항체 변이체
- [0280] 특정 실시양태에서, 항체의 1개 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오Mab"를 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 사용하여 항체를 본원에 추가로 기재된 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 1개 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스테인 조작된 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.
- [0281] e) 항체 유도체
- [0282] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 관련 기술분야에 공지되고 용이하게 입수가 가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 하나 초과와 중합체가 부착될 경우에, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 정의된 조건 하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기반으로 결정될 수 있다.
- [0283] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). 방사선은 임의의 파장의 것일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0284] B. 재조합 방법 및 조성물
- [0285] 항체는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Jag1 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 한 실시양태에서,

본원에 기재된 항-Notch2 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 한 이러한 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터를 포함한다 (예를 들어, 이것으로 형질전환된다). 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 단계, 및 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는 항-Jag1 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 단계, 및 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는 항-Notch2 항체를 제조하는 방법이 제공된다.

- [0286] 항-Jag1 항체 또는 항-Notch2 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상의 절차를 사용하여 용이하게 단리하고 서열분석될 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 것에 의함).
- [0287] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우에, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199, 및 5,840,523을 참조한다. (또한 이. 콜라이에서 항체 단편의 발현을 기재하는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조.) 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.
- [0288] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경도가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 완전히 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터의 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.
- [0289] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 다수의 바콜로바이러스 균주가 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 것으로 확인되어 있다.
- [0290] 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0291] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합화된 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 새끼 햄스터 신장세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR⁻ CHO 세포를 비롯한 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

- [0292] C. 검정
- [0293] 본원에 제공된 항체는 관련 기술분야에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.
- [0294] 1. 결합 검정 및 기타 검정
- [0295] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다.
- [0296] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정은 Jag1에의 결합에 대해 항체 A, A-1 또는 A-2와 경쟁하는 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 항체 A, A-1 또는 A-2에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 또 다른 측면에서, 경쟁 검정은 Notch2에의 결합에 대해 항체 B, B-1, B-2 또는 B-3과 경쟁하는 항체를 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 항체 B, B-1, B-2 또는 B-3에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 예시적인 방법의 상세내용은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에서 제공된다.
- [0297] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정된 Jag1을 Jag1에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 항체 A, A-1 또는 A-2) 및 Jag1에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액 중에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 Jag1을 제1 표지된 항체를 포함하나 제2 비표지된 항체는 포함하지 않는 용액 중에서 인큐베이션한다. Jag1에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 과량의 비결합 항체를 제거하고, 고정된 Jag1과 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 Jag1과 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이는 제2 항체가 Jag1에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다. 또 다른 예시적인 경쟁 검정에서, 고정된 Notch2를 Notch2에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 항체 B, B-1, B-2 또는 B3) 및 Notch2에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험되는 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상청액 중에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정된 Notch2를 제1 표지된 항체를 포함하나 제2 비표지된 항체는 포함하지 않는 용액 중에서 인큐베이션한다. Notch2에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 과량의 비결합 항체를 제거하고, 고정된 Notch2와 회합된 표지의 양을 측정한다. 고정된 Notch2와 회합된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이는 제2 항체가 Notch2에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다.
- [0298] 2. 활성 검정
- [0299] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 Notch2 신호전달 억제제 항체, 예컨대 항-Jag1 항체 및 항-Notch2 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 Notch2 활성, 예를 들어 Notch2 신호전달의 억제 또는 감소, Jag1-매개 Notch 신호전달, 예를 들어 Jag1-매개 Notch2 신호전달의 억제 또는 감소를 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다.
- [0300] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Spp1 발현을 억제하거나 감소시키는 그의 능력에 대해 시험된다. 예시적인 검정이 실시예에 제공된다. 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Notch2 신호전달에 반응성인 리포터 유전자의 발현을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Jag1-매개 Notch2 신호전달, 예를 들어 Jag1-매개 Notch2 신호전달에 반응성인 리포터 유전자의 발현을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 한 예시적인 검정에서, Notch 2에 의해 안정적으로 형질감염되거나 또는 다른 Notch 수용체를 함유하는 플라스미드에 의해 일시적으로 형질감염된 NIH-3T3 세포를 Notch-반응성 TP-I (12X CSL) 반딧불이 루시페라제 리포터 및 구성적으로 활성인 레닐라 루시페라제 리포터 (pRL-CMV, 프로메가)에 의해 공동-형질감염시켜 형질감염 효율을 제어한다. 6시간 내지 밤새, 세포가 형질감염으로부터 회복되게 한다. 항체 처리 및 리간드에 의해 안정적으로 형질감염된 NIH-3T3 세포를 사용하여 수용체 세포를 자극한다. 20시간 후에, 반딧불이 및 레닐라 루시페라제를 듀얼 지오(Dual GIo) 루시페라제 검정 시스템 (프로메가)으로 측정한다. 반딧불이 신호를 레닐라 신호로 나누어 각 조건에 대해 복제물을 분석하여 형질감염 효율을 제어한다. 평균 및 표준 편차를 계산하고, 그 값을

리간드 형질감염되지 않은 NIH-3T3 세포에 의해 자극된 공동-배양물에 대해 계산된 값에 대하여 정규화한다.

[0301] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 성장 또는 증식의 억제에 대한 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 본원에 기재된 "세포 사멸" 검정에 의해 예시되는 세포 증식에 대한 특정 검정은 세포 생존율을 측정한다. 한 이러한 검정은 프로메가 (위스콘신주 매디슨)로부터 상업적으로 입수가능한 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)TM 발광 세포 생존율 검정이다. 상기 검정은 대사적으로 활성인 세포의 지표인 ATP 존재량의 정량화를 기반으로 하여 배양물 중 생존 세포의 수를 결정한다. 문헌 [Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88], 미국 특허 번호 6602677을 참조한다. 상기 검정은 자동화된 고처리량 스크리닝 (HTS)에 적용가능하게 하는 96- 또는 384-웰 포맷으로 수행될 수 있다. 문헌 [Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404]을 참조한다. 검정 절차는 단일 시약 (셀타이터-글로[®] 시약)을 배양된 세포에 직접 첨가하는 것을 수반한다. 이는 세포 용해, 및 루시페라제 반응에 의해 생산된 발광 신호의 생성을 야기한다. 발광 신호는 배양물 중에 존재하는 생존 세포 수에 정비례하는 ATP 존재량에 비례한다. 데이터는 발광측정기 또는 CCD 카메라 영상화 장치에 의해 기록될 수 있다. 발광 출력은 상대 광 단위 (RLU)로 표현된다.

[0302] 세포 증식에 대한 또 다른 검정은 미토콘드리아 리덕타제에 의한 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드의 포르마잔으로의 산화를 측정하는 비색 검정인 "MTT" 검정이다. 셀타이터-글로TM 검정과 마찬가지로, 본 검정은 세포 배양물 내에 존재하는 대사적으로 활성인 세포의 수를 나타낸다. 예를 들어, 문헌 [Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, 및 Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882]을 참조한다.

[0303] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 세포 사멸을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 세포 사멸의 유도에 대한 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 검정은 예를 들어 아이오딘화프로피듐 (PI), 트리판 블루 (문헌 [Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 표시되는 막 완전성의 상실을 측정한다. 예시적인 PI 흡수 검정에서, 세포는 10% 열-불활성화 FBS (하이클론(Hyclone)) 및 2 mM L-글루타민으로 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (D-MEM):렘 F-12 (50:50) 중에서 배양된다. 따라서, 상기 검정은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 수행된다. 세포를 100 x 20 mm 디쉬에서 디쉬 당 3 x 10⁶개의 밀도로 시딩하고 밤새 부착되도록 한다. 배지를 제거하고, 이것을 신선한 배지 단독 또는 다양한 농도의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 세포를 3일 동안 인큐베이션한다. 처리 후, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신처리에 의해 탈착시킨다. 이어서, 세포를 1200 rpm에서 5분 동안 4°C에서 원심분리하고, 펠릿을 3 ml의 차가운 Ca²⁺ 결합 완충제 (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 중에 재현탁하고, 35 mm 스테이너-캡핑된 12 x 75 mm 튜브 (튜브 당 1 ml, 처리 군당 3개 튜브) 내로 분취하여 세포괴를 제거한다. 이어서, 튜브에 PI (10 µg/ml)를 넣는다. 샘플을 팩스칸(FACSCAN)TM 유동 세포측정기 및 팩스컨버트(FACSCONVERT)TM 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (백톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석한다. 이어서, PI 흡수에 의해 결정되는 바와 같은, 통계학적으로 유의한 수준의 세포 사멸을 유도하는 항체가 확인된다.

[0304] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 시험관내에서 아포토시스 (프로그램화된 세포 사멸)을 유도하는 그의 능력에 대해 시험된다. 아포토시스를 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 예시적인 검정은 아넥신 결합 검정이다. 예시적인 아넥신 결합 검정에서, 상기 단락에 논의된 바와 같이 세포를 배양하고 디쉬에 시딩한다. 배지를 제거하고, 신선한 배지 단독 또는 0.001 내지 10 µg/ml의 항체 또는 면역접합체를 함유하는 배지로 교체한다. 3일 인큐베이션 기간 후에, 단층을 PBS로 세척하고, 트립신처리에 의해 탈착시킨다. 이어서, 상기 단락에 논의된 바와 같이 세포를 원심분리하고, Ca²⁺ 결합 완충제에 재현탁하고, 튜브 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 표지된 아넥신 (예를 들어 아넥신 V-FITC) (1 µg/ml)을 넣는다. 샘플을 팩스칸TM 유동 세포측정기 및 팩스컨버트TM 셀퀘스트 소프트웨어 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 분석한다. 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 수준의 아넥신 결합을 유도하는 항체가 이와 같이 확인된다. 아포토시스를 유도하는 항체 또는 면역접합체에 대한 또 다른 예시적인 검정은 게놈 DNA의 뉴클레오솜간 분해를 검출하기 위한 히스톤 DNA ELISA 비색 검정이다. 이러한 검정은 예를 들어 세포 사멸 검출 ELISA 키트 (로슈(Roche), 캘리포니아주 팔로 알토)를 사용하여 수행할 수 있다.

[0305] 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위한 세포는 자연적으로 Notch2 및/또는 Jag1을 발현하거나 또는 Notch2 및/또는 Jag1을 발현하도록 조작된 세포 또는 세포주를 포함한다. 이러한 세포는 동일한 조직 기원의 정상 세

포에 비해 Notch2 및/또는 Jag1을 과다발현하는 종양 세포를 포함한다. 이러한 세포는 또한 Notch2 및/또는 Jag1을 발현하는 세포주 (종양 세포주 포함) 및 정상적으로 Notch2 및/또는 Jag1을 발현하지 않지만 Notch2 및/또는 Jag1을 코딩하는 핵산으로 형질감염된 세포주를 포함한다. 임의의 상기 시험관내 검정에 사용하기 위해 본원에서 제공되는 예시적인 세포주는 NIH-3T3 세포를 포함한다.

[0306] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 생체내에서 세포 성장 또는 증식을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 그의 항-Jag1 항체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 그의 항-Notch2 항체는 생체내에서 종양 성장을 억제하는 그의 능력에 대해 시험된다. 생체내 모델 시스템, 예컨대 이종이식편 모델은 이러한 시험에 사용될 수 있다. 예시적인 이종이식편 시스템에서, 인간 종양 세포는 적합하게 면역손상된 비-인간 동물, 예를 들어 무흉선 "누드" 마우스에 도입된다. 본 발명의 항체는 동물에게 투여된다. 종양 성장을 억제하거나 감소시키는 항체의 능력이 측정된다. 상기 이종이식편 시스템의 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 환자로부터의 종양 세포이다. 이러한 이종이식편 모델은 온코테스트 게엠베하(Oncotest GmbH) (독일 프라이베르크)로부터 상업적으로 입수가능하다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 인간 종양 세포주, 예컨대 HepG2, Hep3B, PCL/PRF/5, Snu387, Snu398, Snu423, Snu449, Snu475, Huh-7, HLE, HLF, JHH1, JHH4, JHH5 및 JHH7로부터의 세포이다. 특정 실시양태에서, 인간 종양 세포는 피하 주사에 의해 또는 적합한 부위, 예컨대 유방 지방 패드로의 이식에 의해, 적합하게 면역손상된 비-인간 동물에 도입된다.

[0307] 임의의 상기 검정이 Notch2 신호전달 억제제 대신 또는 이것에 더하여 본 발명의 면역접합체를 사용하여 수행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0308] D. 면역접합체

[0309] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-Notch2 항체 또는 항-Jag1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.

[0310] 한 실시양태에서, 면역접합체는 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); 및 Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579 참조); 메토티렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 약물에 접합되어 있는 항체-약물 접합체 (ADC)이다.

[0311] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터의 것), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토티카 아메리카나(Phytolacca americana) 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함하나 이에 제한되지 않는 효소적 활성 독소 또는 그의 단편에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다.

[0312] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합체의 생산을 위해 이용가능하다. 예는 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체가 검출을 위해 사용되는 경우에, 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함할 수 있거나, 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 또한 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할

수 있다.

[0313] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로hexan-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리 아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술폰-함유 링커 (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0314] 본원의 면역접합체 또는 ADC는 상업적으로 입수가능한 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.), 미국 일리노이주 록포드로부터의) BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술폰-EMCS, 술폰-GMBS, 술폰-KMUS, 술폰-MBS, 술폰-SIAB, 술폰-SMCC, 및 술폰-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 가교 시약으로 제조된 이러한 접합체를 명백하게 고려하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0315] E. 진단 및 검출을 위한 방법 및 조성물

[0316] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 임의의 항체는 생물학적 샘플에서 Notch2 또는 그의 단편 또는 Jag1 또는 그의 단편의 존재를 검출하는데 유용하다. 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 정량적 또는 정성적 검출을 포괄한다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 또는 조직, 예컨대 간세포, 간암 세포 및 간 종양 조직을 포함한다.

[0317] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-Notch2 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 Notch2의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 Notch2 세포내 도메인 (ICD)의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 Notch2에 대한 항-Notch2 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항-Notch2 항체와 접촉시키는 단계, 및 항-Notch2 항체와 Notch2 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-Notch2 항체는 예를 들어 Notch2, 특히 활성화 Notch2가 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 상기 기재된 바와 같은 항-Notch2 항체를 사용하는 요법에 적절한 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0318] 한 실시양태에서, 진단 또는 검출 방법에 사용하기 위한 항-Jag1 항체가 제공된다. 추가 측면에서, 생물학적 샘플에서 Jag1의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플에서 Jag1 세포내 도메인 (ICD)의 존재를 검출하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 Jag1에 대한 항-Jag1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 항-Jag1 항체와 접촉시키는 단계, 및 항-Jag1 항체와 Jag1 사이에 복합체가 형성되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다. 한 실시양태에서, 항-Jag1 항체는 예를 들어 Jag1이 환자의 선택을 위한 바이오마커인 경우에 상기 기재된 바와 같은 항-Jag1 항체를 사용하는 요법에 적절한 대상체를 선택하는데 사용된다.

[0319] 본 발명의 항체를 사용하여 진단될 수 있는 예시적인 장애는 간암, 특히 간세포성 암종을 포함한다.

[0320] 특정 실시양태에서, 표지된 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체가 제공된다. 표지는 직접적으로 검출되는 표지 또는 모이어티 (예컨대, 형광, 발색, 전자-밀집, 화학발광 및 방사성 표지) 뿐만 아니라 간접적으로, 예를 들어 효소적 반응 또는 분자 상호작용을 통해 검출되는 모이어티, 예컨대 효소 또는 리간드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 표지는 방사성동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, 및 ¹³¹I, 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움벨리페론, 루시페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제, 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 염료 전구체를

산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소, 예컨대 HRP, 락토퍼옥시다제, 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0321]

F. 제약 제제

[0322]

본원에 기재된 바와 같은 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체의 제약 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 이러한 항체를 하나 이상의 임의적인 제약상 허용되는 담체 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 비롯한, 특정의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다.

[0323]

예시적인 동결건조 항체 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 항체 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다.

[0324]

본원의 제제는 또한 치료되는 특정한 적응증에 필요한 하나 초과활성 성분, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체와 함께 화학요법제 또는 또 다른 치료 항체를 추가로 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제는 항-Notch2 항체 및 항-Jag1 항체를 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0325]

활성 성분은 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 각각 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0326]

지속-방출 제제가 제조될 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다.

[0327]

생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0328]

G. 치료 조성물

[0329]

또한, 본원에서 (a) 용기; (b) 용기 내에 수용된, 항-Notch2 항체 또는 항-Jagged1 항체 및 간암의 치료를 위한 담체를 포함하는 물질의 조성물; 및 (c) 간암의 치유적 치료 또는 진단 검출을 위한 물질의 조성물의 사용을 지시하는, 용기에 부착되어 있는 라벨 또는 용기와 함께 포함되어 있는 포장 삽입물을 포함하는 제조품이 제공된다.

[0330]

본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 기타 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 적어도 하나의 추가의 치료제와 공-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제이다.

- [0331] 상기 언급된 이러한 조합 요법은 조합 투여 (2종 이상의 치료제가 동일한 또는 개별 제제에 포함됨), 및 개별 투여를 포괄하고, 이러한 경우에 본 발명의 항체의 투여는 추가의 치료제 및/또는 치료제들의 투여 전에, 그와 동시에 및/또는 그 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 항-Notch2 또는 Jag1 항체의 투여 및 추가의 치료제의 투여는 서로 약 1개월 내에, 또는 약 1, 2 또는 3주 내에, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 내에 이루어진다. 또한, 본 발명의 항체는 방사선 요법과 조합되어 사용될 수도 있다.
- [0332] 본 발명의 항체 (및 임의의 추가의 치료제)는 비경구, 폐내 및 비강내를 비롯하여 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 목적하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 단일 투여 또는 다양한 시점에 걸친 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 투여 스케줄이 본원에서 고려된다.
- [0333] 본 발명의 항체는 우수한 의료 행위와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료할 특정한 장애, 치료할 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 진료의에게 공지된 다른 인자를 포함한다. 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로 해당 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 임의의 경로에 의해 사용된다.
- [0334] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로, 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합되어 사용되는 경우)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의존할 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상의 목적하는 억제가 일어날 때까지 지속될 것이다. 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.
- [0335] 임의의 상기 제제 또는 치료 방법이 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체를 대신하여 또는 이에 더하여 본 발명의 면역 접합체를 사용하여 수행할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0336] H. 제조품
- [0337] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 회합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 예를 들어, (a) 용기; (b) 용기 내에 수용된, 항-Notch2 항체 또는 항-Jagged1 항체 및 간암의 치료를 위한 담체를 포함하는 물질의 조성물; 및 (c) 간암의 치유적 치료 또는 진단 검출을 위한 물질의 조성물의 사용을 지시하는, 용기에 부착되어 있는 라벨 또는 용기와 함께 포함되어 있는 포장 삽입물을 포함하는 제조품이 제공된다.
- [0338] 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 조성물을 그 자체로 수용하거나 또는 상태의 치료, 예방 및/또는 진단에 유효한 또 다른 조성물과 조합하여 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 Notch2 신호전달 억제제, 예를 들어 항-Notch2 항체 또는 항-Jag1 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 간의 증식성 장애, 예컨대 간암을 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에 본 발명의 항체를 포함하는 조성물이 수용된 제1 용기; 및 (b) 그 내부에 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물이 수용된 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이러한 실시양태에서의 제조품은, 조성물이 간의 증식성 장애, 예컨대 간암을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정박테리아 주사용수 (BWF), 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 비롯하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

- [0339] 임의의 상기 제조품은 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 대신 또는 이에 더하여 본 발명의 면역접합체를 포함할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0340] III. 실시예
- [0341] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제공된 일반적 설명을 고려하여 다양한 다른 실시양태가 실시될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0342] 실시예 1
- [0343] 간암의 유전 모델
- [0344] FVB-N 마우스 (찰스 리버(Charles River), 홀리스터)에 대해, 이전에 기재된 바와 같이 (Ho et al., C., Hepatology 55:833-845 (2012)) Ras, AKT, 및 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty) 트랜스포사제 코딩 플라스미드를 유체역학적으로 꼬리 정맥 주사하였다. 간략하게, 10ug의 pT3-CAGGS-NRasV12, 10ug의 pT3-EF1A-AKT, 및 0.8ug CMV-SB (Ho et al., Hepatology 55:833-845 (2012); Yant et al., Mol. Cell. Biol. 24:9239-9247 (2004))를 대략 2mL의 염수 용액 (0.9% NaCl) 중에 희석시키고, FVB-N 마우스의 외측 꼬리 정맥에 5 내지 8초 내에 주사하였다.
- [0345] 간암의 발생을 모델링하기 위해, 마우스에 대해 상기 기재된 바와 같이, 그리고 이전에 기재된 바와 같이 (Ho et al., C., Hepatology 55:833-845 (2012)) 종양원성 Ras 및 구성적으로 활성화된 AKT를 슬리핑 뷰티 트랜스포사제와 함께 코딩하는 플라스미드로 유체역학적으로 꼬리 정맥 주사하였다. 이 모델은 간세포의 효율적이고 안정한 형질감염 및 형질감염된 종양유전자의 신뢰할 만한 발현을 가능하게 한다. 유체역학적 꼬리 정맥 주사 후 5주 내에, 마우스에서 수많은 간내 종양 덩어리가 발생하였다. 대부분의 정상 간 실질이 종양 상피에 의해 디스플레이되었고, 이들 마우스의 간은 그의 원래 크기의 10배만큼 확대되었다. 이전의 보고와 일치하게, 이들 마우스에서 발생한 종양은 간세포성 암종 (HCC)과 담관암종 (CC)을 비롯하여, 넓은 범위의 간 종양 유형을 포함하였다. 종양 결절의 대략 80%는 간세포성 암종에 대한 조직병리학적 기준을 충족시켰고, 20%는 담관암종으로의 확인을 위한 조직병리학적 기준을 충족시켰다.
- [0346] 각각의 간은 매우 많은 종양을 포함하였고, 이들 각각은 주어진 마커 또는 마커의 조합, 예컨대 AFP (도 1a) 및 EpCAM (도 1c)을 발현하였다. 일부 종양은 AFP 및 EpCAM을 둘 다 발현하였다 (도 1b). 이 모델에서 종양은 HCC- 및 CC-특이적 종양 마커의 발현이 달랐다 (도 1a). HCC에 대해 특이적인 알파-태아단백질 (AFP)의 발현은, 정상 비-종양-보유 간에서 1% 미만으로 검출되는 것과 비교하여, 종양-보유 간에서 세포의 약 12.8%에서 검출되었다 (도 1d). 담관암종의 마커인 EpCAM의 발현 (도 1b)은 이 모델에서 덜 만연하였고, 정상 비-종양-보유 간에서 약 1% 검출되는 것과 비교하여, 모든 간 세포에서 평균 약 5%로 검출되었다. HCC- 및 CC-특이적 마커를 둘 다 발현하는 종양이 또한 관찰되었다 (도 1c). 이들 조합 HCC-CC (cHCC-CC) 종양은 특히 공격적인 임상 양상을 특징으로 하고 (American-Cancer-Society, 2012, Cancer Facts & Figures 2012, Atlanta: American Cancer Society), 간 전구 세포와 유전자 발현 패턴을 공유한다 (Coulouarn et al., Carcinogenesis 33:1791-1796 (2012)).
- [0347] 실시예 2
- [0348] Notch2 신호전달의 활성화
- [0349] 간암이 Notch2 활성화와 연관이 있는지를 결정하기 위해, AKT/Ras HTV 마우스의 간에서 생성된 종양에 대해 면역형광 분석을 수행하였다. 간 조직을 포매시키고, O.C.T.™ 동결 배지 (티슈-텍(TISSUE-TEK)®) 중에서 동결시키고, 8µm로 냉동절편화하였다. 절편을 4% 파라포름알데히드 (PFA) 중에 고정시키고, Notch2 (셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)), EpCAM (바이오레전드(BioLegend)), 및 AFP (R&D 시스템즈(R&D Systems))에 대한 1차 항체를 사용하여 염색하였다. 영상 분석을 위해, 면역형광-염색된 슬라이드를 아리오 (Ariol) 슬라이드 스캐닝 시스템 (레이카(Leica))을 사용하여 스캐닝하였다.
- [0350] 핵 Notch2의 면역형광 검출에 의한 결정 시 높은 수준의 Notch2 활성화가 AFP⁺/EpCAM⁺ 종양에서 관찰되었고 (도 1e), EpCAM⁺ 종양에서는 더 낮은 정도로 관찰되었다 (도 1e, 도 1f). 다른 종양 세포 유형에서는 활성화 Notch2에 대해 덜 우세한 염색이 관찰되었다 (도 1e).
- [0351] 실시예 3

- [0352] 항체의 생성
- [0353] Notch2 신호전달이 특히 이종 양성 종양에서 간암의 발생 또는 성장을 유도하는데 중요한지를 결정하기 위해, 마우스에 대해 실시예 1에 기재된 바와 같은 AKT/Ras 구축물로 유체역학적 꼬리 정맥 주사하고, 항-Notch2 항체, 항-Jag1 항체 또는 이소형 대조군 (항-폐지풀) 항체로 치료하였다.
- [0354] a. 항-Jagged 1 항체를 확인하기 위한 라이브러리 분류 및 스크리닝
- [0355] M13 박테리오파지 입자의 표면 상에 디스플레이되는 Fab 단편을 패닝하기 위해, 선택된 상보성 결정 영역 내에 인간 IgG 레퍼토리의 천연 다양성을 모방한 합성적 다양성을 갖는 인간 파지 항체 라이브러리를 사용하였다. 인간 Jag1-DSL-EGF1-4 (도 10)를 라이브러리 분류를 위한 항원으로 사용하였다. 눈크 96 웰 맥시소르프 (Maxisorp) 이뮤노플레이트를 밤새 4°C에서 표적 항원 (10 µg/ml)으로 코팅하고, 1시간 동안 실온에서 파지 차단 완충제 PBST (포스페이트-완충 염수 (PBS) 및 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% (v/v) 트윈-20)로 차단하였다. 항체 파지 라이브러리 VH (예를 들어, 문헌 [Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004] 참조) 및 VH/VL (문헌 [Liang et al., JMB. 366: 815-829, 2007] 참조)을 항원 플레이트에 개별적으로 첨가하고, 밤새 실온에서 인큐베이션하였다. 다음날 항원-코팅된 플레이트를 PBT (0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS)로 10회 세척하고, 결합된 파지를 50mM HCl 및 500mM NaCl로 30분 동안 용리시키고, 동등 부피의 1 M 트리스 염기 (pH7.5)로 중화시켰다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에서 증폭시켰다. 후속 선택 라운드 동안, 항체 파지와 항원-코팅된 플레이트의 인큐베이션을 2-3시간으로 줄이고, 플레이트 세척의 엄격성을 서서히 증가시켰다.
- [0356] 4개 라운드의 패닝 후에, 유의한 풍부화가 관찰되었다. 96개의 클론을 각각 VH 및 VH/VL 라이브러리 분류로부터 골라내어 이것이 인간 Jagged 1에 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하였다. 이들 클론의 가변 영역을 PCR 서열분석하여 특유의 서열 클론을 확인하였다. 스팟 경쟁 ELISA를 사용하여 파지 항체의 친화도를 순위평가하였다. 추가로, 경쟁적 파지 결합 ELISA를 사용하여 파지 항체 IC50 값을 결정하였다. 인간 Jagged 1 (Jagged 2는 아님) 또는 Jagged 1 및 Jagged 2 둘 다에 특이적으로 결합하는 특유의 파지 항체를 선택하고, 시험관내 세포 검정에서의 평가를 위해 전장 IgG로 재포맷하였다.
- [0357] 개개의 클론의 V_L 및 V_H 영역을, 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 pRK 포유동물 세포 발현 벡터 (pRK.LPG3.HumanKappa) 및 전장 인간 IgG1 불변 도메인을 코딩하는 발현 벡터 (pRK.LPG4.HumanHC)에 각각 클로닝하여 (Shields et al., J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604) 관심 클론을 IgG로 재포맷하였다. 이어서 항체를 포유동물 CHO 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질 A 칼럼으로 정제하였다.
- [0358] b. V_H 또는 V_HV_L 라이브러리로부터 유래된 클론의 친화도 개선을 위한 라이브러리의 구축
- [0359] 파지미드 pV0350-2b로부터 유래된 파지미드 pW0703 (문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004)], 모든 CDR-L3 위치에 정지 코돈 (TAA)을 함유하고, M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이함)을 친화도 성숙을 위해 V_H 라이브러리로부터의 관심 클론의 중쇄 가변 도메인 (V_H) 그래프팅을 위한 라이브러리 주형으로 제공하였다. 하드 및 소프트 무작위화 전략 둘 다를 친화도 성숙에 사용하였다. 하드 무작위화의 경우에, 3개의 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 1개의 경쇄 라이브러리를 천연 인간 항체를 모방하도록 설계된 아미노산을 사용하여 무작위화하였고, 설계된 DNA 축증성은 문헌 [Lee et al. (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004))]에 기재된 바와 같았다. 선택된 위치에서 대략 50%의 돌연변이 비율을 도입하는 소프트 무작위화 조건을 달성하기 위해, 돌연변이유발 DNA를 야생형 뉴클레오티드를 선호하는 염기의 70-10-10-10 혼합물로 합성하였다 (Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)). 소프트 무작위화를 위해, CDR-L3의 위치 91-96, CDR-H1의 30-33, 35, CDR-H2의 50, 52, 53-54, 및 56, CDR-H3의 95-98에서의 잔기를 표적화하고; CDR 루프의 3개의 상이한 조합, H1/L3, H2/L3, 및 H3/L3을 무작위화를 위해 선택하였다.
- [0360] V_HV_L 라이브러리 기원의 클론의 경우에, 각각의 CDR에 4개의 정지 코돈 (TAA)을 함유하고 M13 박테리오파지의 표면 상에 1가 Fab를 디스플레이하는 파지미드를 개별적으로 생성하고, 친화도 성숙 라이브러리의 구축을 위한 쿼터 돌연변이유발 주형으로 제공하였다. CDR-L3의 다양성이 나일브 라이브러리로 구축되었으므로, V_HV_L 라이브러리로부터 유래된 클론의 경우에는 오직 소프트 무작위화 전략만을 사용하였다. 소프트 무작위화 조건을 달성하기 위해, CDR-L1의 위치 28-31, CDR-L2의 50, 53-55, CDR-L3의 91-96, CDR-H1의 30-35, CDR-H2의 50-56, CDR-H3의 95-100에서의 잔기를 표적화하고; CDR 루프의 4개의 상이한 조합, H1/L3*, H2/L3*, 및 H3/L3* 및 L1/L2/L3* (여기서 *는 주형 상의 정지 코돈의 위치를 표시함)를 무작위화를 위해 선택하였다.

- [0361] c. 친화도 개선을 생성하기 위한 파지 분류 전략
- [0362] 친화도 개선 선택을 위해, Jag1 항원을 한계 시약 조건 하에 먼저 비오틴화하였다. 파지 라이브러리에 대해 1 라운드의 플레이트 분류를 행하고, 증가하는 엄격성으로 5 라운드의 용액 분류를 행하였다. 제1 라운드의 플레이트 분류를 위해, 10ug/ml 항원을 먼저 맥시소르프 플레이트에 코팅하고, 차단 완충제 (PBS 중 1% BSA 및 0.05% 트윈20)로 사전 차단시켰다. 항원 플레이트에 대해 차단 완충제 중 3 O.D./ml의 파지 투입량으로 3시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 PBS-0.05% 트윈20으로 10회 세척하였다. 결합된 파지를 150ul/웰 50mM HCl, 500mM KCl로 30분 동안 용리시킨 다음, 50ul/웰의 1M 트리스 pH8에 의해 중화시키고, 적정하고, 다음 라운드를 위해 번식시켰다. 후속 라운드에서, 파지 라이브러리의 패닝을 용액 상에서 수행하였으며, 여기서 파지 라이브러리를 1% 슈퍼블록(Superblock) (피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)) 및 0.05% 트윈20을 함유하는 100 μl 완충제 중 100 nM 비오틴화 표적 단백질 (농도는 모 클론 파지 IC50 값에 기초함)과 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 1% 슈퍼블록으로 추가로 10X 희석하고, 100 μl/웰을 30분 동안 실온에서 부드럽게 진탕시키면서 뉴트라비딘-코팅된 웰 (10 μg/ml)에 적용하였다. 배경 결합을 결정하기 위해, 파지를 함유하는 대조 웰을 뉴트라비딘-코팅된 플레이트 상에서 포획하였다. 이어서, 결합된 파지를 세척하고, 용리시키고, 제1 라운드에 대해 기재된 바와 같이 번식시켰다. 추가의 5개 라운드의 용액 분류를 증가하는 선택 엄격성으로 함께 수행하였다. 이들 중 제1 커플 라운드는 비오틴화 표적 단백질 농도를 100nM로부터 0.1nM까지 낮춤으로써 온-레이트 선택을 위한 것이고, 이들 중 마지막 2개의 라운드는 과량의 비-비오틴화 표적 단백질 (300 내지 1000배 초과)을 첨가하여 실온에서 보다 약한 결합제와 경쟁시킴으로써 오프-레이트 선택을 위한 것이다.
- [0363] d. 고처리량 친화도 스크리닝 ELISA (단일 스팟 경쟁)
- [0364] 콜로니를 제6 라운드의 스크리닝으로부터 골라내었다. 콜로니를 96-웰 플레이트 (팔콘(Falcon))에서 50 μg/ml 카르베니실린 및 1×10^{10} /ml M13K07을 갖는 150 μl/웰의 2YT 배지 중에서 밤새 37°C에서 성장시켰다. 동일한 플레이트로부터, XL-1 감염된 모 파지의 콜로니를 대조군으로서 골라내었다. 96-웰 눈크 맥시소르프 플레이트를 PBS 중 100 μl/웰의 Jag1 또는 Jag2 (0.5 μg/ml)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 PBS 20 중 1% BSA 및 0.05% 트윈20 150 μl로 1시간 동안 차단시켰다.
- [0365] 35 μl의 파지 상청액을 5nM Jag1 또는 Jag2의 존재 또는 부재 하의 75 μl의 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정) 완충제 (0.5% BSA, 0.05% 트윈20을 함유하는 PBS)로 희석하고, 1시간 동안 실온에서 F 플레이트 (눈크)에서 인큐베이션되게 하였다. 95 μl의 혼합물을 항원 코팅된 플레이트로 나란히 이동시켰다. 플레이트를 15분 동안 부드럽게 진탕시키고, PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 결합을 ELISA 완충제 중 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체 (1:2500)를 첨가함으로써 정량화하고, 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 이어서, 100 μl/웰의 퍼옥시다제 기질을 웰에 첨가하고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 100 μl 0.1M 인산 (H_3PO_4)을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 중지시키고, 5분 동안 실온에서 인큐베이션되게 하였다. 표준 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 각 웰의 황색의 O.D. (광학 밀도)를 결정하였다. 모 파지의 웰 (100%)의 OD_{450nm} 감소 (%)와 비교하여, 50%보다 낮은 OD_{450nm} 감소 (%)를 갖는 클론을 서열 분석을 위해 골라내었다. 특유의 클론을 파지 제조를 위해 선택하여, 각각의 모 클론과 비교하여 Jag1에 대한 결합 친화도 (파지 IC50)를 결정하였다. 이어서, 가장 친화도-개선된 클론을 항체 생산을 위해 인간 IgG1로 재포맷시켰다.
- [0366] 모 항체 A 및 친화도 성숙 항체 A-1 및 A-2는 인간 및 무린 Jag1, 특히 Jag1 DSL-EGF1-4에는 특이적으로 결합하였지만, 인간 또는 무린 Jag 2에는 그렇지 않았다.
- [0367] 특정 항-Notch2 NRR 항체의 생성 및 특성화는 이전에 기재된 바 있다. PCT 출원 번호 PCT/US09/059028을 참조한다.
- [0368] 실시예 4
- [0369] Notch2 신호전달 억제제에 의한 치료는 중양 부담을 감소시킨다
- [0370] 실시예 1에 기재된 바와 같은 AKT/Ras HTV 마우스를 유체역학적 꼬리 정맥 주사 당일로부터 항-Notch2 항체 (15mg/kg, 1x/주), 항-Jag1 항체 (10mg/kg, 1x/주) 또는 이소형 대조군 항체로 치료하였다. 간을 영상화하고, 부검 시 표준 실험실 저울 상에서 칭량하였다. 대조군 항체로 치료된 마우스는 유체역학적 꼬리 정맥 주사 5주 후에 대형 중양 부담이 발생하였고 (도 2a), 그의 간은 정상, 비-중양-보유 마우스에서의 1.2g 또는 체중의

5.8%에서, 약 8.9g 또는 체중의 대략 31%로 크기가 증가하였다 (도 2b). 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체에 의한 치료는 종양 발생을 유의하게 방해하였다 (도 2a 및 b; $p < 0.0001$, $n > 8$). 항-Notch2 항체로 치료된 마우스에서는 유의하게 더 작은 종양 부담이 발생하였고, 그의 간은 평균적으로 5.1g 또는 체중의 19.3%로 성장하였다 (도 2b). 항-Jag1 치료는 훨씬 더 큰 효과를 가졌다. 이들 마우스에서 최종 간 중량은 평균적으로 4.3g 또는 체중의 15.8%였다 (도 2b).

[0371] 면역형광에 의한 핵 Notch2의 검출에 의한 결정 시 EpCAM⁻ 종양에서보다 Notch2 신호전달이 더욱 매우 활성화되는 종양의 EpCAM⁺ 및 AFP⁺/EpCAM⁺ 하위세트 (도 1e)는 Notch2 경로 억제에 대해 매우 감수성이었다. EpCAM⁺ 종양 (AFP⁻/EpCAM⁺ 및 AFP⁺/EpCAM⁺ 종양)은 항-Notch2 항체 또는 항-Jag1 항체에 의한 치료 후에 면적이 매우 감소되었다 (도 3a, 도 3b). Notch2 신호전달은 AFP⁺/EpCAM⁻ 종양에서는 매우 활성화되지 않았고 (도 1e), 이는 이들 종양이 Notch2 경로 억제에 의해 영향을 받지 않을 수 있음을 시사하였다. 그러나, 예상과 달리, 항-Notch2 치료 및 항-Jag1 치료 둘 다는 AFP⁺ 종양 면적에서 유의한 감소를 생성하였다 (도 3c). 종합하면, 이들 결과는 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 치료가 이러한 간암 모델에서 넓은 범위의 간 종양의 발생을 차단함을 입증한다. 항-Notch2 및 항-Jag1 항체에 의한 성공적인 치료는, 항-Notch2 및 항-Jag1 항체 치료 후의 AFP 및 EpCAM 염색에서의 유의한 감소에 의해 나타내어지는 바와 같이, HCC-유사 및 담관암종-유사 종양 둘 다를 비롯하여 전반적인 종양 부담의 감소를 생성하였다.

[0372] 실시예 5

[0373] Notch1 및 Notch3의 억제

[0374] Jag1의 억제는 Notch2의 억제와 유사한 효과를 가졌고, 이는 Jag1 및 Notch2가 동일한 경로에서 작용하며, 특히 Jag1은 종양 형성을 지지하는데 있어서 Notch2에 대한 리간드로서 작용함을 시사한다. 다른 Notch 수용체의 억제가 또한 간암 형성 또는 성장을 감소시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 마우스에 대해 실시예 1에 기재된 바와 같이 Ras/AKT 구축물로 유체역학적 꼬리 정맥 주사하고, 항-Notch1 길항제 항체 (10mg/kg, 1x/주) 또는 항-Notch3 길항제 항체 (30mg/kg, 3x/주)로 치료하였다. 항-Notch1 항체에 의한 치료는 이소형 대조군과 비교하여 Ras/AKT HTV 마우스에서 간 중량을 감소시킨 반면에, 항-Notch3 항체에 의한 치료는 간 중량에 유의하게 영향을 미치지 않았다 (도 2d; $p < 0.02$, $n \geq 7$). 항-Notch2 또는 항-Jag1 치료는 EpCAM 전사체의 수준을 감소시키는 반면에 (도 3e, $p < 0.005$, $n \geq 7$), Notch1의 억제는 간에서 EpCAM 양성 종양의 단면적을 증가시켰고 (도 3d, 도 3e, $p < 0.02$, $n \geq 7$) 담관암종 마커 시토크라틴 19의 발현을 증가시켰다 (CK19; 도 3f). 항-Notch1 또는 항-Notch3에 대한 길항제 항체에 의한 치료는 간 전구 세포 및 전구 세포-유사 종양 마커 및 담관암종-유사 종양 마커인 Sox9의 발현에는 영향을 미치지 않은 반면에, 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체에 의한 치료는 Sox9를 mRNA (도 3g) 및 단백질 수준 (도 3h) 둘 다에서 매우 감소시켰다.

[0375] 따라서, 항-Notch1 또는 항-Notch3 항체에 의한 치료는 종양 부담을 유의하게 감소시키지 않았다. 실제로, Notch1의 억제는 EpCAM⁺ 담관암종-유사 종양의 개수 및 그것이 점유하는 단면적의 증가를 유발하였다. 이들 결과는, 항-Notch1 치료 후의 증가된 담관암종-유사 병변의 관찰과 종합하여, 간암에서 Notch2 및 Notch1의 정반대 역할이 존재한다는 결론을 추가로 지지하였다.

[0376] 실시예 6

[0377] 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 치료는 Notch2 활성화를 감소시킨다

[0378] 면역조직화학 분석을 위해, 조직을 10% 중성 완충 포르말린 중에 고정시키고, 파라핀 포매하고, 절편화하였다. 4 μm -두께의 포르말린-고정된 파라핀 포매 인간 조직을 염색하였다. Jag1 IHC 염색을 위해, 모든 단계를 벤타나(Ventana) 검출 시약을 사용하는 벤타나 디스커버리(Ventana Discovery) XT 자동염색기 (벤타나 메디칼 시스템즈(Ventana Medical Systems), 애리조나주 투산) 상에서 수행하였다. 조직 절편을 EZPrep 용액 중에서 탈파라핀화하고, 표준 인큐베이션 시간을 사용하여 셀 컨디셔너 1(Cell Conditioner 1)로 전처리를 행하였다. 이어서 조직 절편을 염소 폴리클로날 항-Jag1 일차 항체 (산타 크루즈 바이오테크놀로지 인크(Santa Cruz Biotechnology Inc), 캘리포니아주 산타 크루즈; Cat# sc-6011) 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 와 함께 32분 동안 실온에서 인큐베이션한 다음, 비오틴화 토끼 항-염소 IgG 항체 (벡터 랩스(Vector Labs), 캘리포니아주 벨링게임) 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 와 함께 32분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 일차 및 이차 항체 둘 다를 3% BSA 중의 10% 정상 인간 혈청 (잭슨 이뮤노리서치) 중에서 희석시켰다. 이어서 절편을 항-토끼 OmniMAP-HRP 시약과 함께 16분 동안 실온에서

인큐베이션하였다.

- [0379] Notch 2 IHC를 위해, 모든 단계를 벤타나 검출 시약을 사용하는 벤타나 디스커버리 XT 플랫폼 (벤타나 메디칼 시스템즈, 애리조나주 투산) 상에서 수행하였다. 절편을 EZ Prep를 사용하여 탈파라핀화하고, 표준 인큐베이션 시간을 사용하여 셀 컨디셔너 1로 전처리를 행하였다. 이어서 절편을 토끼 모노클로날 항-Notch2 일차 항체 (클론 D76A6, 셀 시그널링 테크놀로지스(Cell Signaling Technologies), 매사추세츠주 비벌리) 8 µg/ml와 함께 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 다음, 항-토끼 OMNIMAP-HRP 시약과 함께 32분 동안 인큐베이션하였다.
- [0380] Hes1을 위해, 모든 단계를 다코(DAKO) 세척 완충제 및 다코 표적 검색 용액을 사용하는 다코 자동염색기 상에서 수행하였다. 절편을 탈파라핀화하고, 재-수화시킨 다음, 다코 표적 검색 용액과 함께 99°C에서 20분 동안 인큐베이션하고, 3% H2O2로 4분 동안 켄칭시킨 다음, 아비딘 비오틴 차단 키트 (백터 래보러토리즈: cat#sp-2001)로 차단시켰다. 절편을 1µg/ml 항-HES-1 (클론 NM1; MBL 인터내셔널(MBL International))과 함께 실온에서 45분 인큐베이션한 다음, 5µg/ml 이차 항체 Bt-Dk 항-라트 (잭슨이뮤노리서치)와 함께 15분 동안, 이어서 증폭 희석제 중 비오틴화-티라미드 (1:50)와 함께 3분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 발색제 검출 및 대조염색을 위해 절편을 DAB 및 헤마톡실린 II 시약과 함께 인큐베이션하였다. 슬라이드를 탈수시키고, 크실렌 중에서 청정화하고, 커버슬립을 덮었다. 이어서 발색제 검출 및 대조염색을 위해 모든 절편을 DAB 및 헤마톡실린 II 시약과 함께 인큐베이션하였다. 슬라이드를 탈수시키고, 크실렌 중에서 청정화하고, 커버슬립을 덮었다. 영상 분석을 위해, 나노주머(Nanozoomer) 슬라이드 스캐닝 시스템 (하마마츠(Hamamatsu))을 사용하여 면역조직화학 슬라이드를 스캐닝하였다.
- [0381] 택맨(TaqMan) 프로브 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))와 함께 7900 HT RT-PCR 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈)을 사용하는 1단계 반응용 택맨 1-단계 RT-PCR 키트를 사용하여 정량적 실시간 PCR (QRT-PCR)을 수행하였다. 사용된 프로브는 Notch1 (Mm00435245_m1, Hs01062014_m1), Notch2 (Mm00803077_m1, Hs01050719_m1), Notch3 (Mm00435270_m1, Hs01128541_m1), Notch4 (Mm00440525), Jag1 (Mm00496902_m1), Jag2 (Mm01325629_m1), DLL1 (Mm01279269_m1), DLL3 (Mm00432854_m1), DLL4 (Mm00444619), Hey1 (Mm00516555_m1), CK19 (Mm00492980_m1) 및 Sox9 (Mm00448840_m1)였다.
- [0382] 종양 형성에 대한 Notch2 및 Jag1 억제의 광범위한 효과와 일치되게, 면역형광에 의한 핵 Notch2 단백질의 검출에 의해 결정된 바와 같이, Notch2 신호전달은 항-Notch2 또는 항-Jag1에 의한 치료 후에 종양-보유 간 전반에서 유의하게 감소되었다 (도 4a; $p < 0.05$, $n \geq 7$). 이러한 감소는, 정량적 RT-PCR에 의한 결정 시 Notch2 발현의 전체 수준이 변화되지 않았기 때문에, Notch2 단백질의 활성화에 대한 직접적인 효과로 인한 것으로 보인다. Notch2 활성화를 차단하는 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 치료와 일관되게, 면역염색은 Notch2 신호전달 경로의 하류 전사 표적인 Hes1에 대해 감소되었다. 대조군-치료된 Ras/AKT HTV 간은 도 4d에서 높은 수준의 Hes1 염색을 나타내었다. 그러나, 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체에 의한 치료는 항체-치료된 간에서 Notch2 신호전달의 효과적인 차단과 일관되게 Hes1 염색을 유의하게 감소시켰다 (도 4c, 도 4d, $p \leq 0.0001$, $n > 10$). Notch2 신호전달이 차단됨을 확인시켜주는 것으로, 정량적 RT-PCR 분석은 Notch 경로 표적 유전자 HeyL가 또한 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 치료에 의해 강력하게 감소됨을 밝혀내었다 (도 4e, $p < 0.0001$, $n > 7$).
- [0383] 각각의 경우에, 항-Jag1 항체 치료는 항-Notch2 항체 치료와 동일한 효과를 가졌고, 이는 Jag1이 간암 형성 및 성장을 지지하는데 있어서 주로 Notch2를 통해, 즉 그의 리간드로서 작용한다는 결론을 추가로 지지한다. 종합하면, 이들 결과는 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체에 의한 치료가 Notch2 활성화의 감소를 생성함을 입증한다.
- [0384] 실시예 7
- [0385] Notch 신호전달 경로 성분의 발현에 대한 Notch 억제 항체의 효과
- [0386] AKT/Ras HTV 마우스를 Notch1 (10mg/kg, 1x/주), Notch2 (10mg/kg, 2x/주), Notch3 (30mg/kg, 3x/주), 또는 Jag1 (10mg/kg, 1x/주)에 대한 길항제 항체로 치료하였다. 항-웨이풀 항체를 음성 대조군으로서 30mg/kg, 3x/주로 투여하였다. 5주 후에, 간을 수거하고 단리된 RNA에 대해 정량적 실시간 PCR을 수행하여 Notch 신호전달 경로 성분의 전사체에 대한 치료의 효과를 결정하였다. 개개의 Notch 패밀리 수용체의 역할은 다른 Notch 수용체 패밀리 구성원의 발현에서 보상적 증가를 생성하지 않았다.
- [0387] 상기 기재된 바와 같이, 개개의 Notch 수용체, Notch1, Notch2, 및 Notch3의 역할은 간 종양 발생의 AKT/Ras 모델에서 구별되는 효과를 가졌다. 이러한 결과는 개개의 Notch 수용체가 간암에서 반드시 서로 보상하는 것은 아님을 시사한다. Notch 수용체 패밀리 구성원의 발현에 대한 개개의 Notch 수용체 및 리간드의 억제 효과를 결정하기 위해, 실시예 1에 기재된 바와 같이 AKT/Ras 구축물이 주사된 마우스의 항-Notch1, 항-Notch2, 항-

Notch3, 항-Jag1 항체 또는 이소형 대조군 항체에 의한 치료 후의 발현을 평가하였다. 임의의 3종의 억제 항체에 의한 억제 시 임의의 개개의 Notch 수용체에 대한 수용체 전사체 발현에서 어떠한 증가도 관찰되지 않았다 (도 5a-c). 대조적으로 특이적 억제 항체에 의한 Notch2 억제는 Notch3 및 Notch4 둘 다의 발현 수준에서 유의한 감소를 생성하였다 ($p < 0.05$, $n \geq 7$). Notch3의 억제는 또한 그 자신의 발현의 감소를 생성하였다 ($p < 0.005$, $n \geq 7$). 이는 Notch2 및 Notch3 둘 다 Notch3의 전사를 제어한다는 이전의 발견과 일치한다 (Wang et al., PLoS ONE 7:e37365 (2012); Liu et al., Circulation Research 107:860-870 (2010)). 길항제 항체에 의한 치료의 효과는 Notch 리간드 Jag1 및 DLL1의 발현과 관련하여 훨씬 더 컸다. Notch2 억제는, 아마도 이들 간에서의 Jag1-발현 담관암종 및 전구-유사 종양의 감소의 결과로서, Jag1 발현의 유의한 감소를 생성하였다 (도 5e). Jag1 억제는 유사한 효과를 가졌고, 이는 Jag1 및 Notch2가 이러한 종양 모델에서 함께 작용한다는 것을 추가로 확인시켜준다. 대조적으로, Notch1의 억제는 Notch 리간드 Jag2 및 DLL1의 발현을 유의하게 증가시켰다 (도 5f, 도 5g). 이러한 결과는, 적어도 부분적으로, 항-Notch1 길항제 항체로 치료된 간에서 관찰되는 담관암종-유사 병변의 증가를 설명하는데 도움이 될 수 있다.

[0388] 요약하면, Notch2 억제 시 다른 Notch 수용체의 발현에서의 보상 증가는 관찰되지 않으며, 이는 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체에 의한 성공적인 치료가 대안적 Notch 신호전달 성분의 상향조절을 통한 내성을 생성하지 않을 것임을 시사한다. 실제로, Notch2 또는 Jag1 길항제 항체에 의한 치료는 Jag1 리간드 발현의 감소를 실제 생성하였고, 항-Notch2에 의한 치료는 Notch3 발현의 감소를 생성하였다.

[0389] 실시예 8

[0390] 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체 치료는 전구-유사 및 담관암종-유사 간 종양 성장을 차단한다

[0391] Notch2 억제가 감소된 종양 부담으로 이어지는 메커니즘을 규명하기 위해, 고처리량 RNA 서열 분석을 수행하였다. AKT/Ras HTV 마우스를 Notch2 (10mg/kg, 2x/주), Jag1 (10mg/kg, 1x/주), 또는 항-웨이플 대조군 (30mg/kg, 3x/주)에 대한 길항제 항체로 치료하였다. 5주 후에, 간을 수거하고 RNA에 대해 고처리량 서열분석하였다.

[0392] 전구-세포 및 담관암종-유사 HCC 발현 서명 유전자 발현은 항-Notch2 및 항-Jag1 항체 치료 후에 종양-보유 간에서 하향-조절되었다. EpCAM 및 CK19 발현은, 둘 다 간 전구 세포의 마커인 CD133/Prom1 (도 6a 및 데이터는 제시되지 않음) 및 Spp1 (도 6b)의 발현과 마찬가지로, 유의하게 하향-조절되었다. FoxM1은 이전에 일반적으로 HCC 증식에서 (Xia et al., Carcinogenesis 33:2250-2259 (2012)) 특히 간암의 Ras/Akt 모델에서 (Ho et al., Hepatology 55:833-845 (2012)) 역할을 하는 것으로 밝혀졌기 때문에, 본 발명자들은 그의 발현을 조사하였고, Notch2 및 Jag1 억제가 둘 다 FoxM1 발현의 감소를 생성함을 밝혀낼 수 있었다 (도 6c). 또한, FoxM1 표적 유전자 (Laoukili et al., Nat Cell Biol 7:126-136 (2005)), PLK1 (도 6d), Ccnb1 (도 6e), 및 Aurkb (도 6f)가 또한 대조군과 비교하여 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체로 치료된 종양-보유 간에서 감소되었다. Wnt 신호전달의 마커는 Notch2 또는 Jag1 억제 시 증가하였다. 구체적으로, Wnt-경로 표적 유전자 Axin2 (도 6h)와 마찬가지로 Wnt2 리간드가 증가되었다 (도 6g). 최종 분화 간세포의 하위세트의 마커인 글루타민 신테타제 (Glut; 도 6i)의 발현이 또한 대조군과 비교하여 항-Notch2 또는 항-Jag1 항체로 치료된 종양-보유 간에서 증가되었다. 이들 관찰은 FoxM1의 하향조절을 통해 종양 세포 증식의 감소를 유도하고 Wnt-신호전달의 유도를 통해 분화 간세포 운명을 유도하는 Notch2 억제와 일치한다 (Boulter et al., Nat. Med. 18(4):572 (2012)). 간암에서 Notch2 신호전달 억제가 종양 세포의 간세포로의 최종 분화에 영향을 미치는 것이 가능할 수 있다. 이러한 가설과 일관되게, Notch2 및 Jag1 억제는 최종 분화 간세포의 전사 마커 뿐만 아니라, 전구 세포로부터 간세포의 분화에서 중요한 것으로 공지되어 있는 (Boulter et al., Nat. Med. 18(4):572 (2012)) Wnt 신호전달에서의 증가를 생성하였다. Notch2 및 Jag1 억제는 또한 증식을 감소시키고 종양 세포 사멸을 증가시킴으로써 작용하는 것일 수 있다.

[0393] 실시예 9

[0394] 인간 간세포성 암종에서 Notch2의 발현 및 활성화

[0395] 정량적 역전사 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 사용하여 Notch 신호전달 성분의 발현에 대해 인간 HCC 세포주 및 원발성 인간 HCC 종양을 분석하였다. HCC 세포주 HepG2, Hep3B, PCL/PRF/5, Snu387, Snu398, Snu423, Snu449, Snu475는 ATCC (버지니아주 마나사스)에서 획득하였다. HCC 세포주 Huh-7, HLE, HLF, JHH1, JHH4, JHH5, JHH7은 재팬 콜렉션 오브 바이오리소시스 셀 뱅크 (Japanese Collection of Bioresources Cell Bank) (일본, 오사카)에서 획득하였다. 전체 염색된 조직 절편을 데피니엔스(Definiens) 소프트웨어를 사용하여 분석하

였다.

[0396]

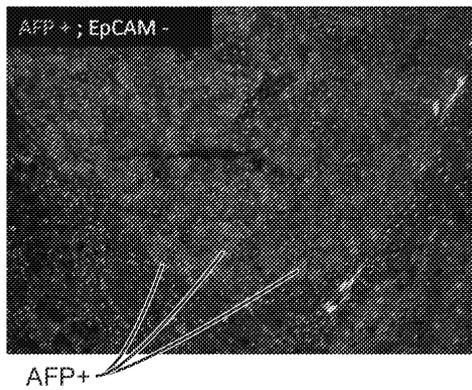
16종의 배양된 HCC 세포주 중 15종에서 Notch1 또는 Notch3보다 Notch2이 더 높은 수준으로 발현되었다 (도 7a). 많은 경우에 Notch2 발현은, 발현을 참조 유전자 (RPL19, 도 7a)에 대해 정규화하였을 때, 다른 Notch 패밀리의 구성원의 발현을 10배보다 더 초과하였다. 이러한 결과와 일관되게, Notch2의 우세한 발현이 IHC에 의한 결정 시 76개의 인간 원발성 HCC 샘플 중 28개 (37%)에서 관찰되었다. 이들 28개의 인간 원발성 HCC 샘플 중 15개 (54%)에서, Notch2는 Notch2 경로 활성화를 보여주는 핵 국제화 (도 7b)를 다양한 정도로 나타내었다. IHC에 의해 평가된 Jag1 발현은 조사된 59개의 인간 원발성 HCC 샘플 중 34개 (57%)에서 관찰되었다 (도 7b). Notch2 및 Jag1 둘 다에 대해 평가된 56개의 인간 원발성 HCC 샘플 중에서, 15개 (27%)가 Notch2 및 Jag1 둘 다의 발현을 갖는 것으로 발견되었다. 중첩 발현을 갖는 이들 15개의 조직 중에서, 11개 (73%)는 활성 Notch2 신호전달을 보여주는 Notch2 핵 국제화를 어느 정도 나타내었다.

[0397]

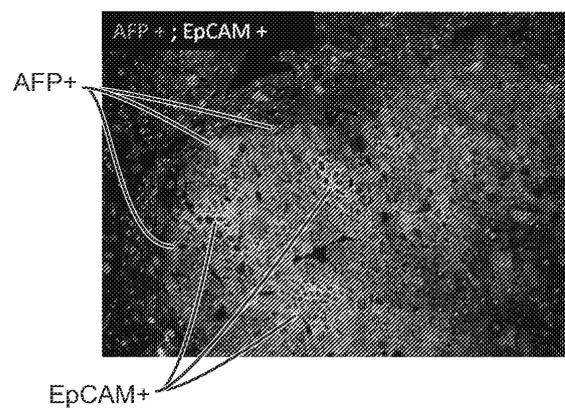
본 발명은 이해를 명확하게 하고자 하는 목적으로 예시 및 실시예로서 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 상기 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시내용은 그 전문이 명백하게 참조로 포함된다.

도면

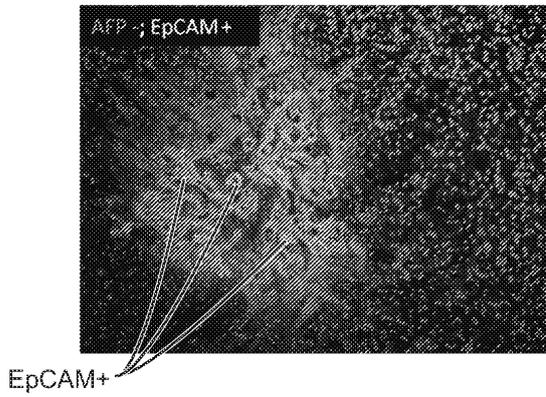
도면1a



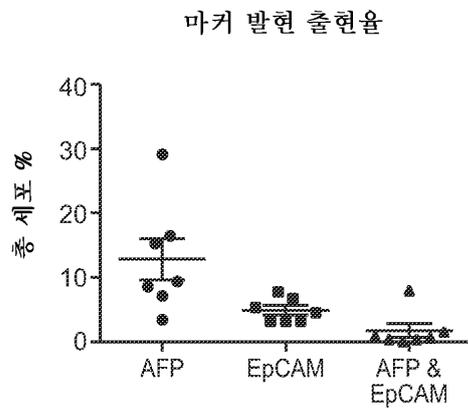
도면1b



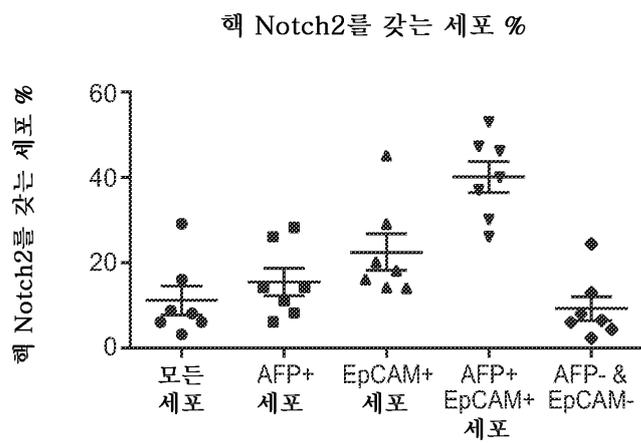
도면1c



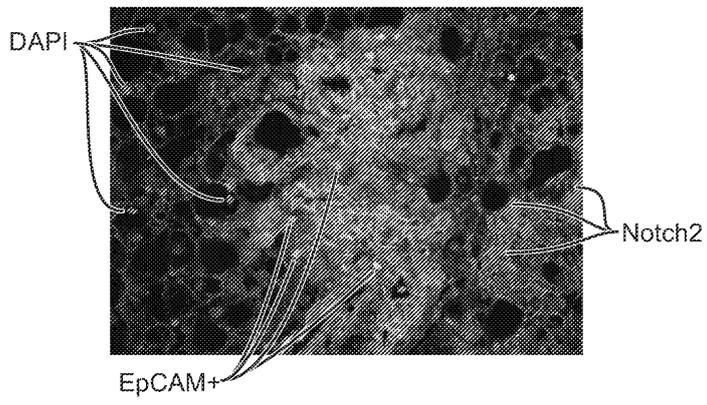
도면1d



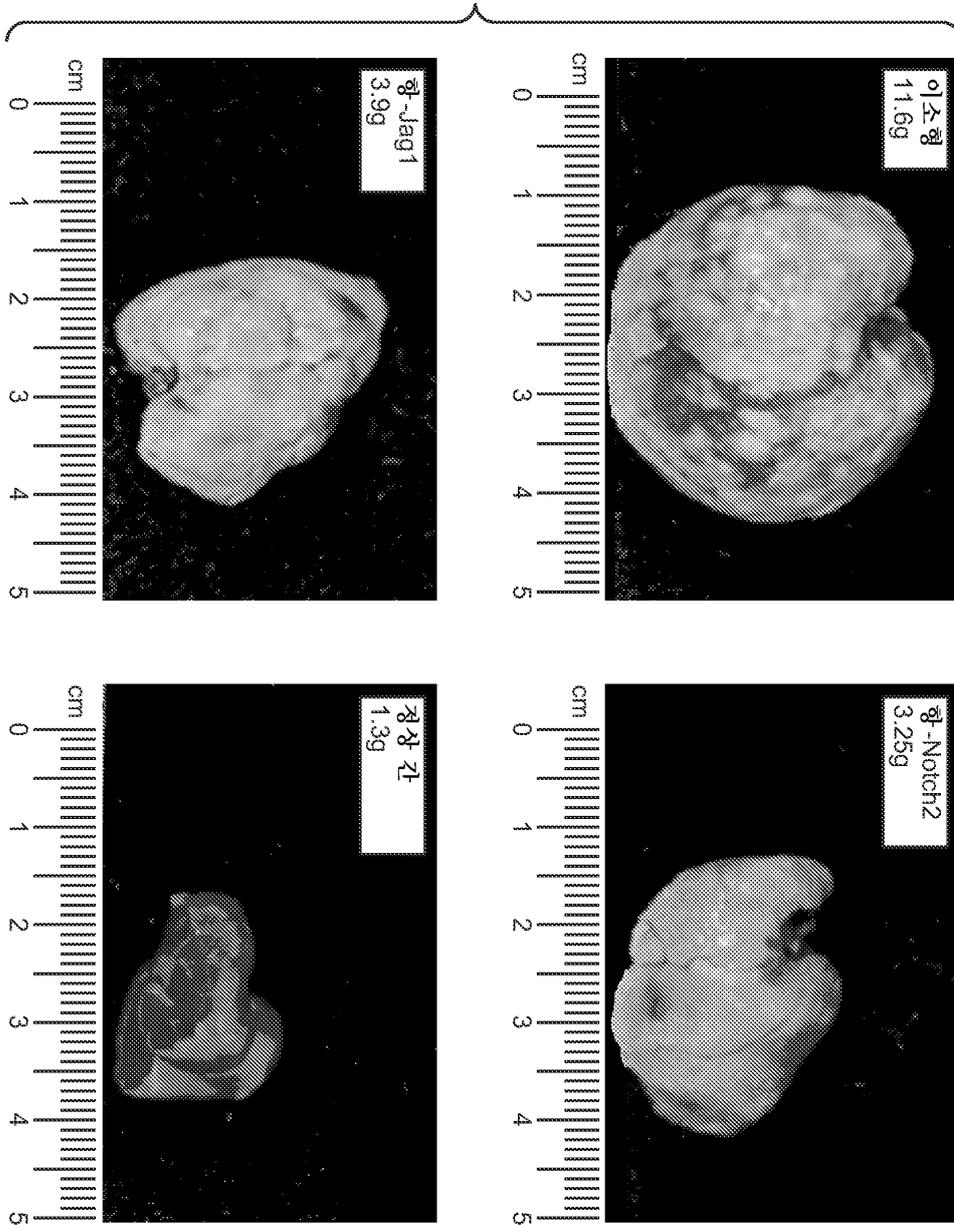
도면1e



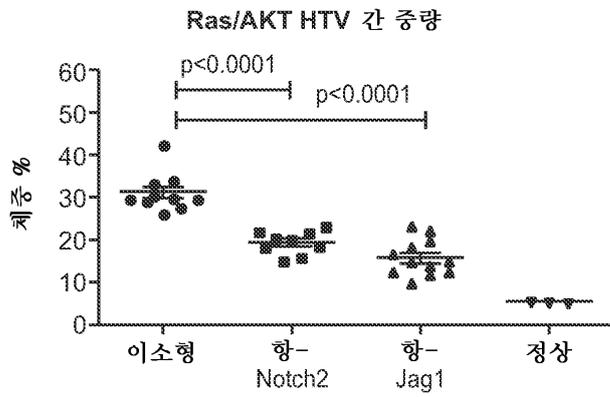
도면1f



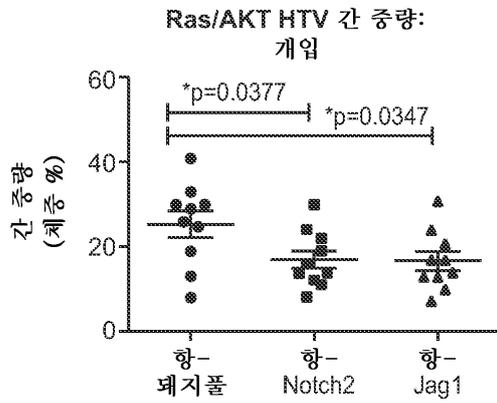
도면2a



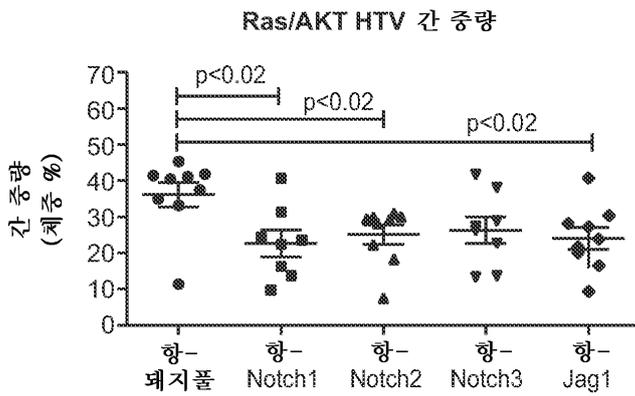
도면2b



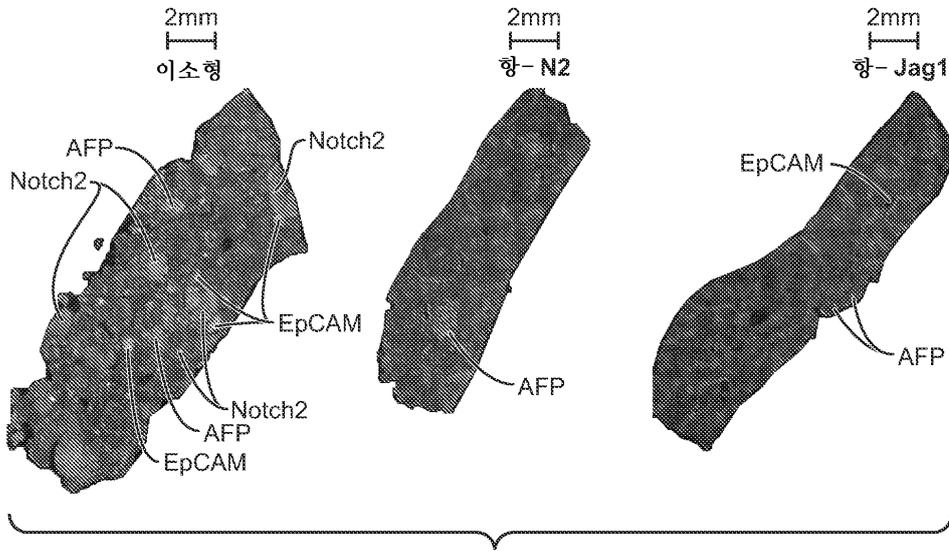
도면2c



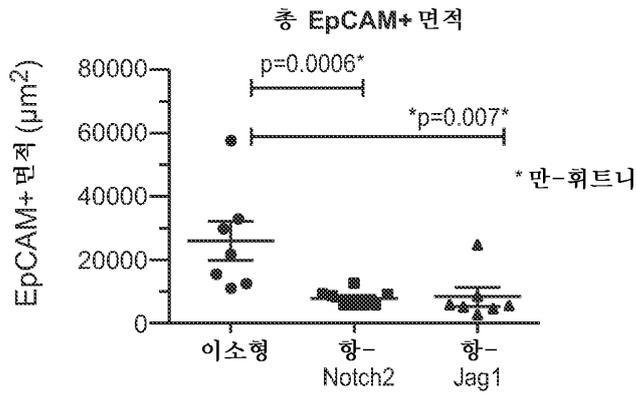
도면2d



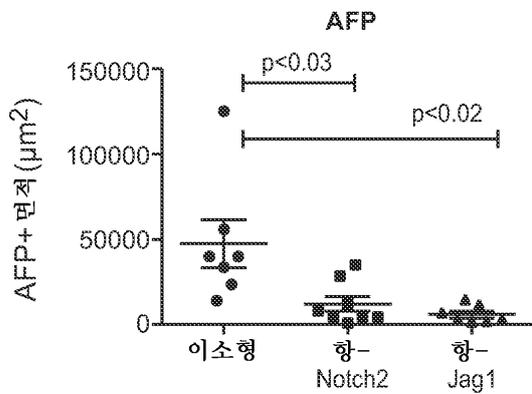
도면3a



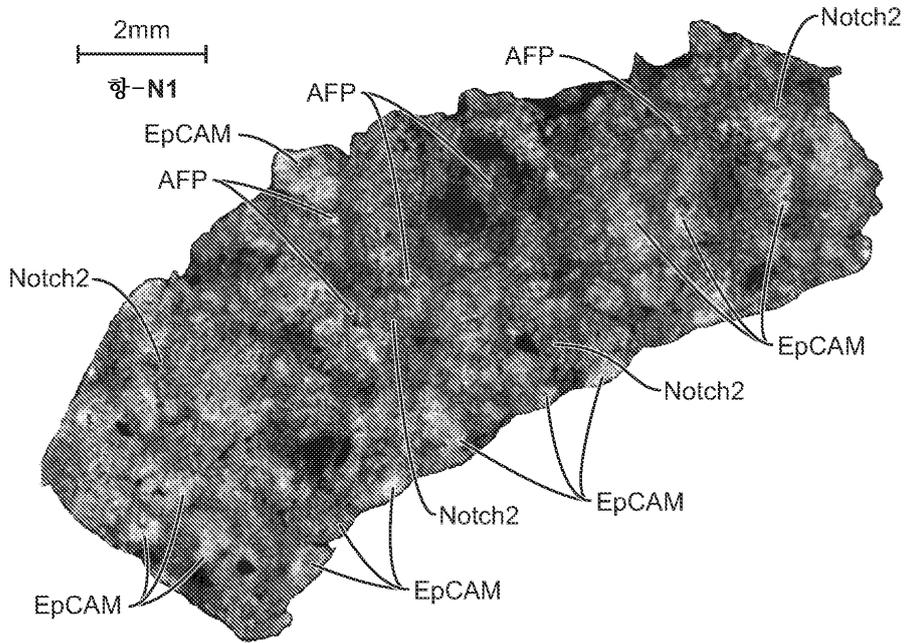
도면3b



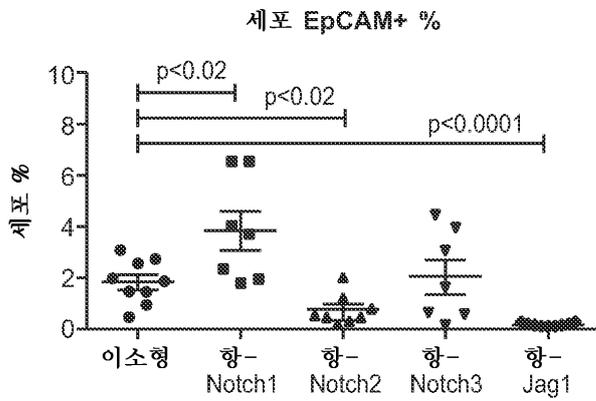
도면3c



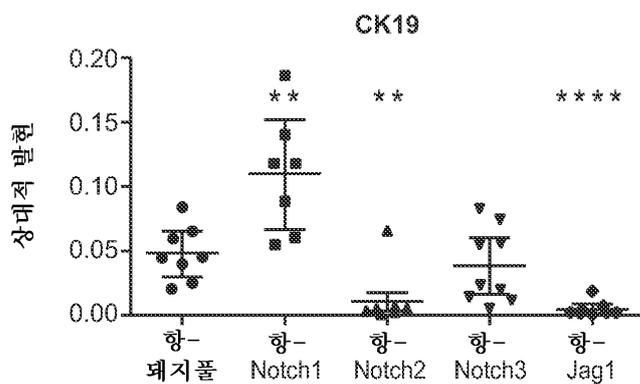
도면3d



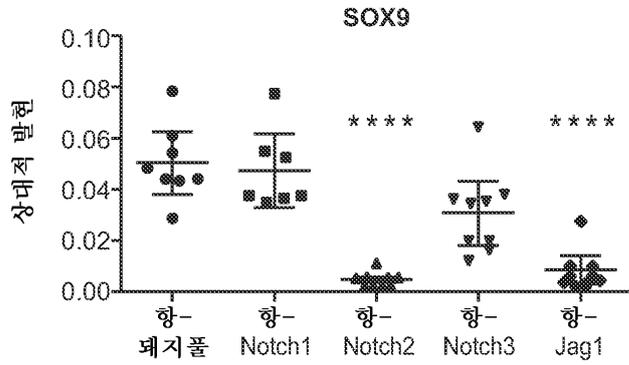
도면3e



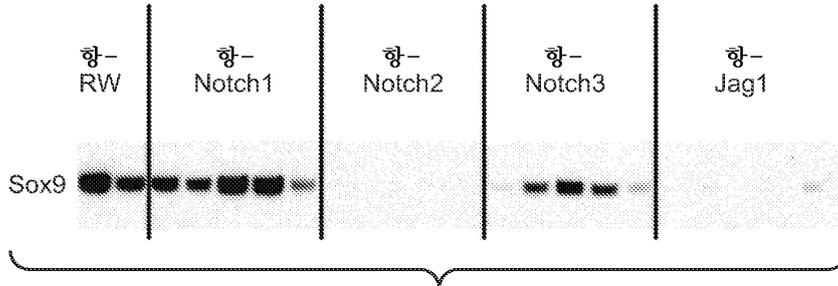
도면3f



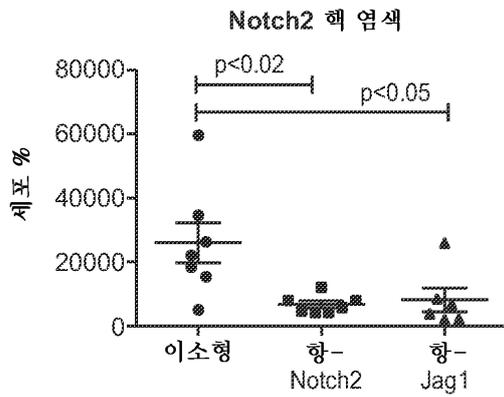
도면3g



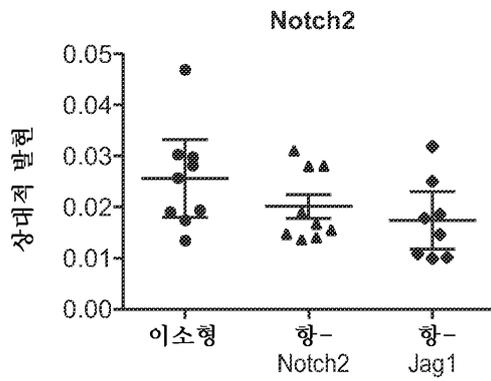
도면3h



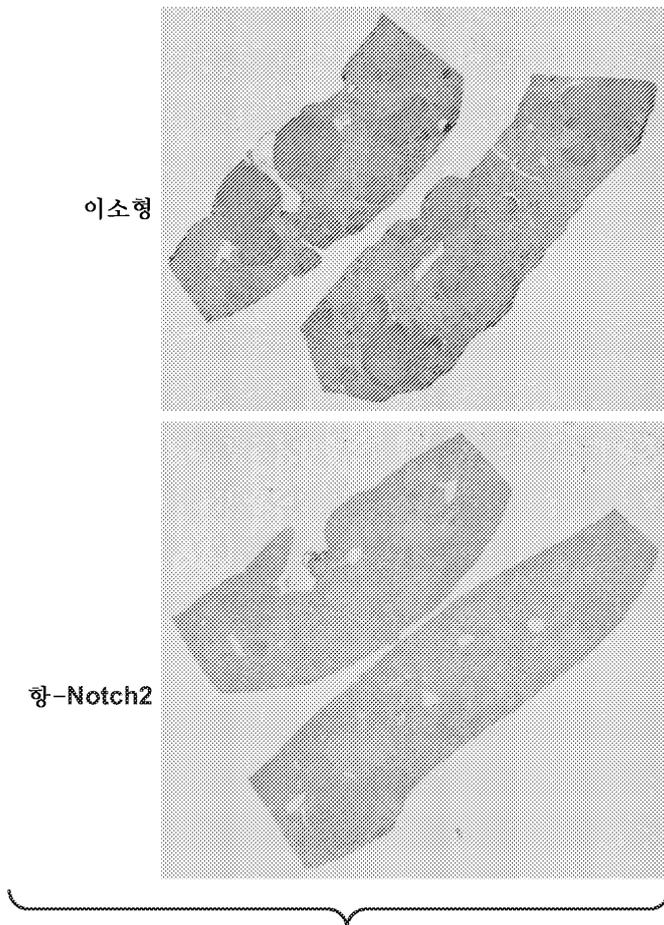
도면4a



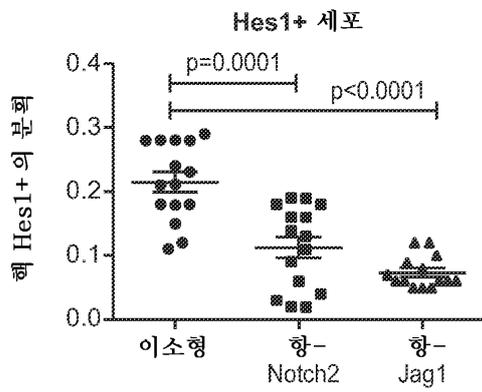
도면4b



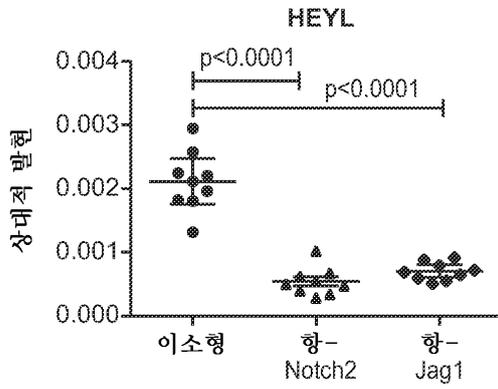
도면4c



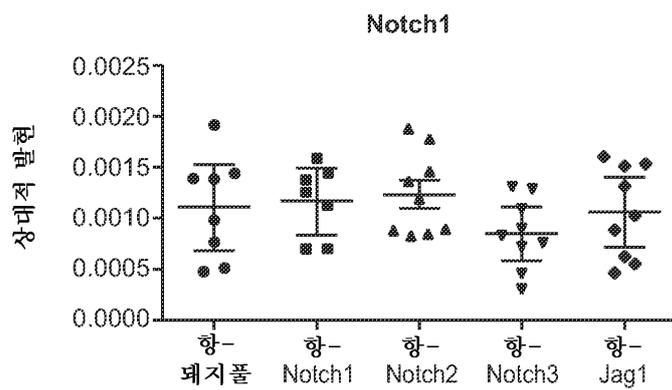
도면4d



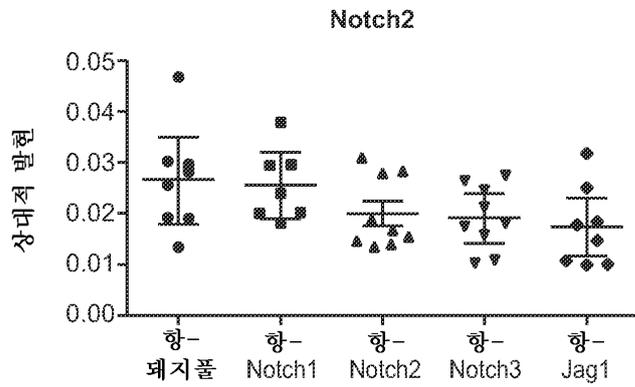
도면4e



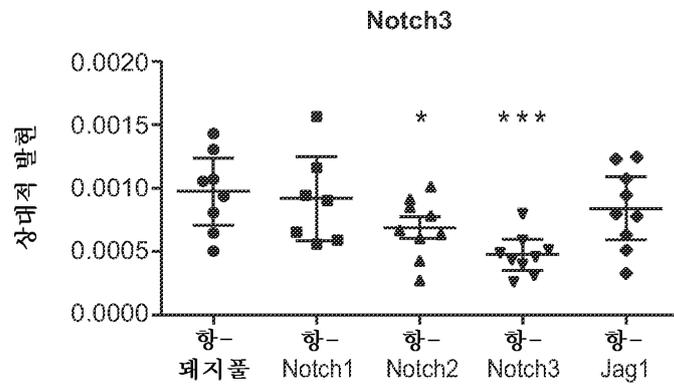
도면5a



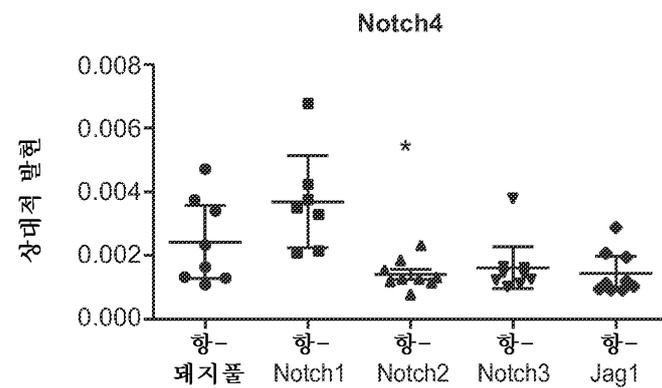
도면5b



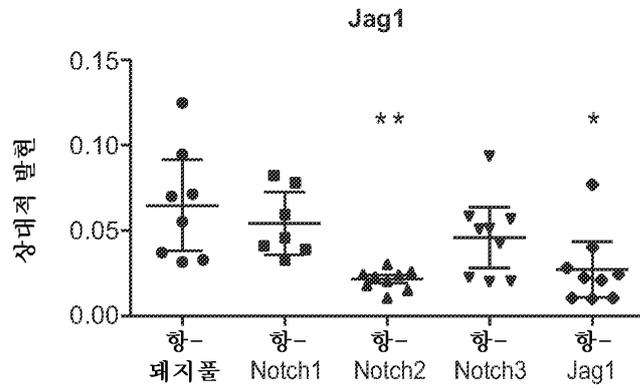
도면5c



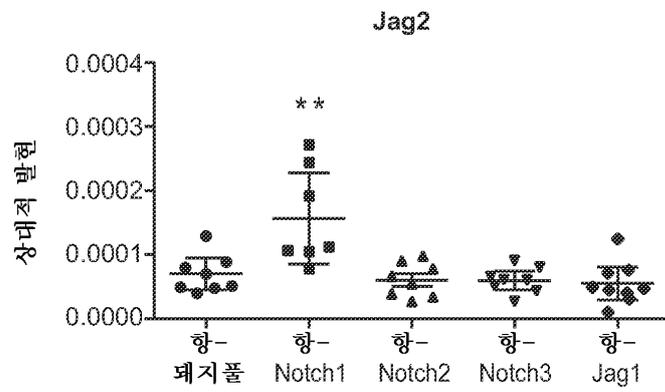
도면5d



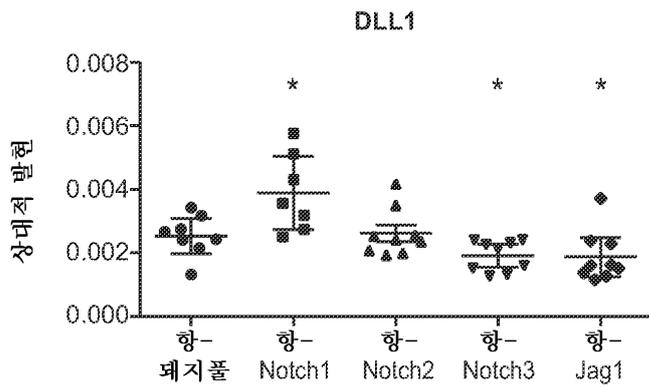
도면5e



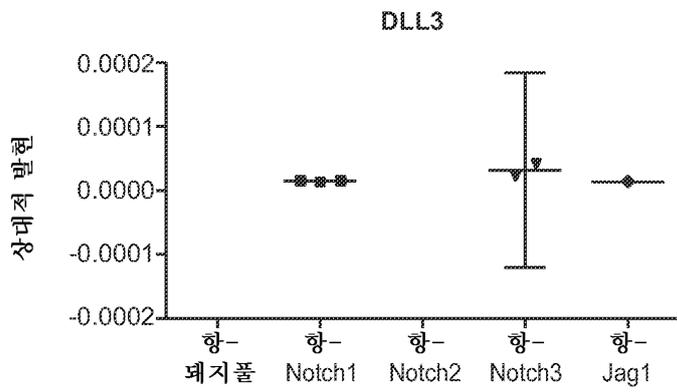
도면5f



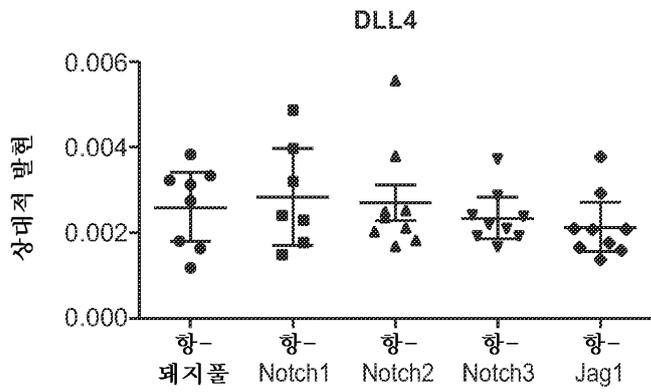
도면5g



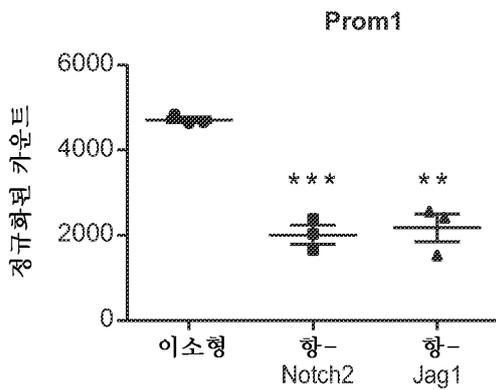
도면5h



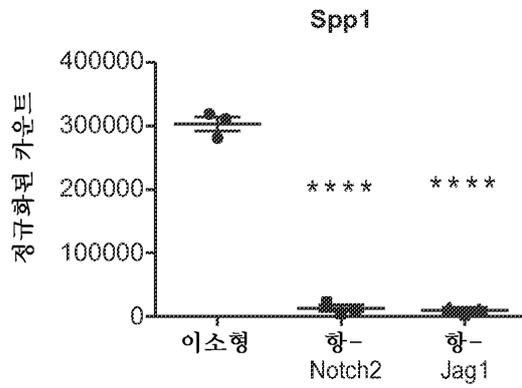
도면5i



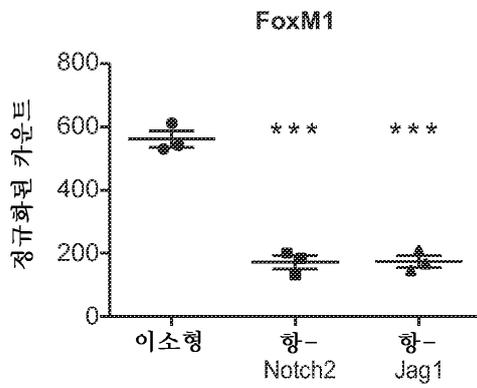
도면6a



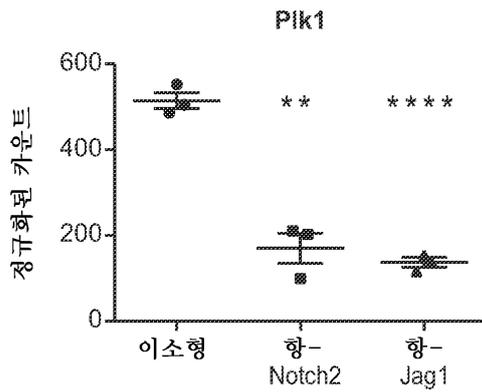
도면6b



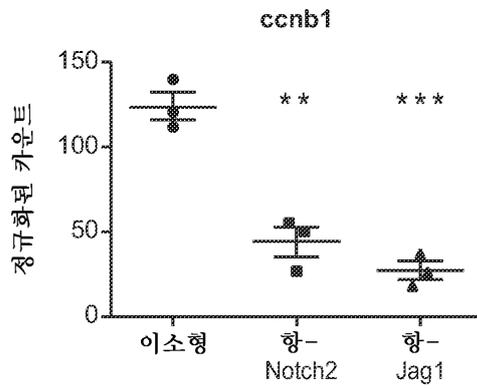
도면6c



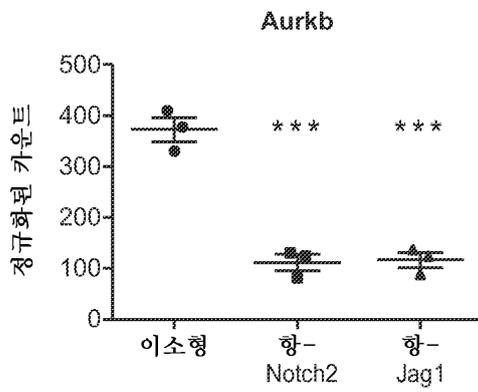
도면6d



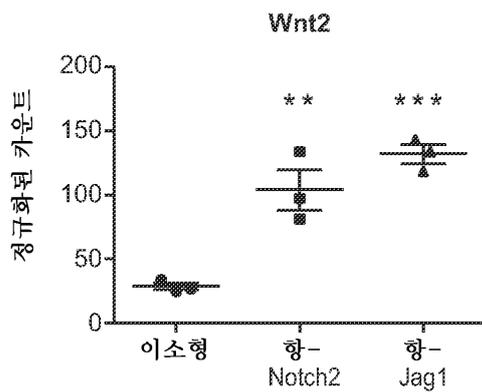
도면6e



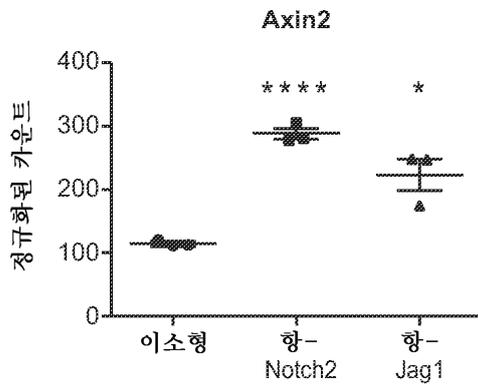
도면6f



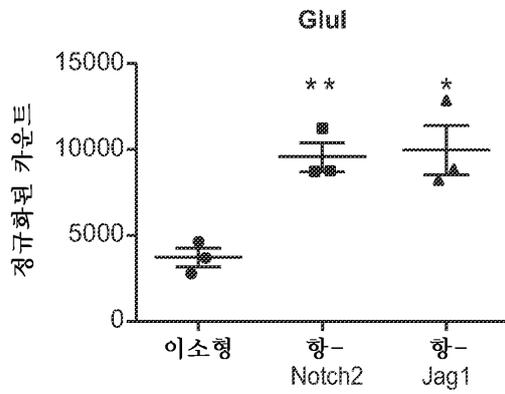
도면6g



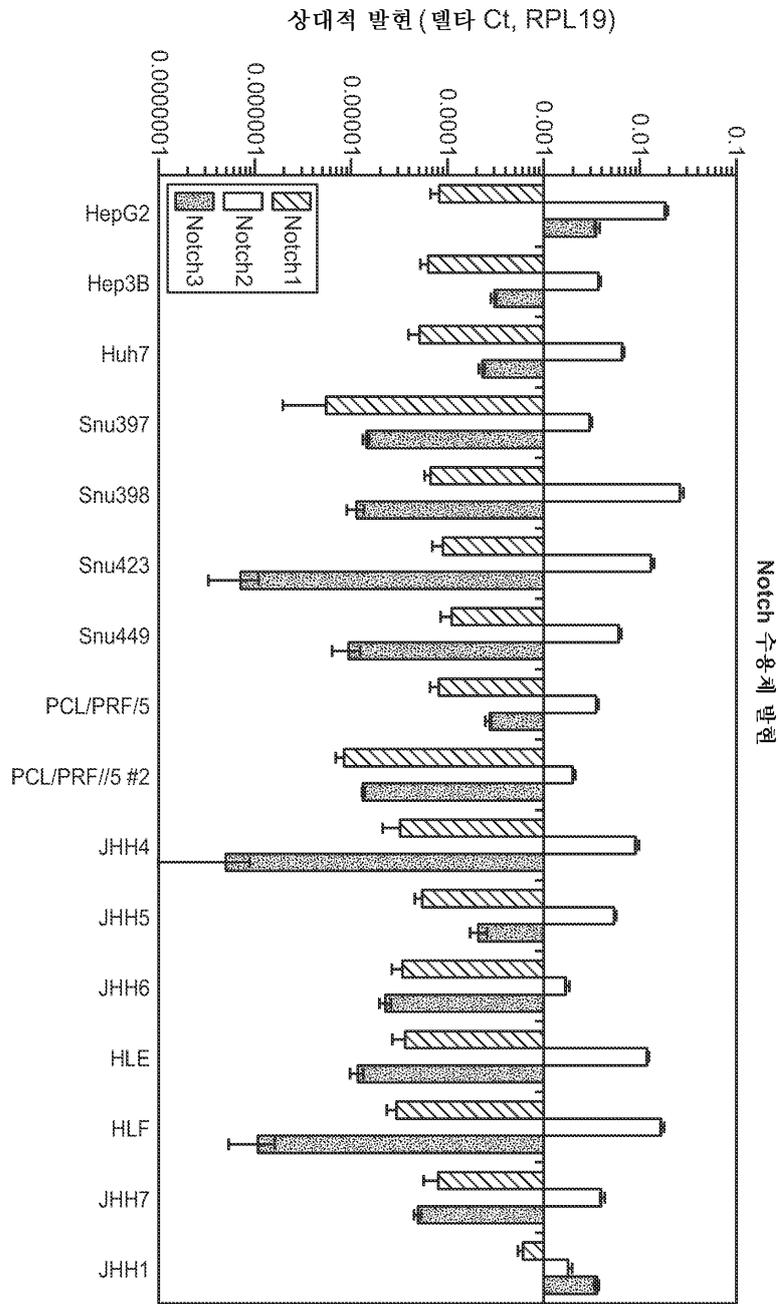
도면6h



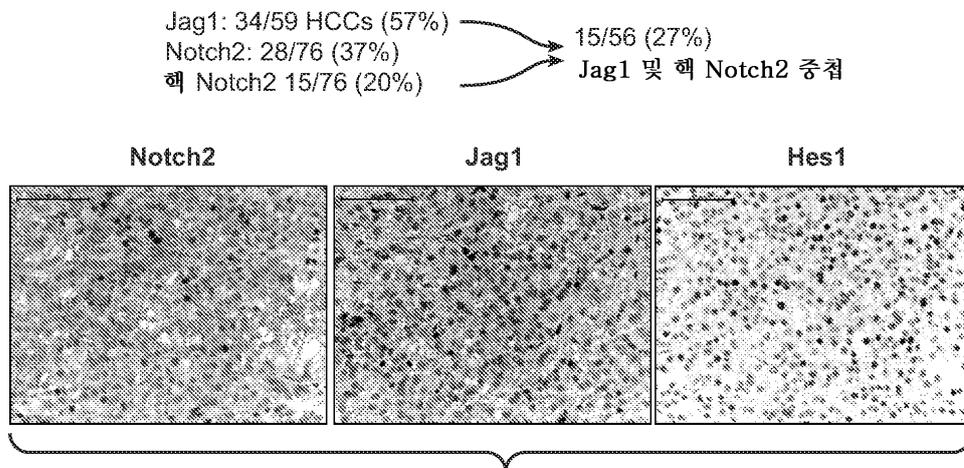
도면6i



도면7a



도면7b



도면8a

인간 Notch2 NRR (서열 73)

```
PATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYI
NNQCDELNTVECLFDNFECQGNSTCKYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDG
LDCAADQPENLAEGTLVIVVLLMPPEQLLODARSFLRALGTLTLLHTNLR IKRDSQGELMVY
PYYGEKSAAMKKQRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCVQSDHCFKNTDAA
AALLASHAIQGTLVSYPLVSVVSESLTPERTQ
```

도면8b

마우스 Notch2 NRR (서열 74)

```
PATCQSQYCADKARDGICDEACNSHACQWDGGDCSLTMEDPWANCTSTLRCWEYIN
NQCDEQCNTAECLFDNFECQRNSKTCYDKYCADHFKNHCDQGCNSEECGWDGL
DCASDQPENLAEGTLIIVVLLPPEQLLODSRSLRALGTLTLLHTNLR IKQDSQGALMVVYPY
FGEKSAAMKKQKMTTRRSLPEEQEQEVIGSKIIFLEIDNRQCVQSDQCFKNTDAAA
LLASHAIQGTLVSYPLVSVFSELESPRFAQ
```

도면8c

인간 Notch2 (서열 75)

MPALRPALLWALLALWLCCAAPAHALQCRDGYEPCVNEGMCVTYHNGTGYCKCPEGFLGEY
 CQHRDPCEKNRCQNGGTCVAQAMLGKATCRCASGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCLNGGTC
 HMLSRDTYECTCQVGFTGKECQWTDACLSPCANGSTCTTVANQFSCKCLTGFTGQKCETD
 VNECDIPGHCQHGGTCLNLPGSYQCQCPOGFTGQYCDLSLYVPCAPSPCVNGGTCRQTGFDT
 FECNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHRCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLL
 QPNACQNGGTCANRRNGGYGCVVNGWSGDDCSENIDDCAFASCPTPGSTCIDRVASFSCMCP
 EGKAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPC
 EHAGKCVNTDGAHFCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGV
 HCELEINECQSNPCVNNQGCVDKVNRFOCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPN
 GYECQCATGFTGVLCEENIDNCDPDPCHHGQCQDGDIDSYTCICNPGYMGAIQSDQIDECYSSP
 CLNDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGVNCIEINFDDCASNPCIHGICMDGINRYSCVCSPGFTGQR
 CNIDIDECASNPCRKGATCINGVNGFRICICPEGPHHPSCYSQVNECLSNPCIHGNTGGLSGY
 KCLCDAGWVGINCEVDKNECLSNPCQNGGTCNLDLVNGYRCTCKKGFKGYNCQVNIDECASN
 PCLNQGTCFDDISGYTCHCVLPYTGNKNCQTVLAPCSPNPCENAAVKESPNEFESYTCLCAPG
 WQGQRCTIDIDECISKPCMNHGLCHNTQGSYMCCECPGFGSGMDCCEEDIDDCLANPCQNGGS
 CMDGVNTFSCLCCLPGFTGDKCQTDMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCKCQAGFDGVHCEN
 NINECTESSCFNGGTCVDGINSFSCLCVPVGTGFSFLHEINECSSHPCLNEGTCVDGLGTYRC
 SCPLGYTGKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQKKAESQCLCPSGWAGAYCDVNVSCDIAASR
 RGVLVEHLQHSQVGINAGNTHYQCQPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCSDFIGGYRC
 ECVPGYQGVNCEYEVDEQCQNGGTCIDLNVNHFKCSPPGTRGLLCEENIDDCARGPH
 CLNNGQCMDRIGGYSCRLPGFAGERCEGDIENECLSNPCSEGLDCIQLTNDYLCVCRSAFT
 GRHCETFDVDCPQMPCLNGGTCAVASNMPDGFICRCPPGFSGARCQSSCGQVKCRKGEQC
 VHTASGPRFCPSPRDCESGCASSPCQHGGSCHPQRQPPYSCQCAPPFSGSRCELYTAPP
 STPPATCLSQYCADKARDGVCDEACNSHACQWDGGDCSLTMENPWANCSSPLPCWDYINN
 QCDELNTVECLFDNFECQNSKTKYDKYCADHFKDNHCDQGCNSEECGWDGLDCAADQ
 PENLAEGTLVIVVLMPEQLLQDARSFLRALGTLHLHTNLRIKRDSQGELMVYPYGEKSAAMKK
 QRMTRRSLPGEQEQEVAGSKVFLEIDNRQCVQSDHCFKNTDAAAALLASHAIQGTLSYPLVS
 VVSESLTPERTQLLYLLAVAVVILFIILLGVIMAKRKRKHGSLWLEPGFTLRRDASNHRREPVG
 QDAVGLKNLSVQVSEANLIGTGTSEHWVDEGPPKVKAEDEALLSEEDPIDRRPWTQOH
 LEAADIRRTPSLALTPPQAEQEVVDVLDVNVVRGBDCTPLMLASLRGSSDLSDEDEDADSSA
 NIITDLVYQGASLQAQTDRTGEMALHLAARYSRADAARKRLLDAGADANAQDNMGRCPHAAVA
 ADAQGVFQILIRNRVTDLDARMNDGTTPLILAAARLAVEGMVAELINCQADVNAVDDHGKSALHW
 AAAVNNVEATLLLLKNGANRDMQDNKEETPLFLAAREGSYEAAKILLDHFANRDI TDHMDRLPR
 DVARDRMHHDIVRLLDEYNVTPSPPGTVLTSALSPVICGPNRSFSLKHTPMGKKSRRPSAKST
 MPTSLPNLAKEAKDAKGSRRKSLSEKVLSESSVTLSPVDSLESPTHYVSDTTSSPMITSPGIL
 QASPNMLATAAPPAPVHAQHALSFSNLHEMQPLAHGASTVLPVSQLLSHHHIVSPGSGSAG
 SLRSLHPVVPADWMNRMEVNETQYNEMFGMVLAPAEGTHPGIAPQSRPPEGKHIITTPREPL
 PPIVTFQLIPKGSIAQPAGAPQPQSTCPPAVAGLPTMYQIPEMARLPSVAFPTAMMPQDQGQ
 VAQTIIPAYHPPASVGYKPTPPSQHSYASSNAAERTPSHSGHLQGEHPYLTSPSPESPDQWSS
 SSPHSASDWSDVTTSPTPGGAGGGQRGPGTHMSEPPHNNMQVYA

도면8d

인간 Notch2 (서열 76)

MPDLRPAALRALLWLWLCGAGPAHALQCRGGQEPVCVNEGTCVTYHNGTGFCRCPEGFLGEY
 CQHRDPCEKNRCQNGGTCVPQGMLGKATCRCAPGFTGEDCQYSTSHPCFVSRPCQNGGTC
 HMLSRDTYPECTCQVGFTGKQCQWTDACLSHPCENGSTCTSVASQFSCKCPAGLTGQKCEAD
 INECDIPGRCQHGGTCLNLPGSYRCQCGQGGFTGQHCDSPYVRGLPCVNGGTCRQTGDFTTLE
 CNCLPGFEGSTCERNIDDCPNHKCQNGGVCVDGVNTYNCRCPPQWTGQFCTEDVDECLLQP
 NACQNGGTCNRRNGGYGCVCVNGWSGDDCSENIDDCAYASCTPGSTCIDRVASFSCLCPEG
 KAGLLCHLDDACISNPCHKGALCDTNPLNGQYICTCPQGYKGADCTEDVDECAMANSNPCEH
 AGKCVNTDGAHFHCECLKGYAGPRCEMDINECHSDPCQNDATCLDKIGGFTCLCMPGFKGVHC
 ELEVNECQSNPCVMNGQCVDKVNRFOCLCPPGFTGPVCQIDIDDCSSTPCLNGAKCIDHPNG
 YEQCATGFTGILCDENIDNCDPDPCHHGQCQDGDIDSYTCICNPGYMGAIQSDQIDECYSSPCL
 NDGRCIDLVNGYQCNCQPGTSGLNCEINFDDCASNPCMHGVCVDGINRYSCVCSPPGFTGQR
 CNIDIDECASNPCRKGATCINDVNGFRICPEGPHHPSCYSQVNECLSNPCIHGNCTGGLSGY
 KCLCDAGWVGVNCEVDKNECLSNPCQNGGTCNNLVNGYRCCKKGFKGYNQVNIDECASN
 PCLNQGTCFDDVSGYTCHMLPYTGKNCQTVLAPCSPNPCENAAVCKEAPNFESFSCLCAPG
 WQKRCQTVDVDECISKPCMNGVCHNTQGSYVCECPPGFSGMDCEEDINDCLANPCQNGG
 SCVDHVNTFSCQCHPGFIGDKQTMNECLSEPCKNGGTCSDYVNSYTCTCPAGFHGVHCE
 NNIDECTESSCFNGGTCVDGINSFSLCPVGFTGPFCLHDINECSSNPCLNAGTCVDGLGTYR
 CICPLGYTGKNCQTLVNLCSRSPCKNKGTCVQEKARPHCLCPPGWDGAYCDVNLVNSCKAAAL
 QKGVPEVHLCQHSIGICINAGNTHHCQPLGYTGSYCEEQLDECASNPCQHGATCNDFIGGYR
 CECVPGYQGV

도면9

인간 Jag1 (서열 78)

MRSRPRTRGRSGRPLSLLLALLCALRAKVC GASGQFELEILSMQNVNGELQNGNCCGGARN
 PGDRKCTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSFGSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDRNRI
 VLPFSFAWPRS YTLLEAWDSSNDTVQPDSIEKASHSGMINPSRQWQTLKQNTGVAHFE
 YQIRVTCDDYYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKTCMEGWMGPECNRAICRQGCSP
 KHGSCKLPGDCRCQYGWQGLYCDKCIHPHGCVHVICNEPWQCLCETNWWGQLCDKDLNYC
 GTHQPCLNGGTC SNTGPKYQCSCPEGYS GPNCEIAEHA CLSDPCHNRGSKETSLGFEC
 ECSPGWTGPTCSTNIDDCSPNNCSHG GTCQDLVNGFKVCVPPQWTGKTCQLDANECEAKP
 CVNAKSKNLIASYYCDCLPGWGMQNC DININDCLGQCQNDASCRDLVNGYRCICPPGYA
 GDHCERDIDECASNPLNGGHCQNEINRFQCLCPTGFSGNLCQLDIDYCEPNPCQNGAQC
 YNRASDYFC KCPEDYEGKNC SHLKDHCRTTPCEVIDSCTVAMASNDTPEGVRYISSNVCG
 PHGKCKSQSGKFTCDCKNGFTGT YCHENINDCESNPCRNGGTCIDGVNSYKICISDGWE
 GAYCETNINDCSQNPCHNGGTCRDLVND FYCDCKNGWKGTCHSRDSQCDEATCNGGTC
 YDEGDAFKMCPGGWEGTTCNIARNSSCLPNPCHNGGTCVVNGESFTCVCKEGWEGPICA
 QNTNDCSPHPCYNSGTCVDGDNWYRCECAPGFAGPDCRININECQSSPCAFGATCVD EIN
 GYRCVCPGGHSGAKCEVSGRPCITMGSVIPDGAKWDDDCNTCQCLNGRIACSKVWCGPR
 PCLLHKHSECPGSGQSCIPILDDQCFVHPCTGVGECRSSSLQPVKTKCTSDSYQDNCAN
 ITFTFNKEMMSPGLTTEHICSELRLN LNILKNVSAEYSIYIACEPSPSANNEIHVAISAED
 IRDDGNPIKEITDKIIDLVSKRDGNSSLI AAVA EVRVQRRPLKNRTDFLVPLLSVLTVA
 WICCLVTA FYWCLRKRKPGSHTHSASEDNTTNNVREQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYE
 NKNSKMSKIRTHNSEVEEDMDKHQ QKARFAKQPAYTLVDREKPPNGTPTKHPNWTNKQ
 DNRDLESAQSLNRMEYIV

뮤린 Jag1 (서열 79)

MRSRPRTRGRPRPLSLLLALLCALRAKVC GASGQFELEILSMQNVNGELQNGNCCGGVRN
 PGDRKCTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSFGSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDRNRI
 VLPFSFAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSIEKASHSGMINPSRQWQTLKQNTGIAHFE
 YQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKTCMEGWMGPDCKAICRQGCSP
 KHGSCKLPGDCRCQYGWQGLYCDKCIHPHGCVHGT CNEPWQCLCETNWWGQLCDKDLNYC
 GTHQPCLNRGTC SNTGPKYQCSCPEGYS GPNCEIAEHA CLSDPCHNRGSKETSSGFEC
 ECSPGWTGPTCSTNIDDCSPNNCSHG GTCQDLVNGFKVCVPPQWTGKTCQLDANECEAKP
 CVNARSCKNLIASYYCDCLPGWGMQNC DININDCLGQCQNDASCRDLVNGYRCICPPGYA
 GDHCERDIDECASNPLNGGHCQNEINRFQCLCPTGFSGNLCQLDIDYCEPNPCQNGAQC
 YNRASDYFC KCPEDYEGKNC SHLKDHCRTTTCEVIDSCTVAMASNDTPEGVRYISSNVCG
 PHGKCKSQSGKFTCDCKNGFTGT YCHENINDCESNPKNGGTCIDGVNSYKICISDGWE
 GAHCENNINDCSQNPCHYGGTCRDLVND FYCDCKNGWKGTCHSRDSQCDEATCNGGTC
 YDEVDTFKMCPGGWEGTTCNIARNSSCLPNPCHNGGTCVVNGDSFTCVCKEGWEGPICT
 QNTNDCSPHPCYNSGTCVDGDNWYRCECAPGFAGPDCRININECQSSPCAFGATCVD EIN
 GYQICPPGHSGAKCHEVSGRSCITMGRVILDGAKWDDDCNTCQCLNGRVACSKVWCGPR
 PCLRHKSHNECPSGQSCIPVLDQCFVRPCTGVGECRSSSLQPVKTKCTSDSYQDNCAN
 ITFTFNKEMMSPGLTTEHICSELRLN LNILKNVSAEYSIYIACEPSSLANNEIHVAISAED
 IRDDGNPFKEITDKIIDLVSKRDGNSSLI AAVA EVRVQRRPLKNRTDFLVPLLSVLTVA
 WVCLVTA FYWVRKRKPSSTH SAPEDNTTNNVREQLNQIKNPIEKHGANTVPIKDYE
 NKNSKMSKIRTHNSEVEEDMDKHQ QKVRFAKQPVVYTLVDREKAPSGTPTKHPNWTNKQ
 DNRDLESAQSLNRMEYIV

도면10a

발현된 단백질 뮤린 Jag1-DSL-EGF1-4 (마우스 Jag1 항원)
 (서열 80)

ADLGSQFELEILSMQNVNGELQNGNCCGGVRNPGDRKCTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAG
 GPC SFGSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDRNRI VLPFSFAWPRS YTLLEAWDSSNDTIQPDSIE
 KASHSGMINPSRQWQTLKQNTGIAHFEYQIRVTCDDHYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQ
 GNKTCMEGWMGPDCKAICRQGCSPKHGSCKLPGDCRCQYGWQGLYCDKCIHPHGCVHGT
 CNEPWQCLCETNWWGQLCDKDLNYCGTHQPCLNRGTC SNTGPKYQCSCPEGYS GPNCEI
 AEHA CLSDPCHNRGSKETSSGFEC ECSPGWTGPTCSTNIDDEFGLVPRGSGHHHHHH

도면10b

**발현된 단백질 인간 Jag1-DSL-EGF1-4 (인간 Jag1 항원)
(서열 28)**

QFELEILSMQNVNVELQNGNCCGGARNPGDRKCTRDECDTYFKVCLKEYQSRVTAGGPCSF
GSGSTPVI GGNTFNLKASRGNDNRNRIVL PFSFAWPRS YTLLEAWDSSNDTVQPSII EKASHS
GMINPSRQWQTLKQNTGVAHFYQIRVTCDDYYYGFGCNKFCRPRDDFFGHYACDQNGNKT
CMEGWMGPECNRAICRQGCSPKHGSKLPGDCRCQYGWQGLYCDKCI PHPGCVHGICNEP
WQCLCETNWGGQLCDKDLNYCGTHQPCLNGGTC SNTGPKYQCSCEGYSGPNCEIAEHA
CLSDPCHNRGSKETS LGFECESPGWTGPTCSTNIDD

도면11

**인간 분비된 인단백질1 (SPP1)
(서열 29)**

MRIAVICFCLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLYNKY PDAVATWLNPDPSQKQNL LAPQNA
VSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDDEDDDDHVD SQDSIDSNDSDDVDDTDDSHQS
DESHHSESEDELVTDFPTDLPATEVFVTPVVPTVDTYDGRGDSV VYGLRSKSKKFRRPDIQ
YPDATDEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETS QLDDQSAETHSH
KQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKF
RISHELDSASSEVN

도면12

HVRH11 서열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체	서열 번호	카바트 번호													
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
B, B-1, B-2, B-3	1	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S				

HVRH12 서열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	서열 번호	카바트 번호																							
		49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65						
B, B-1, B-2, B-3	3	S	Y	I	Y	P	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G						

HVRH13 서열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	서열 번호	카바트 번호																			
		95	96	97	98	99	100	100A	100A	100B	100C	100D	100K	101	102						
B, B-1, B-2, B-3	4	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A	M	D	V							

HVR-L1 시열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	시열 번호	카바트 번호												
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
B	5	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A		
B-1	6	R	A	S	Q	S	N	R	R	F	L	A		
B-2	7	R	A	S	Q	S	V	R	S	F	L	A		
B-3	8	R	A	S	Q	N	I	K	R	F	L	A		
컨센서스	9	R	A	S	Q	S/N	I/N/V	S/R/K	S/R	Y/F	L	A		

HVR-L2 시열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	시열 번호	카바트 번호										
		50	51	52	53	54	55	56				
B	10	G	A	S	S	R	A	S				
B-1	11	G	A	S	R	R	A	S				
B-2	12	R	A	S	I	R	A	S				
B-3	13	G	A	S	T	R	E	S				
컨센서스	14	G/R	A	S	S/R/I/T	R	A/E	S				

HVR-L3 시열 - 항체 B 및 항체 B로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	시열 번호	카바트 번호														
		89	90	91	92	93	94	95	96	97						
B	15	Q	Q	Y	Y	S	S	P	L	T						
B-1	16	Q	Q	Y	Y	I	S	P	L	T						
B-2	17	Q	Q	Y	Y	I	S	P	W	T						
B-3	18	Q	Q	Y	Y	R	S	P	H	T						
컨센서스	19	Q	Q	Y	Y	S/I/R	S	P	L/H/S	T						

카비트 넘버링

항제	번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
항제 B	20	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A
항제 B-1	20	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A
항제 B-2	20	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A
항제 B-3	20	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A
		카비트-CDRH1																							
항제 B	20	S	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
항제 B-1	20	S	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
항제 B-2	20	S	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
항제 B-3	20	S	G	Y	S	F	T	S	Y	G	M	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E
		카비트-CDRH2																							
항제 B	20	W	V	S	Y	I	Y	P	.	.	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F
항제 B-1	20	W	V	S	Y	I	Y	P	.	.	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F
항제 B-2	20	W	V	S	Y	I	Y	P	.	.	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F
항제 B-3	20	W	V	S	Y	I	Y	P	.	.	Y	S	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F
		카비트-CDRH2																							
항제 B	20	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88
항제 B-1	20	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
항제 B-2	20	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A
항제 B-3	20	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A

도면14a

도면14b

카바트 넘버링

시열 번호	카바트 - CDRH3																								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J	100K	100L	
항체 B 20	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A
항체 B-1 20	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A
항체 B-2 20	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A
항체 B-3 20	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A
항체 B 20	100M 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113																								
항체 B-1 20	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											
항체 B-2 20	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											
항체 B-3 20	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S											

카바트 넘버링

시열
번호

항제 B	22	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C
항제 B-1	23	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C
항제 B-2	24	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C
항제 B-3	25	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C

카바트 - CDR L1

24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q	Q	Q	K	P
R	A	S	Q	S	N	R	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	Q	K	P
R	A	S	Q	S	V	R	R	S	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
R	A	S	Q	N	I	K	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	Q	K	P

카바트 - CDR L2

41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	54A	54B	54C	54D	54E	55	56	57	58
G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V
G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	R	A	S	G	V
G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	I	R	A	S	G	V
G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	E	S	G	V	

항제 B	22	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V
항제 B-1	23	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	R	.	.	.	A	S	G	V
항제 B-2	24	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	I	R	A	S	G	V
항제 B-3	25	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	.	.	.	E	S	G	V	

항제 B	22	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
항제 B-1	23	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
항제 B-2	24	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
항제 B-3	25	P	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

도면15a

도면15b

카비드 넘버링

서열 번호	카비드-CDR L3
항체 B-1	81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95A 95B 95C 95D 95E 95F 96 97
항체 B-2	E D F A T Y Y C Q Q Y Y S S P L F
항체 B-3	E D F A T Y Y C Q Q Y Y I S P L F
항체 B	E D F A T Y Y C Q Q Y Y S S P L F
항체 B-1	E D F A T Y Y C Q Q Y Y I S P L F
항체 B-2	E D F A T Y Y C Q Q Y Y I S P S T F
항체 B-3	E D F A T Y Y C Q Q Y Y R S P H F
항체 B	98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
항체 B-1	F G Q G T K V E I K
항체 B-2	F G Q G T K V E I K
항체 B-3	F G Q G T K V E I K

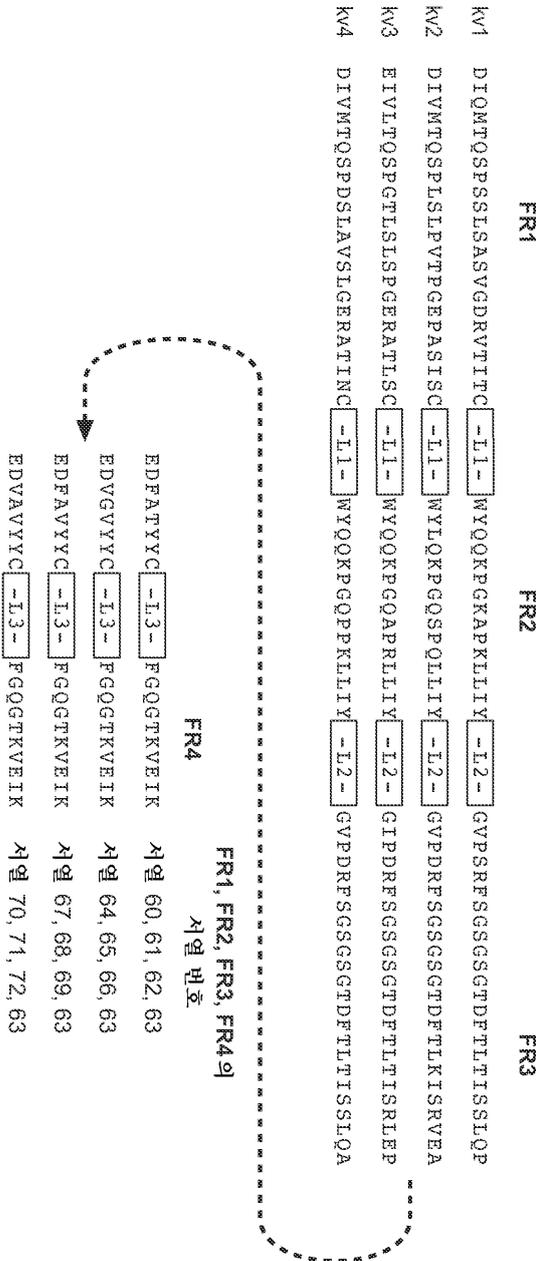
도면16a

	FR1	FR2
I		
A	QVQLVQSGAEVVKRPPGASVYVSCKASGYYTFT	WVRQAPGGGGLWMMG
B	QVQLVQSGAEVVKRPPGASVYVSCKAS	WVRQAPGGGGLWMM
C	QVQLVQSGAEVVKRPPGASVYVSCKAS	WVRQAPGGGGLWMM
D	QVQLVQSGAEVVKRPPGASVYVSCKAS	WVRQAPGGGGLWMM
II		
A	QVQLQESGGPGLVKKPSQTFSLITCTVSGGGSVS	WIRQPPGKGLWMI
B	QVQLQESGGPGLVKKPSQTFSLITCTVSS	WIRQPPGKGLWMI
C	QVQLQESGGPGLVKKPSQTFSLITCTVSS	WIRQPPGKGLWMI
D	QVQLQESGGPGLVKKPSQTFSLITCTVSS	WIRQPPGKGLWMI
III		
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFS	WVRQAPGKGLWVVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
수용자-1		
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFS	WVRQAPGKGLWVVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
수용자-2		
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFS	WVRQAPGKGLWVVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAAS	WVRQAPGKGLWV

도면16b

	FR3	FR4	FR1, FR2, FR3, FR4의 시열 번호
I	A ADTSTSTAYMEIISLSIRSEEDTAVVYCCAR B ADTSTSTAYMEIISLSIRSEEDTAVVYCCAR C ADTSTSTAYMEIISLSIRSEEDTAVVYCCAR D ADTSTSTAYMEIISLSIRSEEDTAVVYCC	[Redacted] [Redacted] [Redacted] [Redacted]	시열 32, 33, 34, 35 시열 36, 37, 34, 35 시열 36, 37, 38, 35 시열 36, 37, 39, 35
II	A VDTSKNOFSLKRISSVTAADTAVVYCCAR B VDTSKNOFSLKRISSVTAADTAVVYCCAR C VDTSKNOFSLKRISSVTAADTAVVYCCAR D VDTSKNOFSLKRISSVTAADTAVVYCC	[Redacted] [Redacted] [Redacted] [Redacted]	시열 40, 41, 42, 35 시열 43, 44, 42, 35 시열 43, 44, 45, 35 시열 43, 44, 46, 35
III	A RDNSKNTLYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR B RDNSKNTLYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR C RDNSKNTLYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR D RDNSKNTLYLOMNSIRAEDTAVVYCC	[Redacted] [Redacted] [Redacted] [Redacted]	시열 47, 48, 49, 35 시열 50, 51, 49, 35 시열 50, 51, 52, 35 시열 50, 51, 53, 35
수용자 - 1	A JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCSR B JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCSR C JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCSR	[Redacted] [Redacted] [Redacted]	시열 54, 48, 55, 35 시열 50, 51, 55, 35 시열 50, 51, 56, 35
수용자 - 2	A JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR B JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR C JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCCAR D JADTTSKNTAYLOMNSIRAEDTAVVYCC	[Redacted] [Redacted] [Redacted] [Redacted]	시열 54, 48, 57, 35 시열 50, 51, 57, 35 시열 50, 51, 58, 35 시열 50, 51, 59, 35

도면17



도면18

huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷

huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³

도면19

위치 66 및 99 (밑줄)에서 변형된 huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷

위치 71, 73 및 78 (밑줄)에서 변형된 huMAb4D5-8 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹²
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³

HVR-H1 시열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 상승 항체

		카바트 번호															
항체 #	시열 번호	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35						
A, A-1, A-2	81	G	F	T	F	S	N	Y	G	I	H						

HVR-H2 시열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 상승 항체

		카바트 번호																							
항체 #	시열 번호	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65							
A, A-1	82	W	I	T	P	D	G	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G							
A-2	83	W	I	T	G	N	G	G	Y	S	D	Y	A	D	S	V	K	G							
컨센서스	84	W	I	T	P/G	D/N	G	G	Y	T/S	D	Y	A	D	S	V	K	G							

HVR-H3 시열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 상승 항체

		카바트 번호									
항체 #	시열 번호	95	96	97	98	100k	101	102			
A, A-2	85	A	G	S	W	F	A	Y			
A-1	86	A	G	S	L	F	A	Y			
컨센서스	87	A	G	S	W/L	F	A	Y			

도면21

HVR-L1 서열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	서열 번호	카바트 번호												
		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
A, A-1, A-2	88	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		

HVR-L2 서열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 성숙 항체

항체 #	서열 번호	카바트 번호									
		50	51	52	53	54	55	56			
A, A-1, A-2	89	S	A	S	F	L	Y	S			

HVR-L3 서열 - 항체 A 및 항체 A로부터 유래된 친화도 성숙 항체

클론 #	서열 번호	카바트 번호														
		89	90	91	92	93	94	95	96	97						
A, A-2	90	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T						
A-1	91	Q	Q	Y	Y	T	T	A	T	T						
컨센서스	92	Q	Q	S/Y	Y	T	T	P/A	P/T	T						

도면22

항체 A, A-1, A-2 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
Arg Val Thr Ile Thr Cys²³
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys⁸⁸
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg¹⁰⁸

항체 A, A-1, A-2 중쇄 가변 도메인의 프레임워크 서열

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly⁴⁹
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg⁹⁴
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³

도면23a

항목	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
항-Notch2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
항-Notch1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
항-Notch3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
항-Jag1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
카바트 - CDR11																								
	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
항-Notch2	R	A	S	Q	N	I	K	R	F	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	G
항-Notch1	R	A	S	Q	D	V	S	F	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G
항-Notch3	R	A	S	Q	G	I	S	S	Y	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G
항-Jag1	R	A	S	Q	D	V	S	F	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G
카바트 - CDR12																								
	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	54A	54B	54C	54D	54E	55	56	57	58	59	
항-Notch2	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	T	R	E	S	G	V	P	
항-Notch1	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	E	S	G	V	P	
항-Notch3	K	A	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	L	E	S	G	V	P	
항-Jag1	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	
항-Notch2	60	61	62	63	64	65	66	66A	66B	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
항-Notch1	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E
항-Notch3	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E
항-Jag1	S	R	F	S	G	S	G	.	.	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E

도면23b

영제	경쇄 시열	카바트 - CRL3																											
		82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95A	95B	95C	95D	95E	95F	96	97	98	99				
영-Notch2	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	R	S	P	H	T	F	G			
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	Y	T	P	S	T	F	G				
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	N	S	Y	P	F	T	F	G				
영-Notch1	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
영-Notch3	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G				
영-Jag1	100	101	102	103	104	105	106	107																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
영-Notch2	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
영-Notch1	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
영-Notch3	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
영-Jag1	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					
	Q	G	T	K	V	E	I	K																					

도면24b

항목	증쇄 서열													카바트 - CDR H3												
	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J		
항-Notch2	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	S	G	Y	Y	R	I	S	S	A		
항-Notch1	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	S	G	F	R	W	V		
항-Notch3	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Q	Y	Y	R	D		
항-Jag1	T	A	V	Y	Y	C	A	R	A	G	S	W		
항-Notch2	100K	100L	100M	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113										
항-Notch1	.	.	M	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	V	T	V	S	S									
항-Notch3	.	.	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	V	T	V	S	S									
항-Jag1	.	.	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	V	T	V	S	S									

카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40

카바트-CDRH1

코티아-CDRH1

접속-CDRH1

A E V Q I V E S S G G G I V Q P G G S I R I S C A A S G F T F S N Y G I H W V R Q A
 A-1 E V Q I V E S S G G G I V Q P G G S I R I S C A A S G F T F S N Y G I H W V R Q A
 A-2 E V Q I V E S S G G G I V Q P G G S I R I S C A A S G F T F S N Y G I H W V R Q A

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

카바트-CDRH2

코티아-CDRH2

접속-CDRH2

A P G K G L E W V G W I T P . . D G G Y F D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
 A-1 P G K G L E W V G W I T P . . D G G Y F D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A
 A-2 P G K G L E W V G W I T G . . N G G Y S D Y A D S V K G R R F T I S A D T S K N T A

카바트# 79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

카바트-CDRH3

코티아-CDRH3

접속-CDRH3

A Y E Q M K S I R A E D T A V Y Y C A R A G S W - - - - - F A Y W G Q G T L V T V S S 서열 93
 A-1 Y E Q M K S I R A E D T A V Y Y C A R A G S L - - - - - F A Y W G Q G T L V T V S S 서열 94
 A-2 Y L Q M K S I R A E D T A V Y Y C A R A G S W - - - - - F A Y W G Q G T L V T V S S 서열 95

도면25a

도면25b

<p>카바트# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107</p>	<p>A E D F A F E Y Y C Q Q S Y T T P P F F G Q G T K V E I K 서열 96 A-1 E D F A F E Y Y C Q Q Y T T T A T F F G Q G T K V E I K 서열 97 A-2 E D F A F E Y Y C Q Q S Y T T P P F F G Q G T K V E I K 서열 98</p>
<p>카바트-CDR13 쿠퍼아-CDR13 결속-CDR13</p>	
<p>카바트# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80</p>	<p>A Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G F D F T L T I S S L Q P A-1 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G F D F T L T I S S L Q P A-2 Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S</p>
<p>카바트-CDR12 쿠퍼아-CDR12 결속-CDR12</p>	
<p>카바트# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37</p>	<p>A D I Q M T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q A-1 D I Q M T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q A-2 D I Q M T Q S P S S I S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q</p>
<p>카바트-CDR11 쿠퍼아-CDR11 결속-CDR11</p>	

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENENTECH, INC. ET AL.
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF HEPATIC CANCERS
- <130> P5570R1-WO
- <140><141><150> 61/789,475
- <151> 2013-03-15
- <160> 107

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

Ala Asp Leu Gly Ser

1 5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

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

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 4

His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 6

Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 7
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 8
 Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe Leu Ala

1 5 10

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Asn

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Asn" or "Val"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Arg" or "Lys"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)
 <223> /replace="Arg"
 <220><221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /replace="Phe"
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> /note="Variant residues given in the sequence have no
 preference with respect to those in the annotations
 for variant positions"
 <400> 9
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 10
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

1 5
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 11
 Gly Ala Ser Arg Arg Ala Ser

1 5
 <210>

> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 12
Arg Ala Ser Ile Arg Ala Ser
1 5
<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 13
Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<220><221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Arg"
<220><221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace="Arg" or "Ile" or "Thr"
<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)
<223> /replace="Glu"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"
<400> 14
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

1 5
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 15
Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

1 5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"
<400> 16
Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 17
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Ser Pro Ser Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 18
 Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 9

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <220><221> VARIANT
 <222> (5)..(5)
 <223> /replace="Ile" or "Arg"
 <220><221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace="Ser" or "His"
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations"

for variant positions"

<400> 19

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr

1 5

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Tyr Arg Ile Ser Ser Ala Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 22
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 23
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Asn Arg Arg Phe

100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 25

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

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Leu Val Pro Arg Gly Ser

1 5

<210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 27
 His His His His His His
 1 5

<210> 28
 <211> 344
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 28

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

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

Val Gln Pro Asp Ser Ile Ile Glu Lys Ala Ser His Ser Gly Met Ile
 115 120 125
 Asn Pro Ser Arg Gln Trp Gln Thr Leu Lys Gln Asn Thr Gly Val Ala

130 135 140
 His Phe Glu Tyr Gln Ile Arg Val Thr Cys Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly
 145 150 155 160
 Phe Gly Cys Asn Lys Phe Cys Arg Pro Arg Asp Asp Phe Phe Gly His
 165 170 175

 Tyr Ala Cys Asp Gln Asn Gly Asn Lys Thr Cys Met Glu Gly Trp Met
 180 185 190
 Gly Pro Glu Cys Asn Arg Ala Ile Cys Arg Gln Gly Cys Ser Pro Lys
 195 200 205
 His Gly Ser Cys Lys Leu Pro Gly Asp Cys Arg Cys Gln Tyr Gly Trp
 210 215 220
 Gln Gly Leu Tyr Cys Asp Lys Cys Ile Pro His Pro Gly Cys Val His
 225 230 235 240

 Gly Ile Cys Asn Glu Pro Trp Gln Cys Leu Cys Glu Thr Asn Trp Gly
 245 250 255
 Gly Gln Leu Cys Asp Lys Asp Leu Asn Tyr Cys Gly Thr His Gln Pro
 260 265 270
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ser Asn Thr Gly Pro Asp Lys Tyr Gln
 275 280 285
 Cys Ser Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Pro Asn Cys Glu Ile Ala Glu
 290 295 300

 His Ala Cys Leu Ser Asp Pro Cys His Asn Arg Gly Ser Cys Lys Glu
 305 310 315 320
 Thr Ser Leu Gly Phe Glu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Trp Thr Gly Pro
 325 330 335
 Thr Cys Ser Thr Asn Ile Asp Asp
 340

 <210> 29
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
 1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
 50 55 60

Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
 85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
 100 105 110

Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
 115 120 125

Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
 130 135 140

Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
 145 150 155 160

Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
 165 170 175

Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
 180 185 190

Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
 195 200 205

Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
 210 215 220

Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240

Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu

245 250 255
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270

Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285
 Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 30

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 30

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 31

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 32

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 33

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

1 5 10

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 35

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

 20 25

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 37

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

1 5 10

<210> 38

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 38

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 39

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

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

1 5 10

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400

> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

 20 25

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

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

1 5 10

<210> 45

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 45

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 46

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 48

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 49

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

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

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

 20 25

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 51

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 52

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

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

<210> 53

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 53

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

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

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 54

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

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

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 55

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 56

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 57

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 58

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 58

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

 20 25 30

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 59

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 60

<211> 23

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"

<400> 60

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 61

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

1 5 10 15

<210> 62

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 63

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 64

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 64

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 65

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

1 5 10 15

<210> 66

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 66

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

1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 67

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 67

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

 20

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 68

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

1 5 10 15

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 69

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

 20 25 30

<210> 70

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 70

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

 20

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 71

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

1 5 10 15

<210> 72

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 72

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 73

<211> 256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Asp Glu Ala Cys Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly
 20 25 30
 Asp Cys Ser Leu Thr Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro
 35 40 45
 Leu Pro Cys Trp Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn
 50 55 60
 Thr Val Glu Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys
 65 70 75 80
 Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His
 85 90 95
 Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp
 100 105 110
 Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Val Ile
 115 120 125
 Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala Arg Ser Phe
 130 135 140
 Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Arg

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

 210 215 220
 Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser Tyr
 225 230 235 240
 Pro Leu Val Ser Val Val Ser Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg Thr Gln
 245 250 255

<210> 74

<211> 258

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 74

Pro Ala Thr Cys Gln Ser Gln Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly
 1 5 10 15

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

Thr Cys Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His
 85 90 95
 Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp
 100 105 110

Cys Ala Ser Asp Gln Pro Glu Asn Leu Ala Glu Gly Thr Leu Ile Ile
 115 120 125

Val Val Leu Leu Pro Pro Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ser Arg Ser Phe
 130 135 140

Leu Arg Ala Leu Gly Thr Leu Leu His Thr Asn Leu Arg Ile Lys Gln
 145 150 155 160

Asp Ser Gln Gly Ala Leu Met Val Tyr Pro Tyr Phe Gly Glu Lys Ser
 165 170 175

Ala Ala Met Lys Lys Gln Lys Met Thr Arg Arg Ser Leu Pro Glu Glu
 180 185 190

Gln Glu Gln Glu Gln Glu Val Ile Gly Ser Lys Ile Phe Leu Glu Ile
 195 200 205

Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Asp Ser Asp Gln Cys Phe Lys Asn Thr
 210 215 220

Asp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ser His Ala Ile Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Leu Val Ser Val Phe Ser Glu Leu Glu Ser Pro Arg Asn
 245 250 255

Ala Gln

<210> 75

<211> 2471

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Met Pro Ala Leu Arg Pro Ala Leu Leu Trp Ala Leu Leu Ala Leu Trp

1 5 10 15

Leu Cys Cys Ala Ala Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Asp Gly Tyr
 20 25 30

Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Met Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr
 35 40 45

Gly Tyr Cys Lys Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His

50 55 60
 Arg Asp Pro Cys Glu Lys Asn Arg Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Val

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

 130 135 140
 Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Ala Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 145 150 155 160
 Thr Val Ala Asn Gln Phe Ser Cys Lys Cys Leu Thr Gly Phe Thr Gly
 165 170 175
 Gln Lys Cys Glu Thr Asp Val Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly His Cys
 180 185 190
 Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Gln Cys Gln

 195 200 205
 Cys Pro Gln Gly Phe Thr Gly Gln Tyr Cys Asp Ser Leu Tyr Val Pro
 210 215 220
 Cys Ala Pro Ser Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly
 225 230 235 240
 Asp Phe Thr Phe Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr
 245 250 255
 Cys Glu Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Arg Cys Gln Asn Gly

 260 265 270
 Gly Val Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro
 275 280 285
 Gln Trp Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu
 290 295 300

Gln Pro Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ala Asn Arg Asn Gly
 305 310 315 320
 Gly Tyr Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser

 325 330 335
 Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Phe Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr
 340 345 350
 Cys Ile Asp Arg Val Ala Ser Phe Ser Cys Met Cys Pro Glu Gly Lys
 355 360 365
 Ala Gly Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys
 370 375 380
 His Lys Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile

 385 390 395 400
 Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asp Cys Thr Glu Asp Val
 405 410 415
 Asp Glu Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys
 420 425 430
 Cys Val Asn Thr Asp Gly Ala Phe His Cys Glu Cys Leu Lys Gly Tyr
 435 440 445
 Ala Gly Pro Arg Cys Glu Met Asp Ile Asn Glu Cys His Ser Asp Pro

 450 455 460
 Cys Gln Asn Asp Ala Thr Cys Leu Asp Lys Ile Gly Gly Phe Thr Cys
 465 470 475 480
 Leu Cys Met Pro Gly Phe Lys Gly Val His Cys Glu Leu Glu Ile Asn
 485 490 495
 Glu Cys Gln Ser Asn Pro Cys Val Asn Asn Gly Gln Cys Val Asp Lys
 500 505 510
 Val Asn Arg Phe Gln Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Pro Val

 515 520 525
 Cys Gln Ile Asp Ile Asp Asp Cys Ser Ser Thr Pro Cys Leu Asn Gly
 530 535 540
 Ala Lys Cys Ile Asp His Pro Asn Gly Tyr Glu Cys Gln Cys Ala Thr

545 550 555 560
 Gly Phe Thr Gly Val Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asn Cys Asp Pro
 565 570 575
 Asp Pro Cys His His Gly Gln Cys Gln Asp Gly Ile Asp Ser Tyr Thr

 580 585 590
 Cys Ile Cys Asn Pro Gly Tyr Met Gly Ala Ile Cys Ser Asp Gln Ile
 595 600 605
 Asp Glu Cys Tyr Ser Ser Pro Cys Leu Asn Asp Gly Arg Cys Ile Asp
 610 615 620
 Leu Val Asn Gly Tyr Gln Cys Asn Cys Gln Pro Gly Thr Ser Gly Val
 625 630 635 640
 Asn Cys Glu Ile Asn Phe Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Ile His

 645 650 655
 Gly Ile Cys Met Asp Gly Ile Asn Arg Tyr Ser Cys Val Cys Ser Pro
 660 665 670
 Gly Phe Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser
 675 680 685
 Asn Pro Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Asn Gly Phe
 690 695 700
 Arg Cys Ile Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln

 705 710 715 720
 Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly
 725 730 735
 Gly Leu Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Ile
 740 745 750
 Asn Cys Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn
 755 760 765
 Gly Gly Thr Cys Asp Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys

 770 775 780
 Lys Gly Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala
 785 790 795 800

Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Phe Asp Asp Ile Ser Gly
 805 810 815

Tyr Thr Cys His Cys Val Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr
 820 825 830

Val Leu Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys
 835 840 845

Lys Glu Ser Pro Asn Phe Glu Ser Tyr Thr Cys Leu Cys Ala Pro Gly
 850 855 860

Trp Gln Gly Gln Arg Cys Thr Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ile Ser Lys
 865 870 875 880

Pro Cys Met Asn His Gly Leu Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Met
 885 890 895

Cys Glu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile
 900 905 910

Asp Asp Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Met Asp
 915 920 925

Gly Val Asn Thr Phe Ser Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Asp
 930 935 940

Lys Cys Gln Thr Asp Met Asn Glu Cys Leu Ser Glu Pro Cys Lys Asn
 945 950 955 960

Gly Gly Thr Cys Ser Asp Tyr Val Asn Ser Tyr Thr Cys Lys Cys Gln
 965 970 975

Ala Gly Phe Asp Gly Val His Cys Glu Asn Asn Ile Asn Glu Cys Thr
 980 985 990

Glu Ser Ser Cys Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser
 995 1000 1005

Phe Ser Cys Leu Cys Pro Val Gly Phe Thr Gly Ser Phe Cys Leu
 1010 1015 1020

His Glu Ile Asn Glu Cys Ser Ser His Pro Cys Leu Asn Glu Gly
 1025 1030 1035

Thr Cys Val Asp Gly Leu Gly Thr Tyr Arg Cys Ser Cys Pro Leu

1040	1045	1050
Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr Leu Val Asn Leu Cys Ser		
1055	1060	1065
Arg Ser Pro Cys Lys Asn Lys Gly Thr Cys Val Gln Lys Lys Ala		
1070	1075	1080
Glu Ser Gln Cys Leu Cys Pro Ser Gly Trp Ala Gly Ala Tyr Cys		
1085	1090	1095
Asp Val Pro Asn Val Ser Cys Asp Ile Ala Ala Ser Arg Arg Gly		
1100	1105	1110
Val Leu Val Glu His Leu Cys Gln His Ser Gly Val Cys Ile Asn		
1115	1120	1125
Ala Gly Asn Thr His Tyr Cys Gln Cys Pro Leu Gly Tyr Thr Gly		
1130	1135	1140
Ser Tyr Cys Glu Glu Gln Leu Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys		
1145	1150	1155
Gln His Gly Ala Thr Cys Ser Asp Phe Ile Gly Gly Tyr Arg Cys		
1160	1165	1170
Glu Cys Val Pro Gly Tyr Gln Gly Val Asn Cys Glu Tyr Glu Val		
1175	1180	1185
Asp Glu Cys Gln Asn Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile		
1190	1195	1200
Asp Leu Val Asn His Phe Lys Cys Ser Cys Pro Pro Gly Thr Arg		
1205	1210	1215
Gly Leu Leu Cys Glu Glu Asn Ile Asp Asp Cys Ala Arg Gly Pro		
1220	1225	1230
His Cys Leu Asn Gly Gly Gln Cys Met Asp Arg Ile Gly Gly Tyr		
1235	1240	1245
Ser Cys Arg Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Glu Arg Cys Glu Gly		
1250	1255	1260
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ser Ser Glu Gly Ser		
1265	1270	1275

Leu Asp Cys Ile Gln Leu Thr Asn Asp Tyr Leu Cys Val Cys Arg
 1280 1285 1290
 Ser Ala Phe Thr Gly Arg His Cys Glu Thr Phe Val Asp Val Cys
 1295 1300 1305
 Pro Gln Met Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ala Val Ala Ser
 1310 1315 1320
 Asn Met Pro Asp Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ser
 1325 1330 1335
 Gly Ala Arg Cys Gln Ser Ser Cys Gly Gln Val Lys Cys Arg Lys
 1340 1345 1350
 Gly Glu Gln Cys Val His Thr Ala Ser Gly Pro Arg Cys Phe Cys
 1355 1360 1365
 Pro Ser Pro Arg Asp Cys Glu Ser Gly Cys Ala Ser Ser Pro Cys
 1370 1375 1380
 Gln His Gly Gly Ser Cys His Pro Gln Arg Gln Pro Pro Tyr Tyr
 1385 1390 1395
 Ser Cys Gln Cys Ala Pro Pro Phe Ser Gly Ser Arg Cys Glu Leu
 1400 1405 1410
 Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Thr Pro Pro Ala Thr Cys Leu Ser Gln
 1415 1420 1425
 Tyr Cys Ala Asp Lys Ala Arg Asp Gly Val Cys Asp Glu Ala Cys
 1430 1435 1440
 Asn Ser His Ala Cys Gln Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Thr
 1445 1450 1455
 Met Glu Asn Pro Trp Ala Asn Cys Ser Ser Pro Leu Pro Cys Trp
 1460 1465 1470
 Asp Tyr Ile Asn Asn Gln Cys Asp Glu Leu Cys Asn Thr Val Glu
 1475 1480 1485
 Cys Leu Phe Asp Asn Phe Glu Cys Gln Gly Asn Ser Lys Thr Cys
 1490 1495 1500
 Lys Tyr Asp Lys Tyr Cys Ala Asp His Phe Lys Asp Asn His Cys

1505	1510	1515
Asp Gln Gly Cys Asn Ser Glu	Glu Cys Gly Trp Asp	Gly Leu Asp
1520	1525	1530
Cys Ala Ala Asp Gln Pro Glu	Asn Leu Ala Glu Gly	Thr Leu Val
1535	1540	1545
Ile Val Val Leu Met Pro Pro	Glu Gln Leu Leu Gln	Asp Ala Arg
1550	1555	1560
Ser Phe Leu Arg Ala Leu Gly	Thr Leu Leu His Thr	Asn Leu Arg
1565	1570	1575
Ile Lys Arg Asp Ser Gln Gly	Glu Leu Met Val Tyr	Pro Tyr Tyr
1580	1585	1590
Gly Glu Lys Ser Ala Ala Met	Lys Lys Gln Arg Met	Thr Arg Arg
1595	1600	1605
Ser Leu Pro Gly Glu Gln Glu	Gln Glu Val Ala Gly	Ser Lys Val
1610	1615	1620
Phe Leu Glu Ile Asp Asn Arg	Gln Cys Val Gln Asp	Ser Asp His
1625	1630	1635
Cys Phe Lys Asn Thr Asp Ala	Ala Ala Ala Leu Leu	Ala Ser His
1640	1645	1650
Ala Ile Gln Gly Thr Leu Ser	Tyr Pro Leu Val Ser	Val Val Ser
1655	1660	1665
Glu Ser Leu Thr Pro Glu Arg	Thr Gln Leu Leu Tyr	Leu Leu Ala
1670	1675	1680
Val Ala Val Val Ile Ile Leu	Phe Ile Ile Leu Leu	Gly Val Ile
1685	1690	1695
Met Ala Lys Arg Lys Arg Lys	His Gly Ser Leu Trp	Leu Pro Glu
1700	1705	1710
Gly Phe Thr Leu Arg Arg Asp	Ala Ser Asn His Lys	Arg Arg Glu
1715	1720	1725
Pro Val Gly Gln Asp Ala Val	Gly Leu Lys Asn Leu	Ser Val Gln
1730	1735	1740

Val Ser Glu Ala Asn Leu Ile Gly Thr Gly Thr Ser Glu His Trp
 1745 1750 1755
 Val Asp Asp Glu Gly Pro Gln Pro Lys Lys Val Lys Ala Glu Asp
 1760 1765 1770
 Glu Ala Leu Leu Ser Glu Glu Asp Asp Pro Ile Asp Arg Arg Pro
 1775 1780 1785
 Trp Thr Gln Gln His Leu Glu Ala Ala Asp Ile Arg Arg Thr Pro
 1790 1795 1800
 Ser Leu Ala Leu Thr Pro Pro Gln Ala Glu Gln Glu Val Asp Val
 1805 1810 1815
 Leu Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Cys Thr Pro Leu Met
 1820 1825 1830
 Leu Ala Ser Leu Arg Gly Gly Ser Ser Asp Leu Ser Asp Glu Asp
 1835 1840 1845
 Glu Asp Ala Glu Asp Ser Ser Ala Asn Ile Ile Thr Asp Leu Val
 1850 1855 1860
 Tyr Gln Gly Ala Ser Leu Gln Ala Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu
 1865 1870 1875
 Met Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ala Asp Ala Ala
 1880 1885 1890
 Lys Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Asp Ala Asn Ala Gln Asp Asn
 1895 1900 1905
 Met Gly Arg Cys Pro Leu His Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Gln
 1910 1915 1920
 Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn Arg Val Thr Asp Leu Asp
 1925 1930 1935
 Ala Arg Met Asn Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg
 1940 1945 1950
 Leu Ala Val Glu Gly Met Val Ala Glu Leu Ile Asn Cys Gln Ala
 1955 1960 1965
 Asp Val Asn Ala Val Asp Asp His Gly Lys Ser Ala Leu His Trp

1970 1975 1980
 Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Glu Ala Thr Leu Leu Leu Leu Lys

 1985 1990 1995
 Asn Gly Ala Asn Arg Asp Met Gln Asp Asn Lys Glu Glu Thr Pro
 2000 2005 2010
 Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Ala Ala Lys Ile
 2015 2020 2025
 Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp
 2030 2035 2040
 Arg Leu Pro Arg Asp Val Ala Arg Asp Arg Met His His Asp Ile

 2045 2050 2055
 Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Val Thr Pro Ser Pro Pro Gly
 2060 2065 2070
 Thr Val Leu Thr Ser Ala Leu Ser Pro Val Ile Cys Gly Pro Asn
 2075 2080 2085
 Arg Ser Phe Leu Ser Leu Lys His Thr Pro Met Gly Lys Lys Ser
 2090 2095 2100
 Arg Arg Pro Ser Ala Lys Ser Thr Met Pro Thr Ser Leu Pro Asn

 2105 2110 2115
 Leu Ala Lys Glu Ala Lys Asp Ala Lys Gly Ser Arg Arg Lys Lys
 2120 2125 2130
 Ser Leu Ser Glu Lys Val Gln Leu Ser Glu Ser Ser Val Thr Leu
 2135 2140 2145
 Ser Pro Val Asp Ser Leu Glu Ser Pro His Thr Tyr Val Ser Asp
 2150 2155 2160
 Thr Thr Ser Ser Pro Met Ile Thr Ser Pro Gly Ile Leu Gln Ala

 2165 2170 2175
 Ser Pro Asn Pro Met Leu Ala Thr Ala Ala Pro Pro Ala Pro Val
 2180 2185 2190
 His Ala Gln His Ala Leu Ser Phe Ser Asn Leu His Glu Met Gln
 2195 2200 2205

Pro Leu Ala His Gly Ala Ser Thr Val Leu Pro Ser Val Ser Gln
 2210 2215 2220

Leu Leu Ser His His His Ile Val Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ala
 2225 2230 2235

Gly Ser Leu Ser Arg Leu His Pro Val Pro Val Pro Ala Asp Trp
 2240 2245 2250

Met Asn Arg Met Glu Val Asn Glu Thr Gln Tyr Asn Glu Met Phe
 2255 2260 2265

Gly Met Val Leu Ala Pro Ala Glu Gly Thr His Pro Gly Ile Ala
 2270 2275 2280

Pro Gln Ser Arg Pro Pro Glu Gly Lys His Ile Thr Thr Pro Arg
 2285 2290 2295

Glu Pro Leu Pro Pro Ile Val Thr Phe Gln Leu Ile Pro Lys Gly
 2300 2305 2310

Ser Ile Ala Gln Pro Ala Gly Ala Pro Gln Pro Gln Ser Thr Cys
 2315 2320 2325

Pro Pro Ala Val Ala Gly Pro Leu Pro Thr Met Tyr Gln Ile Pro
 2330 2335 2340

Glu Met Ala Arg Leu Pro Ser Val Ala Phe Pro Thr Ala Met Met
 2345 2350 2355

Pro Gln Gln Asp Gly Gln Val Ala Gln Thr Ile Leu Pro Ala Tyr
 2360 2365 2370

His Pro Phe Pro Ala Ser Val Gly Lys Tyr Pro Thr Pro Pro Ser
 2375 2380 2385

Gln His Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Ala Ala Glu Arg Thr Pro Ser
 2390 2395 2400

His Ser Gly His Leu Gln Gly Glu His Pro Tyr Leu Thr Pro Ser
 2405 2410 2415

Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Ala
 2420 2425 2430

Ser Asp Trp Ser Asp Val Thr Thr Ser Pro Thr Pro Gly Gly Ala

2435 2440 2445
 Gly Gly Gly Gln Arg Gly Pro Gly Thr His Met Ser Glu Pro Pro
 2450 2455 2460
 His Asn Asn Met Gln Val Tyr Ala
 2465 2470

 <210> 76
 <211> 1180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 Met Pro Asp Leu Arg Pro Ala Ala Leu Arg Ala Leu Leu Trp Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Ala Gly Pro Ala His Ala Leu Gln Cys Arg Gly Gly Gln
 20 25 30
 Glu Pro Cys Val Asn Glu Gly Thr Cys Val Thr Tyr His Asn Gly Thr
 35 40 45
 Gly Phe Cys Arg Cys Pro Glu Gly Phe Leu Gly Glu Tyr Cys Gln His

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

 115 120 125
 Tyr Glu Cys Thr Cys Gln Val Gly Phe Thr Gly Lys Gln Cys Gln Trp
 130 135 140
 Thr Asp Ala Cys Leu Ser His Pro Cys Glu Asn Gly Ser Thr Cys Thr
 145 150 155 160
 Ser Val Ala Ser Gln Phe Ser Cys Lys Cys Pro Ala Gly Leu Thr Gly
 165 170 175

Gln Lys Cys Glu Ala Asp Ile Asn Glu Cys Asp Ile Pro Gly Arg Cys

180 185 190

Gln His Gly Gly Thr Cys Leu Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Gln

195 200 205

Cys Gly Gln Gly Phe Thr Gly Gln His Cys Asp Ser Pro Tyr Val Arg

210 215 220

Gly Leu Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys Arg Gln Thr Gly Asp Phe

225 230 235 240

Thr Leu Glu Cys Asn Cys Leu Pro Gly Phe Glu Gly Ser Thr Cys Glu

245 250 255

Arg Asn Ile Asp Asp Cys Pro Asn His Lys Cys Gln Asn Gly Gly Val

260 265 270

Cys Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Gln Trp

275 280 285

Thr Gly Gln Phe Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Leu Leu Gln Pro

290 295 300

Asn Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Thr Asn Arg Asn Gly Gly Tyr

305 310 315 320

Gly Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Ser Gly Asp Asp Cys Ser Glu Asn

325 330 335

Ile Asp Asp Cys Ala Tyr Ala Ser Cys Thr Pro Gly Ser Thr Cys Ile

340 345 350

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

355 360 365

Leu Leu Cys His Leu Asp Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys His Lys

370 375 380

Gly Ala Leu Cys Asp Thr Asn Pro Leu Asn Gly Gln Tyr Ile Cys Thr

385 390 395 400

Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asp Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu

405 410 415

Cys Ala Met Ala Asn Ser Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Val

Thr Gly Gln Arg Cys Asn Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro
 675 680 685
 Cys Arg Lys Gly Ala Thr Cys Ile Asn Asp Val Asn Gly Phe Arg Cys
 690 695 700
 Ile Cys Pro Glu Gly Pro His His Pro Ser Cys Tyr Ser Gln Val Asn
 705 710 715 720
 Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Asn Cys Thr Gly Gly Leu
 725 730 735
 Ser Gly Tyr Lys Cys Leu Cys Asp Ala Gly Trp Val Gly Val Asn Cys
 740 745 750
 Glu Val Asp Lys Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly
 755 760 765
 Thr Cys Asn Asn Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Thr Cys Lys Lys Gly
 770 775 780
 Phe Lys Gly Tyr Asn Cys Gln Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Ser Asn
 785 790 795 800
 Pro Cys Leu Asn Gln Gly Thr Cys Phe Asp Asp Val Ser Gly Tyr Thr
 805 810 815
 Cys His Cys Met Leu Pro Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Gln Thr Val Leu
 820 825 830
 Ala Pro Cys Ser Pro Asn Pro Cys Glu Asn Ala Ala Val Cys Lys Glu
 835 840 845
 Ala Pro Asn Phe Glu Ser Phe Ser Cys Leu Cys Ala Pro Gly Trp Gln
 850 855 860
 Gly Lys Arg Cys Thr Val Asp Val Asp Glu Cys Ile Ser Lys Pro Cys
 865 870 875 880
 Met Asn Asn Gly Val Cys His Asn Thr Gln Gly Ser Tyr Val Cys Glu
 885 890 895
 Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Met Asp Cys Glu Glu Asp Ile Asn Asp
 900 905 910
 Cys Leu Ala Asn Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Val Asp His Val

Gly Ala Thr Cys Asn Asp Phe Ile Gly Gly Tyr Arg Cys Glu Cys
 1160 1165 1170
 Val Pro Gly Tyr Gln Gly Val
 1175 1180
 <210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 77
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 1218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 Met Arg Ser Pro Arg Thr Arg Gly Arg Ser Gly Arg Pro Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala Leu Leu Cys Ala Leu Arg Ala Lys Val Cys Gly Ala Ser
 20 25 30
 Gly Gln Phe Glu Leu Glu Ile Leu Ser Met Gln Asn Val Asn Gly Glu
 35 40 45
 Leu Gln Asn Gly Asn Cys Cys Gly Gly Ala Arg Asn Pro Gly Asp Arg
 50 55 60
 Lys Cys Thr Arg Asp Glu Cys Asp Thr Tyr Phe Lys Val Cys Leu Lys
 65 70 75 80
 Glu Tyr Gln Ser Arg Val Thr Ala Gly Gly Pro Cys Ser Phe Gly Ser
 85 90 95
 Gly Ser Thr Pro Val Ile Gly Gly Asn Thr Phe Asn Leu Lys Ala Ser

Glu Thr Ser Leu Gly Phe Glu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Trp Thr Gly

 355 360 365
 Pro Thr Cys Ser Thr Asn Ile Asp Asp Cys Ser Pro Asn Asn Cys Ser
 370 375 380
 His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Leu Val Asn Gly Phe Lys Cys Val Cys
 385 390 395 400
 Pro Pro Gln Trp Thr Gly Lys Thr Cys Gln Leu Asp Ala Asn Glu Cys
 405 410 415
 Glu Ala Lys Pro Cys Val Asn Ala Lys Ser Cys Lys Asn Leu Ile Ala

 420 425 430
 Ser Tyr Tyr Cys Asp Cys Leu Pro Gly Trp Met Gly Gln Asn Cys Asp
 435 440 445
 Ile Asn Ile Asn Asp Cys Leu Gly Gln Cys Gln Asn Asp Ala Ser Cys
 450 455 460
 Arg Asp Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Ile Cys Pro Pro Gly Tyr Ala
 465 470 475 480
 Gly Asp His Cys Glu Arg Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys

 485 490 495
 Leu Asn Gly Gly His Cys Gln Asn Glu Ile Asn Arg Phe Gln Cys Leu
 500 505 510
 Cys Pro Thr Gly Phe Ser Gly Asn Leu Cys Gln Leu Asp Ile Asp Tyr
 515 520 525
 Cys Glu Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Gln Cys Tyr Asn Arg Ala
 530 535 540
 Ser Asp Tyr Phe Cys Lys Cys Pro Glu Asp Tyr Glu Gly Lys Asn Cys

 545 550 555 560
 Ser His Leu Lys Asp His Cys Arg Thr Thr Pro Cys Glu Val Ile Asp
 565 570 575
 Ser Cys Thr Val Ala Met Ala Ser Asn Asp Thr Pro Glu Gly Val Arg
 580 585 590
 Tyr Ile Ser Ser Asn Val Cys Gly Pro His Gly Lys Cys Lys Ser Gln

Gly His Ser Gly Ala Lys Cys Gln Glu Val Ser Gly Arg Pro Cys Ile
 850 855 860
 Thr Met Gly Ser Val Ile Pro Asp Gly Ala Lys Trp Asp Asp Asp Cys
 865 870 875 880
 Asn Thr Cys Gln Cys Leu Asn Gly Arg Ile Ala Cys Ser Lys Val Trp
 885 890 895
 Cys Gly Pro Arg Pro Cys Leu Leu His Lys Gly His Ser Glu Cys Pro
 900 905 910
 Ser Gly Gln Ser Cys Ile Pro Ile Leu Asp Asp Gln Cys Phe Val His
 915 920 925
 Pro Cys Thr Gly Val Gly Glu Cys Arg Ser Ser Ser Leu Gln Pro Val
 930 935 940
 Lys Thr Lys Cys Thr Ser Asp Ser Tyr Tyr Gln Asp Asn Cys Ala Asn
 945 950 955 960
 Ile Thr Phe Thr Phe Asn Lys Glu Met Met Ser Pro Gly Leu Thr Thr
 965 970 975
 Glu His Ile Cys Ser Glu Leu Arg Asn Leu Asn Ile Leu Lys Asn Val
 980 985 990
 Ser Ala Glu Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Cys Glu Pro Ser Pro Ser Ala
 995 1000 1005
 Asn Asn Glu Ile His Val Ala Ile Ser Ala Glu Asp Ile Arg Asp
 1010 1015 1020
 Asp Gly Asn Pro Ile Lys Glu Ile Thr Asp Lys Ile Ile Asp Leu
 1025 1030 1035
 Val Ser Lys Arg Asp Gly Asn Ser Ser Leu Ile Ala Ala Val Ala
 1040 1045 1050
 Glu Val Arg Val Gln Arg Arg Pro Leu Lys Asn Arg Thr Asp Phe
 1055 1060 1065
 Leu Val Pro Leu Leu Ser Ser Val Leu Thr Val Ala Trp Ile Cys
 1070 1075 1080
 Cys Leu Val Thr Ala Phe Tyr Trp Cys Leu Arg Lys Arg Arg Lys

Gln Cys Ser Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Pro Asn Cys Glu Ile Ala
 325 330 335

Glu His Ala Cys Leu Ser Asp Pro Cys His Asn Arg Gly Ser Cys Lys
 340 345 350

Glu Thr Ser Ser Gly Phe Glu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Trp Thr Gly
 355 360 365

Pro Thr Cys Ser Thr Asn Ile Asp Asp Cys Ser Pro Asn Asn Cys Ser
 370 375 380

His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Leu Val Asn Gly Phe Lys Cys Val Cys
 385 390 395 400

Pro Pro Gln Trp Thr Gly Lys Thr Cys Gln Leu Asp Ala Asn Glu Cys
 405 410 415

Glu Ala Lys Pro Cys Val Asn Ala Arg Ser Cys Lys Asn Leu Ile Ala
 420 425 430

Ser Tyr Tyr Cys Asp Cys Leu Pro Gly Trp Met Gly Gln Asn Cys Asp
 435 440 445

Ile Asn Ile Asn Asp Cys Leu Gly Gln Cys Gln Asn Asp Ala Ser Cys
 450 455 460

Arg Asp Leu Val Asn Gly Tyr Arg Cys Ile Cys Pro Pro Gly Tyr Ala
 465 470 475 480

Gly Asp His Cys Glu Arg Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 485 490 495

Leu Asn Gly Gly His Cys Gln Asn Glu Ile Asn Arg Phe Gln Cys Leu
 500 505 510

Cys Pro Thr Gly Phe Ser Gly Asn Leu Cys Gln Leu Asp Ile Asp Tyr
 515 520 525

Cys Glu Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Gln Cys Tyr Asn Arg Ala
 530 535 540

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

Ser His Leu Lys Asp His Cys Arg Thr Thr Thr Cys Glu Val Ile Asp

Cys Arg Ile Asn Ile Asn Glu Cys Gln Ser Ser Pro Cys Ala Phe Gly
 820 825 830

Ala Thr Cys Val Asp Glu Ile Asn Gly Tyr Gln Cys Ile Cys Pro Pro
 835 840 845

Gly His Ser Gly Ala Lys Cys His Glu Val Ser Gly Arg Ser Cys Ile
 850 855 860

Thr Met Gly Arg Val Ile Leu Asp Gly Ala Lys Trp Asp Asp Asp Cys
 865 870 875 880

Asn Thr Cys Gln Cys Leu Asn Gly Arg Val Ala Cys Ser Lys Val Trp
 885 890 895

Cys Gly Pro Arg Pro Cys Arg Leu His Lys Ser His Asn Glu Cys Pro
 900 905 910

Ser Gly Gln Ser Cys Ile Pro Val Leu Asp Asp Gln Cys Phe Val Arg
 915 920 925

Pro Cys Thr Gly Val Gly Glu Cys Arg Ser Ser Ser Leu Gln Pro Val
 930 935 940

Lys Thr Lys Cys Thr Ser Asp Ser Tyr Tyr Gln Asp Asn Cys Ala Asn
 945 950 955 960

Ile Thr Phe Thr Phe Asn Lys Glu Met Met Ser Pro Gly Leu Thr Thr
 965 970 975

Glu His Ile Cys Ser Glu Leu Arg Asn Leu Asn Ile Leu Lys Asn Val
 980 985 990

Ser Ala Glu Tyr Ser Ile Tyr Ile Ala Cys Glu Pro Ser Leu Ser Ala
 995 1000 1005

Asn Asn Glu Ile His Val Ala Ile Ser Ala Glu Asp Ile Arg Asp
 1010 1015 1020

Asp Gly Asn Pro Val Lys Glu Ile Thr Asp Lys Ile Ile Asp Leu
 1025 1030 1035

Val Ser Lys Arg Asp Gly Asn Ser Ser Leu Ile Ala Ala Val Ala
 1040 1045 1050

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

1055 1060 1065
 Leu Val Pro Leu Leu Ser Ser Val Leu Thr Val Ala Trp Val Cys
 1070 1075 1080
 Cys Leu Val Thr Ala Phe Tyr Trp Cys Val Arg Lys Arg Arg Lys
 1085 1090 1095

 Pro Ser Ser His Thr His Ser Ala Pro Glu Asp Asn Thr Thr Asn
 1100 1105 1110
 Asn Val Arg Glu Gln Leu Asn Gln Ile Lys Asn Pro Ile Glu Lys
 1115 1120 1125
 His Gly Ala Asn Thr Val Pro Ile Lys Asp Tyr Glu Asn Lys Asn
 1130 1135 1140
 Ser Lys Met Ser Lys Ile Arg Thr His Asn Ser Glu Val Glu Glu
 1145 1150 1155

 Asp Asp Met Asp Lys His Gln Gln Lys Val Arg Phe Ala Lys Gln
 1160 1165 1170
 Pro Val Tyr Thr Leu Val Asp Arg Glu Glu Lys Ala Pro Ser Gly
 1175 1180 1185
 Thr Pro Thr Lys His Pro Asn Trp Thr Asn Lys Gln Asp Asn Arg
 1190 1195 1200
 Asp Leu Glu Ser Ala Gln Ser Leu Asn Arg Met Glu Tyr Ile Val
 1205 1210 1215

<210> 80

<211> 365

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 80

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

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

50 55 60

Ser Phe Gly Ser Gly Ser Thr Pro Val Ile Gly Gly Asn Thr Phe Asn

65 70 75 80

Leu Lys Ala Ser Arg Gly Asn Asp Arg Asn Arg Ile Val Leu Pro Phe

85 90 95

Ser Phe Ala Trp Pro Arg Ser Tyr Thr Leu Leu Val Glu Ala Trp Asp

100 105 110

Ser Ser Asn Asp Thr Ile Gln Pro Asp Ser Ile Ile Glu Lys Ala Ser

115 120 125

His Ser Gly Met Ile Asn Pro Ser Arg Gln Trp Gln Thr Leu Lys Gln

130 135 140

Asn Thr Gly Ile Ala His Phe Glu Tyr Gln Ile Arg Val Thr Cys Asp

145 150 155 160

Asp His Tyr Tyr Gly Phe Gly Cys Asn Lys Phe Cys Arg Pro Arg Asp

165 170 175

Asp Phe Phe Gly His Tyr Ala Cys Asp Gln Asn Gly Asn Lys Thr Cys

180 185 190

Met Glu Gly Trp Met Gly Pro Asp Cys Asn Lys Ala Ile Cys Arg Gln

195 200 205

Gly Cys Ser Pro Lys His Gly Ser Cys Lys Leu Pro Gly Asp Cys Arg

210 215 220

Cys Gln Tyr Gly Trp Gln Gly Leu Tyr Cys Asp Lys Cys Ile Pro His

225 230 235 240

Pro Gly Cys Val His Gly Thr Cys Asn Glu Pro Trp Gln Cys Leu Cys

245 250 255

Glu Thr Asn Trp Gly Gly Gln Leu Cys Asp Lys Asp Leu Asn Tyr Cys

260 265 270

Gly Thr His Gln Pro Cys Leu Asn Arg Gly Thr Cys Ser Asn Thr Gly

275 280 285

Pro Asp Lys Tyr Gln Cys Ser Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly Pro Asn

290 295 300
 Cys Glu Ile Ala Glu His Ala Cys Leu Ser Asp Pro Cys His Asn Arg

305 310 315 320
 Gly Ser Cys Lys Glu Thr Ser Ser Gly Phe Glu Cys Glu Cys Ser Pro

 325 330 335
 Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Ser Thr Asn Ile Asp Asp Glu Phe Gly

 340 345 350
 Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His His His

 355 360 365

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 81

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Ile His

1 5 10

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 82

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

1 5 10 15

Gly

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 83

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

1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Ser"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(17)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 84

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

1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 85

Ala Gly Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 86

Ala Gly Ser Leu Phe Ala Tyr

1 5

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Leu"
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"
 <400> 87
 Ala Gly Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 88

 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
 <400> 89
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 90

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 91

Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Ala Thr Thr

1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Tyr"

<220><221>

> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Thr"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(9)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 92

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 93

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 94

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 94

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 95

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 95

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Thr Gly Asn Gly Gly Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser

115

<210> 96

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 96

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

<400> 98

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 99

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 99

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

1 5 10

<210> 100

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Arg Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Arg Ser Pro His
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 103

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 104

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 104

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

115

<210> 106

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 106

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

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 107

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 107

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

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

 100 105 110
Thr Val Ser Ser
115