



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0068942
(43) 공개일자 2015년06월22일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/42</i> (2006.01) <i>A61K 47/48</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 16/28</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/395</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0078850(분할)
 (22) 출원일자 2015년06월03일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2013-0018955
 원출원일자 2013년02월22일
 심사청구일자 2013년02월22일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020120019221 2012년02월24일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 (주)알테오젠
 대전광역시 유성구 유성대로 1662, 305호 (전민동, 대전바이오벤처타운)</p> <p>(72) 발명자
 박순재
 대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 604동 1002호 (하기동, 송림마을6단지아파트)</p> <p>정혜신
 대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 604동 1002호 (하기동, 송림마을6단지아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 이처영, 장제환</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **시스테인 잔기를 포함하는 모티프가 결합된 변형항체, 상기 변형항체를 포함하는 변형항체-약물 접합체 및 그 제조방법**

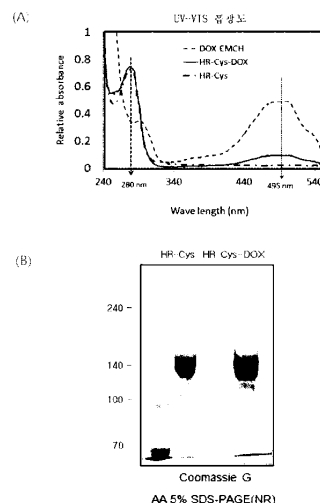
(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함한 아미노산 또는 펩티드로 이루어진 모티프(motif)가 모항체의 말단, 특히 중쇄 말단에 결합된 항체, 그러한 항체와 약물이 결합된 변형항체-약물 접합체(mADC, Antibody-Drug Conjugate) 및 상기 항체 또는 변형항체-약물 접합체의 제조방법에 대한 것이다.

본 발명에 따른 변형항체-약물 접합체(mADC, Antibody-Drug Conjugate)는 접합체에 포함된 항체의 항원에 대한 높은 특이성으로 인해 타겟 세포에 약물을 정확하게 전달할 수 있어, 치료효과를 높일 수 있으며, 또한 높은 효과에도 불구하고 독성으로 인해 사용이 제한적인 약물, 특히 항암제 등의 활용도를 제고할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 변형항체-약물 접합체를 이용한 질병, 특히 암의 치료용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 47/48 (2013.01)

A61K 47/48369 (2013.01)

(72) 발명자

권선훈

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 312동 1301호
(방이동, 올림픽선수촌아파트)

이선배

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 510동 403호 (전
민동, 엑스포아파트)

유선아

대전광역시 유성구 배울1로 147, 204동 702호 (용
산동, 대덕테크노밸리2차푸르지오2단지)

김용모

전전라북도 정읍시 하신경9길 14-21, 105동 1004호
(상동, 현대1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10040057

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 지식경제 기술혁신사업 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 항체-약물 접합체 기술을 이용한 허셉틴 바이오베터 의약품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)알테오젠

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

모항체의 말단에 하기 구조식 (1)로 표시되는 시스테인 잔기를 포함하는 모티프가 결합된 것을 특징으로 하는 변형항체로,

$Xa-(M_{Cys})_n-Xb_n$ 구조식 (1)

상기 구조식 (1)에서, $(M_{Cys})_n$ 는 시스테인 잔기를 포함하는 금속 이온 결합 모티프를 의미하고, Xa 및 Xb_n 는 서로 독립적으로 시스테인을 제외한 아미노산 잔기 0개 내지 20개로 구성된 펩티드를 의미하며, n은 1 내지 20의 정수를 의미하고,

상기 금속 이온 결합 모티프는 C-Q-C-Q-C-A-C 모티프, 막 단백질 ATP 분해 효소의 Ser-Pro-Cys 모티프, 또는 원형 구조를 가지는 금속이온 결합 펩타이드 모티프인 것을 특징으로 하는 변형항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 구조식 (1)로 표시되는 시스테인 잔기를 포함하는 모티프가 모항체의 중쇄 말단에 결합된 것을 특징으로 하는 변형항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 구조식 (1)로 표시되는 시스테인 잔기를 포함하는 모티프가 모항체의 중쇄 C-말단에 결합된 것을 특징으로 하는 변형항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 모항체는 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간 항체 및 인간화 항체로부터 하나 또는 둘 이상 선택하는 것을 특징으로 하는 변형항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 모항체는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로부터 선택되는 하나 이상의 것인 변형항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 모항체는 암 특이 항원, 세포 표면 수용체 단백질, 세포 표면 단백질, 막횡단 단백질, 신호전달 단백질, 세포생존 조절인자, 세포 증식 조절인자, 조직 발달 또는 분화와 연관된 분자, 림포카인, 사이토카인, 세포 주기 조절에 관련된 분자, 혈관형성에 관련된 분자, 또는 혈관신생에 관련된 분자에 대한 결합능과 특이성을 갖는 것을 특징으로 하는 변형항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 변형항체에 약물이 결합된 변형항체-약물 접합체로서, 상기 모항체에 결합된 구조식 (1)로 표시되는 모티프(motif) 내의 시스테인 잔기의 티올기를 통해 약물이 결합되어 있는 것을

특징으로 하는 변형항체-약물 접합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시스테인(Cysteine : Cys) 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 모항체, 바람직하게는 모항체의 말단, 보다 바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 말단, 가장 바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 C-말단에 결합된 변형항체, 그러한 항체와 진단용 또는 치료용 약물이 결합된 변형항체-약물 접합체(mADC, modified Antibody-Drug Conjugate) 및 상기 변형항체 또는 변형항체-약물 접합체의 제조방법에 대한 것이다.

[0002] 본 발명에 따른 변형항체-약물 접합체는 접합체에 포함된 모항체의 항원에 대한 높은 특이성으로 인해 타겟 세포에 약물을 정확하게 전달할 수 있어, 치료효과를 높일 수 있으며, 또한 높은 효과에도 불구하고 독성으로 인해 사용이 제한적인 약물, 특히 항암제 등의 활용도를 제고할 수 있다.

[0003] 또한, 본 발명은 상기 변형항체-약물 접합체를 포함하는 질병, 특히 암의 치료용 조성물 및 이를 이용한 치료방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0004] 특정 질환에서 특이적으로 발현되는 표적(target), 즉 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료제는 바이오 의약품 중에서 현재 가장 활발하게 연구가 진행되고 있다. 특히 암 세포 표면에 특이적으로 발현되는 종양-관련 항원을 규명하고, 이에 결합하여 세포의 성장을 억제하거나 사멸을 유도하는 항체, 즉 항암 항체를 이용한 종양 진단 및 치료 방법은 현재 널리 사용되고 있으며, 앞으로의 전망도 매우 밝은 기술분야이다.

[0005] 하지만, 이러한 항암 항체는 표적 특이성은 매우 높지만, 암세포의 사멸효과는 기존의 세포독성 약물(항암제), 즉 항암 약물에 비해 낮은 경우가 있어, 세포독성 약물 및 기타 세포증식 억제 약물 등과의 병용 투여요법(combination therapy)으로 사용되는 경우가 많다.

[0006] 상기와 같은 병용 투여요법에 있어서, 세포 독성약물 등의 치료효능 제고 및 독성 저하를 위해 독성이 높은 세포 독성약물이 표적항체에 결합된 변형항체-약물 접합체(mADC, modified Antibody-Drug Conjugate)에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는데, 변형항체-약물 접합체를 이용할 경우, 약물의 전신 독성은 경감되고 표적이 과량 발현된 세포, 특히 암세포에만 집중적으로 세포독성을 유발할 수 있어 치료효과를 제고할 수 있는 것으로 인식되고 있다.

[0007] 실제로 제발린(ZEVALINTM, [Witzig et al., J. Clin. Oncol, 2002, 20(15): 3262-3269]), 마일로타그(MYLOTARGTM, [Drugs of the Future, 2000, 25(7):686]) 등의 항체와 세포독성 약물 또는 방사선 동위원소가 결합된 항체-약물 접합체는 비호지킨 림프종과 급성 골수성 백혈병 치료용으로 성공적으로 개발되었으며, 칸투주맵 메르탄신(Immunogen, Inc. [Xie et al., J. of Pharm. and Exp. Ther. 2004, 308 (3):1073-1082]), 트라스투주맵 메르탄신(Roche [Isakoff et al., J. Clin. Oncol. 2011, 29(4): 351-4]) 등 맹독성 메르탄신을 항체에 결합시키거나, 돌라스타틴 유도체인 아우리스타틴 펩티드, 아우리스타틴 E (AE), 모노메틸아우리스타틴(MMAE), 혹은 MMAF 등의 세포독성 약물을 cBR96 (암종 상의 루이스 Y(Lewis Y)에 특이적인 타겟) 항체, 혈액학적 악성 종양 상의 CD30에 특이적인 cAC10, CD20-발현 암 및 면역 장애의 치료를 위한 항-CD20 항체, 예컨대 리톡산, 직장결장 암의 치료를 위한 항-EphB2R 항체, 2H9 및 항-IL-8, E-셀렉틴 항체 등에 결합시키는 등 많은 시도가 활발히 진행되고 있다 ([Klussman, et al., Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(4):765-773]; [Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21(7):778-784]; [Francisco et al., Blood, 2003,102(4):1458-1465]) US 2004/0018194 A1) WO 04/032828 A3; [Mao et al., Cancer Research, 2004, 64(3):781-788]; [Bhaskar et al., Cancer Res, 2003, 63:6387-6394]).

[0008] 또한 다우노마이신, 독소루비신, 메토티렉세이트 및 빈데신을 이용한 항체-약물 접합체 개발도 시도되었으며, 항체-약물 접합체에 포함될 수 있는 약물로서 세균성 독소, 예를 들어 디프테리아 독소, 식물 독소, 예를 들어 라이신, 소분자 독소, 예를 들어 켈라나마이신 ([Mandler et al., J. of the Nat. Cancer Inst, 2000, 92 (19):1573-1581]; [Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters, 2000, 10: 1025-1028]; [Mandler et al., Bioconjugate Chem, 2002, 13:786-791]), 마이탄시노이드 [EP 1391213 A1]; [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 8618-8623]), 및 칼리케아미신 ([Lode et al., Cancer Res, 1998, 58: 2928]; [Hinman et al., Cancer Res, 1993, 53: 3336-3342]) 등이 사용가능하다고 알려져 있다. 이들 세포독성 약물은

주로 투불린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 억제 등의 기전에 의해 세포독성 및 세포증식 억제 효과를 가진다.

[0009] 상기와 같은 항체-약물 접합체를 제조하기 위하여 통상적으로 사용되는 약물과 항체의 공유결합을 유도하는 공정을 이용할 경우, 약물이 항체의 다수 부위에 결합된 이질성 혼합물로 생성되게 된다. 예를 들어, 세포독성 약물은 종종 항체의 다수 라이신 잔기를 통해 항체에 결합되어 이질성 항체-약물 접합체 혼합물이 생성되기 쉬우며, 반응 조건에 따라 이질성 혼합물은 0개 내지 약 8개 이상의 상이한 약물결합 분포, 즉 단위 항체당 결합된 약물의 개수가 상이한 결과를 나타내게 된다.

[0010] 또한, 약물 대 항체의 특정 정수 비율을 갖는 접합체의 각 하위군 내에, 약물이 항체 상의 다양한 부위에 부착되는 잠재적 이질성 혼합물이 존재한다. 이러한 다양한 이질성 혼합물을 균질하게 제조하고 일일이 분획하는 방법은 의약품 대량생산하기 위한 공정으로 사용되기에는 적절하지 않다([Hamblett et al., Clin. Cancer Res, 2003, 10, 7063-7070], [Wang et al., Protein Sci. 2005, 14, 2436-2446]).

[0011] 항체에 약물을 결합시키는 또 다른 방법으로는, 항체에 이미 존재하는 시스테인간의 다이설파이드(disulfide) 결합을 환원제를 이용하여 분리시킨 후, 유리 티올(thiol)기에 약물을 결합시키는 방법이 있는데, 이 방법 또한 항체 고유 특성이 상실될 수 있으며, 역시 이질성 혼합물이 과량 생성된다는 단점이 있다. 구체적으로, 이뮤노글로불린 M은 다이설파이드-결합 펜타머의 예이며, 한편 이뮤노글로불린 G는 서브유닛을 함께 결합시키는 내부 다이설파이드 브릿지(bridge)를 갖는 단백질의 예인데, 상기와 같은 단백질에서, 디티오프레이톨 (DTT) 또는 셀렌올과 같은 시약을 이용한 다이티올 결합의 환원 ([Singh et al., Anal. Biochem. 2002, 304:147-156])은 반응성 유리 티올을 생성시키는데, 이러한 접근법은 항체 3차 구조 및 항원 결합 특이성을 손상시킬 수 있다 ([Jagath et al., Nature Biotechnology, 2008, 26(8):925-32]).

[0012] 이상 설명한 바와 같은 기존의 항체-약물 결합방법의 대표적인 단점은 약물의 항체 결합부위 및 결합개수를 정밀하게 조절하기 어려운 것이다. 이러한 단점을 극복하기 위해서, 항체의 기능을 손상시키지 않는 범위 내에서 위치 선택적으로 유리 티올기를 부가(특정 아미노산을 시스테인으로 치환)하기 위하여, 각 아미노산이 시스테인으로 치환되었을 때 나타나는 티올기의 반응성을 예측하여 적절한 반응성을 가질 것으로 예상되는 위치의 아미노산을 시스테인으로 치환하고 이로부터 최적의 시스테인-치환 항체를 스크리닝하는 방법도 개발된 바 있다(대한민국 공개특허공보 제2007-0054682호, 'ThioFab 기술'). 이러한 방법으로 제조된 트라스투주맙-메르텐신의 항체-약물 접합체를 이용한 전이성 유방암을 치료하기 위한 임상시험이 진행되고 있다([Burris III et al., J. Clin. Oncol, 2011, 29(4):398-405]). 상기 ThioFab 기술은 새로운 시스테인을 항체 내부에 도입함으로써 모항체가 가지는 다이설파이드 결합의 손상을 최대한 억제할 수 있다는 장점을 가지지만, 모항체 내부의 아미노산 일부를 시스테인으로 치환하기 때문에 모항체의 구조와 기능에 대한 변형을 가져올 수 있다는 우려가 여전히 남아 있다.

[0013] 따라서, 모항체의 구조 및 기능 등의 특성이 유지되면서, 결합되는 약물의 개수 및 결합 위치 등을 정확하게 조절할 수 있는 새로운 항체-약물 접합체 및 그 제조방법에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2007-0054682:시스테인 유전자조작 항체 및 접합체, 공개일자: 2006년03월30일, 출원인: 제넨테크, 인크.

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Jagath et al., Nature Biotechnology, 2008, 26(8):925-32

(비특허문헌 0002) Burris III et al., J. Clin. Oncol, 2011, 29(4):398-405

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 '모티프(motif)'가 모항체에 결합되어 다수의 약물 결합 부위를 가지는 새로운 형태의 항체(이하 '변형항체' 라고 한다)를 제공하고자 하며, 또한 상기 변형항체에 약물이 결합된 변형항체-약물 접합체를 제공하고자 한다.
- [0017] 본 발명에서 제공되는 변형항체는 모항체의 특성은 유지되면서, 매우 다양한 약물이 효율적으로 결합될 수 있으므로, 높은 표적 특이성과 약물효과를 기대할 수 있는 새로운 형태의 항체이다.
- [0018] 본 발명의 변형항체는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)를 포함하고 있어, 시스테인 잔기에 약물을 결합시켜 약물을 표적 조직에 효과적으로 전달할 수 있을 뿐 아니라, 약물과 결합할 수 있는 시스테인 잔기 개수의 정확한 조절이 가능하여, 변형항체-약물 접합체에 포함되는 약물의 개수, 즉 양을 조절할 수 있다는 장점을 가지고 있으므로, 기존 항체-약물 접합체의 단점을 개선한 우수한 약물 전달체로 사용될 수 있으며, 궁극적으로 암 등의 질병 치료를 위해 효율적으로 사용될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명에서는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 모항체와 결합되어 다수의 약물 결합부위를 가지는 새로운 형태의 변형항체 및 이를 이용한 변형항체-약물 접합체를 제공한다. 이러한 변형항체는 모항체의 특성은 유지하면서, 매우 다양한 약물이 다수 결합될 수 있어 효율적인 새로운 변형항체-약물 접합체로서 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서의 '모항체'는 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 결합되지 않은 통상적인 '항체'를 의미하는 것으로, 특정 항원에 대한 결합능과 특이성을 가지는 것이라면 제한 없이 사용이 가능하며, 모노클로날 또는 폴리클로날 항체로서, 마우스 항체 등의 동물 유래 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 인간화 항체, 형질전환 마우스나 디스플레이(display) 기술 등을 이용하여 개발된 인간 항체 등이 모두 사용가능하다. 또한 이중특이적 항체(bispecific antibody) 등의 변형된 항체나, 항체의 단편 등도 모두 사용가능함은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자(이하 '통상의 기술자' 라 한다)에게는 자명한 것이다.
- [0021] 본 발명에서의 '항체의 단편'은 적어도 항원에 대한 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, 단쇄 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, Fab 단편, F(ab')₂단편, Fd, scFv, 도메인 항체, 미니바디, 스캐프(singl chain antibody, scAb), 항체 불변영역의 유도체들, 단백질 스캐폴드(protein scaffolds)에 기초한 인공항체 등을 포함한다.
- [0022] 또한 본 발명에 따른 모항체는 면역글로불린 분자의 모든 유형 (예: IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA) 및 이의 하위 부류(예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 일 수 있으며, 어떠한 종에서 유래된 것이라도 사용가능하다.
- [0023] 본 발명에서의 모항체는 종양-관련 항원(TAA) 등의 암 특이 항원, 세포 표면 수용체 단백질, 수용체 이외의 다른 세포 표면 단백질 및 분자, 막형단 단백질, 신호전달 단백질, 세포생존 조절인자, 세포 증식 조절인자, 조직 발달 또는 분화와 연관된 분자 (예를 들어, 조직 발달 또는 분화에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자), 림포카인, 사이토카인, 세포 주기 조절에 관련된 분자, 혈관형성에 관련된 분자 및 혈관신생에 관련된 분자(예를 들어, 혈관신생에 기능적으로 기여하는 것으로 알려져 있거나 추정되는 분자)에 대한 결합능과 특이성을 가진다.
- [0024] 구체적으로 본 발명에서의 모항체가 결합할 수 있는 항원으로는,
- [0025] (1) BMPRII (골 형태형성 단백질 수용체-IB형, 진뱅크 승인 번호 NM_001203);
- [0026] (2) E16 (LAT1, SLC7A5, 진뱅크 승인 번호 NM_003486);
- [0027] (3) STEAP1 (전립선의 6회의 막형단 상피 항원, 진뱅크 승인 번호 NM_012449);
- [0028] (4) 0772P (CA125, MUC16, 진뱅크 승인 번호 AF361486);
- [0029] (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, 거핵세포 강화 인자, 메소텔린, 진뱅크 승인 번호 NM_005823);
- [0030] (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, 용질 운반체 족 34 (인산나트륨), 구성원 2, 제II형 나트륨-의존성 포스페이트 수송체 3b, 진뱅크 승인 번호 NM_006424);

- [0031] (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, 세마포린 5b Hlog, 세마 도메인, 7개의 트롬보스폰딘 반복체 (제1형 및 유사 제1형), 막횡단 도메인 (TM) 및 짧은 세포질 도메인, (세마포린) 5B, 진뱅크 승인 번호 AB040878);
- [0032] (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008016Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 유전자, 진뱅크 승인 번호 AY358628);
- [0033] (9) ETBR (엔도텔린 B형 수용체, 진뱅크 승인 번호 AY275463);
- [0034] (10) MSG783 (RNF124, 가상 단백질 FLJ20315, 진뱅크 승인 번호 NM_017763);
- [0035] (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, 전립선암 관련 유전자 1, 전립선암 관련단백질 1, 전립선의 6회의 막횡단 상피 항원 2, 6회의 막횡단 전립선 단백질, 진뱅크 승인 번호 AF455138);
- [0036] (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 일시적 수용체 잠재적 양이온 채널, M 아족, 구성원 4, 진뱅크 승인 번호 NM_017636);
- [0037] (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, 기형암종-유래 성장인자, 진뱅크 승인 번호 NP_003203 또는 NM_003212);
- [0038] (14) CD21 (CR2 (보체 수용체 2) 또는 C3DR (C3d/엡스타인 바르 바이러스 수용체) 또는 Hs.73792 진뱅크 승인 번호 M26004);
- [0039] (15) CD79b (CD79B, CD79 β , Ig β (이뮤노글로불린-관련 베타), B29, 진뱅크 승인 번호 NM_000626);
- [0040] (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 도메인 함유 포스파타제 고정 단백질 1a), SPAP1B, SPAP1C, 진뱅크 승인 번호 NM_030764);
- [0041] (17) HER2 (진뱅크 승인 번호 M11730);
- [0042] (18) NCA (진뱅크 승인 번호 M18728);
- [0043] (19) MDP (진뱅크 승인 번호 BC017023);
- [0044] (20) IL20R α (진뱅크 승인 번호 AF184971);
- [0045] (21) 브레비칸 (진뱅크 승인 번호 AF229053);
- [0046] (22) EphB2R (진뱅크 승인 번호 NM_004442);
- [0047] (23) ASLG659 (진뱅크 승인 번호 AX092328);
- [0048] (24) PSCA (진뱅크 승인 번호 AJ297436);
- [0049] (25) GEDA (진뱅크 승인 번호 AY260763);
- [0050] (26) BAFF-R (B 세포 활성화 인자 수용체, BLyS 수용체 3, BR3, NP_443177.1);
- [0051] (27) CD22 (B-세포 수용체 CD22-B 이소형, NP-001762.1);
- [0052] (28) CD79a (Ig 베타 (CD79B)와 공유적으로 상호작용하고 IgM 분자와 표면에서 복합체를 형성하는 B 세포 특이적 단백질인 CD79A, CD79 α , 이뮤노글로불린-관련 알파는 B 세포 분화에 관여하는 신호를 전달함, 진뱅크 승인 번호 NP_001774.1);
- [0053] (29) CXCR5 (CXCL13 케모킨에 의해 활성화된 G 단백질 커플링된 수용체인 버킷 림프종 수용체 1은 림프구 이동 및 체액성 방어에 작용하고 HIV-2 감염에 참여하며, AIDS, 림프종, 골수종 및 백혈병의 발병과 관련이 있다고 여겨짐, 진뱅크 승인 번호 NP_001707.1);
- [0054] (30) HLA-DOB (펩티드에 결합하여 CD4+ T 림프구에 제시하는, MHC 클래스 II 분자 (Ia 항원)의 베타 서브유닛, 진뱅크 승인 번호 NP_002111.1);
- [0055] (31) P2X5 (세포의 ATP에 의해 게이트되는 이온 채널인, 퓨린성 수용체 P2X 리간드-게이트 이온 채널 5는 시냅스 전달 및 신경발생에 관여할 수 있으며, 이의 결핍은 특발성 폐뇨근 불안정의 병태생리에 기여할 수 있음, 진뱅크 승인 번호 NP_002552.2);

- [0056] (32) CD72 (B-세포 분화 항원 CD72, Lyb-2, 진뱅크 승인 번호 NP_001773.1);
- [0057] (33) LY64 (루이신 풍부 반복체 (LRR) 족의 제I형 막 단백질인, 림프구 항원 64 (RP105)는 B 세포 활성화 및 세포자멸을 조절하며, 이것의 기능 상실은 전신성 홍반성 루푸스 환자의 질병 활성 증가와 관련이 있음, 진뱅크 승인 번호 NP_005573.1);
- [0058] (34) FcRH1 (C2형 Ig-유사 및 ITAM 도메인을 함유하는 이뮤노글로불린 Fc 도메인에 대한 추정적 수용체인 Fc 수용체 유사 단백질 1은 B 림프구 분화에 관여할 수 있음, 진뱅크 승인 번호 NP_443170.1)
- [0059] (35) IRTA2 (B 세포 발생 및 림프종발생에 작용할 수 있는 추정적 면역수용체인 이뮤노글로불린 거대족 수용체 전좌 관련 2, 전좌에 의한 상기 유전자 탈조절은 몇몇 B 세포 악성종양에서 일어남, 진뱅크 승인 번호 NP_112571.1); 및
- [0060] (36) TENB2 (성장 인자의 EGF/헤레굴린 족 및 폴리스타틴과 관련이 있는 추정적 막횡단 프로테오글리칸, 진뱅크 승인 번호 AF179274);
- [0061] 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 치료용 또는 진단용으로 사용가능한 모든 항원이 포함될 수 있다.
- [0062] 바람직한 예로서, 본 발명에 따른 모항체는 EGFR, HER2, HER3 및 HER4로부터 선택된 ErbB 수용체 및 기타 암 항원에 대한 결합능 및 특이성을 가지며, 특히, 바람직하게는 본 발명에 따른 모항체는 트라스투주맙(trastuzumab, 상품명 : 허셉틴), 리툽시맙(rituximab, 상품명 : 리툽산), 베바시주맙(bevacizumab, 상품명 : 아바스틴) 세툽시맙(cetuximab, 상품명 : 엘비투스), cBR96, cAC10, 항-CD20 항체, 항-EphB2 항체, 항-IL-8, E-셀렉틴(selectin) 항체, 항-MUC16 항체 및 항-CD30 항체로부터 선택되는 하나 이상의 것을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0063] HER2는 유방암 세포의 증식과 생존에 관계하는 중요한 신호전달체계 중의 하나인 상피세포 성장인자수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR) 패밀리를 의미한다. EGFR 패밀리의 티로신 인산화효소 수용체(receptor tyrosine kinases)는 erb1, erb2/HER2, erb3, erb4의 4개로 되어 있으며 세포 증식과 생존 외에도 세포의 분착, 이동 및 분화를 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0064] 4개의 erb 패밀리를 중 erb2/HER2와 결합하는 리간드는 없지만 유방암에서 가장 강력한 암유전자(oncogene)로 알려져 있다. HER2가 정상적인 수준인 경우에는 정상적인 유선조직의 성장과 발달에 관여하지만, 비정상적으로 HER2가 과발현하거나 증폭되면 정상세포 조절이 붕괴되어 유선조직에서는 공격적인 암세포가 형성되게 된다. 즉, HER2가 다른 EGFR 패밀리와 올리고머화(oligomerization)되어 활성화되면 많은 하부 분자(downstream molecules)를 인산화하여 차례로 여러 가지 신호전달계(signaling cascades)를 활성화시키는데, 세포증식에 관여하는 SOS-Ras-Raf-MEK-MAPK 경로와 세포사멸을 억제하는 PI-3K/Akt 경로가 암 증식에 관여하는 대표적인 기전이다.
- [0065] 전임상과 임상 실험 결과, HER2 과발현은 암발생 단계의 초기부터 나타나는 중요한 현상이며, 이는 암의 성장과 진행에 중요한 역할을 하고 있다. HER2 과발현은 침윤성 유방암의 약 20~30%에서 나타나고 있으며 과발현은 악성도가 보다 높은 공격적인 암으로 유방암의 불량한 예후와도 관계가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0066] 상기 HER2 수용체 또는 EGF 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 성장 인자 수용체에 특이적으로 결합하는 모항체에 하나 이상의 시스테인을 포함하는 모티프(motif)를 결합시키고, 이에 다시 통상적인 항암 약물을 결합시킨 본 발명에 따른 변형항체-약물 접합체를 환자의 종양 세포 성장을 억제시키는데 유효한 양으로 환자에게 투여함으로써, 상기 성장 인자 수용체를 과발현하는 종양 세포의 성장을 억제함과 동시에 사멸을 유도하여 뛰어난 암 치료효과를 거둘 수 있다.
- [0067] 또한, 상기 설명한 바와 같이 본 발명에서의 모항체는 트라스투주맙이 바람직한데, 트라스투주맙은 C-말단 라이신(Lys)이 대부분 제거된 형태로 제조되지만, 본 발명에 따른 변형항체-약물접합체는 하나 이상의 시스테인(Cys)을 포함하는 모티프(motif)와 결합되는 트라스투주맙의 C-말단 부위에 라이신(Lys)이 존재하는 형태와 라이신이 존재하지 않는 형태 모두 적용이 가능하다.
- [0068] 본 발명에서 제공되는 아미노산의 다양한 서열 내에 존재하는 아미노산은 그들의 공지된 3-문자 또는 1-문자 약어에 의해 표시된다. 다양한 핵산 절편 내 존재하는 뉴클레오타이드들은 당해 분야에서 일상적으로 사용되는 표준 단일-문자 명명법으로 명명된다.

- [0069] 본 발명에서의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)는 1개 내지 100 개, 바람직하게는 1개 내지 50개, 더욱 바람직하게는 1개 내지 30개, 가장 바람직하게는 1개 내지 10개의 아미노산 잔기를 가지며, 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함한다. 특히, 본 발명에 따른 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)는 1개 내지 20개의 시스테인 잔기를 포함하는 것이 바람직하며, 바람직하게는 1개 내지 10개의 시스테인 잔기를, 특히 바람직하게는 1개 내지 5개의 시스테인 잔기를 포함한다.
- [0070] 상기 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 특정한 작용능(functionality)이나 2차 혹은 3차 구조를 갖지 않는 단순한 펩타이드 모티프(motif)일 수 있으며, 특정한 작용능이나 2차 혹은 3차 구조를 갖는 펩타이드 모티프인 것이 바람직하다. 상기 특정한 작용능은 시스테인 잔기의 화학적 접합성을 유지-보호할 수 있는 특성이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 특정 리간드(ligand)와의 결합이나 혹은 펩타이드 모티프 자체의 2차 또는 3차 구조적 특성으로 인하여 시스테인 잔기의 산화를 방지하거나 산화를 느리게 함으로써 시스테인 잔기의 작용능을 보다 효과적으로 유지시킬 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 하기 구조식 (1)과 같은 구조를 가진다.
- [0072] $Xa-[(M_{Cys})_n-Xb_n]_n$ 구조식 (1)
- [0073] 상기 구조식 (1)에서, $(M_{Cys})_n$ 는 단순한 시스테인 잔기, 또는 시스테인 잔기를 포함하며 특정한 작용능이나 2차 혹은 3차 구조를 갖는 펩타이드 모티프를 의미하고, Xa 및 Xb_n는 서로 독립적으로 시스테인을 제외한 아미노산 잔기 0개 내지 20개로 구성된 펩티드를 의미하며, n은 1 내지 20의 정수 값을 가진다.
- [0074] 상기 구조식 (1)에서의 각 $(M_{Cys})_n$, 즉 $(M_{Cys})_1, (M_{Cys})_2, \dots, (M_{Cys})_n$ 은 서로 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있다. 또한, 각 Xb_n, 즉 Xb_{1}, Xb_{2}, \dots, Xb_n}역시 서로 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있다.}
- [0075] 또한, 상기 구조식 (1)에서, $(M_{Cys})_n$ 이 단순한 시스테인 잔기일 경우, 본 발명에 따른 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 하기 구조식 (2)와 같은 구조를 가진다.
- [0076] $Xa-(Cys-Xb_n)_n$ 구조식 (2)
- [0077] 구조식 (2)에서의 Xa, Xb_n 및 n은 상기 구조식 (1)에서의 정의와 동일하다.
- [0078] 또한, 상기 구조식 (1)에서, $(M_{Cys})_n$ 이 시스테인 잔기를 포함하며 특정한 작용능이나 2차 혹은 3차 구조를 갖는 펩타이드 모티프일 경우, 바람직하게 $(M_{Cys})_n$ 는 시스테인 잔기를 포함하는 금속 이온 결합 모티프일 수 있다. 시스테인 잔기를 포함하는 금속 이온 결합 모티프는 금속 이온과의 결합을 통하여 시스테인 잔기의 산화를 저해함으로써 시스테인기의 알킬화 반응성을 효과적으로 유지시킬 수 있음이 알려져 있다(Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8: 601-610).
- [0079] 본 발명에서 사용될 수 있는 시스테인 잔기를 포함하는 금속 이온 결합 모티프로는 생체 내에서 금속이온의 농도를 조절하는데 사용되는 금속이온 킬레이터(chelator) 단백질 (Zhang et al. (2012) Biochem. Genet. 50(7-8): 585-599), 금속 이온을 세포 외부나 혹은 세포내 특정 위치에 전달하는 역할을 하는 샤페론(chaperones) (Ansbacher and Shurki, J. Phys. Chem. B (2012) 116(15): 4425-4432; Allen et al. (2012) Biochemistry 51(7): 1439-48; Click et al. (2012) H. Comput. Chem. 33(11): 1142-51), 금속 이온의 농도에 따라서 전사(transcription)를 조절하는 전사 조절 단백질(transcriptional regulators) (Gunther et al. (2012) Biochim. Biophys. Acta. 1823(2): 476-483; Sitthisak et al. (2012) FEMS Microbiol. Lett. 327(2): 126-133), 단백질-단백질 반응(protein-protein interaction)이나 단백질-DNA 반응에 관여하는 많은 단백질에 광범위하게 존재하는 징크 핑거 (Zinc Finger) 모티프(MacPherson et al. (2006) Microbiol. Mol. Bio. Rev. 70(3):583-604; Schaeffer et al. (2012) Nucleic Acids Res. 40(18): 9298-9307) 및 다양한 종류의 효소 (Zielazinski et al. (2012) Biochemistry 51(40):7891-7900; Zhou et al. (2012) FEBS J. 279(2):285-298; Cochran et al. (2011) Nat. Struct. Mol. Biol. 19(1):122-127) 유래의 것 등이 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 금속 이온 결합 모티프들은 시스테인 잔기를 금속 이온 결합 모티프의 필수불가결한 결합 그룹으로 사용하고 있으며, 그러한 금속 이온 결합 모티프가 본 발명에 따른 변형항체-약물접합체의 제조에 이용될 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 금속 이온 결합 모티프의 구체적인 예로는 징크 핑거 단백질의 C₂H₂그룹 (Cys₂His₂class:Cys-X₂-Cys-X₁₂-His-X₃₋₅-His), C₄그룹 (C4 class: Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys-X_m-Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys), C₆그룹 (C6

class: Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₅₋₁₂-Cys-X₂-Cys-X₆₋₈-Cys), 전사 조절 단백질이나 금속 샤페론 단백질, 금속이온 운반 단백질 (metal ion transporter), 수퍼옥사이드 디스무테이스(superoxide dismutase) 등에서 많이 발견되는 Cys-X-X-Cys나 Cys-X-Cys 모티프 등 Cys-X_m-Cys모티프, Met-X-Cys-X-X-Cys 모티프, C-Q-C-Q-C-A-C 모티프, 막 단백질 ATP 분해효소의 Ser-Pro-Cys 모티프 등이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 금속 이온 결합 모티프 구조에서, X는 Cys 이외의 아미노산 잔기, m은 1 내지 10, 바람직하게는 1 내지 5의 정수를 의미하며, X_m또는 X_{m-q}는 m 또는 m 내지 q개의 Cys 이외의 아미노산 잔기를 의미한다.

[0081]

보다 구체적으로 본 발명에서 사용될 수 있는 징크핑거 단백질의 금속이온 결합 모티프는,

[0082]

YKCKQCGKAFGCPNSLRRHGRTH(SEQ ID NO.1), YQCNICGGKCFSCNSLHRHQRTTH(SEQ ID NO.2),
YSCGICGKSFSQSSAKRRHCILH(SEQ ID NO.3), YTCSDCGKAFRDKSCLNRHRRTH(SEQ ID NO.4),
YRCKYCDRSFSDSSNLQRHVRNIH(SEQ ID NO.5), YKCECGKAFNHSSNFNKHHRH(SEQ ID NO.6),
FKCPVCGKAFRHSSSLVRHQRTTH(SEQ ID NO.7), YRCKYCDRSFSISSNLQRHVRNIH(SEQ ID NO.8),
YEDCHCGKAFSIGSNLNVHRRH(SEQ ID NO.9), YGCHLCCKAFSKSSNLRRHEMIH(SEQ ID NO.10),
YKCECGQAFRQRAHLIRHHKLH(SEQ ID NO.11), YKCHQCGKAFIQSFNLRRHERTH(SEQ ID NO.12),
FQCNCQCGASFTQKGNLNRHIKHLH(SEQ ID NO.13), YTCSYCGKSFTQSNLTKQHTRI(SEQ ID NO.14),
YACHLCGKAFQSSSHRHEKTH(SEQ ID NO.15), YKCGQCGKFYSQVSHLTRHQKIH(SEQ ID NO.16),
YACHLCGKAFQCSHLRRHEKTH(SEQ ID NO.17), YACHLCAKAFIQCSHLRRHEKTH(SEQ ID NO.18),
YVCRECGRGFRQHSLLVRHQRTH(SEQ ID NO.19), YKCEECGKAFRQSSHLTTHKIIH(SEQ ID NO.20),
YEDCHCGKSFSQSSSLNVHQRTH(SEQ ID NO.21), YMCSECGRGFSQKSNLTIHQRTTH(SEQ ID NO.22),
YKCEECGKAFQSSSLTKHKKIH(SEQ ID NO.23), FECKDCGKAFIQKSNLIRHQRTTH(SEQ ID NO.24),
YVCRECRGFSQKSNLIRHQRTTH(SEQ ID NO.25), YECEKCGKAFNQSSNLTRHKKSH(SEQ ID NO.26),
YECVQCGKSYSSSLNFRHQRTH(SEQ ID NO.27), YECVQCGKGFTQSSNLITHQRVH(SEQ ID NO.28),
YECNTRKRTFSQKSNLIVHQRTTH(SEQ ID NO.29), YVCSKCGKAFQSSSLTVHQKIH(SEQ ID NO.30),
YKDECEGKNFTQSSSLIVHKRIH(SEQ ID NO.31), YECVQCGKFTQKSNLGVHQRTTH(SEQ ID NO.32),
YKCPDCGKSFSQSSSLIRHQRTTH(SEQ ID NO.33), YECQDCGRAFNQSSSLGRHQRTH(SEQ ID NO.34),
YECNECGKFFSQSSSLIRHRRSH(SEQ ID NO.35), YKCEECGKAFNQSSSLTRHKIVH(SEQ ID NO.36),
YECNECGKAFQNSTLRVHQRTH(SEQ ID NO.37), YEVHDCGKSFRQSTHTLTQHRRH(SEQ ID NO.38),
YECDCGKSFRQSTHTLTRHRRH(SEQ ID NO.39), HKCLECGKCFSQNTHTLRHQRTTH(SEQ ID NO.40),
YVCDVEGCTWKFARSDENLRHKKRH(SEQ ID NO.41), YHCDWDGCGWKFARSDENLRHRRH(SEQ ID NO.42),
YRCSWEGCEWRFARSDENLRHFRKH(SEQ ID NO.43), FSCSWKGCERRFARSDENLRHRRH(SEQ ID NO.44),
FACSWQDCNKKFARSDENLRHYRTH(SEQ ID NO.45), YHCNWDGCGWKFARSDENLRHRRH(SEQ ID NO.46),
FLCQYCAQRFGRKDLTRHMKHSH(SEQ ID NO.47), CRCNECGKFSRRDLVRHQRTTH(SEQ ID NO.48),
FQCKTCQKFSRSDHLKTHTRTH(SEQ ID NO.49), FACEVCGVRFTRNDKLKIHMRKH(SEQ ID NO.50),
YVCDVEGCTWKFARSDKLRHKKRH(SEQ ID NO.51), YKCMCEGKAFNRRSHLTRHQRIH(SEQ ID NO.52),
YICRKCGRGFSRKSNIIRHQRTTH(SEQ ID NO.53), YECKEKGKAFSSGSNFRHQRIH(SEQ ID NO.54),
FHCYCEKFSVSKDYLTKHIRTH(SEQ ID NO.55), YEDCHCGKAFSVSSNLNVHRRH(SEQ ID NO.56),
YTCKQCGKAFSVSSSLRRHETTH(SEQ ID NO.57), YECNYCGKTFVSSSLIRHQRIH(SEQ ID NO.58),
YRCEECGKAFRWSNLTRHKRIH(SEQ ID NO.59), FACDICGRKFARSDERKRHTKI(SEQ ID NO.60),
CPVESCDRRFSRSDENLRHRRH(SEQ ID NO.61), CDICGRKFARSDERKRHTKI(SEQ ID NO.62) 등을 들 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, zfdesign/zfdesignhome.php또는 Macpherson et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70(3), 583~604) 등에 보고된 징크핑거 단백질의 금속이온 결합 모티프 중에서 본 발명의 기술적 특성과 부합되는 것이라면 어느 것이라도 제한 없이 사용가능하다.

[0083]

또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 전사조절 단백질이나 금속 샤페론 등의 금속이온 결합 모티프는

[0084]

CadC 단백질:

[0085]

CEIFCYDEEKVNRIQGLQTVDISGVSIKAIADENRAKITIALCQDEELCVC(SEQ ID NO.63)

[0086]

AztR 단백질:

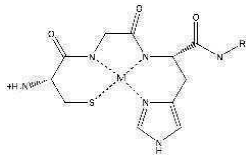
[0087]

CDTHLVHLDNVRSSQAQILPTDKAAQMAEIFGVLDATNRIRLLSALASSELVC(SEQ ID NO.64))

- [0088] ZiaR 단백질:
- [0089] CDQPLVHLEQVRQVQPEVMSLDQAQQAEEFFSALADPSRLRLMSALARQELCVC(SEQ ID NO.65)
- [0090] BxmR 단백질:
- [0091] CDRAHLVDCSRVGDITQVLNTAKAQRMAEFFSLLGDANRLRVSVLAKQELCVC(SEQ ID NO.66)
- [0092] ArsR 단백질: LSETRLGIVLLREMGECLVCDCM(SEQ ID NO.67)
- [0093] CCTLATGPLSSDESEHYADLFKVLGDPVRLRILSQLAAGGC(SEQ ID NO.68)
- [0094] YRAAMPVVRALVAYLTENCCHGTRDC(SEQ ID NO.69)
- [0095] CmtR 단백질:
- [0096] CLRGCGLVVATYEGRQVRYALADSHLARALGELVQVVLAVDTDQPC(SEQ ID NO.70)
- [0097] CLRDCGLVVTVPDGRRSRYELADERLGHALLDLRAAVVAVDADRTCPDADELECC(SEQ ID NO.71) 등을 들 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 박테리아의 신호전달에 관여하는 막단백질에서 발견되는 아연(Zn) 결합 단백질은 하나의 시스테인과 세개의 히스티딘 잔기로 구성되는 고유한 금속 이온 결합 모티프를 갖는데 (Draper et al., J. Bacteriol. 2011, 193 (17), 4338-4345), 이는 HXXWFYLY₂₁₋₂₈CXLFMVIGXWFLVIX₁₈₋₂₇HXXH(X는 임의의 아미노산이며, X_{m-q}는 m 내지 q개의 Cys 이외의 아미노산 잔기를 의미한다.)의 구조를 가지며, 현재까지 보고된 150 종 이상의 아연 결합 단백질도 본 발명에서의 금속 이온 결합 모티프로 사용가능하다.
- [0099] 금속이온 운반 단백질에는 양이온 확산 유도 단백질 그룹(cation diffusion facilitators), Zrt, Irk-유사 단백질(Zrt, Irk-like protein), 양이온 교환 단백질 (cation exchangers), 구리 운반 단백질(copper transporters), 중금속 P-형 ATP 분해효소(heavy metal P-type ATPase), ATP-결합 카세트(ATP-binding cassette) 운반 단백질 등이 알려져 있는데 (Hanikenne et al. Plant Physiology 2005, 137, 428-446; Hall and Williams, J. Experimental Botany, 2003, 54(393) 2601-2613), 본 발명에서는 다음과 같은 M-X-C-X-X-C 모티프가 바람직하게 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0100] *E.coli* ZntA : VSGMDCAACARKVENAVRQLAGVNQVQLFA(SEQIDNO.72)
- [0101] *E.coli* ZntA : VSGMDCAACARKVENAVRQLAGVNQVQLFA(SEQIDNO.72)
- [0102] Tn501 MerA : ITGMTCDSCAAHVKEALEKVPQVSALVSY(SEQIDNO.74)
- [0103] *S.aureus* CadA : VQGFTCANCAGKFEKNVKKIPGVQDAKVNFG(SEQIDNO.75)
- [0104] Human Menkes : VEGMTCNSCVWTIEQQIGKVNGEHHIKVSLE(SEQIDNO.76)
- [0105] Yeast Atx1 : VVMTCSGCGSAGVNVLTLEPDVSKIDIS(SEQIDNO.77)
- [0106] Rat Wilsons : GMTASCVANIERNLREEGIYSV(SEQIDNO.78)
- [0107] Hum Wilsons : YEGMTQSCVSSIEGKYRKLQGVVRYKVSL(SEQIDNO.79)
- [0108] Rice Cu ATPase : GMSQGCAGAVRRVLTKEGVETFDIDME(SEQIDNO.80)
- [0109] *H.pylori* Cu ATPase : VPSTCSHCVDKIEKFVGEIEGVSFIDANVE(SEQIDNO.81)
- [0110] Ran1 : VTGMTCAACNSVEAALMNVDVGGMTCGGCSASVKKLLESQPCVASASV(SEQ ID NO.82)
- [0111] Cpx89 : VSGMVCAACSTAVENALLSCSGV(SEQ ID NO.83)
- [0112] Paa1 : DVGGMTCGGCSASVKKILESQP(SEQ ID NO.84)
- [0113] Cpx1184 : DVGGMKCGGCVHEVKKILEEQFGVTSAS(SEQ ID NO.85)
- [0114] 또한 상기와 같은 생체 내에서 발견되는 천연(wild type) 금속이온 결합 모티프를 기반으로 하여 인위적으로 디자인된 여러 가지 금속 이온 결합 모티프도 본 발명에 따른 변형항체-약물접합체의 제조에 사용될 수 있는데, 이러한 예로는 징크 핑거 단백질의 금속 이온 결합 펩타이드 모티프 중에서 시스테인 잔기를 포함하지 않는 GGH

모티프를 기반으로 하는 CGH 모티프 (Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8: 601-610), 혹은 펩타이드 모티프 내에 존재하는 여러 개의 시스테인 잔기 중 하나 이상의 시스테인을 트레오닌(threonine)이나 세린(serine), 히스티딘 (Histidine) 등 다른 아미노산 잔기로 치환한 (Jancso et al. (2011) Metallomics 3(12):1331-1339) 금속 이온 결합 모티프 등을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 CGH 모티프는 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 특히 C 말단과 N 말단에 알라닌이 위치하는 ACGHA 구조를 가지는 것이 바람직하다.

화학식 1



[0115]

[0116]

상기 화학식 1에서, M은 금속 이온을 의미하며, R은 시스테인을 제외한 아미노산 잔기, 특히 알라닌이 바람직하다.

[0117]

본 발명에 따른 CGH 모티프는 N-말단과 C-말단의 위치가 바뀌어도 여전히 금속 이온 결합 특성을 가지므로, 본 발명에서의 CGH 모티프에는 N-말단과 C-말단의 위치가 바뀐 HGC 모티프도 포함됨은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[0118]

징크핑거 모티프를 기반으로 하여 인위적으로 합성된 금속이온 결합 모티프로는 PYKCPECGKSFSQKSALVKHQRTHTH에서 가장 필수적인 역할을 하는 시스테인 잔기나 히스티딘 잔기중 시스테인을 메틸기가 치환된 메틸-시스테인기(Me-Cys)로 치환되거나 또는 히스티딘 잔기를 시스테인으로 치환된(Roehm and Berg, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120. 13083-13087 참조) 다음과 같은 금속 결합 펩타이드 모티프가 사용될 수 있다.

[0119]

PYKCPECGKSFSQKSALVKHQRTHTC(SEQ ID NO.86),

[0120]

PYKCPECGKSFSQKSALVKHQRTHTM(SEQ ID NO.87),

[0121]

PYKCPECGKSFSQKSALVKHQRTHT(Me-C) (SEQ ID NO.88),

[0122]

PYK(Me-C)PECGKSFSQKSALVKHQRTHTH(SEQ ID NO.89),

[0123]

PYKCPE(Me-C)GKSFSQKSALVKHQRTHTH(SEQ ID NO.90),

[0124]

PYKCPE(Me-C)GKSFSQKSALVKHQR(SEQ ID NO.91)

[0125]

상기 금속 결합 펩타이드 모티프에서, Me-C는 메틸기가 치환된 시스테인 잔기를 의미한다.

[0126]

이외에도, 현재까지 보고된 많은 금속 이온 결합 단백질 모티프를 기반으로 하는 인위적 합성 펩타이드들도 사용가능하다. 단백질의 2차 및 3차 구조에 기반한 금속 이온 결합 모티프들은 beta-sheet, 혼재된 alpha/beta 모티프, 그리고 가장 많이 발견되는 alpha-헬릭스 구조 등을 들 수 있는데, alpha-헬릭스 구조에는 단일 사슬뿐만 아니라 이중 사슬, 삼중 사슬, 4중 사슬 alpha-헬릭스 구조를 갖는 펩타이드들이 있다.

[0127]

이들 다중 사슬의 alpha-헬릭스로는, 예를 들어 TRI 패밀리의 경우에는 LKALEEK 시퀀스의 펩타이드가 4개가 연속되는 G(LKALEEK)₄G의 구조를 갖는다. 이러한 TRI 패밀리에 특정 아미노산을 시스테인으로 치환한 인위적으로 합성된 금속 이온 결합 펩타이드 모티프들이 보고된 바 있으며 (Peakcock et al. 2009. Dalton Trans. 7(13). 2271-2280), 아래와 같은 구조를 갖는 이들 인위적으로 합성된 펩타이드 모티프들이 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0128]

GLKALEEKCKALEEKLKALEEKLKALEEKG(SEQ ID NO.92)

[0129]

GLKALEEKLKALEEKLKACEEKLKALEEKG(SEQ ID NO.93)

[0130]

GLKALEEKCKALEEKLKACEEKLKALEEKG(SEQ ID NO.94)

[0131]

GLKALEEKLKALEECKALEEKLKALEEKG(SEQ ID NO.95)

- [0132] GLKALEEKLKALEEKLKALEEKC KALEEKG (SEQ ID NO.96)
- [0133] GLKALEEKLKALEEKLKALEEKLKAAEEKC KALEEKG (SEQ ID NO.97)
- [0134] GLKALEEKLKALEEKC KALEEKLKAAEEKC KALEEKG (SEQ ID NO.98)
- [0135] ELYALEKELGALEKELACLEKELGALEKELYALEK (SEQ ID NO.99)
- [0136] KLYALKEKLGALKEKLACLEKELGALKEKLYALKE (SEQ ID NO.100)
- [0137] ELYALEKELGALEKELACLEKELGALKEKLYALKE (SEQ ID NO.101)
- [0138] KLYALKEKLGALKEKLACLEKELGALEKELYALEK (SEQ ID NO.102)
- [0139] 이 외에도 원형 구조를 갖는 Cyclo[K 1,12] (QCGVCGKCIACK)와 같은 금속 이온 결합 펩타이드 모티프 (Nivorozhkin et al. 2000. Inorg. Chem. 39(11) 2306-2313) 등 무수히 많은 금속 이온 결합 펩타이드들 또한 사용될 수 있다.
- [0140] 본 발명에 따른 변형항체에 사용될 수 있는 시스테인을 포함하는 금속 이온 결합 모티프를 정리하면, 아래 표 1과 같다.
- [0141] 표 1. 본 발명에서 사용될 수 있는 시스테인 포함 금속 이온 결합 모티프 구조

모티프 구조		
전면 단백질 유래 금속 이온 모티프	단편 모티프	C ₂ H ₂ 그룹 Cys-X ₂₋₄ -Cys-X ₁₂ -His-X ₃₋₅ -His
		C ₄ 그룹 Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys
		C ₆ 그룹 Cys-X ₂ -Cys-X ₆ -Cys-X ₅₋₁₂ -Cys-X ₂ -Cys-X ₆₋₈ -Cys
	전사조절 단백질, 금속 이온 샤페론	Cys-X _n -Cys
	막단백질	HXXWFLX ₂₁₋₂₆ CXLFMVIGXWFLVIX ₁₈₋₂₇ HXXH (X는 임의의 아미노산)
	금속이온 운반 단백질	M-X-C-X-X-C
	인공 합성 금속 이온 모티프	ACGHA
인공 합성 금속 이온 모티프	징크핑거 유래 모티프	PYKCECGKSFSSQKSLVKHQRTHTH 변형 펩타이드
	포인 다중 사슬 α-헬릭스	TRI 패밀 (LKALEEK) _n (n=1~5)의 변형 펩타이드
	기타	Cyclo(K 1,12)-QCGVCGKCIACK ELYALEKELGALEKELACLEKELGALEKELYALEK

- [0142]
- [0143] 이러한 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 모항체의 특이성을 유지하면서 타겟 약물이 결합 가능한 형태라면 모항체의 경쇄 또는 중쇄의 N-말단이나 C-말단 중에서 선택된 하나 이상의 부위에 제한 없이 결합될 수 있지만, 바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 C-말단에 연결되며, 특히 중쇄의 C-말단, 즉 모항체 불변영역(constant region) 말단 부위, 항체 단편이 사용될 경우는 그 단편의 중쇄 C-말단에 결합되는 것이 바람직하다.
- [0144] 하지만, 모항체의 특이성이 유지되는 한, 본 발명에 따른 시스테인 잔기를 포함하는 모티프, 특히 시스테인 잔기를 포함하는 모티프가 금속 이온 결합 모티프와 같이 시스테인 잔기를 포함하며 특정한 작용능이나 2차 혹은 3차 구조를 갖는 펩타이드 모티프인 경우에는 모항체의 중쇄와 경쇄 말단 이외의 다른 위치, 즉 항체의 내부 어느 곳과도 연결될 수 있으며, 긴 사슬의 펩타이드 링커를 통해서 도입될 수도 있다. 가변 영역을 제외한 모항체의 중쇄나 경쇄의 아미노산을 시스테인이나 라이신으로 치환한 변형 항체에 긴 사슬의 탄화수소 링커를 통하여 도입된 항체-약물 접합체의 경우 모항체의 구조적 특성과 항체의 특이성을 유지시킬 수 있음은 잘 알려진 바 있다. 따라서 이러한 위치에 긴 사슬의 펩타이드 링커로 연결된 시스테인 잔기를 포함하는 금속 이온 결합 펩타이드 모티프는 모항체의 특이성을 유지시키면서 동일성(homogeneity)이 높은 항체-약물 접합체를 제공할 수 있다.
- [0145] 본 발명에 따른 변형항체에 있어서, 모항체와 시스테인 잔기를 포함하는 모티프는 아미노 결합을 통한 융합

(fusion) 형태로 직접 결합될 수 있으며, 모항체의 말단 작용기와 시스테인 잔기를 가지는 모티프(motif)의 말단 작용기를 화학적으로 결합하는 형태로 결합할 수도 있고, 제1 링커에 의해 매개된(linker-mediated) 형태의 결합도 가능하다.

[0146] 모항체에 결합된 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif) 내의 시스테인 잔기와 시스테인 잔기의 티올기(-SH)를 통해 직접 결합될 수 있으며, 시스테인과 약물을 연결하는 제2 링커가 삽입된 형태로 결합될 수도 있다.

[0147] 상기 시스테인 잔기를 포함하는 모티프 내의 시스테인 잔기와 약물을 연결하는 제2 링커의 결합은 알킬레이션, 이황화(disulfide) 상호교환 방법 및 트랜스티오에스테르화 반응법이 이용될 수 있다. 상기 제2 링커는 할로아세틸 기능을 포함하는 알킬할라이드 유도체, 말레이미드기를 포함하는 유도체, 아지리딘 유도체, 아크릴로일 유도체, 또는 플루오로벤젠 등을 포함하는 아릴할라이드 유도체로부터 하나 또는 둘 이상 선택되는 것을 특징으로 하지만, 이에 한정되지는 않는다. 상기 유도체들은 알킬화 반응기, 아릴화 반응기, 말레이미드기, 아지리딘기, 아크릴로일기, 또는 피리딜 다이설파이드 및 티오니트로벤조익 산 등을 포함하는 이황화(disulfide) 상호교환 반응기 등에 의해 모티프 내 시스테인 잔기의 티올기와 결합하는 것이 특징이다(Bioconjugate techniques, 2nd edition, pp 182 ~ 192, Gerg T.Hermanson, ELSVIER).

[0148] 일례로, 티올-링커 결합을 위해서 통상적으로 사용되는 말레이미드 기의 경우, 시스테인 잔기의 티올이 말레이미드 기에 대하여 갖는 친핵 반응성이 단백질 중에 존재하는 다른 아미노산 기능기, 예를 들어 리신 잔기의 아미노기 또는 N-말단 아미노기에 비하여 약 1,000배 더 높기 때문에 시스테인에 특이적으로 결합시키는데 활용되고 있다. 그러므로 제2 링커인 말레이미드 또는 요오드아세트아마이드를 특징으로 하는 변형항체-약물 접합체는 시스테인이 티오에테르 결합으로 약물과 결합됨을 알 수 있다. 통상적으로 제2 링커는 항체 상에 존재하는 친핵성 시스테인에 반응하는 친전자성기를 갖는 반응성 부위를 가진다.

[0149] 본 발명에서의 변형항체와 결합되는 약물은 질병의 치료효과가 있는 약물이면 어느 것이라도 제한없이 사용가능하며, 특히 종양 세포의 증식억제 효능이 있는 암 치료용 약물이 바람직하다.

[0150] 구체적으로, 본 발명의 변형항체-약물 접합체에 사용될 수 있는 약물은 세포독성 또는 세포증식 억제 효과를 갖는 임의의 화합물, 부분 또는 기를 포함하며,

[0151] (i) 마이크로투블린 억제제, 유사분열 억제제, 토포이소머라아제 억제제, 또는 DNA 인터칼레이터로서 기능할 수 있는 화합물

[0152] (ii) 효소적으로 기능할 수 있는 단백질 독소

[0153] (iii) 특정 암유전자(oncogene)의 발현을 억제시킬 수 있는 마이크로 RNA (miRNA), siRNA, shRNA; 및

[0154] (iv) 방사선동위원소 등이 포함된다.

[0155] 이러한 약물에는 마이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴, 트리코테센, CC1065(세포독성화합물), 칼리케아미신 및 다른 에네딘 항생제, 타산, 안트라시클린, 메토티렉세이트, 아드리아미신, 빈데신, 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신, 다우노마이신 및 그의 입체이성질체, 동배체, 동족체 또는 유도체, 기타 삽입제인 효소 및 그의 단편, 예를 들어 핵산 분해 효소, 항생제, 및 독소(세균, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 소분자 독소) 및 시스플라틴, CPT-11, 독소루비신, 파클리탁셀 및 도세탁셀 등의 각종 항종양 또는 항암제 등이 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다.

[0156] 또한 본 발명에서 약물 부분 상의 친핵기는 제2 링커 부분 및 제2 링커 시약 상의 친전자성 기와 공유결합을 형성하기 위해 반응할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드기로부터 선택된 하나 이상의 것을 포함하며, 이들로 한정되지는 않는다.

[0157] 본 발명의 상기 제2 링커 부분을 통해 항체와 결합할 수 있는 약물의 수는 상기 기재된 바와 같이 모항체에 결합된 모티프(motif)에 포함된 시스테인 잔기의 수가 증가될수록 증가될 수 있다.

[0158] 상기와 같이 본 발명에 따른 변형항체는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 모항체, 바람직하게는 모항체 C-말단에 결합됨으로써, 약물 결합에 이용될 수 있는 시스테인을 다수 포함할 수 있게 된다. 따라서 본 발명에 따른 변형항체에는 다량의 약물이 결합될 수 있을 뿐만 아니라, 결합된 다량의 약물이 타겟 세포 또는 조직에 효과적으로 전달될 수 있다.

[0159] 또한, 모항체에 결합하는 시스테인 잔기 개수의 조절이 용이하므로, 변형항체-약물 접합체(mADC)에 포함되는 약

물의 개수, 즉 약물의 양을 목적하는 수준으로 용이하게 조절할 수 있다. 이러한 특징은 기존 변형항체-약물 접합체의 단점을 개선한 것으로, 본 발명에 따른 새로운 변형항체-약물 접합체는 우수한 약물 전달체로 사용될 수 있으며, 궁극적으로 암 등의 질병 치료를 위해 효율적으로 사용될 수 있다.

[0160] 또한, 본 발명에서는 모항체 및 하나 이상의 시스템인이 포함된 모티프(motif)와 결합된 변형항체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0161] 상기 모항체는 모항체의 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 포함된 적절한 발현 벡터를 제조하고, 제조된 상기 발현 벡터를 사용하여 원핵 또는 진핵 세포를 형질 전환하여 항체 단백질을 발현시키고, 이후 분리 및 통상적으로 제약적으로 허용가능한 순도로의 정제과정을 포함하여 제조될 수 있다.

[0162] 본 발명에 따른 적절한 발현 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절인자 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로 사용되는 프로모터로써, 원핵 세포에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터가 있으나 이에 제한되지는 않는다. 진핵세포에는 원숭이 바이러스 40(SV40), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV), 예를 들면 HIV의 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 로우스 사코마 바이러스(RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 인간 메탈로티오네인 유래의 프로모터가 있으나 이것으로 제한되지는 않는다.

[0163] 상기 발현 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 형질 전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터는 복제 가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다.

[0164] 외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 발현 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다.

[0165] 본 발명에 따른 모항체 또는 하나 이상의 시스템인이 포함된 모티프가 융합된 변형항체를 발현시키기 위해 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 대장균(Escherichia coli)에서 얻어지는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트형 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ m 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL941이다.

[0166] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 숙주세포에 삽입되어 형질 전환체를 형성한다. 상기 벡터의 적합한 숙주세포는 대장균, 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토마이세스 속(Streptomyces sp.), 슈도모나스 속(Pseudomonas sp.), 프로테우스 미라빌리스(Proteus mirabilis) 또는 스태필로코쿠스 속(Staphylococcus sp.)과 같은 원핵 세포일 수 있다. 또한, 아스페르길러스 속(Aspergillus sp.)과 같은 진균, 피치아 파스토리스(Pichia pastoris), 사카로마이세스 세레비시아(Saccharomyces cerevisiae), 쉬조사카로마세스 속(Schizosaccharomyces sp.) 및 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa)와 같은 효모, 그 밖의 하등진핵 세포, 및 곤충으로부터의 세포와 같은 고등 진핵생물의 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 또한 식물, 포유동물로부터 유래할 수 있다. 바람직하게는, PER.C6 세포, 원숭이 신장 세포7(COS7:monkey kidney cells) 세포(특히 시미안(simian) COS 세포), NSO 세포, SP2/0, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO:chinese hamster ovary) 세포, W138, 어린 햄스터 신장(BHK:baby hamster kidney)세포, MDCK, 골수종 세포주, HuT 78 세포 및 HEK293 세포, 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포 등이 이용 가능 하지만 이에 한정되지 않는다.

[0167] 특히 본 발명에 따른 숙주세포는 최대한으로 발현 효율을 높이기 위해 대장균, 시미안(simian) COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 달리 생성하지는 않는 다른 포유동물 숙주 세포로부터 선택

된 하나 이상이 바람직하며, 특히 차이니스 햄스터 난소 세포인 CHO-K1를 숙주세포로 사용하는 것이 바람직하다.

[0168] 본 발명에서 숙주세포로의 '형질 전환'은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타딘 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0169] 상기 발현된 항체 단백질, 즉 항체는 숙주 세포로부터, 배양액의 상청액 또는 용해 후 세포로부터 회수되어 통상의 단백질 정제 기술을 이용하여 본 발명의 하나 이상의 시스테인이 포함된 모티프(motif)가 결합된 변형항체가 제조될 수 있다.

[0170] 상기 항체의 정제 방법은 예를 들어, 단백질 A 세파로오스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 종래의 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지로부터 적절히 분리될 수 있다.

[0171] 시스테인이 포함된 모티프(motif)가 결합된 모항체는 모항체의 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 시스테인이 포함된 모티프(motif)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 연결하여, 융합(fusion)된 형태로 발현될 수 있도록 재조합된 발현 벡터를 제조하고, 이를 원핵 또는 진핵 세포에서 발현시켜, 상기 모항체의 제조방법과 유사한 방법으로 생산, 정제할 수 있다.

[0172] 또한, 모항체와 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)를 각각 발현시키고, 모항체의 말단 작용기와 시스테인 잔기를 가지는 모티프(motif)의 말단 작용기를 화학적으로 결합시키거나, 제1 링커 매개된(linker-mediated) 형태로 결합시켜 항체를 제조할 수 있고, 상기 본 발명의 모항체에 하나 이상의 시스테인이 포함된 모티프(motif)가 결합된 변형항체와 약물을 결합하여 변형항체-약물 접합체(mADC)를 제조할 수 있다.

[0173] 구체적으로는 모항체에 결합된 하나 이상의 시스테인이 포함된 모티프(motif)의 시스테인의 티올기를 이용하여 약물에 결합시켜 제조하는 방법은:

[0174] (a) 하나 이상의 시스테인이 포함된 모티프(motif)가 결합한 모항체는 링커 시약과 반응하여 공유결합을 통하여 항체-제2 링커 중간체를 형성시킨 다음, 이를 활성화 약물 부분과 반응시키는 방법 및

[0175] (b) 약물 부분의 친핵기를 제2 링커 시약과 반응시켜 공유결합을 통하여 약물-제2 링커 중간체를 형성시킨 다음, 이를 하나 이상의 시스테인이 포함된 모티프(motif)와 결합한 모항체의 시스테인기와 반응시키는 방법으로도 제조가능하다.

[0176] 또 다른 양태로서, 본 발명은 변형항체-약물 접합체를 유효성분으로 포함하는 치료용 조성물을 제공한다.

[0177] 상기 조성물에서 변형항체-약물 접합체의 약물은 세포 독성제 또는 세포 증식 억제제, 화학 요법제, 면역 억제제, 항염증제 등이 사용될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 암 치료에 있어서 종양 세포를 사멸 또는 억제하는 약물의 국소적 전달을 위한 항체 접합체의 사용으로 약물 부분이 종양 내로 항체-항원으로 표적화된 전달 및 세포 내로의 축적을 가능하게 한다. 이때 이러한 비결합 약물 제제의 투여는 제거하고자 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에도 허용될 수 없는 수준의 독성을 유발하기도 한다. 하지만, 본 발명에서는 변형항체-약물 접합체에 포함된 항체의 항원에 대한 높은 특이성으로 인해 타겟 세포에 약물을 정확하게 전달할 수 있어, 치료효과를 높일 수 있으며, 또한 높은 효과에도 불구하고 독성으로 인해 사용이 제한적인 약물, 특히 항암제 등의 활용도를 제고할 수 있다. 이에 따라 최소의 독성을 수반한 최고의 효능이 추구되는 항체-약물 접합체가 제조, 정제되어 제공된다.

[0178] 또한 본 발명에서는 변형항체-약물 접합체를 유효성분으로 하여 암, 자가면역, 염증성 또는 감염성 질병 또는 질환이 있는 상기 표적 세포에 접촉하여 표적 세포의 증식을 억제하는 방법을 제공한다.

[0179] 본 발명에서의 치료가능한 암은 간암, 위암, 유방암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부 암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로부터 선택되는 하나 이상의 것으로 이에 한정되지 않는다. 구체적인 예로 시험관내의 HER2-증폭된 유방암 세포인 BT-474에서 변형항체-약물 접합체를 접촉시켜 세포증식 억제를 유도할 수 있다. 그

러므로 본 발명에서의 변형항체-약물 접합체를 유효성분으로 한 억제 방법은 상기 질병과 관련된 세포를 사멸시키거나 증식 속도를 감소시키며 억제시키는 효과를 가지는 것이 분명하다.

발명의 효과

[0180] 본 발명에서는 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 모항체에 결합된 변형항체, 그러한 변형항체와 약물이 결합된 변형항체-약물 접합체(mADC, Modified-Antibody-Drug Conjugate) 및 상기 변형항체 또는 변형항체-약물 접합체의 제조방법을 제공한다.

[0181] 본 발명에 따른 변형항체는 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 모티프(motif)가 모항체에 결합됨으로써, 약물 결합에 이용될 수 있는 시스테인을 다수 포함할 수 있게 되므로, 다량의 약물을 결합될 수 있을 뿐만 아니라, 결합된 다량의 약물이 타겟 세포 또는 조직에 효과적으로 전달될 수 있다. 또한, 모항체에 결합하는 시스테인 잔기 개수의 조절이 용이하므로, 변형항체-약물 접합체(mADC)에 포함되는 약물의 개수, 즉 약물의 양을 목적하는 수준으로 용이하게 조절할 수 있다.

[0182] 또한, 본 발명에 따른 변형항체-약물 접합체는 항원에 대한 높은 특이성으로 인해 타겟세포에 약물을 정확하게 전달할 수 있어, 치료효과를 높일 수 있으며, 높은 효과에도 불구하고 독성으로 인해 사용이 제한적인 약물, 특히 항암제 등의 활용도를 제고할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0183] 도 1은 트라스트주맙 시스테인 추가 변형항체 발현벡터의 개열지도를 나타내는 도면

도 2는 정제 후, HR-Cys의 형태를 western-blot으로 확인한 결과를 나타내는 도면(트라스트주맙 (오른쪽 2 개 레인)과 시스테인이 추가된 트라스트주맙 변이체(HR-Cys, 왼쪽 2 개 레인))

도 3은 HR-Cys-독소루비신 접합체의 결합여부를 UV-VIS 흡광도(A) 및 비환원 SDS-PAGE(B)로 확인한 결과를 나타내는 도면

도 4는 Her-M2(Cys) 항체 변이체와 형광 염료인 Alexa Fluor 488의 접합체인 Her-M2(Cys)-Alexa488을 제조한 후, (A) SDS-PAGE gel에서의 전기영동 결과 (B) 중쇄와 경쇄에 각각 결합한 Alexa488 염료의 상대적인 형광 세기를 분석한 결과를 나타내는 도면

도 5는 HER2 발현 BT-474 세포에서 세포증식도 분석(anti-proliferation MTS assay)을 통하여 HR-Cys-DOX의 세포성장억제 효과를 허셉틴, 허셉틴과 독소루비신 (doxorubicin) 1:2 혼합물, 그리고 독소루비신(doxorubicin)과 비교하여 확인한 결과를 나타내는 도면

도 6은 HER2 발현 SK-BR3 세포에서의 세포 증식도 분석 (anti-proliferation assay)를 통하여 허셉틴-MMAE 항체-약물 접합체인 HER-M2(Cys)-MMAE의 세포성장 억제 효과를 허셉틴과 비교하여 확인한 결과를 나타내는 도면.

도 7은 HER2 발현 SK-BR-3 세포에서 HR-Cys2-MMAE의 세포사멸 효과를 확인하기 위하여 처리 농도별 캐스페이스(caspase) 활성화 현상을 허셉틴과 비교하여 관찰한 결과를 나타내는 도면

도 8은 HER2 발현 SK-BR3 세포에서의 세포사멸이 허셉틴 항체변이체에 접합된 MMAE에 의한 세포사멸(apoptosis) 효과를 확인하기 위하여 처리 농도별 캐스페이스(caspase) 활성화 현상을 허셉틴과 비교하여 관찰한 결과를 나타내는 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0184] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[0185] 본 발명에서 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다. 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

[0186] UV-VIS 분광분석

- [0187] 본 발명에서는 항암제인 독소루비신(6-maleimidocaproyl)hydrazone에 링커를 부착한 약물(DOX-EMCH)을 이용하여 항체-약물 접합체를 제조하였다. DOX-EMCH는 인체에 주사시 혈액내 알부민에 존재하는 시스테인의 티올기와 결합하여 알부민-약물 접합체를 형성하는 약물[Willner et al., Bioconjugate Chem. 1993 (4):521-7]로서 본 발명의 설명에 용이하게 적용될 수 있다.
- [0188] 단백질과 약물의 결합반응 이후 단백질을 정제하여 약물이 여전히 단백질에 결합되어 있는지 확인하기 위해서 통상적으로 적용하는 방법은 단백질과 약물의 UV-VIS 흡광도 최대치를 활용하는 방법이다. 단백질은 통상 280 nm 파장의 UV 영역에서 최대 흡광도를 나타내며 본 발명에 사용된 독소루비신은 495 nm 파장의 가시광선 영역에서 최대흡광도를 가진다. 단백질과 독소루비신 모두 고유의 흡광계수를 가지기 때문에 280 nm 와 495 nm에서의 흡광도를 측정하여 흡광계수를 적용하면 단백질 분자당 결합된 약물의 당량을 측정하였다[US patent 7,528,234 B2].
- [0189] 시험관 내 세포증식 억제능 분석
- [0190] 변형항체-약물 접합체(mADC)의 세포독성 또는 세포 증식 억제성 활성은 수용체 단백질을 갖는 포유동물 세포, 예를 들면 SK-BR-3 세포 혹은 BT-474 세포를 세포배양 배지에서 변형항체-약물 접합체(mADC)에 노출시키고, 세포를 약 6시간 내지 약 5일 동안 배양하고, 세포 생존률을 측정함으로써 확인하였다.
- [0191] 시험관 내 Caspase 3/7 활성 측정
- [0192] 허셉틴은 직접적으로 암세포 사멸을 일으키지 않고 ADCC(antibody dependent cellular cytotoxicity)를 통해 Her2 양성 세포 사멸을 일으킨다. 반면에 약물 치료 방법은 직접적으로 암세포 사멸을 유도(apoptotic cell death) 하기 때문에 caspase 활성을 측정하면 변형항체-약물 접합체(mADC)의 세포독성이 케스페이즈 매개 세포 사멸 (caspase mediated apoptosis)인지 확인할 수 있다 (Bayascas, et al. (2002), Cell Death and Differentiation. 9: 1078-1089; Preaudat, et al (2002), Journal of Biomolecular Screening. 7: 267-274; Phillips, et al. (2008), Cancer Research 68(22): 9280-9290).
- [0193] 본 발명에서는 변형항체-약물 접합체(mADC)에 의한 세포사멸 (apoptosis) 기작을 확인하기 위하여 케스페이즈 3 과 7 (Caspase 3/7)의 활성을 측정하였다. 일반적으로, 변형항체-약물 접합체(mADC)에 의한 세포사멸은, 수용체 단백질을 갖는 포유동물 세포, 예컨대 SK-BR-3 세포 혹은 BT-474 세포를 배지에서 변형항체-약물 접합체(mADC)에 노출시키고, 세포를 약 2일 동안 배양하고, 케스페이즈 활성을 측정함으로써 확인된다.
- [0194] 실시예
- [0195] 실시예 1. 발현 벡터 pAV4의 제조.
- [0196] 본 발명에 필요한 발현벡터 클로닝은 모벡터인 pSGHV0(GenBank Accession No. AF285183)를 이용하여 산업체에서 항체제작에 사용 가능하도록 목적에 맞게 개량시켜 개발한 pAV4 벡터를 이용하였다. 모벡터는 대장균과 같은 박테리아를 이용하여 인체 유래 단백질을 발현시킬 경우 세포 내로 과량 발현되지만, 활성을 가진 물질로 얻기 어려운 단백질의 경우에 동물세포를 이용하여 세포 외로 생리활성을 가진 관심 단백질을 고농도로 발현시켜 손쉽게 정제할 목적으로 제작된 연구용 벡터이다. 그러나 산업체에서 생산용으로 사용하기에는 여러 가지로 제한이 있으므로 이 벡터의 가장 큰 장점인 발현량이 높은 것을 생산에 이용하기 위하여 산업체에서 사용가능하도록 개량한 것이다. 또한 항체의 경우 중쇄(heavy chain)와 경쇄(light chain) 두 개의 단백질을 동시에 발현시켜야 하므로 이러한 목적에 적합한 벡터를 개발하였다.
- [0197] 실시예 2. 트라스트주맵 및 트라스트주맵-시스테인 추가 변형항체의 벡터 제조.
- [0198] 트라스트주맵(HHL002) 벡터를 제조하기 위하여, 트라스트주맵의 중쇄와 경쇄의 cDNA를 CHO 세포에서 발현이 극대화되도록 코돈 최적화된 서열로 각각 합성하였다. 이 유전자를 pAV4 벡터의 XhoI/NotI 과 ApaI/SmaI에 각각 클로닝하여 트라스트주맵 벡터(pHHL002)를 제조하였다.
- [0199] 2.1 트라스트주맵 변형항체 HR-Cys와 HR-Cys-Gly-Cys 제조:
- [0200] 트라스트주맵의 C-말단에 코딩된 라이신을 제거하고 시스테인 잔기 하나만이 추가된 트라스트주맵 시스테인 변형항체(HR-Cys, HHL002C)와 Cys-Gly-Cys(CGC)로 구성된 펩티드가 추가된 또 다른 변형항체(HR-Cys-Gly-Cys, HHL002C2)를 제조하기 위하여, 제조한 트라스트주맵 벡터(pHHL002)를 주형으로 하여 2개의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머들을 이용하여 PCR하였다. 구체적으로는, 트라스트주맵을 주형으로 하여 2개의 프라이머인

XhoHH 정방향 프라이머(5'-GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT -3')와 HHNot 역방향 프라이머(5'-GCG GCC GGC CGC TCA ACA ACC CGG AGA CAG -3'), 또는 HHNot 역방향 프라이머 2(5'-GCG GCC GGC CGC TCA ACA GCC ACA ACC CGG AGA CAG-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 상기 증폭된 뉴클레오티드를 말단에 존재하는 두개의 제한효소인 XhoI과 NotI으로 절단하고, XhoI/NotI 절단부를 가지고 있는 발현 벡터 pHHL002와 접합하여 트라스트주맵 시스템 변형항체 벡터(pHHL002C, pHHL002C2)를 제조하였다. 벡터 모식도는 도 1과 같다. 본 실시예에서 제조된 시스템 추가 변형항체는 C-말단 라이신이 제거되고 시스템 또는 시스템, 글라이신, 시스템이 추가된 트라스트주맵의 시스템 추가 항체이다.

2.2 트라스트주맵 변형항체 HR-M2(Cys) 제조:

금속이온 결합 모티프(CGH) 2개를 갖는 트라스트주맵 변형 항체인 HR-M2(Cys) (HR-ACHGAACGHA, HHL002M2)을 제조하기 위해 트라스트주맵 벡터(pHHL002)를 주형으로 하여 XhoHH 정방향 프라이머(5'-GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT -3')와 M2 역방향 프라이머 (5' CCCC GC GGC CGC CTA GGC ATG GCC ACA AGC AGC ATG GCC ACA GGC GCC GGG AGA CAG AGA 3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 상기 증폭된 뉴클레오티드를 말단에 존재하는 두개의 제한효소인 XhoI과 NotI으로 절단하고, XhoI/NotI 절단부를 가지고 있는 발현 벡터 pHHL002와 접합하여 트라스트주맵 시스템 변형항체 벡터(pHHL002M2)를 제조하였다.

2.3 트라스트주맵 변형항체 HR-M(Cys) 제조:

금속 이온 결합 모티프(CGH)를 하나만 갖는 트라스트주맵 변형 항체인 HR-M(Cys) (HR-GGGACGHA, HHL002M)를 제조하기 위해 위에서 제조한 트라스트주맵 변형항체 HR-M2(Cys)를 주형으로 하여 정방향 프라이머(5'-GGT GGA GGT GCT TGT GGC CAT TAA GC)와 역방향 프라이머(3'-GCC GGG AGA CAG AGA CAG TG)를 사용하여 site-directed mutagenesis (엔지노믹스 EzChange Site-directed mutagenesis kit, Ez004S) 방법으로 PCR을 이용하여 두 개의 금속 이온 결합 모티프 중 C-말단의 모티프를 제거하고 모항체와의 사이에 글라이신 링커를 첨가하였다. 모체 주형인 HR-M2(Cys)는 제한 효소인 DpnI으로 잘라낸 후, PCR을 통해 만들어진 5-M(Cys)는 라이게이즈(ligase)를 이용하여 이중 가닥 DNA로 다시 연결하여 트라스트주맵 변형 항체 벡터(pHHL002M)를 제조하였다.

2.4 트라스트주맵 변형항체 HR-M2L(Cys) 제조

금속이온 결합 모티프(CGH)가 3개의 아미노산 링커로 연결된 트라스트주맵 변형 항체인 HR-M2L(Cys) (HR-ACGHAGGGACGHA, HHL002M2L)를 제조하기 위해 위에서 제조한 트라스트주맵 변형항체 HR-M2(Cys)를 주형으로 하여 정방향 프라이머(5'-GGT GGA GGTGCT TGT GGC CAT GCC TAA GCG)와 역방향 프라이머(3'-AGC ATG GCC ACA GGC GCC)를 사용하여 site-directed mutagenesis (엔지노믹스EzChange Site-directed mutagenesis kit, Ez004S) 방법으로 PCR을 이용하여 두 개의 금속 이온 결합 모티프 사이에 글라이신 링커를 첨가하였다. 모체 주형인 HR-M2(Cys)는 제한 효소인 DpnI으로 잘라낸 후, PCR을 통해 만들어진 5-M2L(Cys)는 라이게이즈(ligase)를 이용하여 이중 가닥 DNA로 다시 연결하여 트라스트주맵 변형 항체 벡터(pHHL002M2L)를 제조하였다.

2.5 트라스트주맵 변형항체 HR-Z(Cys) 제조

금속이온 결합 특성을 갖는 클래스 I(Class I) 징크 핑거 (Zinc Finger) 모티프를 갖는 HR-Z(Cys) (HR-CDICGRKFARSDEKRRHTKIHLRQK, HHL002Z)을 제조하기 위해 트라스트주맵 벡터(pHHL002)를 주형으로 하여 XhoHH 정방향 프라이머(5'-GGG GGG CTC GAG ACC ATG GGT TGG AGC TGT -3', 서열번호 1)와 Z 역방향 프라이머(5'-GCA TGC GGC CGC CTT ACT TCT GCC GCA GGT GGA TCT TGG TAT GCC TTT TTC GCT CGT CGG ATC TAG CAA ATT TGC GTC CAC AAA TAT CGC ATT TGC CGG GAG ACA GAG A-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 상기 증폭된 뉴클레오티드를 말단에 존재하는 두 개의 제한효소인 XhoI과 NotI으로 절단하고, XhoI/NotI 절단부를 가지고 있는 발현 벡터 pHHL002와 접합하여 트라스트주맵 시스템 변형항체 벡터(pHHL002Z)를 제조하였다.

실시예 3. 트라스트주맵 및 트라스트주맵-시스템 추가 변형항체의 발현 및 정제.

차이니스 햄스터 난소세포(CHO-K1)를 이용하여 실시예 1 및 2에서 제조한 트라스트주맵(HHL002) 및 이의 시스템 변형항체들(HHL002C, HHL002C2, HHL002M, HHL002M2, HHL002M2L, HHL002Z)의 단백질 발현을 확인하였다. CHO-K1은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 항생제를 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media)에 37°C, 5% CO₂, 배양기에서 배양 하였다. 트라스트주맵 및 이의 변형항체 발현벡터를 도입하기 하루 전, 100mm 배양접시에 세포를 5x 10⁶/ml 농도로 접종하여 배양한 후, FBS와 항생제가 없는 800μl의 DMEM과 10μg의 트라스트주맵 또는 시스템 변형항체 발현벡터를 혼합하여 상온에서 1분 동안 유지한 후, 20μg의 PEI(Polyethylenimine, linear, Polysciences Inc (Cat. no: 23966, MW~25,000))와 혼합하여 10~15분 정도 상온에서 방치하였다. 이때

하루 전 배양하였던 세포를 PBS로 씻어내고 새로운 배양액 6ml의 DMEM을 첨가하였다. 10~15분 동안 상온에 방치한 트라스트주맵 또는 시스테인 변형항체의 발현벡터를 이 배양접시에 첨가하였다. 다음 날 PBS로 씻어내고 FBS가 없는 IMDM(Cat. No 12200-028, Gibco, Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 배지를 첨가하여 단백질 발현을 확인하였다.

[0211] 이와 같이 발현된 트라스트주맵 및 이의 시스테인 변형항체는 하기와 같이 정제하였다. 구체적으로는, 세포 배양액으로 분비된 트라스트주맵 및 이의 시스테인 변형항체를 정제하기 위하여, 배양액을 원심 분리하여 세포를 제거한 후 상층액을 취하고 이 상층액을 평형 완충용액으로 평형화된 HiTrap Protein A HP(GE Healthcare, 미국) 컬럼에 주입하고 평형 완충용액으로 충분히 세척한 후 Glycine 완충용액(100mM Glycine, pH 2.8)으로 pH를 변화시켜 단백질을 용출시켰다. 상기 용액을 인산염 완충용액으로 투석한 후, Vivaspinn20(Sartorius, 미국)을 사용하여 농축하였고, 최종적으로 고순도로 정제된 단백질을 얻었다.

[0212] 실시예 4. 변형항체와 약물의 접합체 제조

[0213] 4.1 트라스트주맵 기반 변형항체와 약물(독소루비신)의 접합체 제조

[0214] 통상적으로 단백질의 시스테인이 내부 다이설파이드 결합을 이루고 있지 않으면 단백질끼리 다이설파이드를 이루어 이량체를 이루지만, 도 2에서 보는 바와 같이, 본 발명에서 제조된 HR-Cys는 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏(western blot)으로 확인한 바 온전한 항체의 형태로 존재하였다. 또한 자유 티올기를 가지는 시스테인은 세포 내 성분인 글루타치온이나 아미노산으로 존재하는 시스테인과 다이설파이드 결합 상태로 존재할 수 있기 때문에 약물-제2 링커와의 결합 시, 다이설파이드 결합을 해체하기 위하여 DTT(dithiothreitol)나 TCEP(tris(2-carboxyethyl) phosphine)로 대표되는 환원제 처리단계를 필요로 하지만 상온에서 교반하는 처리만으로도 충분히 결합반응이 일어나기도 한다.

[0215] 본 실험에 사용된 제2 링커와 결합된 약물은 DOXO-EMCH로 알려진 독소루비신의 (6-maleimidocaproyl)hydrazine 유도체이며, DOXO-EMCH와 같이 말레이미드기를 가지는 화합물을 단백질의 티올기에 결합시키는 방법은 전술한 문헌에 잘 기재되어 있다.[Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773, page 766; Emmanuel et al. (2010) Chemistry & Biology 2010(17):213-227].

[0216] 본 발명에서는 정제된 HR-Cys와 DOXO-EMCH를 1:10의 몰비율로 혼합하여 상온에서 4시간 교반한 후 염 제거 컬럼으로 잔류 DOXO-EMCH를 제거하고 한외여과법으로 3회 세척함으로써 HR-Cys-독소루비신 결합체(HR-Cys-DOX)를 제조할 수 있었으며 제조된 물질의 결합여부는 UV-VIS 흡광도 측정으로, 도 3에서 보는 바와 같이 확인하였다. 단백질과 약물의 고유한 흡광계수를 이용하여 계산한 결과, HR-Cys 분자당 약 2 분자의 DOXO-EMCH가 결합된 것을 알 수 있었다.

[0217] 4.2. 트라스트주맵 기반 변형항체와 약물(MMAE)의 접합체 제조

[0218] 본 발명에서는 독소루비신보다 세포독성이 훨씬 높다고 알려진 MMAE와 HR-Cys-Gly-Cys를 접합시켜 허셉틴-MMAE 결합체(HR-Cys2-MMAE)를 제조하였다. MMAE로 알려진 아우리스타틴(Auristatin)의 접합 가능성 유도체인 단일 메틸 아우리스타틴 E (monomethyl Auristatin E, [화학식 2] 참조)로서, 세포 내에서 단백질 분해효소(protease)에 의해서 분해되는 발린-시트룰린(valine-citrulline)과 자체 분해 스페이스 그룹인 파라 아닐린 벤조산(para-aniline benzoic acid: PABA)를 통하여 티올기에 선택적으로 결합하는 말레이미드기에 연결되는 구조를 갖는다. 이를 통칭하여 MC(maleimido caproic acid)-VC(valine-citrulline)-PAB-MMAE라고 하며 이에 대한 합성 방법은 이미 알려진 바와 같다 (US patent 6214345; US patent 7745394). 아우리스타틴은 세포내 독성이 강한 물질로써 세포증식 억제 시험에서의 IC50 값이 200~300 pM로 알려져 있다.

[0219] 4.3 말레이미드기를 포함하는 형광 염료 Alexa Fluor 488을 이용한 트라스트주맵 변이항체의 선택적 접합 특성 확인

[0220] 트라스트주맵의 중쇄 C-말단 부위에 도입된 시스테인 잔기에 선택적으로 약물이 접합되는 지를 확인하기 위해서, 티올기에 선택적으로 결합하는 말레이미드기가 치환된 형광 염료인 Alexa Fluor 488를 각각의 트라스트주맵 변이항체와 반응시켰다. 통상적으로 단백질의 시스테인이 내부 다이설파이드 결합을 이루고 있지 않으면 단백질끼리 다이설파이드를 이루어 이량체를 이루지만, 도 2에서 보는 바와 같이, 본 발명에서 제조된 HR-Cys는 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏(western blot)으로 확인한 바 온전한 항체의 형태로 존재하였다. 또한 자유 티올기를 가지는 시스테인은 세포내 성분인 글루타치온이나 아미노산으로 존재하는 시스테인과 다이설파이드 결합 상태로 존재할 수 있기 때문에 약물-제2 링커와의 결합 시, 다이설파이드 결합을 해체하기 위하여 DTT(dithiothreitol)나 TCEP(tris(2-carboxyethyl) phosphine)로 대표되는 환원제 처리단계를 필요로 하지만

상온에서 교반하는 처리만으로도 충분히 결합반응이 일어나기도 한다. 2~4 당량의 환원제는 중쇄의 C-말단에 도입된 시스테인 잔기뿐만 아니라, 중쇄와 경쇄 각각의 사슬내(interchain)의 다이설파이드 결합과 중쇄와 경쇄를 연결하는 사슬간(intrachain) 다이설파이드 결합도 환원시킬 수 있다. 따라서 환원제에 의해 환원된 시스테인기에는 어디에나 형광 염료가 결합될 가능성이 있다. 사슬간 또는 사슬내의 다이설파이드에 결합되는 약물체는 항체-약물 접합체의 동일성(homogeneity)를 떨어뜨리고 또한 결합된 비교적 크기가 큰 약물체는 항체 단백질 자체의 구조적 안정성과 항원 특이성을 저해할 가능성이 크기 때문에 궁극적 바이오 약물 제조에 있어서 그 효용성이 매우 떨어뜨릴 수 있다.

[0221]

트라스트주맵 변이항체 1 당량에 2~4 당량의 TCEP를 가한 후 4도씨에서 30분가량 환원시킨다. 이 과정을 통해서 다이설파이드 결합을 통하여 이량체로 존재하는 변형항체나 단백질 발현과정에서 산화제와 결합되어 있는 형태로 존재할 수 있는 시스테인의 티올 작용기가 말레이마이드기와 결합할 수 있는 환원된 형태로 복원된다. 환원 반응 후 말레이마이드기와 반응성이 있는 DTT 등의 환원제는 원심분리 여과 필터 등을 통해 제거되지만, TCEP의 경우에는 제거하지 않아도 말레이마이드기와 티올기의 결합반응에 관여하지 않는다. TCEP에 의해 환원된 트라스트 주맵 변이항체에 1당량당 2~10 당량의 Alexa Fluor○Or488을 가한 후, 상온에서 2~4시간 가량 흔들어 주면서 반응시킨다. 반응은 과량의 시스테인을 가하여 종결시키고, 반응하지 않고 남은 과량의 염료와 환원제 등은 원심분리 여과 필터로 제거한 후, 인산염 완충용액에서 투석을 통하여 최종의 트라스트주맵 변이항체-Alexa488 염료 접합체를 얻는다.

[0222]

위와 같이 얻은 트라스트주맵 변이항체-Alexa488 염료 접합체를 SDS-PAGE gel에서 전기영동을 통하여 분리한 후, 중쇄와 경쇄에 각각 결합된 염료의 양을 형광 이미지 분석기(Fluorescencen Image Ananlyzer, Typoon9410, Amerssharm Bioscience Ltd.)를 통하여 분석하였다. 형광 이미지 분석은 HR-Cys와 HR-Cys-Gly-Cys 항체 변이체의 경우, 경쇄에 비해서 중쇄에 염료가 상대적 많이 결합됨을 볼 수 있었다. 금속 이온 결합 모티프를 갖는 HR-M(Cys), HR-M2(Cys), HR-M2L(Cys), HR-Z(Cys)의 경우에도 경쇄에 비해서 많은 염료가 결합됨을 볼 수 있다. 도 4에서 보는 바와 같이, HR-M2(Cys) 항체 변이체의 경우, 경쇄에 비해서 중쇄에 결합된 형광 염료의 상대적 형광 세기는 대략 6배 정도로 관찰되었다. 이러한 상대적인 형광세기의 차이는 경쇄에 비해서 중쇄에 결합하는 염료의 양이 훨씬 더 많음을 보여주며, 따라서 중쇄에 대한 말레이마이드기의 선택성이 더 큼을 보여준다.

[0223]

실시예 5. 금속 이온 결합 모티프의 금속 이온 결합력 측정

[0224]

위에서 언급한 바와 같이 금속 이온 결합 모티프인 CGH를 갖는 펩타이드는 금속 이온에 결합하여서 시스테인 잔기의 산화를 억제하거나 느리게 하여, 시스테인의 과산화에 따른 술폰화 반응을 방지한다. 시스테인 잔기의 산화는 두 가지 반응 경로를 통해서 진행될 수 있다. 하나는 티올-티올 결합을 통한 다이 설파이드 결합이 생길 수 있고, 다른 하나는 공기중에서 과량의 산소와 반응하여 산화되어 중간 생성물로 술펜산(sulfenic acid: R-S-OH)가 생성될 수도 있다. 이 경우, 티올-다이설파이드 형성 반응은 가역 반응으로써 환원제를 통하여 다시 티올 단일체로 환원될 수 있지만, 산소가 결합된 설펜산의 형성은 비가역적 반응이다. 다이설파이드와 설펜산은 과량의 산소에 장기간 노출될 경우 모두 비가역적 반응을 통하여 술폰산(R-SO₃H)으로 산화된다. 이러한 술펜산이나 술폰산은 모두 말레이마이드에 대한 반응성이 없으므로 술펜산이나 술폰산으로의 산화는 항체 변이체의 말레이마이드에 대한 반응성을 약화시키고, 따라서 항체-약물 접합체의 접합 수율과 동질성에 큰 영향을 미칠 수 있다.

[0225]

앞서 서술한 바와 같이, 생체내에서 많이 발견되는 금속 이온 결합 모티프인 GGH에서 유래한 합성 모티프인 CGH가 포함된 펩타이드는 금속 이온과의 결합을 통하여 시스테인의 술폰화 반응을 억제함이 보고된 바 있다 (Van Horn et al. (2003) J. Biol. Inorg. Chem. 8: 601-610). 금속 이온 결합 펩타이드 모티프를 포함하는 항체 단백질은 발현과정을 통하여 세포 외로 발현된 후, 세포 배양액에 존재하는 미량의 금속 이온과의 결합을 통하여 시스테인의 술폰화 반응을 효과적으로 억제할 수 있을 것이다. 이러한 금속 이온 결합 펩타이드 모티프를 포함하는 항체 변형체의 금속 이온 결합 특성을 측정하기 위하여 잘 알려진 금속 이온 킬레이터(chelator)인 Fura-2 (Invitrogen, F-1200)을 이용하여 금속 이온 결합의 세기를 측정하였다. 이를 통하여 HR-M2(Cys)는 아연 금속 이온과의 분해 상수(K_d)가 약 20 nM로 매우 강한 결합을 함을 측정하였다. 또한 이들 금속 이온을 포함하는 항체 변이체가 금속 이온과의 결합을 통하여 시스테인 잔기를 보호하는 지를 확인하기 위하여, 금속 이온을 첨가하였을 때의 알킬화 반응 속도를 측정하였다. 아연 금속 이온과는 매우 강한 결합을 하여 금속 이온이 없을 때와 비교하여 24시간까지도 시스테인의 알킬화 반응을 억제하고 있음을 관찰하였다. 니켈 금속 이온의 경우는 아연 금속 이온에 비하여 CGH 모티프에 대한 결합이 크지 않아서, 아연 금속 이온에 비하여는 시스테인의 알킬화를 억제하는 효과가 크지 않았다. 하지만 금속 이온이 없는 경우와 비교하여서는 니켈 금속 이온이 있을 경우,

시스테인의 알킬화 속도가 줄어들음을 확인 할 수 있었다. 아연 금속 이온과 결합한 HR-M2(Cys)에 강한 금속 이온 킬레이터인 EDTA를 첨가하여 아연 금속 이온을 제거한 경우, 시스테인의 알킬화는 금속 이온이 없는 경우와 마찬가지로 알킬화 반응이 빠르게 일어남을 관찰하였다.

[0226]

[0227]

실시예 6. 시험관 내 세포증식억제능 시험.

[0228]

6.1 독소루비신과 변형항체 접합체의 세포증식 억제능

[0229]

BT-474 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM/F12 배지에 희석하여 1×10^4 개/웰이 되도록 조정한 후 100 μ l 세포 배양물을 96-웰 플레이트의 각 웰에 접종하였다. 접종 후 웰 플레이트를 5% 이산화탄소 및 37°C로 설정된 배양기에서 24 시간 동안 배양하여 세포를 플레이트에 부착시켰다. 허셉틴, 허셉틴과 doxorubicin의 1:2 혼합물, 상기 실시예에서 제조된 HR-Cys-DOX, 그리고 doxorubicin을 배지에 희석한 후 100 μ l/웰로 최종 농도 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM 및 0.1 nM이 되게 첨가하였으며, 함께 대조군 웰에는 배지만(약물 없음) 첨가하였다. 5일 동안 배양 후에, 20 μ l/웰로 CellTiter 96-Aqueous One Solution 시약 [MTS-기초 검정; 살아있는 세포의 디하이드로게나제(dehydrogenase)에 의해 MTS가 보라색 포마잔(formazan)을 형성하며, 생성된 보라색 포마잔의 양에 의해 증식측정]을 첨가한 후 37°C로 설정된 배양기에서 2시간 동안 배양 하였다. 10% SDS 용액을 20 μ l/웰 첨가하여 반응을 종료시킨 후 충분히 혼합하여 세포용균을 유도하였다. 세포 용균을 흡광분석기로 측정하였으며, viability(%)로서 도 5에 그래프로 나타냈다. 그 결과 낮은 농도로 처리하였을 때는 HR-Cys-DOX의 세포성장억제 효과는 허셉틴, 그리고 허셉틴과 독소루비신(doxorubicin)의 1:2 혼합물의 효과와 유사하게 나타났으며, 높은 농도에서는 독소루비신(doxorubicin)과 유사한 세포독성을 나타내었다. 본 결과로 부터, HR-Cys-DOX는 허셉틴 고유의 기능을 유지함과 동시에 제2 링커와 연결되어 허셉틴에 결합되어 있음에도 불구하고 독소루비신(doxorubicin) 고유의 세포독성도 충분히 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0230]

6.2. MMAE와 변형항체 접합체의 세포증식 억제능

[0231]

SK-BR3 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM/F12 배지에 희석하여 1×10^4 개/웰(well)이 되도록 조정한 후 100 μ l 세포 배양물을 96-웰(well) 플레이트의 각 웰에 가하였다. 이후 웰 플레이트를 5% 이산화탄소 및 37°C로 설정된 배양기에서 24 시간 동안 배양하여 세포를 플레이트에 부착시켰다. 허셉틴과 상기 예에서 제조한 허셉틴 변이항체-MC-vc-PAB-MMAE 접합체를 배지에 희석한 후 최종 농도 66.7 nM, 33.3 nM, 6.7 nM, 3.3 nM, 0.67 nM, 0.33 nM, 0.067 nM, 및 0.0067 nM이 되게 첨가하였으며, 함께 대조군 웰에는 배지만(약물 없음) 첨가하였다. 5일 동안 배양 후에, 20 μ l/웰로 CellTiter 96-Aqueous One Solution 시약 [MTS-기초 검정; 살아있는 세포의 디하이드로게나제(dehydrogenase)에 의해 MTS가 보라색 포마잔(formazan)을 형성하며, 생성된 보라색 포마잔의 양에 의해 증식 측정]을 첨가한 후 37°C로 설정된 배양기에서 2시간 동안 배양 하였다. 세포 용균을 흡광분석기로 O.D. 490nm에서 측정하여 viability(%)를 측정하였다. HR-Cys-MC-vc-PAB-MMAE, HR-Cys-Gly-Cys-MC-vc-PAB-MMAE, HR-M2(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE, HR-M(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE, HR-M2L(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE, HR-Z(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE 모두 모항체인 허셉틴에 비하여 우수한 세포증식 억제능을 보였다. 도 6에 보이는 것처럼, HR-M2(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE는 모항체인 허셉틴에 비하여 IC50 값은 5배 이상(허셉틴은 viability가 50% 이하로 내려가지 않았으므로 viability 최대값과 최소값의 중간값을 잡았음) 감소하고 높은 농도에서의 세포독성은 항체-약물 접합체가 약 85%가 감소함에 비하여 모항체인 허셉틴은 약 40%만 감소함을 보인다. 이로부터 항체-약물 접합체가 모항체에 비하여 매우 우수한 세포독성과 IC50 값을 보임을 알 수 있었다.

[0232]

실시예 7 : 시험관 내 Caspase 3/7 활성 측정 시험

[0233]

SK-BR-3 세포를 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 희석하여 1×10^4 개/웰(well)이 되도록 조정한 후 100 μ l 세포 배양물을 96-웰 플레이트의 각 웰에 가하였다. 이후 웰 플레이트를 5% 이산화탄소 및 37°C로 설정된 배양기에서 24 시간 동안 배양하여 세포를 플레이트에 부착시켰다. 허셉틴과 상기 실시예에서 제조된 항체 변이체-약물 접합체를 배지에 희석한 후 최종 농도 66.7 nM, 33.3 nM, 6.7 nM, 3.3 nM, 0.67 nM, 0.33 nM, 0.067 nM 및 0.0067 nM이 되게 첨가하였으며, 함께 대조군 웰에는 배지만(약물 없음) 첨가하였다. 48시간 동안 배양 후에, 100 μ l/웰로 Caspase-Glo 3/7 시약 [Caspase-Glo 3/7 검정; 케스페이즈 패스웨이(Caspase pathway)를 통해 세포 사멸이 진행되는 세포에서 형성된 케스페이즈 3, 7의 활성화에 의해 케스페이즈 기질이 분해되어 발광하는

정도 측정]을 첨가한 후 실온에서 30분 동안 배양 하였다. 발광을 루미노미터(luminometer)로 측정하였다.

[0234]

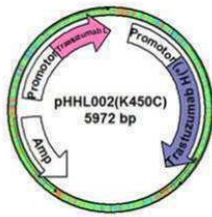
그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 모항체인 허셉틴을 처리한 세포에서는 케스페이즈 활성이 거의 나타나지 않았으나 HR-Cys2-MMAE 처리 세포는 농도가 증가함에 따라 케스페이즈 3와 7의 활성이 높게 나타남을 보였다. 본 결과로부터, HR-Cys2-MMAE 는 허셉틴과 달리 세포내로 수송된 HR-Cys2-MMAE에서 유리된 MMAE 약물이 케스페이즈 패스웨이를 통해 세포사멸을 일으킴을 확인할 수 있었다.

[0235]

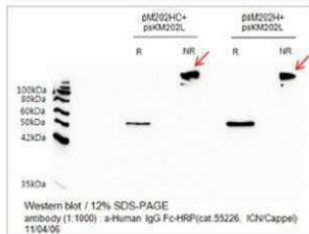
또한, 도 8에 나타난 바와 같이 모항체인 허셉틴을 처리한 세포에서는 케스페이즈 활성이 거의 나타나지 않았으나 HR-M2(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE 처리 세포는 농도가 증가함에 따라 케스페이즈 3와 7의 활성이 높게 나타남을 보였다. 본 결과로부터, HR-M2(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE는 허셉틴과 달리 세포내로 수송된 HR-M2(Cys)-MC-vc-PAB-MMAE에서 유리된 MMAE 약물이 케스페이즈 패스웨이를 통해 세포사멸을 일으킴을 확인할 수 있었다.

도면

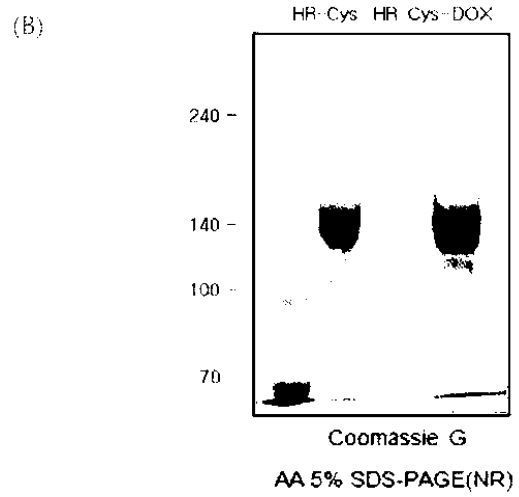
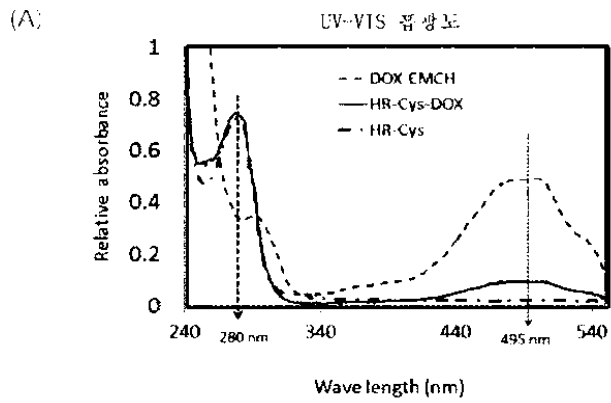
도면1



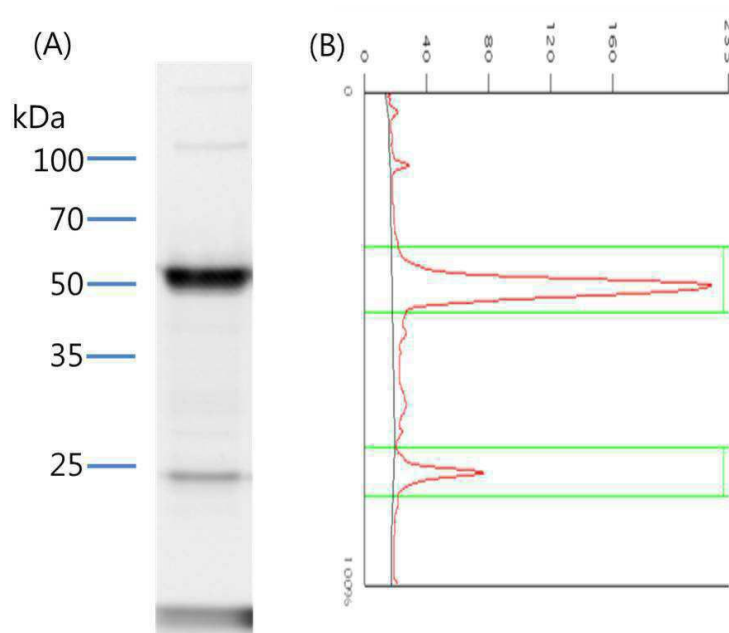
도면2



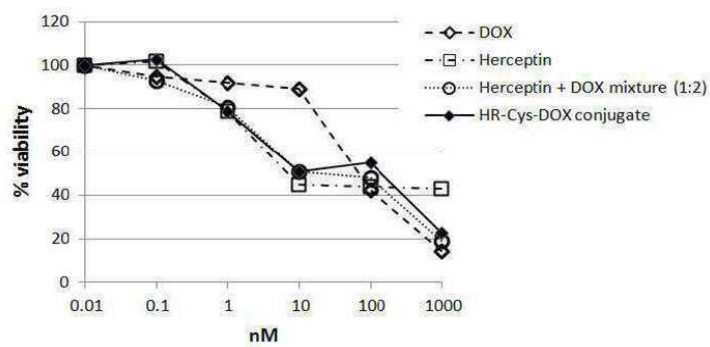
도면3



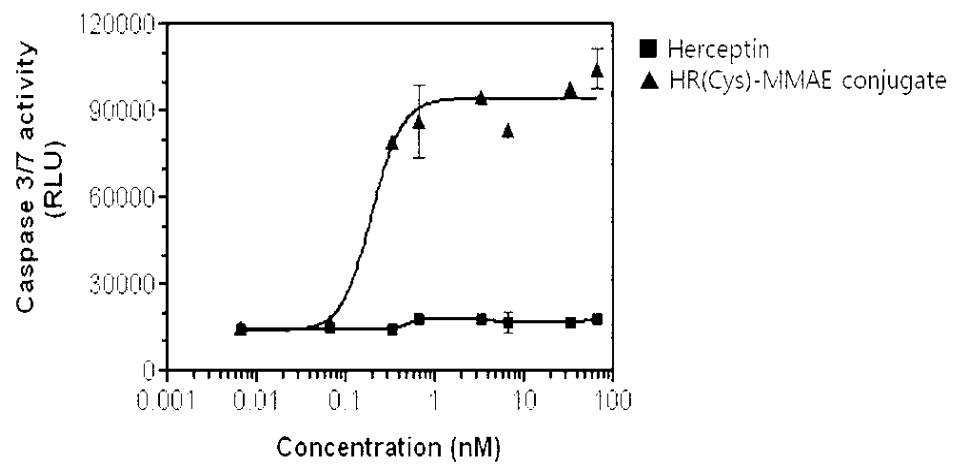
도면4



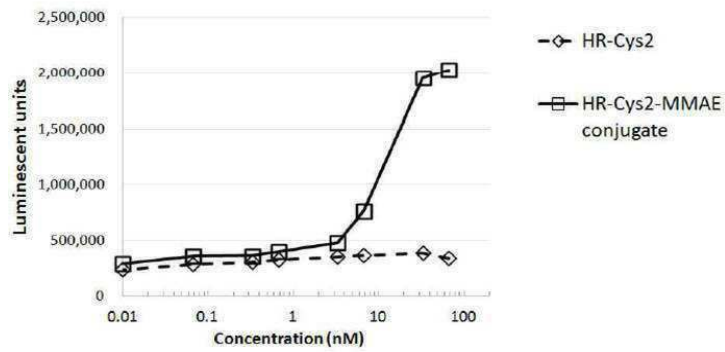
도면5



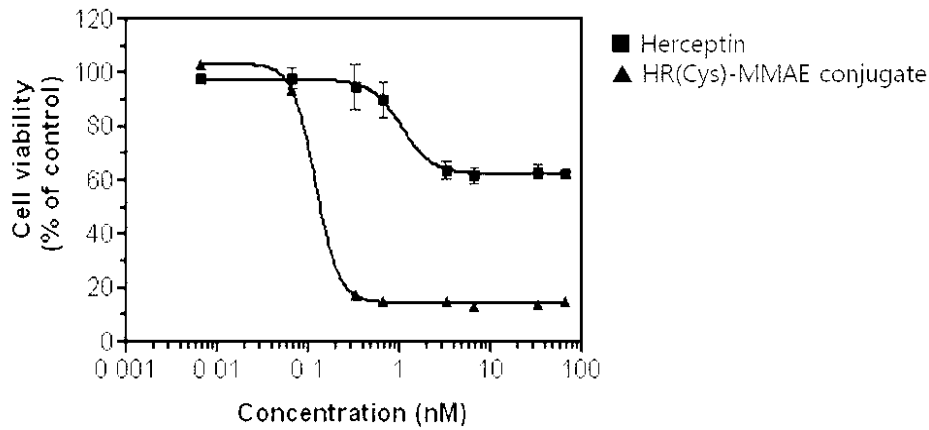
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Alteogen InC
- <120> Antibody variant with cysteine residues, antibody-drug conjugate comprising the antibody variant, and method of manufacturing thereof
- <130> P13-B030
- <160> 102
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SEQ ID NO.1
- <400> 1

Tyr Lys Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Gly Cys Pro Ser Asn Leu

1 5 10 15
Arg Arg His Gly Arg Thr His

20
<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SEQ ID NO.2
<400> 2

Tyr Gln Cys Asn Ile Cys Gly Gly Lys Cys Phe Ser Cys Asn Ser Asn
1 5 10 15
Leu His Arg His Gln Arg Thr His

20
<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SEQ ID NO.3
<400> 3

Tyr Ser Cys Gly Ile Cys Gly Lys Ser Phe Ser Asp Ser Ser Ala Lys

1 5 10 15
Arg Arg His Cys Ile Leu His

20
<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> SEQ ID NO.4
<400> 4

Tyr Thr Cys Ser Asp Cys Gly Lys Ala Phe Arg Asp Lys Ser Cys Leu
1 5 10 15
Asn Arg His Arg Arg Thr His

20

<210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.5

<400> 5
 Tyr Arg Cys Lys Tyr Cys Asp Arg Ser Phe Ser Asp Ser Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Gln Arg His Val Arg Asn Ile His
 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.6

<400> 6
 Tyr Lys Cys Lys Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn His Ser Ser Asn Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys His His Arg Ile His
 20

<210>
 > 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.7

<400> 7
 Phe Lys Cys Pro Val Cys Gly Lys Ala Phe Arg His Ser Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 Val Arg His Gln Arg Thr His
 20

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.8

<400> 8

Tyr Arg Cys Lys Tyr Cys Cys Asp Arg Ser Phe Ser Ile Ser Ser Asn

1 5 10 15

Leu Gln Arg His Val Arg Asn Ile His

20 25

<210> 9

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.9

<400> 9

Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ala Phe Ser Ile Gly Ser Asn Leu

1 5 10 15

Asn Val His Arg Arg Ile His

20

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.10

<400> 10

Tyr Gly Cys His Leu Cys Cys Lys Ala Phe Ser Lys Ser Ser Asn Leu

1 5 10 15

Arg Arg His Glu Met Ile His

20

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.11

<400> 11

Tyr Lys Cys Lys Glu Cys Gly Gln Ala Phe Arg Gln Arg Ala His Leu

1 5 10 15

Ile Arg His His Lys Leu His

20

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.12

<400> 12

Tyr Lys Cys His Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ile Gln Ser Phe Asn Leu

1 5 10 15

Arg Arg His Glu Arg Thr His

20

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.13

<400> 13

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

1 5 10 15

Asn Arg His Ile Lys Leu His

20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.14

<400> 14

Tyr Thr Cys Ser Tyr Cys Gly Lys Ser Phe Thr Gln Ser Asn Thr Leu

1 5 10 15

Lys Gln His Thr Arg Ile His

20

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.15

<400> 15

Tyr Ala Cys His Leu Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ser Ser His Arg

1 5 10 15

Arg His Glu Lys Thr His

20

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.16

<400> 16

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

1 5 10 15

Thr Arg His Gln Lys Ile His

20

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.17

<400> 17

Tyr Ala Cys His Leu Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Cys Ser His Leu

1 5 10 15

Arg Arg His Glu Lys Thr His

20

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.18

<400> 18

Tyr Ala Cys His Leu Cys Ala Lys Ala Phe Ile Gln Cys Ser His Leu

1 5 10 15

Arg Arg His Glu Lys Thr His

20

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.19

<400> 19

Tyr Val Cys Arg Glu Cys Gly Arg Gly Phe Arg Gln His Ser His Leu

1 5 10 15

Val Arg His Lys Arg Thr His

20

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.20

<400> 20

Tyr Lys Cys Glu Glu Cys Glu Gly Lys Ala Phe Arg Gln Ser Ser His

1 5 10 15

Leu Thr Thr His Lys Ile Ile His

20

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.21

<400> 21

Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser His Leu

1 5 10 15

Asn Val His Lys Arg Thr His

20

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.22

<400> 22

Tyr Met Cys Ser Glu Cys Gly Arg Gly Phe Ser Gln Lys Ser Asn Leu

1 5 10 15

Thr Ile His Gln Arg Thr His

20

<210> 23

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.23

<400> 23

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

1 5 10 15

Thr Lys His Lys Lys Ile His

20

<210> 24

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.24

<400> 24

Phe Glu Cys Lys Asp Cys Gly Lys Ala Phe Ile Gln Lys Ser Asn Leu

1 5 10 15

Ile Arg His Gln Arg Thr His

20

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.25

<400> 25

Tyr Val Cys Arg Glu Cys Arg Arg Gly Phe Ser Gln Lys Ser Asn Leu

1 5 10 15

Ile Arg His Gln Arg Thr His

20

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.26

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Arg His Lys Lys Ser His

20

<210> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.27

<400> 27

Tyr Glu Cys Val Gln Cys Gly Lys Ser Tyr Ser Gln Ser Ser Asn Leu

1 5 10 15

Phe Arg His Gln Arg Arg His

20

<210> 28

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.28
 <400> 28
 Tyr Glu Cys Val Gln Cys Gly Lys Gly Phe Thr Gln Ser Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Ile Thr His Gln Arg Val His
 20
 <210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.29
 <400> 29
 Tyr Glu Cys Asn Thr Cys Arg Lys Thr Phe Ser Gln Lys Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Ile Val His Gln Arg Thr His
 20
 <210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.30
 <400> 30
 Tyr Val Cys Ser Lys Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ser Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Thr Val His Gln Lys Ile His
 20
 <210> 31
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.31

<400> 31

Tyr Lys Cys Asp Glu Cys Gly Lys Asn Phe Thr Gln Ser Ser Asn Leu

1 5 10 15

Ile Val His Lys Arg Ile His

20

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.32

<400> 32

Tyr Glu Cys Asp Val Cys Gly Lys Thr Phe Thr Gln Lys Ser Asn Leu

1 5 10 15

Gly Val His Gln Arg Thr His

20

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.33

<400> 33

Tyr Lys Cys Pro Asp Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Ser Leu

1 5 10 15

Ile Arg His Gln Arg Thr His

20

<210> 34

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.34

<400> 34

Tyr Glu Cys Gln Asp Cys Gly Arg Ala Phe Asn Gln Asn Ser Ser Leu

1 5 10 15

Gly Arg His Lys Arg Thr His

20

<210> 35

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.35

<400> 35

Tyr Glu Cys Asn Glu Cys Gly Lys Phe Phe Ser Gln Ser Ser Ser Leu

1 5 10 15

Ile Arg His Arg Arg Ser His

20

<210> 36

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.36

<400> 36

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

1 5 10 15

Thr Arg His Lys Ile Val His

20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.37

<400> 37

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

1 5 10 15

Arg Val His Gln Arg Ile His

20

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.38

<400> 38

Tyr Glu Val His Asp Cys Gly Lys Ser Phe Arg Gln Ser Thr His Thr

1 5 10 15

Leu Thr Gln His Arg Arg Ile His

20

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.39

<400> 39

Tyr Glu Cys His Asp Cys Gly Lys Ser Phe Arg Gln Ser Thr His Leu

1 5 10 15

Thr Arg His Arg Arg Ile His

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> SEQ ID NO.40

<400> 40

His Lys Cys Leu Glu Cys Gly Lys Cys Phe Ser Gln Asn Thr His Leu

1 5 10 15

Thr Arg His Gln Arg Thr His

20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.41

<400> 41

Tyr Val Cys Asp Val Glu Gly Cys Thr Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Leu Asn Arg His Lys Lys Arg His

20 25

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.42

<400> 42

Tyr His Cys Asp Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His

20 25

<210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.43

<400> 43

Tyr Arg Cys Ser Trp Glu Gly Cys Glu Trp Arg Phe Ala Arg Ser Asp

1 5 10 15

Glu Leu Thr Arg His Phe Arg Lys His

20 25

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.44

<400> 44

Phe Ser Cys Ser Trp Lys Gly Cys Glu Arg Arg Phe Ala Arg Ser Asp

1 5 10 15
 Glu Leu Ser Arg His Arg Arg Thr His
 20 25
 <210> 45
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.45
 <400> 45

Phe Ala Cys Ser Trp Gln Asp Cys Asn Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Ala Arg His Tyr Arg Thr His
 20 25
 <210> 46
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.46
 <400> 46

Tyr His Cys Asn Trp Asp Gly Cys Gly Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His
 20 25
 <210> 47
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.47
 <400> 47

Phe Leu Cys Gln Tyr Cys Ala Gln Arg Phe Gly Arg Lys Asp His Leu
 1 5 10 15
 Thr Arg His Met Lys His Ser His
 20

<210> 48
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.48
 <400> 48
 Cys Arg Cys Asn Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Arg Asp His Leu
 1 5 10 15

Val Arg His Gln Arg Thr His
 20

<210> 49
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.49
 <400> 49
 Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu
 1 5 10 15

Lys Thr His Thr Arg Thr His
 20

<210> 50
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.50
 <400> 50
 Phe Ala Cys Glu Val Cys Gly Val Arg Phe Thr Arg Asn Asp Lys Leu

1 5 10 15
 Lys Ile His Met Arg Lys His

20

<210> 51
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.51

<400> 51

Tyr Val Cys Asp Val Glu Gly Cys Thr Trp Lys Phe Ala Arg Ser Asp

1 5 10 15

Lys Leu Asn Arg His Lys Lys Arg His

20 25

<210> 52

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.52

<400> 52

Tyr Lys Cys Met Glu Cys Gly Lys Ala Phe Asn Arg Arg Ser His Leu

1 5 10 15

Thr Arg His Gln Arg Ile His

20

<210> 53

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.53

<400> 53

Tyr Ile Cys Arg Lys Cys Gly Arg Gly Phe Ser Arg Lys Ser Asn Leu

1 5 10 15

Ile Arg His Gln Arg Thr His

20

<210> 54

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.54

<400> 54

Tyr Glu Cys Lys Glu Cys Gly Lys Ala Phe Ser Ser Gly Ser Asn Phe
1 5 10 15

Thr Arg His Gln Arg Ile His
20

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.55

<400> 55

Phe His Cys Gly Tyr Cys Glu Lys Ser Phe Ser Val Lys Asp Tyr Leu
1 5 10 15

Thr Lys His Ile Arg Thr His
20

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.56

<400> 56

Tyr Glu Cys Asp His Cys Gly Lys Ala Phe Ser Val Ser Ser Asn Leu
1 5 10 15

Asn Val His Arg Arg Ile His
20

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.57

<400> 57

Tyr Thr Cys Lys Gln Cys Gly Lys Ala Phe Ser Val Ser Ser Ser Leu
1 5 10 15

Arg Arg His Glu Thr Thr His

20

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.58

<400> 58

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

1 5 10 15

Ile Arg His Gln Arg Ile His

20

<210> 59

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.59

<400> 59

Tyr Arg Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ala Phe Arg Trp Pro Ser Asn Leu

1 5 10 15

Thr Arg His Lys Arg Ile His

20

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.60

<400> 60

Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg

1 5 10 15

Lys Arg His Thr Lys Ile His

20

<210> 61

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.61

<400> 61

Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu

1 5 10 15

Thr Arg His Ile Arg Ile His

20

<210> 62

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.62

<400> 62

Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg

1 5 10 15

His Thr Lys Ile His

20

<210> 63

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.63

<400> 63

Cys Glu Ile Phe Cys Tyr Asp Glu Glu Lys Val Asn Arg Ile Gln Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ala Asp Glu Asn Arg Ala Lys Ile Thr Tyr Ala Leu Cys Gln Asp

35 40 45

Glu Glu Leu Cys Val Cys

50

<210> 64

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.64

<400> 64

Cys Asp Thr His Leu Val His Leu Asp Asn Val Arg Ser Ser Gln Ala

1 5 10 15

Gln Ile Leu Pro Thr Asp Lys Ala Gln Gln Met Ala Glu Ile Phe Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Cys Val Cys

50

<210> 65

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.65

<400> 65

Cys Asp Gln Pro Leu Val His Leu Glu Gln Val Arg Gln Val Gln Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Leu Ala Asp Pro Ser Arg Leu Arg Leu Met Ser Ala Leu Ala Arg

35 40 45

Gln Glu Leu Cys Val Cys

50

<210> 66

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.66

<400> 66

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

Lys Gln Glu Leu Cys Val Cys
 50 55

<210> 67
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.67
 <400> 67

Leu Ser Asp Glu Thr Arg Leu Gly Ile Val Leu Leu Leu Arg Glu Met
 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Cys Val Cys Asp Leu Cys Met
 20 25

<210> 68
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.68
 <400> 68

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

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

<210> 69
 <211> 26
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.69

<400> 69

Tyr Arg Ala Ala Met Pro Val Val Arg Ala Leu Val Ala Tyr Leu Thr

1 5 10 15

Glu Asn Cys Cys His Gly Thr Arg Asp Cys

20 25

<210> 70

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.70

<400> 70

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

1 5 10 15

Val Arg Tyr Ala Leu Ala Asp Ser His Leu Ala Arg Ala Leu Gly Glu

20 25 30

Leu Val Gln Val Val Leu Ala Val Asp Thr Asp Gln Pro Cys

35 40 45

<210> 71

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.71

<400> 71

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

1 5 10 15

Ser Arg Tyr Glu Leu Ala Asp Glu Arg Leu Gly His Ala Leu Asp Asp

20 25 30

Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Val Asp Ala Asp Arg Thr Cys Pro Asp

35 40 45

Ala Asp Glu Leu Glu Cys Cys

50 55

<210> 72

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.72

<400> 72

Val Ser Gly Met Asp Cys Ala Ala Cys Ala Arg Lys Val Glu Asn Ala

1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Ala Gly Val Asn Gln Val Gln Val Leu Phe Ala

20 25 30

<210> 73

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.73

<400> 73

Val Pro Gly Met Thr Cys Ser Ala Cys Pro Ile Thr Val Lys Lys Ala

1 5 10 15

Ile Ser Glu Val Glu Gly Val Ser Lys Val Asp Val Thr Phe Glu

20 25 30

<210> 74

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.74

<400> 74

Ile Thr Gly Met Thr Cys Asp Ser Cys Ala Ala His Val Lys Glu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 75

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.75

<400> 75

Val Gln Gly Phe Thr Cys Ala Asn Cys Ala Gly Lys Phe Glu Lys Asn

1 5 10 15

Val Lys Lys Ile Pro Gly Val Gln Asp Ala Lys Val Asn Phe Gly

20 25 30

<210> 76

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.76

<400> 76

Val Glu Gly Met Thr Cys Asn Ser Cys Val Trp Thr Ile Glu Gln Gln

1 5 10 15

Ile Gly Lys Val Asn Gly Glu His His Ile Lys Val Ser Leu Glu

20 25 30

<210> 77

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.77

<400> 77

Val Val Met Thr Cys Ser Gly Cys Ser Gly Ala Val Asn Lys Val Leu

1 5 10 15

Thr Lys Leu Glu Pro Asp Val Ser Lys Ile Asp Ile Ser

20 25

<210> 78

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.78

<400> 78

Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys Val Ala Asn Ile Glu Arg Asn Leu Arg

1 5 10 15

Arg Glu Glu Gly Ile Tyr Ser Val

20

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.79

<400> 79

Tyr Glu Gly Met Thr Cys Gln Ser Cys Val Ser Ser Ile Glu Gly Lys

1 5 10 15

Tyr Arg Lys Leu Gln Gly Val Val Arg Tyr Lys Val Ser Leu

20 25 30

<210> 80

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.80

<400> 80

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

1 5 10 15

Lys Met Glu Gly Val Glu Thr Phe Asp Ile Asp Met Glu

20 25

<210> 81

<211> 31

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.81

<400> 81

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

1 5 10 15

Val Gly Glu Ile Glu Gly Val Ser Phe Ile Asp Ala Asn Val Glu

20 25 30

<210> 82

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.82

<400> 82

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

1 5 10 15

Leu Met Asn Val Asn Gly Val Asp Val Gly Gly Met Thr Cys Gly Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ser Val

50

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.83

<400> 83

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

1 5 10 15

Leu Leu Ser Cys Ser Gly Val

20

<210> 84

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.84

<400> 84

Asp Val Gly Gly Met Thr Cys Gly Gly Cys Ser Ala Ser Val Lys Lys

1 5 10 15
 Ile Leu Glu Ser Gln Pro
 20
 <210> 85
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.85
 <400> 85
 Asp Val Gly Gly Met Lys Cys Gly Gly Cys Val Glu His Val Lys Lys

1 5 10 15
 Ile Leu Glu Glu Gln Phe Gly Val Thr Ser Ala Ser
 20 25
 <210> 86
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.86
 <400> 86
 Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala

1 5 10 15
 Leu Val Lys His Gln Arg Thr His Thr Cys
 20 25
 <210> 87
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SEQ ID NO.87
 <400> 87
 Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala

1 5 10 15
 Leu Val Lys His Gln Arg Thr His Thr Met
 20 25

<210> 88

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.88

<400> 88

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys His Gln Arg Thr His Thr Cys
20 25

<210> 89

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.89

<400> 89

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys His Gln Arg Thr His Thr His
20 25

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.90

<400> 90

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys His Gln Arg Thr His Thr His
20 25

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.91

<400> 91

Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Lys Ser Ala

1 5 10 15

Leu Val Lys His Gln Arg

20

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.92

<400> 92

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Cys Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Gly

20 25 30

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.93

<400> 93

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Lys Ala Cys Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Gly

20 25 30

<210> 94

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.94

<400> 94

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Cys Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Lys Ala Cys Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Gly

20 25 30

<210> 95

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.95

<400> 95

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Cys

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Gly

20 25 30

<210> 96

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.96

<400> 96

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Glu Lys Cys Lys Ala Leu Glu Glu Lys Gly

20 25 30

<210> 97

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.97

<400> 97

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Ala Glu Glu Lys Cys Lys Ala

20 25 30

Leu Glu Glu Lys Gly

35

<210> 98

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.98

<400> 98

Gly Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Leu Glu Glu Lys Cys

1 5 10 15

Lys Ala Leu Glu Glu Lys Leu Lys Ala Ala Glu Glu Lys Cys Lys Ala

20 25 30

Leu Glu Glu Lys Gly

35

<210> 99

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.99

<400> 99

Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ala Leu Glu Lys Glu Leu Ala

1 5 10 15

Cys Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ala Leu Glu Lys Glu Leu Tyr Ala Leu

20 25 30

Glu Lys

<210> 100

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.100

<400> 100

Lys Leu Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Leu Gly Ala Leu Lys Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Cys Leu Lys Glu Lys Leu Gly Ala Leu Lys Glu Lys Leu Tyr Ala
 20 25 30

Leu Lys Glu

35

<210> 101

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.101

<400> 101

Glu Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ala Leu Glu Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Ala Cys Leu Lys Glu Lys Leu Gly Ala Leu Lys Glu Lys Leu Tyr Ala
 20 25 30

Leu Lys Glu

35

<210> 102

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SEQ ID NO.102

<400> 102

Lys Leu Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Leu Gly Ala Leu Lys Glu Lys Leu
 1 5 10 15

Ala Cys Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ala Leu Glu Lys Glu Leu Tyr Ala
 20 25 30

Leu Glu Lys

35