

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0125114
(43) 공개일자 2021년10월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7032002(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월09일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2016-7018130
원출원일자(국제) 2014년12월09일
심사청구일자 2019년12월09일
- (85) 번역문제출일자 2021년10월05일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/069409
- (87) 국제공개번호 WO 2015/089117
국제공개일자 2015년06월18일
- (30) 우선권주장
61/913,891 2013년12월09일 미국(US)
- (71) 출원인
알라코스 인크.
미국 94065 캘리포니아주 레드우드 시티 아일랜드 드라이브 975 #201
- (72) 발명자
베빙턴, 크리스토퍼, 알.
미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이 쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내
파라하티, 러스텀
미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이 쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 13 항

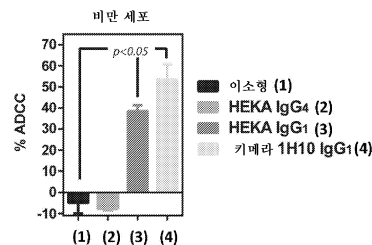
(54) 발명의 명칭 항-Siglec-8 항체 및 그의 사용 방법

(57) 요약

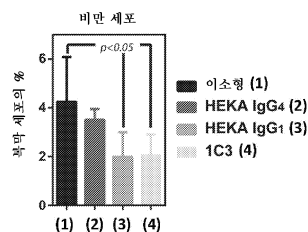
본 발명은 인간화 항-Siglec-8 항체, 및 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애를 치료 및 예방하는 데 있어서의 그의 용도 뿐만 아니라 인간화 항-Siglec-8 항체를 포함하는 조성물 및 키트를 제공한다.

대표도 - 도8

8A



8B



(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/90 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

수자 페르난데스, 캐롤리나, 리타

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이
쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내

매튜, 데이비드, 존

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이
쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내

토마세빅, 네나드

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이
쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내

윌리엄스, 제이슨

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이
쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내

렝, 존

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 스위트 에이
쇼어웨이 로드 75 알라코스 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 항체는 인간 IgG1 Fc 영역 및 Fc 영역에 연결된 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄를 포함하고, N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄의 50% 미만이 푸코스 잔기를 함유하는 것인,

(a) 대상체에서 천식, 알레르기성 비염, 비강 폴립증, 아토피성 피부염, 만성 두드러기, 비만세포증, 호산구성 백혈병, 과다호산구성 증후군, 소수 과립구성 천식, 급성 또는 만성 기도 과민증, 호산구성 식도염, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 신체적 두드러기, 한랭 두드러기, 압박성 두드러기, 수포성 유사천포창, 식품 알레르기, 및 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 치료하거나; 또는 (b) 대상체에서 알레르기 반응의 한 가지 이상의 증상을 억제하는 데 사용하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄 중 어느 것도 푸코스 잔기를 함유하지 않는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 인간화 또는 인간 항체인 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 16 내지 22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 23 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 2 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 16 내지 24

로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 또는 결합 친화력이 항체 2E2 또는 2C4의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 또는 결합 친화력보다 더 높은 것인 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 열 이동 검정에서 70℃ 이상의 T_m을 갖는 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 항체가 열 이동 검정에서 70℃ 이상 내지 72℃ 이상의 T_m을 갖는 것인 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2013년 12월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 61/913,891을 우선권 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

ASCII 텍스트 파일 상의 서열 목록의 제출

ASCII 텍스트 파일 상으로 제출된 다음 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 컴퓨터 판독 가능한 형태(CRF)의 서열 목록(파일명: 701712000140SeqList.txt, 기록일: 2014년 12월 9일, 크기: 115 KB).

본 발명은 항-인간 Siglec-8 항체, 및 Siglec-8을 발현하는 세포에 의해 매개된 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경 기술

Siglec (시알산-결합 이뮤노글로불린-유사 렉틴)는 세포 표면 당접합체에 부착된 시알산에 대한 그의 특이성을 특징으로 하고 주로 백혈구 상에서 발견되는 단일 통과 막관통 세포 표면 단백질이다. Siglec 패밀리는 포유류에서 발견되는 적어도 15개의 구성원을 함유한다 (Pillai et al., *Annu Rev Immunol.*, 2012, 30:357-392). 이들 구성원은 시알로이드헤신 (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), 미엘린(myelin) 관련 당단백질 (Siglec-4), Siglec-5, OBPP1 (Siglec-6), AIRM1 (Siglec-7), SAF-2 (Siglec-8), 및 CD329 (Siglec-9)를 포함한다. 인간에서는 발현되지만, 마우스에서는 그렇지 않은 구성원인 Siglec-8이, 신규의 인간 호산구 단백질을 확인하기 위한 노력의 일부로서 처음으로 밝혀졌다. 호산구에 의한 발현 이외에도, 이는 또한, 비만 세포 및 호염기구에 의해 발현된다. Siglec-8은 황산화 글리칸, 즉 6'-sulfo-sialyl 루이스(Lewis) X 또는 6'-sulfo-sialyl-N-아세틸-S-락토사민을 인식하고, 비만 세포 기능을 억제하는 것으로 밝혀진 세포내 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM) 도메인을 함유한다.

비만 세포와 함께, 호산구는 특이적 조직 부위에서의 감염을 제어하는 것과 같은 유익한 기능적 역할을 하는 염증 반응을 증진시킬 수 있다. 염증 반응 동안, 생존-증진성 시토카인, 예컨대 IL-3 및 GM-CSF의 활성을 통하여, 호산구의 아포토시스(apoptosis)를 억제할 수 있다. 그러나, 아포토시스에 의해 신속하게 제거되지 않는 활성화 호산구가 증가하게 되면, 이미 염증이 생긴 부위에서 호산구 과립 단백질이 방출될 수 있으며, 이는 조직을 손상시킬 수 있고 염증을 추가로 악화시킬 수 있다. 몇 가지 질환, 예컨대 처그 스트라우스 증후군 (Churg Strauss syndrome), 류마티스 관절염 및 알레르기성 천식이 호산구 활성화와 연관되는 것으로 밝혀졌다 (Wechsler et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2012, 130(3):563-71). 현재, 염증에 관여한 면역 세포의 활성,

예컨대 호산구 및 비만 세포의 활성을 제어할 수 있는 요법에 대한 필요성이 대두된다.

[0008] 기존의 연구 결과, Siglec-8이 Siglec-8의 세포외 부분에 대항하여 유발된 특이적 무린 항체와 교차 결합되는 경우에, 호산구가 아토피시스를 진행한다는 사실이 입증되었다 (Nutku et al., *Blood*, 2003, 336:918-24). 이들 항체는 미국 특허 번호 8,207,305, 미국 특허 번호 8,197,811, 미국 특허 번호 7,871,612, 및 미국 특허 번호 7,557,191에 기재되어 있다. 그러나, 인간 Siglec-8을 고 친화도 및 특이성으로 인식하는 인간화 항-Siglec-8 항체를 개발한 필요성이 있다. 이러한 항-Siglec-8 항체를 개발함으로써, 호산구 및/또는 비만 세포의 활성화에 의해 매개된 질환에 대한 치료법을 개발할 수 있다.

[0009] 본원에 인용된 모든 참고 문헌 (특허 출원, 특허 공보, 및 과학 문헌 포함)은, 마치 각각의 개별 참고 문헌이 구체적이고도 개별적으로 참조로 포함된다고 표시되는 것 처럼, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0010] 본원에는 항-Siglec-8 항체 (인간화 항-Siglec-8 항체 포함), 이를 포함하는 조성물, 및 이의 사용 방법이 제공된다.

[0011] 한 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 상기 인간화 항체의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 및/또는 결합 친화력은 항체 2E2 및/또는 항체 2C4의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 및/또는 결합 친화력 보다 더 높다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8은 이량체이다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8은 이뮤노글로불린의 Fc 영역과 융합된 세포외 도메인 인간 Siglec-8을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8은 서열식별번호:(SEQ ID NO:) 74의 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 IgG Fc 영역을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1은 서열식별번호: 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76 또는 77로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트(Kabat)에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 2개의 중쇄를 포함하고, 여기서 상기 항체의 2개의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개가 비-푸코실화된다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 이러한 항체는 열 이동 검정에서 약 70℃ 이상 내지 약 72℃ 이상의 T_m을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 열 이동 검정에서 약 70℃, 약 71℃, 또는 약 72℃의 T_m을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 키메라 2C4 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 T_m을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 T_m을 갖는다.

[0014] 일부 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터

선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 IgG Fc 영역을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1은 서열식별번호: 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76 또는 77로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0015] 또한 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 이러한 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63 및 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66 또는 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 23 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 IgG Fc 영역을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1은 서열식별번호: 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0016] 또한 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 상기 항체는 서열식별번호: 2 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0017] 또한 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 상기 항체는 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 내지 22로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 (a) 상기 중쇄 가변 영역은 (1) 서열식별번호: 26 내지 29로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR1; (2) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (3) 서열식별번호: 31 내지 36으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR2; (4) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (5) 서열식별번호: 38 내지 43으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR3; (6) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (7) 서열식별번호: 45 내지 46으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR4를 포함하고/하거나 (b) 경쇄 가변 영역은 (1) 서열식별번호: 48 내지

49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR1; (2) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1; (3) 서열식별번호: 51 내지 53으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR2; (4) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2; (5) 서열식별번호: 55 내지 58로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR3; (6) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및 (7) 서열식별번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0019]

또한 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 결합하고; ADCC 활성에 의해 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시키는 단리된 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 시험관 내에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시킨다 (예를 들어, 실시예 2에 기재된 바와 같은 세포 배양 검정에서 측정된다). 일부 실시양태에서, 상기 항체는 치료 유효량을 투여한 경우에 대상체에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 고갈시킨다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 처리하기 전의 기준선 수준과 비교하여, 상기 대상체로부터 수득된 샘플 중에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포의 약 20% 이상 (예를 들어, 이상)을 고갈시킨다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 샘플은 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 피부, 폐, 골수, 및 비강 폴립(nasal polyps)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 유체 샘플은 혈액, 기관지 폐포 세척, 및 비강 세척으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 알파1,6-푸코실트랜스페라제 (Fut8) 녹아웃(knockout)을 갖는 세포주에서 생성될 수 있다. 일부 추가 실시양태에서, 상기 항체는 β 1,4-N-아세틸글리코시미닐트랜스페라제 III (GnT-III)을 과다발현하는 세포주에서 생성될 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 세포주는 부가적으로, 글자 μ -만노시다제 II (ManII)를 과다발현한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 ADCC 활성을 개선시키는 Fc 영역 내에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 무린 항체이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을

포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 대상체는 인간일 수 있다.

[0020]

또한 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체가 제공된다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 1 (예를 들어, 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함하는 도메인 1) 내의 에피토프에 결합할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 3 (예를 들어, 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 포함하는 도메인 3) 내의 에피토프에 결합할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 2 (예를 들어, 서열식별번호: 113의 아미노산 서열을 포함하는 도메인 2) 내의 에피토프에 결합할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 듀린 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 IgG1 또는 IgG4 항체 (예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG4)이다.

[0021]

또 다른 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 116의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지 않는 항-인간 Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지만, 서열식별번호: 116의 아미노산을 포함하는 융합 단백질과는 결합하지 않는다. 본원의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0022]

또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 결합하는 인간화 항체가 제공되며, 여기서 활성화 인간 호산구를

고갈시키는 데 있어서의 EC_{50} 은 인간 Siglec-8에 대한 항체 2E2 또는 2C4의 EC_{50} 보다 적다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항체의 EC_{50} 은 인간 Siglec-8에 대한 항체 2E2 또는 2C4의 EC_{50} 보다 약 85% 이하 적다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항체의 EC_{50} 은 인간 Siglec-8에 대한 항체 2E2 또는 2C4의 EC_{50} 보다 약 85%, 약 80%, 약 70%, 약 65%, 약 60%, 약 55%, 약 50%, 약 45%, 약 40%, 약 35%, 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10% 또는 약 5% 이하 적다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 인간화 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 인간화 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 인간화 항체는 서열식별번호: 2 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 IgG Fc 영역을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1은 서열식별번호: 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76 또는 77로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본원에는 상기 및 본원에 기재된 어떠한 항체도 코딩하는 핵산이 제공된다. 또한 또 다른 측면에서, 본원에는 본원에 기재된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 한 실시양태에서, 이러한 벡터는 발현 벡터이다. 또한 또 다른 측면에서, 본원에는 본원에 기재된 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 숙주 세포는 상기 항체를 발현하고 생산한다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본원에는 본원에 기재된 항체를 생성하는 조건 하에, 이러한 항체를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체의 생성 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 숙주 세포에 의해 생성된 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 또한 본원에는 상기 방법에 의해 생성된 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 또한 본원에는 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체의 항원-결합 단편

이 제공된다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본원에는 상기 및 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 단편을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 항체는 Fc 영역; 및 이러한 Fc 영역과 연결된 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄를 포함하며, 여기서 상기 조성물 내의 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄의 50% 미만이 푸코스 잔기를 함유한다. 일부 실시양태에서, N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄는 실질적으로 푸코스 잔기를 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 2 내지 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 내지 22의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 23 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 2 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 조성물은 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 항체의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 및/또는 결합 친화력은 항체 2E2 또는 2C4의 인간 Siglec-8에 대한 결합 친화도 및/또는 결합 친화력 보다 더 높을 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 열 이동 검정에서 약 70°C 이상 내지 약 72°C 이상의 T_m을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 약 70°C, 약 71°C, 또는 약 72°C의 T_m을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 키메라 2C4 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 T_m을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 T_m을 갖는다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본원에는 대상체에게 본원에 기재된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 기재된 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 이러한 대상체에서 Siglec-8을 발현하는 세포에 의해 매개된 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 호산구 매개된 질환이다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 비만 세포 매개된 질환이다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 비강 폴립증, 아토피성 피부염, 만성 두드러기, 비만세포증, 호산구성 백혈병, 및 과다호산구성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 소수 과립구성 천식, 급성 또는 만성 기도 과민증, 호산구성 식도염, 처그-스트라우스 증후군, 시토카인과 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 악성 종양, 신체적 두드러기, 한랭 두드러기, 압박성 두드러기, 수포성 유사천포창, 식품 알레르기, 및 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 알레르기 반응의 한 가지 이상의 증상을 억제한다. 일부 실시양태에서, 알레르기 반응은 유형 I 과민증 반응이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 대상체는 흡입 코르티코스테로이드, 단기 작용 β₂ 효능제, 장기 작용 β₂ 효능제, 또는 그의 조합에 의해 적절하게 제어되지 않는 천식으로 인해 고통받을 수 있다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본원에는 대상체에게 인간 Siglec-8에 결합하는 항체의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 (여기서, 상기 항체는 ADCC 활성화에 의해 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시킨다), 상기 대상체에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 고갈시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 시험관 내에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시킨다 (예를 들어, 실시예 2에 기재된 바와 같은 세포 배양 검정에서 측정된다). 일부 실시양태에서, 상기 항체는 처리하기 전의 기준선 수준과 비교하여, 상기 대상체로부터 수득

된 샘플 중에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포의 약 20% 이상을 고갈시킨다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 샘플은 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 피부, 폐, 골수, 및 비강 폴립으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 유체 샘플은 혈액, 기관지 폐포 세척, 및 비강 세척으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성을 개선하도록 조작될 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 2개의 중쇄를 포함할 수 있고, 여기서 상기 항체의 2개의 중쇄 중 적어도 1개 또는 둘 다는 비-푸코실화된다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 알파1,6-푸코실트랜스페라제 (Fut8) 녹아웃을 갖는 세포주에서 생성될 수 있다. 일부 추가 실시양태에서, 상기 항체는 β 1,4-N-아세틸글리코시미닐트랜스페라제 III (GnT-III)을 과다발현하는 세포주에서 생성될 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 세포주는 부가적으로, 골지 μ -만노시다제 II (ManII)를 과다발현한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 ADCC 활성을 개선시키는 Fc 영역 내에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 인간 IgG1 항체이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 106의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 109의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 110의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 108의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 111의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 대상체는 Siglec-8을 발현하는 세포에 의해 매개된 질환을 갖고 있다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 비강 폴립증, 아토피성 피부염, 만성 두드러기, 비만세포증, 호산구성 백혈병, 및 과다호산구성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 질환은 소수 과립구성 천식, 급성 또는 만성 기도 과민증, 호산구성 식도염, 처그-스트라우스 증후군, 시토카인과 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 악성 종양, 신체적 두드러기, 한랭 두드러기, 압박성 두드러기, 수포성 유사천포창, 식품 알레르기, 및 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 알레르기 반응의 한 가지 이상의 증상을 억제한다. 일부 실시양태에서, 알레르기 반응은 유형 I 과민증 반응이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 대상체는 흡입 코르티코스테로이드, 단기 작용 β 2 효능제, 장기 작용 β 2 효능제, 또는 그의 조합에 의해 적절하게 제어되지 않는 천식으로 인해 고통받을 수 있다. 본원

의 실시양태 중 어느 것에서, 대상체는 인간일 수 있다.

[0029] 본원에 기재된 각종 실시양태의 특성 중 하나, 일부 또는 모두를 합하여 본 발명의 다른 실시양태를 형성할 수 있는 것으로 이해해야 한다. 본 발명의 이들 및 기타 측면은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 이들 및 기타 실시양태는 다음의 상세한 설명으로써 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 인간화 항체의 중쇄 서열의 비교를 보여주는 서열 정렬이다. 마우스 2E2 항체의 분자 모델 내에서 CDR의 4Å 내의 프레임워크 잔기는 *로써 나타내었고; 수용체 인간 프레임워크 내에서 상이한 VCI 잔기 및 CDR의 4Å 내의 잔기는 ^로 강조되었으며; 수용체 인간 프레임워크 내에서의 이들 잔기의 마우스로의 복귀 돌연변이는 @로써 표시되었고; 인간 생식세포 계열로부터의 체세포 돌연변이는 °로써 표시되었으며; 그들 잔기가 AF471521 FW 및 mou2E2 (즉, 마우스 2E2)와 상이하거나 또는 AF471521 프레임워크와 상이하고 mou2E2 (즉, 마우스 2E2)와 동일한 경우에는, 수용체 인간 프레임워크 내에서의 상응하는 잔기가 인간 생식세포 계열로 복귀 돌연변이되었으며, 이는 +로써 표시되었다. 중쇄의 버전 2에서 강조된 서열은 mou2E2 (즉, 마우스 2E2) CDR을 가장 근접한 인간 생식세포 계열 (즉, 가장 근접한 생식세포 계열 서열) 내로 곧바로 이식하는 것을 나타낸다. m2E2 VH는 서열식별번호: 1에 상응하고; 인간 FW AF471521은 서열식별번호: 120에 상응하며; 생식세포 계열 X92218 VH366은 서열식별번호: 121에 상응하고; 2E2 RHA는 서열식별번호: 2에 상응하며; 2E2 RHB는 서열식별번호: 3에 상응하고; 2E2 RHC는 서열식별번호: 4에 상응하며; 2E2 RHD는 서열식별번호: 5에 상응하고; 2E2 RHE는 서열식별번호: 6에 상응하며; 2E2 RHF는 서열식별번호: 7에 상응하고; 2E2 RHG는 서열식별번호: 8에 상응하며; IGHV4-59 FW는 서열식별번호: 122에 상응하고; 2E2 RHA2는 서열식별번호: 9에 상응하며; 2E2 RHB2는 서열식별번호: 10에 상응한다.

도 2는 인간화 항체의 경쇄 서열의 비교를 보여주는 서열 정렬이다. 마우스 2E2 항체의 분자 모델 내에서 CDR의 4Å 내의 프레임워크 잔기는 *로써 나타내었고; 수용체 인간 프레임워크 내에서 상이한 VCI 잔기 및 CDR의 4Å 내의 잔기는 +로써 표시되었으며; 인간 FW 내에서의 이들 잔기의 마우스로의 복귀 돌연변이는 @로써 표시되었고; X93721 프레임워크 내에서 마우스와 상이한 잔기의 인간 생식세포 계열로의 복귀 돌연변이는 #로써 표시되었다. m2E2 VK는 서열식별번호: 15에 상응하고; X93721은 서열식별번호: 123에 상응하며; 생식세포 계열 X01668은 서열식별번호: 124에 상응하고; m2E2 RKA는 서열식별번호: 16에 상응하며; m2E2 RKB는 서열식별번호: 17에 상응하고; m2E2 RKC는 서열식별번호: 18에 상응하며; m2E2 RKD는 서열식별번호: 19에 상응하고; m2E2 RKE는 서열식별번호: 20에 상응하며; m2E2 RKF는 서열식별번호: 21에 상응하고; m2E2 RKG는 서열식별번호: 22에 상응한다.

도 3은 인간화 항체의 경쇄와 중쇄 둘 다에서 돌연변이되었던 CDR 서열의 비교를 보여주는 서열 정렬이다. 생식세포 계열 서열에 보다 근접하도록 변이체 내에서 돌연변이되었던 CDR 잔기가 #로써 표시되었다. 2E2 RKA는 서열식별번호: 16에 상응하고; 2E2 RKF는 서열식별번호: 21에 상응하며; 2E2 RKA F-Y mut는 서열식별번호: 23에 상응하고; 2E2 RKF F-Y mut는 서열식별번호: 24에 상응하며; 2E2 RHA는 서열식별번호: 2에 상응하고; 2E2 RHE는 서열식별번호: 6에 상응하며; 2E2 RHE S-G mut는 서열식별번호: 11에 상응하고; 2E2 RHE E-D mut는 서열식별번호: 12에 상응하며; 2E2 RHE Y-V mut는 서열식별번호: 13에 상응하고; 2E2 RHE E-D 삼중 mut는 서열식별번호: 14에 상응한다.

도 4는 표시된 온도 하에서 10분 동안 가열한 다음, Siglec-8 결합 ELISA를 수행하기 전에 4℃로 냉각시킨, 키메라 2C4에 의해 코딩되거나 또는 2E2 RHE와 2E2 RKA, 2E2 RKF, 2E2 RKA CDR3 돌연변이체 또는 2E2 RKF CDR3 돌연변이체의 조합물에 의해 코딩된 정제된 후보 항체에 의한 Siglec-8 항원 결합의 비교를 보여주는 그래프이다.

도 5는 ch2C4 (즉, 키메라 2C4 항체)와 비교된 바와 같은, 정제된 2C4 후보 항체의 T_m을 보여주는 그래프이다.

도 6은 -20℃ 하에 60분 동안 동결시키고 실온 하에 해동시킨 후, 키메라 및 인간화 항-Siglec-8 항체의 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 7은 항-Siglec-8 항체를 이용하여 호산구를 사멸시키는 것을 보여주는 그래프이다. 총 말초 혈액 백혈구를 표시된 항-Siglec-8 및 대조군 항체 농도의 존재 하에 16시간 동안 인큐베이션하였다. 호산구 수의 감소를 유동 세포계수법에 의해 모니터링하였고, 고 사이드-스캐터(side-scatter) (SSC^{HI})를 이용하여 CD16-음성 IL5Rα+ 세포의 손실로서 정량화하였다.

도 8은 항-Siglec-8 항체에 의한 인간 비만 세포의 생체내 고갈 및 시험관내 아포토시스를 보여주는 일련의 그래프이다. 도 8A. 48시간제에 LDH 방출에 의해 입증된 바와 같이 인간 조혈 줄기 세포가 생착된 NSGS 마우스의 복막 세척으로부터의 1차 인간 비만 세포 상에서 HEKA IgG4 항체, 비-푸코실화 HEKA IgG1 항체 및 저 푸코스 키메라 1H10 IgG1 항체의 NK-세포 매개된 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC) 활성. 대조군은 Siglec-8에 결합하지 않는 푸코실화 인간 IgG1 이소형 항체를 표시한다. 도 8B. 생체 내에서 Siglec-8 양성 비만 세포의 고갈. 인간 비만 세포 상에서와 거의 동등한 수준으로 비만 세포의 표면 상에서 Siglec-8을 선택적으로 발현하는 Siglec-8 트랜스제닉 마우스를, HEKA IgG4 항체, 비-푸코실화 HEKA IgG1 항체, 무린 1C3 항체, 또는 Siglec-8에 결합하지 않는 인간 IgG4 이소형 대조군 항체로 복강내 처리하였다. 군당 4마리의 마우스가 사용되었다.

도 9는 인간화 항-Siglec-8 IgG4 항체에 의한 인간화 마우스에서의 유형 I 과민증 반응의 억제를 보여주는 그래프이다. 항-NP-IgE (오른쪽 귀에 전달됨) 또는 PBS 대조군 (왼쪽 귀에 전달됨)으로 감작시킴으로써 생착시킨 NSGS 마우스의 귀에서 수동 피부 아나필락시스 반응을 유도시켰고, 감작시킨지 24시간 후에 NP-BSA를 투여하였다. 마우스를, *로써 표시된 바와 같이 감작시키기 24시간 전에 또는 @로써 표시된 바와 같이 감작시킨지 2시간 후에 HEKA IgG4, 또는 Siglec-8에 결합하지 않는 인간 IgG4 이소형 대조군 항체로 처리하였다. 시험감염 후 3시간 또는 24시간제에 귀 두께 상의 평균 변화 및 표준 오차가 제시되어 있다. HEKA IgG4 항체 처리된 마우스의 경우에는 군당 5마리 마우스가 사용되었고; 이소형 대조군 항체 처리된 마우스의 경우에는 군당 4마리 마우스가 사용되었다.

도 10은 유동 세포계수법에 의해 입증된 바와 같이, 개코 원숭이(baboon) 및 인간 호산구 ($CD49^{+} CD16^{-} SSC^{HL}$ 세포)에 대한 무린 항-Siglec-8 모노클로날 항체 2E2, 1C3, 및 1H10의 결합을 보여주는 일련의 히스토그램이다. 히스토그램은 Siglec-8에 결합하지 않는 마우스 IgG1 이소형 대조군 항체와 비교하여 각 항체에 대한 형광 세기에 대항하여 플롯된 개코 원숭이 또는 인간 혈액 호산구의 수를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의.

본 발명을 상세히 설명하기 전에, 본 발명이 특별한 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않고, 물론 다양할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 전문 용어는 단지 특별한 실시양태를 설명하기 위한 목적이고, 이로써 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 문맥상 달리 명백히 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "분자"에 대한 언급은 임의로, 둘 이상의 상기 분자의 조합 등을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 본 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 지칭한다. 본원의 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그러한 값 또는 파라미터 자체에 대해 지시되는 실시양태를 포함한다 (그리고 설명한다).

본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 이러한 측면 및 실시양태를 "포함하고", "이루어지고" 및 "본질적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (이뮤노글로불린 Fc 영역을 갖는 완전한 길이의 항체 포함), 폴리에피토프 특이성을 지닌 항체 조성물, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체, 디아보디, 및 단일쇄 분자) 뿐만 아니라 항체 단편 [예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv]을 포함한다. 용어 "이뮤노글로불린" (Ig) 은 본원에서 "항체"와 상호 교환적으로 사용된다.

기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L)와 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이종사량체성 당단백질이다. IgM 항체는 J 쇠로 불리우는 부가의 폴리펩티드와 함께, 상기 기본 이종사량체 단위 중 5개로 이루어지고, 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 반면, IgA 항체는 상기 기본 4-쇄 단위 중 2 내지 5개를 포함하는데, 이를 중합시켜, J 쇠와 조합하여 다량 집합체를 형성할 수 있다. IgG의 경우에는, 4-쇄 단위가 일반적으로, 약 150,000 달톤이다. 각 L 쇠는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 H 쇠와 연결되는 반면, 2개의 H 쇠는 H 쇠 이소형에 따라서 1개 이상의 디설피드 결합에 의해 서로 연결된다. 각 H 및 L 쇠는 또한, 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각 H 쇠는 N-말단에 가변 도메인 (V_H)에 이어, 각각의 α 및 γ 쇠 이소형의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C_H)을 갖고 있고 μ 및 ε 이소형의 경우에는 4개의 C_H 도메인을 갖고 있다. 각 L 쇠는 N-

말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고 있고, 그의 다른 말단에 불변 도메인을 갖고 있다. 이러한 V_L 은 V_H 와 정렬되고 C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})과 정렬된다. 특별한 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 간의 계면을 형성하는 것으로 여겨진다. V_H 와 V_L 이 함께 쌍형성을 하면, 단일 항원 결합 부위가 형성된다. 상이한 부류의 항체의 구조와 특성에 관해서는, 예를 들어 문헌 ([*Basic and Clinical Immunology*, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6])을 참조할 수 있다.

[0037] 어느 척추동물 종으로부터의 L쇄는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 근거하여, 카파 및 람다로 불리우는 2가지 명백히 별개 유형 중 하나로 배정될 수 있다. 그들 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라서, 이뮤노글로불린은 상이한 부류 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 부류의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있으며, 이들은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지명된 중쇄를 갖는다. γ 및 α 부류는 CH 서열 및 기능에 있어서의 비교적 사소한 차이를 근거로 하여 하위부류로 추가로 분할되며, 예를 들어 인간은 다음 하위부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2. IgG1 항체는 동종이형으로 명명된 다중 다형체성 변이체로 존재할 수 있으며 (문헌 [Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7]에서 고찰됨), 이들 중 어느 것도 본 발명에 사용하기 적합하다. 인간 집단 내에서 공통의 동종이형 변이체는 문자 a, f, n, z로써 지명된 것이다.

[0038] "단리된" 항체는 (예를 들어, 자연적으로 또는 재조합적으로) 그의 생성 환경의 성분으로 확인되어 이러한 생성 환경으로부터 분리 및/또는 회수시킨 것이다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드는 그의 생성 환경으로부터의 다른 모든 성분과 연합된 것이 없다. 그의 생성 환경의 오염 성분, 예컨대 재조합 형질감염된 세포로부터 생성된 것은 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 전형적으로 방해할 수도 있는 물질인데, 이는 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 (1) 예를 들어, 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과, 및 일부 실시양태에서 99 중량% 초과로 정제시키거나, (2) 스피닝 컵(spinning cup) 서열 분석기의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 획득하기에 충분한 정도로 정제시키거나, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 은 염색을 이용하여 비-환원성 또는 환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하도록 정제시킨다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하며, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드 또는 항체는 한 가지 이상의 정제 단계에 의해 제조된다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적 항체 집단, 즉 집단을 차지하고 있는 개개의 항체가 미량으로 존재할 수도 있는 가능한 자연 발생적 돌연변이 및/또는 번역 후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일한 집단으로부터 획득한 항체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄에 C-말단 절단을 갖는다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 중쇄 및/또는 경쇄의 C-말단에서 절단된다. 일부 실시양태에서, 이와 같이 C-말단 절단하면, 중쇄로부터 C-말단 리신이 제거된다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄에 N-말단 절단을 갖는다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산 잔기가 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단에서 절단된다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체의 끝을 잘라낸 형태는 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 다중 항원 부위에 대항하여 유도된다 (예컨대, 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체). 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 동질적 항체 집단으로부터 획득되는 바와 같은 항체의 형질을 표시하고, 어떠한 특별한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 추론되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고 자 하는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 기술, 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌, 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 전부 또는 일부를 갖는 동물에게서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성하는 기술을 포함한 각종 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0040] 용어 "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성 표지와 접합되지 않은 항체를 지칭한다.

[0041] 용어 "완전한 길이의 항체", "무손상 항체" 및 "완전 항체"는 항체 단편이 아니라, 그의 실질적인 무손상 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 구체적으로 언급하면, 완전 항체는 Fc 영역을 포함한 중쇄 및 경쇄를 수반한 것을 포함한다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일부 경우에, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 가질 수 있다.

- [0042] "항체 단편"은 무손상 항체의 특정 부분, 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아보디; 선형 항체 (미국 특허 번호 5,641,870, Example 2; 문헌 [Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0043] 항체를 파파인 분해시키면, "Fab" 단편으로 불리우는 2개의 동일한 항원 결합 단편과 잔류성 "Fc" 단편 (이 명칭은 용이하게 결정화될 수 있는 능력을 반영한다)이 생성되었다. Fab 단편은 H쇄의 가변 영역 도메인 (V_H), 및 1개의 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_{H1})과 함께, 전체 L쇄로 이루어진다. 각 Fab 단편은 항원 결합과 관련하여 1가인데, 즉 이는 단일 항원 결합 부위를 갖는다. 항체를 펩신 처리하면, 상이한 항원 결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략 상응하고 항원과 여전히 가교 결합할 수 있는 단일의 대형 F(ab')₂ 단편이 산출된다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함한 C_{H1} 도메인의 카르복시 말단에 수 개의 부가 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하고 있는, Fab'에 대한 본원의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래에는, 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링물이 또한 공지되어 있다.
- [0044] Fc 단편은 디설피드에 의해 결합된 양 H쇄의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정하며, 이러한 영역은 특정 유형의 세포 상에 발견된 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되기도 한다.
- [0045] "Fv"는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인과 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다. 이들 두 도메인의 폴딩으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여해주는 6개의 추가변 루프 (H쇄 및 L쇄로부터 각각 3개의 루프)가 나온다. 그러나, 전체 결합 부위 보다는 낮은 친화도이긴 하지만, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 HVR 만을 포함하는 Fv의 절반)도 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 지니고 있다.
- [0046] "단일-쇄 Fv" (또한, "sFv" 또는 "scFv"로서 약칭됨)는 단일 폴리펩티드쇄 내로 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 해주는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv에 관한 고찰은 문헌 ([Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)])을 참조할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 항체의 "기능적 단편"은 무손상 항체의 특정 부분을 포함하며, 이는 일반적으로, 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역, 또는 변형된 FcR 결합 능력을 보유하거나 갖고 있는 항체의 Fv 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0048] 본원의 모노클로날 항체는 구체적으로, 중쇄 및/또는 경쇄 일부가 특별한 종으로부터 유래되거나 또는 특별한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 반면, 나머지쇄(들)는 또 다른 종으로부터 유래되거나 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린) 뿐만 아니라 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본원의 관심 키메라 항체는 항체의 항원-결합 영역이, 예를 들어 짧은 꼬리(macaque) 원숭이를 관심 항원으로 면역시킴으로써 생성된 항체로부터 유래되는 PRIMATIZED® 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "인간화 항체"는 "키메라 항체"의 일부로서 사용된다.
- [0049] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는, 수용자의 HVR로부터의 잔기를 목적하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 보유하고 있는 비-인간 중 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류의 HVR로부터의 잔기로 대체시킨 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체시킨다. 더욱이, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능, 예컨대 결합 친화성을 추가로 정련시키기 위해 만들어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두

포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린 서열의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이긴 하지만, FR 영역은 항체 성능, 예컨대 결합 친화성, 이성질체화, 면역원성 등을 개선시키는 하나 이상의 개개의 FR 잔기 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 FR에서의 이들 아미노산 치환물의 수는 H 쇄에서 6개 이하이고, L 쇄에서 3개 이하이다. 인간화 항체는 임의로 또한, 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 세부 사항에 대해서는, 예를 들어 문헌 ([Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)])을 참조할 수 있다. 또한, 예를 들어 문헌 ([Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)]; [Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409)을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 단일 항원 부위에 대항하여 유도된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 다중 항원 부위에 대항하여 유도된다. 또 다른 인간화 방법이 미국 특허 번호 7,981,843 및 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0134098에 기재되어 있다.

[0050] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 "VH" 및 "VL"로서 각각 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로, (동일한 부류의 다른 항체와 비교하여) 항체의 가장 가변 부분이고 항원 결합 부위를 함유한다.

[0051] 본원에 사용된 경우의 용어 "추가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 서열 내에 추가변적이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함하며, VH에 3개가 있고 (H1, H2, H3), VL에 3개가 있다 (L1, L2, L3). 천연 항체에서는, H3 및 L3이 6개의 HVR 중 가장 다양성을 나타내고, H3이 특히, 항체에 대한 훌륭한 특이성을 부여하는 데 있어서 독특한 역할을 하는 것으로 여겨진다 (예를 들어, 문헌 [Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)] 참조). 실제로, 중쇄로만 이루어진 자연 발생적 카멜리드(camelid) 항체는 경쇄의 부재 하에서 기능적이고 안정적이다 (예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)]; 및 [Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)] 참조).

[0052] HVR에 관한 다수의 설명이 사용되고 있고 본원에 포괄된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)인 HVR은 서열 가변성에 근거한 것이며, 가장 흔히 사용되고 있다 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)]. 코티아 (Chothia) HVR은 대신 구조적 루프의 위치를 지칭한다 [Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]. "접촉" HVR은 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 근거한 것이다. 이들 HVR 각각으로부터의 잔기가 다음에 제시된다:

루프	카바트	코티아	접촉
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0053]

[0054] 달리 표시되지 않는 한, 가변 도메인 잔기 (HVR 잔기 및 프레임워크 영역 잔기)는 카바트 등 (상기 참조)에 따라서 넘버링된다.

[0055] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0056] 표현 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 그의 변수들은 카바트 등의 문헌 (상기 참조)에서 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메

인의 FR 또는 HVR의 단축, 또는 이러한 FR 또는 HVR 내로의 삽입에 상응하는 몇 개 적거나 또는 부가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따르는 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따르는 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬함으로써 소정의 항체에 대해 결정할 수 있다.

[0057] 본원에서의 목적상 "수용체 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크로부터 유래되거나 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기존의 아미노산 변화 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 또는 2개 이하이다.

[0058] 참조 폴리펩티드 서열을 기준으로 한 "% 아미노산 서열 동일성"은 서열들을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 % 서열 동일성을 달성하며, 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환물도 고려하지 않은 후에, 참조 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 비율 (%)로서 정의된다. % 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은, 예를 들어 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 관련 기술분야의 기술 수준 내의 각종 방식으로 달성할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 서열을 정렬시키는 데 적당한 파라미터를 결정할 수 있으며, 이는 비교되는 완전한 길이의 서열 전반에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데에 필요한 모든 알고리즘을 포함한다. 예를 들어, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 대한 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (또 다른 한편, 소정의 아미노산 서열 B에 대한, 이와와 또는 이에 대한 소정의 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 소정의 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있다)은 다음과 같이 계산한다:

[0059] $100 \times \text{분율 } X/Y$

[0060] 상기에서, X는 A와 B의 프로그램 정렬에서의 서열에 의해 동일한 매칭물 (match)로서 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고; Y는 B 중의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않는 경우에는, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동등하지 않다는 것을 인지해야 할 것이다.

[0061] 특별한 폴리펩티드 또는 특별한 폴리펩티드 상의 에피토프와 "결합"하거나, "특이적으로 결합"하거나 또는 이에 대해 "특이적인" 항체는 다른 모든 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프와는 실질적으로 결합하지 않으면서, 상기 특별한 폴리펩티드 또는 특별한 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체가 무관한 비-Siglec-8 폴리펩티드에 결합하는 것은 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 측정된 바와 같이 [예를 들어, 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)], Siglec-8에 대한 항체 결합의 약 10% 미만이다. 일부 실시양태에서, Siglec-8에 결합하는 항체 [예를 들어, 이량체 형태의 Siglec-8 Fc 융합 단백질 (서열식별번호: 74)]는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.7 \text{ nM}$, $\leq 0.6 \text{ nM}$, $\leq 0.5 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 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.

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "Siglec-8"은 인간 Siglec-8 단백질을 지칭한다. 이러한 용어는 또한, Siglec-8의 자연 발생적 변이체 (스플라이스 변이체 또는 대립 유전자 변이체 포함)를 포함한다. 예시되는 인간 Siglec-8의 아미노산 서열이 서열식별번호: 72에 제시된다. 또 다른 예시되는 인간 Siglec-8의 아미노산 서열이 서열식별번호: 73에 제시된다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 단백질은 이뮤노글로불린 Fc 영역과 융합된 인간 Siglec-8 세포외 도메인을 포함한다. 이뮤노글로불린 Fc 영역과 융합된 예시되는 인간 Siglec-8 세포외 도메인의 아미노산 서열이 서열식별번호: 74에 제시된다. 서열식별번호: 74에서 밑줄친 아미노산 서열은 Siglec-8 Fc 융합 단백질 아미노산 서열의 Fc 영역을 표시한다.

[0063] 인간 Siglec-8 아미노산 서열

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
SGEELHYATLSFHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSKEV
RG

[0064]

[0065] (서열식별번호: 72)

[0066] 인간 Siglec-8 아미노산 서열

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHPRNLTCVSPWACKQGTTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
SGEELHYATLSFHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSKEV
RG

[0067]

[0068] (서열식별번호: 73)

[0069] Siglec-8 Fc 융합 단백질 아미노산 서열

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSE
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0070]

[0071] (서열식별번호: 74)

[0072] "아포토시스를 유도"시키거나 또는 "아포토시스성"인 항체는 표준 아포토시스 검정, 예컨대 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 내형질 세망의 확장, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (아포토시스체로 불리움)의 형성에 의해 결정된 바와 같이, 프로그래밍된 세포 사멸을 유도시키는 것이다. 예를 들어, 본 발명의 항-Siglec-8 항체의 아포토시스 활성은 세포를 아넥신 V로 염색함으로써 나타낼 수 있다.

- [0073] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하며, 이는 항체 이소형에 따라서 다양하다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.
- [0074] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 특성의 세포독성 세포 [예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구, 및 대식 세포] 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR) 상으로 결합된 분비된 Ig로 인해, 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포와 특이적으로 결합할 수 있게 되고, 연속해서 이러한 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. 항체는 이러한 세포독성 세포를 "보강"하고, 상기 기전에 의해 표적 세포를 사멸시키는 데 요구된다. ADCC를 매개하는 데에 있어 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면, 단구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 Fc 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 ADCC를 증강시킨다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 또 다른 한편 또는 부가적으로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. *PNAS USA* 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. ADCC 활성 및 다른 항체 특성을 변경시키는 다른 Fc 변이체는 문헌 ([Ghetie et al., *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997]; [Duncan et al., *Nature* 332:563-564, 1988]; [Lund et al., *J. Immunol* 147:2657-2662, 1991]; [Lund et al., *Mol Immunol* 29:53-59, 1992]; [Alegre et al., *Transplantation* 57:1537-1543, 1994]; [Hutchins et al., *Proc Natl. Acad Sci USA* 92:11980-11984, 1995]; [Jefferis et al., *Immunol Lett.* 44:111-117, 1995]; [Lund et al., *FASEB J* 9:115-119, 1995]; [Jefferis et al., *Immunol Lett* 54:101-104, 1996]; [Lund et al., *J Immunol* 157:4963-4969, 1996]; [Armour et al., *Eur J Immunol* 29:2613-2624, 1999]; [Idusogie et al., *J Immunol* 164:4178-4184, 2000]; [Reddy et al., *J Immunol* 164:1925-1933, 2000]; [Xu et al., *Cell Immunol* 200:16-26, 2000]; [Idusogie et al., *J Immunol* 166:2571-2575, 2001]; [Shields et al., *J Biol Chem* 276:6591-6604, 2001]; [Jefferis et al., *Immunol Lett* 82:57-65, 2002]; [Presta et al., *Biochem Soc Trans* 30:487-490, 2002]; [Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010, 2006]; 미국 특허 번호 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; 7,335,742; 및 7,317,091)에 개시된 것을 포함한다.
- [0075] 본원에서의 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한, 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양하긴 하지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로, 위치 Cys226 하의 아미노산 잔기 또는 위치 Pro230 하의 아미노산 잔기에서부터 그의 카르복실-말단까지 연장하는 것으로 규정된다. 본 발명의 항체에 사용하기 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 단일 아미노산 치환 (카바트 넘버링에 따르는 S228P; IgG4Pro로 지명됨)을 도입하여, 제조합 IgG4 항체에서 관찰된 이질성을 없앨 수 있다 (문헌 [Angal, S. et al. (1993) *Mol Immunol* 30, 105-108] 참조).
- [0076] "비-푸코실화" 또는 "푸코스-결핍성" 항체는 Fc 영역을 포함하는 글리코실화 항체 변이체를 지칭하며, 여기서 이러한 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조는 감소된 푸코스를 갖거나 또는 푸코스가 결여된다. 일부 실시양태에서, 푸코스가 감소되었거나 또는 푸코스가 결여된 항체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 비-푸코실화 또는 푸코스-결핍성 항체는 특정 세포주에서 생성된 동일한 항체 상의 푸코스의 양과 비교하여 감소된 푸코스를 갖는다. 본원에서 고려된 비-푸코실화 또는 푸코스-결핍성 항체 조성물은 이러한 조성물 내의 항체의 Fc 영역에 부착된 N-연결된 글리칸의 약 50% 미만이 푸코스를 포함하는 조성물이다.
- [0077] 용어 "푸코실화" 또는 "푸코실화된"은 항체의 펩티드 주쇄에 부착된 올리고사카라이드 내에 푸코스 잔기가 존재한다는 것을 지칭한다. 구체적으로 언급하면, 푸코실화 항체는 항체 Fc 영역에 부착된 N-연결된 올리고사카라이드 중 하나 또는 둘 다 내의 가장 안쪽의 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 잔기, 예를 들어 인간 IgG1 Fc 도메인의 위치 Asn 297 (Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 α (1,6)-연결된 푸코스를 포함한다. Asn297은 또한, 이뮤노글로불린 내에서의 사소한 서열 변이로 인해, 위치 297의 상류 또는 하류의 약 + 3개 아미노산, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다.
- [0078] "푸코실화도"는, 예를 들어 매트릭스 보조 레이저 탈착-이온화 비행 시간 질량 분광측정법 (MALDI TOF MS)에 의해 평가된 N-글리코시다제 F 처리된 항체 조성물에서, 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 확인된 모든 올리고

사카라이드와 비교하여 푸코실화된 올리고사카라이드의 비율 (%)이다. "완전히 푸코실화된 항체"의 조성물에서, 본질적으로 모든 올리고사카라이드는 푸코스 잔기를 포함하며, 즉 푸코실화된. 일부 실시양태에서, 완전히 푸코실화된 항체의 조성물은 약 90% 이상의 푸코실화도를 갖는다. 따라서, 이러한 조성물 내의 개개의 항체는 전형적으로, Fc 영역 내의 2개의 N-연결된 올리고사카라이드 각각에 푸코스 잔기를 포함한다. 역으로 언급하면, "완전히 비-푸코실화된" 항체의 조성물에서는, 본질적으로 어떠한 올리고사카라이드도 푸코실화되지 않고, 이러한 조성물 내의 개개의 항체는 Fc 영역 내의 2개의 N-연결된 올리고사카라이드 중 어느 것에도 푸코스 잔기를 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 완전히 비-푸코실화된 항체의 조성물은 약 10% 미만의 푸코실화도를 갖는다. "부분적으로 푸코실화된 항체"의 조성물에서는, 올리고사카라이드의 일부만이 푸코스를 포함한다. 이러한 조성물 내의 개개의 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고사카라이드 중 어느 것에도 푸코스 잔기를 포함하지 않거나, 또는 상기 N-연결된 올리고사카라이드 중 하나 또는 둘 다에 푸코스 잔기를 포함할 수 있으며, 단 상기 조성물은 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고사카라이드 내에 푸코스 잔기가 결여된 본질적으로 모든 개개의 항체를 포함하지 않아야 하거나, 또는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고사카라이드 둘 다 내에 푸코스 잔기를 함유하는 본질적으로 모든 개개의 항체를 포함하지 않아야 한다. 한 실시양태에서, 부분적으로 푸코실화된 항체의 조성물은 약 10% 내지 약 80% (예를 들어, 약 50% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 80%, 또는 약 70% 내지 약 80%)의 푸코실화도를 갖는다.

[0079] 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화도"는 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 간의 비-공유적 상호 작용의 세기를 지칭한다. 일부 실시양태에서, Siglec-8에 대한 항체 (이는 본원에 기재된 Siglec-8-Fc 융합 단백질과 같은 이량체일 수 있다)의 친화도는 일반적으로, 해리 상수 (K_d)로써 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화력"은 분자 (예를 들어, 항체)의 다중 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원)의 결합 세기를 지칭한다.

[0081] 본원의 항체를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 이를 생성한 환경에서 통상적으로 연합되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리되는 핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 그러한 생성 환경과 연관된 모든 성분과의 연합이 없다. 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 그것이 자연에서 발견되는 환경 또는 형태 이외의 형태로 존재한다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 세포 내에 자연적으로 존재하는 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과는 구별된다.

[0082] 용어 "제약 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 유효하도록 해줄 수 있는 형태로 존재하고, 상기 제형이 투여되는 대상체에 대해 허용되지 않는 수준으로 독성인 부가의 성분을 전혀 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제형은 멸균성이다.

[0083] 본원에 사용된 바와 같은 "담체"는 이용된 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유류에게 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 인산염, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 항산화제 (아스코르브산 포함); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 PLURONICS™를 포함한다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료"는 임상 병리상태의 과정 동안 치료하고자 하는 개체 또는 세포의 자연 과정을 변경시키기 위해 설계된 임상적 개입을 지칭한다. 목적하는 치료 효과는 질환 진행 속도를 감소시키고, 질환 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차단시키거나 예후를 개선시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 특정 장애 (예를 들어, 호산구-매개된 질환)와 연관된 한 가지 이상의 증상을 경감시키거나 또는 없애는 경우에, 특정 개체는 성공적으로 "치료된" 것이다. 예를 들어, 치료로 인해, 질환을 앓고 있는 개체의 삶의 질이 증가되고/되거나, 질환을 치료하는 데 필요한 다른 의약의 용량이 감소되고/되거나, 질환의 재발 횟수가 감소되고/되거나, 질환의 중증도가 줄어들고/되거나, 질환의 발생 또는 진행이 지연되고/되거나 개체의 생존율이 연장되는 경우에, 특정 개체는 성공적으로 "치료된" 것이다.

[0085] 본원에 사용된 바와 같은, "연계해서"는 하나의 치료 양식 이외에 또 다른 치료 양식을 투여하는 것을 지칭한다. 따라서, "연계해서"는 개체에게 하나의 치료 양식을 투여하기 전, 투여하는 동안 또는 투여 후에 다

른 치료 양식을 투여하는 것을 지칭한다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "예방"은 특정 개체에게서 질환의 발생 또는 재발과 관련한 예방을 제공하는 것을 포함한다. 특정 개체는 장애에 걸리기 쉽거나, 장애에 대해 감수성이 있거나, 또는 장애가 발생할 위험이 있을 수 있지만, 아직까지는 이러한 장애가 있는 것으로 진단되지 않았다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체를 이용하여 장애의 발생을 지연시킨다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같은, 장애가 발생할 "위험이 있는" 개체는 탐지 가능한 질환 또는 질환 증상을 나타낼 수 있거나 나타내지 않을 수 있고, 본원에 기재된 치료 방법에 앞서 탐지 가능한 질환 또는 질환 증상을 표시할 수 있거나 표시하지 않을 수 있다. "위험이 있는"은 특정 개체가 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포 매개된 장애의 발생과 상관이 있는 측정 가능한 파라미터인 하나 이상의 위험 인자를 갖는 것을 의미한다. 이들 위험 인자 중 하나 이상을 갖는 개체는 이들 위험 인자 중 하나 이상을 갖지 않는 개체 보다 상기 장애가 발생할 확률이 더 높다.

[0088] "유효량"은 목적하거나 또는 표시된 효과 (치료적 또는 예방적 결과 포함)를 달성하는 데 필요한 기간 및 투여량에서, 이러한 효과의 달성에 유효한 최소한의 양을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다. "치료 유효량"은 특별한 장애의 측정 가능한 개선을 수행하는 데 요구되는 적어도 최소 농도이다. 본원에서 치료 유효량은 질환 상태, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 유도시킬 수 있는 항체의 능력과 같은 인자에 따라서 다양할 수 있다. 치료 유효량은 또한, 본 발명의 항체의 치료상 유의한 효과가 이러한 항체의 모든 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 것일 수 있다. "예방적으로 유효한 양"은 목적하는 예방적 결과를 달성하는 데 필요한 기간 및 투여량에서, 이러한 효과의 달성에 유효한 양을 지칭한다. 반드시 아니지만 전형적으로, 예방적 용량은 질환의 발생 이전에 또는 질환의 초기 단계에서 대상체에게 사용되기 때문에, 예방적으로 유효한 양은 치료 유효량 보다 적을 수 있다.

[0089] "만성" 투여는 의약(들)을 급성 방식과는 달리 지속적인 방식으로 투여하여, 초기 치료 효과 (활성)가 장기간 유지되도록 하는 것을 지칭한다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 수행하지는 않지만, 사실상 순환식 치료이다.

[0090] 본원에 사용된 바와 같은 "개체" 또는 "대상체"는 포유류이다. 치료 목적상 "포유류"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 게르빌루스쥐, 마우스, 흰족제비, 래트, 고양이 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0091] II. 항-Siglec-8 항체 및 조성물

[0092] 한 측면에서, 본 발명은 인간 Siglec-8에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 다음 특징들 중 하나 이상을 갖는다: (1) 인간 Siglec-8에 결합하는 특징; (2) 인간 Siglec-8의 세포외 도메인에 결합하는 특징; (3) 마우스 항체 2E2 및/또는 마우스 항체 2C4 보다 높은 친화도로 인간 Siglec-8에 결합하는 특징; (4) 마우스 항체 2E2 및/또는 마우스 항체 2C4 보다 높은 친화력으로 인간 Siglec-8에 결합하는 특징; (5) 열 이동 검정에서 약 70°C 내지 72°C 또는 그 보다 높은 T_m을 갖는 특징; (6) 감소된 푸코실화도를 갖거나 또는 비-푸코실화되는 특징; (7) 호산구 상에서 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 호산구의 아포토시스를 유도시키는 특징; (8) 비만 세포 상에서 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 비만 세포를 고갈시키는 특징; (9) 비만 세포 상에서 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 비만 세포의 FcεRI-의존적 활성화 (예를 들어, 히스타민 방출, PGD₂ 방출, Ca²⁺ 유동, 및/또는 β-핵소스아미니다제 방출 등)을 억제하는 특징; (10) ADCC 활성을 개선시키기 위해 조작된 특징; (11) 비만 세포 상에서 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고, (시험관 내, 및/또는 생체 내에서) ADCC 활성화에 의해 비만 세포를 사멸시키는 특징; (12) 인간 및 비-인간 영장류의 Siglec-8에 결합하는 특징; (13) 인간 Siglec-8의 도메인 1, 도메인 2, 및/또는 도메인 3에 결합하거나, 또는 인간 Siglec-8의 도메인 1, 도메인 2, 및/또는 도메인 3을 포함하는 Siglec-8 폴리펩티드 (예를 들어, 본원에 기재된 융합 단백질)에 결합하는 특징; 및 (14) 마우스 항체 2E2 또는 2C4의 EC₅₀ 보다 적은 EC₅₀으로 활성화 호산구를 고갈시키는 특징.

[0093] 한 측면에서, 본 발명은 인간 Siglec-8에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8은 서열식별번호: 72의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8은 서열식별번호: 73의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 1 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 1은 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 2 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 2는 서열식별번호: 113의 아미

노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 3 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 3은 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 세포외 도메인 내의 선형 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 세포외 도메인 내의 입체 형태적 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 호산구 상에 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 호산구의 아토포시스를 유도시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 비만 세포 상에 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 비만 세포를 고갈시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 비만 세포 상에 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고 비만 세포-매개된 활성을 억제한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 비만 세포 상에 발현된 인간 Siglec-8에 결합하고, ADCC 활성에 의해 비만 세포를 사멸시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 비만 세포를 고갈시키고 비만 세포 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 본원의 항체는 활성화 호산구를 고갈시키고 비만 세포 활성화를 억제한다.

[0094] 본원에는 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 단리된 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 영장류 교차 반응성을 이용하여 항체를 확인하는 것이 비-인간 영장류에서 항-Siglec-8 항체를 전임상 시험하는 데 유용할 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 영장류 Siglec-8은 서열식별번호: 118의 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 영장류 Siglec-8은 서열식별번호: 119의 아미노산 서열 또는 그의 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 영장류는 개코 원숭이 [예를 들어, 파피오 아누비스 (*Papio Anubis*)]이다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 1 내의 에피토프에 결합한다. 추가 실시양태에서, 인간 Siglec-8의 도메인 1은 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 3 내의 에피토프에 결합한다. 추가 실시양태에서, 인간 Siglec-8의 도메인 3은 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체는 인간화 항체, 키메라 항체, 또는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체는 무린 항체이다. 일부 실시양태에서, 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합하는 항체는 인간 IgG1 항체이다.

[0095] 한 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 모노클로날 항체이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 항체 단편 (항원 결합 단편 포함), 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 키메라, 인간화, 또는 인간 항체이다. 한 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 중 어느 것도 정제된다.

[0096] 한 측면에서, Siglec-8에의 결합을 놓고 무린 2E2 항체 및 무린 2C4 항체와 경쟁하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 무린 2E2 항체 및 무린 2C4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-Siglec-8 항체가 또한 제공된다. 한 측면에서, Siglec-8에의 결합을 놓고 본원에 기재된 모든 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11)와 경쟁하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 본원에 기재된 모든 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11)와 동일한 에피토프에 결합하는 항-Siglec-8 항체가 또한 제공된다.

[0097] 본 발명의 한 측면에서, 항-Siglec-8 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터가 제공된다. 특정 실시양태에서, 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항-Siglec-8 항체 또는 항-Siglec-8 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애, 예컨대 본원에 열거된 장애를 치료하기 위한 제약 제형이다.

[0098] 한 측면에서, 본원에는 무린 항체 2C4의 HVR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 무린 항체 2E2의 HVR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 HVR은 카바트 CDR 또는 코티아 CDR이다.

- [0099] 한 측면에서, 본원에는 뮤린 항체 1C3의 HVR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 뮤린 항체 4F11의 HVR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 뮤린 항체 1H10의 HVR 서열 중 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 HVR은 카바트 CDR 또는 코티아 CDR이다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 1 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 1은 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 2 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 2는 서열식별번호: 113의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 3 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 3은 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합하지만, 서열식별번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질과는 그렇지 않다.
- [0102] 한 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0103] 한 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0104] 한 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0105] 또 다른 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다.
- [0106] 또 다른 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 97의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 100의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 103의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 2 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 2는 서열식별번호: 113의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0107] 또 다른 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나

나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 98의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 101의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 104의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 3 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 3은 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합한다.

[0108] 또 다른 측면에서, 본원에는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1, (ii) 서열식별번호: 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2, 및 (iii) 서열식별번호: 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3을 포함하고/하거나; 경쇄 가변 영역은 (i) 서열식별번호: 99의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1, (ii) 서열식별번호: 102의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2, 및 (iii) 서열식별번호: 105의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8의 도메인 1 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 도메인 1은 서열식별번호: 112의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 Siglec-8 및 비-인간 영장류 Siglec-8에 결합한다.

[0109] 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 적합한 어떠한 프레임워크 가변 도메인 서열도 포함할 수 있으며, 단 상기 항체는 인간 Siglec-8에 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있어야 한다. 본원에 사용된 바와 같은, 중쇄 프레임워크 영역은 "HC-FR1-FR4"로 지명되고 경쇄 프레임워크 영역은 "LC-FR1-FR4"로 지명된다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 26, 34, 38, 및 45의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열 (각각 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 및 HC-FR4)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 48, 51, 55, 및 60의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열 (각각 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 48, 51, 58, 및 60의 경쇄 가변 도메인 프레임워크 서열 (각각 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 및 LC-FR4)을 포함한다.

[0110] 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 프레임워크 서열 및 추가변 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열식별번호: 26 내지 29 (HC-FR1), 서열식별번호: 31 내지 36 (HC-FR2), 서열식별번호: 38 내지 43 (HC-FR3), 및 서열식별번호: 45 또는 46 (HC-FR4)의 HC-FR1 내지 HC-FR4 서열을 포함하고; HVR-H1은 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하며; HVR-H2는 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H3은 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 프레임워크 서열 및 추가변 영역을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열식별번호: 26 내지 29 (HC-FR1), 서열식별번호: 31 내지 36 (HC-FR2), 서열식별번호: 38 내지 43 (HC-FR3), 및 서열식별번호: 45 또는 46 (HC-FR4)의 HC-FR1 내지 HC-FR4 서열을 포함하고; HVR-H1은 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하며; HVR-H2는 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-H3은 서열식별번호: 67 내지 70으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 프레임워크 서열 및 추가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열식별번호: 48 또는 49 (LC-FR1), 서열식별번호: 51 내지 53 (LC-FR2), 서열식별번호: 55 내지 58 (LC-FR3), 및 서열식별번호: 60 (LC-FR4)의 LC-FR1 내지 LC-FR4 서열을 포함하고; HVR-L1은 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하며; HVR-L2는 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L3은 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 프레임워크 서열 및 추가변 영역을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 각각 서열식별번호: 48 또는 49 (LC-FR1), 서열식별번호: 51 내지 53 (LC-FR2), 서열식별번호: 55 내지 58 (LC-FR3), 및 서열식별번호: 60 (LC-FR4)의 LC-FR1 내지 LC-FR4 서열을 포함하고; HVR-L1은 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하며; HVR-L2는 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하고; HVR-L3은 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 16 내지 22로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 23 또는 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 16 내지 22로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 23 또는 24로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인은 서열식별번호: 21의

아미노산 서열을 포함한다.

[0111] 일부 실시양태에서, 중쇄 HVR 서열은 다음을 포함한다:

[0112] a) HVR-H1 (IYGAH (서열식별번호: 61));

[0113] b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (서열식별번호: 62)); 및

[0114] c) HVR-H3 (DGSSPYYSMEY (서열식별번호: 63); DGSSPYYGMEY (서열식별번호: 67); DGSSPYYSMDY (서열식별번호: 68); DGSSPYYSMEV (서열식별번호: 69); 또는 GSSPYYGMDV (서열식별번호: 70)).

[0115] 일부 실시양태에서, 중쇄 HVR 서열은 다음을 포함한다:

[0116] a) HVR-H1 (SYAMS (서열식별번호: 88); DYMY (서열식별번호: 89); 또는 SSWMN (서열식별번호: 90));

[0117] b) HVR-H2 (IISGGSYTYSDSVKG (서열식별번호: 91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (서열식별번호: 92); 또는 QIYPGDDYTNNGKFKG (서열식별번호: 93)); 및

[0118] c) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (서열식별번호: 94); EGNYYGSSILDY (서열식별번호: 95); 또는 LGPYGPFAD (서열식별번호: 96)).

[0119] 일부 실시양태에서, 중쇄 FR 서열은 다음을 포함한다:

[0120] a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (서열식별번호: 26);

[0121] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (서열식별번호: 27);

[0122] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS (서열식별번호: 28); 또는

[0123] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLT (서열식별번호: 29));

[0124] b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (서열식별번호: 31); WVRQAPGKGLEWLG (서열식별번호: 32); WVRQAPGKGLEWLS (서열식별번호: 33); WVRQAPGKGLEWVG (서열식별번호: 34); WIRQPPGKGLEWIG (서열식별번호: 35); 또는 WVRQPPGKGLEWLG (서열식별번호: 36));

[0125] c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 38);

[0126] RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 39);

[0127] RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 40);

[0128] RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (서열식별번호: 41);

[0129] RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR (서열식별번호: 42); 또는

[0130] RLSISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAR (서열식별번호: 43)); 및

[0131] d) HC-FR4 (WGQGTITVTVSS (서열식별번호: 45); 또는 WGQGTILTVTVSS (서열식별번호: 46)).

[0132] 일부 실시양태에서, 경쇄 HVR 서열은 다음을 포함한다:

[0133] a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (서열식별번호: 64));

[0134] b) HVR-L2 (STSNLAS (서열식별번호: 65)); 및

[0135] c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (서열식별번호: 66); 또는 QQRSSYPYT (서열식별번호: 71)).

[0136] 일부 실시양태에서, 경쇄 HVR 서열은 다음을 포함한다:

[0137] a) HVR-L1 (SASSSVSYMH (서열식별번호: 97); RASQDITNYLN (서열식별번호: 98); 또는 SASSSVSYMY (서열식별번호: 99));

[0138] b) HVR-L2 (DTSKLY (서열식별번호: 100); FTSRLHS (서열식별번호: 101); 또는 DTSSLAS (서열식별번호: 102)); 및

[0139] c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (서열식별번호: 103); QQGNLPWT (서열식별번호: 104); 또는 QQWNSDPYT (서열식별번호: 105)).

- [0140] 일부 실시양태에서, 경쇄 FR 서열은 다음을 포함한다:
- [0141] a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 48); 또는
- [0142] EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 49));
- [0143] b) LC-FR2 (WFQKPGQAPRLLIY (서열식별번호: 51); WFQKPGQAPRLWIY (서열식별번호: 52); 또는 WYQKPGQAPRLLIY (서열식별번호: 53));
- [0144] c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 55);
- [0145] GVPARFSGSGSGTDYTLTITSSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 56);
- [0146] GVPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 57); 또는
- [0147] GIPARFSGSGSGTDYTLTITSSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 58)); 및
- [0148] d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (서열식별번호: 60)).
- [0149] 일부 실시양태에서, 본원에는 인간 Siglec-8에 특이적으로 결합하는 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체)가 제공되며, 여기서 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 항체는
- [0150] (a) (1) 서열식별번호: 26 내지 29로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR1;
- [0151] (2) 서열식별번호: 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
- [0152] (3) 서열식별번호: 31 내지 36으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR2;
- [0153] (4) 서열식별번호: 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
- [0154] (5) 서열식별번호: 38 내지 43으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR3;
- [0155] (6) 서열식별번호: 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3; 및
- [0156] (7) 서열식별번호: 45 내지 46으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HC-FR4
- [0157] 를 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및/또는
- [0158] (b) (1) 서열식별번호: 48 내지 49로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LC-FR1;
- [0159] (2) 서열식별번호: 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
- [0160] (3) 서열식별번호: 51 내지 53으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LC-FR2;
- [0161] (4) 서열식별번호: 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2;
- [0162] (5) 서열식별번호: 55 내지 58로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LC-FR3;
- [0163] (6) 서열식별번호: 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3; 및
- [0164] (7) 서열식별번호: 60의 아미노산 서열을 포함하는 LC-FR4
- [0165] 을 포함하는 경쇄 가변 도메인
- [0166] 을 포함한다.
- [0167] 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 16 내지 22로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 2 내지 10으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 23 또는 24로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 16 내지 22로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 11 내지 14로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 23 또는 24로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 6의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공

된다.

- [0168] 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 106 내지 108로부터 선택된 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 109 내지 111로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 106의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 109의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 107의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 110의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 한 측면에서, 본원에는 서열식별번호: 108의 중쇄 가변 도메인을 포함하고/하거나 서열식별번호: 111의 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 본원에는 서열식별번호: 2 내지 14로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 서열식별번호: 106 내지 108로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열과 비교하여 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 아미노산 서열을 포함하는 항체는 인간 Siglec-8에 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 치환, 삽입 또는 결실 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산)은 HVR을 벗어난 영역 (즉, FR)에서 발생된다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 106 내지 108로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0170] 일부 실시양태에서, 본원에는 서열식별번호: 16 내지 24로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 서열식별번호: 109 내지 111로부터 선택된 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열은 참조 서열과 비교하여 치환, 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그러한 아미노산 서열을 포함하는 항체는 인간 Siglec-8에 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 치환, 삽입 또는 결실 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 아미노산)은 HVR을 벗어난 영역 (즉, FR)에서 발생된다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 16 또는 21의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 109 내지 111로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 본원에는 도 1 또는 도 3에 도시된 바와 같은 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 본원에는 도 2 또는 도 3에 도시된 바와 같은 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다.
- [0173] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 도 1 또는 도 3에 제시된 것으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 VH HVR, 및/또는 (b) 도 2 또는 도 3에 제시된 것으로부터 선택된 1개, 2개 또는 3개의 VL HVR을 포함하는 항-Siglec-8 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 도 1 또는 도 3에 제시된 것으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 및 도 2 또는 도 3에 제시된 것으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체를 제공한다.
- [0174] 일부 실시양태에서, 본원에는 표 3에 제시된 항체, 예를 들어 HAKA 항체, HAKB 항체, HAKC 항체 등의 중쇄 가변 도메인 및/또는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다.
- [0175] 5가지 부류의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 있으며, 이들은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지명된 중쇄를 갖는다. γ 및 α 부류는 하위부류로 추가로 분할되며, 예를 들어 인간은 다음 하위부류를 발현한다: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2. IgG1 항체는 동종이형으로 명명된 다중 다형체성 변이체로 존재할 수 있으며 (문헌 [Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7]에서 고찰됨), 이들 중 어느 것도 본원의 실시양태 중 일부에서 사용하기 적합하다. 인간 집단 내에서 공통의 동종이형 변이체는 문자 a, f, n, z 또는 그의 조합으로써 지명된 것이다. 본원의 실시양태 중 어느 것에서, 상기 항체는 인간 IgG Fc 영역을 포함

하는 중쇄 Fc 영역을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG Fc 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1은 서열식별번호: 78의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4는 서열식별번호: 79의 아미노산 서열을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 본원에는 서열식별번호: 75의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76 또는 77로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-Siglec-8 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열식별번호: 87의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및/또는 서열식별번호: 76의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 비만 세포를 고갈시키고 비만 세포 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 활성화된 호산구를 고갈시키고 비만 세포 활성화를 억제한다.

[0177] 1. 항체 친화도

[0178] 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 마우스 항체 2E2 및/또는 마우스 항체 2C4와 비교하여 대략 동일하거나 또는 더 높은 친화도 및/또는 더 높은 친화력으로 인간 Siglec-8에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-Siglec-8 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 150 \text{ nM}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 50 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, $\leq 0.01 \text{ nM}$, 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. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 마우스 항체 2E2 및/또는 마우스 항체 2C4 보다 약 1.5배, 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배 또는 약 10배 더 높은 친화도로 인간 Siglec-8에 결합한다. 본원의 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0179] 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체의 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, Kd 또는 Kd 값은 약 10 반응 단위 (RU)에서 고정화 항원 CM5 칩을 수반하여 25°C 하에 BIAcore™-2000 또는 BIAcore™-3000 [비아코어, 인크. (BIAcore, Inc.; 미국 뉴저지주 피스카타웨이)]을 이용함으로써 측정할 수 있다. 간략하게 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5; 비아코어® 인크.)을 공급자의 지시에 따라서 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC) 및 N-히드록시수신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 포획 항체 (예를 들어, 항-인간-Fc)를 10 mM 소듐 아세테이트, pH 4.8로 희석시킨 후, 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 주사하고, 항-Siglec-8 항체로 추가로 고정화시킨다. 역학 측정을 위해, 이량체성 Siglec-8의 2배 일련의 희석물을 대략 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 25°C 하에 PBS 중의 0.05% TWEEN 20 (PBST)과 함께 주사한다. 연합 속도 (kon) 및 해리 속도 (koff)는 연합 및 해리 센서그램을 동시에 고정시킴으로서 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (BIAcore® Evaluation Software version 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 koff/kon 비로서 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881] 참조).

[0180] 또 다른 실시양태에서, 바이오층 간섭법(biolayer interferometry)을 이용하여 Siglec-8에 대항한 항-Siglec-8 항체의 친화도를 결정할 수 있다. 예시되는 검정에서는, Siglec-8-Fc 태그부착된 단백질을 항-인간 포획 센서 상으로 고정화시키고, 이를 증가 농도의 마우스, 키메라, 또는 인간화 항-Siglec-8 Fab 단편과 함께 인큐베이션하여, 예를 들어 옥테트 레드(Octet Red) 384 시스템 [포르테바이오(ForteBio)]과 같은 기기를 이용하여 친화도 측정치를 수득한다.

[0181] 항-Siglec-8 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 기술을 이용하여, 문헌 ([Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]에 기재된 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 결정할 수도 있다 (또한, 문헌 [Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1947)] 참조).

[0182] 2. 항체 친화력

[0183] 한 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체의 결합 친화력은 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, Kd 또는 Kd 값은 비아코어 T100을 이용함으로써 측정될 수 있다. 포획 항체 (예를 들어, 염소-항-인간-Fc 및 염소-항-마우스-Fc)를 CM5 칩 상에 고정화시킨다. 유동 세포를 항-인간 또는 항-마우스 항체로 고정화시킬 수 있다. 이러한 검정은 특정 온도 및 유속, 예를 들어 25°C 하에 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 수행된다. 이량체성 Siglec-8을 각종 농도, 예를 들어 15 nM 내지 1.88 pM의 범위의 농도 하에 검정 완충제에서 희석시킨다. 항

체를 포획하고, 고 성능 주사를 수행한 다음 해리시킨다. 유동 세포를 완충제, 예를 들어 50 mM 글리신 pH 1.5 로 재생시킨다. 빈 참조 세포 및 다중 검정 완충 주사제를 이용한 결과를 여백으로 두고, 1:1 포괄적인 맞춤형 파라미터를 이용하여 분석하였다.

[0184] 3. 경쟁 검정

[0185] 경쟁 검정을 이용하여, 2개의 항체가 동일하거나 또는 입체적으로 중복되는 에피토프를 인식함으로써 동일한 에피토프에 결합하는지 아니면 1개의 항체가 항원에 대한 또 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 지를 결정할 수 있다. 이들 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 항원 또는 항원 발현성 세포를 다중-웰 판 상에 고정화시키고, 표지된 항체의 결합을 차단할 수 있는 표지되지 않은 항체의 능력을 측정한다. 이러한 경쟁 검정을 위한 통상의 표지는 방사성 표지 또는 효소 표지이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 세포 (예를 들어, 호산구)의 세포 표면 상에 존재하는 에피토프에의 결합을 놓고, 본원에 기재된 2E2 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 세포 (예를 들어, 호산구)의 세포 표면 상에 존재하는 에피토프에의 결합을 놓고, 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 세포 (예를 들어, 호산구)의 세포 표면 상에 존재하는 에피토프에의 결합을 놓고, 본원에 기재된 2C4 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 세포 (예를 들어, 호산구)의 세포 표면 상에 존재하는 에피토프에의 결합을 놓고, 서열식별번호: 2 (미국 특허 번호 8,207,305에서 밝혀진 바와 같음)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열식별번호: 4 (미국 특허 번호 8,207,305에서 밝혀진 바와 같음)의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체와 경쟁한다.

[0186] 4. 열 안정성

[0187] 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8은 열 이동 검정에서 약 70°C 이상, 약 71°C 이상, 또는 약 72°C 이상의 용점 (Tm)을 갖는다. 예시되는 열 이동 검정에서는, 인간화 항-Siglec-8 항체를 포함하는 샘플을 형광성 염료 [시프로 오렌지(Sypro Orange)]와 함께 71주기 동안 인큐베이션하며, qPCR 열 순환기 내에서 1주기마다 1°C 증가시키면서 수행하여 Tm을 결정한다. 본원의 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 마우스 2E2 항체 및/또는 마우스 2C4 항체와 비교하여 유사하거나 더 높은 Tm을 갖는다. 본원의 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는 서열식별번호: 16 또는 21로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 키메라 2C4 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 Tm을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 84의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열식별번호: 85의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 갖는 항체와 비교하여 동일하거나 더 높은 Tm을 갖는다.

[0188] 5. 생물학적 활성 검정

[0189] 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8은 호산구의 아포토시스를 유도시킨다. 일부 다른 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8은 비만 세포를 고갈시킨다. 세포의 아포토시스를 평가하는 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 아넥신 V로 염색하는 것과 TUNNEL 검정이 있다. 예시되는 세포 아포토시스 검정에서는, 혈액 샘플로부터의 신선한 연막을 배지에 재현탁시키고 96-웰 U-바닥 판에 도말한다. 항-Siglec-8 항체의 일련의 5배 희석물 시리즈를 각 웰에 가하고, 상기 판을 37°C 및 5% CO₂ 하에 4시간 초과해서 인큐베이션한다. 상기 세포를 PBS에 희석된 파라포름알데하이드로 고정시키고, 현미경을 이용하여 탐지하기 위해 호산구에 대해 특이적인 접합된 항체로 염색한다. 상기 연막을 항-Siglec-8 항체의 존재하에 인큐베이션하지 않은 경우와 비교하여, 이러한 연막을 항-Siglec-8 항체의 존재하에 인큐베이션한 경우에 총 말초 혈액 백혈구 내에서의 호산구 집단을 평가한다. 또 다른 예시되는 검정에서는, 혈액 샘플로부터 정제된 호산구 [예를 들어, 밀테니이 (Miltenyi) 호산구 단리용 키트]를 배지에 재현탁시키고, IL-5의 존재 또는 부재하에 밤새 배양한다. 이와 같이 배양된 호산구를 연속해서, 원심분리에 의해 수거하고, 배지에 재현탁시키며, 96-웰 U-바닥 판에 도말한다. 항-Siglec-8 항체의 일련의 5배 희석물 시리즈를 각 웰에 가하고, 상기 판을 37°C 및 5% CO₂ 하에 4시간 초과해서 인큐베이션한다. 상기 세포를 고정시키고, 현미경을 이용하여 호산구의 수를 탐지하는 것으로 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 기술을 이용하여 아넥신-V로 염색한다. 상기 정제된 세포를 항-Siglec-8 항체의 존재하에 인큐베이션하지 않은 경우와 비교하여, 상기 정제된 세포를 항-Siglec-8 항체의 존재하에 인큐베이션한 경우에 샘플 내에서의 호산구 집단을 평가한다.

- [0190] 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 ADCC 활성을 유도시킨다. 일부 다른 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 ADCC 활성에 의해 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시킨다. 일부 실시양태에서, 조성물은 비-푸코실화 (즉, 아푸코실화) 항-Siglec-8 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 비-푸코실화 항-Siglec-8 항체를 포함하는 조성물은 부분적으로 푸코실화된 항-Siglec-8 항체를 포함하는 조성물과 비교하여 ADCC 활성을 증강시킨다. ADCC 활성을 평가하는 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다. 예시되는 검정에서는, ADCC 활성을 측정하기 위하여, 이펙터 세포 및 표적 세포를 이용한다. 이펙터 세포의 예는 자연 킬러 (NK) 세포, 대형 과립 림프구 (LGL), 림포카인-활성화 킬러 (LAK) 세포, 및 NK 및 LGL을 포함하는 PBMC, 또는 세포 표면 상에 Fc 수용체를 갖는 백혈구, 예컨대 호중구, 호산구 및 대식세포를 포함한다. 표적 세포는 평가하고자 하는 항체가 인식할 수 있는 세포 표면 항원 상에서 발현되는 모든 세포이다. 이러한 표적 세포의 예는 세포 표면 상에 Siglec-8을 발현하는 호산구이다. 이러한 표적 세포의 또 다른 예는 세포 표면 상에 Siglec-8을 발현하는 비만 세포이다. 표적 세포는 세포용해의 탐지를 가능하게 해주는 시약으로 표지시킨다. 표지용 시약의 예는 방사성 물질, 예컨대 소듐 크로메이트 ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Immunology, 14, 181 (1968)]; [J. Immunol. Methods, 172, 227 (1994)]; 및 [J. Immunol. Methods, 184, 29 (1995)] 참조).
- [0191] 일부 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 비만 세포-매개된 활성을 억제한다. 비만 세포 트립타제가 총 비만 세포 수 및 활성화에 대한 바이오마커로서 사용되어 왔다. 예를 들어, 총 및 활성 트립타제 뿐만 아니라 히스타민, N-메틸 히스타민, 및 11-베타-프로스타글란딘 F2를 혈액 또는 뇨에서 측정하여 비만 세포에 있어서의 감소를 평가할 수 있다. 예시되는 비만 세포 활성 검정에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 US 20110293631을 참조할 수 있다. 본원의 실시예 2에 기재된 검정을 또한 사용하여, 비만 세포 상에서의 항-Siglec-8 항체의 ADCC 및 아포토시스 활성을 평가할 수 있다.
- [0192] 6. 융합 단백질 결합 검정
- [0193] 융합 단백질에의 결합 검정을 이용하여, 항체에 의해 인식된 에피토프를 결정할 수 있다. 에피토프 지도화를 위해 융합 단백질을 이용하는 검정이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 Ig-Fc와 융합된 Siglec-8 단백질의 일부를 포함하는 융합 단백질을 다중 웰 판 상에 고정화시키고, 이러한 융합 단백질에 결합할 수 있는 항체의 능력을 측정한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 115의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 116의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 117의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 서열식별번호: 118의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질에 결합한다.
- [0194] III. 항체 제조
- [0195] 본원에 기재된 항체는 항체를 생성시키기 위해 관련 기술분야에서 이용 가능한 기술을 사용하여 제조되며, 그의 예시되는 방법이 다음 섹션에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0196] 1. 항체 단편
- [0197] 본 발명은 항체 단편을 포괄한다. 항체 단편은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 분해, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황 하에서는, 완전한 항체 보다는 오히려 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 특정의 항체 단편에 관한 고찰은 다음 문헌을 참조할 수 있다 (Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134).
- [0198] 항체 단편을 생성시키기 위한 각종 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체를 단백질 분해적으로 분해시킴으로써 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재, 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성시킬 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 발현되어 이로부터 분비될 수 있으므로, 이들 단편의 대량 생산이 용이해진다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 또 다른 한편, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 이를 화학적으로 커플링시켜 F(ab')_2 단편을 형성시킬 수 있다 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. 또 다른 접근 방식에 따르면, F(ab')_2 단편을 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리시킬 수 있다. 재이용(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가

증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편을 생성시키기 위한 다른 기술은 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편(scFv)이다(WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458 참조). Fv 및 scFv는 불변 영역이 없는 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이므로, 이들은 생체내 사용 동안 비특이적 결합 감소를 위해 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질을 구축하여 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합을 산출시킬 수 있다(상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조). 항체 단편은 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0199] 2. 인간화 항체

[0200] 본 발명은 인간화 항체를 포괄한다. 비-인간 항체를 인간화시키기 위한 각종 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로서 지칭되며, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 인간화는 본질적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 추가변 영역 서열로 대체함으로써, 윈터(Winter)의 방법에 따라서 수행할 수 있다([Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) *Nature*, 332:323-327]; [Verhoeven et al. (1988) *Science*, 239:1534-1536]). 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 덜한 무손상 인간 가변 도메인을 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체시킨 키메라 항체(미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로, 일부 추가변 영역 잔기와 가능하게는 일부 FR 잔기를 설치류 항체 내의 유사한 부위로부터의 잔기로 대체시킨 인간 항체이다.

[0201] 인간화 항체를 제조하는데 사용될, 경쇄와 중쇄 둘 다의 인간 가변 도메인의 선택이 항원성을 저하시키는 데에 있어서 중요할 수 있다. 소위 "최량 적합(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류(예를 들어, 마우스) 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대항하여 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 허용한다([Sims et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2296]; [Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특별한 아군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특별한 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크를 몇 가지 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다([Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285]; [Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623]).

[0202] 항원에 대한 높은 친화도와 기타 바람직한 생물학적 특성을 유지하면서 항체를 인간화시키는 것이 추가로 일반적으로 바람직하다. 이를 달성하기 위한 한 가지 방법에 따르면, 모 서열과 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열과 각종 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 익숙하다. 선별된 후보 이뮤노글로불린 서열의 추정상의 3차원적 입체 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 입수 가능하다. 이들 디스플레이를 검사하여, 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있으며, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합할 수 있는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별하고, 이를 수용자로부터 유입 서열과 합하여, 목적하는 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성을 달성하도록 한다. 일반적으로, 추가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는 데에 있어 직접적이면서도 가장 실재적으로 관여한다.

[0203] 3. 인간 항체

[0204] 본 발명의 인간 항-Siglec-8 항체는 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선별된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축할 수 있다. 또 다른 한편, 본 발명의 인간 모노클로날 항-Siglec-8 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종-골수종 세포주가, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다([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)]).

[0205] 면역시, 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재 하에 완전한 레퍼토리의 인간 항체를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 계열 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역(JH) 유전자의 동형접합성 결실로 인해, 내인성 항체 생성이 완전히 억제되는 것으로 보고되었다. 이러한 생식세포 계열 돌연변이체 마우스에서 인간 생식세포 계열 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 전이시키면, 항원 시험감염시 인간 항체가 생성될 것이다(예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)] 참조).

[0206] 유전자 셔플링(shuffling)을 또한 이용하여 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체로부터 인간 항체를 유도시킬 수 있으며, 여기서 이러한 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화성과 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅(imprinting)"으로 지칭되기도 하는 상기 방법에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체시키면, 비-인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라 집단이 창출된다. 항원을 이용하여 선별하면 비-인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되며, 여기서 인간 쇄는 일차 파지 디스플레이 클론 내의 상응하는 비-인간 쇄의 제거 시 파괴된 항원 결합 부위를 복원시키며, 즉 에피토프가 인간 쇄 파트너의 선택을 좌우한다. 나머지 비-인간 쇄를 대체시키기 위해 상기 공정을 반복하는 경우, 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일에 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식화에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 전혀 없는 완전한 인간 항체를 제공해 준다.

[0207] 4. 이중특이적 항체

[0208] 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 상기 결합 특이성 중 하나는 Siglec-8에 대한 것이고, 다른 하나는 다른 모든 항원에 대한 것이다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Siglec-8의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체를 또한 이용하여 세포독성제를, Siglec-8을 발현하는 세포로 국한시킬 수 있다. 이중특이적 항체는 완전한 길이의 항체 또는 항체 단편 [예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체]으로서 제조될 수 있다.

[0209] 이중특이적 항체의 제조 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 ([Milstein and Cuello, Nature, 305:537 (1983)], WO 93/08829 (1993년 5월 13일에 공개됨), 및 [Trautnecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991)] 참조). 이중특이적 항체를 생성하기 위한 추가의 세부 사항에 관해서는, 예를 들어 문헌 ([Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)])을 참조할 수 있다. 이중특이적 항체는 가교 결합되거나 또는 "이중 접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘과 커플링될 수 있고, 다른 하나는 바이오틴과 커플링될 수 있다. 이중접합체 항체는 편리한 어떠한 가교 결합 방법을 이용해서도 제조될 수 있다. 적합한 가교 결합체는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 수많은 가교 결합 기술과 함께, 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0210] 5. 단일-도메인 항체

[0211] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체 [도매티스, 인크. (Domantis, Inc.; 미국 매사추세츠주 월섬)]이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0212] 6. 항체 변이체

[0213] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 내로 적당한 변화를 도입하거나, 또는 캡티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내의 잔기로부터의 결실, 및/또는 잔기 내로의 삽입 및/또는 잔기의 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 어떠한 조합도 만들어서 최종 구축물에 도달시킬 수 있으며, 단 이러한 최종 구축물은 목적하는 특징을 보유하고 있어야 한다. 아미노산 변경은 대상 항체 아미노산 서열이 만들어진 시점에 이러한 서열 내에 도입할 수 있다.

[0214] 돌연변이 유발을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는 데 유용한 방법은 문헌 ([Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085])에 기재된 바와 같은 소위 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이다. 여기서는 특정 잔기, 또는 표적 잔기 군을 확인하고 (예를 들어, 전하를 띤 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu), 이를 중성 또는 음전하를 띤 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체시켜, 상기 아미노산과 항원 간의 상호 작용에 영향을 미친다. 이어서, 이러한 치환물에 대한 기능적 민감도를 명확하게 보여주는 아미노산 위치는 치환 부위에 추가의 또는 기타 변이체를 도입함으로써 정련시킨다.

따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 미리 결정되긴 하였지만, 돌연변이 자체의 성질이 미리 결정될 필요는 없다. 예를 들어, 소정의 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발을 표적 코돈 또는 영역에서 수행하고, 발현된 이류노글로불린을 대상으로 하여 목적하는 활성에 관하여 스크리닝한다.

[0215] 아미노산 서열 삽입물은 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입물 뿐만 아니라 1개 잔기에서부터 수백 개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지 범위의 길이의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합물을 포함한다. 말단 삽입물의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 수반한 항체를 포함한다. 항체 분자의 기타 삽입형 변이체는 항체의 N- 또는 C-말단과 효소와의 융합물, 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합물을 포함한다.

[0216] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 항체가 글리코실화되는 정도를 증가 또는 감소시키도록 변경시킨다. 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로, N-연결되거나 또는 O-연결된다. N-연결된이란 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착시킨 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중의 어느 하나가 폴리펩티드에 존재하면, 잠재적 글리코실화 부위가 창출된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신을 사용할 수도 있다.

[0217] 글리코실화 부위를 항체에 부가하거나 결실시키는 것은 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우에는) 상기 언급된 트리펩티드 서열 중 하나 이상을 창출시키거나 제거하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수행된다. 이러한 변경은 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래의 항체 서열에 부가하거나, 결실시키거나 또는 치환시킴으로써 만들 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0218] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우에는, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결여된 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.)에 기재되어 있다 [또한, US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 참조]. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내에 이등분 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체가 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.)에서 참조된다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고된다. 또한, 변경된 탄수화물이 항체의 Fc 영역에 부착된 항체에 관해서는, WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조할 수 있다. 또한, 변형된 글리코실화를 나타내는 항원-결합 분자에 관해서는 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 참조할 수 있다.

[0219] 특정 실시양태에서, 글리코실화 변이체는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 이러한 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조는 푸코스가 결여되거나 또는 감소된 푸코스를 갖는다. 이러한 변이체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 임의로, Fc 영역은 그 내부에, ADCC를 추가로 개선시켜 주는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 추가로 포함한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍성" 항체에 관한 공개공보의 예는 다음 문헌을 포함한다 (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; [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]). 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화에 있어 결핍성인 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스페라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)]), 및 β 1,4-N-아세틸글리코시미널트랜스페라제 III (GnT-III) 및 골지 μ -만노시다제 II (ManII)를 과다발현하는 세포를 포함한다.

[0220] 야생형 CHO 세포에서 생성된 동일한 항체 상에서의 푸코스의 양과 비교하여 감소된 푸코스를 갖는 항체가 본원에서 고려된다. 예를 들어, 이러한 항체는 천연 CHO 세포 (예를 들어, 천연 글리코실화 패턴을 생산하는 CHO 세포, 예컨대 천연 FUT8 유전자를 함유하는 CHO 세포)에 의해 생성되는 경우에 가질 수도 있는 양 보다 적은 양의 푸코스를 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-Siglec-8 항체는 그 위에 있는 N-연결된 글리칸의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 또는 1% 미만이 푸코스를 포함하는 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공

된 항-Siglec-8 항체는 그 위에 있는 N-연결된 글리칸 중 어느 것도 푸코스를 포함하지 않는 것인데, 즉 여기서 상기 항체는 푸코스를 완전히 포함하지 않거나, 또는 푸코스를 전혀 갖지 않거나 또는 비-푸코실화되거나 또는 아푸코실화된다. 푸코스의 양은, 예를 들어 WO 2008/077546에 기재된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분광측정법에 의해 측정된 바와 같이 Asn297에 부착된 모든 당구조물 (예를 들어, 복합체, 혼성체 및 고 만노스 구조물)의 총 합을 기준으로 하여, Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 결정할 수 있다. Asn297은 Fc 영역 내의 위치 약 297 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치한 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한, 항체 내에서의 사소한 서열 변이로 인해, 위치 297의 상류 또는 하류의 약 $\pm$ 3개 아미노산, 즉 위치 294와 300 사이에 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개는 비-푸코실화된다.

[0221] 한 실시양태에서, 항체는 그의 혈청 반감기를 개선하기 위해 변경된다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여, 예를 들어 미국 특허 번호 5,739,277에 기재된 바와 같이 항체 (특히, 항체 단편) 내로 재이용 수용체 결합 에피토프를 혼입할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "재이용 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 데 책임이 있는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다 (US 2003/0190311, 미국 특허 번호 6,821,505; 미국 특허 번호 6,165,745; 미국 특허 번호 5,624,821; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 6,165,745; 미국 특허 번호 5,834,597).

[0222] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 상이한 잔기에 의해 대체된 항체 분자 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 치환형 돌연변이 유발을 위한 관심 부위는 초가변 영역을 포함하지만, FR 변경물도 또한 고려된다. 보존적 치환이 "바람직한 치환물"이란 표제 하에 표 1에 제시된다. 이러한 치환으로 인해 생물학적 활성 상의 바람직한 변화가 이루어진다면, 표 1에서 "예시되는 치환물"로 명명되거나, 또는 아미노산 부류와 관련하여 다음에 추가로 기재되는 바와 같은 보다 실제적인 변화를 도입할 수 있고 생성물을 스크리닝한다.

[0223] <표 1>

본래의 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

[0224]

[0225] 항체의 생물학적 특성 면에 있어서의 실제적인 변형은 (a) 치환 부위에서 폴리펩티드 주쇄의 구조를, 예를 들어 시트 또는 나선 입체 형태로서 유지하거나, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지하거나, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 데에 대한 그들의 효과 면에서 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 아미노산은 그들의 측쇄의 특성 면에서의 유사성에 따라서 분류될 수 있다 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]:

- [0226] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- [0227] (2) 전하를 띠지 않은 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- [0228] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)
- [0229] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H).
- [0230] 또 다른 한편, 자연 발생적 잔기는 공통의 측쇄 특성을 근거로 하여 다음 군으로 나눌 수 있다:
- [0231] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0232] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0233] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0234] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0235] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [0236] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0237] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류의 구성원으로 교환시키는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기는 보존적 치환 부위, 또는 나머지 (비-보존적) 부위 내로 도입할 수도 있다.
- [0238] 한 가지 유형의 치환형 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환시키는 것을 포함한다. 일반적으로, 이로써 생성된 추가의 개발을 위해 선택된 변이체(들)는, 이들을 생성시킨 모 항체와 비교하여 변형된 (예를 들어, 개선된) 생물학적 특성을 지닐 것이다. 이러한 치환형 변이체를 생성시키기 위한 편리한 방식은 파지 디스플레이를 이용한 진화성 성숙을 포함한다. 간략하게 언급하면, 몇 가지 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환을 생성시킨다. 이로써 생성된 항체를, 각 입자 내에 패키징된 파지 외피 단백질 (예를 들어, M13의 유전자 III 생성물)의 적어도 일부에 대한 융합물로서 섬유상 파지 입자로부터 디스플레이한다. 이어서, 이와 같이 파지-디스플레이된 변이체를 대상으로 하여, 그들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 관하여 스크리닝한다. 변형시키기 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 스캐닝 돌연변이 유발 (예를 들어, 알라닌 스캐닝)을 수행하여 항원 결합에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 부가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 항원 간의 접촉점을 확인하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이와 이웃하는 잔기는 본원에 상세히 설명된 기술을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 기술에 따라서 치환시키기 위한 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 대상으로 하여 본원에 기재된 기술을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 지닌 항체를 추가 개발을 위해 선별할 수 있다.
- [0239] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 관련 기술분야에 공지된 각종 방법에 의해 제조한다. 이들 방법은 자연 공급원으로부터의 분리 방법 (자연 발생적 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 앞서 제조된 변이체 또는 항체의 비-변이체 버전을 올리고뉴클레오타이드-매개된 (또는 부위-유도된) 돌연변이 유발, PCR 돌연변이 유발 및 카세트 돌연변이 유발시킴으로써 제조하는 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0240] 본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입함으로써, Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인을 포함한 하나 이상의 아미노산 위치에서의 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. 일부 실시양태에서, 상기 Fc 영역 변이체는 인간 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 추가 실시양태에서, 인간 IgG4 Fc 영역은 아미노산 치환 S228P를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라서 넘버링된다.
- [0241] 본 명세서 및 관련 기술분야의 교시에 따라서, 일부 실시양태에서는 본 발명의 항체가 야생형 대응물 항체와 비교하여, 예를 들어 Fc 영역에서 하나 이상의 변형을 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 그럼에도 불구하고, 이들 항체는 그들의 야생형 대응물과 비교하여 치료적 유용성을 위해 요구되는 바와 실질적으로 동일한 특징을 보유했을 것이다. 예를 들어, 특징의 변경이 Fc 영역에서 이루어져, 예를 들어 W099/51642에 기재된 바와 같이 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 변경될 것으로 (즉, 개선되거나 저하됨) 여겨진다. Fc 영역 변이체의 기타 예에 관해서는 또한 다음 문헌을 참조할 수 있다 ([Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미

국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 W094/29351). W000/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 개선되거나 저하된 결합을 나타내는 항체 변이체가 기재되어 있다 (이들 특허 공개 공보의 전문이 본원에 참조로 구체적으로 포함된다) (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조). 모계 IgG를 태아에게 전이시키는 데에 책임이 있는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합과 증가된 반감기를 갖는 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시켜 주는 하나 이상의 치환물을 내부에 수반한 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열과 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 지닌 폴리펩티드 변이체가 미국 특허 번호 6,194,551B1, W099/51642에 기재되어 있다. (이들 특허 공개 공보의 전문이 본원에 참조로 구체적으로 포함된다) (또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)] 참조).

[0242] 7. 벡터, 숙주 세포 및 제조법 방법

[0243] 본 발명의 항체를 제조법 생성하기 위해, 이를 코딩하는 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 발현시킨다. 상기 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 및 서열 분석한다. 많은 벡터가 입수 가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로, 사용하고자 하는 숙주 세포에 좌우된다. 일반적으로, 숙주 세포는 원핵성 또는 진핵성 (일반적으로 포유류) 기원의 세포이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함한, 모든 이소형의 불변 영역이 상기 목적을 위해 사용될 수 있다는 사실과, 이러한 불변 영역은 모든 인간 또는 동물 종으로부터 획득될 수 있다는 사실을 인지해야 할 것이다.

[0244] 원핵성 숙주 세포를 이용한 항체의 생성:

[0245] a) 벡터 구축

[0246] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 제조법 기술을 사용하여 획득할 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생산 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 분리 및 서열 분석할 수 있다. 또 다른 한편, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 획득되면, 폴리펩티드를 코딩하는 서열을, 원핵성 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 제조법 벡터 내로 삽입한다. 관련 기술분야에서 입수 가능하고 공지되어 있는 많은 벡터가 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적당한 벡터의 선택은 벡터 내로 삽입하고자 하는 핵산의 크기와, 이러한 벡터로 형질전환시키고자 하는 특별한 숙주 세포에 주로 좌우될 것이다. 각 벡터는 그의 기능 (이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 그것이 거주하는 특별한 숙주 세포와의 화합성에 따라서, 각종 성분을 함유한다. 이러한 벡터 성분은 일반적으로, 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0247] 일반적으로, 숙주 세포와 화합성인 종으로부터 유래되는 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 플라스미드 벡터를 이들 숙주와 연계해서 사용한다. 이러한 벡터는 형질전환된 세포에서 표현형별 선별을 제공해줄 수 있는 서열을 만들 뿐만 아니라 통상적으로 복제 부위를 수반하고 있다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로, 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 앰피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하므로, 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공해준다. pBR322, 그의 유도체, 또는 기타 미생물성 플라스미드 또는 박테리오파지는 또한, 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물성 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유할 수 있거나, 또는 이러한 프로모터를 함유하도록 변형시킬 수 있다. 특별한 항체의 발현을 위해 사용된 pBR322 유도체의 예가 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.)에 상세히 기재되어 있다.

[0248] 또한, 숙주 미생물과 화합성인 제어 서열 및 레플리콘을 함유하는 파지 벡터를, 이들 숙주와 연계해서 형질전환성 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 감수성 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 LE392를 형질전환시키는데 사용할 수 있는 제조법 벡터를 제조하는 데 있어 박테리오파지, 예컨대 λGEM.TM.-11을 활용할 수 있다.

[0249] 본 발명의 발현 벡터는 폴리펩티드 성분 각각을 코딩하는, 2개 이상의 프로모터-시스트론(cistron) 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치한 비번역 조절성 서열이다. 원핵성 프로모터는 전형적으로 2가지 부류, 즉 유도성 프로모터와 구성적 프로모터로 나누어진다. 유도성 프로모터는 배양 조건 상의 변화, 예를 들어 영양분의 존재 또는 부재, 또는 온도 상의 변화에 반응하여 그의 제어 하

에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

- [0250] 각종의 잠재적 숙주 세포에 의해 인식된 수많은 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선별된 프로모터는 제한 효소 분해를 통하여 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고, 이와 같이 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써, 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA와 작동적으로 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열과 많은 이종 프로모터 둘 다를 사용하여, 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터가 활용되며, 이는 이들이 일반적으로, 천연 표적 폴리펩티드 프로모터와 비교하여 보다 큰 전사 수준을 허용하고, 발현된 표적 유전자를 보다 높은 수율로 산출시키기 때문이다.
- [0251] 원핵성 숙주의 경우에 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 혼성체 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 기타 프로모터 (예컨대, 기타 공지된 박테리아 또는 파지 프로모터)가 또한 적합하다. 그들의 뉴클레오티드 서열이 공개되었기 때문에, 통상의 기술자는 요구되는 어떠한 제한 부위도 공급해주는 적응 인자 또는 링커를 사용하여 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 상기 서열을 작동적으로 결합시킬 수 있다 (Siebenlist et al. (1980) Cell, 20:269).
- [0252] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각 시스트론은 발현된 폴리펩티드가 막을 가로질러 전위되도록 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 이러한 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적상 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이종 폴리펩티드에 대해 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵성 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정한 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군 중에서 선택된 원핵성 신호 서열로써 치환시킨다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 양 시스트론에 사용된 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0253] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따르는 이뮤노글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으므로, 각 시스트론 내에 분비 신호 서열이 존재할 필요는 없다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄를 발현하고, 폴딩한 다음 어셈블리하여 세포질 내에 기능적 이뮤노글로불린을 형성시킨다. 특정의 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB⁻ 균주)는 디설피드 결합 형성에 선호되는 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 소단위의 적당한 폴딩 및 어셈블리가 이루어질 수 있도록 한다 (Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)).
- [0254] 본 발명의 항체는 또한, 발현된 폴리펩티드 성분들의 정량적 비를 조정하여, 분비되어 적당하게 어셈블리된 본 발명의 항체의 수율을 최대화할 수 있는 발현 시스템을 사용함으로써 생성될 수 있다. 이러한 조정은 폴리펩티드 성분들에 대한 번역 강도를 동시에 조정함으로써 적어도 부분적으로 달성된다.
- [0255] 번역 강도를 조정하기 위한 한 가지 기술이 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)에 개시되어 있다. 이는 시스트론 내의 번역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 활용한다. 소정의 TIR에 대해서는, 일정 범위의 번역 강도를 지닌 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체를 창출시킴으로써, 특이적쇄의 목적하는 발현 수준을 위해 상기 인자를 조정하는 편리한 수단을 제공할 수 있다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경시킬 수 있는 코돈 변화를 초래하는 통상적인 돌연변이 유발 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오티드 서열상의 변화는 침묵이다. TIR 내에서의 변경은, 예를 들어 신호 서열상의 변경과 함께, 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열의 수 또는 간격상의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성시키기 위한 한 가지 방법은 신호 서열의 아미노산 서열은 변화시키지 않는 (즉, 변화는 침묵이다) 코딩 서열의 처음에 "코돈 뱅크"를 생성시키는 것이다. 이는 각 코돈의 세 번째 뉴클레오티드 위치를 변화시킴으로써 달성될 수 있으며; 부가적으로, 류신, 세린 및 아르기닌과 같은 일부 아미노산은 상기 뱅크를 만드는데 있어 복잡성을 부가해줄 수 있는 다중의 첫 번째 및 두 번째 위치를 갖는다. 이러한 돌연변이 유발 방법은 문헌 [Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158]에 상세히 기재되어 있다.
- [0256] 한 실시양태에서, 내부에 각 시스트론에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 지닌 벡터 세트를 생성시킨다. 이러한 제한된 세트는 각종 TIR 강도 조합 하에 목적하는 항체 생성물을 산출시킬 뿐만 아니라 각쇄의 발현 수준 비교를 제공해준다. TIR 강도는 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)에 상세히 기재된 바와 같은 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 결정할 수 있다. 번역 강도 비교를 근거로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구축물에 조합될 목적하는 개개의 TIR을 선별한다.
- [0257] 본 발명의 항체를 발현하는데 적합한 원핵성 숙주 세포는 아르카에박테리아 (Archaeobacteria) 및 유박테리아

(*Eubacteria*), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리차 (*Escherichia*) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스 (*Bacillus*) [예를 들어, 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*)], 엔테로박테리아 (*Enterobacteria*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 종 [예를 들어, 피. 아에루기노사 (*P. aeruginosa*)], 살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스칸스 (*Serratia marcescans*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 프로테우스 (*Proteus*), 쉬겔라 (*Shigella*), 리조비아 (*Rhizobia*), 비트레오실라 (*Vitreoscilla*), 또는 파라코쿠스 (*Paracoccus*)를 포함한다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에 대한 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예는 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체, 예를 들어 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R을 갖는 균주 33D3을 포함한다 (미국 특허 번호 5,639,635). 기타 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이들 예는 제한적이라기 보다는 예시적이다. 규정된 유전자형을 갖는 상기 언급된 박테리아 중 어느 것의 유도체를 구축하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 특정 박테리아 세포 내에서 레플리콘의 복제 가능성을 고려하여 적당한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 레플리콘을 공급하기 위해 널리 공지된 플라스미드, 예컨대 pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410을 사용하는 경우에 숙주로서 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종을 사용하는 것이 적합할 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해성 효소를 분비해야 하고, 부가의 프로테아제 억제제가 세포 배양물에 혼입되는 것이 바람직할 수 있다.

- [0258] b) 항체 생성
- [0259] 숙주 세포를 상기 언급된 발현 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적당한 배대로 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양한다.
- [0260] 형질전환은 DNA를 원핵성 숙주 내로 도입하여, 이러한 DNA가 염색체의 요소로서 복제 가능하거나 또는 염색체성 통합물에 의해 복제 가능하도록 하는 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 따라서, 형질전환은 이러한 세포에 적당한 표준 기술을 사용하여 수행한다. 염화칼슘을 이용한 갈슘 처리는 일반적으로, 실재적인 세포-벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 대해 사용한다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 이용한다. 사용된 또 다른 기술은 전기천공이다.
- [0261] 본 발명의 폴리펩티드를 생성시키기 위해 사용된 원핵성 세포는 관련 기술분야에 공지되어 있고 선별된 숙주 세포의 배양을 위해 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양분 보충물이 부가된 루리아 브로쓰 (LB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 배지는 또한, 발현 벡터의 구축을 근거로 하여 선택된 선별 작용제를 함유하여, 이러한 발현 벡터를 함유하는 원핵성 세포의 성장을 선택적으로 허용해 준다. 예를 들어, 앰피실린 내성 유전자를 발현하는 세포의 성장을 위해 앰피실린을 배지에 가한다.
- [0262] 탄소, 질소 및 무기 인산염 공급원 이외의 모든 필수 보충물이, 단독으로 도입되거나 또는 또 다른 보충물 또는 배지, 예컨대 복합 질소 공급원과의 혼합물로서 도입된 적당한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타치온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리트 및 디티오프레이톨로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.
- [0263] 원핵성 숙주 세포는 적합한 온도 하에 배양한다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이 성장의 경우, 성장 온도 범위는 약 20℃ 내지 약 39℃; 약 25℃ 내지 약 37℃; 또는 약 30℃이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라서 약 5 내지 약 9의 범위의 모든 pH일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이의 경우, 그 pH는 약 6.8 내지 약 7.4, 또는 약 7.0이다.
- [0264] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에는, 이러한 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 발현을 유도시킨다. 본 발명의 한 측면에서, 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위해 PhoA 프로모터를 사용한다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포를, 유도를 위해 인산염-제한 배지에서 배양한다. 특정 실시양태에서, 이러한 인산염-제한 배지는 C.R.A.P. 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 이용된 벡터 구축물에 따라서 각종의 기타 유도제를 사용할 수 있다.
- [0265] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 주변세포질(periplasm) 내로 분비되어, 이로부터

회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 미생물을 일반적으로 삼투압 쇼크, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 붕괴시키는 것을 포함한다. 일단 세포가 붕괴되면, 세포 부스러기 또는 완전 세포를 원심분리 또는 여과함으로써 제거할 수 있다. 단백질을, 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피함으로써 추가로 정제할 수 있다. 또 다른 한편, 단백질을 배양 배지 내로 수송하고, 이 안에서 단리시킬 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과시킨 다음, 생성된 단백질의 추가 정제를 위해 이를 농축시킬 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 통상적으로 공지된 방법, 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯(Western blot) 검정을 이용하여 추가로 단리 및 확인할 수 있다.

[0266] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 각종 대규모 공급-배치식 발효 과정이 재조합 단백질의 생성을 위해 이용 가능하다. 대규모 발효기는 1,000리터 이상의 용량을 가지며, 특정 실시양태에서는 약 1,000 내지 100,000리터의 용량을 갖는다. 이들 발효기는 산소 및 영양분, 특히 글루코스를 분배시키기 위해 진탕기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하며, 이는 약 1리터 내지 약 100리터의 범위일 수 있다.

[0267] 발효 공정에서는, 단백질 발현의 유도가 전형적으로, 세포를 적합한 조건 하에 목적 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장 (이 단계에서는 세포가 초기 정지 상에 있다)시킨 후에 개시된다. 관련 기술분야에 공지되어 있고 상기 언급된 바와 같이, 이용된 벡터 구축물에 따라서 각종 유도제를 사용할 수 있다. 유도시기에 앞서, 세포를 보다 단기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도시키지만, 보다 길거나 짧은 유도 시간을 이용할 수도 있다.

[0268] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율과 질을 개선시키기 위해, 각종 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤페론(chaperone) 단백질, 예컨대 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 지니고 있는 펩티딜프로필 시스,트랜스-이소머라제)를 과다발현하는 부가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵성 세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적당한 폴딩과 용해도를 촉진시키는 것으로 입증되었다 ([Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210])).

[0269] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해적으로 감수성인 단백질)의 단백질분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해성 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 박테리아 프로테아제, 예컨대 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍성 균주가 이용 가능하고, 이는 예를 들어, 문헌 ([Joly et al. (1998) 상기 참조]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.); [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)])에 기재되어 있다.

[0270] 한 실시양태에서, 단백질 분해성 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤페론 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질전환시킨 이. 콜라이 균주를 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로서 사용한다.

[0271] c) 항체 정제

[0272] 한 실시양태에서, 본원에서 생성된 항체 단백질을 추가로 정제하여, 추가의 검정과 사용을 위해 실질적으로 균질한 제제를 수득한다. 관련 기술분야에 공지된 표준 단백질 정제 방법을 이용할 수 있다. 다음 과정은 적합한 정제 과정의 예시이다: 면역친화성 또는 이온 교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상에서의 크로마토그래피, 크로마토분획(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어, 세파텍스 G-75를 이용한 겔 여과.

[0273] 한 측면에서, 본 발명의 항체 생성물의 면역친화성 정제를 위해, 고체 상에 고정화시킨 단백질 A를 사용한다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역과 고 친화성으로 결합하는, 스탕필로코쿠스 아우레아스 (*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다 (Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13). 단백질 A가 고정화되는 고체 상은 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 또는 제어 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼이다. 일부 적용에서는, 오염물의 비특이적 부착을 가능한 방지하기 위해, 상기 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅한다.

- [0274] 정제의 제1 단계로서, 상기 언급된 바와 같은 세포 배양물로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정화된 고체 상에 적용하여, 관심 항체가 단백질 A와 특이적으로 결합할 수 있게 한다. 이어서, 상기 고체 상을 세척하여 이러한 고체 상과 비특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 관심 항체를 용출에 의해 고체 상으로부터 회수한다.
- [0275] **진핵성 숙주 세포를 이용한 항체의 생성:**
- [0276] 진핵성 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 일반적으로, 다음 중 하나 이상의 성분을 포함하지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0277] a) 신호 서열 성분
- [0278] 진핵성 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 신호 서열, 또는 성숙한 관심 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수도 있다. 선택된 이중 신호 서열은 상기 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단되는) 것일 수 있다. 포유류 세포 발현에서는, 포유류 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호를 이용할 수 있다. 이러한 전구체 영역에 대한 DNA가 동일 판독 프레임 내에서, 상기 항체를 코딩하는 DNA에 결합된다.
- [0279] b) 복제 기점
- [0280] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유류 발현 벡터에 필요치 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있으며, 이는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.
- [0281] c) 선별 유전자 성분
- [0282] 발현 및 클로닝 벡터는 선별성 마커로 명명되기도 하는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 기타 독소, 예를 들어 앰피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여해 주는 단백질; (b) 관련있는 경우, 영양요구성 결핍증을 보충해주는 단백질; 또는 (c) 복합 배지로부터 입수 가능하지 않은 중요한 영양분을 공급해 주는 단백질을 코딩한다.
- [0283] 선별 도식의 한 가지 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키기 위한 약물을 활용한다. 이중 유전자를 이용하여 성공적으로 형질전환시킨 세포는 약물 내성을 부여해 주는 단백질을 생산하므로, 선별 요법에서 살아 남는다. 이러한 우성 선별의 예들은 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.
- [0284] 포유류 세포에 적합한 선별성 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 흡수하기에 적절한 세포를 확인시켜 줄 수 있는 것인데, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이 있다.
- [0285] 예를 들어, 일부 실시양태에서, DHFR 선별 유전자로 형질전환시킨 세포는 먼저, 형질전환체 모두를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 일부 실시양태에서, 야생형 DHFR이 이용되는 경우에 적당한 숙주 세포는, DHFR 활성이 결핍된 중국산 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.
- [0286] 또 다른 한편, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 또 다른 선별성 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환시켰거나 공동-형질전환시킨 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는, 선별성 마커, 예컨대 아미노글리코시드성 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418에 대한 선별 작용제를 함유하는 배지에서 세포 성장시킴으로써 선별할 수 있다 (미국 특허 번호 4,965,199 참조). 숙주 세포는 NS0, CHOK1, CHOK1SV 또는 유도체 [글루타민 합성효소 (GS)가 결핍된 세포주 포함]를 포함할 수 있다. GS를 포유류 세포에 대한 선별성 마커로서 사용하는 방법이 미국 특허 번호 5,122,464 및 미국 특허 번호 5,891,693에 기재되어 있다.
- [0287] d) 프로모터 성분
- [0288] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 코딩하는 핵산과 작동적으로 연결되는 프로모터를 함유한다. 진핵생물에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 예를 들어, 사실상 모든 진핵성 유전자는, 전사가 개시되는 부위로부터 상류의 대략 25 내지 30개 염기에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시 부위로부터 상류의 70 내지 80개 염기에서 발견된 또 다른 서열은 CNCAAT 영역인데, 여기서 N은 어떠한 뉴클레오티드일 수도 있다. 대부분의 진핵성 유전자의 3' 말단은 AATAAA 서열인데, 이는 폴리 A 미부를 코딩 서열의 3' 말단에 부가하기 위한 신호일 수 있다. 특정 실시양태에

서, 이들 서열 중 어느 것 또는 모두는 진핵성 발현 벡터 내로 적합하게 삽입될 수 있다.

[0289] 포유류 숙주 세포에서 벡터로부터의 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스(fowlpox) 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터 수득된 프로모터, 이중 포유류 프로모터, 예를 들어 약된 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열-쇼크 프로모터에 의해 제어되며, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 화합성이어야 한다.

[0290] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 함유하기도 하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 즉발형 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 벡터로서 소 유두종 바이러스를 사용하여 포유류 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관해서는 다음 문헌을 참조할 수 있다 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]. 또 다른 한편, 라우스(Rous) 육종 바이러스 장 말단 반복 서열을 프로모터로서 사용할 수 있다.

[0291] e) 인핸서 요소 성분

[0292] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유류 유전자로부터 공지되어 있다 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린). 그러나, 전형적으로는, 진핵성 세포 바이러스로부터의 인핸서가 사용될 것이다. 이의 예는 복제 기점의 후기 측면 (bp 100-270) 상의 SV40 인핸서, 인간 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 마우스 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후기 측면 상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 진핵성 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소에 관해서는 다음 문헌을 참조할 수 있다 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]. 인핸서는 항체 폴리펩티드-코딩 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 분할될 수 있지만, 일반적으로 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.

[0293] f) 전사 종결 성분

[0294] 진핵성 숙주 세포에 사용된 발현 벡터는 또한, 전사를 종결시키고 mRNA를 안정화시키는데 필요한 서열을 함유할 수 있다. 이러한 서열은 진핵성 또는 바이러스성 DNA 또는 cDNA의 비번역 영역의 5', 및 종종 3'로부터 통상 이용 가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다. 한 가지 유용한 전사 종결 성분은 소의 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다 (W094/11026; 및 이에 개시된 발현 벡터 참조).

[0295] g) 숙주 세포의 선별 및 형질전환

[0296] 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝 또는 발현하는 데에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 고등 진핵생물 세포 (척추동물 숙주 세포 포함)를 포함한다. 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것이 (조직 배양) 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 계열 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계열 (293, 또는 현탁 배양 하에 성장하도록 서브클로닝된 293 세포; 문헌 [Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)]); 어린 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 중국산 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO; 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리(sertoli) 세포 (TM4; 문헌 [Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카산 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개의 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; CHOK1 세포, CHOK1SV 세포 또는 유도체 및 인간 간세포암 계열 (Hep G2)이다.

[0297] 항체 생성을 위해 숙주 세포를 상기 언급된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고; 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적당한 배대로 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0298] h) 숙주 세포 배양

[0299] 본 발명의 항체를 생성시키기 위해 사용된 숙주 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지, 예컨대

햄스(Ham's) F10 [시그마(Sigma)], 최소 필수 배지 [(MEM); 시그마], RPMI-1640 (시그마), 및 둘백코 변형 이글 배지 [(DMEM); 시그마]가 상기 숙주 세포를 배양하는 데에 적합하다. 또한, 다음 문헌에 기재된 배지 중 어느 것도 숙주 세포에 대한 배양 배지로서 사용할 수 있다 ([Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)]; [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)]; 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 번호 (재)30,985). 이들 배지 중 어느 것도 필요에 따라, 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, GENTAMYCINTM 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가 에너지 공급원으로 보충시킬 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있는 다른 모든 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있는 것이고, 이는 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0300] i) 항체의 정제

[0301] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체를 세포내적으로 생성시킬 수 있거나, 또는 배지 내로 직접 분비할 수 있다. 항체가 세포내적으로 생성되는 경우에는, 제1 단계로서 숙주 세포 또는 용해된 단편의 미세 부스러기를, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에는, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저, 시판용 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킬 수 있다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 전술된 단계들 중 어느 단계에 포함시켜 단백질 분해를 억제시킬 수 있고, 항생제를 포함시켜 우발적 오염물의 성장을 방지시킬 수 있다.

[0302] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화 크로마토그래피가 편리한 기술이다. 단백질 A가 친화성 리간드로서 적합한지의 여부는 항체에 존재하는 어느 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 근거하여 항체를 정제할 수 있다 [Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소형과 인간 $\gamma 3$ 에 권장된다 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 아가로스일 수 있지만, 기타 매트릭스도 이용 가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스, 예컨대 제어 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가르스를 이용하여 달성될 수 있는 것 보다 더 신속한 유속 및 보다 짧은 처리 시간을 허용해 준다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 [제이.티. 베이커 (J. T. Baker; 미국 뉴저지주 필립스버그)]가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온 교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSETM 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대, 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토분획, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전을, 회수하고자 하는 항체에 따라서 이용하기도 한다.

[0303] 어느 예비 정제 단계(들) 후, 관심 항체와 오염물을 포함하는 혼합물을 대상으로 하여, 저 염 농도 (예를 들어, 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행된, pH 약 2.5 내지 4.5의 용출 완충제를 사용하여, 예를 들어 저 pH 소수성 상호 작용 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다.

[0304] 일반적으로, 연구, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하는 각종 방법론이 관련 기술분야에 널리 정립되고 있고, 이는 상기 언급된 방법론과 일치하고/하거나 특별한 관심 항체에 대하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 적당한 것으로 간주되는 바와 같다.

[0305] **비-푸코실화 항체의 생성**

[0306] 본원에는 푸코실화도가 감소된 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 본원에 고려된 방법은 단백질 푸코실화가 결핍된 세포주 (예를 들어, Lec13 CHO 세포, 알파-1,6-푸코실트랜스페라제 유전자 녹아웃 CHO 세포, $\beta 1,4$ -N-아세틸글리코시미널트랜스페라제 III를 과다발현하고 골지 μ -만노시다제 II를 추가로 과다발현하는 세포 등)의 사용하는 방법, 및 항체의 생성을 위해 사용된 세포 배양 배지에 푸코스 유사체(들)를 추가하는 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); WO 2004/056312 A1; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)]; 및 미국 특허 번호 8,574,907 참조). 항체의 푸코스 함량을 감소시키기 위한 부가의 기술은 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0214975에 기재된 글리맥스(Glymaxx) 기술을 포함한다. 항체의 푸코스 함량을 감소시키기 위한 부가의 기술은 또한, 항체의 생성을 위해 사용된 세포 배양 배지에 하나 이상의 글리코

시다제 억제제를 부가하는 것을 포함한다. 글리코시다제 억제제는 α -글루코시다제 I, α -글루코시다제 II, 및 α -만노시다제 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리코시다제 억제제는 α -만노시다제 I의 억제제 [예를 들어, 키푸넨신(kifunensine)]이다.

[0307] 본원에 사용된 바와 같은, "코어 푸코실화"는 N-연결된 글리칸의 환원성 말단에서 N-아세틸글루코사민 ("GlcNAc")에 푸코스를 부가하는 것 ("푸코실화")을 지칭한다. 또한, 이러한 방법에 의해 생성된 항체, 및 그 의 조성물이 제공된다.

[0308] 일부 실시양태에서, Fc 영역 (또는 도메인)에 결합된 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄의 푸코실화가 감소된다. 본원에 사용된 바와 같은, "복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄"는 전형적으로, 아스파라긴 297 (카바트의 넘버링 에 따른다)에 결합되긴 하지만, 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄는 다른 아스파라긴 잔기와 연결될 수도 있다. "복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄"는 고 만노스 유형의 당 쇄를 제외하며, 이는 만노스만이 코어 구조의 비-환원성 말단에서 혼입되지만, 1) 코어 구조의 비-환원성 말단 쪽이 갈락토스-N-아세틸글루코사민 ("gal-GlcNAc"로서 지칭되기도 함)의 1개 이상의 분지를 가지며, Gal-GlcNAc의 비-환원성 말단 쪽이 임의로, 시알산, 이등분 N-아세틸글루코사민 등을 갖는 복합체 유형; 또는 2) 코어 구조의 비-환원성 말단 쪽이 고 만노스 N-글리코시드-연결된 당 쇄의 분지와 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄의 분지 둘 다를 갖는 혼성체 유형을 포함한다.

[0309] 일부 실시양태에서, 상기 "복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄"는 코어 구조의 비-환원성 말단 쪽이 갈락토스-N-아세틸글루코사민 ("gal-GlcNAc"로서 지칭되기도 함)의 0개, 1개 또는 그 초과 분지를 가지며, Gal-GlcNAc의 비-환원성 말단 쪽이 임의로, 시알산, 이등분 N-아세틸글루코사민 등과 같은 구조를 추가로 갖는 복합체 유형을 포함한다.

[0310] 본 발명의 방법에 따라서, 전형적으로 단지 적은 양의 푸코스가 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄(들) 내로 혼입된다. 예를 들어, 각종 실시양태에서, 항체의 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만이 조성물 내의 푸코스에 의한 코어 푸코실화를 갖는다. 일부 실시양태에서, 조성물 내의 푸코스에 의한 코어 푸코실화를 갖는 항체는 실질적으로 없다 (즉, 약 0.5% 미만). 일부 실시양태에서, 항체의 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 90% 초과, 약 91% 초과, 약 92% 초과, 약 93% 초과, 약 94% 초과, 약 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과, 또는 약 99% 초과가 조성물 내에서 비푸코실화된다.

[0311] 일부 실시양태에서, 본원에는 푸코스 잔기를 함유하는 N-글리코시드-연결된 탄수화물 쇄가 실질적으로 없는 (즉, 약 0.5% 미만) 항체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에는 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개가 비-푸코실화되는 항체가 제공된다.

[0312] 상기 언급된 바와 같이, 각종 포유류 숙주-발현 벡터 시스템을 활용하여 항체를 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배양 배지에 푸코스를 보충하지 않는다. 일부 실시양태에서, 유효량의 푸코스 유사체가 배양 배지에 부가된다. 이러한 맥락에서, "유효량"은 항체의 복합 N-글리코시드-연결된 당 쇄 내로의 푸코스 혼입을 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상 또는 약 50% 이상 정도 감소시키는 데 충분한 상기 유사체의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 항체는 푸코스 유사체의 부재 하에서 배양된 숙주 세포로부터 생성된 항체와 비교하여, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상 또는 약 50% 이상의 비-코어 푸코실화 단백질 (예를 들어, 코어 푸코실화가 결여됨)을 포함한다.

[0313] 푸코스가 당 쇄의 환원성 말단 내에서의 N-아세틸글루코사민에 결합되는 당 쇄와 비교하여, 푸코스가 당 쇄의 환원성 말단 내에서의 N-아세틸글루코사민에 결합되지 않는 당 쇄의 함량 (예를 들어, 비)은, 예를 들어 본 실시예에 기재된 바와 같이 결정할 수 있다. 다른 방법은 히드라진분해 또는 효소 분해 (예를 들어, 문헌 [Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), edited by Reiko Takahashi (1989)] 참조), 방출된 당 쇄의 형광 표지화 또는 방사성 동위원소 표지화, 및 이어서, 이와 같이 표지된 당 쇄를 크로마토그래피함으로써 분리시키는 것을 포함한다. 또한, 방출된 당 쇄의 조성은, 이러한 쇄를 HPAEC-PAD 방법 (예를 들어, 문헌 [J. Liq Chromatogr. 6:1557 (1983)] 참조)에 의해 분석함으로써 결정할 수 있다 (일반적으로, 미국 특허 출원 공개 번호 2004/0110282 참조).

[0314] IV. 조성물

[0315] 일부 측면에서, 또한 본원에는 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 중 어느 것을 포함하는 조성물 (예를 들어, 제 약 조성물)이 제공된다. 일부 측면에서, 본원에는 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체를 포함하는 조성물이 제공

되며, 여기서 상기 항체는 Fc 영역; 및 이러한 Fc 영역과 연결된 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄를 포함하며, 여기서 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄의 약 50% 미만이 푸코스 잔기를 함유한다. 일부 측면에서, 본원에는 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 항체는 Fc 영역; 및 이러한 Fc 영역과 연결된 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄를 포함하며, 여기서 N-글리코시드-연결된 탄수화물쇄는 실질적으로 푸코스 잔기를 함유하지 않는다.

[0316] 목적하는 순도를 갖는 활성 성분을, 임의로 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 저장하기 위한 치료 제형을 제조한다 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wiklins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, Pa. 2000). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 이는 완충제, 항산화제 (아스코르브산 포함), 메티오닌, 비타민 E, 소듐 메타비술파이트; 보존제, 등장제, 안정화제, 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 킬레이트제, 예컨대 EDTA 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

[0317] 완충제를 사용하여, 특히 안정성이 pH 의존적인 경우에는, 치료 유효성을 최적화하는 범위로 pH를 제어할 수 있다. 완충제는 약 50 mM 내지 약 250 mM의 범위의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 완충제는 유기 산과 무기 산 둘 다, 및 그의 염을 포함한다. 예를 들어, 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트가 있다. 부가적으로, 완충제는 히스티딘 및 트리메틸아민 염, 예컨대 트리스(Tris)로 구성될 수 있다.

[0318] 보존제를 부가하여 미생물 성장을 방지할 수 있으며, 이는 전형적으로, 약 0.2% 내지 1.0% (w/v)의 범위로 존재한다. 본 발명에 사용하기 적합한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드), 벤즈에토늄 클로라이드; 티메osal, 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올, 3-펜탄올, 및 m-크레솔을 포함한다.

[0319] 종종 "안정화제"로서 공지된 등장제는 조성물 내의 액체의 등장성을 조정 또는 유지하기 위해 존재할 수 있다. 대형의 전하를 띤 생체 분자, 예컨대 단백질 및 항체와 함께 사용되는 경우, 이들은 종종 "안정화제"로서 명명되며, 이는 이들이 아미노산 측쇄의 전하를 띤 군과 상호 작용함으로써, 분자간 상호 작용과 분자내 상호 작용의 가능성을 저하시킬 수 있기 때문이다. 등장제는 다른 성분의 상대적 양을 고려하여, 약 0.1 중량% 내지 약 25 중량%의 양, 또는 약 1 중량% 내지 약 5 중량%의 양으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 등장제는 다가 당 알콜, 3가 또는 더 고가의 당 알콜, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.

[0320] 부가의 부형제는 다음 중 하나 이상으로서 제공될 수 있는 작용제를 포함한다: (1) 벌크제, (2) 용해도 증강제, (3) 안정화제 및 (4) 용기 벽에 대한 부착 또는 변성을 방지하는 작용제. 이러한 부형제는 다가 당 알콜 (상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알콜, 예컨대 슈크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 시클리톨 (예를 들어, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타치온, 티옥트산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 소듐 티오술페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 기타 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드 (예를 들어, 크실로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스); 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 슈크로스); 트리스카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트린 또는 텍스트란을 포함한다.

[0321] 비-이온성 계면활성제 또는 세정제 ("습윤제"로서 공지되기도 함)는 치료제를 용해시키는 것을 도와줄 뿐만 아니라 진탕-유도된 응집에 대항하여 치료용 단백질을 보호해주기 위해 존재할 수 있으며, 이는 또한 활성 치료용 단백질 또는 항체의 변성을 유발시키지 않으면서 전단 표면 응력에 상기 제형이 노출될 수 있도록 해준다. 비-이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml의 범위, 또는 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재한다. 일부 실시양태에서, 비-이온성 계면활성제는 약 0.001% 내지 약 0.1% w/v, 또는 약 0.01% 내지 약 0.1% w/v, 또는 약 0.01% 내지 약 0.025% w/v의 범위로 존재한다.

[0322] 적합한 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), PLURONIC® 폴리올, TRITON®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (TWEEN®-20, TWEEN®-80 등), 라우로매트 로졸 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화 피마자 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아

레이트, 슈크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세정제는 소듐 라우릴 술페이트, 디옥틸 소듐 술포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 술포네이트를 포함한다. 양이온성 세정제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤즈에토늄 클로라이드를 포함한다.

[0323] 제형을 생체내 투여에 사용하기 위해서는, 멸균성이어야만 한다. 제형을 멸균성 여과 막 내로 여과시킴으로써 멸균성으로 만들 수 있다. 본원의 치료 조성물은 일반적으로, 멸균성 유입 포트, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 막을 갖는 정맥내 용제 봉지 또는 바이알을 갖는 용기 내에 놓아둔다.

[0324] 투여 경로는 공지되고 허용되는 방법에 따르며, 예컨대 단일 또는 다중 거환에 의해, 또는 장시간에 걸쳐 적합한 방식으로 주입함으로써, 예를 들어 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로에 의해 주사 또는 주입에 의해, 국소 투여, 흡입, 또는 지속 방출 또는 연장 방출 수단에 의해서이다.

[0325] 본원의 제형은 또한, 치료하고자 하는 특별한 적응증에 필요한 바대로 2가지 이상의 활성 화합물, 바람직하게 서로에게 불리한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 지닌 화합물을 함유할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 또한, 상기 조성물은 세포독성제, 시토키인 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도한 목적에 유효한 양으로 조합해서 존재하는 것이 적합하다.

[0326] V. 치료 방법

[0327] 본원에는 특정 대상체에게 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체) 또는 그의 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에서 Siglec-8을 발현하는 세포에 의해 매개된 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체 (예를 들어, 인간 환자)는 호산구-매개된 장애가 있는 것으로 진단되었거나, 또는 호산구-매개된 장애가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체 (예를 들어, 인간 환자)는 비만 세포-매개된 장애가 있는 것으로 진단되었거나, 또는 비만 세포-매개된 장애가 발생할 위험이 있다. 일부 실시양태에서, 상기 대상체는 호산구-매개된 장애 또는 비만 세포-매개된 장애를 갖고 있다.

[0328] 본원에는 특정 대상체에게 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 호산구를 고갈 또는 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 호산구의 고갈 또는 감소는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플) 중의 호산구 집단 수를, 상기 항체로 처리하기 전에 특정 대상체로부터의 샘플 중의 호산구 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 이러한 호산구의 고갈 또는 감소는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플) 중의 호산구 집단 수를, 상기 항체로 처리하지 않은 또 다른 대상체로부터의 샘플 중의 호산구 집단 수 또는 상기 항체로 처리하지 않은 대상체들로부터의 샘플 중의 평균 호산구 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 조직 샘플 (예를 들어, 폐 샘플, 비강 폴립증 샘플 등)이다. 일부 실시양태에서, 호산구의 고갈 또는 감소는 활성화된 호산구의 아포토시스에 기인한다. 호산구는 시토키인 또는 호르몬, 예컨대 IL-5, GM-CSF, IL-33, IFN- γ , TNF- α , 및 랩틴 (이에 제한되지 않는다)에 의해 활성화되거나 감작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 호산구의 고갈 또는 감소는 휴지기 호산구의 아포토시스에 기인한다. 일부 실시양태에서, 호산구의 고갈 또는 감소는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)에 기인한다. 일부 실시양태에서, 염증성 매개인자의 호산구 생성이 방지되거나 감소된다. 예시되는 염증성 매개인자는 반응성 산소 종, 과립 단백질 (예를 들어, 호산구 양이온성 단백질, 주요 염기성 단백질, 호산구-유래된 신경독소, 호산구 페록시다제 등), 지질 매개인자 (예를 들어, PAF, PGE1, PGE2 등), 효소 (예를 들어, 엘라스타제), 성장 인자 (예를 들어, VEGF, PDGF, TGF- α , TGF- β 등), 케모카인 (예를 들어, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP4, 에오타신 등) 및 시토키인 (예를 들어, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-33, TNF- α 등)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0329] 본원에는 또한, 특정 대상체에게 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 비만 세포를 고갈 또는 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포의 고갈 또는 감소는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플) 중의 비만 세포 집단 수를, 상기 항체로 처리하기 전에 특정 대상체로부터의 샘플 중의 비만 세포 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포의 고갈 또는 감소는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플) 중의 비만 세포 집단 수를, 상기 항체로 처리하지 않은 또 다른 대상체로부터의 샘플 중의 비만 세포 집단 수 또는 상기 항체로 처리하지 않은 대상체들로부터의 샘플 중의 평균 비만 세포 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 조직 샘플 (예를 들어, 피부 샘플, 폐 샘플, 골수 샘플, 비강 폴립증 샘플 등)이다.

일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 유체 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플, 기관지 폐포 세척 샘플, 및 비강 세척 샘플)이다. 일부 실시양태에서, 비만 세포의 고갈 또는 감소는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)에 기인한다. 일부 실시양태에서, 비만 세포의 고갈 또는 감소는 비만 세포로부터 생성된, 미리 형성되었거나 새롭게 형성된 염증성 매개인자의 감소 또는 방지이다. 예시되는 염증성 매개인자는 히스타민, N-메틸 히스타민, 효소 (예를 들어, 트립타제, 키마제, 카테스핀 G, 카르복시펩티다제 등), 지질 매개인자 (예를 들어, 프로스타글란딘 D2, 프로스타글란딘 E2, 류코트리엔 B4, 류코트리엔 C4, 혈소판-활성화 인자, 11-베타-프로스타글란딘 F2 등), 케모카인 (예를 들어, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 (즉, 예오타신), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10 등), 및 시토카인 (예를 들어, IL-3, IL-4, IL-5, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF 등)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0330] 본원에는 또한, 특정 대상체에게 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 이러한 대상체에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 고갈시키는 방법이 제공되며, 여기서 상기 항-Siglec-8 항체는 ADCC 활성화에 의해 Siglec-8을 발현하는 비만 세포를 사멸시킨다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 처리 전의 기준선 수준과 비교하여, 상기 대상체로부터 수득된 샘플 중에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포의 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 100% 이상을 고갈시킨다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 처리 전의 기준선 수준과 비교하여, 상기 대상체로부터 수득된 샘플 중에서 Siglec-8을 발현하는 비만 세포의 약 20% 이상을 고갈시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포의 고갈 또는 사멸은 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플) 중의 비만 세포 집단 수를, 상기 항체로 처리하기 전에 특정 대상체로부터의 샘플 중의 비만 세포 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포의 고갈 또는 사멸은 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 생물학적 유체 샘플) 중의 비만 세포 집단 수를, 상기 항체로 처리하지 않은 또 다른 대상체로부터의 샘플 중의 비만 세포 집단 수 또는 상기 항체로 처리하지 않은 대상체로부터의 샘플 중의 평균 비만 세포 집단 수와 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 조직 샘플 (예를 들어, 피부 샘플, 폐 샘플, 골수 샘플, 비강 폴립증 샘플 등)이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 유체 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플, 기관지 폐포 세척 샘플, 및 비강 세척 샘플)이다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 ADCC 활성을 개선시키도록 조작되었다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 ADCC 활성을 개선시키는, Fc 영역 내의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체의 중쇄 중 적어도 1개 또는 2개가 비-푸코실화된다. 일부 실시양태에서, 비만 세포의 고갈 또는 사멸은 비만 세포로부터 생성된, 미리 형성되었거나 새롭게 형성된 염증성 매개인자의 감소 또는 방지이다. 예시되는 염증성 매개인자는 히스타민, N-메틸 히스타민, 효소 (예를 들어, 트립타제, 키마제, 카테스핀 G, 카르복시펩티다제 등), 지질 매개인자 (예를 들어, 프로스타글란딘 D2, 프로스타글란딘 E2, 류코트리엔 B4, 류코트리엔 C4, 혈소판-활성화 인자, 11-베타-프로스타글란딘 F2 등), 케모카인 (예를 들어, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 (즉, 예오타신), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10 등), 및 시토카인 (예를 들어, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF 등)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0331] 본원에는 또한, 특정 대상체에게 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체 (예를 들어, 인간화 항-Siglec-8 항체)의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 비만 세포-매개된 활성을 억제하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포-매개된 활성의 억제는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 혈액 샘플) 중에서의 비만 세포-매개된 활성을, 상기 항체로 처리하기 전에 특정 대상체로부터의 샘플 중에서의 비만 세포-매개된 활성과 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 이러한 비만 세포-매개된 활성의 억제는 상기 항체로 처리한 후에 특정 대상체로부터의 샘플 (예를 들어, 조직 샘플 또는 생물학적 샘플) 중에서의 비만 세포-매개된 활성을, 상기 항체로 처리하지 않은 또 다른 대상체로부터의 샘플 중에서의 비만 세포-매개된 활성 또는 상기 항체로 처리하지 않은 대상체로부터의 샘플 중에서의 평균 비만 세포-매개된 활성과 비교함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 조직 샘플 (예를 들어, 피부 샘플, 폐 샘플, 골수 샘플, 비강 폴립증 샘플 등)이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 유체 샘플 (예를 들어, 혈액 샘플, 기관지 폐포 세척 샘플, 및 비강 세척 샘플)이다. 일부 실시양태에서, 비만 세포-매개된 활성의 억제는 비만 세포 탈과립화의 억제이다. 일부 실시양태에서, 비만 세포-매개된 활성의 억제는 기도 평활근 수축의 억제이다. 일부 실시양태에서, 비만 세포-매개된 활성의 억제는 비만 세포에서 칼슘 유동의 억제이다. 일부 실시양태에서, 비만 세포-매개된 활성의 억제는 비만 세포로부터 미리 형성되었거나 새롭게 형성된 염증성 매개인자의 방출의 억제이다. 예시되는 염증성 매개인자는 히스타민, N-메틸 히스타민, 효소 (예를 들어, 트립타제, 키마제, 카테스핀 G, 카르복시펩티다제 등), 지질 매개인자 (예를 들어, 프로스타글란딘 D2, 프로스타글란딘 E2, 류코트리엔 B4, 류코트리엔 C4, 혈소판-활성화 인자, 11-베타-프로스타글란딘 F2 등), 케모카인 (예를 들어, CCL2, CCL3,

CCL4, CCL11 (즉, 예오탁신), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10 등), 및 시토카인 (예를 들어, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF 등)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0332] 질환을 예방 또는 치료하기 위한 활성 작용제의 적당한 투여량은 상기 정의된 바와 같은, 치료하고자 하는 질환의 유형, 질환의 중증도 및 과정, 상기 작용제가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 작용제에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 상기 작용제는 대상체에게 1회 투여하거나 일련의 치료 전반에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 본원에 기재된 방법의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체의 투여 사이의 간격은 약 1개월 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 투여 사이의 간격은 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월 또는 그 초과이다. 본원에 사용된 바와 같은, 투여 사이의 간격은 항체의 한번 투여와 항체의 그 다음 투여 사이의 기간을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은, 약 1개월의 간격은 4주를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 투여 사이의 간격은 약 4주, 약 8주, 약 12주, 약 16주, 약 20주, 약 24주 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 치료는 항체의 수회 투여를 포함하며, 여기서 투여 사이의 간격은 다양할 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 투여와 두 번째 투여 사이의 간격은 약 1개월이고, 후속 투여들 사이의 간격은 약 3개월이다. 일부 실시양태에서, 첫 번째 투여와 두 번째 투여 사이의 간격은 약 1개월이고, 두 번째 투여와 세 번째 투여 사이의 간격은 약 2개월이며, 후속 투여들 사이의 간격은 약 3개월이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 정상 보다 낮은 용량으로 투여한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 1회 용량당 약 150 내지 약 450 mg의 투여량으로 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 항-Siglec-8 항체는 1회 용량당 약 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 및 450 mg 중 어느 것의 투여량으로 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 또는 약 1.0 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 투여량으로 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체는 약 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.5 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.5 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.5 mg/kg, 또는 10.0 mg/kg 중 어느 것의 투여량으로 대상체에게 투여한다. 상기 언급된 투여 횟수 중 어느 것을 이용할 수 있다.

[0333] 본원에서 고려된 치료 방법은 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애를 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체로 치료하는 것이다. 호산구-매개된 장애는 호산구 이동, 화학주성, 생성 또는 과립화와 연관된 장애 또는 질환을 포함한다. 유사하게, 비만 세포-매개된 장애는 비만 세포 이동, 화학주성, 생성 또는 과립화와 연관된 장애 또는 질환을 포함한다. 본 발명의 제형을 이용하여 치료할 수 있는 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애는 천식, 알레르기성 비염, 비강 폴립증, 아토피성 피부염, 만성 두드러기 (예를 들어, 만성 특발성 두드러기 및 만성 자발성 두드러기), 비만세포증, 호산구성 백혈병, 및 과다호산구성 증후군을 포함한다. 본 발명의 제형을 이용하여 치료할 수 있는 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애는 또한, 소수 과립구성 천식, 급성 또는 만성 기도 과민증, 호산구성 식도염, 처그-스트라우스 증후군, 시토카인과 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 악성 종양, 신체적 두드러기, 한랭 두드러기, 압박성 두드러기, 수포성 유사천포창, 식품 알레르기, 및 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA)을 포함한다.

[0334] 본원의 방법의 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-Siglec-8 항체는 알레르기 반응의 한 가지 이상의 증상을 억제한다. 일부 실시양태에서, 알레르기 반응은 유형 I 과민증 반응이다.

[0335] 알레르기성 비결막염 또는 건초열로서 공지되기도 한 알레르기성 비염은 흡입 알레르기 유발 항원에 대한 아토피성 반응의 가장 흔한 징후이고, 그의 중증도와 지속 기간은 종종, 이러한 알레르기 유발 항원에 대한 노출의 세기 및 길이와 상관이 있다. 이는 어떠한 연령에서도 처음으로 생길 수 있는 만성 질환이지만, 그 발병은 통상적으로 소아기 또는 청년기 동안이다. 전형적인 공격은 다량의 맑은 콧물, 발작성 재채기, 코 폐색, 및 코와 입천장의 가려움증으로 이루어진다. 후비부의 점액 배수는 또한, 인후염, 헛기침 및 기침을 유발시킨다. 또한, 결막과 눈꺼풀의 극심한 가려움증, 발적, 눈물흘림, 및 눈부심을 동반한, 알레르기성 안검결막염의 증상이 있을 수 있다. 종종, 공격은 종종, 전신 권태감, 쇠약, 피로를 동반하고, 종종 재채기 집중 기간 후의 근통증을 동반한다.

[0336] 가역적 폐쇄성 기도 질환으로서 공지되기도 한 천식은 호흡기 자극성 물질 및 기관지수축제 화학물질에 대한 기관지관지 분지의 과민 반응을 특징으로 하며, 이로써 쉼쉼거림, 호흡곤란, 흉부 압박감 및 기침의 공격이 초래되며, 이는 자발적으로 가역적이거나 또는 치료 이용에 따라 가역적이다. 이는 전체 기도와 관련된 만성 질환이지만, 그 중증도는 우발적인 경증의 일시적 증상 발현에서부터 생명에 위협을 가하는 중증의 만성 기관지 폐

왜까지 다양하다. 천식 공격의 신체적 징후는 빠른 호흡, 잘들리는 쌽쌽거림, 및 호흡기관의 부근육의 사용을 포함한다. 빠른 맥박과 혈압 상승이 또한, 전형적으로 존재하는데, 이는 말초 혈액과 비강 분비물에서의 호산구의 수준이 상승되기 때문이다. 천식과 아토피가 공존할 수 있지만, 천식 환자의 약 절반만이 또한 아토피성이고, 아토피 환자의 훨씬 더 적은 비율이 또한, 천식을 갖고 있다. 그러나, 천식이, 특히 소아기 동안에는 비아토피성 개개인들 중에서 보다는 아토피성 개개인들 중에서 더 자주 발생한다는 점에서 아토피와 천식이 전적으로 독립적이진 않다. 천식은 추가로, 역사상 다음 2개의 아군으로 분류되어 왔다: 외인성 천식 및 내인성 천식. 또한, 천식은 기도의 만성 염증과 관련이 있으며, 급성 악화는 상이한 환자들 간에 빈도에 있어서 다양하고 환경적 촉발인자에 반응하여 변화된다. 중증의 사례에서는, 기도의 만성 재형성이 일어날 수 있다.

[0337] 알레르기성, 아토피성 또는 면역학적 천식으로서 공지되기도 한 외인성 천식은, 일반적으로 어린 나이에, 통상 유아기 또는 소아기 동안 천식이 발생하는 환자를 설명한다. 아토피의 다른 징후 (습진 또는 알레르기성 비염 포함)가 또한 공존한다. 천식의 공격은 꽃가루 계절 동안, 동물의 존재하에, 또는 집먼지, 깃털 베개 또는 다른 알레르기 유발 항원에 대한 노출시 발생할 수 있다. 피부 시험은 원인이 되는 알레르기 유발 항원에 대한 양성/부양성의 두드러기와 광반(wheel-and-flare) 반응을 나타낸다. 흥미롭게도, 혈청 총 IgE 농도가 자주 상승되지만, 때때로는 정상 수준이다. 비알레르기성 또는 특발성 천식으로서 공지되기도 하는 내인성 천식은 전형적으로, 외관상의 호흡기 감염 후에, 성년기 동안에 처음으로 발생한다. 증상은 꽃가루 계절 또는 기타 알레르기 유발 항원에 대한 노출과 무관한 만성 또는 재발성 기관지 폐쇄를 포함한다. 피부 시험은 통상의 아토피성 알레르기 유발 항원에 대하여 음성이고, 혈청 IgE 농도는 정상 수준이다. 부가의 증상은 객담 혈액 및 호산구증가증을 포함한다. 본 특허 출원의 목적상, "호산구-매개된 장애"는 알레르기성 천식과 비-알레르기성 천식 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 호산구-매개된 장애(들) 및/또는 비만 세포-매개된 장애(들)가 있는 대상체는 흡입 코르티코스테로이드, 단기 작용 β_2 효능제, 장기 작용 β_2 효능제, 또는 그의 조합에 의해 적절하게 제어되지 않는 천식을 앓고 있다.

[0338] 습진, 신경피부염, 아토피성 습진 또는 베니에 양진(Besnier's prurigo)으로서 공지되기도 하는 아토피성 피부염은 가족성 아토피와 면역학적 아토피의 특징을 나타내는 일부 환자에 대해 특이적인 흔한 만성 피부 장애이다. 기본적인 특징은 소양증의 피부 염증 반응인데, 이는 특정 부위에 대한 편애를 동반한, 대칭적으로 분포된 특징적인 피부 발진을 유도시킨다. 아토피성 피부염이 알레르기성 비염 및 천식 및 고 수준의 IgE와 연관되기 때문에 아토피의 피부 형태로서 분류되긴 하지만, 그 피부염의 중증도는 피부 시험시 알레르기 유발 항원에 대한 노출과 항상 상관이 있는 것은 아니고, (다른 알레르기성 질환과는 달리) 탈감작화가 유효한 치료가 아니다. 고 혈청 IgE 수준이 알레르기성 천식의 진단에 확정적이긴 하지만, 정상 수준도 그 진단을 불가능하게 하는 것은 아니다. 상기 질환의 발병은 어떠한 연령에서도 일어날 수 있고, 병변은 홍반성의 부종성 구진 또는 낙설을 동반한 플라크와 함께 급성으로 시작된다. 가려움증으로 인해, 삼출성이 되고 껍질이 생기는 증상이 유발된 다음, 만성적인 태선화(lichenification)로 된다. 세포성 수준에서는, 급성 병변이 부종이고, 진피는 단핵 세포, CD4 림프구로 침윤된다. 호중구, 호산구, 혈장 세포 및 호염기구는 드물지만, 탈과립화된 비만 세포는 존재한다. 만성 병변은 표피 증식, 과각화증 및 부전각화증을 특징으로 하고, 진피는 단핵 세포, 랑게르한스(Langerhans') 세포 및 비만 세포로 침윤된다. 소신경의 신경다발막의 병변을 포함한, 섬유증의 병소 부위가 존재할 수도 있다.

[0339] 두드러기 및 혈관부종은 표재성 피부 혈관에서 히스타민 자극된 수용체로부터 비롯되는 신체적 종창, 홍반 및 가려움증을 지칭하고, 전신성 아나필락시스의 특징적인 피부 특색이다. 전신성 아나필락시스는 약물, 곤충 독 또는 식품로부터 비롯되는, 다중 기관에서 IgE-매개된 반응이 동시에 발생하는 것이다. 이는 알레르기 유발 항원 유도되고, 비만 세포 부하된 IgE에 의해 갑자기 유발되어, 생명 유지에 절대 필요한 각종 기관의 기능에 있어서 극심하면서도 생명에 위협이 되는 변형을 초래한다. 혈관 붕괴, 급성 기도 폐쇄, 피부 혈관 확장 및 부종, 및 위장관 및 비뇨 생식기 근육 경련이 거의 동시에 발생하지만, 항상 동일한 정도는 아니다. 아나필락시스의 병리 상태는 기도의 점액 플러깅과 병소 폐확장부전을 동반한 혈관부종 및 과다팽창된 폐를 포함한다. 세포성 수준에서는, 폐가 급성 천식 공격 동안과 유사하게 보이며, 이는 기관지 점막하 분비선의 과다 분비, 점막 및 점막하 부종, 주변기관지 혈관 충혈, 및 기관지 벽 내에서의 호산구 증가증을 동반한다. 폐 부종과 출혈이 존재할 수 있다. 기관지 근육 경련, 과다팽창, 및 심지어 폐포의 과열이 존재할 수도 있다. 인간 아나필락시스의 중요한 특징은 후두, 기관, 후두개 및 하인두의 고유판 내에서의 부종, 혈관 울혈 및 호산구 증가증을 포함한다. 알레르기 유발 항원에 대한 노출은 섭취, 주사, 흡입, 또는 피부 또는 점막과의 접촉을 통해서 이루어질 수 있다. 그 반응은 알레르기 유발 항원에 대한 노출 후 수초 또는 수분 내에 시작된다. 초기 공포 또는 압박한 종말의 감지가 있는 다음, 하나 이상의 표적 기관계, 즉 심혈관, 호흡기, 피부 또는 위장에서의 증상이 신속하게 나타날 수 있다. 아나필락시스에 대해 책임이 있는 알레르기 유발 항원은 흔히 아토피와 연관된 것과

상이다. 식품, 약물, 곤충 독 또는 라텍스가 가장 흔한 공급원이다. 식품 알레르기 유발 항원은 갑각류, 연체동물 (예를 들어, 바닷가재, 새우, 게), 어류, 콩과 식물 (예를 들어, 땅콩, 완두, 콩류, 감초), 종자 (예를 들어, 참깨, 목화씨, 캐러웨이(caraway), 겨자, 아마씨, 해바라기), 견과류, 베리류, 달걀 흰자, 메밀 및 우유에서 발견된 것을 포함한다. 약물 알레르기 유발 항원은 이중 단백질 및 폴리펩티드, 폴리사카라이드 및 합성 약물에서 발견된 것을 포함한다. 곤충 알레르기 유발 항원은 히메노테라(Hymenoptera) 곤충을 포함하며, 이는 꿀벌, 말벌, 호르넷(hornet), 와스프(wasp) 및 불개미를 포함한다. 에피네프린이 아나필락시스에 대한 전형적인 치료제이지만, 항히스타민제 또는 기타 히스타민 차단제가 전형적으로, 덜 심각한 두드러기 또는 혈관 부종 반응을 위해 처방된다.

[0340] 비강 폴립증은 염증이 생긴 조직이 비강 내로 증식하는 것을 특징으로 하는, 상기도의 만성 염증성 질환이고, 그 정확한 병인은 공지되어 있지 않지만, 성인의 1 내지 5%에게서 발병하는 것으로 공지되어 있다 (Settipane G A: Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*, 1996, 17:231-236). 비강 폴립증은 전형적으로, 20 세 이상의 남성에게 존재하고, 비강 폐쇄증, 후각감퇴증, 및 재발성 감염증을 유발시키며, 이는 사계절 알레르기성 비염 보다 삶의 질에 있어 상당히 더 많은 영향을 미친다 (Li et al., Characterizing T-Cell Phenotypes in Nasal Polyposis in Chinese Patients, *J Invest Allergol Clin Immunol*, 2009; Vol. 19(4):276-282). 비강 폴립증에 걸린 모든 환자의 1/3 이하가 천식을 갖고 있는 것으로 보고되지만, 천식 환자의 7%만이 비강 폴립증을 갖고 있다. 비강 폴립증과 관련된 우세 세포 유형은 호산구 및 비만 세포를 포함한다.

[0341] VI. 제조품 또는 키트

[0342] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 항-Siglec-8 항체를 포함하는 제조품 또는 키트가 제공된다. 이러한 제조품 또는 키트는 본 발명의 방법에서 상기 항체의 사용 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 상기 제조품 또는 키트는 특정 개체에게 유효량의 항-Siglec-8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 이러한 개체에게서 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애를 치료 또는 예방하는 방법에서 항-Siglec-8 항체의 사용 설명서를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 개체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 상기 개체는 천식, 알레르기성 비염, 비강 폴립증, 아토피성 피부염, 만성 두드러기, 비만세포증, 호산구성 백혈병, 및 과다호산구성 증후군으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖고 있다. 특정 실시양태에서, 상기 개체는 소수 과립구성 천식, 급성 또는 만성 기도 과민증, 호산구성 식도염, 처그-스트라우스 증후군, 시토킨과 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 염증, Siglec-8을 발현하는 세포와 연관된 악성 종양, 신체적 두드러기, 한랭 두드러기, 압박성 두드러기, 수포성 유사천포창, 식품 알레르기, 및 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증 (ABPA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 갖고 있다.

[0343] 상기 제조품 또는 키트는 용기를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 용기는, 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 주사기 (예컨대, 단일 또는 이중 챔버 주사기) 및 시험용 튜브를 포함한다. 용기는 각종 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 이 용기는 상기 제형을 보유하고 있다.

[0344] 제조품 또는 키트는 표지 또는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 용기 상에 있거나 또는 용기와 연합되고, 상기 제형의 재구성 및/또는 사용에 대한 지시 사항을 표시할 수 있다. 이러한 표지 또는 패키지 삽입물은 상기 제형이 특정 개체에게서 호산구-매개된 장애 및/또는 비만 세포-매개된 장애를 치료 또는 예방하기 위하여 피하, 정맥내 또는 기타 투여 방식에 유용하거나 또는 이러한 투여 방식으로 의도된 것이란 사실을 추가로 표시할 수 있다. 제형을 보유하고 있는 용기는 단일-사용 바이알 또는 다중-사용 바이알일 수 있으며, 이는 재구성된 제형의 반복 투여를 허용해준다. 제조품 또는 키트는 적합한 희석제를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제조품 또는 키트는 상업적, 치료적, 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 이는 기타 완충제, 희석제, 여과제, 바늘, 주사기, 및 사용 설명서를 수반한 패키지 삽입물을 포함한다.

[0345] 구체적 실시양태에서, 본 발명은 단일 용량-투여 단위용 키트를 제공한다. 이러한 키트는 단일 또는 다중-챔버의 미리-충진된 주사기 둘 다를 포함한, 치료용 항체의 수성 제형의 용기를 포함한다. 예시되는 미리-충진된 주사기는 베테 게엠베하 (Vetter GmbH; 독일 라벤스부르크)로부터 입수 가능하다.

[0346] 본원의 제조품 또는 키트는 임의로, 제2 의약을 포함하는 용기를 추가로 포함하며, 여기서 항-Siglec-8 항체는 제1 의약이고, 어느 제조품 또는 키트는 표지 또는 패키지 삽입물 상에, 제2 의약의 유효량을 이용하여 대상체를 치료하는 것에 관한 설명서를 추가로 포함한다. 예시되는 제2 의약은 항-IgE 항체, 항히스타민제, 기관지확장제, 글루코코르티코이드, NSAID, 충혈제거제, 기침 억제제, 진통제, TNF-길항제, 인테그린 길항제, 면역억제제, IL-4 길항제, IL-13 길항제, 이중 IL-4/IL-13 길항제, DMARD, B-세포 표면 마커에 결합하는 항체, 및/또는

BAFF 길항제일 수 있다.

- [0347] 또 다른 실시양태에서, 본원에는 자동-주사기 장치에서 투여하기 위한 본원에 기재된 제형을 포함하는 제조품 또는 키트가 제공된다. 자동-주사기는 활성화시, 환자 또는 투여자로부터 부가의 적절한 조치 없이도 그의 내용물을 전달하게 될 주사 장치로서 설명될 수 있다. 이는 전달 속도가 일정해야만 하고 전달 시간이 잠깐 보다는 긴 경우에 치료 제형의 자기 치료에 특히 적합하다.
- [0348] 본 발명은 다음 실시예를 참조로 하여 보다 완전히 이해될 것이다. 그러나, 이들 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적인고, 그를 고려한 각종 변형 또는 변화가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 제시될 것이며 이것이 본 출원의 요지 및 이해 범위와 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다.
- [0349] 실시예
- [0350] Siglec (시알산-결합, 이뮤노글로불린-유사 렉틴)는 주로 백혈구 상에서 발견되는 단일 통과 막관통 세포 표면 단백질이다. Siglec 패밀리의 한 구성원인 Siglec-8은 신규 인간 호산구 단백질을 확인하기 위한 노력의 일부로서 처음 발견되었다. 이는 인간 호산구와 함께 발견되는 것 이외에도, 비만 세포에 의해 발현되기도 한다. Siglec-8은 황산화 글리칸, 6'-sulfo-sialyl 루이스 X를 인식하고, 비만 세포 기능을 억제하는 것으로 밝혀진 세포내 번역수용체 티로신-기제 억제 모티프 (ITIM) 도메인을 함유한다. Siglec-8에 대한 무린 항체인 2E2 및 2C4 항체가 미국 특허 번호 8,207,305; 미국 특허 번호 8,197,811, 미국 특허 번호 7,871,612, 및 미국 특허 번호 7,557,191에 기재되어 있다. 마우스 항-Siglec-8 2C4 항체의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열이, 예를 들어 미국 특허 번호 8,207,305에서 각각 서열식별번호: 2 및 서열식별번호: 4로서 발견될 수 있다.
- [0351] **실시예 1: 키메라 항-Siglec-8 항체의 생성 및 성상 확인.**
- [0352] 키메라 항체를 마우스 2E2 항체 및 마우스 2C4 항체로부터 생성하였고, 연속해서 이를 대상으로 하여 인간 Siglec-8에 대한 결합 활성에 관하여 분석하였다.
- [0353] **방법 및 결과**
- [0354] 키메라 2E2 항체 (ch2E2) 및 키메라 2C4 항체 (ch2C4)의 생성
- [0355] 키메라 2E2 항체 (ch2E2)를 생성하기 위하여, 스냅-동결시킨 마우스 하이브리도마 2E2 세포 용해물을, RNeasy 미니 키트 [퀴아젠(Qiagen)]를 이용하여 처리하여 제조업자의 프로토콜에 따라서 전체 RNA를 단리하였다. 단리된 RNA의 3 µg 샘플을 역전사시켜, 제조업자의 프로토콜에 따라서 제1 가닥 cDNA 합성용 키트 [GE 라이프 사이언스(Life Sciences)]를 이용하여 2E2 cDNA를 생성하였다. 연속해서 2E2 cDNA를, 푸션(Phusion) 섬광 고성능 PCR 마스터 믹스 [더모 사이언티픽(Thermo Scientific)]을 이용하여 PCR함으로써 증폭시키고, 이러한 PCR 반응내의 서열을 확장하였다. 상기 푸션 고성능 PCR 마스터 믹스를 이용하여 이뮤노글로불린 중쇄 가변 영역 (VH) cDNA 및 카파 경쇄 가변 영역 (VL)을 PCR 증폭시켰다. 각 PCR 반응의 결과가 단일 증폭 생성물이었으며, 이를 제조업자의 프로토콜에 따라서 퀴아퀵(QIAquick) PCR 정제용 키트 (퀴아젠)를 이용하여 정제하였고, 각 이뮤노글로불린 쇠에 대한 서열을 수득하였다. 카파 경쇄 가변 영역의 컨센서스 서열은 2E2 VK로 지명되었고, 중쇄 가변 영역의 컨센서스 서열은 2E2 VH로 지명되었다. 2E2 VK 단백질 서열은 첫 번째 잔기를 제외하고는 (여기서, Gln은 Glu로써 대체되었다) 마우스 2C4 IgG1 항체의 서열과 동일하였지만 (문헌 [Kikly et al., *J. Allergy Clin Immunol.*, 2000; 105:1093-1100] 참조), 2E2 VH 단백질 서열은 2C4의 서열과 완전히 동일하였다.
- [0356] 키메라 발현 벡터의 구축은, 증폭된 가변 영역을 리가제-비의존성 클로닝을 이용하여 IgG/카파 불변 영역 벡터 내로 클로닝하는 것을 수반하였다. 간략하게 언급하면, pCMV 벡터를 BfuA1 (BspM1)로 분해시키고, 이와 같이 분해된 벡터를 겔 전기영동에 의해 정제하며, T4 DNA 중합효소 및 100 mM dATP와 함께 인큐베이션함으로써 벡터 내에 화합성 오버행을 생성시켰다. 이러한 삽입물의 경우에는, 리더 서열의 3' 말단을 함유하는 프라이머, 즉 정방향 프라이머, 또는 불변 영역 (IgG1 또는 카파)의 시작을 함유한 다음 가변 영역의 시작을 함유하는 (각 방향으로) 프라이머, 즉 역방향 프라이머를 이용하여 2E2 cDNA로부터 PCR함으로써 항체 서열을 증폭시켰다. 이와 같이 증폭시킨 삽입물을, PCR 정제용 키트 (퀴아젠)를 이용하여 정제하고, T4 DNA 중합효소 및 100 mM dTTP와 함께 인큐베이션함으로써 삽입물 내에 상보적 오버행을 생성시켰다. 벡터 및 삽입물을 실온 하에 인큐베이션하였고, 이를 이용하여 화학적으로 적격한 TOP10 박테리아 [인트로젠(Intvitrogen)]를 형질전환시켰으며, 연속해서 이를 카나마이신을 함유하는 배양 판 상에 도말하였다. 몇 가지 클론을 단리하였고, 집락을 PCR에 의해 스크리닝하였다. 정확한 크기의 PCR 생성물을 함유하는 클론을 선별하였고, 미니프렙 키트 (퀴아젠)를 이용하여 DNA

를 분리하였으며, 이 DNA를 서열 분석하였다.

[0357] 키메라 2C4 항체 (ch2C4)를 생성하기 위하여, 2C4 중쇄 가변 영역 (VH) 및 카파 경쇄 가변 영역 (VK)을 합성하였고 [진스크립트(GeneScript)], 키메라 2E2 항체를 클로닝하기 위해 사용된 동일한 방법을 적용하였다. Expi293 형질감염 배지 (인트로젠)에서 성장하고 있는 Expi293 현탁 세포 (인간 배아 신장 세포), 및 항생제를, 제조업자의 프로토콜에 따라서 Expi293 발현 시스템 키트 (인트로젠)가 공급된 Expi팩타민 293 시약을 이용하여, ch2E2 중쇄 및 ch2E2 카파 경쇄를 코딩하는 구축물 또는 ch2C4 중쇄 및 ch2C4 카파 경쇄를 코딩하는 구축물 (각각 1 μ g DNA)로 공동-형질감염시켰다. 상기 세포를 7일 동안 6 웰 판 내의 2 ml 성장 배지에서 성장시킨 후, 배지를 수거하고 ELISA에 의해 재조합 단백질 발현에 관하여 검정하였다.

[0358] 키메라 항체의 Siglec-8 결합 활성

[0359] 키메라 2E2 및 키메라 2C4 IgG1K 항체에 의한 재조합 인간 Siglec-8 세포외 도메인 (ECD)의 결합을 ELISA에 의해 측정하였다. Siglec-8 결합 검정을 위해, 4°C에서 밤새 웰당 0.4 μ g/mL Siglec-8 ECD 30 μ l로 코팅한 다음, 세척 완충제 (0.1% 트윈 20)에서 웰을 세척하고 실온 하에 2시간 동안 90 μ l 5% BSA/TBS 용액으로 차단함으로써 상기 코팅 용액을 제거함으로써, 384-웰 스펙트라플레이트(SpectraPlate) [펄킨 엘머(Perkin Elmer)]를 제조하였다. 0.2% BSA/TBS 중에서의 키메라 항체 (ch2E2 또는 ch2C4) 또는 마우스 항체 (m2E2 또는 m2C4) (출발 농도는 5,000 ng/mL였다)의 3배 일련의 희석물을 각 코팅된 웰에 가하였다. 상기 판을 실온 하에 2시간 동안 인큐베이션하였고, 웰을 연속해서 세척한 후, 0.2% BSA/TBS 용액에서 희석된 염소-항-인간 Fc 페록시다제 접합체 (1:10,000 희석) 또는 항-마우스 Fc 페록시다제 접합체 (1:30,000 희석)를 부가하였다. 상기 판을 실온 하에 45분 동안 인큐베이션한 다음, 세척하고 30 μ l K-블루 HRP 기질 [스카이바이오 리미티드(SkyBio Ltd)]을 각 웰에 부가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 10 μ l의 레드 중지 용액 (스카이바이오 리미티드)을 각 웰에 부가함으로써 상기 반응을 중지시켰다. ELISA 판독기 PHERAStar FS [BMG 랩테크(Labtech)]를 이용하여, 실험용 샘플의 광학 밀도를 650 nm 하에 판독하였다.

[0360] 양 키메라 항체는 거의 동등한 EC₅₀ 값으로 완전한 Siglec-8 ECD에 결합하였다. 키메라 항체 ch2E2는 마우스 항체 m2E2와 비교하여 보다 낮은 EC₅₀ 값으로 Siglec-8 ECD에 결합하였다 (표 2).

[0361] <표 2>

[0362] 인간 Siglec-8 ECD에 대한 항체 결합

	m2E2	정제된 ch2E2	ch2E2	ch2C4
EC50	0.1003	0.05701	0.04759	0.07411

[0363]

[0364] **실시예 2: 인간화 항-Siglec-8 항체의 생성 및 성상 확인.**

[0365] 키메라 항체 2E2 및 키메라 항체 2C4의 서열을 이용하여, 마우스 2E2 항체의 인간화 버전을 설계하였다.

[0366] 방법 및 결과

[0367] 인간화 항-Siglec-8 항체의 설계

[0368] 국제 면역유전학 데이터베이스 2009 (문헌 [Lefranc, MP., *Nucleic Acid Res.*, 2003, 31(1):307-10]) 및 면역학적 관심 단백질 서열의 카바트 데이터베이스 출시 5 (가장 최근의 업데이트 날짜는 1999년 11월 17일이다) (문헌 [Kabat et al., NIH National Technical Information Service, 1991, 1-3242])로부터의 인간 및 마우스 이뮤노글로불린의 단백질 서열을 이용하여, 인간 이뮤노글로불린 서열의 데이터베이스를 카바트 정렬로 편집하였다. 이와 같이 편집된 데이터베이스는 10,906 VH 및 2,912 VK 서열을 함유하였다.

[0369] 디스커버리 스튜디오(Discovery Studio) 패키지 [엑셀리스, 인크.(Accelrys, Inc.)]에 포함된 모델러 (Modeller) 프로그램 (문헌 [Eswar et al., *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2006, Ch. 5:Unit 5.6])을 이용하여, 마우스 항체 2C4 가변 영역의 상동성 모델을 계산하였다. 1a70.pdb, 1dqd.pdb 및 1ORS.pdb의 원자 좌표가, 항체 pdb 구조물 데이터베이스 (엑셀리스, 인크.)의 기본 로컬 정렬 검색 도구 (BLAST) 분석에 의해 결정된 바와 같이, VH, VL 및 주쇄/계면 각각에 대한 가장 높은 프레임워크 실제 서열 주형이었다. 이들 주형을 사용하여 프레임워크의 30개 초기 모델을 생성하였고, 최종 마우스 2C4 모델을 궁극적으로 생성시키기 위한 카바트 정의를 이용하여, 가장 낮은 에너지 모델을 사용하여 20개 루프 모델 (모든 CDR 루프가 포함됨)과 그의 5

개의 최상의 루프 주형을 생성하였다.

[0370] 인간화를 위해서는, 적합한 인간 V 영역을 확인해야 할 필요가 있다. 깁스(Gibbs) 서열 분석용 프로그램(MRCT)을 사용하여, 각종 선별 기술을 이용하여 2C4 VH 및 VK 단백질 서열을 수반한 인간 VH 및 VK 데이터베이스로부터 정보를 얻었다. 상기 디스커버리 스튜디오 프로그램(엑셀리스)을 이용하여, 마우스 항체 2C4의 최종 상동성 모델에서 CDR 잔기(카바트 정의)의 4Å 이내의 프레임워크(FW) 잔기를 확인하였고, 이를 "4Å CDR 외막"으로서 지명하였다. 높은 4Å CDR 외막을 보유한 2C4와 CDR 1, 2 및 3 길이 동일성 및/또는 2C4 VH에 대한 VCI 동일성을 공유하는 인간 VH 서열은 없었다. AF471521이 주요 프레임워크 잔기(19/24 4Å 외막 및 18/22 VCI)의 가장 높은 동일성 스코어를 나타내는 14개 잔기의 CDR3 크기를 갖는 그 다음으로 우수한 후보였지만, 다른 서열은 부가의 차이를 나타냈으며, 이로써 이들은 그리 중요하지 않은 사항이 되었다. 그러나, AF471521은 그의 생식세포 계열 VH 유전자 X92218로부터 11개의 체세포 돌연변이를 갖고 있었다. 체세포 돌연변이를 이동시키기 위하여, 생식세포 계열과는 상이하였고/하였거나 마우스 내에 보존되지 않았던 어떠한 프레임워크 잔기 도 인간 생식세포 계열 서열로 복귀 돌연변이시켰다. 따라서, 6개 프레임워크 잔기 를 생식세포 계열로 복귀 돌연변이시켰고, 생식세포 계열과 상이하였던 나머지 5개 잔기는 주요 프레임워크 잔기 였고 마우스 서열과 동일하였다.

[0371] 2C4 항체의 상동성 모델을 이용하여, 적합한 수용체 인간 프레임워크를 확인하였기 때문에, 2E2 항체의 CDR을 수용체 인간 프레임워크 상으로 이식화함으로써 합성 단백질 및 DNA 서열을 설계하였다. 2E2RHA의 초기 설계는 2E2 VH로부터의 CDR 1, 2 및 3을 AF471521의 수용체 FW 내로 이식화하는 것이었다. 2E2 VH CDR(회색 음영)을 AF471521의 FW 서열 내로 삽입하면, 초기 인간화 변이체인 2E2RHA가 설계되었다(도 1). 카바트 위치 24, 48, 49, 67 및 68에서의 5개의 4Å CDR 외막/VCI 잔기는 2E2RHA에 보존되지 않았고, 이들은 인간화 버전 2E2RHB에서 마우스 등가 잔기로 복귀 돌연변이되었거나 또는 다음 변이체에서 한번에 하나씩 돌연변이시켰다: 서열들을 인실리코(in silico)로 어셈블리하였고, 이를 2E2RHA 내지 2E2RHG로 지명하였다(도 1).

[0372] 경쇄를 인간화하기 위하여, 중쇄와 유사한 과정으로 인간 카파 쇄를 확인하였다. AY867246은 4Å CDR 외막/VCI에서 2E2 VK와 가장 높은 동일성을 갖는 서열이었지만, 6개의 체세포 돌연변이를 갖고 있었다. AY867246를 버리고, X93721을 선호하였으며, 이는 21/25 4Å 외막 및 15/17 VCI를 함유하였고, 가장 가까운 생식세포 계열 VK 유전자인 X01668로부터의 단지 1개의 체세포 돌연변이를 함유하였다. X93721로부터의 프레임워크를 사용하여, 인간화 구축물에 대한 DNA 및 단백질을 설계하였다. 2E2 VK로부터의 CDR 1, 2 및 3(회색 음영)을 X93721의 수용체 FW 내로 이식하여 2E2RKA를 생성하였다(도 2). 변이체 2E2RKB에서 또는 개별적으로 다음 변이체에서 등가 마우스 잔기로 복귀 돌연변이시켰던 2E2RKA에 4개의 매칭되지 않은 4Å CDR 외막 잔기, 3, 47, 58 및 71이 있었다: 서열들을 인실리코로 어셈블리하였고, 이를 2E2RKA 내지 2E2RKG로 지명하였다(도 2).

[0373] 인간화 항-Siglec-8 항체의 생성

[0374] 2E2RHA 및 2E2RKA에 대한 유전자를 합성하였고(진스크립트), 인간 서열에 대하여 코돈 최적화하였다. 자연 인간 프레임워크 서열 AF471521 및 X93721, 중쇄 및 경쇄 각각, 및 자연 마우스 CDR 서열을 인실리코로 어셈블리하였고, 이를 2E2RHA 내지 2E2RHG 및 2E2RKA 내지 2E2RKG로 지명하였다. 소프트웨어 알고리즘(진스크립트)을 이용하여, 상기 서열을 침묵 돌연변이 유발에 의해 최적화하여, 인간 세포에 의해 우선적으로 활용되고 합성된 코돈을 사용하였다. RHA/B 및 RKA/B 구축물을, 키메라 항체의 PCR 증폭을 위하여 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이, 발현 벡터 및 삽입물에 대한 특이적 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰고; 이를 리가제-비의존성 클로닝 반응에 의해 IgG/카파 불변 영역 벡터 내로 삽입하였으며; 키메라 항체를 생성시키기 위하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 TOP10 박테리아를 형질전환시키기 위해 사용하였다. RKA 및 RHA를 연속해서, 제조업자의 프로토콜에 따라서 쿼체인지 라이트닝 부위-유도 돌연변이 유발 키트[스트라타젠(Stratagene)]를 이용하여 PCR 돌연변이 유발시킴으로써 변형시켜 모든 인간 항체 변이체를 수득하였다(도 1, 도 2, 표 3, 표 4, 및 표 5).

[0375] <표 3>

[0376] 키메라 및 인간화 항체 변이체의 가변 영역의 아미노산 서열

항체 명칭	가변 중쇄	가변 경쇄
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)

[0377]

HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HEKF	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HFKA	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HFKB	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HFKC	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HFKD	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HFKE	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HFKF	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HFKG	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HGKA	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HGKB	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HGKC	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HGKD	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)

[0378]

HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KFmut	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HB2KFmut	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HEKAmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA F-Y mut (SEQ ID NO:23)
HEKFmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HAKFmut	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HBKFmut	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HCKFmut	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HDKFmut	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HFKFmut	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HGKFmut	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)

[0379]

RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE 삼중-KA	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE 삼중-KB	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE 삼중-KC	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE 삼중-KD	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE 삼중-KE	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE 삼중-KF	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE 삼중-KG	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE 삼중-KFmut	2E2 RHE 삼중 (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKFmut	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)

[0380]

[0381]

<표 4>

[0382] 2E2 및 인간화 항체 변이체로부터의 HVR의 아미노산 서열

항체쇄	HVR1	HVR2	HVR3
2E2 항체			
중쇄	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMY SEQ ID NO:63
경쇄	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
인간화 중쇄 변이체 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2, 및 2E2 RHB2			
중쇄	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSMY SEQ ID NO:63
인간화 경쇄 변이체 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF, 및 2E2 RKG			
경쇄	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
인간화 중쇄 변이체 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, 및 2E2 RHE 삼중			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMEY SEQ ID NO:67
2E2 RHE E-D	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMDY SEQ ID NO:68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMEV SEQ ID NO:69
2E2 RHE 삼중	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMDV SEQ ID NO:70
인간화 경쇄 변이체 2E2 RKA F-Y 및 2E2 RKF F-Y			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71

[0383]

[0384] <표 5>

[0385] 2E2 및 인간화 항체 변이체로부터의 FR의 아미노산 서열

중쇄	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESGPGGLVA PSQSLSTCTVSGFS LT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGLEW LG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKSQVF LKINSLQTDDTAL YYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:44)
2E2 RHA	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHB	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF SLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGLEW LG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:39)	WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF	WVRQAPGKGLEW VS	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV	WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:45)

[0386]

	SLT (SEQ ID NO:27)	(SEQ ID NO:31)	YYCAR (SEQ ID NO:38)	
2E2 RHD	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW LS (SEQ ID NO:33)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHF	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKNTV YLQMNSLRAEDTA VYYCAR (SEQ ID NO:40)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:41)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLEW G (SEQ ID NO:35)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR (SEQ ID NO:42)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46)
2E2 RHB2	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGF SLT (SEQ ID NO:29)	WVRQPPGKGLEW LG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKNQVS LKLSSVTAADTAV YYCAR (SEQ ID NO:43)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46)
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE 삼중	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:45)

[0387]

	(SEQ ID NO:26)		(SEQ ID NO:38)	
경쇄	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMASASP GEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPKLW IY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEDA ATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKB	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRL WIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGSGT DYTLTISLEPEDF AVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKD	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL WIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKE	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD YTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAPRL LIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD YTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

[0388]

[0389]

클론을 서열 분석하였고, 제조업자의 프로토콜에 따라서 플라스미드 미니프랩 키트 (퀴아젠) 또는 퓨어일드 (PureYield) 플라스미드 맥시프랩 시스템 [프로메가(Promega)]을 이용하여 발현 플라스미드 DNA를 제조하였다. 인간화 또는 키메라 VH 및 VK를 코딩하는 발현 플라스미드 체제를 사용하여, 상기 실시예 1에 기재된 바와 같은 Expi293 세포 (인트로젠)를 형질감염시켰다. 이러한 세포를 무혈청 배지에서 7일 동안 배양하였고, 그 결과 상기 세포로부터 적응용 배지를 수거하였으며 ELISA에 의해 검정하여 항체의 생성을 확증하였다.

[0390]

인간화 VH 및 VK 구축물에 의해 코딩된 항체에 의한 Siglec-8 결합

[0391]

인간화 설계와 관련된 모든 총체적인 문제를 확인하기 위한 시도로 기본 인간화 중쇄 및 경쇄를 그들의 키메라 대응물과 쌍형성하였다. Siglec-8 항원을 사용하여, 실시예 1에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 항체 결합을 측정하였다. 2E2RHB가 키메라 경쇄와 쌍형성을 한 경우에, 이는 RHA 중쇄 보다 더 강력한 것으로 여겨지는 반면, RKB 구축물은 중쇄 키메라 구축물 (cVH)과 연합하여, 상기 쌍형성을 한 양 cVK 구축물 보다 더 높은 효력으로 Siglec-8 항원에 결합하였다. 이들 결과는 중쇄와 경쇄 둘 다에 대한 인간화 설계는 대략 정확하였고 모두

Siglec-8에 결합하였지만, 보다 우수한 결합 특징을 갖는 부가의 인간화 항체를 확인하기 위해서는 추가의 작업이 필요하였다는 사실을 확증시켜 주었다.

[0392] 키메라 대응물과 조합된 완전한 인간화 항체에 의한 Siglec-8 결합

[0393] 완전한 인간화 항체 중쇄 및 경쇄를 합하고, 이를 키메라 항체와 비교하여, 4Å 및 표준 프레임워크 잔기 및 계면 잔기를 대체하는 것이 2E2를 성공적으로 인간화하는 데 충분하였는지를 결정하였다. Expi293 세포를 상이한 인간화 중쇄 백터와 연합된 상이한 인간화 경쇄 백터의 조합물로 공동-형질감염시켰다. Siglec-8 항원을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 항체 결합을 측정하였다. 키메라 대조군과 비교하여 Siglec-8에 대한 이들 항체의 결합은 HBKA와 HBKB가 HAKA와 HAKB 보다 우수한 조합물인 것으로 여겨지는 것으로 나타났다 (표 6).

[0394] 완전한 인간화 항체에 의한 Siglec-8 결합

[0395] 중쇄에서 단일 아미노산 치환의 상대적 중요성을 결정하기 위하여, 인간화 중쇄 RHC (A24V), RHD (V48L), RHE (S49G), RHF (F67L) 및 RHG (T68S)를 모든 경쇄 변이체와 조합하여 발현하였고, 이를 RHA 및 RHB 버전, 및 키메라 항체 대조군과 비교하였다. Siglec-8 ECD에 대한 이들 항체 결합의 결과는, 이들 모든 인간화 항체 조합물이 RHA, RHF 및 RHG 계열 (모든 경쇄 변이체를 수반함)을 제외하고는 동일한 효력으로 Siglec-8에 결합하였다는 사실을 제안하였다 (표 6).

[0396] 그 다음, 단일 아미노산 치환을 수반하면서, 경쇄가 RKA에서 RKB로 변화하는 것이 항체 결합에 영향을 미칠 것 인지를 결정하였다. 키메라 항체 및 RKA 및 RKB 버전과 비교하여, 모든 중쇄 변이체와 경쇄 RKC (V3I), RKD (V48L), RKE (L47W) 및 RKF (E58V)의 조합물로 이루어진 항체의 결합을 평가하였다. 경쇄 변이체가 결합의 패턴에 상당한 영향을 미치는 것으로 보이지는 않았다 (표 6). 또한, 모든 중쇄 변이체와의 조합하여, 경쇄 생식 세포 계열 잔기 F71Y (RKG)의 관련성을 또한 조사하였고, 그 결과, 상기 잔기가 일반적으로, 결합 상의 큰 저하를 유발시킨 것으로 입증되었다.

[0397] HEKA 및 HEKF가 Siglec-8에 대항한 가장 우수한 후보 항체인 것으로 여겨졌다. 따라서, ELISA를 수행하여, 대조군으로서 키메라 항체와 HEKA 및 HEKF 둘 다와 비교하여, 상기 항원에 대한 가장 높은 효력으로 결합된 항체를 재시험하였다. 그 결과는 인간화 중쇄와 인간화 경쇄의 상이한 조합물이, RHA와의 조합물을 제외하고는 Siglec-8과 유사한 방식으로 결합하였다는 것을 표시하였다 (표 6). 그 결과는 HEKA 및 HEKF가 매우 우수한 후보라는 사실을 강조하였고, 이들을 키메라 양성 대조군과 호의적으로 비교하였으며, 프레임워크 내에 최소한의 마우스 잔기를 갖고 있었다.

[0398] 2E2RH 버전 2 및 CDR 돌연변이된 변이체의 생성

[0399] 가장 근접한 생식세포 계열 유전자에 근거하여 후속 인간화 중쇄를 생성하였다. 2E2VH와 가장 유사한 생식세포 계열인 IGHV4-59 생식세포 계열 서열 (도 1)을 사용하여 마우스 CDR의 이식편을 설계하였고, 상기 언급된 다른 구축물과 동일한 방식으로 합성 (진스크립트) 및 제조하여, RHA 및 RHB 쇄의 첫 번째 버전과 비교하기 위한 인간화 항체를 생성하였다. 또한, 상기 항체가 관용될 수 있었는지를 결정하기 위하여, 특정의 CDR3 잔기를 생식 세포 계열로 변화시킨다. 부위-유도 돌연변이 유발에 의해, 3개의 돌연변이를 RHE 변이체 중쇄의 CDR3에 도입하였고 (단일 및 삼중 돌연변이) 1개의 돌연변이를 RKA 및 RKF 경쇄의 CDR3에 도입하였다 (도 3). RHE 돌연변이되거나 또는 RKA/RKF 돌연변이된 것을 함유하는 항체를 발현시키고, 이를 상기 언급된 바와 동일한 방법을 이용하여 상보적 쇄의 완전한 패널과 조합하였다.

[0400] 인간 생식세포 계열 내로 이식된 중쇄 CDR을 다른 중쇄 버전과 비교하였다. 곧바른 이식편 (RHA2)은 상기 항원에의 결합을 완전히 붕괴시켰고, 마우스로 복귀 돌연변이된 4Å/VCI 잔기를 수반한 생식세포 계열 프레임워크 (RHB2)는 첫 번째 RHB 변이체와 매우 유사하게 반응을 보였지만, RHB의 5개와 비교하여 10개의 마우스 잔기를 함유하였다. 결합 데이터는 양 쇄의 CDR3에 도입되는 돌연변이의 영향력을 예시하였고; 중쇄 내의 돌연변이는 Siglec-8에의 결합에 대하여 불리한 영향을 미친 반면, 경쇄 돌연변이 그 자체로는 또한, 많은 개선을 제공하지 못하였지만, 가장 우수한 항체는 중쇄 후보인 RHE 및 RHB (모든 마우스 복귀 돌연변이)를 함유하는 것이었다는 사실을 제안하였다 (표 6).

[0401] <표 6>

[0402] 인간 Siglec-8 ECD에 대한 항체 결합

인간화 항체							
항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)
HAKA	0.058	HCKA	0.056	HEKA	0.112	HGKA	0.061
HAKB	0.071	HCKB	0.065	HEKB	0.057	HGKB	0.134
HAKC	0.066	HCKC	0.058	HEKC	0.065	HGKC	0.065
HAKD	0.058	HCKD	0.049	HEKD	0.070	HGKD	0.047
HAKE	0.052	HCKE	0.059	HEKE	0.205	HGKE	0.116
HAKF	0.062	HCKF	0.050	HEKF	0.097	HGKF	0.088
HAKG	0.189	HCKG	0.273	HEKG	0.302	HGKG	0.254
HBKA	0.070	HDKA	0.067	정제된 ch2E2	0.062	VHVK	0.043
HBKB	0.056	HDKB	0.055			cVHKA	NA
HBKC	0.033	HDKC	0.057			cVHKB	0.027
HBKD	0.039	HDKD	0.048			HAcVK	0.067
HBKE	0.061	HDKE	0.065			HBcVK	0.066
HBKF	0.051	HDKF	0.057			정제된 ch2E2	0.062
HBKG	0.212	HDKG	0.113				
정제된 ch2E2	0.044	정제된 ch2E2	0.062				
인간화 항체							
항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)		
ch2C4	0.057	ch2C4	0.079	ch2C4 T1	0.075		
HFAA	0.106	HAKA	0.085	HA2KA	NA		
HFKB	0.099	HAKF	0.078	HA2KB	124.30		
HFKC	0.063	HBKA	0.055	HB2KA	NA		
HFKD	0.058	HBKF	0.066	HB2KB	0.051		
HFKE	0.104	HA2KF	8.719	ch2C4	0.069		
HFKF	0.118	HB2KF	0.063	HA2KC	0.488		
HFKG	0.355	HEKA	0.068	HA2KD	NA		
		HEKB	0.063	HA2KE	NA		
		HEKC	0.069	HA2KF	NA		

[0403]

		HEKD	0.059	HA2KG	NA		
		HEKE	0.057	HB2KC	0.101		
		HEKF	0.064	HB2KD	0.075		
		HEKF T2	0.064	HB2KE	0.087		
		mo2C4	0.115	HB2KF	0.089		
				HB2KG	0.227		
CDR 인간 항체 변이체							
항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)		
ch2C4	0.052	ch2C4	0.208	ch2C4	0.057		
RHE Y-V KA	0.088	RHE S-GKA	50.620	HAKEFmut	0.086		
RHE Y-V KB	0.306	RHE S-GKB	626.900	HBKEFmut	0.048		
RHE Y-V KC	0.215	RHE S-GKC	173.300	HCKFmut	0.078		
RHE Y-V KD	0.283	RHE S-GKD	8.647	HDKFmut	0.056		
RHE Y-V KE	0.070	RHE S-GKE	NA	HEKEFmut	0.072		
RHE Y-V KF	0.091	RHE S-GKF	3.279	HFKFmut	0.057		
RHE Y-V KG	8.808	RHE S-GKG	33.540	HFKFmut	0.062		
RHE E-D KA	0.388	RHE 삼중-KA	18.640				
RHE E-D KB	0.289	RHE 삼중-KB	NA				
RHE E-D KC	0.516	RHE 삼중-KC	NA				
RHE E-D KD	0.316	RHE 삼중-KD	13.200				
RHE E-D KE	0.364	RHE 삼중-KE	34.060				
RHE E-D KF	0.445	RHE 삼중-KF	NA				
RHE E-D KG	NA	RHE 삼중-KG	NA				
CDR 인간 항체 변이체							
항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)	항체	EC50 (nM)		
ch2C4	0.075	ch2C4	0.075	ch2C4	0.175		
HEKA	0.054	HA2KA	NA	RHE S-G KFmut	207.100		
HEKE	0.042	HA2KB	124.300	RHE 삼중 KFmut	NA		
HEKF	0.074	HA2KFmut	31.610	HEKF	0.052		
RHE Y-V KFmut	0.398	HB2KA	0.051	HEKA	0.064		
RHE E-D KFmut	1.399	HB2KB	0.069				
		HB2KFmut	0.080				

[0404]

[0405] 주: 각 칼럼은 하나의 실험을 나타내고; NA는 입수 가능하지 않음을 표시한다.

[0406]

고온에 대한 인간화 후보 항체의 열 안정성

[0407]

인간화 항체의 열 안정성을 비교하였다. 이 항체를 10분 동안 -20 내지 85℃로 다양한, 보다 고온에 두었고, 실온으로 냉각시킨 다음, 각 후보의 EC80 농도에서 ELISA 검정으로 평가하였다. 리드(lead) 항체 후보는 안정적인 것으로 여겨졌다 (도 4). CDRL3 (즉, 경쇄의 CDR3) 돌연변이된 항체와의 HEKA/KF는 68℃ 하에서 완전히 불활성인 반면, 상기 키메라는 70℃ 하에서 불활성이었는데, 이 온도에서는 리드 후보 HEKA 및 HEKF가 여전히 25 내지 50% 활성이었고, 75℃에서만 완전한 불활성을 나타내었다.

[0408]

인간화 후보 항체 T_m의 결정

[0409]

상기 리드 항체의 용점을 결정하기 위하여, 상기 키메라, HEKA, HEKF, 및 CDRL3 (즉, 경쇄의 CDR3) 돌연변이를 수반한 동일한 인간화 후보를 2-단계 친화 크로마토그래피 및 겔 여과 시스템에서 정제하였고, 열 이동 검정에서 시험하였다. 항체를 2가지 상이한 농도 하에서 형광성 염료 (시프로 오렌지)와 함께 71주기 동안 인큐베이션하였는데, qPCR 열 순환기 내에서 1주기 마다 1℃ 증가시키면서 수행하였다. T_m은 50% 최대 형광에 대한 온도로써 정의되었다. 상기 키메라 및 5개의 인간화 항체에 대한 T_m은 열 안정성 검정에서 수득된 결과를 확증시

켜 주었으며, 가장 안정적인 항체는 시험된 다른 인간화 항체 보다 더 높은 T_m을 갖는 HEKA 및 HEKF였다. HEKA는 키메라 항체 보다 더 높은 T_m을 갖는다 (도 5 및 표 7).

<표 7>

키메라 및 인간화 항체의 T_m

항체	T _m
chVHVK 2uM	71 °C
chVHVK 1uM	71 °C
HEKA 2uM	72 °C
HEKA 1uM	72 °C
HEKF 2uM	70 °C
HEKF 1uM	70 °C
HEKAmut 2uM	68 °C
HEKAmut 1uM	68 °C
HEKFmut 2uM	67 °C
HEKFmut 1uM	68 °C

인간화 후보 항체의 친화도 및 친화력

비아코어 T200을 이용하여 SPR 분석함으로써 항체 친화력 결정을 수행하였다. 마우스, 키메라 및 인간화 항-Siglec-8 항체에 대한 인간 Siglec-8 ECD 단백질의 결합을 비아코어 T100 상에서 측정하였다. 포획 항체 [잭슨 임뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)로부터 입수 가능한 염소-항-인간-Fc 및 염소-항-마우스-Fc]를 제조업자의 프로토콜에 따라서 CM5 칩 상에 고정화시켰다 (비아코어, GE). 유동-세포 1, 2 및 3을 항-인간 항체로 고정화시켰고, 유동 세포 4는 항-마우스 항체로 고정화시켰다. 검정을 25°C 하에 30 μ l/min의 유속으로 수행하였다. 검정 완충액은 초순수 물에서 제조된, 20 mM 트리스-HCl pH 8.3, 150 mM 염화나트륨, 0.05% 폴리소르베이트 20, 10% 글리세롤, 0.1% BSA였다. 이량체성 Siglec-8 (단량체성 및 올리고머성 Siglec-8의 불순물은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 제거하였다)을 15 nM 내지 1.88 pM의 검정 완충액에서 2x 희석으로 희석시켰다. 항체를 포획하여 대략 120 RU로 변화시켰다. 6분 고 성능 주사를 수행한 다음, 120분 해리를 수행하였다. 유동 세포를 50 mM 글리신 pH 1.5로 재생시켰다. 빈 참조 세포 및 다중 검정 완충 주사제를 이용한 결과를 이중 여백으로 두었고, 1:1 포괄적인 맞춤 파라미터를 이용하여 분석하였다.

뮤린 2E2 항체 및 키메라 2E2 항체의 친화력은 각각 28 pM 및 16 pM인 것으로 결정되었다 (표 8). 인간화 항체에 대한 친화력은 HEKA의 경우에는 17 pM이었고 HEKF의 경우에는 21 pM이었으며, 이는 인간화가 상기 결합 활성을 성공적으로 유지하였고 증강시켰다는 것을 표시한다.

<표 8>

마우스, 키메라 및 인간화 항체의 친화력 결정

항체	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (pM)
마우스 2E2	5.56E+05	1.54E-05	28
키메라 2E2	8.51E+05	1.32E-05	16
HEKA	6.38E+05	1.11E-05	17
HEKF	6.78E+05	1.40E-05	21

바이오층 간섭법 (포르테바이오)에 의해 항체 친화도 결정을 또한 수행하였다. 인간 Siglec-8 단백질에 대한

마우스, 키메라 및 인간화 항-Siglec-8 항체 Fab 단편의 결합을 포르테바이오 옥테트 레드 384 상에서 측정하였다. 검정을 검정 완충제 중에서 25℃ 및 1,000의 RPM 하에 수행하였다. 1x 포르테바이오 역학 완충제를 수반한 HBS 완충제는 초순수 물 중의 스톡 용액 (각각 비아코어 BR-10670, 포르테바이오18-132)으로부터 제조하였다. Fab 단편 [항체는 제조업자의 명세서에 따라서 더모-피어스(Thermo-Pierce) 고정화된 파파인으로 분해하였다]를 50 nM 내지 1.56 nM의 검정 완충액에서 2x 희석으로 희석시켰다. Siglec-8-Fc 태그부착된 단백질질을 3분 동안 검정 완충액 중의 100 nM 하에 항-인간-포획 센서 상에 고정화시켜 대략 1.2의 nm 상의 변화를 가져다 주었다. 2분간 해리를 수행한 다음, 10분간 해리를 수행하였다. 빈 참조 AHC 센서를 이용한 결과를 여백으로 두었고, 1:1 포괄적인 맞춤 파라미터를 이용하여 포르테바이오 분석용 소프트웨어에서 분석하였다.

[0420] 듀린 2E2 및 키메라 2E2 Fab 단편의 친화도는 각각 536 pM 및 585 pM인 것으로 결정되었다 (표 9). 인간화 항체에 대한 친화도는 HEKA의 경우에는 464 pM이었으며, HEKF의 경우에는 592 pM이었으며, 이는 인간화가 이들 두 인간화 항체에 대한 결합 활성을 성공적으로 유지하였다는 것을 표시한다. HEKA는 본 검정에서 Siglec-8에 대한 1가 친화도가 마우스 및 키메라 2E2 보다 더 높았다. 인간화 항체 변이체인 HEKAmut 및 HEKFmut에 대한 친화도는 또한, 각각 902 pM 및 1160 pM의 KD를 수반한 피코몰 범위 내였다.

[0421] <표 9>

[0422] 마우스, 키메라 및 인간화 항체의 친화도 결정

항체	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (pM)
마우스 2E2	1.14E+06	6.12E-04	536
키메라 2E2	9.51E+05	5.56E-04	585
HEKA	1.04E+06	4.82E-04	464
HEKF	9.20E+05	5.45E-04	592
HEKAmut	7.26E+05	6.55E-04	902
HEKFmut	4.45E+05	5.16E-04	1160

[0423]

[0424] 인간화 후보 항체의 용해도

[0425] 정제된 키메라 및 후보 항체를, 원심분리용 필터 장치 [아미콘(Amicon) 30K 4 mL, 4000 g 5 min - 첫 번째 농도; 아미콘 울트라 0.5 mL 3K, 14000 g - 그 다음 농도]를 이용하여 순차적으로 농축시켰고, 각 단계에서 그 농도를 측정하였다. 모든 샘플을 침전시키지 않으면서 21 내지 24배 이하 만큼 완전히 농축시켰고, ELISA에 의해 시험하였고, 그 결과 Siglec-8에 대한 결합 효력을 상실한 것은 전혀 없는 것으로 나타났다. 항체는 적어도 25 mg/mL 까지의 농도 하에서는 침전되는 경향이 없었다. 구체적으로 언급하면, ch2E2에 대한 용해도는 적어도 18 mg/mL였고, HEKA에 대한 용해도는 적어도 25 mg/mL였으며, HEKF에 대한 용해도는 적어도 8 mg/mL였고, HEKAmut에 대한 용해도는 적어도 29 mg/mL였으며, HEKFmut에 대한 용해도는 적어도 17 mg/mL였다.

[0426] 인간화 후보 항체의 응집

[0427] 샘플을 분석하기에 앞서 여과시켜 모든 염 또는 단백질 침전물을 제거하였고, 농도를 다시 측정하였다. 이어서, 이를 HPLC 시스템 내의 크기 배제 칼럼 내로 0.4 mL/min으로 주사하였고, 다중-각도 광 산란에 의해 분석하여 절대 몰 질량을 결정하였고 응집에 관하여 검사하였다. 모든 변이체는 응집의 징후를 전혀 나타내지 않았고, 평균 분자량은 134.9 내지 138.2 kDa의 범위였으며, 이는 본 분석에서 IgG 단량체에 대한 예상된 범위였다 (표 10).

[0428] 모든 샘플은 단분산되었다 ($M_w/M_n < 1.05$). 그러나, 분포 분석 플롯은 글리코실화 변이체 (ch2C4, HEKA 및 HEKFmut)가 존재한다는 것을 보여주었다. 분포 분석 플롯은 또한, 모든 샘플 내에 약 105 내지 120 kDa 종이 존재한다는 것을 보여주는데, 이는 봉해된 항체 또는 저 글리코실화 변이체였을 수도 있다. 질량 회수율은 82.9 내지 102.8%였으며 (주사된 질량 상에서 계산된 질량), 이는 우수한 단백질 회수율을 표시하였고, 상기 샘플은 칼럼에 부착되는 것으로 간주되지 않거나 또는 불용성 응집체를 함유하는 것으로 간주되지 않았으며, 이는 보호 칼럼에 의해 유지될 수 있을 것이다. 전반적으로 상기 데이터는 분석된 항-Siglec-8 항체 샘플 중 어느 것에서도 유의적 응집이 없었다는 것을 표시하였다 (표 10).

[0429] <표 10>

[0430] 키메라 및 인간화 변이체 항체의 응집 분석

	MW (kDa)	불확실성	다분산성 (Mw/Mn)	불확실성	계산된 질량 (μg)	질량 분획 (%)	질량 회수율 (%)
ch2C4	138.7	0.80%	1.01	1.10%	11.02	100	96.6
ch2C4	134.6	0.80%	1.017	1.10%	10.86	100	95.2
평균	136.6		1.013		10.94	100	95.9
% 표준편차	2.1		0.445		0.11	0	1
HEKA	134	0.90%	1.03	1.30%	15	100	102.8
HEKA	135.9	0.90%	1.01	1.30%	14.4	100	98.6
평균	134.9		1.02		14.7	100	100.7
% 표준편차	1		0.014		0.43	0	2.9
HEKA Mut	135.4	0.80%	1.013	1.10%	13.61	100	98.8
HEKA Mut	137.3	0.90%	1.011	1.30%	13.68	100	99.3
평균	136.3		1.012		13.65	100	99
% 표준편차	1.3		0.001		0.05	0	0.4
HEKF	291	13.90%	1.742	14.40%	4.83	100	88.1
HEKF	138.2	0.80%	1.01	1.10%	4.54	100	82.9
평균	214.6		1.376		4.69	100	85.5
% 표준편차	50.3		37.622		4.31	0	4.3

[0431]

[0432] 인간화 후보 항체의 동결 용해 안정성

[0433] 정제된 키메라 ch2C4 항체, 인간화 HEKA 및 HEKF 항체, 및 인간화 HEKAmut 및 HEKFmut 항체 변이체를 60분 동안 -20℃ 하에 놓아두고, 실온으로 해동시킨 다음, 각 후보에 대한 EC80 농도에서 ELISA 검정에 사용하였다. HEKA는 이러한 검정에서 가장 높은 안정성을 나타내었다 (도 6).

[0434] 비-푸코실화 항체의 ADCC 활성

[0435] 재료

[0436] RBC 용해 완충제 (10X RBC 용해 완충제): 제조업자 [이바이오사이언스(eBioscience), 00-4300-54]에 의해 지시된 바와 같이 1 X로 희석시킨다.

[0437] PBS: Ca^{2+}/Mg^{2+} 를 수반하지 않는 DPBS [하이클론(Hyclone), SH30028.02].

[0438] 완전 RPMI: 10% FBS를 수반한 멸균성 여과된 RPMI-1640 (인트로젠).

[0439] 96-웰 U-바닥 판 [팔콘(Falcon), 353077].

[0440] LDH 검정: 시토크스(CytoTox) 96 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가, G1780).

[0441] FIX 완충제: PBS 중의 1 내지 4% 파라포름알데히드. PBS [일렉트론 마이크로스코피 디아툼(Electron Microscopy Diatom), 50-980-488]에서 희석시킴으로써 16% 파라포름알데히드 (EM 등급, 메탄올-무함유)로부터 제조한다.

[0442] 방법

[0443] 호산구에 대한 항-Siglec-8 항체의 ADCC 및 아포토시스 활성을 시험하기 위하여, 신선한 말초 혈액 백혈구 (PBL)를 키메라 및 마우스 2E2 항체와 함께 인큐베이션하였다. 저-푸코스 키메라 2E2 IgG1 항체는 호산구의 가장 강력한 사멸을 나타냈고, 푸코실화 키메라 2E2 IgG1 보다 상당히 더 높은 효력을 지니고 있었으며, 이는 상기 항체의 저-푸코스 형태에 대한 보다 높은 ADCC 활성과 일치한다 (도 7).

[0444] 전체 말초 혈액 백혈구 내에서의 항-Siglec-8 항체 활성을 평가하기 위하여, 채취한지 24시간 이내에 수집된 공여자 혈액으로부터 표준 방법에 의해 PBL을 수득하고, 이를 완전 RPMI 배지에 재현탁시켰다. 세포를 계수하고, 완전 RPMI 배지에서 10×10^6 개/mL가 되도록 조정하며, 멸균성 96-웰 U-바닥 판에 $100 \mu\text{L}$ /웰로 도말하였다. 항-Siglec-8 항체를 0.0001 ng/mL 내지 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 가한다. 판을 1분 동안 200 g으로 원심분리시키고, >4시간 동안 5% CO_2 하에 가습 37℃ 인큐베이터에서 인큐베이션한다. 세포 집단을 유동 세포계수법에 의해 평

가하여, 예를 들어 표 11에 제시된 시약을 이용하여 호산구 및 호염기구의 고갈을 평가하고, 유동 세포계수법에 의해 평가한다. CCR3-양성, CD16-음성 과립상 (고 사이드-스캐터) 세포의 제거를 이용하여 호산구의 고갈을 탐지할 수 있다. 예를 들어, CCR3-양성 저 사이드-스캐터 세포를 분석함으로써, 호염기구 계수치를 결정할 수 있다.

<표 11>

시약

표적	포맷	클론	표적종	숙주	이소형	판매사	카탈로그 번호
7AAD	7AAD	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559925
아넥신 V	PE	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559763
CD117	APC	A3C6E2	인간	마우스	IgG ₁	밀테나이	130-091-733
CD16	FITC	3G8	인간	마우스	IgG ₁	BD	555406
CD193 (CCR3)	알렉사 플루오르® 647	5E8	인간	마우스	IgG _{2b}	BD	558208
CDw125 (IL-5Rα)	PE	A14	인간	마우스	IgG ₁	BD	555902
절단된 PARP	알렉사 플루오르® 647	F21-852	인간	마우스	IgG ₁	BD	558710
FCεR1α	FITC	AER-37 CRA1	인간	마우스	IgG _{2b}	밀테나이	130-095-978
이소형 IgG ₁	PE	MOPC-21	N/A	마우스	IgG ₁	BD	555749
이소형 IgG _{2b}	FITC	27-35	N/A	마우스	IgG _{2b}	BD	555742
이소형 IgG _{2b}	APC	eBMG2b	N/A	마우스	IgG _{2b}	이바이오사이언스	17-4732

정제된 호산구에서 아포토시스를 유도시킬 수 있는 항-Siglec-8 항체의 능력을 평가하기 위하여, 혈액 샘플 또는 등가의 혈액 생성물로부터 채취한지 24시간 이내에 수집한 신선한 연막을 사용한다. 호산구의 정제는 제조업자의 지시에 따라서 수행한다 (밀테나이 호산구 단리용 키트, 130-092-010). 정제된 호산구를 완전 RPMI 배지에서 1×10^6 개/mL로 재현탁시키고, IL-5 (약 1 ng/mL 내지 약 50 ng/mL의 농도 하)의 존재 또는 부재 하에 밤새 배양한다. 그 다음날, 판 또는 플라스크를 반복해서 세척함으로써, 배양된 호산구를 수거한다. 세포를 10분 미만 동안 200 내지 400 g으로 원심분리시키고, 완전 RPMI 배지에서 1×10^6 개/mL로 재현탁시킨다. 호산구를 멸균성 96-웰 U-바닥 판에 100 μL/웰로 도말한다. 완전 RPMI 배지에서 제조된 100 μL의 2X 시약을 각 웰에 가하고, 상기 언급된 바와 같이 희석물을 제조한다. 상기 판을 1분 동안 200 g로 원심분리시키고, ≥4시간 동안 5% CO₂ 하에 가습 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션한다. 아넥신-V 염색을 제조업자의 지시에 따라서 수행하고, 아포토시스 및 괴사성 세포를 유동 세포계수법에 의해 분석한다.

단리된 비만 세포에 대한 항-Siglec-8 항체의 ADCC 및 아포토시스 활성을 평가하기 위하여, 인간 비만 세포는 공개된 프로토콜에 따라서 인간 조직으로부터 단리되거나 (문헌 [Guhl et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75:382-384]; [Kulka et al., *In Current Protocols in Immunology*, 2001, (John Wiley & Sons, Inc.)]) 또는 예를 들어, 문헌 ([Yokoi et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2008, 121:499-505])에 기재된 바와 같이, 인간 조혈 줄기 세포로부터 분화된다. 정제된 비만 세포를 멸균성 96-웰 U-바닥 판 내의 완전 RPMI 배지에서 1×10^6 개/mL로 재현탁시키고, 0.0001 ng/ml 내지 10 μg/ml의 범위의 농도 하에 30분 동안 항-Siglec-8 항체의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션한다. 샘플을 정제된 자연 킬러 (NK) 세포 또는 신선한 PBL을 수반하고 및 수반하지 않으면서 4 내지 16시간 더 인큐베이션하여 ADCC를 유도시킨다. 아포토시스 또는 ADCC에 의한 세포-사멸을, 형광성 접합된 항체를 이용하여 유동 세포계수법에 의해 분석하여, 비만 세포 (CD117 및 FcεR1)를 탐지하고, 아넥신-V 및 7AAD를 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포 또는 죽어가는 세포를 판별한다. 아넥신-V 및 7AAD 염색은 제조업자의 지시에 따라서 수행한다.

[0450] 시험관 내에서 인간화 항체의 호산구-고갈 활성의 평가

[0451] 인간화 항체를 대상으로 하여, 무린 2E2 항체와 비교하여 시험관 내에서 정상 인간 혈액으로부터의 호산구의 Siglec-8 매개된 고갈을 유도시킬 수 있는 능력에 관하여 평가하였다.

[0452] 채취한지 24시간 이내에 수집한 인간 공여자 혈액으로부터의 말초 혈액 백혈구 (PBL)를 완전 RPMI 배지 [10% 소 태아 혈청을 보충시킨 RPMI-1640 배지 (인트로젠, 카탈로그 번호 A10491-01)]에 재현탁시켰다. 세포를, 50 ng/ml 재조합 인간 IL-5 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 205-IL-025)를 보충시킨 완전 RPMI 배지에서 1 mL당 10^7 개가 되도록 조정하였고, 멸균성 96-웰 U-바닥 판에 100 μ L/웰로 도말하였다. 항-Siglec-8 항체를 0.1 pg/mL 내지 10 μ g/mL의 범위 (즉, 1 pg/mL, 10 pg/mL, 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 및 10 μ g/mL)의 농도로 가하여, 50% 최대 호산구 고갈을 제공하는 농도 (EC₅₀) 및 용량 반응을 결정하였다. 판을 1분 동안 200 g으로 원심분리시키고, 16시간 동안 5% CO₂ 하에 가습 37°C 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. PBL을 항-Siglec-8 항체와 함께 16시간 동안 IL-5의 존재 하에 인큐베이션하면, 호산구가 Siglec-8-매개된 아포토시스에 감작되었다. 세포 집단을 유동 세포계수법에 의해 평가하여 호산구의 고갈을 평가하였다. 호산구 고갈은 CCR3-양성 과립성 (고 사이드-스캐터) 세포를 제거함으로써 탐지하였다.

[0453] HEKAmut IgG1 항체를 제외한, 시험된 인간화 항체 각각은 인간 호산구의 고갈에 대하여 마우스 2E2 항체와 비교하여 등가의 또는 증가된 효력 (즉, 더 낮은 EC₅₀)을 나타내었다 (표 12). 인간 호산구의 고갈에 대한 항체 효력은 이소형에 의존적이지 않았으며, 이는 HEKA IgG1 항체와 HEKA IgG4 항체가 유사한 효력을 나타냈기 때문이다.

[0454] <표 12>

[0455] 시험관 내에서 호산구를 고갈시키기 위한 인간화 항-Siglec-8 항체의 효력

항체	이소형	호산구 고갈에 대한 평균 EC ₅₀ (ng/ml)
2E2	IgG1	6.8
HEKA	IgG1	4.3
HEKA	IgG4	3.9
HEKAmut	IgG1	43.3
HEKF	IgG1	6.7
HEKFmut	IgG1	6.9

[0456]

[0457] 평균 EC₅₀은 2가지 독립적인 검정으로부터 호산구 고갈에 요구되는 평균 절반-최대 항체 농도를 표시한다.

[0458] 활성 이소형을 수반한 항-Siglec-8 항체는 시험관내 및 생체내에서 인간 비만 세포의 ADCC-매개된 사멸을 유도할 수 있다.

[0459] 강력한 Fc-수용체 매개된 ADCC 활성을 지닌 인간화 항-Siglec-8 항체를 생성하기 위하여, 푸코실 트랜스페라제-8이 결핍된 CHO 세포주 [론자(Lonza), 포텔리전트(Potelligent) CHOK1SV 세포]로부터 HEKA IgG1 항체를 발현시켜, α 1,6 푸코스가 결여된 탄수화물을 수반한 항체 (즉, 비-푸코실화 항체)를 생성하였다. HEKA IgG1 항체와 상이한, Siglec-8의 세포의 영역을 인식하는 무린 IgG2a 이소형을 수반한 무린 모노클로날 항-Siglec-8 항체 (즉, 1C3 항체)를 실시예 3에 기재된 바와 같이 생성하였다. 키메라 1H10 항체는 마우스 모노클로날 항체 1H10의 V-영역 및 인간 IgG1 카파 불변 영역을 함유한다. 10 μ M 키프넨신의 존재 하에 배양된 인간 293TS 세포주로부터 키메라 1H10 항체를 발현시켜 저 푸코스 항체를 생성시키고, 이를 단백질 A 친화 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0460] 인간 비만 세포에 대항하여 NK-세포-매개된 ADCC 활성을 유도시킬 수 있는 비-푸코실화 HEKA IgG1 및 키메라 1H10 저-푸코스 항체의 능력을 시험관 내에서 평가하였다. 인간 조혈 줄기 세포가 생착된 면역결핍성 NSGS 마우스의 복강을 세척함으로써 1차 인간 비만 세포를 단리하였다. 비만 세포를 48시간 동안 10 μ g/ml의 비-푸코실화 HEKA IgG1 항체, 키메라 1H10 저-푸코스 항체, HEKA IgG4 항체 또는 이소형 대조군 인간 IgG1 항체와 함께 인큐베이션하였고, 10.75:1의 이펙터 대 표적 세포 (E:T) 비로 정제된 인간 CD56⁺CD16⁺ NK 이펙터 세포와 함께 인큐베이션하였다. 시토크스 96 세포독성 검정용 키트 (프로메가, 카탈로그 번호 G1780)를 이용하여 LDH 방출에 의해 ADCC 활성을 결정하였다. 비-푸코실화 HEKA IgG1 항체 및 키메라 1H10 저-푸코스 항체는 48시간 후에

인간 비만 세포의 현저한 ADCC-매개된 사멸을 유도하였다 (도 8A). 비-푸코실화 또는 저 푸코스 항-Siglec-8 항체에 의해 유도된 LDH 방출은 용해 용액 (프로메가, 카탈로그 번호 G1821)을 이용하여 유도된 최대 LDH 방출의 38 내지 53%였다.

[0461] 생체 내에서 Siglec-8-양성 비만 세포를 고갈시킬 수 있는 항-Siglec-8 항체의 능력은 인간 Siglec-8이 비만 세포, 호산구 및 호염기구의 표면 상에서 선택적으로 발현되는 트랜스제닉 마우스 모델에서 평가하였다. 마우스에게 100 μ g의 HEKA IgG4 항체, HEKA IgG1 비-푸코실화 인간화 항체, 뮤린 1C3 항체 (뮤린 IgG2a 이소형) 또는 인간 IgG1 이소형 대조군 항체를 복강내 주사함으로써, 마우스를 2회 처리하였다. 이러한 두 번의 복강내 주사는 48시간 간격으로 투여하였고, 두 번째 주사한지 48시간 후에 복막을 세척함으로써 복막 비만 세포를 분리하였다. 비-푸코실화 HEKA IgG1 항체 및 뮤린 1C3 항체 투여로 인해, 복막 비만 세포가 상당히 고갈되었다. 이와는 달리, HEKA IgG4 항체는 상당한 비만 세포 고갈을 나타내지 않았으며, 이는 비만 세포를 생체내 고갈시키기 위해서는 활성 이소형이 요구된다는 사실을 표시한다 (도 8B). 이들 결과는 Siglec-8의 세포외 도메인의 상이한 영역에 대하여 유도된 활성 이소형, 즉 뮤린 IgG2a 이소형 또는 인간 IgG1 비-푸코실화 이소형을 수반한 2가지 상이한 항-Siglec-8 항체가 생체 내에서 Siglec-8-양성 비만 세포를 고갈시킬 수 있다는 사실을 입증해준다.

[0462] 이들 결과는, Siglec-8이 신속하게 내재화되므로 ADCC 활성을 유도시키는 데 적합하지 않은 것으로 보고되었기 때문에 예상치 못한 것이었다 (문헌 [O'Reilly et al., *Trends Pharmacol Sci.*, 2009, 30(5):240-248] 참조).

[0463] 인간화 항-Siglec-8은 생체 내에서 인간 비만 세포에 의해 매개된 IgE-유도된 수동 피부 아나필락시스 반응을 억제한다

[0464] 인간 조혈 줄기 세포 (HSC)를 생착시킨 후 대량의 인간 비만 세포를 생성할 수 있는 면역결핍성 마우스가 보고되었다 (Tanaka et al., *J Immunol.*, 2012, 188(12):6145-55). NSGS로 지명된 마우스 계통 [더 잭슨 라보라토리즈(The Jackson Laboratory)]은 IL-2 수용체 감마-쇄 유전자가 결실된 비-비만 당뇨병/중증 복합 면역결핍증 (NOD SCID) 마우스의 유도체이다 (NSG 마우스). NSGS 마우스는 부가적으로, 인간 조혈 줄기 세포로의 생착을 촉진시키기 위한 3개의 인간 시토카인 (줄기 세포 인자 [SCF], IL-3, 및 GM-CSF)에 대해 트랜스제닉이다. NSGS 마우스의 생착시, 인간 CD34⁺ 세포는 인간 호산구를 생성하고 수많은 인간 비만 세포를 증강시켰다. 생착된 NSGS 마우스 내에서의 양 세포 유형은 인간 말초 혈액 및 조직으로부터 분리된 상응하는 세포 유형 상에서의 수준과 거의 동등한 수준으로 Siglec-8을 발현한다. 따라서, 이들 마우스는 생체 내에서 인간 세포에 대한 항-Siglec-8 항체의 활성을 평가하기 위한 매력적인 모델을 제공한다.

[0465] 생체 내에서 비만 세포 활성화에 대한 항-Siglec-8 항체의 효과를 평가하기 위하여, IgE-매개된 귀 팽윤 모델을 인간화 NSGS 마우스에서 정립시켰다. 이러한 모델에서는, 합텐-접합된 소 혈청 알부민 (NP-BSA)을 전신 주사하기 24시간 전에 한쪽 귀에 특이적 모노클로날 항-합텐 IgE (항-NP IgE)를 주사함으로써, 수동 피부 아나필락시스 (PCA)인 유형 I 과민증 반응을 유도시켰다. 인간 앵실론 불변 영역을 수반한 키메라 항-NP IgE를 이용하여, 합텐에 대한 인간 비만-세포 특이적 반응이 반드시 생성되도록 하였고, 즉시형 반응과 후기 상 부종 반응을 귀 두께 상의 변화에 의해 측정하였다.

[0466] 본 검정을 수행하기 8주 내지 12주 전에 NSGS 마우스에게 인간 CD34⁺ HSC를 생착시켰다. 인간 불변 영역을 수반한 키메라 모노클로날 항-NP IgE를 100 ng의 용량으로 마우스의 오른쪽 귀 내로 피내 주사하여 인간 피부 비만 세포를 감작시켰지만, 마우스 피부 비만 세포는 그렇지 않았으며, PBS를 왼쪽 귀 내로 피내 주사하였다. 24시간 후에, 0.5 mg NP-BSA를 정맥내 주사함으로써 PCA를 유도시켰다. 감작시키기 24시간 전에 또는 항-NP IgE로 감작시킨지 2시간 후에, 0.1 mg 항-Siglec-8 항체 (즉, HEKA IgG4 항체) 또는 인간 IgG4 이소형 대조군 항체를 상기 마우스에게 정맥내 주사하였다. 유도 후 4시간 이하의 시점 및 유도 후 24시간째에 귀 두께를 측정하여, 초기 상 및 후기 상 귀 팽윤 반응을 각각 결정하였다.

[0467] HEKA IgG4 항체는 상기 PCA 생체내 모델에서 초기 상 피부 알레르기 반응과 후기 상 피부 알레르기 반응 둘 다를 방지하거나 억제하였다 (도 9). 이 모델에서, 초기 상 반응은 비만-세포 탈과립화 및 히스타민 방출에 의존적인 반면, 후기 상 반응은 새로이 합성된 매개인자 (시토카인 포함)의 비만 세포 분비 뿐만 아니라 호산구 및 호염기구 침윤에 의존적이다. HEKA IgG4 항체는 또한, 감작시키기 24시간 전에 또는 항-NP IgE로 감작시킨지 2시간 후에 투여된 경우에, 인간화 NSGS 마우스에서 PCA 반응을 방지하거나 억제하였다 (도 9). 이들 실험 과정 동안에는 항체 처리에 따른 불리한 효과가 전혀 관찰되지 않았다.

[0468] 실시예 3: 뮤린 항-Siglec-8 항체의 생성 및 성상 확인.

[0469] Siglec-8의 세포외 영역은 3개의 이뮤노글로불린-유사 도메인으로 구성된다: 리간드에 결합하는 독특한 N-말단 V-세트 도메인 (도메인 1)에 이어 2개의 C-세트 도메인 (도메인 2 및 3). 항체 1C3은 인간 Siglec-8의 재조합 세포외 도메인 (서열식별번호: 74)에 대항하여 생성된 IgG2a 중쇄 및 카파 경쇄를 수반한 뮤린 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체 1H10 및 4F11은 인간 Siglec-8의 재조합 세포외 도메인 (서열식별번호: 74)에 대항하여 생성된 뮤린 IgG1 중쇄 및 카파 경쇄 항체이다 (표 13 참조). 이들 항체는 인간으로부터의 재조합 Siglec-8 서열 (서열식별번호: 74) 및 비-인간 영장류로부터의 재조합 Siglec-8 서열 (서열식별번호: 118)에 결합한 항체에 대한 하이브리도마 스크린으로부터 확인하였다.

[0470] <표 13>

[0471] 뮤린 1C3, 1H10, 및 4F11 항체로부터의 HVR의 아미노산 서열

항체	쇄	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	중쇄	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGSYTYYSDSVKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFAY SEQ ID NO:94
1H10	중쇄	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAPKFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILDY SEQ ID NO:95
4F11	중쇄	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNYNGKFKG SEQ ID NO:93	LGPYGPFPAD SEQ ID NO:96
1C3	경쇄	SASSSVSYMH SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
1H10	경쇄	RASQDITNYLN SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
4F11	경쇄	SASSSVSYMY SEQ ID NO:99	DTSSLAS SEQ ID NO:102	QQWNSDPYT SEQ ID NO:105

[0472]

[0473] 항-Siglec-8 항체에 대한 에피토프를 포함하는 영역을 확인하기 위하여, 인간 Ig-Fc와 융합된 Siglec-8 세포외 도메인 각각을 함유하는 융합 단백질을 CHO 세포로부터 발현 및 정제하였다. 인간 도메인 1을 함유하는 융합 단백질 (서열식별번호: 115), 도메인 1 및 2를 함유하는 융합 단백질 (서열식별번호: 116); 또는 도메인 1, 2, 및 3을 함유하는 융합 단백질 (서열식별번호: 117)을, 항체 결합을 결정하기 위하여 ELISA 검정에 사용하였다. 일부 실험에서는, 인간 Siglec-8에 대한 항체의 특이성을, 올리브 개코 원숭이 (파피오 아누비스) (미국 국립 생명공학 정보 센터 참조 서열 XP_009193370.1)로부터의 Siglec-8의 세포외 도메인 1, 2, 및 3을 함유하는 융합 단백질 (서열식별번호: 118)과 비교하여 평가하였다.

[0474] 항체 결합 검정을 위하여, ELISA 판 [맥시소르프(MaxiSorp); 눈크(Nunc)]을 4℃ 하에 밤새 0.2 µg/ml의 융합 단백질로 코팅하였고, 실온 하에 1시간 동안 PBS 중의 2% BSA로 차단시켰다. 항체를 1 µg/ml로 가하고, 판을 실온 하에 2시간 동안 인큐베이션하였다. 판을 세척한 후, 서양고추냉이 페록시다제 접합된 2차 항체를 가하고, 판을 1시간 동안 인큐베이션하였다. 2차 항체는 인간화 항체의 경우에는, 항-인간 H+L HRP (잭슨 임뮤노리서치, 카탈로그 번호 709-035-149)였거나 또는 마우스 항체의 경우에는, 항-마우스 H+L HRP (잭슨 임뮤노리서치, 카탈로그 번호 715-035-151)였다. 상기 판을 TMB 기질 (시그마, 카탈로그 번호 T0440-1L)로 현상하였다.

[0475] 뮤린 2E2 항체와 HEKA IgG1 항체는 도메인 1 융합 단백질에 결합하였으며, 이는 이들 두 항체에 대한 에피토프가 N-말단 리간드-결합 도메인 내에 있다는 것을 표시한다 (표 14). 이와는 달리, 뮤린 1C3 항체는 도메인 1 및 도메인 2 융합 단백질에 결합하였지만, 도메인 1 융합 단백질에 대한 검출 가능한 결합을 명확히 보여주지 못하였으며, 이는 상기 항체에 대한 에피토프가 도메인 2 내에 있다는 것을 표시한다 (표 14).

[0476] <표 14>

[0477] 인간 Siglec-8 내의 에피토프에 대한 항-Siglec-8 항체의 결합

항체	도메인 1-Fc (SEQ ID NO:115)	도메인 1+2-Fc (SEQ ID NO:116)	도메인 1+2+3-Fc (SEQ ID NO:117)	에피토프 도메인
2E2	+	+	+	1
HEKA	+	+	+	1
1C3	-	+	+	2

[0478]

[0479] 뮤린 4F11 및 1H10 항체는 인간 Siglec-8; 및 올리브 개코 원숭이 (파피오 아누비스) (미국 국립 생명공학 정보 센터 참조 서열 XP_009193370.1)로부터의 예상된 Siglec-8 단백질 서열에 결합하였다. 도메인 융합 단백질의 ELISA 스크린 내에서 및 환원된 SDS-PAGE 겔의 웨스턴 블롯 상에서, 4F11은 인간 Siglec-8 도메인 1 내의 선형 에피토프를 인식하였고, 1H10은 인간 Siglec-8 도메인 3 내의 서열을 포함한 선형 에피토프를 인식하였다. 1C3은 인간 Siglec-8 도메인 2 내의 변성된 서열은 인식하지 못하였으며, 이는 이것이 입체 형태적 에피토프를 인식하였다는 것을 표시한다. 항체 4F11 및 1H10은 50 ng/ml IL-5의 존재 하에 인간 말초 혈액 백혈구로부터의 호산구를 강력하게 고갈시키는 것으로 밝혀졌으며, 각각 5.9 및 41 ng/ml의 EC₅₀을 나타낸다 (표 15). 인간 Siglec-8에 대해 특이적인 뮤린 1C3 항체 및 뮤린 2E2 항체는 개코 원숭이 Siglec-8과 교차 반응하지 못하였다.

[0480] <표 15>

[0481] 인간 또는 개코 원숭이 Siglec-8 내의 에피토프에 대한 항-Siglec-8 항체의 결합, 및 인간 호산구에 대한 상기 항체의 고갈 활성

항체	인간 Siglec-8 도메인 내의 에피토프	선형 에피토프 (환원된 SDS-PAGE)	개코 원숭이 교차 반응성 (ELISA)	호산구 사멸에 대한 평균 EC ₅₀ (ng/ml) (2명 공여자)
4F11	1	+	+	5.9
1H10	3	+	+	41
1C3	2	-	-	7.7
2E2	1	+	-	6.9

[0482]

[0483] 평균 EC₅₀은 2가지 독립적인 검정으로부터의 호산구 고갈에 요구되는 평균 절반-최대 항체 농도를 표시한다.

[0484] 인간 및 개코 원숭이 호산구에 대한 항체의 결합은 유동 세포계수법에 의해 결정하였다. 인간 또는 개코 원숭이 말초 혈액 백혈구 제제를 포화 량의 항-Siglec-8 모노클로날 항체 2E2, 1C3, 및 1H10 또는 마우스 IgG1 이소형 대조군 항체로 표시시켰다. 항-Siglec-8 항체를 2차 항-마우스 IgG H+L 알렉사플루오르(AlexaFluor) 647에 의해 가시화하였다. 고 입상도 스캐터와 함께, CD49d 및 CD16에 대한 영장류 교차-반응성 모노클로날 항체를 이용하여 호산구를 확인하였다. 뮤린 1H10 항체는 개코 원숭이 및 인간 호산구에 결합한 반면, 마우스 2E2 및 1C3 항체는 인간 호산구에 결합하였지만, 개코 원숭이 호산구와는 교차 반응하지 못하였다 (도 10). 이들 결과는, 인간 Siglec-8에 결합하는 다른 모노클로날 마우스 항-Siglec-8 항체가 비-인간 영장류 Siglec-8을 인식하지 않는 것으로 밝혀졌기 때문에 예상치 못한 것이었다 (문헌 [Hudson et al., *J. Clin. Immunol.*, 2011, 31(6):1045-53] 참조).

[0485] 서열

[0486] 마우스 2E2 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열

QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNY
NSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTTDALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGTSTV
VSS

[0487]

[0488] (서열식별번호: 1)

- [0489] 2E2 RHA 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0490]
- [0491] (서열식별번호: 2)
- [0492] 2E2 RHB 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0493]
- [0494] (서열식별번호: 3)
- [0495] 2E2 RHC 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0496]
- [0497] (서열식별번호: 4)
- [0498] 2E2 RHD 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0499]
- [0500] (서열식별번호: 5)
- [0501] 2E2 RHE 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
TVTVSS
- [0502]
- [0503] (서열식별번호: 6)
- [0504] 2E2 RHF 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRLTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0505]
- [0506] (서열식별번호: 7)
- [0507] 2E2 RHG 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
VTVSS
- [0508]
- [0509] (서열식별번호: 8)

- [0510] 2E2 RHA2 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYN
SALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGLVTV
SS
- [0511]
- [0512] (서열식별번호: 9)
- [0513] 2E2 RHB2 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGL
VTVSS
- [0514]
- [0515] (서열식별번호: 10)
- [0516] 2E2 RHE S-G 돌연변이체 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYWGQGT
TVTVSS
- [0517]
- [0518] (서열식별번호: 11)
- [0519] 2E2 RHE E-D 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM DYWGQGT
TVTVSS
- [0520]
- [0521] (서열식별번호: 12)
- [0522] 2E2 RHE Y-V 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EVWGQGT
TVTVSS
- [0523]
- [0524] (서열식별번호: 13)
- [0525] 2E2 RHE 삼중 돌연변이체 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVWGQG
TTVTVSS
- [0526]
- [0527] (서열식별번호: 14)
- [0528] 마우스 2E2 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK
- [0529]
- [0530] (서열식별번호: 15)

- [0531] 2E2 RKA 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0532] (서열식별번호: 16)
- [0533] 2E2 RKB 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGVPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0534] (서열식별번호: 17)
- [0535] 2E2 RKC 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0536] (서열식별번호: 18)
- [0537] 2E2 RKD 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0538] (서열식별번호: 19)
- [0539] 2E2 RKE 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0540] (서열식별번호: 20)
- [0541] 2E2 RKF 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0542] (서열식별번호: 21)
- [0543] 2E2 RKG 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0544] (서열식별번호: 22)
- [0545] 2E2 RKA F-Y 돌연변이체 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK
- [0546] (서열식별번호: 23)

- [0555] 2E2 RKF F-Y 돌연변이체 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK
- [0556]
- [0557] (서열식별번호: 24)
- [0558] HEKA IgG1 중쇄 및 HEKF IgG1 중쇄의 아미노산 서열
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0559]
- [0560] (서열식별번호: 75)
- [0561] HEKA 카파 경쇄의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0562]
- [0563] (서열식별번호: 76)
- [0564] HEKF 카파 경쇄의 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSVMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0565]
- [0566] (서열식별번호: 77)
- [0567] IgG1 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0568]
- [0569] (서열식별번호: 78)

- [0570] IgG4 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열 (IgG4는 S228P 돌연변이를 함유한다)
- ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
- [0571]
- [0572] (서열식별번호: 79)
- [0573] Ig 카파 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열
- RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0574]
- [0575] (서열식별번호: 80)
- [0576] 뮤린 2C4 및 2E2 IgG1 중쇄의 아미노산 서열
- QVQLKRAAGPGLVAPSSQSLITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYSMEYWGQGTSTV
TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPA
VLESDLYTLSSSVTVPPSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS
VFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA
KDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSN
WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG
- [0577]
- [0578] (서열식별번호: 81)
- [0579] 뮤린 2C4 카파 경쇄의 아미노산 서열
- EIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVVPRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVISIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
- [0580]
- [0581] (서열식별번호: 82)
- [0582] 뮤린 2E2 카파 경쇄의 아미노산 서열
- QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSVMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVVPRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVISIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
- [0583]
- [0584] (서열식별번호: 83)

[0585] 키메라 2C4 및 2E2 IgG1 중쇄의 아미노산 서열

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGT
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0586]

[0587] (서열식별번호: 84)

[0588] 키메라 2C4 카파 경쇄의 아미노산 서열

EIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVS YMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0589]

[0590] (서열식별번호: 85)

[0591] 키메라 2E2 카파 경쇄의 아미노산 서열

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVS YMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0592]

[0593] (서열식별번호: 86)

[0594] HEKA IgG4 중쇄의 아미노산 서열 (IgG4는 S228P 돌연변이를 함유한다)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0595]

[0596] (서열식별번호: 87)

[0597] 마우스 1C3 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (밑줄친 잔기는 코티아 넘버링에 따르는 CDR H1 및 H2를 포함한다)

EVQVVESGGDLVKSGGSLKLSCAASGFPFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVAIISSGGSYTY
YSDSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHETAQA AWFAYWGQGLTV
TVSA

[0598]

- [0599] (서열식별번호: 106)
- [0600] 마우스 1H10 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (밑줄친 잔기는 코티아 넘버링에 따르는 CDR H1 및 H2를 포함한다)
- EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYMYWVKQRPEQGLEWIGRIAPEDGDT
EYAPKFQ GKATVTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWGQGTT
LTVSS
- [0601]
- [0602] (서열식별번호: 107)
- [0603] 마우스 4F11 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 (밑줄친 잔기는 코티아 넘버링에 따르는 CDR H1 및 H2를 포함한다)
- QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFRSSWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDDY
TNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLGPYPGFADWGQGTTLVT
VSA
- [0604]
- [0605] (서열식별번호: 108)
- [0606] 마우스 1C3 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAYGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK
- [0607]
- [0608] (서열식별번호: 109)
- [0609] 마우스 1H10 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK
- [0610]
- [0611] (서열식별번호: 110)
- [0612] 마우스 4F11 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열
- QIVLTQSPAIVSAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLIYDTSSLASGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRIESEDAANYCQQWNSDPYTFGGGTKLEIK
- [0613]
- [0614] (서열식별번호: 111)
- [0615] 인간 Siglec-8 도메인 1의 아미노산 서열
- MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRP
- [0616]
- [0617] (서열식별번호: 112)
- [0618] 인간 Siglec-8 도메인 2의 아미노산 서열
- DILILGTLESGHSRNLTCSPWACKQGTPPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLTPKPQDH
GTSLTCQVTLP GTGVTTTSTVRLDVS
- [0619]
- [0620] (서열식별번호: 113)

- [0621] 인간 Siglec-8 도메인 3의 아미노산 서열
- YPPWNLMTVTFQGDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTL
CPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLA
AVGG
- [0622]
- [0623] (서열식별번호: 114)
- [0624] 인간 Siglec-8 도메인 1 융합 단백질의 아미노산 서열
- MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPIEGRSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0625]
- [0626] (서열식별번호: 115)
- [0627] 인간 Siglec-8 도메인 1 및 2 융합 단백질의 아미노산 서열
- MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTPPMI
SWIGASVSSPGPTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSIEGRSD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0628]
- [0629] (서열식별번호: 116)
- [0630] 인간 Siglec-8 도메인 1, 2, 및 3 융합 단백질의 아미노산 서열
- MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTPPMI
SWIGASVSSPGPTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWN
LTMTVTFQGDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSS
NPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIE
GRSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0631]
- [0632] (서열식별번호: 117)

[0633] 개코 원숭이 Siglec-8 도메인 1, 2, 및 3 융합 단백질의 아미노산 서열

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPKDDWTYSDPVHGYWFRAGDR
 PYQEAPVATNNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
 MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLESQHPRNLTCVSPWACEQRMPPM
 ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLIPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWN
 LTVTVFQGDDTASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
 NPGLLELLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTAAVGGIE
 GRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0634]

[0635] (서열식별번호: 118)

[0636] 개코 원숭이 Siglec-8 도메인 1, 2, 및 3의 아미노산 서열

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPKDDWTYSDPVHGYWFRAGDR
 PYQEAPVATNNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
 MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLESQHPRNLTCVSPWACEQRMPPM
 ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLIPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWN
 LTVTVFQGDDTASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
 NPGLLELLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTAAVGG

[0637]

[0638] (서열식별번호: 119)

도면

도면1

카바트 넘버링	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110				
	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----															
정규	11.1.....1.....2.....2.....1.....															
버니어	***..... ^{AA} ^{AA}*.....*															
인터페이스	1.....1.....1.....1.....1.....1.....1.....1.....1.....															
4A외의 관계	* ^{AA}	****	***	^{AA}	^{AA}	^{AA} ***	****	*								
인간 M2E2 VH	-QVQJESGGLVAPSSSLILCTVSGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
배선 PM AP41521	-EIKVESGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[ETVM--WQAPGGL[EWQJLIG---SASIVYASVKGPFITISNSEQWYIQQNSLRAEDHAYVCAH[EDWVYG-----HDMWQGTIVYSS															
X92218 VH3-66	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGG[TVSSVMS--WQAPGGL[EWQJLITS---GSSIVYASVKGPFITISQNS[ETJTIQQNSLRAEDHAYVCAH															
2E2 RHA	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHB	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHC	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHD	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHE	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHF	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHG	-E[QMSGGGLVQPGGSLILSCAAGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
IGHV-59 FM	-QVQJESGGLVAPSSSLILCTVSGGSL[ETVY--HJAPGGL[EWQJLITS---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHA2	-QVQJESGGLVAPSSSLILCTVSGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															
2E2 RHE2	-QVQJESGGLVAPSSSLILCTVSGGSL[EGAH--WQAPGGL[EWQJLHA---GSSINWGAJMSLISONSQVPIKINSQJDDHALVCAH[GSSEPYTS-----HBJWQGTIVYSS															

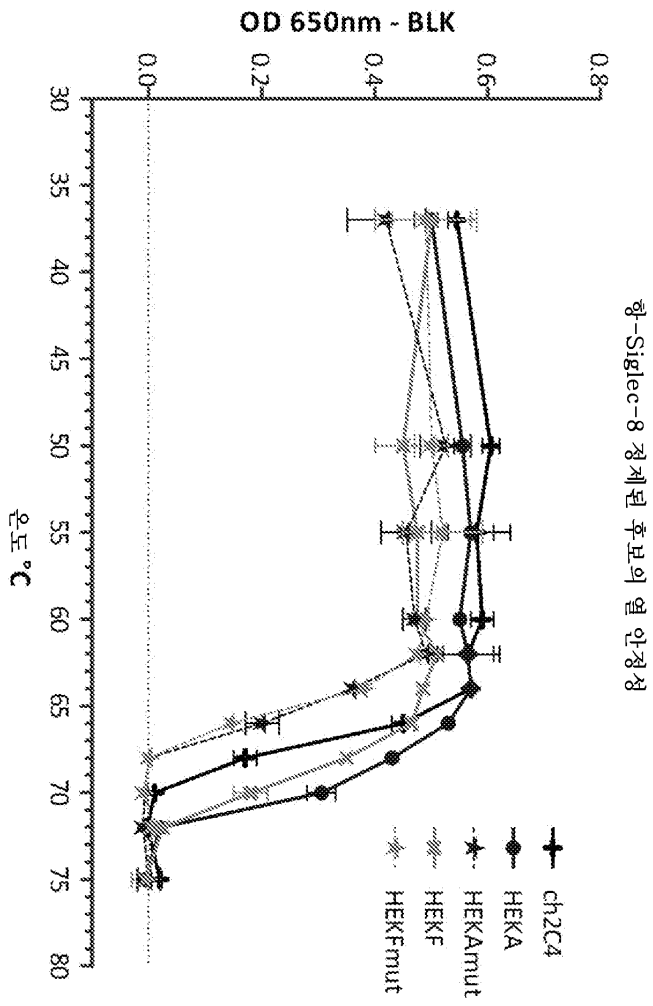
도면2

[illegible]

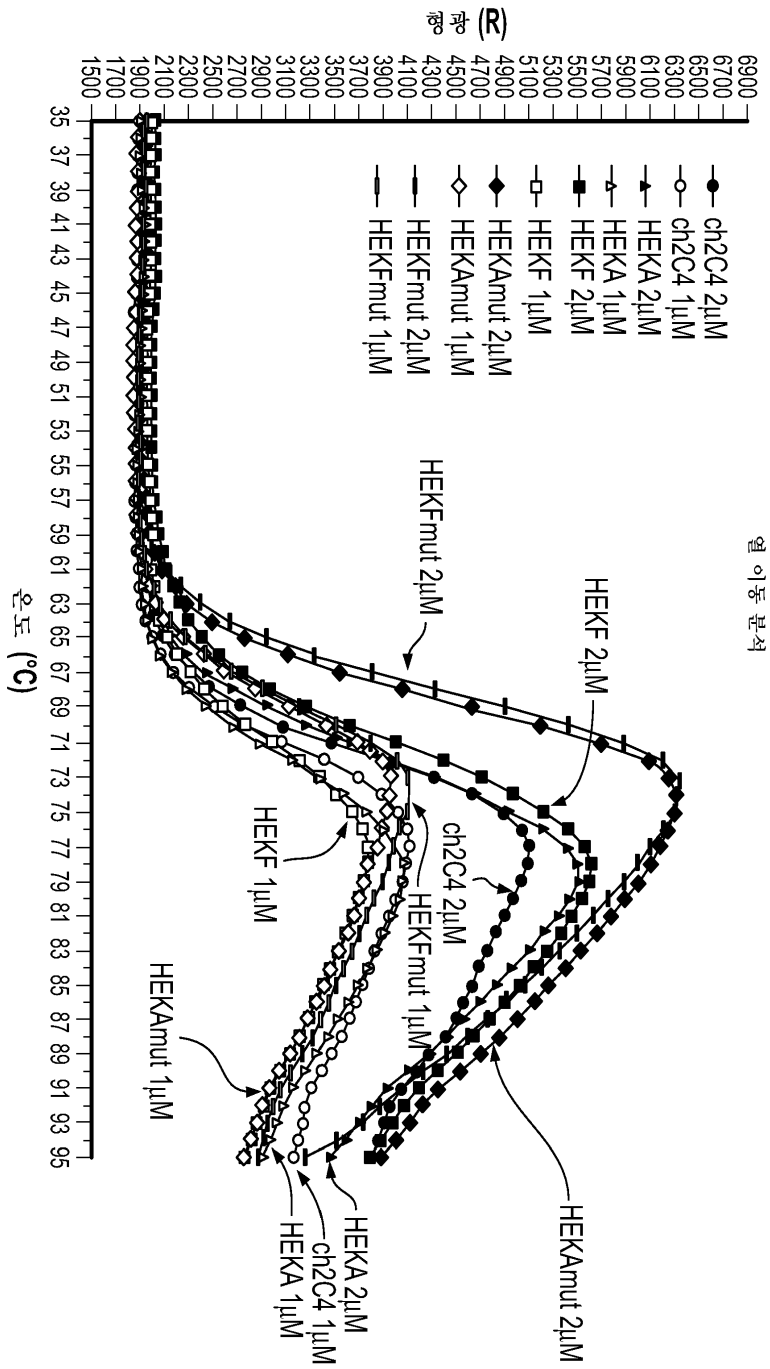
도면3

카바트 넘버링	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----A-										
2E2 RKA	EIVLTQSPATLSISPGKRLTISQNT-----SSSYWMEHQKPKQAPRLLLPTSNLA3IPAPSGSGSDPTLTISLPEEDPAVYVQDQSSSYV-----TLPQGTAKDI-K										
2E2 RKT	EIVLTQSPATLSISPGKRLTISQNT-----SSSYWMEHQKPKQAPRLLLPTSNLA3IPAPSGSGSDPTLTISLPEEDPAVYVQDQSSSYV-----TLPQGTAKDI-K										
2E2 RKA F-Y mut	EIVLTQSPATLSISPGKRLTISQNT-----SSSYWMEHQKPKQAPRLLLPTSNLA3IPAPSGSGSDPTLTISLPEEDPAVYVQDQSSSYV-----TLPQGTAKDI-K										
2E2 RKT F-Y mut	EIVLTQSPATLSISPGKRLTISQNT-----SSSYWMEHQKPKQAPRLLLPTSNLA3IPAPSGSGSDPTLTISLPEEDPAVYVQDQSSSYV-----TLPQGTAKDI-K										
카바트 넘버링	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----A-										
2E2 RKA	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										
2E2 RHE	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										
2E2 RHE S-G mut	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										
2E2 RHE E-D mut	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										
2E2 RHE Y-Y mut	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										
2E2 RHE 삼중 mut	+++ -WQDTESSGGSLVDPSSSLALSCHASGSLITIGAH--WVQAPKPKGLMWQITIA---GGSTINVSALMSPRTISQNSKQIVYQWNSLRADDTAVYCAFDQSSPYYS-----MEWQGTIVVSS										

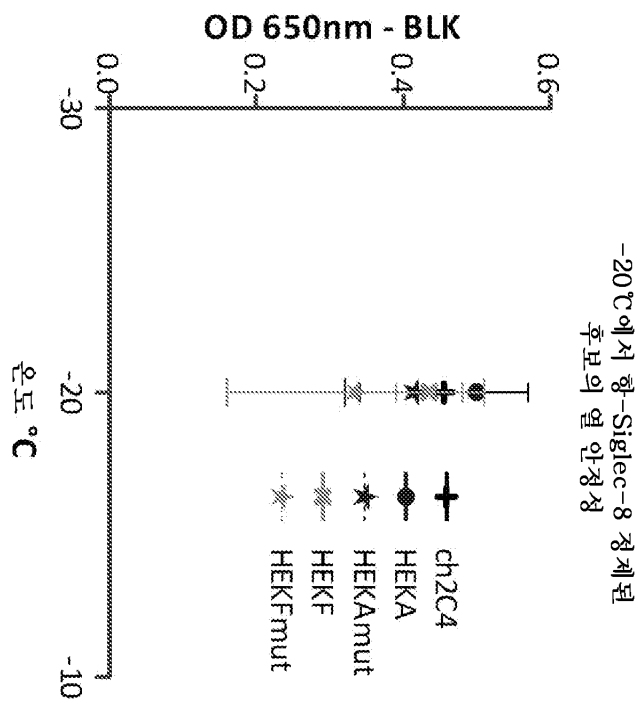
도면4



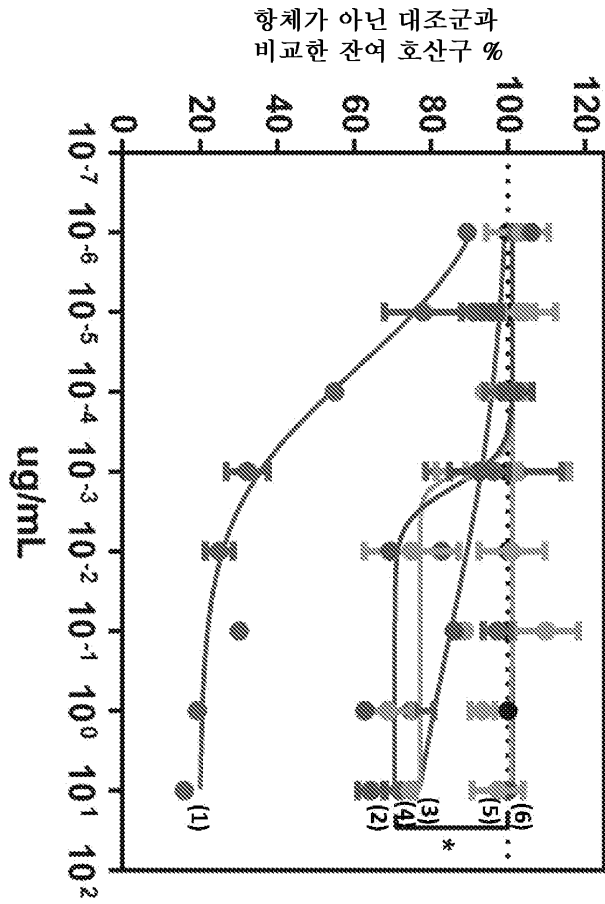
도면5



도면6



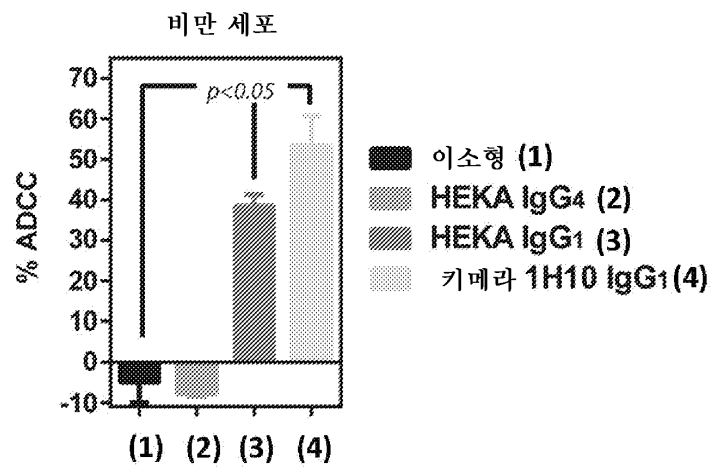
도면7



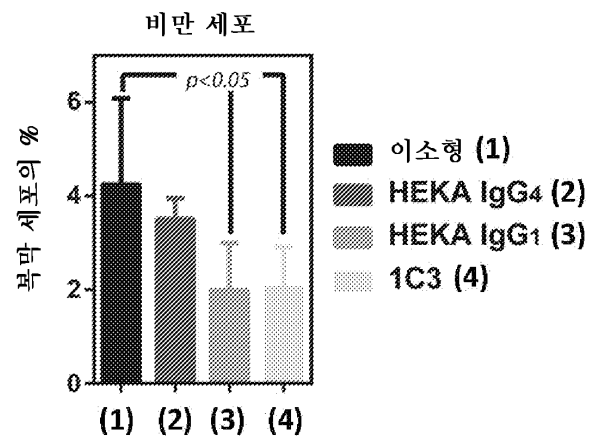
- (1) 저-푸코스 키메라 2E2 IgG1
- (2) 푸코실화 키메라 2E2 IgG1
- (3) 키메라 2E2 IgG4
- (4) 마우스 2E2 IgG1
- (5) 이소형 대조군 IgG1
- (6) 항체가 아님

도면8

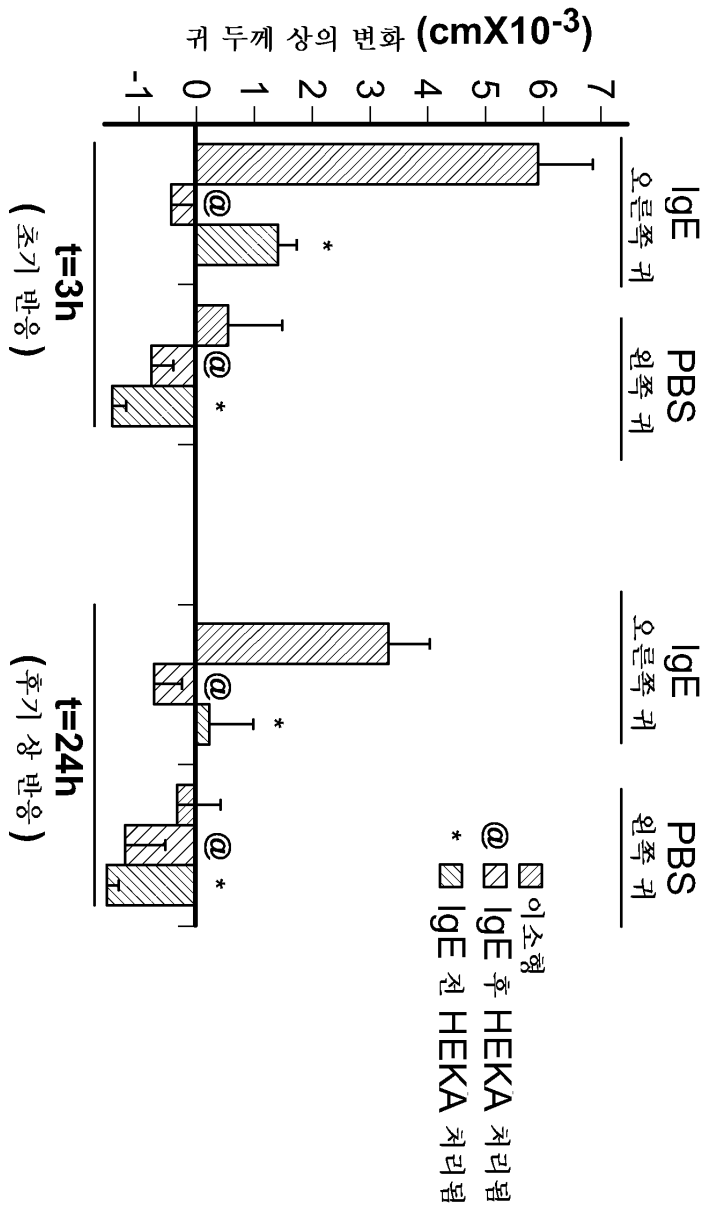
8A



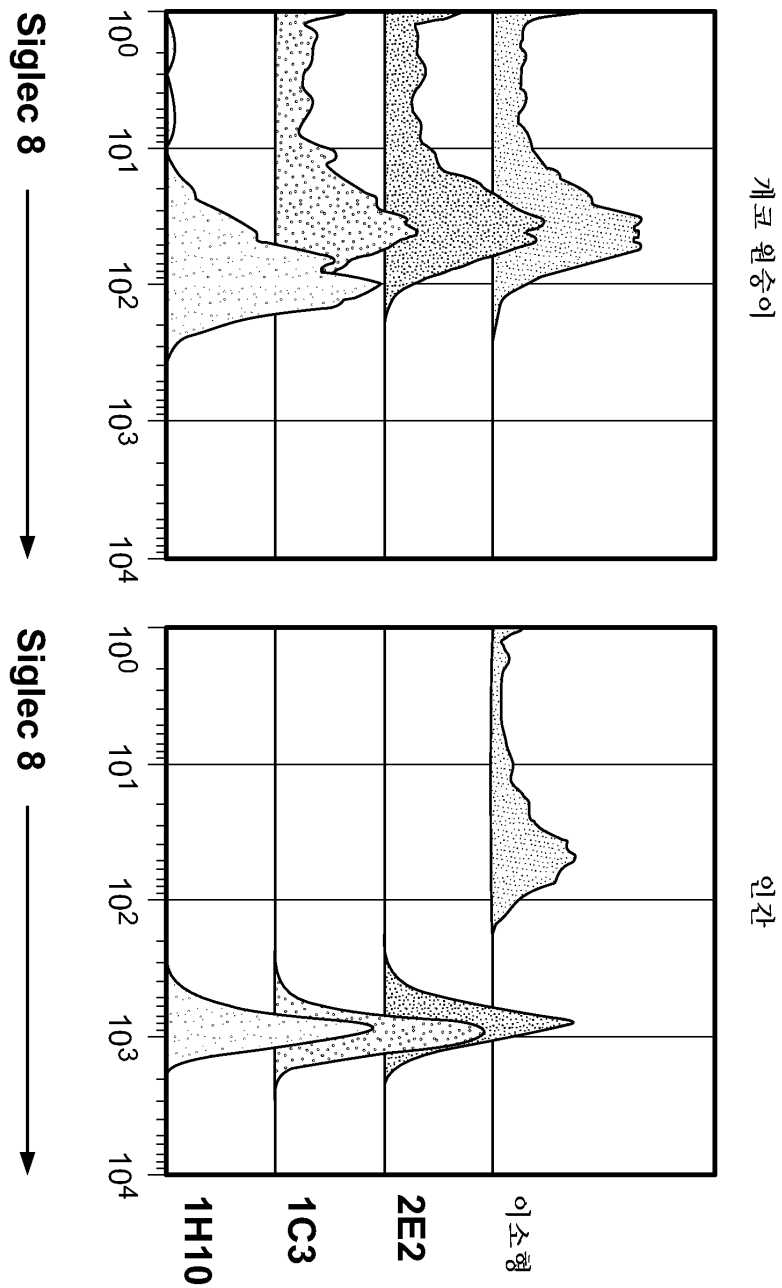
8B



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BEBBINGTON, CHRISTOPHER ROBERT

FALAHATI, RUSTOM

SOUSA FERNANDES, CAROLINA RITA

MATTHEWS, DAVID JOHN

TOMASEVIC, NENAD

WILLIAMS, JASON

LEUNG, JOHN

<120> ANTI-SIGLEC-8 ANTIBODIES AND METHODS OF
USE THEREOF

<130> 701712000140

<150> US 61/913,891

<151> 2013-12-09

<160> 124

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

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

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

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

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

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 Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ile Tyr			
20	25	30	
Gly Ala His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu			
35	40	45	
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met			
50	55	60	

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

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

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

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

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

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

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

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

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

1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu
Thr	Cys	Thr	Val
Ser	Gly	Gly	Ser
Ile	Ser	Ile	Tyr
20	25	30	

Gly Ala His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

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

1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ile Tyr
20 25 30

Gly Ala His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100

105

110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

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

1

5

10

15

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

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

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

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

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

65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

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

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

Gly Ala His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

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

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

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

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

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

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95
Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105
<210> 17
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 17
Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35 40 45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95
Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105
<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 18
Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

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

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

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

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

100 105

<210> 25

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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 Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr

20 25 30

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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> 39

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 23

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys

20

<210> 48

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 55

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 58

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ile Tyr Gly Ala His

1 5

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser

1 5 10 15

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5
 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5
 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Glu Tyr

1 5 10
 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5 10
 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Val

1 5 10
 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 72

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln

50 55 60

Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn

65 70 75 80

Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser

85 90 95

Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser

100 105 110

Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu

115 120 125

Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His

130 135 140

Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr

145 150 155 160

Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro

165 170 175

Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp

180 185 190

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

195 200 205

Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu

245 250 255

Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg

260 265 270

Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu

275 280 285

Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg

290 295 300

Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Phe

340 345 350

Cys Ile Ile Phe Ile Ile Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg

355 360 365

Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Met Glu Asp Ala Lys Ala Ile

370 375 380

Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu Ser Trp Lys Asp Gly

385 390 395 400
Asn Pro Leu Lys Lys Pro Pro Pro Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly Glu

 405 410 415
Glu Gly Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Ser Phe His Lys Val Lys Pro

 420 425 430
Gln Asp Pro Gln Gly Gln Glu Ala Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Glu Ile

 435 440 445
Lys Ile His Lys Arg Glu Thr Ala Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Asn

 450 455 460
His Asn Pro Ser Ser Lys Glu Val Arg Gly

465 470

<210> 73

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln

 50 55 60

Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn

65 70 75 80

Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser

 85 90 95

Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser

 100 105 110

Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu

115	120	125	
Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His			
130	135	140	
Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr			
145	150	155	160
Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro			
165	170	175	
Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp			
180	185	190	
His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val			
195	200	205	
Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn			
210	215	220	
Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Ala Thr Ala Ser Thr Ala Leu			
225	230	235	240
Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu			
245	250	255	
Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg			
260	265	270	
Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu			
275	280	285	
Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg			
290	295	300	
Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
305	310	315	320
Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr Ser Arg Pro Val Ser Gln Val Thr Leu			
325	330	335	
Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Phe			
340	345	350	
Cys Ile Ile Phe Ile Ile Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg			
355	360	365	

Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Met Glu Asp Ala Lys Ala Ile

370

375

380

Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu Ser Trp Lys Asp Gly

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

Gln Asp Pro Gln Gly Gln Glu Ala Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Glu Ile

435

440

445

Lys Ile His Lys Arg Glu Thr Ala Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Asn

450

455

460

His Asn Pro Ser Ser Lys Glu Val Arg Gly

465

470

<210> 74

<211> 573

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln

50

55

60

Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn

65

70

75

80

Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser

85

90

95

Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser
 100 105 110
 Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu
 115 120 125
 Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His
 130 135 140
 Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr
 145 150 155 160
 Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro
 165 170 175
 Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp
 180 185 190
 His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val
 195 200 205
 Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn
 210 215 220
 Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Ala Thr Ala Ser Thr Ala Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu
 245 250 255
 Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg
 260 265 270
 Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg
 290 295 300
 Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr Ser Arg Pro Val Ser Gln Val Thr Leu
 325 330 335
 Ala Ala Val Gly Gly Ile Glu Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

340 345 350
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 355 360 365
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 370 375 380
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 385 390 395 400
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

405 410 415
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 420 425 430
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 435 440 445
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 450 455 460
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

465 470 475 480
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 485 490 495
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 500 505 510
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 515 520 525
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

530 535 540
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 545 550 555 560
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 75

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 75

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

<210> 76

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400>

```

76
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20          25          30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35          40          45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
          195         200         205
Asn Arg Gly Glu Cys

```

210

<210> 77

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 78
<211> 329
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 78
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

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

260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 79

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

50

55

60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305					310						315					320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly											
					325											
<210> 80																
<211> 107																
<212> PRT																
<213> Homo sapiens																
<400> 80																
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
1				5				10						15		
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
			20					25					30			
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
			35					40					45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
	50					55					60					
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
65				70						75					80	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
			85						90					95		
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
			100					105								
<210> 81																
<211> 444																
<212> PRT																
<213> Mus musculus																
<400> 81																
Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Arg	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	
1				5				10						15		
Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile	
			20					25					30			
Tyr	Gly	Ala	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
			35					40					45			

Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro

180 185 190

Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly

210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln

275 280 285

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

290 295 300
 Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg

 305 310 315 320
 Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

 325 330 335
 Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro

 340 345 350
 Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr

 355 360 365
 Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln

 370 375 380
 Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
 385 390 395 400
 Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu

 405 410 415
 Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn

 420 425 430
 His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly

 435 440
 <210> 82
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 82
 Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

 35 40 45

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

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

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

 Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
 180 185 190
 Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
 195 200 205
 Arg Asn Glu Cys
 210
 <210> 83
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 83
 Gln Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp Ala Ala Pro Thr
100 105 110
Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
115 120 125
Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
130 135 140
Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
145 150 155 160
Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
165 170 175
Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
180 185 190
Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
195 200 205
Arg Asn Glu Cys

210

<210> 84

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 84

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

Tyr Gly Ala His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu
 50 55 60
 Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 435 440 445
 Pro Gly
 450
 <210> 85
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 85
 Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

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

 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 86
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct
 <400> 86

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

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

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

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

195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 87

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 87

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 88

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 89

Asp Tyr Tyr Met Tyr

1 5

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

Ser Ser Trp Met Asn

1 5

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 91

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

1 5 10 15

Gly

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Arg Ile Ala Pro Glu Asp Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

His Glu Thr Ala Gln Ala Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

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

1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Phe Ala Asp

1 5

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 97

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 98

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 99

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Tyr

1 5

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 101

Phe Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 102

Asp Thr Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 104

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 105

Gln Gln Trp Asn Ser Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210> 106

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Ser Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Glu Thr Ala Gln Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

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

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Ala Pro Glu Asp Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 108

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Phe Ala Asp Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 109

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

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

1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 110

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 110

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 111

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

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

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

<210> 112

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg
85 90 95

Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
100 105 110

Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys
115 120 125

Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro
130 135 140

<210>

113

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Ser Arg Asn Leu
1 5 10 15

Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr Pro Pro Met Ile
20 25 30

Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro Thr Thr Ala Arg
35 40 45

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

50 55 60

Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Ser
65 70 75 80

Thr Val Arg Leu Asp Val Ser
85

<210> 114

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Tyr Pro Pro Trp Asn Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Ala Thr
 1 5 10 15
 Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly
 20 25 30
 Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg
 35 40 45
 Leu Ser Trp Thr Arg Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser
 50 55 60
 Asn Pro Gly Leu Leu Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly
 65 70 75 80
 Glu Phe Thr Cys Arg Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser
 85 90 95
 Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr Ser Arg Pro Val
 100 105 110
 Ser Gln Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly
 115 120
 <210> 115
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 115
 Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly
 35 40 45
 Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala
 50 55 60
 Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
 65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

340 345 350
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

355 360 365
Leu Ser Pro Gly Lys

370

<210> 116

<211> 460

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly

35 40 45

Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala

50 55 60

Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe

65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro Asp Ile Leu

130 135 140

Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser

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

 210 215 220
 Leu Asp Val Ser Ile Glu Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 225 230 235 240
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 245 250 255
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 260 265 270
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

 275 280 285
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 290 295 300
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 305 310 315 320
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 325 330 335
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

 340 345 350
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 355 360 365
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 370 375 380
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

435 440 445

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

450 455 460

<210> 117

<211> 582

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly

35 40 45

Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala

50 55 60

Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe

65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro Asp Ile Leu

130 135 140

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

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

 260 265 270
 Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro
 275 280 285
 Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu Glu Leu Pro Arg Val His Val
 290 295 300
 Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser
 305 310 315 320
 Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr

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

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

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

 515 520 525
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 530 535 540
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
545 550 555 560
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575
Ser Leu Ser Pro Gly Lys

580

<210> 118

<211> 582

<212> PRT

<213> Papio spp.

<400> 118

Met Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
1 5 10 15

Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Pro Lys Asp Asp Trp Thr Tyr Ser Asp Pro Val His Gly
 35 40 45
 Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Glu Ala Pro Val Ala
 50 55 60
 Thr Asn Asn Pro Asp Thr Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
 65 70 75 80
 Gln Leu Leu Gly Asp Arg Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Asn
 85 90 95
 Asp Ala Arg Lys Gly Asp Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
 100 105 110
 Gly Arg Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Ala Lys
 115 120 125
 Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr Gln Arg Pro Asp Ile Leu
 130 135 140
 Ile Gln Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Arg Met Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile
 165 170 175
 Gly Thr Ser Val Ser Ser Leu Gly Pro Ile Thr Ala Arg Phe Ser Val
 180 185 190
 Leu Thr Leu Ile Pro Lys Pro Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys
 195 200 205
 Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Arg Thr Val Gln
 210 215 220
 Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn Leu Thr Val Thr Val Phe Gln
 225 230 235 240
 Gly Asp Asp Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser
 245 250 255
 Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asp Ser Asn

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

 305 310 315 320
 Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr
 325 330 335
 Ala Arg Pro Val Ser Glu Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly Ile Glu
 340 345 350
 Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

 370 375 380
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 385 390 395 400
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 405 410 415
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 420 425 430
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

 435 440 445
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 450 455 460
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 465 470 475 480
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 485 490 495
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

 500 505 510

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
515 520 525

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
530 535 540

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
545 550 555 560

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
565 570 575

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 119

<211> 350

<212> PRT

<213> Papio spp.

<400> 119

Met Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
1 5 10 15

Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
20 25 30

Phe Ser Tyr Pro Lys Asp Asp Trp Thr Tyr Ser Asp Pro Val His Gly
35 40 45

Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Glu Ala Pro Val Ala
50 55 60

Thr Asn Asn Pro Asp Thr Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
65 70 75 80

Gln Leu Leu Gly Asp Arg Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Asp Ala Arg Lys Gly Asp Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
100 105 110

Gly Arg Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Ala Lys
115 120 125

Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr Gln Arg Pro Asp Ile Leu

130 135 140
 Ile Gln Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Arg Met Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile

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

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

 290 295 300
 Lys Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Gln Ala Glu Asn Pro Arg Gly Ser
 305 310 315 320
 Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr
 325 330 335
 Ala Arg Pro Val Ser Glu Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly
 340 345 350

 <210> 120
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 120

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

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

<210> 121

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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 Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg

<210> 122

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

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

Arg

 $\langle 210 \rangle$ 123

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 123

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Arg Ser Asn Trp Leu Ile
 85 90 95

Ala Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 124

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95