



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0018989
 (43) 공개일자 2013년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 7/08* (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7000714(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2005년05월11일
 심사청구일자 2013년01월10일
 (62) 원출원 특허 10-2012-7015966
 원출원일자(국제) 2005년05월11일
 심사청구일자 2012년07월19일
 (85) 번역문제출일자 2013년01월10일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2005/016441
 (87) 국제공개번호 WO 2005/110456
 국제공개일자 2005년11월24일
 (30) 우선권주장
 60/570,161 2004년05월11일 미국(US)

(71) 출원인
 압제노믹스 코오페라티에프 유.에이.
 네덜란드 1077 제트엑스 암스테르담 스트라빈스키
 란 3111
 (72) 발명자
 린 통화
 대만 타이페이 106 다-안 디스트릭트 신생 에스.
 로드 섹션 3 레인 54 넘버 12 7에프
 창 충 난
 미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 세인트 크
 로익스 레인 602
 (74) 대리인
 유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 T 세포 사멸 유도성 에피토프

(57) 요 약

본 발명은 세포 사멸 유도성 에피토프 및 이를 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 화합물, 에피토프에 대한 항체를 생산하는 방법, 에피토프에 결합하는 화합물을 동정하는 방법, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 방법 및 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

$X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ 를 포함하는 분리된 폴리펩티드로서,

활성화된 T 세포상의 폴리펩티드에 리간드가 결합되면 상기 세포의 사멸이 유도되며,

X_6 은 Asp^o]고;

X_7 은 Tyr, Met, Asn, Trp, 또는 Phe이고;

X_8 은 Phe 또는 Leu^o]고;

X_9 는 Pro^o]고;

X_{10} 은 Glu^o]이고,

상기 폴리펩티드 길이가 5 내지 150개의 아미노산에 해당되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드 길이가 5 내지 15개의 아미노산에 해당되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 14-18로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 $X_6-X_7-X_5-X_9-X_{10}$ 인 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 5

제1항의 폴리펩티드에 결합하여 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항체는 단일클론인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제1항의 폴리펩티드의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항체 생산 방법.

청구항 8

활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 후보 화합물의 동정 방법으로서,

상기 방법은 제 1항의 폴리펩티드를 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하며;

상기 폴리펩티드와 상기 화합물의 결합이, 상기 화합물이 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 후보물질임을 의미하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 화합물은 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 화합물은 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제5항의 항체를 활성화된 T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 방법.

청구항 12

제5항의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 자가면역질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 및 T 세포 유래 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술 분야

[0001]

본 출원은 2004년 5월 11일자 미국 가출원번호 제 60/570,161호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

배경기술

[0002]

원하지 않는 면역반응을 제어하는 것은 자가면역질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 및 T 세포 유래 암을 치료하는데 중요하다. 과도하게 공격적인 T 세포의 활성은 면역억제 또는 면역 허용(immunological tolerance)에 의해 억제될 수 있다. 세포자살은 과도하게 공격적인 T 세포와 같이 불필요한 세포를 제거하고, 면역계의 적절한 기능을 유지하는데 관여하는 것으로 여겨지고 있다(Kabelitz et al. (1993) Immunol Today 14, 338-340; Raff (1992) Nature 356, 397-399).

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0003]

발명의 개요

[0004]

본 발명은 T 세포 사멸 유도성 에피토프(epitope)에 관한 것이다. 상기 에피토프는 특히 상기 에피토프에 결합하는 화합물들을 선별하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물들은 과도하게 공격적인 T 세포가 관여하는 질환의 치료에 유용하다. 이러한 질환들의 예로는 자가면역 질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 및 T 세포 유래 암을 포함한다.

[0005]

본 발명의 일 측면은 분리된 3차 구조의 에피토프에 관한 것이다. 활성화된 T 세포상의 에피토프와 리간드의 결합으로 상기 세포의 사멸이 유도된다. 그러한 에피토프는 이하와 같이 표시된다:

[0006]

(1) X₁-X₂-X₃-X₄-X₅ (서열번호 1),

[0007]

상기에서, X₁은 Tyr, Trp, His, 또는 Met이고;

[0008]

X₂는 Asp이고;

[0009]

X₃은 Ser, Phe, Pro, Glu, 또는 His이고;

[0010]

X₄는 동물에서 자연적으로 형성되는 임의의 아미노산이고; 및

[0011]

X₅는 Pro, Tyr, His, 또는 Trp이며,

[0012]

(2) X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (서열번호 2),

[0013]

상기에서, X₆은 Asp이고;

[0014]

X₇은 Tyr, Met, Asn, Trp, 또는 Phe이고;

[0015]

X₈은 Phe 또는 Leu이고;

[0016]

X₉는 Pro이고; 및

- [0017] X_{10} 은 Glu이며, 또는
- [0018] (3) $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (서열번호 3)
- [0019] 상기에서, X_{11} 은 Pro이고;
- [0020] X_{12} 는 Met이고;
- [0021] X_{13} 은 Glu 또는 Ser이고; 및
- [0022] X_{14} 는 Ile이다.
- [0023] 전술한 임의의 에피토프는 예컨대 폴리펩티드, 두개의 폴리펩티드의 상호작용 부위, 당 모이어티, 당단백질 또는 이들의 구조적, 기능적 동등물일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면은 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$, 또는 $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ 를 포함하는 분리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 활성화된 T 세포상의 폴리펩티드에 대한 리간드 결합으로 상기 세포의 사멸이 유도된다. 일 예로, 상기 폴리펩티드는 4 내지 400개의 아미노산(예, 4 내지 400 중 임의의 정수를 포함)을 포함한다. 예로, 상기 폴리펩티드는 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열번호 1), $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (서열번호 2), $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ (서열번호 3) 또는 서열 번호 4, 6-18 및 20-22중 임의의 것일 수 있다.
- [0025] "분리된 에피토프" 또는 "분리된 폴리펩티드"는 자연적으로 조합된 문자로부터 실질적으로 유리된 에피토프 또는 폴리펩티드, 즉, 적어도 75 건조 중량%(예, 75% 내지 100%의 임의의 수를 포함함)의 순도인 것이다. 순도는 적절한 표준적인 방법, 예컨대 컬럼 크로마토그래피, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동 또는 HPLC 분석에 의해 측정가능하다. 본 발명의 분리된 에피토프 또는 폴리펩티드는 천연원으로부터 정제하거나, 재조합 DNA 기법으로 생산하거나 또는 화학적인 방법으로 제조할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 측면은 전술한 에피토프들 중 어느 하나에 결합하는 신규 화합물에 관한 것이다. 상기 화합물은 단일클론 항체와 같은 항체를 포함한 임의의 문자 종류일 수 있다. 본 발명의 화합물은 본 발명의 에피토프를 검출하고, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는데 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 항체 생산 방법 역시 본 발명의 범위에 속한다. 상기 방법은 전술한 유효량의 에피토프(예, 폴리펩티드)를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 항체는 본 발명의 에피토프를 검출하거나, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는데 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명은 또한 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하기 위한 후보 화합물(예, 단일클론 항체)을 동정하기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본 발명의 화합물과 테스트 화합물을 접촉시키는 단계 및 테스트 화합물이 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다. 테스트 화합물이 에피토프에 결합한다면, 이것은 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하기 위한 후보물질이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 활성화된 T 세포를 본 발명의 화합물과 접촉시킴으로써 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면은 약학적으로 허용가능한 담체와, (1) 폴리펩티드와 같은 본 발명의 에피토프 또는 (2) 에피토프에 결합하는 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명은 자가면역 질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 및 T 세포 유래 암과 같은 과도하게 공격적인 T 세포가 관여하는 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 구체적인 한가지 이상의 예를 하기에 나타낸다. 그외 구성, 목적 및 발명의 이점은 상세한 설명에서 분명해질 것이다.
- [0032] **발명의 상세한 설명**
- [0033] 본 발명은 활성화된 T 세포를 세포자살로 진행시키고 새로운 T 세포 사멸 유도성 에피토프의 접촉에 의해 고갈되도록 유도할 수 있는 예상하지 못하였던 발견을 토대로 한다. 활성화된 T 세포의 고갈은 특히 과도하거나 또는 원하지 않은 T 세포 매개성 면역 반응이나 T 세포 증식과 관련있는 증상의 치료에 유용하다. 예컨대, 활성화된 T 세포의 고갈은 자가면역 질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 또는 T 세포 유도성 암과 관련된 부적합한 T 세포 활성이거나 증식을 감소 또는 제거할 수 있다.

[0034]

따라서, 본 발명은 분리된 3차 구조의 에피토프에 관한 것이다. 활성화된 T 세포상의 에피토프와 리간드의 결합으로 상기 세포의 사멸이 유도된다. 에피토프는 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$, 또는 $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ 로 표시된다. $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$, 또는 $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ 의 3차 구조는 예컨대 Duggan et al., (1995) J Med Chem. 38:3332-41 및 Toogood (2002) J Med Chem. 45: 1543-57에 기재된 바와 같이 컴퓨터 모델링 프로그램을 이용하여 결정할 수 있다. 구조적 및 기능적 에피토프 동등물을 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$, 또는 $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ 의 3차 구조에 따라 설계하여, 공지의 방법으로 제조한 다음, 하기 실시예에 개시된 방법에 의해 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는데 관여하는 그것의 능력을 테스트할 수 있다. 예로, Barbas et al. (2001) Phage display. A laboratory manual. CSHL Press; Parmley et al. (1998) Gene 73, 305-3 18; Scott et al. 15(1990) Science 249, 386-390; 미국 특허 출원번호 20030049252 A1; WO 03/013603 A1; Osborne (1996) Cun Opin Immunol 8:245-248; Lin et al. (1997) J. Immunol. 158, 598-603; Zhang et al. (1995) Nature 377, 348-350; Lai et al. (1995) Eur J Immunol 25, 3243-3248; Mollereau et al. (1996) J Immunol 156; 3184-3 190; 및 Gribben et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92, 811-815를 참조한다.

[0035]

본원에서, "활성화된 T 세포"는 증식 빈도, 속도 또는 범위가 비활성화된 T 세포보다 높은 T 세포이다. 세포의 "사멸"은 프로그래밍화된 세포 사멸, 즉 세포자살을 포함한다. 물질에 의한 "세포 사멸 유도"는 물질로 처리된 세포 집단이 무처리 세포 집단에 비해 높은 사멸율을 나타낼 때 이루어진다. 예로, 아넥신 V 염색 및 FAVS 분석(하기 실시예 참조)로 결정된 바와 같이, 단일클론 항체 m128-9F9, m152-15A7, 또는 m166-43B6으로 처리시, 시험관내에서 세포자살로 진행중인 활성화된 T 세포의 퍼센트는 무처리 세포에 약 두배이다.

[0036]

또한, 본 발명은 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$, $X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$, 또는 $X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}$ 를 포함하는 분리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 상기 폴리펩티드는 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 화합물을 동정하기 위해 사용할 수 있다. 활성화된 T 세포의 표면에서 발현된 폴리펩티드에 대한 이러한 화합물의 결합으로 세포 사멸이 유도된다. 나아가, 자유 폴리펩티드(즉, 세포 표면상에서 발현되지 않는 것)는 세포 표면 폴리펩티드와 내인성 사멸 유도성 리간드에 대해 경쟁함으로써, 원하지 않는 세포 사멸을 저해할 수 있다. 상기 폴리펩티드의 길이 또는 서열은 이들의 사용에 따라 다양할 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 예컨대 분리된 T 세포 표면 단백질, 합성 폴리펩티드 또는 재조합 폴리펩티드로서 수득할 수 있다. 재조합 폴리펩티드를 제조하기 위해, 그것을 코딩하는 핵산은 융합 파트너, 예컨대 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 6x-His 에피토프 텍 또는 M13 유전자 3 단백질을 코딩하는 다른 핵산에 연결시킬 수 있다. 제조되는 융합 핵산은 표준 방법으로 분리할 수 있는 융합 단백질을 적합한 숙주 세포에서 발현된다. 분리된 융합 단백질은 예컨대, 효소적 분해에 의해 추가적으로 처리하여, 융합 파트너를 제거하고 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 수득할 수 있다.

[0037]

본 발명의 에피토프 또는 본 발명의 폴리펩티드를 이용하여 동물(항체 생산을 위해) 또는 인간(질환 치료를 위해)에서 항체를 제조할 수 있다. 단일클론 항체, 다클론 항체, 및 그것의 절편을 동물에서 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예로, Harlow and Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York을 참조한다. 용어 "항체"는 무순상 분자 및 Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (단쇄 항체) 및 dAb(도메인 항체; Ward, et. al. (1989) Nature, 341, 544)와 같은 그것의 단편을 포함한다. 이들 항체는 에피토프를 검출하는데, 예컨대 에피토프(하기 참조)에 결합하는 화합물을 동정하는데 이용할 수 있다. 활성화된 T 세포의 사멸을 유도할 수 있는 항체는 또한 자가면역 질환, 이식 거부 반응, 알레르기성 질환 또는 T 세포 유래 암과 같은 질환 치료에 유용하다. 일반적으로, 본 발명의 에피토프, 예컨대 폴리펩티드는 KLH와 같은 보강제(adjuvant)와 혼합될 수 있으며, 담체 단백질과 커플링되어, 포유류 숙주 내로 주입될 수 있다. 이후, 그러한 동물에서 생산된 항체는 웨პ티드 항원 친화성 크로마토그래피로 정제할 수 있다. 통상적으로 사용되는 숙주 동물로는 토끼, 마우스, 기니아 퍼그, 및 랫을 포함한다. 면역 반응을 증가시키기 위하여 사용될 수 있는 각종 보강제는 숙주의 종류에 따라 결정되며, 프레온드의 보강제(완전 및 불완전), 수산화알루미늄과 같은 미네랄 젤, 표면 활성 물질, 예를 들면, 리조렉시친(lyssolecithin), 플루로닉 폴리올(pluronic polyol)과 같은 표면 활성 성분, 폴리양이온(polyanion), 웨პ티드, 오일 에멀젼, KLH(keyhole limpet hemocyanin), 및 디니트로페놀이 포함된다. 유용한 인간 보강제로는 BCG(bacille Calmette-Guerin)과 코리네박테리움 파르븀 (*Corynebacterium parvum*)이 있다.

[0038]

다클론 항체는 면역화된 동물의 혈청 내에 존재하는 이형적인 항체 분자들의 군집이다. 특정 항원에 대하여 동질적인 항체 군집인 단일클론 항체는, 표준적인 하이브리도마 기법을 이용하여 제조할 수 있다(예로, Kohler et al. (1975) Nature 256, 495; Kohler et al. (1976) Eur J Immunol 6, 511; Kohleret al. (1976) Eur J

Immunol 6,292; and Hammerling et al. (1981) Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y.을 참조한다). 특히, 단일클론 항체는 Kohler 등의 Nature 256: 495(1975) 및 미국 특허 제 4,376,110호에 제시된 바와 같은, 연속 배양 세포주에 의한 항체 분자의 생산 기술; 인간 B-세포 하이브리도마 기술(Kosbor et al., Immunology Today 4: 72(1983); Cole et al., Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026(1983)), 및 EBV-하이브리도마 기술(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96(1983))에 의하여 수득할 수 있다. 이러한 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD를 포함하는 임의의 면역글로불린 클래스 및 그의 서브클래스(subclass)의 항체일 수 있다. 본 발명의 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마는 시험관내 또는 생체내에서 배양할 수 있다. 생체내에서 높은 역가의 단일클론 항체를 생산하는 능력은 특히 유용한 생산 방법이다.

[0039] 또한, "키메라 항체"의 생산을 위해 개발된 기법들을 사용할 수 있다. 예로, Morrison et al. (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81, 6851; Neuberger et al. (1984) Nature 312, 604; 및 Takeda et al. (1984) Nature 314:452을 참조한다. 키메라 항체는 뮤라인 단일클론 항체에서 유래된 가변부 및 인간 면역글로불린의 불변 부위를 가지는 것과 같이, 각각의 부분들이 상이한 동물 종에서 유래된 하나의 분자이다. 대안적으로, 단체 항체의 생산에 대한 기법(미국 특허 제 4,946,778 및 4,704,692호)을 적합하게 수정하여 단체 Fv 항체의 파지 라이브러리를 제작할 수 있다. 단체 항체는 아미노산 브릿지를 통해 Fv 부위의 중쇄와 경쇄 단편을 연결시킴으로써 형성된다. 더욱이, 항체 단편은 공지된 기법으로 제조 가능하다. 예를 들어, 이러한 단편은 비제한적으로, 항체 분자의 패신 절단에 의해 제조할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편과 $F(ab')_2$ 단편의 이황화 결합을 환원시킴으로써 제조 할 수 있는 Fab 단편이 있다. 항체는 당업계에 공지된 방법으로 인간화할 수 있다. 예를 들어, 원하는 결합 특이성을 가지는 단일클론 항체를 상업적으로 인간화시킬 수 있다(Scotgene, Scotland; and Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.). 또한, 형질전환 동물에서 발현되는 것과 같은 완전한 인간 항체도 본 발명의 특징이다(예, Green et al. (1994) Nature Genetics 7, 13; 및 미국 특허 제 5,545,806호와 제 5,569,825호 참조).

[0040] 또한, 본 발명은 본 발명의 에피토프에 결합하며 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 신규 화합물에 관한 것이다. 이러한 화합물은 예컨대 컴퓨터 모델링 프로그램을 이용하여 3차 구조의 에피토프에 따라 설계할 수 있으며, 당업계에 공지된 방법을 이용하여 합성할 수 있다. 또한, 하기한 바와 같이 라이브러리의 스크리닝을 통해 동정할 수 있다.

[0041] 테스트 화합물은 당업계에 공지된 조합 라이브러리 방법으로 수많은 임의의 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 이러한 라이브러리로는, 웹티드 라이브러리, 웹토이드 라이브러리(웹티드의 기능성을 가지는 분자들의 라이브러리이나, 효소 절단에 내성을 가지는 신규한 비웹티드성 벡본을 가진 것), 구조적으로 어드레스할 수 있는 병렬 고형상(spatially addressable parallel solid phase) 또는 용액상 라이브러리(solution phase library), 디콤볼루션(deconvolution) 또는 친수성 크로마토그래피 선별에 의해 수득한 합성 라이브러리, "비드 하나 화합물 하나(one-bead one-compound)" 라이브러리 및 항체 라이브러리가 있다. 예로, Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678-85; Lam (1997) Anticancer Drug Des 12, 145; Lam et al. (1991) Nature 354, 82; Houghten et al. (1991) Nature 354, 84; 및 Songyang et al. (1993) Cell 72, 767를 참조한다.

[0042] 분자 라이브러리 합성의 예시적인 방법들은 당업계, 예컨대 DeWitt et al (1993) PNAS USA 90, 6909; Erb et al (1994) PNAS USA 91, 11422; Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678; Cho et al. (1993) Science 261, 1303; Carrell et al. (1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2059; Carell et al.(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2061; 및 Gallop et al. (1994) J Med Chem 37, 1233에서 확인할 수 있다.

[0043] 화합물 라이브러리는 용액 중에(예, Houghten (1992) Biotechniques 13, 412-421), 또는 비드(Lam (1991) Nature 354, 82-84), 칩(Fodor (1993) Nature 364, 555-556), 세균(U.S. Patent No. 5,223,409), 포자(U.S. Patent No. 5,223,409), 플라스미드(Cull et al. (1992) PNAS USA 89, 1865-1869), 또는 파지(Scott and Smith (1990) Science 249, 3 86-390; Devlin (1990) Science 249 404-406; Cwirla et al. (1990) PNAS USA 87, 6378-6382; Felici (1991) J Mol Biol 222, 301-3 10; and U.S. Patent No. 5,223,409)상에 존재할 수 있다.

[0044] 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하기 위한 후보 화합물을 동정하기 위해, 본 발명의 에피토프를 테스트 화합물과 접촉시키고, 에피토프에 대한 화합물의 결합성을 평가한다. 만약 화합물이 에피토프에 결합하면, 이는 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 후보물이다.

[0045] 스크리닝 분석은 여러가지 방법으로 수행할 수 있다. 예로, 한 가지 방법은 에피토프(또는 에피토프 함유

분자, 예컨대 폴리펩티드 또는 융합 단백질) 또는 테스트 화합물을 고상에 고정하는 단계 및 반응 종료시 고상에 형성된 에피토프-테스트 화합물의 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 실제, 마이크로타이터 플레이트는 고상으로서 용이하게 사용할 수 있다. 고정 성분은 비공유 또는 공유 결합에 의해 고정시킬 수 있다. 비공유 결합은 고형 표면을 고정 성분의 용액으로 간단하게 코팅하여, 플레이트를 건조함으로써 수행될 수 있다. 대안적으로, 고정 성분에 특이적인 고정화된 항체(예, 단일클론 항체)를 사용하여 고상 표면에 고정 성분을 고정할 수 있다. 비-고정 성분은 고정 성분으로 코팅된 고상 표면에 첨가한다. 반응이 완료된 후, 비-고정 성분들의 미결합 분획들은 형성된 모든 복합체들이 고상 표면상에서 고정화된 상태로 유지되는 조건하에서 제거(예, 세정)한다. 이러한 복합체의 검출은 여러가지 방법으로 수행될 수 있다. 비-고정 성분이 미리 표지된 경우, 고상 표면상에 고정화된 표지들이 검출되는 것은 복합체가 형성되었음을 의미한다. 비-고정 성분이 미리 표지되어 있지 않은 경우, 간접적인 표지를 사용하여, 예컨대 비-고정 성분(항체는 표지된 항-Ig 항체로 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있음)에 특이적인 항체를 이용하여, 상기 표면에 형성된 복합체를 검출할 수 있다.

[0046] 대안적으로, 반응은 액체 상에서 수행될 수 있다. 상기 복합체들은 예컨대 에피토프(또는 에피토프 함유 분자)나 테스트 화합물에 특이적인 고정화된 항체를 이용하여 미결합 성분들로부터 분리한다. 이후, 복합체는 예컨대 다른 성분에 특이적인 표지 항체를 이용하여 검출한다.

[0047] 후보 화합물은 하기 실시예에 기재된 방법이나 또는 당업계에 공지된 방법을 이용하여, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 그것의 능력을 확인함으로써 검증할 수 있다. 검증된 화합물은 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하고, 자가면역 질환, 이식 거부반응, 알레르기성 질환 또는 T 세포 유래 암과 같은 질환 치료를 위해 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명은 예컨대 활성화된 T 세포에 본 발명의 화합물을 시험관내에서 접촉시키거나, 또는 본 발명에 따른 유효량의 화합물을 그것이 필요한 개체에게 투여함에 의한, 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 방법을 제공한다. 치료되는 개체는 과도하거나 또는 불필요한 T 세포 매개성 면역 반응을 특징으로 하는 증상을 취득할 위험성이 있거나, 취득한 것으로 동정될 수 있으며, 예컨대 자가면역 질환, 이식 거부반응, 알레르기성 질환 또는 T 세포 유래 암 환자로 동정될 수 있다. 상기 방법은 단독으로 또는 다른 약 또는 요법과 병용 수행될 수 있다.

[0049] 용어 "치료"는 장애, 장애 증상, 질환으로 이차적으로 발생되는 장애 또는 병에 걸리기 위한 소인을 치유, 경감, 완화, 개선, 예방 또는 향상시킬 목적으로 개체에게 조성물을 투여하는 것으로 정의된다. "유효량"은 예컨대 전술한 바와 같이 처리된 개체에게서 의학적으로 바람직한 결과를 발생시킬 수 있는 조성물의 함량이다.

[0050] 치료되는 질환의 예로는, 당뇨병, 관절염(류마토스 관절염, 아동 류머티스성 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 골관절염(osteoarthritis) 및 건선성 관절염(psoriatic arthritis) 포함), 다발성 경화증, 뇌척수염(encephalomyelitis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 전신 낭창성 홍반(systemic lupus erythematosis), 자가면역성 갑상선염(autoimmune thyroiditis), 피부염(아토피성 피부염 및 습진성 피부염), 건선, 조그伦 증후군(Sjogren's Syndrome), 크론 증후군(Crohn's disease), 아프타 궤양(apthous ulcer), 홍채염, 결막염, 각막 결막염, 1형 당뇨병, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염, 천식, 알레르기성 천식, 피부 낭창성 홍반(cutaneous lupus erythematosus), 경피증, 질염, 직장염, 약물 발진(drug eruptions), 나병 전도 반응(leprosy reversal reactions), 나병 결절 홍반(erythema nodosum leprosum), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 알레르기성 뇌척수염, 급성 피사 출혈성 척수염(acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy), 특발성의 진행성 양측 감각신경 난청(idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss), 재생불량성 빈혈, 순수 적혈구 세포성 빈혈(pure red cell anemia), 특발성 저혈소판증(idiopathic thrombocytopenia), 다발연골염(polychondritis), 베게너의 육아종증(Wegener's granulomatosis), 만성 활성 간염(chronic active hepatitis), 스티븐스-존슨 증후군(Stevens-Johnson syndrome), 특발성 스프루(idiopathic sprue), 편평 태선(lichen planus), 그레이브씨병(Graves' disease), 사르코이드증, 초기 담즙 경화(primary biliary cirrhosis), 후부 포도막염(uveitis posterior), 간질성 폐섬유증(interstitial lung fibrosis), 이식편-대-속주 질환, 골수 이식, 간 이식, 또는 임의의 기관 또는 조직의 이식과 같은 이식의 사례(동형 또는 이형 조직을 이용한 이식 포함), 아토피성 알레르기와 같은 알레르기, AIDS, 및 백혈병 및/또는 림프종과 같은 T-세포 종양이 포함되나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0051] 생체내 방법으로, 치료 조성물(예, 본 발명의 에피토프, 폴리펩티드 또는 화합물을 함유하는 조성물)을 개체에 투여한다. 일반적으로, 에피토프, 폴리펩티드 또는 화합물은 약학적으로 허용가능한 담체(예, 생리식염수)에 혼탁하여 경구 투여, 정맥내 주입, 또는 피하, 근육내, 척수강내(intrathecal), 복막내, 직장내, 질내, 비내, 위내, 기도내, 또는 폐내 주사 또는 삽입된다.

- [0052] 필요 투여량은 투여 경로의 선정, 제형의 성질, 개체의 질환 특성, 개체의 신장, 무게, 표면적, 나이 및 성별, 그외 투여중인 약물 및 주치의의 판단에 따라 결정된다. 적정 투여량은 0.01-100.0 mg/kg의 범위이다. 이용 가능한 조성물의 다양성 및 다양한 투여 경로의 상이한 효율성의 측면에서 요구되는 투여량에 있어서의 다양한 변화가 예상된다. 예컨대, 경구 투여는 정맥내 주사에 의한 투여에 비해 더 많은 투여량이 필요할 것으로 예상된다. 이러한 투여량의 변동은 당업계에 잘 이해되고 있는 최적화를 위한 표준 공식 경로를 사용하여 조정할 수 있다. 적절한 전달 비히클(예컨대, 폴리머 미세입자 또는 삽입가능 기구)내 조성물의 캡슐화는 특히 경구 전달에서의 전달 효율성을 증가시킬 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 및 유효량의 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다. 약학적 조성물은 전술한 질환을 치료하는데 사용할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 용매, 분산 매질, 코팅제, 항세균제, 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제를 포함한다.
- [0054] 본 발명의 약학적 조성물은 전형적인 방법을 사용하여 상이한 투여 경로를 위한 제형으로 제형화될 수 있다. 예컨대, 경구 투여용 캡슐, 젤 실(gel seal), 또는 정제로 제형화될 수 있다. 캡슐은 젤라틴 또는 셀룰로오스와 같은 표준 약학적으로 허용되는 임의의 표준 물질을 함유할 수 있다. 정제는 조성 혼합물을 고체 담체 및 윤활제와 함께 압축함으로써 전형적인 절차에 따라 제형화할 수 있다. 고체 담체의 예는 전분 및 슈가 벤토나이트를 포함한다. 조성물은 또한 락토오스 또는 만니톨과 같은 바인더, 통상적인 충전제 및 정제화제를 함유하는 캡슐 또는 경피 정제(hard shell tablet)의 형태로 투여할 수 있다. 약학적 조성물은 비경구 경로로 투여할 수 있다. 비경구 제형의 예는 수용액, 등장 염수 또는 5% 글루코오스 활성 제제, 또는 기타 공지의 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 시클로텍스트린 또는 당업계에 알려진 가용화제를 치료제 전달을 위한 약학적 부형제로서 사용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학적 조성물의 효능은 시험관내 및 생체내에서 평가할 수 있다. 예로, 하기 실시예들을 참조한다. 간략하게 설명하면, 상기 조성물은 시험관내에서 활성화된 T 세포의 사멸을 유도하는 능력에 대해 조사할 수 있다. 생체내 연구에서, 조성물을 동물(예, 마우스 모델)에 주입한 후, 그것의 치료 효과를 분석할 수 있다. 그 결과를 토대로, 적정 투여량 범위와 투여 경로를 결정할 수 있다.
- [0056] 하기 구체적인 실시예들은 예시로서 개시된 것으로, 어떠한 방식으로도 한정하는 것으로 아니다. 추가의 노력 없이도, 당업자는 본 발명에 기재된 바를 토대로 본 발명을 최대한 이용할 수 있을 것이다. 본 발명에 원용된 참조문헌들은 그 전체로서 본 발명에 포함된다.
- ### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용
- [0057] 마우스 비장 세포의 혼탁물 준비
- [0058] 마우스 비장을 HBSS(Hank's balanced salt solution) 8 ml에 침지하고, 멸균된 커버 슬립으로 조심스럽게 잘라 15 ml 원심분리 튜브(Costar)에 넣어 5분간 200 xg로 회전시켰다. 상층물을 버리고, 세포 펠렛은 나머지 완충 액을 첨가하여 튜브 벽을 손가락으로 조심스럽게 두드리면서 혼탁하였다. 혼입된 적혈구(RBC)에 RBC 용해 완충 액(0.6 M NH₄Cl, 0.17 M Tris-base, pH 7.65) 1 ml을 첨가하여 용해한 다음, 2분간 실온에서 반응시키고 HBSS 9 ml로 신속하게 퀸칭하였다. 세포는 200 xg로 5분간 펠렛화하고, 2회 세척한 다음 RPMI 배지에 혼탁하였다. 혼합물내 세포 농도 및 생존성은 혈구 측정기(Cambridge Scientific Inc.) 및 트립판 블루 배척법(Trypan blue exclusion)로 측정하였다.
- [0059] 항-T 세포, 자살 유도성 단일클론 항체의 제조
- [0060] 콘카노발린 A로 활성화된 인간 T 세포로 마우스를 면역화하여 T 세포 자살 유도성 단일클론 항체를 제조하고, 그것의 활성화된 인간 T 세포 결합하여 T 세포 자살을 유도하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 단일클론 항체는 Kohler 및 Milstein((1976) Euro J Immunol 6, 511-519)의 잘 알려진 세포 융합 방법에 따라 제조하여 원하는 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하였다. 이러한 방법에 따라 제조한 단일클론 항체를 생산하는 3종의 하이브리도마는 각각 m128-9F9, m152-15A7, 및 m166-43B6으로 명명하였고, 이들은 시험관내에서 T 세포의 세포자살을 유도할 수 있다.
- [0061] 각 하이브리도마의 농축 배양 상층액을 10분간 20000 xg로 회전시키고, 상층액은 1:1의 비로 결합 완충액(0.1 M 소듐 아세테이트, pH 5.0)으로 희석하였다. 단백질 G 컬럼(약, 1 ml 충전 부피)을 결합 완충액 3-5 ml로 3회 세정하였다. 맑은 배양 상층액을 단백질 G 컬럼에 주입한 다음, 플로우 쓰루(flow-through)를 모아 다시 주입하였다. 이후 컬럼을 결합 완충액 6-10 ml로 세정하였고, 용출 완충액(0.1 M 글리신-HC1, pH 2.8) 5 ml로 컬럼

에 결합된 항체를 용출시켰다. 각 분획은 용출된 항체 1 ml씩 모우고, 이후 용출된 분획은 각 1 ml 분획에 1 M Tris-HCl, pH 7.5 50 μl와 혼합하여 pH를 중성으로 조절하였다. 항체가 함유된 분획을 모아 1회당 3시간씩 3번, PBS, pH 7.4 2 L에 투석하였다. 항체 샘플의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석(BIO-RAD, Hercules, CA)를 이용한 브래드포드 방법으로 결정하였다.

[0062] 활성화된 T 세포의 단일클론 항체에 의한 사멸 유도

[0063] 활성화된 T 세포(상기 참조)를 IL-2 5 ng/ml을 포함하는 RPMI 배지에 최종 농도 5×10^5 cells/ml로 재현탁한 다음, 대조군 Ig, m128-9F9, m152-15A7, 또는 m166-43B6을 처리하였다.

[0064] T 세포 사멸 유도성 항체는 이식 거부 반응, 자가면역 질환 및 알레르기와 같은 T 세포성 질환을 치료하기 위한 치료제로 사용할 수 있는 것으로 잘 알려져 있다. 인간 T 세포에 대한 3종의 단일클론 항체를 제조하고, 이들 단일클론 항체의 활성화된 인간 T 세포의 사멸 유도 능력을 테스트하였다. 하이브리도마 세포주 m128-9F9, m152-15A7, 또는 m166-43B6에서 분비된 단일클론 항체를 포함하는 배양 상층액을 비활성화된 인간 T 세포(0일) 또는 시험관내에서 활성화된 인간 T 세포(7일)중 어느 하나와 6시간동안 배양하였다. 세포는 배양후 아넥신 V로 염색하여 FACS 분석을 수행하였다. CD3 양성 세포는 시험관내에서 활성화된 인간 T 세포나 휴지기 인간 T 세포 중 어느 하나를 계수하는데 사용된다. 세포자살성 세포는 아넥신 V 염색에 양성이다. 표 1은 스캐닝한 모든 T 세포들 중에서 세포자살성 T 세포의 퍼센트를 나타낸 것이다. 예상하지 못하게도, 하이브리도마 세포주 m128-9F9, m152-15A7 및 m166-43B6에서 분비되는 단일클론 항체는 시험관내에서 활성화된 인간 T 세포의 사멸을 유도하였지만 비활성화된 인간 T 세포에는 작용하지 않았다. 휴지기 T 세포에는 작용하지 않으나 활성화된 T 세포에 세포자살을 유도하는 이러한 능력은, 세포자살 경로의 고유 특징이며 T 세포 매개 질환을 표적으로 하는 치료제의 공통된 특징이다.

표 1

세포자살성 T 세포의 퍼센트

| | 무처리 | 항-myC | m128-9F9 | 무처리 | 항-myC | m152-15A7 | m166-43B6 |
|----|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|--------------|
| 0일 | 4.17 | 6.67 | 5.82 | 18.18 | 15.52 | 5.23 | 6.57 |
| 7일 | 12.63 | 13.36 | 28.71 | 24.18 | 23.08 | 51.66 | 49.44 |

[0065] T 세포 사멸 유도성 애피토프의 동정

[0066] 단일클론 항체 m128-9F9, m152-15A7 및 m166-43B6에 의해 인지되는 사멸 유도성 애피토프를 동정하기 위해, 이들 단일클론 항체를 사용하여 폴리펩티드 라이브러리(Ph. D.-12™ Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Inc.)에서 보존적 결합 서열을 스크리닝하였다. 상기 라이브러리는 406-aa M13 유전자 3 단백질에 연결된 여러가지 12-mer 펩티드를 포함하고 있다. 96웰 마이크로타이터 플레이트를 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) 코팅 완충액 중의 10 μg/ml 농도의 항체를 사용하여 4 °C에서 50 μl/웰씩 코팅하였다. 세정한 후, 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6), 5 mg/ml BSA, 0.02% NaN₃(150 μl/we11)을 포함하는 블록킹 완충액과 4 °C에서 1시간 이상 반응시켜 블록킹하였다. 이후, 플레이트는 전술한 폴리펩티드 라이브러리로부터 유래된 융합 단백질을 여러가지 농도로 사용하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 0.5% 트윈 함유 TBS로 세정한 다음, 1 mg/ml BSA 함유 0.2 M 글리신-HCl(pH 2.2) 완충액으로 결합된 융합 단백질을 용출시키고, 1 M Tris-HCl(pH 9.1)로 중화하였다. 용출된 융합 단백질의 아미노산 서열을 이후 결정하였다.

[0067] 단일클론 항체 m128-9F9에 결합된 폴리펩티드 서열은 하기와 같다:

| | | |
|-------|---------------|--------|
| 0069] | WPEDSSYDSWPRG | 서열번호 4 |
| 0070] | LDYDFLPETEP | 서열번호 5 |
| 0071] | TATWDPDYFSDS | 서열번호 6 |
| 0072] | AETDYDPDHFTP | 서열번호 7 |
| 0073] | DARYSHDPAWPG | 서열번호 8 |
| 0074] | AGQKWDPEWPHSG | 서열번호 9 |

- [0075] EPNMDPNWASPSG 서열번호 10
- [0076] KSHYDESWWYNGG 서열번호 11
- [0077] YDHHWTPPTQK 서열번호 12
- [0078] YDHHWPRDDIAP 서열번호 13
- [0079] $X_1 = Y/W/H/M$, $X_2 = D$, $X_3 = S/F/P/E/H$, $X_4 = \text{임의 아미노산}$ 이고 $X_5 = P/Y/H/W$ 인, 보존적 폴리펩티드 서열 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ 을 수득하였다.
- [0080] 단일클론 항체 m166-43B6에 결합된 폴리펩티드 서열은 하기와 같다:
- [0081] QDTWYPDYFPES 서열번호 14
- [0082] SHTLLNDMFPES 서열번호 15
- [0083] SPLRDNFPETLW 서열번호 16
- [0084] ASPYMDNFPEEN 서열번호 17
- [0085] QLVQDWLPEESH 서열번호 18
- [0086] YLDYDFLPETEPP 서열번호 19
- [0087] $X_6 = D$, $X_7=Y/M/N/W/F$, $X_8=F$ 또는 L , $X_9=P$ 이고 $X_{10}=E$ 인, 보존적 폴리펩티드 서열 $X_6-X_7-X_3-X_9-X_{10}$ 을 수득하였다.
- [0088] 단일클론 항체 m152-15A7에 결합된 폴리펩티드 서열은 하기와 같다:
- [0089] YTPMPMEISHSA 서열번호 20
- [0090] MNDKYIPMSISA 서열번호 21
- [0091] KIPHKTLVPMEI 서열번호 22
- [0092] TDSAMEIQTTQ 서열번호 23
- [0093] $X_{11} = P/A$, $X_{12}=M$, $X_{13}=E/S$ 이고 $X_{14} = I$ 인, 보존적 폴리펩티드 서열 $X_{11}-X_1 2-X_{13}-X_{14}$ 를 수득하였다.
- [0094] 단일클론 항체에 의해 인식된 T 세포 사멸 유도성 애피토프의 ELISA 분석
- [0095] 전술한 단일클론 항체에 의해 인식된 사멸 유도성 애피토프의 특이성을 확인하기 위해, 샌드위치 ELISA를 수행하였다. 애피토프 함유 폴리펩티드의 연속 희석물(0.0017 fmol 내지 17 fmol)을 단일클론 항체 m128-9F9, m152-15A7, 또는 m166-43B6로 미리 코팅된 ELISA 플레이트와 반응시켜, 결합 친화성을 측정하였다.
- [0096] 96웰 마이크로타이터 플레이트는 $1 \mu\text{l}/\text{ml}$ 농도의 항체를 $50 \mu\text{l}/\text{웰}$ 로 4°C 에서 하룻밤동안 코팅하였다. 이후 37°C 에서 한 시간 동안 PBS($150 \mu\text{l}/\text{웰}$)중의 0.25% BSA를 반응시켜, 플레이트를 블록킹하였다. 이후, 플레이트는 여러가지 폴리펩티드를 함유하고 있는 융합 단백질과 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 0.05% 트윈 20을 포함하는 PBS(PBST)로 플레이트를 4번 세정한 다음, 융합 파트너에 특이적인 항체를 실온에서 1.5시간동안 반응시켰다. 반응 후, 플레이트는 PBST로 4회 세정하였다. 1 내지 3000배 희석한 알카리 포스파타제(AP)가 접합된 특이적 염소 항-융합 파트너 항체 $50 \mu\text{l}$ 을 각 웰에 첨가하여 37°C 에서 한시간 배양하였다. 효소 반응은 AP 기질 용액(기질 완충액 5 ml 에 용해된 1AP 기질 정제) $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 수행하였다. 선별된 폴리펩티드 모두 선별을 위해 사용된 각 해당 항체에 특이적으로 결합하는 것으로 확인되었다.
- [0097] 기타 구현예
- [0098] 본 명세서에 개시된 모든 구성은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각 구성은 동일하거나, 동등하거나 또는 유사한 목적으로 제공하는 대체 구성으로 치환될 수 있다. 따라서, 별도로 언급되지 않는 한, 개시된 각 구성은 일반적인 동등 또는 유사 구성의 예일 뿐이다.
- [0099] 전술한 기재로부터, 당업자는 본 발명의 필수적인 특징을 용이하게 알 수 있으며, 본 발명의 사상 및 구성으로부터 이탈되지 않는 범위내에서 여러가지 사용 및 조건에 이를 적응시키기 위해 본 발명에 대한 다양한 변이 및 수정을 가할 수 있다. 따라서, 다른 구현예 역시 본 발명의 범위에 속한다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AbGenomics Corporation

<120> T-CELL DEATH-INDUCING EPITOPES

<130> 113062-009W01

<140> PCT/US2005/016441

<141> 2005-05-11

<150> US 60/570,161

<151> 2004-05-11

<160> 23

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Tyr, Trp, His, or Met

<220><221> VARIANT

<222> 2

<223

> Xaa = Asp

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Ser, Phe, Pro, Glu, or His

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = any amino acid that naturally occurring in

animals

<220><221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Pro, Tyr, His, or Trp

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Asp

<220><221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Tyr, Met, Asn, Trp, or Phe

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Phe or Leu

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Pro

<220><221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Glu

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Consensus sequence

<220><221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Pro

<220><221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Met

<220><221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa = Glu or Ser

<220><221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Ile

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 4

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

1

5

10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 5

Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro

1

5

10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 6

Thr Ala Thr Trp Asp Pro Asp Tyr Phe Ser Asp Ser

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 7

Ala Glu Thr Asp Tyr Asp Pro Asp His Phe Thr Pro Gly

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 8

<211

> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 8

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

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 9

Ala Gly Gln Lys Trp Asp Pro Glu Trp Pro His Ser Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 10

Glu Pro Asn Met Asp Pro Asn Trp Asp Ser Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 11

Lys Ser His Tyr Asp Glu Ser Trp Trp Tyr Asn Gly Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 12

Tyr Asp His His Trp Thr Asn Pro Pro Thr Gln Lys

1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 13

Tyr Asp His His Trp Pro Arg Asp Asp Ile Ala Pro

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 14

Gln Asp Thr Trp Tyr Pro Asp Tyr Phe Pro Glu Ser

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 15

<211

> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 15

Ser His Thr Leu Leu Asn Asp Met Phe Pro Glu Ser

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 16

Ser Pro Leu Arg Asp Asn Phe Pro Glu Thr Leu Trp

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 17

Asp Tyr Met Asp Asn Phe Pro Glu Glu Asn

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 18

Gln Leu Val Gln Asp Trp Leu Pro Glu Glu Ser His

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 19

Tyr Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 20

Tyr Thr Pro Met Pro Met Glu Ile Ser His Ser Ala

| | | |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 21

Met Asn Asp Lys Tyr Ile Pro Met Ser Ile Ser Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 22

Lys Ile Pro His Lys Thr Leu Val Pro Met Glu Ile

1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated peptide

<400> 23

Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln

1 5 10