(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0020838
(43) 공개일자 2019년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7004552(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년04월26일
심사청구일자 2019년02월18일
(62) 원출원 특허 10-2014-7029492
원출원일자(국제) 2013년04월26일
심사청구일자 2018년04월20일
(85) 번역문제출일자 2019년02월15일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/053312
(87) 국제공개번호 WO 2013/160879
국제공개일자 2013년10월31일
(30) 우선권주장
JP-P-2012-103929 2012년04월27일 일본(JP)
JP-P-2013-011042 2013년01월24일 일본(JP)

(71) 출원인
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤
일본 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 혼쵸 3-5-1
(72) 발명자
이스미 요시타카
일본 140-8710 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1-2-58 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 내
사토 도시유키
일본 140-8710 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1-2-58 다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

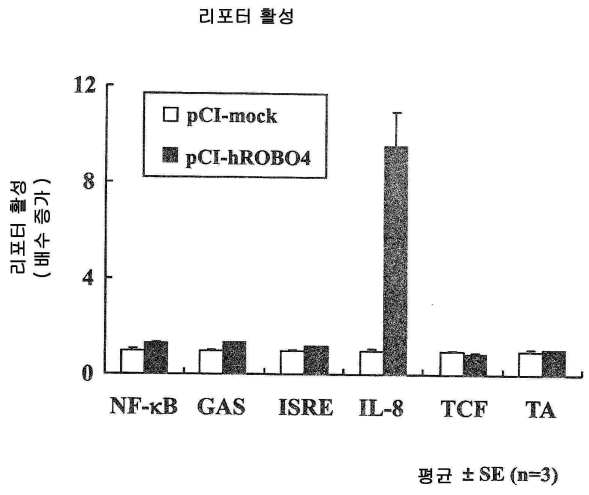
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **항-ROBO4 항체**

(57) 요 약

본 개시내용은 항-혈관신생 활성을 갖는 항체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 ROBO4에 대한 항체 및 이 항체를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용의 목적은 항-혈관신생 효과를 갖는 항-ROBO4 항체, 이 항체를 포함하는 약학 조성물 등, 이 항체를 사용하여 혈관신생을 억제하는 방법 등을 제공하는 것이다. 본 개시내용의 또 다른 목적은 상기 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다. 본 개시내용의 항체는 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시키고 VEGF 또는 bFGF에 의해 유도된 세포 이동에 대한 억제 활성을 갖는다. 본 개시내용의 항체는 생체내 모델에서도 항-혈관신생 효과를 나타낸다. 따라서, 종래기술의 문제점이 해결되었다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
하세가와 준
일본 140-8710 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1-2-58
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 내
이노우에 다츠야
일본 140-8710 도쿄도 시나가와쿠 히로마치 1-2-58
다이이찌 산쿄 가부시키가이샤 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 (i) 내지 (iv)에 따른 항체가 인식하는 항원 상의 부위에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

(I) 1×10^{-8} M 이하의 K_D 값으로 인간 ROBO4 단백질에 결합하고;

(II) 시험관 내에서 교차-연결(cross-linking) 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해하고;

(III) 생체 내에서 혈관신생을 억제 또는 저해하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 44(도 25)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH1, 서열번호 46(도 26)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 68(도 44)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH2, 및 서열번호 48(도 27)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH3을 포함하는 중쇄 및, 서열번호 50(도 28)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 70(도 46)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL1, 서열번호 52(도 29)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL2, 및 서열번호 54(도 30)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL3을 포함하는 경쇄로 구성된 항체,

(ii) 서열번호 31(도 16)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33(도 18)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체,

(iii) 하기 a) 내지 d)로부터 선택된 어느 한 중쇄 가변 영역 및 하기 e) 및 f)로부터 선택된 어느 한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체:

a) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H1형) 가변 영역,

b) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H2형) 가변 영역,

c) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H3형) 가변 영역, 및

d) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H4형) 가변 영역; 및

e) 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L1형) 가변 영역, 및

f) 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L2형) 가변 영역,

(iv) 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 하기 조합 1) 내지 6) 중 어느 한 조합을 포함하는 항체:

1) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

2) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

3) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

4) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

5) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열

번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역 및

6) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역.

청구항 2

인간 ROBO4 단백질과의 결합에 대해서 하기 (i) 내지 (iv)에 따른 어느 하나의 항체와 경쟁하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로서,

(I) 1×10^{-8} M 이하의 K_D 값으로 인간 ROBO4 단백질에 결합하고;

(II) 시험관 내에서 교차-연결(cross-linking) 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해하고;

(III) 생체 내에서 혈관신생을 억제 또는 저해하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편:

(i) 서열번호 44(도 25)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH1, 서열번호 46(도 26)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 68(도 44)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH2, 및 서열번호 48(도 27)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH3을 포함하는 중쇄 및, 서열번호 50(도 28)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 70(도 46)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL1, 서열번호 52(도 29)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL2, 및 서열번호 54(도 30)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL3을 포함하는 경쇄로 구성된 항체,

(ii) 서열번호 31(도 16)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 33(도 18)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체,

(iii) 하기 a) 내지 d)로부터 선택된 어느 한 중쇄 가변 영역 및 하기 e) 및 f)로부터 선택된 어느 한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체:

a) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H1형) 가변 영역,

b) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H2형) 가변 영역,

c) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H3형) 가변 영역, 및

d) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H4형) 가변 영역; 및

e) 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L1형) 가변 영역, 및

f) 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L2형) 가변 영역,

(iv) 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 하기 조합 1) 내지 6) 중 어느 한 조합을 포함하는 항체:

1) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

2) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

3) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

4) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

5) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열

번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역 및

6) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 ROBO4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 단백질인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 ROBO4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 번호 46 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 단백질인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 번호 132 내지 209의 아미노산 서열로 구성된 부위에 결합하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 단일 클론 항체 또는 그의 항원 결합 단편인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체 또는 그의 항원 결합 단편인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체 또는 그의 항원 결합 단편인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 IgG1 또는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 ROBO4에 대해서 1×10^{-8} 이하의 K_D 값을 갖고, 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해하고, 생체내에서 혈관신생을 억제하거나 저해하고, 중쇄 및 경쇄의 하기 조합 1) 내지 6) 중 어느 한 조합을 포함하는 하기 항체 중 어느 한 항체와 아미노산 서열에서 95% 이상 동일한, 항체:

1) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1140),

2) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1143),

3) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2143),

4) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2140),

5) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1040), 및

6) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2040).

청구항 11

제1항에 있어서, 인간 항체 또는 그의 항원 결합 단편인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 12

하기 (I) 내지 (III)으로 구성된 군으로부터 선택되는 핵산:

(I) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산,

(II) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 핵산, 및

(III) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 핵산.

청구항 13

제12항의 핵산의 삽입체를 함유하는 재조합 벡터.

청구항 14

제12항의 핵산 또는 그의 내부에 도입된 제13항의 재조합 벡터를 함유하는 재조합 세포.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 생산하는 세포.

청구항 16

하기 공정(I) 및 (II)을 포함하는, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 제조 방법:

(I) 제14항 또는 제15항의 세포를 배양하는 단계; 및

(II) 상기 공정(I)에서 얻은 배양물로부터 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 수집하는 단계.

청구항 17

제16항의 제조 방법에 의해 제조된 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 18

제1항 내지 제11항 및 제17항 중 어느 한 항에 있어서, N-연결된 글리코실화, O-연결된 글리코실화, N-말단 프로세싱, C-말단 프로세싱, 탈아미드화, 아스파르트산의 이성질체화, 메티오닌의 산화, 프롤린 잔기의 아미드화, 및 중쇄의 1개 또는 2개의 카복실-말단 아미노산의 결여로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 변경을 포함하는, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 19

제1항 내지 제11항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 활성 성분으로서 포함하는 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 혈관신생 질환을 치료하거나 예방하는 데에 사용되기 위한 약학 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제11항, 제17항 및 제18항의 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 활성 성분으로서 포함하는 혈관신생 억제제.

청구항 22

제19항 또는 제20항에 있어서, 추가 치료제 또는 예방제와 병용되는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-혈관신생 활성을 갖는 항체에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 ROBO4에 대한 항체, 및 이 항체를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분자량이 110 kDa인 단백질인 라운드어바웃 상동체(Roundabout homolog) 4(ROBO4)는 단회-통과 경막 구조를 갖고(비특허문헌 1), 공지된 혈관신생 억제제 슬릿(Slit) 상동체 2(Slit2)와의 결합을 통해 혈관신생을 억제하는 것으로 공지되어 있다(특허문헌 1 및 비특허문헌 2). Slit2는 혈관 내피 성장인자(VEGF)에 의해 촉진된 HUVEC의 이동을 억제한다고 보고되어 있고, 또한 ROBO4 유전자로 형질감염된 혈관 내피 세포(이하, 혈관 내피 세포는 "EC"로서도 지칭됨)의 경우 빈 벡터로 형질감염된 EC에 비해 VEGF 또는 bFGF에 의한 세포 이동의 촉진을 억제한다고 보고되어 있다(특허문헌 1 및 비특허문헌 2 내지 4).

[0003] 뿐만 아니라, 세포 이동의 촉진, 내강(lumen) 형성의 촉진 또는 VEGF에 의한 투과성의 증가에 대한 Slit2의 억제 효과는 야생형 마우스로부터 유래된 EC 또는 조절 siRNA로 형질감염된 EC에서 관찰되지만, ROBO4 유전자-넉아웃 마우스로부터 유래된 EC 또는 ROBO4 유전자를 넉다운시키는 siRNA로 형질감염된 EC에서는 관찰되지 않는다고 보고되어 있다(특허문헌 2 및 비특허문헌 4 내지 6). 나아가, Slit2는 삼출성 연령 관련 황반 변성 또는 당뇨망막병증을 갖는 동물 질환 모델인, 레이저-유도된 맥락막 혈관신생 또는 산소-유도된 망막병증을 갖는 마우스 모델에서 ROBO4를 통해 혈관신생 또는 혈관 투과성의 증가를 억제한다고 보고되어 있다(특허문헌 2 및 비특허문헌 4).

[0004] 이들 발견들에도 불구하고, ROBO4가 Slit2에 결합하지 않는다는 것을 보이는 보고도 있다(비특허문헌 9 및 특허문헌 5). ROBO4 유전자-넉아웃 EC의 이동 또는 내강 형성이 억제되기 때문에 ROBO4가 혈관신생의 억제보다는 오히려 혈관신생의 촉진에 참여한다는 그의 기능에 대한 보고도 있다(비특허문헌 10 및 11).

[0005] 임상 실시에서, ROBO4는 결장암, 신경절신경아교종, 방광암, 유방암, 전이성 흑색종, 신장암, 폐암, 간암 또는 결장암으로부터의 간 전이에서 종양내 혈관에서 고도로 발현된다고 보고되어 있다(특허문헌 3 및 비특허문헌 1, 3 및 7). 더욱이, ROBO4는 증식성 당뇨망막병증 환자의 섬유혈관 막 내의 혈관에서도 발현된다고 보고되어 있다(비특허문헌 8). 따라서, ROBO4는 혈관 내피 세포, 특히 병리학적 상태에서 새로 형성된 혈관 내의 내피 세포에서 발현된다. 이것은 ROBO4의 고도 발현으로부터 비롯된 병리학적 혈관신생을 암시할 수 있지만, 병리학적 혈관신생을 억제하기 위한 ROBO4의 보충 발현도 암시할 수 있다.

[0006] 전술된 바와 같이, ROBO4는 항-혈관신생 효과에 관여한다. 따라서, ROBO4에 대한 항체 및 그의 기능성 단편은 혈관신생을 수반하는 질환의 치료에 유용할 것이다. 그러나, ROBO4에 대한 작용제 또는 길항제 항체가 혈관신생을 억제하는지 아니면 촉진하는지는 불확실하다.

[0007] 유럽 특허 제1,565,491호(특허문헌 4) 및 국제 특허출원 공보 제WO2008/100805호(특허문헌 5)에 기재된 항체들도 ROBO4에 대한 항체로서 공지되어 있다(이하, "항-ROBO4 항체"로서 지칭됨). 이들 항체들 중 어느 것도 생체내에서 혈관신생에 대한 억제 또는 저해 효과를 보이지 않는다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 국제 특허출원 공보 제WO2004/003163호

(특허문헌 0002) [특허문헌 2] 국제 특허출원 공보 제WO2008/073441호

(특허문헌 0003) [특허문헌 3] 국제 특허출원 공보 제WO2002/036771호

(특허문헌 0004) [특허문헌 4] 유럽 특허 제1,565,491호

(특허문헌 0005) [특허문헌 5] 국제 특허출원 공보 제WO2008/100805호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] Genomics, 2002, vol. 79, p. 547-552

(비특허문헌 0002) [비특허문헌 2] Developmental Biology, 2003, vol. 261, p. 251-267

(비특허문헌 0003) [비특허문헌 3] Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, vol. 332, p. 533-541

(비특허문헌 0004) [비특허문헌 4] Nature Medicine, 2008, No. 14, p. 448-453

(비특허문헌 0005) [비특허문헌 5] Science Translational Medicine, 2010, vol. 2, p. 23ra19

(비특허문헌 0006) [비특허문헌 6] Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, vol. 107, p. 10520-10525

(비특허문헌 0007) [비특허문헌 7] Oncology Reports, 2006, vol. 15, p.1437-1443

(비특허문헌 0008) [비특허문헌 8] Molecular Vision, 2009, vol. 15, p. 1057-1069

(비특허문헌 0009) [비특허문헌 9] The FASEB Journal, 2005, vol. 19, p. 121-123

(비특허문헌 0010) [비특허문헌 10] BMC Cell Biology, 2008, vol. 9, p. 61-72

(비특허문헌 0011) [비특허문헌 11] The FASEB Journal, 2009, vol. 23, p. 513-522

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 ROBO4에 대한 항체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 추가 목적은 항-혈관신생 효과 등을 갖는 항-ROBO4 항체를 함유하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 추가 목적은 상기 항체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 추가 목적은 상기 항체 등을 사용하여 혈관신생을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 상기 목적들을 달성하기 위해 꾸준한 연구를 수행하였고 결과적으로 ROBO4의 다운스트림 신호의 활성화를 검출하는 스크리닝 시스템을 성공적으로 구축하였다. 더욱이, 본 발명자들은 상기 스크리닝 시스템을 이용하여 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시키고 ROBO4 발현 EC에서 다양한 혈관신생 인자들, 예컨대, VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB 및 SDF-1에 의해 유도된 세포 이동에 대한 억제 활성을 갖고 심지어 생체내 모델에서도 항-혈관신생 효과를 나타내는 신규 항-ROBO4 단일클론 항체를 성공적으로 수득하였다. 이 방식으로, 본 발명이 완성되었다.

[0015] 구체적으로, 본 발명은 하기 (1) 내지 (34)에 관한 것이다:

[0016] (1) 하기 (I) 내지 (III)에 기재된 성질을 갖는 항체 또는 그의 기능성 단편:

[0017] (I) 바람직하게는 1×10^{-8} 이하, 특히 바람직하게는 5×10^{-9} 이하의 K_D 값으로 ROBO4 단백질에 결합하는 성질,

[0018] (II) 시험관내에서 교차-연결(cross-linking) 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해하는 성질, 및

[0019] (III) 생체내에서 혈관신생을 억제하거나 저해하는 성질;

[0020] (2) (1)에 있어서, ROBO4 단백질이 인간 ROBO4 단백질인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0021] (3) (1)에 있어서, ROBO4 단백질이 서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 단백질인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0022] (4) (1)에 있어서, ROBO4 단백질이 서열번호 2의 아미노산 번호 46 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 단백질인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0023] (5) (3) 또는 (4)에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 번호 132 내지 209의 아미노산 서열로 구성된 부위에 결합하는 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0024] (6) (1)에 있어서, 단일클론 항체 또는 그의 기능성 단편인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0025] (7) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 44(도 25)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH1, 서열번호 46(도 26)으로 표시된 아미노산 서열 또는 1개의 아미노산의 치환에 의해 서열번호 46의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열로 구성된 CDRH2 및 서열번호 48(도 27)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH3을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 50(도 28)으로 표시된 아미노산 서열 또는 1개 내지 3개의 아미노산(들)의 치환에 의해 서열번호 50의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열로 구성된 CDRL1, 서열번호 52(도 29)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL2 및 서열번호 54(도 30)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL3을 포함하는 경쇄로 구성된 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0026] (8) (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 44(도 25)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH1, 서열번호 46(도 26)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 68(도 44)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH2 및 서열번호 48(도 27)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH3을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 50(도 28)으로 표시된 아미노산 서열 또는 서열번호 70(도 46)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL1, 서열번호 52(도 29)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL2 및 서열번호 54(도 30)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL3을 포함하는 경쇄로 구성된 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0027] (9) (1) 내지 (7) 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 31(도 16)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 33(도 18)으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0028] (10) (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 있어서, 하기 a) 내지 d)로부터 선택된 어느 한 중쇄 가변 영역 및 하기 e) 및 f)로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 기능성 단편:

[0029] a) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H1형) 가변 영역,

[0030] b) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H2형) 가변 영역,

[0031] c) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H3형) 가변 영역, 및

[0032] d) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄(hMAb1-H4형) 가변 영역; 및

[0033] e) 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L1형) 가변 영역, 및

[0034] f) 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(hMAb1-L2형) 가변 영역;

[0035] (11) (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 있어서, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 하기 조합 1) 내지 6) 중 어느 한 조합을 포함하는 항체 또는 그의 기능성 단편:

[0036] 1) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

[0037] 2) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

[0038] 3) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

[0039] 4) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역,

[0040] 5) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역, 및

[0041] 6) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역;

[0042] (12) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 있어서, 키메라 항체 또는 그의 기능성 단편인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0043] (13) (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 있어서, 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0044] (14) (1) 내지 (13) 중 어느 하나에 있어서, 인간 IgG1 또는 인간 IgG2 중쇄 불변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0045] (15) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 있어서, (7) 내지 (14) 중 어느 하나에 따른 항체에 의해 인식되는 항원 상의 부위에 결합하는 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0046] (16) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 있어서, ROBO4 단백질과의 결합에 대해 (7) 내지 (14) 중 어느 하나에 따른 항체와 경쟁하는 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0047] (17) (1) 내지 (8) 중 어느 하나에 있어서, 중쇄와 경쇄의 하기 조합 1) 내지 6) 중 어느 한 조합을 포함하는 항체 또는 그의 기능성 단편:

[0048] 1) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1140),

[0049] 2) 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1143),

[0050] 3) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2143),

[0051] 4) 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2140),

[0052] 5) 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-1040), 및

[0053] 6) 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄(H-2040);

[0054] (18) (17)에 따른 항체의 중쇄의 변경된 형태를 포함하는 항체로서, 이때 상기 변경된 형태가 상기 중쇄의 1개 내지 수개의 카복실-말단 아미노산(들), 바람직하게는 상기 중쇄의 1개 내지 8개의 카복실-말단 아미노산(들), 보다 바람직하게는 상기 중쇄의 1개 또는 2개의 카복실-말단 아미노산(들)을 결여하는 것인 항체;

[0055] (19) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 있어서, 아미노산 서열 면에서 (17)에 따른 항체와 95% 이상 동일하고, 인간 ROBO4에 대한 1×10^{-8} 이하의 K_D 값을 갖고, 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해하고, 생체내에서 혈관신생을 억제하거나 저해하는 항체;

[0056] (20) (15)에 있어서, 인간 항체 또는 그의 기능성 단편인 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0057] (21) 하기 (I) 내지 (III)으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열:

[0058] (I) (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체의 중쇄 또는 경쇄의 부분 또는 전체 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열,

[0059] (II) (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체의 중쇄 또는 경쇄의 부분 또는 전체 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 뉴클레오티드 서열, 및

[0060] (III) (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체의 중쇄 또는 경쇄의 부분 또는 전체 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성된 뉴클레오티드 서열;

[0061] (22) (21)에 따른 뉴클레오티드 서열의 삽입체(insert)를 함유하는 재조합 벡터;

[0062] (23) 그의 내부에 도입된 (21)에 따른 뉴클레오티드 서열 또는 (22)에 따른 재조합 벡터를 함유하는 재조합 세포;

[0063] (24) (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체를 생성하는 세포로서, 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 CHO 세포, 훨씬 더 바람직하게는 CHOK1SV인 세포;

[0064] (25) (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편의 제조 방법으로서, 하기 단계 (I) 및 (II)를 포함하는 제조 방법:

[0065] (I) (23) 또는 (24)에 따른 세포를 배양하는 단계, 및

[0066] (II) 단계 (I)에서 수득된 배양물로부터 (1) 내지 (20) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편을 수집하는 단계;

[0067] (26) (25)에 따른 제조 방법에 의해 제조된 항체 또는 그의 기능성 단편;

[0068] (27) (1) 내지 (20) 및 (26) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편의 변경된 형태;

[0069] (28) (1) 내지 (20) 및 (26) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 (27)에 따른 변경된 형태를 활성 성분으로서 포함하는 약학 조성물;

[0070] (29) (28)에 있어서, 혈관신생 질환의 치료 또는 예방을 위한 물질인 약학 조성물;

[0071] (30) (28)에 있어서, 혈관신생 질환이 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만인 약학 조성물;

[0072] (31) (28)에 있어서, 혈관신생 질환이 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 수정체뒤섬유증식, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장 또는 각막 조직 이식의 면역 거부인 약학 조성물;

[0073] (32) (1) 내지 (20) 및 (26) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편 또는 (27)에 따른 변경된 형태를 활성 성분으로서 포함하는 혈관신생 억제제;

[0074] (33) (1) 내지 (20) 및 (26) 중 어느 하나에 따른 항체 또는 그의 기능성 단편 또는 (27)에 따른 변경된 형태, 또는 (28) 내지 (31) 중 어느 하나에 따른 조성물을 혈관신생 질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 혈관신생 질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 이때 상기 혈관신생 질환이 바람직하게는 발현된 ROBO4 단백질을 갖는 개체의 혈관신생 질환인 방법; 및

[0075] (34) (28) 내지 (31) 중 어느 하나에 있어서, 추가 치료제 또는 예방제와 병용되는 약학 조성물로서, 이때 상기 치료제 또는 예방제가 바람직하게는 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물인 약학 조성물.

발명의 효과

[0076] 본 발명에 따라, ROBO4에 결합하고 항-혈관신생 효과를 갖는 항체를 함유하는, 혈관신생 질환용 치료제 등이 수득될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 HEK293 세포에서 인간 ROBO4의 일시적인 발현에 있어서 반응 요소로서 NF-κB, GAS, ISRE, IL-8 프로모터 또는 TCF에 대한 리포터 활성의 변화의 존재 또는 부재를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3).

도 2는 HEK293 세포에서 전장 인간 ROBO4 또는 인간 ROBO4의 세포내 영역 결실 변이체의 일시적인 발현에 있어서 IL-8 프로모터 활성의 변화의 존재 또는 부재를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 5 또는 10).

도 3은 항-ROBO4 항체 MAb1에 의해 야기된, 인간 ROBO4-형질감염된 HEK293 세포에서의 IL-8 프로모터 활성의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3).

도 4는 항-ROBO4 항체 MAb2, MAb3 또는 MAb4에 의해 야기된, 인간 ROBO4-형질감염된 HEK293 세포에서의 IL-8 프로모터 활성의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3).

도 5는 항-ROBO4 항체 MAb1에 의해 야기된, VEGF 또는 bFGF의 존재 하에서 HUVEC의 이동 성능의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3 또는 4).

도 6은 항-ROBO4 항체 MAb2, MAb3 또는 MAb4에 의해 야기된, bFGF의 존재 하에서 HUVEC의 이동 성능의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 4).

도 7은 인간 ROBO4, 마우스 ROBO4, 래트 ROBO4 또는 사이노몰구스 원숭이 ROBO4에 대한 항-ROBO4 항체 MAb1의 결합 활성의 존재 또는 부재를 보여주는 도면이다.

도 8은 인간 ROBO1, 인간 ROBO2 또는 인간 ROBO3에 대한 항-ROBO4 항체 MAb1의 결합 활성의 존재 또는 부재를 보여주는 도면이다. 상부 상자는 MAb1에 대한 결과를 보여주고, 하부 상자는 세포 표면 상에서의 이들 단백질들의 발현을 확인시켜준 양성 대조군 항체에 대한 결과를 보여준다.

도 9는 인간 ROBO4의 세포외 영역/도메인 결실 변이체에 대한 항-ROBO4 항체 MAb1의 결합 활성의 존재 또는 부재를 보여주는 도면이다. 상부 상자는 MAb1에 대한 결과를 보여주고, 하부 상자는 세포 표면 상에서의 이들 단백질들의 발현을 확인시켜준 항-FLAG 항체에 대한 결과를 보여준다.

도 10은 항-ROBO4 항체 MAb1에 의해 야기된, 레이저-유도된 맥락막 혈관신생 모델에서의 혈관신생의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시하고(n = 4개의 눈), ■ 또는 □는 각각의 눈의 결과를 보여준다.

도 11은 항-ROBO4 키메라 항체 cMAb1-1 또는 cMAb1-2에 의해 야기된, 인간 ROBO4-형질감염된 HEK293 세포에서의 IL-8 프로모터 활성의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3).

도 12는 항-ROBO4 키메라 항체 cMAb1-1 또는 cMAb1-2에 의해 야기된, bFGF의 존재 하에서 HUVEC의 이동 성능의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 4).

도 13은 전장 인간 ROBO4를 코딩하는 cDNA(서열번호 1)를 보여준다.

도 14는 인간 ROBO4의 전장 아미노산 서열(서열번호 2)을 보여준다.

도 15는 MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 30)을 보여준다.

도 16은 MAb1 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 31)을 보여준다.

도 17은 MAb1의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 32)을 보여준다.

도 18은 MAb1 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 33)을 보여준다.

도 19는 cMAb1의 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 37)을 보여준다.

도 20은 cMAb1 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 38)을 보여준다.

도 21은 cMAb1-1의 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 39)을 보여준다.

도 22는 cMAb1-1 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 40)을 보여준다.

도 23은 cMAb1-2의 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 41)을 보여준다.

도 24는 cMAb1-2 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 42)을 보여준다.

도 25는 MAb1의 중쇄 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 44)을 보여준다.

도 26은 MAb1의 중쇄 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 46)을 보여준다.

도 27은 MAb1의 중쇄 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 48)을 보여준다.

도 28은 MAb1의 경쇄 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 50)을 보여준다.

도 29는 MAb1의 경쇄 CDRL2의 아미노산 서열(서열번호 52)을 보여준다.

도 30은 MAb1의 경쇄 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 54)을 보여준다.

도 31은 hMAb1-H1형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 55)을 보여준다.

도 32는 hMAb1-H1형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 56)을 보여준다.

도 33은 hMAb1-H2형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 57)을 보여준다.

도 34는 hMAb1-H2형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 58)을 보여준다.

도 35는 hMAb1-H3형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 59)을 보여준다.

도 36은 hMAb1-H3형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 60)을 보여준다.

도 37은 hMAb1-H4형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 61)을 보여준다.

도 38은 hMAb1-H4형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 62)을 보여준다.

도 39는 hMAb1-L1형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 63)을 보여준다.

도 40은 hMAb1-L1형 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 64)을 보여준다.

도 41은 hMAb1-L2형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 65)을 보여준다.

도 42는 hMAb1-L2형 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 66)을 보여준다.

도 43은 hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 67)을 보여준다.

도 44는 hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 68)을 보여준다.

도 45는 hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 69)을 보여준다.

도 46은 hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 70)을 보여준다.

도 47은 hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL2의 아미노산 서열(서열번호 71)을 보여준다.

도 48은 hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 72)을 보여준다.

도 49는 H-1040, H-1143, H-1140, H-2040, H-2143 또는 H-2140에 의해 야기된, 인간 ROBO4-형질감염된 HEK293 세포에서의 IL-8 프로모터 활성의 변화를 보여주는 도면이다.

도 50은 H-1143, H-2140 또는 H-2143에 의해 야기된, bFGF의 존재 하에서 HUVEC의 이동 성능의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 4).

도 51은 H-1143의 교차-종 반응성을 보여주는 도면이다.

도 52는 H-2140의 교차-종 반응성을 보여주는 도면이다.

도 53은 H-2143의 교차-종 반응성을 보여주는 도면이다.

도 54는 H-1143, H-2140 또는 H-2143의 결합 특이성을 보여주는 도면이다.

도 55는 H-2143에 의해 야기된, 레이저-유도된 맥락막 혈관신생 모델에서의 혈관신생의 변화를 보여주는 도면이다. 이 도면에서 오차 막대는 표준 편차를 표시한다(n = 3개 또는 4개의 눈).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 1. 정의

[0079] 본 발명에서, "유전자"는 단백질의 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드(들) 또는 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 상보적인 가닥을 의미한다. "유전자"는 예를 들면, 단백질의 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보적인 가닥으로서 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, DNA, mRNA, cDNA 및 cRNA를 포함하기 위한 것이다. 이러한 유전자는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 이상의 가닥을 갖는 뉴클레오티드 서열이고, "유전자"는 DNA 가닥과 RNA 가닥의 회합체, 1개 뉴클레오티드 가닥 상의 리보뉴클레오티드들(RNA들)과 데옥시리보뉴클레오티드들(DNA들)의 혼합물, 및 이러한 뉴클레오티드 가닥을 포함하는 이중 가닥 또는 삼중 이상의 가닥을 갖는 뉴클레오티드 서열도 포함하기 위한 것이다. 본 발명의 "ROBO4 유전자"의 예로는 ROBO4 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA, mRNA, cDNA 및 cRNA를 들 수 있다.

[0080] 본 발명에서, 용어 "뉴클레오티드(들)" 또는 "뉴클레오티드 서열"은 "핵산"과 동일한 의미를 갖고, 예를 들면, DNA, RNA, 프로브, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 및 프라이머도 포함하기 위한 것이다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 이상의 가닥을 갖는 뉴클레오티드이고, "뉴클레오티드" 서열은 DNA 가닥과 RNA 가닥의 회합체, 1개 뉴클레오티드 가닥 상의 리보뉴클레오티드들(RNA들)과 데옥시리보뉴클레오티드들(DNA들)의 혼합물, 및 이러한 뉴클레오티드 가닥을 포함하는 2개의 가닥 또는 3개 이상의 가닥의 회합체도 포함하기 위한 것이다.

[0081] 본 발명에서, 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 동일한 의미를 갖는다.

[0082] 본 발명에서, "항원"은 "면역원"의 의미로서도 사용된다.

[0083] 본 발명에서, "세포"는 동물 개체, 하위배양된 세포, 1차 배양된 세포, 세포주, 재조합 세포 등으로부터 유래된 다양한 세포도 포함한다.

[0084] 본 발명에서, ROBO4 단백질을 인식하는 항체는 "항-ROBO4 항체"로서도 지칭된다. "항-ROBO4 항체"는 항-ROBO4 키메라 항체, 항-ROBO4 인간화된 항체, 항-ROBO4 인간 항체 등을 포함한다.

[0085] 본 발명에서, "항체의 기능성 단편"은 원래의 항체의 기능들 중 하나 이상의 기능, 예를 들면, 결합 친화성(K_D 값)을 발휘하는 항체 단편을 의미한다. "항체의 기능성 단편"의 예로는 Fab, F(ab')2, scFv, Fab', 단일 쇄 면역글로불린 등을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이러한 항체의 기능성 단편은 항체 단백질의 전장 분자를 효소, 예컨대, 파파인 또는 펩신으로 처리함으로써 수득될 수 있거나, 재조합 유전자를 사용하여 적절한 숙주 세포에서 생성한 재조합 단백질일 수 있다. 바람직한 "기능성 단편"은 원래의 항체의 생물학적 활성들 중 하나 이상의 생물학적 활성도 갖는다.

[0086] 추가로, 본 발명과 관련하여 중쇄 또는 경쇄의 "부분 아미노산 서열"을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 본원에서 상기 정의된 "항체의 기능성 단편"을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이거나 이러한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0087] 본 발명에서, 항체가 결합하는 "부위", 즉 항체에 의해 인식되는 "부위"는 항체에 의해 결합되거나 인식되는 항원 상의 부분 펩티드 또는 부분 입체구조를 의미한다. 본 발명에서, 이러한 부위는 에피토프 또는 항체 결합 부위로서도 지칭된다. 본 발명의 항-ROBO4 항체에 의해 결합되거나 인식되는 ROBO4 단백질 상의 부위의 예로는 ROBO4 단백질 상의 부분 펩티드 또는 부분 입체구조를 들 수 있다.

[0088] 항체 분자의 중쇄 및 경쇄는 3개의 상보성 결정 영역들(CDR들)을 각각 갖는 것으로 공지되어 있다. 상보성 결정 영역은 초가변 도메인으로서도 지칭된다. 이들은 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 영역에 위치한다. 이들 부위들은 특히 고도 가변성 1차 구조를 갖고 통상적으로 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 가닥의 각각의 1차 구조 상의 3개 위치에서 분리되어 있다. 본 발명에서, 항체의 상보성 결정 영역은 중쇄의 상보성 결정 영역의 경우 중쇄 아미노산 서열의 아미노 말단부터 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로서 지칭되고 경쇄의 상보성 결정 영역의 경우 경쇄 아미노산 서열의 아미노 말단부터 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로서 지칭된다. 이들 부위들은 3차원 구조 상에서 서로 인접하고 결합될 항원에 대한 특이성을 결정한다.

[0089] 본 발명에서, "항체 돌연변이체"는 아미노산(들)의 치환, 결실, 추가 및/또는 삽입(이하, "돌연변이"로서 총칭됨)에 의해 원래의 항체의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 갖고 본 발명의 ROBO4 단백질에 결합하는 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 항체 돌연변이체에서 돌연변이된 아미노산의 수는 1개 또는 2개, 1개 내지 3

개, 1개 내지 4개, 1개 내지 5개, 1개 내지 6개, 1개 내지 7개, 1개 내지 8개, 1개 내지 9개, 1개 내지 10개, 1개 내지 12개, 1개 내지 15개, 1개 내지 20개, 1개 내지 25개, 1개 내지 30개, 1개 내지 40개 또는 1개 내지 50개이다. 이러한 항체 돌연변이체도 본 발명의 "항체"에 의해 포괄된다.

[0090] 본 발명에서, "1개 내지 수개"에서 용어 "수개"는 2개 내지 10개, 바람직하게는 2개 내지 8개, 보다 바람직하게는 2개를 지칭한다.

[0091] 본 발명의 항체에 의해 발휘되는 활성 또는 성질의 예로는 생물학적 활성 또는 물리화학적 성질을 들 수 있고, 구체적으로 다양한 생물학적 활성, 항원 또는 에피토프에 대한 결합 활성, 제조 또는 저장 동안의 안정성, 및 열안정성을 들 수 있다.

[0092] 본 발명에서, 어구 "엄격한 조건 하에서 혼성화하는"은 5 x SSC를 함유하는 65℃ 용액에서의 혼성화에 이어서, 2 x SSC-0.1% SDS를 함유하는 65℃ 수용액에서의 20분 동안의 세척, 0.5 x SSC-0.1% SDS를 함유하는 65℃ 수용액에서의 20분 동안의 세척 및 0.2 x SSC-0.1% SDS를 함유하는 65℃ 수용액에서의 20분 동안의 세척을 포함하는 조건 하에서의 혼성화, 또는 이와 동등한 조건 하에서의 혼성화를 의미한다. SSC는 150 mM NaCl-15 mM 구연산나트륨의 수용액을 의미하고, n x SSC는 n배 농도를 갖는 SSC를 의미한다.

[0093] 2. ROBO4 단백질

[0094] 본 명세서에서, 용어 "ROBO4" 및 "ROBO4 단백질"은 동일한 의미로서 사용된다.

[0095] (2-1) 성질

[0096] 본 발명의 ROBO4 단백질은 하기 성질을 갖는다:

[0097] (i) ROBO4는 대략 110 kDa의 분자량 및 단회-통과 경막 구조를 갖고, 혈관신생에 관여하는 SLIT2 단백질의 수용체 단백질이다. 본 발명의 임의의 ROBO4 단백질은 막, 예컨대, 세포막으로부터 유리된 형태로 발견될 수 있고, 막, 예컨대, 세포막에 결합된 형태로 존재할 수도 있다. 이와 관련하여, 분자량은 SDS-PAGE의 비환원 조건 하에서의 겉보기 분자량을 의미한다. ROBO4의 N-말단 세포외 영역은 2개의 면역글로불린 유사 도메인들(이하, "Ig 유사 도메인들"로서 지칭됨) 및 2개의 피브로넥틴 III형 도메인을 함유하는 반면, 그의 C-말단 세포내 영역은 단백질 풍부 영역을 함유한다. 본 명세서에서, 이들 2개의 면역글로불린 유사 도메인들은 아미노 말단부터 각각 Ig 유사 도메인 1 및 Ig 유사 도메인 2로서 지칭된다. 인간 ROBO4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 번호 28 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된다. 서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 27은 분비 신호를 나타내고; 그의 아미노산 번호 28 내지 467은 세포외 영역을 나타내고; 그의 아미노산 번호 46 내지 131은 Ig 유사 도메인 1을 나타내고; 그의 아미노산 번호 137 내지 224는 Ig 유사 도메인 2를 나타내고; 그의 아미노산 번호 252 내지 340은 피브로넥틴 III형 도메인 1을 나타내고; 그의 아미노산 번호 347 내지 438은 피브로넥틴 III형 도메인 2를 나타내고; 그의 아미노산 번호 468 내지 490은 세포막 내의 영역을 나타내고; 그의 아미노산 번호 491 내지 1007은 세포내 영역을 나타낸다.

[0098] (ii) ROBO4는 항-혈관신생 효과를 갖는다. 본 발명에서, 용어 "항-혈관신생"은 분자가 혼자서, 또 다른 인자와 협력하여, 또는 또 다른 인자와의 회합체로서 혈관신생을 직접적으로 또는 간접적으로 억제하고/하거나 저해한다는 것을 의미한다. 항-혈관신생 효과는 예를 들면, VEGF에 의한 혈관 투과성, 세포 이동 촉진 활성 또는 내강 형성 활성의 증가에 대한 억제 효과를 지표로서 사용함으로써 평가될 수 있다.

[0099] (iii) ROBO4는 하기 (a) 내지 (e) 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열(이하, "ROBO4 아미노산 서열"로서 지칭됨)을 포함하거나, ROBO4 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열로 구성되거나, ROBO4 아미노산 서열로 구성된다:

[0100] (a) 서열번호 2(도 14)로 표시된 아미노산 서열;

[0101] (b) 서열번호 2(도 14)로 표시된 아미노산 서열에 대한 80% 이상, 82% 이상, 84% 이상, 86% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 96% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내고 항-혈관신생 효과를 나타내는 폴리펩티드의 아미노산 서열;

[0102] (c) 1개 내지 50개, 1개 내지 45개, 1개 내지 40개, 1개 내지 35개, 1개 내지 30개, 1개 내지 25개, 1개 내지 20개, 1개 내지 15개, 1개 내지 10개, 1개 내지 8개, 1개 내지 6개, 1개 내지 5개, 1개 내지 4개, 1개 내지 3개, 1개 또는 2개, 또는 1개의 아미노산(들)의 치환, 결실, 추가 또는 삽입을 갖는 서열번호 2(도 14)로 표시된 아미노산 서열을 포함하고 혈관신생을 억제하는 폴리펩티드의 아미노산 서열;

[0103] (d) 아미노산 1 내지 45 또는 1 내지 131의 결실을 갖는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고 혈관신생을 억제하는 폴리펩티드의 아미노산 서열; 및

[0104] (e) 서열번호 2(도 14)로 표시된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 뉴클레오티드와 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되고 혈관신생을 억제하는 폴리펩티드의 아미노산 서열.

[0105] ROBO4 단백질은 2개 이상의 서브유닛으로 구성된 동종 또는 이종 올리고 회합체의 전체 또는 부분으로서 존재할 수 있다.

[0106] ROBO4 단백질의 아미노산 서열 및/또는 다른 성질은 개체, 조직, 체액, 세포, ROBO4 단백질 함유 분획, 정제된 또는 부분적으로 정제된 ROBO4 단백질 제제 등에서, 또는 복수의 개체, 조직, 세포, ROBO4 단백질 함유 분획 또는 ROBO4 단백질 제제들 사이에 동일하지 않을 수 있고 균질하지도 않을 수 있다. 한 개체, 조직, 체액, 세포, ROBO4 단백질 함유 분획, 정제된 또는 부분적으로 정제된 ROBO4 단백질 제제 등은 아미노산 서열 및/또는 성질 면에서 상이한 복수의 종류의 ROBO4 단백질들을 함유할 수 있다. 대안적으로, 복수의 개체, 조직, 세포, ROBO4 단백질 함유 제제 또는 ROBO4 단백질 제제는 ROBO4 단백질의 아미노산 서열 및/또는 다른 성질 면에서 상이할 수 있다. 아미노산 서열 및/또는 성질 면에서 서로 상이한 이러한 단백질들조차도, 이들이 상기 (i) 내지 (iii)에 기재된 성질을 보유하는 한, 본 발명의 "ROBO4 단백질"에 의해 모두 포괄된다.

[0107] (iv) 본 발명의 ROBO4 단백질은 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 설치류, 예컨대, 마우스 또는 래트, 또는 인간의 조직, 훨씬 더 바람직하게는 인간 또는 마우스의 조직, 이러한 조직으로부터 유래된 세포, 이러한 세포의 배양물 등으로부터 수득될 수 있다. 이러한 조직 및 세포는, 이들이 ROBO4 단백질을 함유하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 관절 조직, 혈액, 림프, 흉선, 비장, 및 이들 중 어느 하나로부터 유래된 세포를 들 수 있다. 바람직한 조직 및 세포는 혈관신생을 갖는 동물 또는 환자로부터 유래된 조직 및 세포이다. 그러나, 본 발명의 ROBO4 단백질의 기원은 전술된 기원들로 한정되지 않고, 본 발명의 ROBO4 단백질은 다른 동물 종, 다른 조직, 다른 세포 등으로부터 유래된 ROBO4 단백질들이 상기 (i) 내지 (iii)에 기재된 성질을 보유하는 한, 이들 단백질들 조차도 포함하기 위한 것이다.

[0108] 본 발명의 ROBO4 단백질은 천연 단백질 및 재조합 단백질 중 임의의 단백질일 수 있다. ROBO4 단백질은 또 다른 펩티드 또는 단백질, 예컨대, 담체 또는 태그를 갖는 융합 생성물도 포함하기 위한 것이다. ROBO4 단백질은 중합체, 예컨대, PEG의 추가를 포함하는 화학적 변경, 및/또는 당쇄 변경을 포함하는 생물학적 변경을 구비한 형태도 포함하기 위한 것이다. 나아가, 본 발명의 ROBO4 단백질은 ROBO4 단백질 단편을 포함하기 위한 것이다. 상기 (ii)에 기재된 성질을 보유하는 ROBO4 단백질 단편은 ROBO4 단백질의 기능성 단편으로서 지칭된다.

[0109] (2-2) ROBO4 유전자

[0110] 본 발명의 ROBO4 유전자는 하기 (a) 내지 (c) 중 어느 하나에 기재된 뉴클레오티드 서열(이하, "ROBO4 유전자 서열"로서 지칭됨)을 포함하거나, ROBO4 유전자 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 구성되거나, ROBO4 유전자 서열로 구성된다:

[0111] (a) 서열번호 1(도 13)로 표시된 뉴클레오티드 서열;

[0112] (b) 서열번호 1로 표시된 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열로 구성된 뉴클레오티드와 엄격한 조건 하에서 혼성화하고 혈관신생을 억제하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및

[0113] (c) 1개 내지 150개, 1개 내지 140개, 1개 내지 130개, 1개 내지 120개, 1개 내지 110개, 1개 내지 100개, 1개 내지 90개, 1개 내지 80개, 1개 내지 70개, 1개 내지 60개, 1개 내지 50개, 1개 내지 45개, 1개 내지 40개, 1개 내지 30개, 1개 내지 25개, 1개 내지 20개, 1개 내지 15개, 1개 내지 10개, 1개 내지 8개, 1개 내지 6개, 1개 내지 5개, 1개 내지 4개, 1개 내지 3개, 1개 또는 2개, 또는 1개의 염기(들)의 치환, 결실, 추가 또는 삽입을 갖는 서열번호 1(도 13)로 표시된 뉴클레오티드 서열을 포함하고 혈관신생을 억제하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

[0114] ROBO4 유전자는 혈관신생을 동반하는 질환, 예를 들면, 증식성 당뇨망막병증을 갖는 환자의 섬유혈관막 내의 혈관 또는 종양내 혈관에서 과다발현된다. 추가로, ROBO4 유전자는 혈관신생을 수반하는 것으로 간주되는 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 황반 부종, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만으로 고통받는 환자, 또는 이들 질환들의 모델 동물로부터

유래된 조직 또는 혈액 분획에서 과다발현되어 있는 것으로 보인다.

[0115] ROBO4 유전자의 발현 및 발현 수준은 ROBO4 유전자 전사 생성물 및 ROBO4 단백질 중 임의의 물질을 지표로서 사용함으로써 분석될 수 있고, 전자 지표의 경우 RT-PCR, 노던 블롯 혼성화 등에 의해 측정될 수 있고 후자 지표의 경우 면역분석(예를 들면, 효소-연결된 면역흡착 분석; 이하, "ELISA"로서 지칭됨) 등에 의해 측정될 수 있다.

[0116] (2-3) 단백질의 제조

[0117] 본 발명의 ROBO4 단백질은 동물 조직(체액을 포함함), 상기 조직으로부터 유래된 세포, 또는 상기 세포의 배양물로부터 정제될 수 있거나 단리될 수 있고, 유전자 재조합, 시험관내 번역, 화학 합성 등에 의해 제조될 수 있다.

[0118] (2-3-1) 천연 ROBO4의 정제 또는 단리

[0119] 천연 ROBO4 단백질은 예를 들면, 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만으로 고통받는 환자 또는 비인간 동물로부터 유래된 조직(체액, 세포 등을 포함함), 상기 조직으로부터 유래된 세포, 또는 상기 세포의 배양물로부터 정제될 수 있거나 단리될 수 있다. 이러한 비인간 동물은 이들 질환들의 모델 동물도 포함한다. 모델 제조에 사용되는 동물들은, 이들이 척추동물인 한, 특별히 한정되지 않는다. 상기 동물들은 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 설치류, 예컨대, 마우스 또는 래트, 훨씬 더 바람직하게는 마우스 또는 래트이다. 이러한 환자 또는 모델 동물의 조직 및 세포는, 이들이 ROBO4 단백질을 함유하는 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 관절 조직, 혈액, 림프, 흉선, 비장, 및 이들 중 임의의 조직으로부터 유래된 세포를 들 수 있다. 바람직한 조직 및 세포는 혈관신생을 갖거나 유사한 증상을 나타내는 환자 또는 모델 동물로부터 유래된다. 그러나, 본 발명의 ROBO4 단백질의 기원은 전술된 기원들로 한정되지 않고, 본 발명의 ROBO4 단백질은 다른 동물 종, 다른 조직, 다른 세포 등으로부터 유래될 수 있다.

[0120] 이러한 조직, 세포, 세포 배양물 등으로부터의 정제 또는 단리는 당업자에게 잘 공지된 방법들, 예컨대, 분별과 크로마토그래피의 병용에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법들은 염석, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 순상 또는 역상 크로마토그래피 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 항-ROBO4 단일클론 항체와 교차-연결된 친화성 겔을 제조하여 컬럼에 적재함으로써 친화성 크로마토그래피용 컬럼을 제조할 수 있다. ROBO4 단백질을 함유하는 미정제 또는 부분적으로 정제된 분획을 이러한 컬럼에 첨가한다. 그 후, 멸균된 인산염 완충 식염수(PBS)를 사용하여 비특이적으로 흡착된 물질을 제거한 후, 용출용 완충제 용액을 첨가하여 ROBO4 단백질을 선택적으로 수집한다. ROBO4 단백질을 함유하는 용액을 겔 여과하거나, 또는 완충제를 교체하고/하거나 농축기, 예컨대, 센트리프렙(Centriprep)을 이용하여 농축할 수 있다.

[0121] (2-3-2) 재조합 ROBO4 단백질의 제조

[0122] 본 발명의 ROBO4 단백질은 재조합체 형태로 제조될 수도 있다. 구체적으로, ROBO4 단백질 또는 ROBO4 단백질 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 사용하여 숙주 세포를 형질감염시키고 ROBO4 단백질을 세포 배양물로부터 수집할 수 있다. 예를 들면, ROBO4 유전자 또는 그의 단편을 발현 벡터 내로 삽입한다. 그 후, 발생된 재조합 벡터를 사용하여 원핵 또는 진핵 숙주 세포를 형질감염시키고, 수득된 재조합 세포를 항온처리하여 ROBO4 단백질을 발현시킬 수 있다. 당분야에서 공지된 발현 패턴, 예컨대, 분비 발현, 가용성 형태의 세포내 발현 또는 봉입체(inclusion body) 방법이 이용될 수 있다. 또한, ROBO4 단백질은 천연 ROBO4 단백질과 동일한 아미노 말단(N-말단) 및/또는 카복시 말단(C-말단)을 갖는 분자로서 발현될 수 있을 뿐만 아니라, 분비 신호, 세포내 국소화 신호, 친화성 정제용 태그 또는 파트너 펩티드를 갖는 융합 단백질로서도 발현될 수 있다. 방법들, 예컨대, 상기 (2-3-1)의 천연 ROBO4 단백질의 정제 또는 단리에 기재된 분별과 크로마토그래피의 적절한 병용으로 이러한 재조합 세포 배양물로부터 ROBO4 단백질을 정제할 수 있거나 단리할 수 있다.

[0123] ROBO4 유전자 또는 그의 단편을 당업자에게 잘 공지된 방법으로 제조할 수 있다.

[0124] 그의 예로는 ROBO4 cDNA 발현 라이브러리를 주형으로서 사용하고 서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 한 세트의 프라이머를 사용하는 중합효소 연쇄 반응(이하, "PCR"로서 지칭됨; Saiki, R.K., et al., Science (1988) 239, p. 487-489); ROBO4 발현용 mRNA 분획을 주형으로서 사용하고 서열을 역전사할 수 있는 프라이머 및 서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 한 세트의 프라이머를 사용하는 역전사 PCR(이하, "RT-PCR"로서 지칭됨); 면역분석을

이용한 발현 클로닝; 및 정제된 ROBO4 단백질의 부분 아미노산 서열을 사용한 cDNA 클로닝을 들 수 있다.

[0125] (2-3-3) 시험관내 번역

[0126] 본 발명의 ROBO4 단백질은 시험관내 번역에 의해 제조될 수도 있다. 이러한 번역 방법은, 이 방법이 전사 및 번역에 필요한 효소, 기질 및 에너지 물질을 포함하는 세포 무함유 번역 시스템을 사용하는 방법인 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 로슈 디아그노스틱스(Roche Diagnostics)에 의해 제조된 신속 번역 시스템(RTS)을 이용하는 방법을 들 수 있다.

[0127] (2-3-4) 화학적 합성

[0128] 본 발명의 ROBO4 단백질은 화학적 합성에 의해 제조될 수도 있다. 화학적 합성 방법의 예로는 고체상 펩티드 합성 방법, 예컨대, Fmoc 합성 및 Boc 합성 방법을 들 수 있다.

[0129] 3. 항-ROBO4 항체

[0130] (3-1) 항-ROBO4 항체의 종류

[0131] 본 발명의 항체는 단일클론 항체 및 다중클론 항체 중 임의의 항체일 수 있다. 본 발명의 단일클론 항체의 예로는 비인간 동물 유래의 항체(비인간 동물 항체), 인간 유래의 항체(인간 항체), 키메라 항체 및 인간화된 항체, 바람직하게는 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 유래의 항체(인간 항체), 보다 바람직하게는 인간화된 항체 및 인간 유래의 항체(인간 항체)를 들 수 있다.

[0132] 비인간 동물 항체의 예로는 척추동물, 예컨대, 포유동물 및 조류로부터 유래된 항체를 들 수 있다. 포유동물 유래의 항체의 예로는 설치류 유래의 항체, 예컨대, 마우스 항체 및 래트 항체를 들 수 있다. 조류 유래의 항체의 예로는 닭 항체를 들 수 있다.

[0133] 키메라 항체의 예로는 인간 항체(인간 면역글로불린) 불변 영역과 결합된 비인간 동물 항체 유래의 가변 영역을 포함하는 항체를 들 수 있으나 이것으로 한정되지 않는다. 비인간 동물 항체 유래의 가변 영역의 예로는 후술된 MAb1로부터 유래된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 들 수 있다.

[0134] 인간화된 항체의 예로는 비인간 동물 항체의 가변 영역 내의 CDR들을 이식받은 인간 항체(인간 면역글로불린 가변 영역), 상기 CDR들뿐만 아니라 비인간 동물 항체의 골격 영역의 부분 서열도 이식받은 인간 항체, 및 이들 인간화된 항체들 중 임의의 인간화된 항체에서 1개 또는 2개 이상의 비인간 동물 항체 유래의 아미노산(들)을 치환시킨 인간 항체 아미노산(들)을 갖는 항체를 들 수 있다. 비인간 동물 항체의 가변 영역 내의 CDR들의 예로는 후술된 MAb1로부터 유래된 중쇄 가변 영역 내의 CDRH1 내지 CDRH3, 및 후술된 MAb1로부터 유래된 경쇄 가변 영역 내의 CDRL1 내지 CDRL3을 들 수 있다.

[0135] 인간 항체는, 이것이 본 발명의 항원을 인식하는 항체인 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 본 발명의 항체 CDR들을 갖는 항체에 의해 결합된 부위와 동일한 부위에 결합하는 인간 항체, 및 전술된 MAb1에 의해 결합된 부위와 동일한 ROBO4 상의 부위에 결합하는 인간 항체를 들 수 있다.

[0136] 본 발명에 따른 항체는 복수의 상이한 항체들로부터 유래된 부위들로 구성된 항체일 수 있다. 그의 예로는 복수의 상이한 항체들 사이에서 교환된 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하는 항체, 그들 사이에서 교환된 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 포함하는 항체, 그들 사이에서 교환된 가변 또는 불변 영역을 포함하는 항체, 및 그들 사이에서 교환된 모든 또는 일부 CDR들을 포함하는 항체를 들 수 있다. 키메라 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 본 발명의 상이한 항체들로부터 유래될 수 있다. 인간화된 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 내의 CDRH1 내지 CDRH3 및 CDRL1 내지 CDRL3은 본 발명의 2개 이상의 상이한 항체들로부터 유래될 수 있다. 인간 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 내의 CDRH1 내지 CDRH3 및 CDRL1 내지 CDRL3은 본 발명의 2개 이상의 상이한 항체들에 의해 보유된 CDR들의 조합일 수 있다.

[0137] 본 발명의 단일클론 항체의 동종형(isotype)은 특별히 한정되지 않고, 그의 예로는 IgG, 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, IgM, IgA, 예컨대, IgA1 및 IgA2, IgD 및 IgE를 들 수 있고, 바람직하게는 IgG 및 IgM, 보다 바람직하게는 IgG2를 들 수 있다. 단일클론 항체의 동종형 및 서브클래스는 예를 들면, 오우크텔로니(Ouchterlony) 시험, ELISA 또는 방사면역분석(이하, "RIA"로서 지칭됨)에 의해 결정될 수 있다. 확인을 위한 상업적으로 입수가능한 키트(바이오-라드 라보라토리스 인코포레이티드(Bio-Rad Laboratories, Inc.)에 의해 제조된 마우스 타이퍼(Typer) 키트, 에이비디 세로텍(AbD Serotec)에 의해 제조된 래트 단일클론 항체 동종형분류 시험 키트(RAT MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST KIT) 등)가 사용될 수 있다.

[0138] (3-2) 항-ROBO4 항체의 결합 특이성

[0139] 본 발명의 항체는 ROBO4 단백질을 인식한다. 다시 말해, 본 발명의 항체는 ROBO4 단백질에 결합한다. 이러한 항체는 "항-ROBO4 항체"로서 지칭된다. 나아가, 본 발명의 바람직한 항체는 ROBO4 단백질을 특이적으로 인식한다. 다시 말해, 본 발명의 바람직한 항체는 ROBO4 단백질에 특이적으로 결합한다. 나아가, 본 발명의 보다 바람직한 항체는 ROBO4 단백질에 의해 보유된 Ig 유사 도메인에 특이적으로 결합한다. 이러한 Ig 유사 도메인의 예로는 Ig 유사 도메인 1 및 Ig 유사 도메인 2를 들 수 있다. 본 발명의 보다 바람직한 항체는 서열번호 2의 아미노산 번호 132 내지 209의 아미노산 서열로 구성된 영역을 인식한다. 본 발명의 항체는 인간 ROBO4 단백질, 원숭이, 바람직하게는 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 단백질 및 토끼 ROBO4 단백질에 결합하지만, 마우스 ROBO4 단백질 및 래트 ROBO4 단백질에는 결합하지 않는다(실시예 4)-3 및 실시예 11)-4에서의 교차-종 반응성).

[0140] 본 발명에서, "특이적 인식", 즉 "특이적 결합"은 비특이적 흡착이 아닌 결합을 의미한다. 결합이 특이적인지 아닌지를 결정하기 위한 기준의 예로는 해리 상수(이하, "K_D"로서 지칭됨)를 들 수 있다. 본 발명의 바람직한 항체는 ROBO4 단백질에 대한 1×10^{-5} 이하, 5×10^{-6} 이하, 2×10^{-6} 이하 또는 1×10^{-6} 이하, 보다 바람직하게는 5×10^{-7} 이하, 2×10^{-7} 이하 또는 1×10^{-7} 이하, 훨씬 더 바람직하게는 5×10^{-8} 이하, 2×10^{-8} 이하 또는 1×10^{-8} 이하, 더욱 더 바람직하게는 5×10^{-9} 이하, 2×10^{-9} 이하 또는 1×10^{-9} 이하, 가장 바람직하게는 5×10^{-10} 이하, 2×10^{-10} 이하 또는 $1x10^{-10}$ 이하의 K_D 값을 갖는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 바람직한 항체는 ROBO4 단백질에 대한 2×10^{-8} 이하, 보다 바람직하게는 1×10^{-8} 이하, 훨씬 더 바람직하게는 5×10^{-9} 이하의 K_D 값을 갖는다.

[0141] 본 발명에서, 항체와 항원의 결합은 ELISA, RIA, 표면 플라스몬 공명(이하, "SPR"로서 지칭됨) 분석 등에 의해 분석될 수 있거나 측정될 수 있다. SPR 분석에서 이용된 장치의 예로는 (지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)에 의해 제조된) 비아코어(BIAcore)(TM), (바이오-라드 라보라토리스 인코포레이티드(Bio-Rad Laboratories, Inc.)에 의해 제조된) 프로테온(ProteOn)(TM), (바이오나비스 오이 리미티드(BioNavis Oy Ltd.)에 의해 제조된) SPR-나비(SPR-Navi)(TM), (텍사스 인스트루먼츠 인코포레이티드(Texas Instruments Inc.)에 의해 제조된) 스프레에타(Spreeta)(TM), (호리바 리미티드(Horiba, Ltd.)에 의해 제조된) SPRi-플렉스(Plex)II(TM) 및 (메트롬(Metrohm)에 의해 제조된) 오토랩(Autolab) SPR(TM)을 들 수 있다. 항체와 세포 표면 상에서 발현된 항원의 결합은 유동 세포측정(flow cytometry) 등에 의해 분석될 수 있다.

[0142] (3-3) 항-ROBO4 항체의 시험관내 항-혈관신생 활성

[0143] 본 발명의 항체는 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 항-혈관신생 활성을 갖는다. 일부 항체들이 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 약리학적 활성을 나타내지 않지만 생체내에서는 교차-연결 항체의 부재 하에서 약리학적 활성을 나타낸다는 것이 공지되어 있다(Cancer Cell (2011), 19, p. 101-113). 이것은 아마도 백혈구가 생체내에서 교차-연결 항체의 기능과 동일한 기능을 갖는 Fcγ 수용체를 발현한다는 것이 발견되었기 때문일 것이므로(Nature (2008), 8, p. 34-47), 상기 항체들은 교차-연결 항체 없이도 백혈구의 존재 하에서 교차-연결을 통해 약리학적 활성을 나타낸다. 그러나, 실제 유기체에서 병변 내의 백혈구의 수는 개체들 사이에 상이하고(Cancer Res (2011), 71, 5670-5677), 아마도 이로 인해 백혈구에 의해 유도된 교차-연결에 의존하는 약리학적 활성을 나타내는 항체들의 효과가 개체들 사이에 상이하다. 본 발명의 항체는 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서조차도 뛰어난 항-혈관신생 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 항체는 생체내에서 백혈구의 수와 무관한 항-혈관신생 효과도 가질 수 있으므로 약학적으로 적합하다.

[0144] 항-혈관신생 활성은 혈관 내피 세포 성장, 이동, 내강 형성 등을 억제하는 활성을 의미한다. 시험관내 항-혈관신생 활성은 혈관 투과성, 혈관 내피 세포 이동 또는 내강 형성 시험에 의해 평가될 수 있다.

[0145] 예를 들면, 이러한 평가를 위한 혈관 투과성 시험은 1 ㎛의 공극 크기를 갖는 보이덴(Boyden) 챔버의 상층에 정상 인간 제대 정맥 내피 세포(HUVEC)를 접종하여 단일 층을 형성한 후, 상기 세포 층을 투과하는 FITC-표지부착된 덱스트란 등의 양을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 세포 층을 투과하는 FITC-표지부착된 덱스트란의 양은 예를 들면, 시험관내 혈관 투과성 분석(카탈로그 번호 ECM640, 밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.)에 의해 제조됨)을 이용함으로써 측정될 수 있다. 5 ㎍/㎖ 이하의 농도로 첨가된 항체가 세포 층을 투과하는 FITC-표지부착된 덱스트란의 양을 억제하는 효과를 나타내는 경우, 이 항체는 혈관 투과성에 대한 억제 효과를 갖고

항-혈관신생 활성을 갖는 항체로서 평가될 수 있다. 본 발명의 항체는 전술된 측정 조건 하에서 바람직하게는 5 ㎍/㎖ 이하, 보다 바람직하게는 1 ㎍/㎖ 이하, 특히 바람직하게는 0.5 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 혈관 투과성에 대한 억제 활성을 나타낸다.

[0146] 이러한 평가를 위한 세포 이동 시험은 3 내지 8 ㎛의 공극 크기를 갖는 보이덴 챔버의 상층에 HUVEC를 접종하는 단계, 내피 세포 이동 향상제, 예컨대, VEGF를 함유하는 배지를 하층에 첨가하는 단계, 및 하층으로 이동하는 세포의 수를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 항체가 이동하는 HUVEC 세포의 수를 감소시키는 효과를 나타내는 경우, 이 항체는 혈관 내피 세포 이동에 대한 억제 효과를 갖고 항-혈관신생 활성을 갖는 항체로서 평가될 수 있다. 이동하는 세포의 수는 예를 들면, 혈관 내피 세포 이동 분석 시스템(카탈로그 번호 354143, 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)에 의해 제조됨)을 이용함으로써 측정될 수 있다. 본 발명의 항체는 바람직하게는 전술된 측정 조건 하에서 바람직하게는 5 ㎍/㎖ 이하, 보다 바람직하게는 1 ㎍/㎖ 이하, 특히 바람직하게는 0.5 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 세포 이동에 대한 억제 활성을 나타낸다.

[0147] 이러한 평가를 위한 내강 형성 시험은 매트리겔(Matrigel)로 코팅된 세포 배양 용기에 HUVEC를 접종하는 단계 및 매트리겔 상에서 HUVEC에 의해 형성된 내강 구조의 분지점 수, 관 길이 등을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 항체가 내강 구조의 분지점 수 또는 관 길이를 감소시키는 효과를 나타내는 경우, 이 항체는 내강 형성에 대한 억제 효과를 갖고 항-혈관신생 활성을 갖는 항체로서 평가될 수 있다. 내강 구조의 분지점 수 또는 관 길이는 예를 들면, 혈관 내피 세포 관 형성 분석 시스템(카탈로그 번호 354149, 비디 바이오사이언시스에 의해 제조됨)을 이용함으로써 측정될 수 있다. 본 발명의 항체는 전술된 측정 조건 하에서 바람직하게는 5 ㎍/㎖ 이하, 보다 바람직하게는 1 ㎍/㎖ 이하, 특히 바람직하게는 0.5 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 내강 형성에 대한 억제 활성을 나타낸다.

[0148] 그러나, 이러한 분석 시스템은, 이것이 ROBO4 단백질에 의해 유도된 혈관신생 및 그의 억제를 분석할 수 있는 한, 이들 시험들로 한정되지 않는다.

[0149] 교차-연결 항체는 본 발명의 항체의 Fc 영역에 결합하고 2개 이상의 본 발명의 항체 분자들을 교차-연결하는 작용을 하는 항체를 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 항체의 Fc 영역이 마우스로부터 유래된 경우, 교차-연결 항체는 마우스 Fc 영역에 결합하고 교차-연결 항체의 2개의 결합 부위들에서 이들 2개의 본 발명의 항체 분자들에 각각 결합함으로써 2개 이상의 본 발명의 항체 분자들을 회합시키는 항체를 지칭한다.

[0150] 어구 "교차-연결 항체의 부재 하에서 항-혈관신생 활성을 갖는"은 항체가 심지어 교차-연결 항체와 공존하지 않는 상태에서도 혈관신생 억제에 대한 평가 시스템, 예를 들면, 전술된 평가 시스템에서 항-혈관신생 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

[0151] 어구 "교차-연결 항체의 존재 하에서 항-혈관신생 활성을 갖는"은 항체가 혈관신생에 대한 평가 시스템, 예를 들면, 전술된 항-혈관신생 활성 평가 시스템에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 항-혈관신생 활성을 나타내지 않지만, 1개의 본 발명의 항체 분자 당 하나 이상의 교차-연결 항체 분자(들), 바람직하게는 2개 이상의 교차-연결 항체 분자들과 공존할 때 항-혈관신생 활성을 나타낸다는 것을 의미한다.

[0152] (3-4) 혈관신생에 대한 항-ROBO4 항체의 생체내 억제 또는 저해 활성

[0153] 본 발명의 항체는 생체내에서 혈관신생을 억제하거나 저해한다. 혈관신생에 대한 생체내 억제 또는 저해 활성은 표준 방법에 따라 동물 질환 모델을 사용함으로써 평가될 수 있다. 예를 들면, 하기 실시예 4)-6에 기재된 레이저-유도된 맥락막 혈관신생 모델이 혈관신생의 질환 모델로서 널리 사용되고, 새로 형성된 혈관의 양을 점수로서 평가하는 데에 사용될 수 있다. 또한, 환자의 경우, 예를 들면, 본 발명의 항체의 투여 전 및 후에 생검으로 종양 환자로부터 종양 샘플을 채취하고, 그의 종양내 혈관의 혈관 밀도를 면역조직화학적 분석(IHC)으로 측정하여 새로 형성된 혈관의 양을 점수화할 수 있다.

[0154] (3-5) 항-ROBO4 항체에 의한 다운스트림 신호의 활성화

[0155] ROBO4 단백질에 대한 일부 유도된 반응을 나타내는 세포주 또는 1차 배양된 세포를 사용하는 평가 시스템으로 본 발명의 항-ROBO4 항체를 평가할 수 있다. 이러한 세포주의 예로는 마우스 혈관 내피 세포주(ATCC 번호 CRL-2779)를 들 수 있다. 이러한 1차 배양된 세포의 예로는 마우스 혈관 내피 세포 및 인간 혈관 내피 세포를 들 수 있다.

[0156] 본 발명의 항체는 ROBO4에 대한 작용제 항체이다. 구체적으로, 본 발명의 항체는 ROBO4에 결합하고 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시킨다. 따라서, 본 발명의 항체의 항-혈관신생 효과는 ROBO4 다운스트림 신호의 활성화

를 지표로서 사용함으로써 평가될 수 있다. ROBO4 다운스트림 신호의 예로는 IL-8 프로모터 활성을 들 수 있다. IL-8 프로모터 활성은 인간 ROBO4를 발현하지 않는 세포에 비해 전장 인간 ROBO4를 발현하는 세포에서 급격히 증가되었고, 세포내 도메인-결실된 인간 ROBO4를 발현하는 세포에서는 거의 관찰되지 않았다. 따라서, IL-8 프로모터 활성의 증가는 ROBO4 신호의 활성화가 검출되었다는 것을 입증하였다(실시예 3). IL-8 프로모터 활성은 예를 들면, IL-8 프로모터 서열 삽입체를 갖는 리포터 벡터 및 인간 ROBO4 발현 플라스미드로 형질감염된 세포에 항-ROBO4 항체를 첨가하거나 항-ROBO4 항체 및 교차-연결 항체를 함께 첨가한 후 리포터 활성을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0157] (3-6) 항-ROBO4 마우스 단일클론 항체 및 키메라 항체

[0158] MAb1은 실시예 2에 기재된 방법에 의해 수득된 항-ROBO4 마우스 단일클론 항체이다.

[0159] MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 30(도 15)에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 31(도 16)에 제시되어 있다. CDRH1의 아미노산 서열은 서열번호 44(도 25)에 제시되어 있고, CDRH2의 아미노산 서열은 서열번호 46(도 26)에 제시되어 있고, CDRH3의 아미노산 서열은 서열번호 48(도 27)에 제시되어 있다. MAb1의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 32(도 17)에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 33(도 18)에 제시되어 있다. CDRL1의 아미노산 서열은 서열번호 50(도 28)에 제시되어 있고, CDRL2의 아미노산 서열은 서열번호 52(도 29)에 제시되어 있고, CDRL3의 아미노산 서열은 서열번호 54(도 30)에 제시되어 있다.

[0160] 본 발명의 항체 돌연변이체는 바람직하게는 단백질 분해 또는 산화에 대한 감소된 민감성, 개선된 생물학적 활성, 항원에 결합하는 개선된 능력, 또는 그에 부여된 물리화학적 또는 기능적 성질 등을 나타낸다. 이러한 항체 돌연변이체의 예로는 보존적 아미노산 치환에 의해 원래의 항체의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 갖는 항체를 들 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 측쇄와 관련된 아미노산 기에서 일어나는 치환이다.

[0161] 바람직한 아미노산 기는 다음과 같다: 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하는 산성 기; 라이신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함하는 염기성 기; 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌 및 트립토판을 포함하는 비극성 기; 및 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 쓰레오닌 및 티로신을 포함하는 비하전된 극성 패밀리. 다른 바람직한 아미노산 기는 다음과 같다: 세린 및 쓰레오닌을 포함하는 지방족 하이드록시 기; 아스파라긴 및 글루타민을 포함하는 아미드 함유 기; 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신을 포함하는 지방족 기; 및 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함하는 방향족 기. 항체 돌연변이체에서 이러한 아미노산 치환은 바람직하게는 원래의 항체의 항원 결합 활성을 감소시키지 않으면서 수행된다.

[0162] 보존적 아미노산 치환에 의해 본 발명의 MAb1의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 갖는 항체 돌연변이체뿐만 아니라, 보존적 아미노산 돌연변이에 의해 MAb1 유래의 CDRH1 내지 CDRH3 및 CDRL1 내지 CDRL3 중 임의의 CDR의 아미노산 서열로부터 유도된 CDR 아미노산 서열을 포함하는 마우스 항체, 래트 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 등도 본 발명에 의해 포괄된다.

[0163] 본 발명의 항체의 불변 영역은 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는, 인간 항체로부터 유래된 불변 영역은 인간에서 질환을 치료하거나 예방하기 위한 본 발명의 항체에서 사용된다. 인간 항체의 중쇄 불변 영역의 예로는 Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cμ, Cδ, Cα1, Cα2 및 Cε을 들 수 있다. 인간 항체의 경쇄 불변 영역의 예로는 Cκ 및 Cλ를 들 수 있다.

[0164] 본 발명의 마우스-인간 IgG1형 키메라 항체로서 예시된 cMAb1-1의 분비 신호 함유 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 아미노산 서열뿐만 아니라, 그의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 아미노산 서열도 각각 서열번호 37, 38, 39 및 40(도 19, 20, 21 및 22)에 제시되어 있다. 마찬가지로, 본 발명의 마우스-인간 IgG2형 키메라 항체로서 예시된 cMAb1-2의 분비 신호 함유 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 아미노산 서열뿐만 아니라, 그의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 아미노산 서열도 각각 서열번호 37, 38, 41 및 42(도 19, 20, 23 및 24)에 제시되어 있다.

[0165] (3-7) 항-ROBO4 항체의 기능성 단편

[0166] 한 양태에 따라, 본 발명은 본 발명의 항-ROBO4 항체의 기능성 단편을 제공한다. 상기 항체의 기능성 단편은 상기 항체의 기능의 적어도 일부를 유지하는 단편, 또는 하기 (3-10)에 기재된 그의 변경된 형태를 의미한다. 항체의 이러한 기능의 예로는 일반적으로 항원 결합 활성, 항원 활성 조절 활성, 항체 의존적 세포독성 활성 및 보체 의존적 세포독성 활성을 들 수 있다. 본 발명의 항-ROBO4 항체의 기능의 예로는 ROBO4 단백질 결합 활성, 항-혈관신생 활성 및 ROBO4 다운스트림 신호 활성화 효과를 들 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 ROBO4에

대한 항체에 의해 나타나는 전술된 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 임의의 기능성 단편이 본 발명의 항체의 기능성 단편에 포함된다.

[0167] 항체의 기능성 단편은, 이것이 항체의 활성의 적어도 일부를 유지하는 항체의 단편 또는 그의 변경된 형태인 한, 특별히 한정되지 않는다. 그의 예로는 Fab, F(ab')2, Fv, 적절한 연결제를 통해 연결된 중쇄 및 경쇄 Fv들을 포함하는 단일 쇄 Fv(scFv), 디아바디(diabodies), 선형 항체, 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 환원 조건 하에서 F(ab')2의 처리에 의해 수득된 항체 가변 영역의 1가 단편인 Fab'를 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 연결제 모이어티(moiety)를 보유하는 scFv와 같이 본 발명의 항체의 단편 이외의 모이어티를 함유하는 분자도 본 발명의 항체의 기능성 단편의 의미에 포함된다.

[0168] 그의 아미노 말단 및/또는 카복시 말단에서 1개 내지 수개 이상의 아미노산(들)의 결실에 의해 항체 단백질로부터 유도되고 항체의 기능의 적어도 일부를 유지하는 분자도 본 발명의 항체의 기능성 단편의 의미에 포함된다.

[0169] 본 발명의 항체 또는 그의 기능성 단편은 2종 이상의 상이한 항원들에 대한 특이성을 갖는 다중특이적 항체일 수 있다. 다중특이적 항체는 2종의 상이한 항원들에 결합하는 이중특이적 항체로 한정되지 않고, 3종 이상의 상이한 항원들에 대한 특이성을 갖는 항체도 본 발명의 "다중특이적 항체"의 의미에 포함된다.

[0170] 본 발명의 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 그의 기능성 단편(예를 들면, 이중특이적 F(ab')2 항체)일 수 있다. 이중특이적 항체는 2종의 항체들의 중쇄와 경쇄(HL 쌍)를 결합시킴으로써 제조될 수도 있다. 이중특이적 항체는 2종 이상의 단일클론 항체 생성 하이브리도마들을 융합시켜 이중특이적 항체 생성 융합 세포를 제조함으로써 수득될 수도 있다(Millstein et al., Nature (1983) 305, p. 537-539). 다중특이적 항체도 전술된 방식과 동일한 방식으로 제조될 수 있다.

[0171] 한 양태에 따라, 본 발명의 항체는 단일 쇄 항체(단일 쇄 Fv; 이하, "scFv"로서 지칭됨)이다. scFv는 폴리펩티드 연결제를 통해 항체의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 연결함으로써 수득된다(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113, ed Rosenburg and Moore, Springer Verlag, New York, p.269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, p.1126-1136). 나아가, 폴리펩티드 연결제를 통해 연결된 2개의 scFv들을 포함하는 2가 scFv가 이중특이적 항체로서 사용될 수 있다. 더욱이, 3개 이상의 scFv들을 포함하는 다가 scFv도 다중특이적 항체로서 사용될 수 있다.

[0172] 본 발명은 적절한 연결제를 통해 연결된 항체의 전장 중쇄 서열 및 경쇄 서열을 포함하는 단일 쇄 면역글로불린을 포함한다(Lee, H-S, et. al., Molecular Immunology (1999) 36, p.61-71; Shirrmann, T. et. al., mAbs (2010), 2, (1) p.1-4). 이러한 단일 쇄 면역글로불린은 이량체화됨으로써, 원래 사량체인 항체의 구조 및 활성과 유사한 구조 및 활성을 유지할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 단일 중쇄 가변 영역을 갖고 경쇄 서열을 갖지 않는 항체일 수 있다. 이러한 항체는 단일 도메인 항체(sdAb) 또는 나노바디(nanobody)로서 지칭되고 항원에 결합하는 능력을 유지한다고 보고되어 있다(Muyldemans S. et. al., Protein Eng. (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., Nature (1993) 363 (6428) 446-8). 이들 항체들도 본 발명에 따른 항체의 기능성 단편의 의미에 포함된다.

[0173] (3-8) 항-인간 ROBO4 인간화된 항체(이하, "항-ROBO4 인간화된 항체")

[0174] 한 양태에 따라, 본 발명은 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편을 제공한다. 본 발명의 항-ROBO4 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편은 항-혈관신생 활성을 갖고 바람직하게는 생체내에서 항-혈관신생 활성을 갖는다. 바람직하게는, 상기 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편은 ROBO4 단백질에 특이적으로 결합한다. 나아가, 상기 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편은 ROBO4에 대한 작용제 항체이고 그의 다운스트림 신호를 활성화시킨다. 나아가, 상기 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편은 시험관내에서 교차-연결 항체의 부재 하에서 혈관 내피 세포 이동을 억제하거나 저해한다.

[0175] 본 발명의 인간화된 항체의 예로는 비인간 동물 항체의 상보성 결정 영역들(CDR들)로 치환된 MAb1 CDR들을 갖는 인간 유래의 항체(문헌(Nature (1986) 321, p. 522-525) 참조), 및 CDR 이식 방법(국제 특허출원 공보 제 WO90/07861호)에 의해 CDR 서열 및 골격 영역의 일부 아미노산 잔기들을 이식받은 인간 항체를 들 수 있다. 나아가, 각각의 CDR 내의 1개 내지 3개 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환됨으로써 인간화된 항체로부터 유도된 변이체도, 이 변이체가 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 한, 본 발명의 항체에 포함된다.

[0176] 본 발명의 항-ROBO4 인간화된 항체 또는 그의 기능성 단편의 바람직한 예로는 서열번호 44(도 25)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH1, 서열번호 46(도 26)으로 표시된 아미노산 서열 또는 1개의 아미노산의 치환에 의

해 서열번호 46의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열로 구성된 CDRH2 및 서열번호 48(도 27)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRH3을 포함하는 가변 영역을 갖는 중쇄, 및 서열번호 50(도 28)으로 표시된 아미노산 서열 또는 1개 내지 3개의 아미노산(들)의 치환에 의해 서열번호 50의 아미노산 서열로부터 유도된 아미노산 서열로 구성된 CDRL1, 서열번호 52(도 29)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL2 및 서열번호 54(도 30)로 표시된 아미노산 서열로 구성된 CDRL3을 포함하는 가변 영역을 갖는 경쇄로 구성되고 본 발명의 ROBO4 단백질을 인식하는 항체; 및 이 항체의 ROBO4 단백질 결합 활성을 유지하는 항체의 분획을 들 수 있다.

[0177] CDRH2에서의 아미노산 치환의 예로는 CDRH2에서 서열번호 46의 아미노산 4로 표시된 아미노산의 치환을 들 수 있다. 구체적으로, 서열번호 46의 아미노산 4인 아스파라긴은 글루타민으로 치환될 수 있다. 발생된 항체가 본 발명의 ROBO4에 대한 항체에 의해 나타나는 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 한, 치환될 아미노산은 한정되지 않는다.

[0178] CDRL1에서의 아미노산 치환의 예로는 CDRL1에서 서열번호 50의 아미노산 9, 11 및 13으로 표시된 아미노산들 중 임의의 1개 내지 3개, 바람직하게는 3개 아미노산의 치환을 들 수 있다. 구체적으로, 서열번호 50의 세린(아미노산 9), 글리신(아미노산 11) 및 쓰레오닌(아미노산 13)은 글루탐산, 라이신 및 류신으로부터 선택된 아미노산, 바람직하게는 각각 글루탐산, 라이신 및 류신으로 치환될 수 있다. 발생된 항체가 본 발명의 ROBO4에 대한 항체에 의해 나타나는 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 한, 치환될 아미노산(들)은 한정되지 않는다.

[0179] 펩티드 또는 단백질 내의 아스파라긴 잔기는 일부 조건에서 탈아미드화를 용이하게 겪는다고 보고되어 있으므로 (Gerger et al: The Journal of Biological Chemistry Vol.262 No.2, 785-794, 1987), 전술된 CDR들에서의 아미노산 치환은 본 발명의 인간화된 항체의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0180] 이들 CDRH들을 갖는 보다 바람직한 인간화된 항체의 중쇄 가변 영역의 예로는 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 50 내지 54, 69 내지 85 및 118 내지 126으로 표시됨), 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 50 내지 54, 69 내지 85 및 118 내지 126으로 표시됨), 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 50 내지 54, 69 내지 85 및 118 내지 126으로 표시됨), 및 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 각각 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 50 내지 54, 69 내지 85 및 118 내지 126으로 표시됨)을 들 수 있다. 이들 CDRL들을 갖는 보다 바람직한 인간화된 항체의 경쇄 가변 영역의 예로는 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 44 내지 59, 75 내지 81 및 114 내지 122로 표시됨), 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열(이때, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 44 내지 59, 75 내지 81 및 114 내지 122로 표시됨)을 들 수 있다.

[0181] 보다 바람직한 인간화된 항체의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 보다 바람직한 조합의 예로는 하기 조합들을 들 수 있다: 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체; 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체; 서열번호 62(도 38)의 아미노산 잔기 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체; 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체; 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체; 및 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 137로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 가변 영역 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 134로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 항체.

[0182] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 보다 바람직한 조합을 포함하는 전장 인간화된 항체의 훨씬 더 바람직한 예로는 하기 인간화된 항체들을 들 수 있다: 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노

산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-1140); 서열번호 58(도 34)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-1143); 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 66(도 42)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-2143); 서열번호 62(도 38)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-2140); 서열번호 56(도 32)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-1040); 및 서열번호 60(도 36)의 아미노산 번호 20 내지 463으로 표시된 아미노산 서열로 구성된 중쇄 및 서열번호 64(도 40)의 아미노산 번호 21 내지 239로 표시된 아미노산 서열로 구성된 경쇄를 포함하는 인간화된 항체(H-2040).

[0183] 본 발명의 가장 바람직한 항체는 H-1140, H-1143, H-2140 및 H-2143이다.

[0184] H-1140은 1) 인간 ROBO4에 특이적으로 결합하고 ROBO1, ROBO2 및 ROBO3에는 결합하지 않는 성질, 2) 인간 ROBO4에 대한 3.9 nM의 K_D 값을 갖는 성질, 3) 4주 동안 40℃ 하에서 인간 ROBO4에 대한 친화성을 유지하는 성질, 4) VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB 및 SDF-1로부터 선택된 하나 이상의 혈관신생 인자, 특히 VEGF 또는 bFGF에 의해 유도된 HUVEC 이동을 억제하는 성질, 5) 생체내에서 혈관신생을 억제하는 성질, 및 6) ISPRI 웹에 기초한 면역원성 스크리닝(에피백스 인코포레이티드(EpiVax, Inc.))에서 낮은 면역원성을 나타내는 성질을 갖는다.

[0185] H-1143은 1) 인간 ROBO4에 특이적으로 결합하고 ROBO1, ROBO2 및 ROBO3에는 결합하지 않는 성질, 2) 인간 ROBO4에 대한 3.5 nM의 K_D 값을 갖는 성질, 3) 4주 동안 40℃ 하에서 인간 ROBO4에 대한 친화성을 유지하는 성질, 4) VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB 및 SDF-1, 특히 VEGF 및 bFGF로부터 선택된 하나 이상의 혈관신생 인자에 의해 유도된 HUVEC 이동을 억제하는 성질, 5) 생체내에서 혈관신생을 억제하는 성질, 및 6) 에피스크린(EpiScreen)™ 면역원성 시험(안티토프 리미티드(Antitope Ltd.))에서 낮은 면역원성을 나타내는 성질을 갖는다.

[0186] H-2140은 1) 인간 ROBO4에 특이적으로 결합하고 ROBO1, ROBO2 및 ROBO3에는 결합하지 않는 성질, 2) 인간 ROBO4에 대한 1.8 nM의 K_D 값을 갖는 성질, 3) 4주 동안 40℃ 하에서 인간 ROBO4에 대한 친화성을 유지하는 성질, 4) 다양한 혈관신생 인자들, 예컨대, VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB 및 SDF-1, 특히 VEGF 및 bFGF에 의해 유도된 HUVEC 이동을 억제하는 성질, 5) 생체내에서 혈관신생을 억제하는 성질, 및 6) 에피스크린™ 면역원성 시험(안티토프 리미티드)에서 낮은 면역원성을 나타내는 성질을 갖는다.

[0187] H-2143은 1) 인간 ROBO4에 특이적으로 결합하고 ROBO1, ROBO2 및 ROBO3에는 결합하지 않는 성질, 2) 인간 ROBO4에 대한 1.7 nM의 K_D 값을 갖는 성질, 3) 4주 동안 40℃ 하에서 인간 ROBO4에 대한 친화성을 유지하는 성질, 4) 다양한 혈관신생 인자들, 예컨대, VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB 및 SDF-1, 특히 VEGF 및 bFGF에 의해 유도된 HUVEC 이동을 억제하는 성질, 5) 생체내에서 혈관신생을 억제하는 성질, 6) 에피스크린™ 면역원성 시험(안티토프 리미티드)에서 낮은 면역원성을 나타내는 성질, 및 7) 사이노몰구스 원숭이에게의 단회 유리체내 주사(2.75 mg/눈) 후 임상 징후, 체중, 음식물 소비, 혈액학, 혈액 화학, 병리학 또는 망막전도기록에서 심각한 변화를 보이지 않는 성질을 갖는다.

[0188] 항체, 예컨대, H-1140, H-1143, H-2143, H-2140, H-1040 및 H-2040의 아미노산 서열에 대한 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 항체도, 이 항체가 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 한, 본 발명의 항체에 포함된다. 더욱이, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합을 포함하는 상기 항체 또는 중쇄와 경쇄의 조합을 포함하는 상기 항체의 CDR들과 아미노산 서열 면에서 동일한 CDR들을 갖고, 그에 대한 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상의 동일성을 갖는 CDR 아미노산 서열 이외의 아미노산 서열을 갖는 항체도, 이 항체가 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 갖는 한, 본 발명의 항체에 포함된다.

[0189] (3-9) 동일한 부위에 결합하는 항체

[0190] 본 발명에 의해 제공된 항체에 의해 결합되는 부위와 "동일한 부위에 결합하는 항체"도 본 발명의 항체에 포함

된다. 특정 항체에 의해 결합되는 부위와 "동일한 부위에 결합하는 항체"는 이 항체에 의해 인식되는 항원 분자 상의 부위에 결합하는 또 다른 항체를 의미한다. 제2 항체가 제1 항체에 의해 결합되는 항원 분자 상의 부분 펩티드 또는 부분 3차원 구조에 결합하는 경우, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 부위에 결합한다는 결론을 내릴 수 있다. 나아가, 심지어 특이적 결합 부위의 펩티드 서열 또는 3차원 구조가 결정되지 않은 경우에도 제2 항체가 항원과의 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것, 즉 제2 항체가 제1 항체와 항원의 결합을 방해한다는 것을 확인함으로써 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 부위에 결합한다는 결론을 내릴 수 있다. 나아가, 제1 항체 및 제2 항체가 동일한 부위에 결합하고 제1 항체가 본 발명의 항체의 한 양태의 특징적인 효과, 예컨대, 항-혈관신생 활성을 갖는 경우, 제2 항체도 그와 동일한 활성을 가질 확률이 극도로 높다. 따라서, 제2 항-ROBO4 항체가 제1 항-ROBO4 항체에 의해 결합되는 부위에 결합하는 경우, 제1 항체 및 제2 항체는 ROBO4 단백질 상의 동일한 부위에 결합한다는 결론을 내릴 수 있다. 나아가, 제2 항-ROBO4 항체가 ROBO4 단백질과의 결합에 대해 제1 항-ROBO4 항체와 경쟁한다는 것을 확인함으로써 제1 항체 및 제2 항체가 ROBO4 단백질 상의 동일한 부위에 결합하는 항체라는 결론을 내릴 수 있다.

[0191] 본 발명의 MAb1에 의해 인식되는 ROBO4 단백질 상의 부위에 결합하는 항체도 본 발명에 포함된다.

[0192] 항체 결합 부위는 당업자에게 잘 공지된 방법, 예컨대, 면역분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 일련의 펩티드들을 항원의 아미노산 서열의 적절한 C-말단 또는 N-말단 절두로 제조하고, 그에 대한 항체의 반응성을 연구하여 인식 부위를 대략적으로 결정한다. 그 다음, 보다 짧은 펩티드들을 합성하고 이들 펩티드들에 대한 항체의 반응성을 연구하여 결합 부위를 결정할 수 있다. 유전자 재조합 또는 펩티드 합성과 같은 기법을 이용하여 항원 단편 펩티드를 제조할 수 있다.

[0193] 항체가 항원의 부분 입체구조에 결합하거나 이러한 부분 입체구조를 인식하는 경우, X-선 구조 분석을 이용하여 상기 항체에 인접한 항원 상의 아미노산 잔기를 확인함으로써 상기 항체에 대한 결합 부위를 결정할 수 있다.

[0194] (3-10) 항-ROBO4 항체의 변경된 형태 또는 그의 기능성 단편

[0195] 본 발명은 항체 또는 그의 기능성 단편의 변경된 형태를 제공한다. 본 발명의 항체 또는 그의 기능성 단편의 변경된 형태는 화학적 또는 생물학적 변경을 구비한 본 발명의 항체 또는 그의 기능성 단편을 의미한다. 화학적으로 변경된 형태는 화학적 모이어티와 접합된 아미노산 골격을 갖는 형태, 화학적으로 변경된 N-연결된 또는 O-연결된 탄수화물 쇄를 갖는 형태 등을 포함한다. 상기 화학적 모이어티 또는 형태는 독성 또는 세포독성을 나타낼 수 있다. 생물학적으로 변경된 형태는 번역 후 변경(예를 들면, N-연결된 또는 O-연결된 글리코실화, N-말단 또는 C-말단 프로세싱, 탈아미드화, 아스파르트산의 이성질체화 또는 메티오닌의 산화)을 겪은 형태, 원핵 숙주 세포를 사용한 발현에 의해 N-말단에 추가된 메티오닌 잔기를 함유하는 형태 등을 포함한다. 이러한 변경된 형태는 본 발명의 항체 또는 항원의 검출 또는 단리를 허용하도록 표지부착된 형태, 예를 들면, 효소-표지부착된 형태, 형광-표지부착된 형태 또는 친화성-표지부착된 형태도 포함하기 위한 것이다. 본 발명의 항체의 이러한 변경된 형태 또는 그의 기능성 단편은 본 발명의 원래의 항체 또는 그의 기능성 단편의 안정성 또는 혈액 체류의 개선, 항원성의 감소, 항체 또는 항원의 검출 또는 단리 등에 유용하다.

[0196] 화학적으로 변경된 형태에 함유된 화학적 모이어티의 예로는 수용성 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 덱스트란 및 폴리비닐 알코올을 들 수 있다.

[0197] 생물학적으로 변경된 형태의 예로는 효소 처리, 세포 처리 등에 의해 변경된 형태, 유전자 재조합에 의해 추가된 또 다른 펩티드, 예컨대, 태그와 융합된 형태, 및 내재성 또는 외재성 당쇄 변경 효소를 발현하는 숙주 세포로부터 제조된 형태를 들 수 있다.

[0198] 이러한 변경은 항체 또는 그의 기능성 단편 내의 임의 위치 또는 원하는 위치에서 만들어질 수 있다. 대안적으로, 동일한 또는 2개 이상의 상이한 변경들이 항체 또는 그의 기능성 단편 내의 1개 또는 2개 이상의 위치에서 만들어질 수 있다.

[0199] 본 발명에서, "항체 단편의 변경된 형태"는 심지어 "항체의 변경된 형태의 단편"도 포함하기 위한 것이다.

[0200] 예를 들면, 종종, 배양된 포유동물 세포에 의해 생성된 항체는 그의 중쇄에서 카복실-말단 라이신 잔기를 결여한다는 것이 공지되어 있다(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)). 종종 중쇄의 2개 카복실-말단 아미노산 잔기들(즉, 글리신 및 라이신)이 결여되고 카복실-말단에 새로 위치하는 프롤린 잔기가 아미드화된다는 것도 공지되어 있다(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). 그러나, 이들 중쇄 서열들에서의 이러한 결여 또는 변경은 항체가 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치지 않고 항체의 이펙터 기능(보체 활성화, 항체 의존적 세포독성 등)에도 영향을 미치지 않는다. 따라서, 변경을 갖는 항체 및 이 항체의 기능성 단편

도 본 발명의 항체에 포함된다. 이러한 항체의 예로는 중쇄의 카복실-말단에서 1개 또는 2개의 아미노산(들)이 결실되거나 결여됨으로써 본 발명의 항체로부터 유도된 결실 돌연변이체, 및 아미드화된 잔기(예를 들면, 중쇄의 카복실-말단 부위에서 아미드화된 프롤린 잔기)를 갖는 결실 돌연변이체를 들 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 항체의 결실 돌연변이체는, 이 결실 돌연변이체가 항원에 결합하는 능력 및 활성 (3-3) 내지 (3-5)의 전부 또는 일부를 유지하는 한, 전술된 종류들로 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 항체를 구성하는 2개의 중쇄들은 전장 중쇄 및 결실 돌연변이체의 중쇄로 구성된 군으로부터 선택된 임의의 1종의 중쇄로 구성될 수 있거나, 이들로부터 선택된 임의의 2종의 중쇄들의 조합으로 구성될 수 있다. 결실 변이체 중쇄(들)의 정량적 비는 예를 들면, 본 발명에 따른 항체를 생성하는 배양된 포유동물 세포의 종류, 및 세포의 배양 조건에 민감하다. 본 발명에 따른 항체의 주성분으로서 이러한 결실 변이체 중쇄의 예로는 둘다가 1개의 카복실-말단 아미노산 잔기를 결여하는 2개의 중쇄들을 들 수 있다. 이들 결실 변이체들의 전부가 본 발명에 따른 항체 변이체, 항체의 기능성 단편 또는 그의 변경된 형태에 포함된다.

[0201] 4. 항체의 제조 방법

[0202] (4-1) 하이브리도마를 사용하는 방법

[0203] 본 발명의 항-ROBO4 항체를 제조하기 위해, 문헌(Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p.495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody, p.365-367, Prenum Press, N. Y. (1980))의 방법에 따라 ROBO4 단백질로 면역화된 동물의 비장으로부터 항-ROBO4 항체 생성 세포를 단리한다. 상기 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 확립하고, 이들 하이브리도마의 배양물로부터 단일클론 항체를 수득할 수 있다.

[0204] (4-1-1) 항원의 제조

[0205] 항-ROBO4 항체의 제조를 위한 항원은 예를 들면, 본 명세서의 다른 단락들에 기재된 천연 또는 재조합 ROBO4 단백질 제조 방법에 따라 수득될 수 있다. 이로써 제조될 수 있는 항원의 예로는 ROBO4 단백질, 또는 그의 6개 이상의 연속 아미노산을 갖는 부분 서열을 포함하는 ROBO4 단백질 단편, 및 그에 추가된 임의 아미노산 서열 또는 담체를 추가로 포함하는 그들의 유도체를 들 수 있다(이하, "ROBO4 항원"으로서 총칭됨).

[0206] 재조합 ROBO4 항원은 ROBO4 항원의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자로 숙주 세포를 형질감염시키고 상기 세포의 배양물로부터 상기 항원을 수집함으로써 제조될 수 있다. 천연 ROBO4 항원은 예를 들면, 혈관신생을 갖는 인간 또는 설치류 조직, 이 조직으로부터 유래된 세포 또는 이 세포의 배양물로부터 정제될 수 있거나 단리될 수 있다. 세포 무함유 시험관내 번역 시스템에서 ROBO4 항원의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자로부터 수득된 ROBO4 항원도 본 발명의 "ROBO4 항원"에 포함된다.

[0207] (4-1-2) 항-ROBO4 단일클론 항체의 제조

[0208] 상기 단일클론 항체는 전형적으로 하기 단계들에 의해 제조된다:

[0209] (a) 항원을 제조하는 단계,

[0210] (b) 항체 생성 세포를 제조하는 단계,

[0211] (c) 골수종 세포(이하, "골수종"으로서 지칭됨)를 제조하는 단계,

[0212] (d) 상기 항체 생성 세포를 골수종과 융합시키는 단계,

[0213] (e) 관심있는 항체를 생성하는 하이브리도마 군에 대해 스크리닝하는 단계, 및

[0214] (f) 단일 세포 클론을 수득하는 단계(클로닝).

[0215] 이 제조 방법은 필요한 경우 (g) 하이브리도마를 배양하는 단계, 하이브리도마가 이식된 동물을 발생시키는 단계 등, (h) 단일클론 항체의 생물학적 활성을 분석하거나 측정하는 단계 등을 추가로 포함한다.

[0216] 이하, 단일클론 항체의 제조 방법은 이들 단계들과 관련하여 상세히 기재될 것이다. 그러나, 상기 항체의 제조 방법은 이들로 한정되지 않고, 예를 들면, 비장 세포 및 골수종 이외의 항체 생성 세포가 사용될 수 있다.

[0217] (a) 항원을 제조하는 단계

[0218] 상기 (2-3)에 기재된 ROBO4 단백질 제조 방법에 따라 항원을 제조할 수 있다.

[0219] (b) 항체 생성 세포를 제조하는 단계

[0220] 단계 (a)에서 수득된 항원을 항원보강제, 예컨대, 프로인트 완전 또는 불완전 항원보강제 또는 황산알루미늄칼륨과 혼합하고, 실험 동물을 발생된 면역원으로 면역화시킨다. 당분야에서 공지된 하이브리도마 제조 방법에서 사용된 임의의 실험 동물이 제한 없이 사용될 수 있다. 구체적으로, 예를 들면, 마우스, 래트, 염소, 양, 소 또는 말이 사용될 수 있다. 단리된 항체 생성 세포 등과 융합될 용이하게 입수가능한 골수종 세포의 관점에 비추어 볼 때 면역화될 동물은 바람직하게는 마우스 또는 래트이다.

[0221] 실제로 사용되는 마우스 및 래트 품종은 특별히 한정되지 않는다. 마우스의 경우, 예를 들면, A, AKR, BALB/c, BALB/cAnNCrj, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB 또는 129가 사용될 수 있다. 래트의 경우, 예를 들면, 위스타(Wistar), 로우(Low), 르위스(Lewis), 스프라그-다울리(Sprague-Dawley), ACI, BN 또는 피셔(Fischer)가 사용될 수 있다.

[0222] 이들 마우스 및 래트는 실험 동물 사육소/분양소, 예를 들면, 클레아 재팬 인코포레이티드(CLEA Japan, Inc.) 또는 찰스 리버 라보라토리스 재팬 인코포레이티드(Charles River Laboratories Japan Inc.)로부터 입수될 수 있다.

[0223] 이들 중 BALB/c 마우스 품종 또는 위스타 및 로우 래트 품종이 후술된 골수종 세포와의 융합 적합성을 고려할 때 면역화될 동물로서 특히 바람직하다.

[0224] 또한, 인간 항원과 마우스 항원 사이의 상동성을 고려할 때, 자가항체를 제거하는 생물학적 기작이 감소되어 있는 마우스, 즉 자가면역 질환 마우스도 바람직하게 사용된다.

[0225] 이와 관련하여, 이들 마우스 또는 래트는 면역화 시점에서 바람직하게는 5주령 내지 12주령, 보다 바람직하게는 6주령 내지 8주령이다.

[0226] 예를 들면, 문헌(Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois (1964))의 방법을 이용하여 ROBO4 단백질로 동물을 면역화시킬 수 있다.

[0227] 항체 역가 측정 방법의 예로는 면역분석, 예컨대, RIA 및 ELISA를 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0228] 면역화된 동물로부터 분리된 비장 세포 또는 림프구로부터 유래된 항체 생성 세포를 당분야에서 공지된 방법, 예를 들면, 문헌(Kohler et al., Nature (1975) 256, p.495; Kohler et al., Eur. J. Immnol. (1977) 6, p.511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p.550; Walsh, Nature, (1977) 266, p.495)의 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0229] 비장 세포의 경우, 비장을 잘게 자르는 단계, 스테인레스 메쉬를 통해 세포를 여과하는 단계 및 이어서 발생된 세포를 이글(Eagle's) 최소 필수 배지(MEM) 등에 부유시켜 항체 생성 세포를 분리하는 단계를 포함하는 일반적인 방법이 채택될 수 있다.

[0230] (c) 골수종을 제조하는 단계

[0231] 세포 융합에서 사용되는 골수종 세포는 특별히 한정되지 않고 당분야에서 공지된 세포주로부터 사용하기에 적절하게 선택될 수 있다. 스크리닝 절차가 이미 확립된 HGPRT(하이포잔틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제) 결핍 세포주, 즉 마우스 유래의 X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8.653(X63.653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45.6TG1.7(45.6TG), FO, S149/5XXO, BU.1 등, 래트 유래의 210.RSY3.Ag.1.2.3(Y3) 등, 또는 인간 유래의 U266AR(SKO-007), GM1500-GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2), 8226AR/NIP4-1(NP41) 등이 융합 세포로부터 하이브리도마를 선택하는 데에 있어서의 편의를 고려할 때 바람직하게 사용된다. 이들 HGPRT 결핍 세포주들은 예를 들면, 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)으로부터 입수될 수 있다.

[0232] 이들 세포주들은 적절한 배지, 예를 들면, 8-아자구아닌 배지[글루타민, 2-머캡토에탄올, 젠타미신 및 태아 소혈청(이하, "FCS"로서 지칭됨)으로 보충되고 8-아자구아닌으로 더 보충된 RPMI-1640 배지], 이스코브 변경 둘베코 배지(이하, "IMDM"으로서 지칭됨) 또는 둘베코 변경 이글 배지(이하, "DMEM"으로서 지칭됨)에서 하위배양되고, 세포 융합 당일 2 x 10^7개 세포 이상의 세포수를 확보하기 위해 세포 융합 3일 내지 4일 전에 일반 배지[예를 들면, 10% FCS를 함유하는 ASF104 배지(아지노모토 컴파니 인코포레이티드(Ajinomoto Co., Inc.)에 의해 제조됨)에서 하위배양된다.

[0233] (d) 항체 생성 세포를 골수종 세포와 융합시키는 단계

[0234] 당분야에서 공지된 방법(문헌(Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)), 문헌(Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Spigfield, Illinois (1964)) 등)에 따라 세포 생존율이 극도로 감소되는 것을 방지하는 조건 하에서 항체 생성 세포를 골수종 세포와 융합시킬 수 있다. 예를 들면, 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜의 고농도 용액에서 항체 생성 세포를 골수종 세포와 혼합하는 단계를 포함하는 화학적 방법, 또는 전기 자극을 이용하는 물리적 방법이 이용될 수 있다.

[0235] (e) 관심있는 항체를 생성하는 하이브리도마 군에 대해 스크리닝하는 단계

[0236] 세포 융합에 의해 수득된 하이브리도마에 대한 선택 방법은 특별히 한정되지 않고, HAT(하이포잔틴-아미노프테린-타이미딘) 선택 방법(Kohler et al., Nature (1975) 256, p.495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p.550)이 전형적으로 이용된다. 이 방법은 아미노프테린의 존재 하에서 생존할 수 없는 HGPRT 결핍 골수종 세포주를 사용하여 하이브리도마를 수득하는 데에 효과적이다. 구체적으로, 비융합된 세포 및 하이브리도마를 HAT 배지에서 배양하여 아미노프테린에 대한 내성을 갖는 하이브리도마만이 선택적으로 남아 생장하게 할 수 있다.

[0237] (f) 단일 세포 클론을 수득하는 단계(클로닝)

[0238] 당분야에서 공지된 방법, 예를 들면, 메틸셀룰로스, 연질 아가로스 또는 제한 희석 방법(예를 들면, 문헌(Barbara, B. M. and Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)) 참조)을 이용하여 하이브리도마를 클로닝할 수 있다. 제한 희석 방법이 바람직하다.

[0239] (g) 하이브리도마를 배양하는 단계 및 하이브리도마가 이식된 동물을 발생시키는 단계

[0240] 선택된 하이브리도마를 배양하여 단일클론 항체를 생성할 수 있다. 바람직하게는, 원하는 하이브리도마를 클로닝한 후 항체를 생성할 수 있다.

[0241] 이 하이브리도마에 의해 생성된 단일클론 항체를 하이브리도마의 배양물로부터 수집할 수 있다. 뿐만 아니라, 재조합 항체도 단일클론 항체 유전자로 형질감염된 세포의 배양물로부터 수집할 수 있다. 나아가, 하이브리도마를 동일한 품종의 마우스(예를 들면, 전술된 BALB/cAnNCrj) 또는 Nu/Nu 마우스에 복강내로 주사하여 생장시킬 수 있다. 그 다음, 그들의 복수로부터 단일클론 항체를 수집할 수도 있다.

[0242] (h) 단일클론 항체의 생물학적 활성을 분석하거나 측정하는 단계

[0243] 다양한 생물학적 시험을 선택하여 목적에 따라 이 단계에 적용할 수 있다.

[0244] (4-2) 세포 면역화 방법

[0245] 천연 ROBO4 단백질을 발현하는 세포, 재조합 ROBO4 단백질 또는 그의 단편을 발현하는 세포 등을 면역원으로서 사용하여 전술된 하이브리도마 방법으로 항-ROBO4 항체를 제조할 수 있다.

[0246] 천연 ROBO4 단백질을 발현하는 세포의 예로는 혈관신생 질환, 예컨대, 증식성 당뇨망막병증 또는 종양으로 고통받는 환자로부터 유래된 세포, 및 이들 환자의 조직으로부터 유래된 세포를 들 수 있다. 이러한 세포는 바람직하게는 혈관 내피 세포이지만 이것으로 한정되지 않는다. 이들 ROBO4 단백질 발현 세포들은 1회 면역화에서 1 x 10^5개 내지 1 x 10^9개 세포, 바람직하게는 1 x 10^6개 내지 1 x 10^8개 세포, 보다 바람직하게는 0.5 x 10^7개 내지 2 x 10^7개 세포, 훨씬 더 바람직하게는 1 x 10^7개 세포의 양으로 사용된다. 면역화에 사용될 세포의 수는 ROBO4 단백질의 발현 수준에 따라 변화될 수 있다. 면역원은 일반적으로 복강내로 투여되고, 피내 경로 등을 통해 투여될 수 있다. (4-1-2)에 기재된 방법이 하이브리도마 제조 방식에 적용될 수 있다.

[0247] (4-3) 유전자 재조합 및 숙주 세포

[0248] 본 발명의 항체를 제조하기 위해, 그의 중쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드(중쇄 뉴클레오티드) 및 그의 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드(경쇄 뉴클레오티드), 또는 중쇄 뉴클레오티드의 삽입체를 함유하는 벡터 및 경쇄 뉴클레오티드의 삽입체를 함유하는 벡터로 숙주 세포를 형질감염시킨 후 배양하고, 배양물로부터 항체를 수집할 수 있다. 중쇄 뉴클레오티드 및 경쇄 뉴클레오티드는 한 벡터 내에 삽입될 수 있다.

[0249] 원핵 또는 진핵 세포가 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 진핵 세포가 숙주로서 사용되는 경우, 동물 세포, 식물 세포 또는 진핵 미생물이 사용될 수 있다.

[0250] 동물 세포의 예로는 포유동물 유래의 세포, 즉 원숭이 유래의 COS 세포(Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC 번호 CRL-1650), 마우스 섬유모세포 NIH3T3(ATCC 번호 CRL-1658), 마우스 NSO 세포주(ECACC), 중국 햄스터 난소 세포(CHO 세포, ATCC 번호 CCL-61), 그의 디하이드로폴레이트 환원효소 결핍 세포주(CHOdhfr-: Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p.4126-4220), 론자 바이올로직스(Lonza Biologics)에 의해 개발된 CHOK1SV, 조류, 예컨대, 닭으로부터 유래된 세포, 및 곤충으로부터 유래된 세포를 들 수 있다.

[0251] 또한, 본 발명의 숙주 세포는 항체 단백질에 부착된 당쇄의 구조가 변경되어 있는 항체 단백질을 생성할 수 있는 세포를 포함하고, 이때 변경을 갖는 항체의 생물학적 활성은 바람직하게는 변경을 갖지 않은 항체에 비해 향상되어 있다. 본 발명의 이러한 숙주 세포의 예로는 항체의 Fc 영역에 결합된 복합 N-글리코사이드-연결된 당쇄를 갖는 항체 단백질을 생성할 수 있는 CHO 세포를 들 수 있고, 이때 항체의 Fc 영역에 결합된 총 복합 N-글리코사이드-연결된 당쇄들 중에서 푸코스가 당쇄의 환원 말단에서 N-아세틸글루코스아민에 결합되어 있지 않은 당쇄의 비는 20% 이상이다(국제 특허출원 공보 제WO2000/61739호 및 제WO2002/31140호).

[0252] 진핵 미생물의 예로는 효모를 들 수 있다. 원핵 세포의 예로는 이. 콜라이(*E. coli*) 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 들 수 있다.

[0253] 본 발명의 항-ROBO4 항체를 생성하기 위한 숙주 세포로서 바람직하게는 포유동물 유래의 세포가 사용되고, 보다 바람직하게는 CHO 세포가 사용되고, 훨씬 더 바람직하게는 CHOK1SV가 사용된다.

[0254] 본 발명의 항체(다양한 동물 종들로부터 유래된 단일클론 항체, 래트 항체, 마우스 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 인간 항체 등)의 분비를 위한 신호 펩티드는 상기 항체와 동일한 종, 동일한 종류 및 동일한 하위종류의 항체의 분비 신호, 또는 항체 그 자체의 분비 신호로 한정되지 않는다. 그와 상이한 종류 또는 하위종류의 항체의 임의의 분비 신호, 또는 그와 상이한 진핵 종 또는 원핵 종으로부터 유래된 단백질의 임의의 분비 신호가 선택되고 사용될 수 있다.

[0255] (4-4) 인간화된 항체를 디자인하고 제조하는 방법

[0256] 인간화된 항체의 예로는 비인간 동물 항체의 CDR들로 치환된 CDR들을 갖는 인간 유래의 항체(문헌(Nature (1986) 321, p. 522-525) 참조), CDR 이식 방법에 의해 CDR 서열 및 골격 영역의 일부 아미노산 잔기들을 이식받은 인간 항체(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO90/07861호 및 미국 특허 제6972323호 참조), 및 이들 인간화된 항체들 중 임의의 인간화된 항체에서 1개 또는 2개 이상의 비인간 동물 항체 유래의 아미노산(들)을 치환시킨 인간 항체 아미노산(들)을 갖는 항체를 들 수 있다.

[0257] (4-5) 인간 항체를 제조하는 방법

[0258] 본 발명의 항체의 추가 예로는 인간 항체를 들 수 있다. 항-ROBO4 인간 항체는 인간 유래의 항체의 아미노산 서열로 구성된 항-ROBO4 항체를 의미한다. 항-ROBO4 인간 항체는 인간 항체 중쇄 및 경쇄 코딩 유전자를 포함하는 인간 게놈 DNA 단편을 보유하는 인간 항체 생성 마우스를 사용하는 방법에 의해 수득될 수 있다(예를 들면, 문헌(Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p.133-143), 문헌(Kuroiwa, Y. et. al., Nuc. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448), 문헌(Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999), 문헌(Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727) 등 참조).

[0259] 구체적으로, 이러한 인간 항체 생성 동물은 비인간 포유동물의 내재성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자 좌위를 파괴하고 대신에 효모 인공 염색체(YAC) 벡터 등을 통해 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자 좌위를 그에 도입함으로써 제조될 수 있다. 대안적으로, 유전자 재조합 기법으로 이러한 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 코딩 cDNA들, 바람직하게는 상기 cDNA들 각각을 포함하는 벡터를 사용하여 진핵 세포를 형질전환시키고, 재조합 인간 단일클론 항체를 생성하는 형질전환된 세포를 배양한다. 배양 상청액으로부터 이 항체를 수득할 수 있다.

[0260] 이와 관련하여, 예를 들면, 진핵 세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 예컨대, CHO 세포, 림프구 또는 골수종이 숙주로서 사용될 수 있다.

[0261] 인간 항체 라이브러리로부터 선택된 파지 디스플레이 유래의 인간 항체를 수득하는 방법(문헌(Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p.2301-2308), 문헌(Carmen, S. et.

al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p.189-203), 문헌(Siriwardena, D. et. al., Opthalmology (2002) 109 (3), p.427-431) 등 참조)도 공지되어 있다.

[0262] 예를 들면, 인간 항체의 가변 영역이 파지 표면 상에서 단일 쇄 항체(scFv)로서 발현되게 하는 단계 및 항원에 결합하는 파지를 선택하는 단계를 포함하는 파지 디스플레이 방법(Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116)이 이용될 수 있다.

[0263] 파지와 항원의 결합을 기초로 선택된 파지의 유전자를 분석하여 항원에 결합하는 인간 항체의 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열을 결정할 수 있다.

[0264] 항원에 결합하는 scFv의 DNA 서열이 결정되면, 이 서열을 갖는 발현 벡터를 제조하고, 적절한 숙주를 상기 발현 벡터로 형질감염시키고 인간 항체를 발현하게 한다(국제 특허출원 공보 제WO92/01047호, 제WO92/20791호, 제WO93/06213호, 제WO93/11236호, 제WO93/19172호, 제WO95/01438호 및 제WO95/15388호, 문헌(Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p.433-455) 및 문헌(Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p.1105-1116)).

[0265] (4-6) 항체의 기능성 단편을 제조하는 방법

[0266] 단일 쇄 항체를 제조하는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 미국 특허 제4,946,778호, 제5,260,203호, 제5,091,513호 및 제5,455,030호 참조). 이 scFv에서, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역은 이들이 접합체를 형성하는 것을 방지하는 연결제, 바람직하게는 폴리펩티드 연결제를 통해 연결된다(Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85, p. 5879-5883). scFv에서 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 동일한 항체로부터 유래될 수 있거나 상이한 항체로부터 유래될 수 있다.

[0267] 예를 들면, 12개 내지 19개의 잔기들로 구성된 임의 단일 쇄 펩티드가 이들 가변 영역들을 연결하는 폴리펩티드 연결제로서 사용된다.

[0268] scFv 코딩 DNA를 수득하기 위해, 항체의 중쇄 또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 및 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA의 서열들 중 전체 또는 원하는 아미노산 서열을 코딩하는 각각의 DNA 부분을 주형으로서 사용하고 이 주형의 양 말단들을 플랭킹하는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR로 증폭시킨다. 그 후, 폴리펩티드 연결제 모이어티를 코딩하는 DNA도 그의 양 말단들을 플랭킹하는 프라이머 쌍으로 함께 증폭하여 이들 말단들을 각각 중쇄 및 경쇄에 연결한다.

[0269] scFv 코딩 DNA를 상용적인 방법에 따라 사용하여 상기 DNA를 함유하는 발현 벡터를 제조할 수 있고 숙주 세포를 상기 발현 벡터로 형질전환시킬 수 있다. 추가로, 숙주 세포를 배양하고 scFv를 상용적인 방법에 따라 배양물로부터 수집할 수 있다.

[0270] 또한, 항체의 다른 기능성 단편을 수득하기 위해, 각각의 기능성 단편을 코딩하는 유전자를 전술된 방법에 따라 수득하고, 세포를 상기 유전자로 형질감염시킨다. 관심있는 기능성 단편을 세포의 배양물로부터 수집할 수 있다.

[0271] 본 발명의 항체를 다량체화하여 항원에 대한 그의 친화성을 향상시킬 수 있다. 다량체화되는 항체는 1종의 항체일 수 있거나 복수의 에피토프들 각각 또는 동일한 항원을 인식하는 복수의 항체들일 수 있다. 항체 다량체화 방법의 예로는 2개의 scFv들과 IgG CH3 도메인의 결합, 2개의 scFv들과 스트렙타비딘의 결합 및 나선-회전-나선 모티프의 도입을 들 수 있다.

[0272] 본 발명의 항체는 아미노산 서열 면에서 상이한 복수의 종류의 항-ROBO4 항체들의 혼합물, 즉 다중클론 항체일 수 있다. 다중클론 항체의 예로는 CDR 세트의 부분 또는 전체에서 상이한 복수의 종류의 항체들의 혼합물을 들 수 있다. 이러한 다중클론 항체는 혼합 배양된 상이한 항체 생성 세포들의 배양물로부터 수집될 수 있다(국제 특허출원 공보 제WO2004/061104호). 뿐만 아니라, 별도로 제조된 항체들을 혼합할 수 있다. 나아가, 동물을 원하는 항원으로 면역화시키고 표준 방법에 따라 상기 동물로부터 혈청을 수집함으로써 다중클론 항체의 한 양태인 항혈청을 제조할 수 있다.

[0273] 다양한 분자들, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 접합체 항체도 항체의 변경된 형태로서 사용될 수 있다.

[0274] 본 발명의 항체는 이들 항체와 다른 약물에 의해 형성된 임의의 접합체(면역접합체)일 수도 있다. 이러한 항체의 예로는 방사성 물질 또는 약리학적 효과를 갖는 화합물과 접합된 항체를 들 수 있다(Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146).

[0275] (4-7) 항체의 정제

[0276] 수득된 항체를 균질한 수준으로 정제할 수 있다. 항체의 분리 및 정제를 위해 통상적인 단백질 분리 및 정제 방법을 이용할 수 있다.

[0277] 적절하게 선택되거나 조합된 방법, 예를 들면, 크로마토그래피 컬럼, 필터, 한외여과, 염석, 투석, 분취 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및/또는 등전점 포커싱(isoelectric focusing)(그러나, 이들로 한정되지 않음)으로 항체를 분리하고 정제할 수 있다(Strategies for Protein Purification and Charcterization: A Laboratoy Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

[0278] 크로마토그래피의 예로는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 크로마토그래피, 겔 여과, 역상 크로마토그래피 및 흡착 크로마토그래피를 들 수 있다.

[0279] 액체상 크로마토그래피, 예컨대, HPLC 또는 FPLC를 이용하여 이들 크로마토그래피 방법을 수행할 수 있다.

[0280] 친화성 크로마토그래피에서 사용되는 컬럼의 예로는 단백질 A, 단백질 G 및 항원 컬럼을 들 수 있다.

[0281] 단백질 A 컬럼의 예로는 (폴 코포레이션(Pall Corp.)에 의해 제조된) 하이퍼(Hyper) D, (어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드(Applied Biosystems, Inc.)에 의해 제조된) POROS 및 (지이 헬스케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조된) 세파로스 F.F.를 들 수 있다.

[0282] 또한, 항원-고정된 담체를 사용하여 항원에 대한 항체의 결합 활성을 기초로 항체를 정제할 수 있다.

[0283] 본 발명은 본 발명의 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태를 코딩하는 유전자, 이 유전자의 삽입체를 함유하는 재조합 벡터, 상기 유전자 또는 벡터로 형질감염된 세포, 및 본 발명의 항체를 생성하는 세포도 제공한다.

[0284] 방법 (4-1) 내지 (4-6) 중 임의의 방법에 의해 제조된 항체 또는 그의 기능성 단편이 본 발명에 포함될 수 있다.

[0285] 5. 약학 조성물

[0286] 본 발명은 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0287] 본 발명의 약학 조성물은 발병, 진행 및/또는 악화의 과정 동안 병리학적 소견들 중 하나로서 혈관신생을 보이고 이 혈관신생 또는 혈관 투과성의 억제에 의해 개선될 수 있는 질환(이하, 이 질환은 편의상 "혈관신생 질환"으로서 지칭됨)의 치료 또는 예방에 유용하다. 혈관신생 질환의 예로는 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 및 비만을 들 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 혈관신생 질환의 치료 또는 예방에 있어서 약제로서 유용하고, 특히 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 수정체뒤섬유증식, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장 및 각막 조직 이식의 면역 거부의 치료 또는 예방에 유용하고, 보다 바람직하게는 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 수정체뒤섬유증식, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증 및 혈관신생 녹내장의 치료 또는 예방에 유용하다.

[0288] 본 발명에서, 질환의 치료 및/또는 예방은 질환, 바람직하게는 발현된 ROBO4 단백질을 갖는 개체에서의 질환의 발병의 예방, 그의 악화 또는 진행의 억제 또는 저해, 질환으로 고통받는 개체에 의해 나타나는 1개 또는 2개 이상의 증상의 경감, 그의 악화 또는 진행의 억제 또는 관해, 2차 질환의 치료 또는 예방 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0289] 본 발명의 약학 조성물은 치료 또는 예방 유효량의 항-ROBO4 항체 또는 이 항체의 기능성 단편 및 약학적으로 허용가능한 희석제, 비히클, 가용화제, 유화제, 보존제 및/또는 첨가제를 함유할 수 있다.

[0290] "치료 또는 예방 유효량"은 특정 제형 및 투여 경로에 의해 특정 질환에 대한 치료 또는 예방 효과를 발휘하는 양을 의미한다.

[0291] 본 발명의 약학 조성물은 이 조성물 또는 그에 함유된 항체의 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색채, 긴장성, 멸균성 또는 안정성, 가용성, 지속된 방출, 흡수성, 투과성, 제형, 강도, 성질, 형태 등을 변화시키거나, 유지하거나 보유하기 위한 물질(이하, "약학 물질"로서 지칭됨)을 함유할 수 있다. 약학 물질은, 이 물질이 약리학적으로

허용가능한 물질인 한, 특별히 한정되지 않는다. 예를 들면, 무독성 또는 낮은 독성이 바람직하게는 이들 약학 물질들에 의해 보유된 성질이다.

[0292] 약학 물질의 예로는 하기 물질들을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다: 아미노산, 예컨대, 글리신, 알라닌, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 및 라이신; 항균제; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산, 황산나트륨 및 중아황산나트륨; 완충제, 예컨대, 인산염, 구연산염 또는 붕산염 완충제, 중탄산나트륨 및 트리스-HCl 용액; 충전제, 예컨대, 만니톨 및 글리신; 킬레이팅제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 착물화제, 예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리딘, β-사이클로덱스트린 및 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린; 증량제, 예컨대, 글루코스, 만노스 및 덱스트린; 다른 탄수화물, 예컨대, 단당류, 이당류, 글루코스, 만노스 및 덱스트린; 착색제; 교취제; 희석제; 유화제; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리딘; 저분자량 폴리펩티드; 염 형성 반대이온; 방부제, 예컨대, 염화벤즈알코늄, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페에틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 및 과산화수소; 용매, 예컨대, 글리세린, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜; 당 알코올, 예컨대, 만니톨 및 소르비톨; 현탁제; 계면활성제, 예컨대, PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트, 예컨대, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80, 트리톤, 트로메타민, 레시틴 및 콜레스테롤; 안정성 향상제, 예컨대, 수크로스 및 소르비톨; 탄성 향상제, 예컨대, 염화나트륨, 염화칼륨, 만니톨 및 소르비톨; 수송제; 희석제; 부형제; 및/또는 약학 첨가제.

[0293] 첨가되는 이들 약학 물질들의 양은 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태의 중량의 0.001배 내지 1000배, 바람직하게는 0.01배 내지 100배, 보다 바람직하게는 0.1배 내지 10배이다.

[0294] 리포좀 내에 캡슐화된 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태; 또는 리포좀과 접합된 항체를 포함하는 변경된 항체 형태를 포함하는 면역리포좀을 함유하는 약학 조성물(미국 특허 제6214388호 등)도 본 발명의 약학 조성물에 포함된다.

[0295] 부형제 또는 비히클은, 이들이 주사가능한 물, 식염수, 인공 뇌척수액, 및 경구 또는 비경구 투여를 위한 다른 제제에서 통상적으로 사용되는 액체 또는 고체 물질인 한, 특별히 한정되지 않는다. 식염수의 예로는 중성 식염수 및 혈청 알부민 함유 식염수를 들 수 있다.

[0296] 완충제의 예로는 약학 조성물의 최종 pH를 7.0 내지 8.5로 조절하는 트리스 완충제, 약학 조성물의 최종 pH를 4.0 내지 5.5로 조절하는 아세트산염 완충제, 약학 조성물의 최종 pH를 5.0 내지 8.0으로 조절하는 구연산염 완충제, 및 약학 조성물의 최종 pH를 5.0 내지 8.0으로 조절하는 히스티딘 완충제를 들 수 있다.

[0297] 본 발명의 약학 조성물은 고체, 액체, 현탁액 등이다. 본 발명의 약학 조성물의 또 다른 예로는 동결건조된 제제를 들 수 있다. 부형제, 예컨대, 수크로스를 사용하여 동결건조된 제제를 형성할 수 있다.

[0298] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 장 투여, 국소 투여 및 비경구 투여 중 임의의 투여일 수 있고, 바람직하게는 표적화된 질환에 따라 선택될 수 있다. 그의 구체적인 예로는 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 피내 투여, 피하 투여, 복강내 투여, 경피 투여, 골내 투여 및 관절내 투여를 들 수 있다. 또한, 안내 투여는 바람직하게는 눈 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 수정체뒤섬유증식, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장 또는 각막 조직 이식의 면역 거부의 경우 이용될 수 있다.

[0299] 약학 조성물의 처방(recipe)은 투여 방법, ROBO4 단백질에 대한 항체의 결합 친화성 등에 따라 결정될 수 있다. ROBO4 단백질에 대한 보다 높은 친화성(보다 낮은 K_D 값)을 갖는 본 발명의 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태는 보다 낮은 용량에서 그의 약물 효능을 발휘할 수 있다.

[0300] 본 발명의 항-ROBO4 항체의 복용량은 개체의 종, 질환의 종류, 증상, 성별, 연령, 기존 병태, ROBO4 단백질에 대한 항체의 결합 친화성 또는 그의 생물학적 활성, 및 다른 인자에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 통상적으로 0.01 내지 1000 mg/kg, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 복용량이 180일 동안 매일 1회, 또는 1일 2회 또는 3회 이상 투여될 수 있다.

[0301] 약학 조성물의 제형의 예로는 주사제(동결건조된 제제 및 점적제를 포함함), 좌약제, 경비 흡수 제제, 경피 흡수 제제, 설하 제제, 캡슐제, 정제, 연고, 과립제, 에어로졸, 환제, 산제, 현탁액, 유제, 점안제 및 생물학적 이식물 제제를 들 수 있다.

[0302] 활성 성분으로서 본 발명의 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태를 포함하는 약학 조성물은 추가 치료제 또는 예방제와 병용될 수 있다. 상기 치료제 또는 예방제의 예로는 항-혈관신생 약물, 소염

약물 및/또는 항암 약물을 들 수 있다. 예를 들면, 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물을 대상체에게 투여한 후, 활성 성분으로서 항-ROBO4 항체 또는 이 항체의 기능성 단편을 포함하는 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여한다. 대안적으로, 상기 약학 조성물을 대상체에게 투여한 후, 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물을 상기 대상체에게 투여한다. 대안적으로, 상기 약학 조성물을 항-혈관신생 약물, 소염 약물 및/또는 항암 약물과 동시에 대상체에게 투여할 수 있다. 항-혈관신생 약물의 예로는 라니비주맙을 들 수 있다.

[0303] 본 발명은 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만을 치료하거나 예방하는 방법, 상기 혈관신생 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물의 제조를 위한 본 발명의 항체의 용도, 및 상기 혈관신생 질환의 치료 또는 예방을 위한 본 발명의 항체의 용도도 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 치료 또는 예방용 키트도 본 발명에 포함된다.

[0304] 6. 진단용 조성물

[0305] 본 발명은 본 발명의 항-ROBO4 항체 또는 그의 기능성 단편, 또는 그의 변경된 형태를 포함하는 검사 또는 진단용 조성물(이하, "진단용 조성물"로서 총칭됨)을 제공한다.

[0306] 본 발명의 진단용 조성물은 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만의 검사 또는 진단에 유용하다. 본 발명의 진단용 조성물은 보편적인 진단 기준을 충족시키지 못하는 초기 혈관신생 또는 혈관신생 전 증상, 혈관신생으로 발전하는 비진단된 증상 등의 검사 또는 진단에도 유용하다. 본 발명에서, 상기 검사 또는 진단은 예를 들면, 질환을 획득할 위험의 확인 또는 시험, 질환의 존재 또는 부재의 확인, 진행 또는 악화 정도의 시험, 항-ROBO4 항체 등을 포함하는 약학 조성물을 사용한 약물 치료의 효과의 시험 또는 확인, 약물 치료 이외의 치료의 효과의 시험 또는 확인, 재발 위험의 시험, 및 재발의 존재 또는 부재의 확인을 포함한다. 그러나, 본 발명에 따른 검사 또는 진단은, 이것이 통상적인 검사 또는 진단인 한, 이들로 한정되지 않는다.

[0307] ROBO4 단백질이 건강한 개체로부터 유래된 샘플에 비해 시험 대상체로부터 유래된 샘플에서 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배 또는 20배 이상의 양, 바람직하게는 10배 이상의 양으로 검출되는 경우, 시험 대상체는 혈관신생 질환을 갖거나 이를 획득할 고위험에 있는 대상체로서 진단될 수 있다. 뿐만 아니라, ROBO4 단백질의 혈청 농도가 특정 기준 값을 초과하는 경우, 시험 대상체는 혈관신생 질환을 갖는 대상체로서 진단되거나 이를 획득할 고위험에 있는 대상체로서 진단될 수 있다. 상기 기준 값은 통상적으로 0.01 내지 10 ng/㎖, 바람직하게는 0.1 내지 1 ng/㎖, 보다 바람직하게는 0.1 내지 0.3 ng/㎖이다.

[0308] 이러한 진단용 조성물은 pH 완충제, 삼투조절제, 염, 안정화제, 방부제, 색채 현상제, 증감제, 응집 억제제 등을 함유할 수 있다.

[0309] 본 발명은 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만을 검사하거나 진단하는 방법, 상기 혈관신생 질환의 진단용 조성물의 제조를 위한 본 발명의 항체의 용도, 및 상기 혈관신생 질환의 검사 또는 진단을 위한 본 발명의 항체의 용도도 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 검사 또는 진단용 키트도 본 발명에 포함된다.

[0310] 본 발명의 항체를 사용하는 검사 또는 진단 방법은 바람직하게는 샌드위치 ELISA이다. 항체를 사용하는 통상적인 검출 방법, 예컨대, ELISA, RIA, ELISPOT(효소-연결된 면역스폿) 분석, 도트 블롯팅, 오우크터로니 시험 또는 CIE(역면역전기영동)가 이용될 수 있다. 샌드위치 ELISA 분석 시스템에 적용되는 항체는 ROBO4를 인식하지만 서로 경쟁하지 않는 2종의 항체들의 임의의 조합물일 수 있다. 바이오틴 이외에 생화학적 분석에서 수행될 수 있는 표지부착 방법, 예컨대, HRP, 알칼리성 포스파타제 또는 FITC가 항체를 위한 표지부착 방법으로서 사용될 수 있다. 발색 기질, 예컨대, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘), BCIP(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트), ρ-NPP(ρ-니트로페닐 포스페이트), OPD(o-페닐렌디아민), ABTS(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산), 수퍼시그날(SuperSignal) ELISA 피코 화학발광 기질(써모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드(Thermo Fisher Scientific

Inc.)), 형광 기질, 예컨대, 콴타블루(QuantaBlu)(TM) 형광발생 퍼록시다제 기질(써모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드) 및 화학발광 기질이 효소 표지부착을 이용하는 검출에서 사용될 수 있다. 인간 또는 비인간 동물로부터 유래된 샘플뿐만 아니라 인위적으로 처리된 샘플, 예컨대, 재조합 단백질도 이 분석에서 사용될 수 있다. 유기체 개체로부터 유래된 시험 샘플의 예로는 혈액, 활액, 복수, 림프, 뇌척수액 및 조직 균질화물 상청액을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0311] 본 발명의 항체를 포함하는 검사 또는 진단용 샌드위치 ELISA 키트는 ROBO4 단백질 표준물 용액, 착색 시약, 희석을 위한 완충제 용액, 고체상을 위한 항체, 검출을 위한 항체 및 세척 용액 등을 함유할 수 있다. 항원에 결합된 항체의 양은 바람직하게는 흡광도, 형광도, 발광도 또는 RI(방사성동위원소) 방법과 같은 방법을 이용함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는 흡광도 플레이트 판독기, 형광도 플레이트 판독기, 발광도 플레이트 판독기, RI 액체 신틸레이션 계수기 등이 이 측정에서 이용된다.

[0312] [실시예]

[0313] 이하, 본 발명은 실시예와 관련하여 보다 상세히 기재될 것이다. 그러나, 본 발명은 이들로 한정되기 위한 것이 아니다.

[0314] 달리 특정되어 있지 않은 한, 하기 실시예에서 각각의 유전공학적 공정은 문헌("Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989))에 기재된 방법 또는 당업자에 의해 이용되는 다른 실험 매뉴얼에 기재된 방법에 의해 수행되었거나, 사용된 상업적으로 입수가능한 시약 또는 키트의 설명서에 따라 수행되었다.

[0315] (실시예 1) 발현 벡터의 제조

[0316] 1)-1 인간 ROBO4 발현 벡터의 제조

[0317] 1)-1-1 전장 인간 ROBO4 발현 벡터의 제조

[0318] EcoRV 및 NotI을 사용하여 인간 ROBO4 cDNA(접수번호 BC039602)를 포함하는 플라스미드(오픈 바이오시스템스(Open Biosystems)에 의해 제조됨)로부터 인간 ROBO4 cDNA를 절단하고 pCI 벡터(프로메가 코포레이션(Promega Corp.)에 의해 제조됨)의 EcoRV와 NotI 사이에 도입하여 전장 인간 ROBO4 발현 벡터(이하, "pCI-hROBO4"로서 지칭됨)를 제조하였다. 이 벡터에 클로닝된 인간 ROBO4 유전자의 서열은 서열번호 1에 제시되어 있다. 또한, 인간 ROBO4의 아미노산 서열은 서열번호 2에 제시되어 있다.

[0319] 1)-1-2 인간 ROBO4 세포외 영역 발현 벡터의 제조

[0320] 하기 프라이머 세트를 사용하는 PCR 반응을 통해 인간 ROBO4 세포외 영역 폴리펩티드(서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 461로 표시된 아미노산 서열로 구성됨; 이하, "인간 ROBO4-ECD"로서 약칭됨)를 코딩하는 cDNA를 증폭하였다:

[0321] 프라이머 1F: 5'-aaaggtaccaccatgggctctggaggagacagcctcctg-3', 및
프라이머 1R: 5'-aaagatatcctgctccagggtccagggaccatgctcact-3'.

[0322] 수득된 PCR 생성물을 pEF6/V5-His-TOPO 벡터(라이프 테크놀로지스 코포레이션(Life Technologies Corp.)에 의해 제조됨) 내로 클로닝하였다(이하, 발생된 벡터는 "pEF6-ROBO4-ECD"로서 약칭되고; 이하, "pEF6-ROBO4-ECD"에 의해 발현된 재조합 단백질은 "rROBO4-ECD"로서 지칭됨).

[0323] 1)-1-3 N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4 및 인간 ROBO4 세포외 영역/도메인 결실 변이체 발현 벡터의 제조

[0324] FLAG 태그가 부착된 N-말단을 갖는, 인간 ROBO4의 서열번호 2의 아미노산 번호 28 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-28"로서 지칭됨), 그의 아미노산 번호 46 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-46"으로서 지칭됨), 그의 아미노산 번호 132 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-132"로서 지칭됨), 그의 아미노산 번호 210 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-210"으로서 지칭됨), 그의 아미노산 번호 225 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-225"로서 지칭됨), 또는 그의 아미노산 번호 341 내지 1007로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이 도면에서, 이 영역은 "hROBO4-341"로서 지칭됨)을 포함하는 단백질의 발현을 위한 벡터를 구축하기 위해, pCI-hROBO4를 주형으로서 사용하고 하기 각각의 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0325] hROBO4-28 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0326] 프라이머 2F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataagcaggactccccgccccagatcctagtccac-3', 및
프라이머 2R: 5'-gctagcggagtaatctacaggagaagcaccagccttg-3'.

[0327] hROBO4-46 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0328] 프라이머 3F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataagcctggccctgccaggatgagctgccaag-3', 및 프라이머 2R.

[0329] hROBO4-132 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0330] 프라이머 4F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataaggtggctgtcctccgggaggatttccagatc-3', 및 프라이머 2R.

[0331] hROBO4-210 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0332] 프라이머 5F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataagaccaacagcgcaggacatagggagagcc-3', 및 프라이머 2R.

[0333] hROBO4-225 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0334] 프라이머 6F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataagatccaggagccccaggactacacggagcc-3', 및 프라이머 2R.

[0335] hROBO4-341 증폭을 위한 프라이머 세트:

[0336] 프라이머 7F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagacagcctcctcggcggcagaggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggag gcatggctgattacaaggatgacgacgataagaggctgccggaaaaagtgcccagtgcccca-3', 및 프라이머 2R.

수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터(라이프 테크놀로지스 코포레이션(Life Technologies Corp.)에 의해 제조됨) 내로 도입하여 클로닝 벡터를 제조하였다. KpnI 및 NheI을 사용하여 각각의 클로닝 벡터로부터 상응하는 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 KpnI과 NheI 사이에 도입하여 N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4 발현 벡터 및 4개의 인간 ROBO4 세포외 영역/도메인 결실 변이체 발현 벡터들을 제조하였다. N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4 발현 벡터는 N-말단부터 ROBO4의 신호 서열(서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 27의 아미노산들) + FLAG 서열(DYKDDDDK) + ROBO4(서열번호 2의 아미노산 번호 28 내지 1007의 아미노산들)을 코딩하는 뉴클레오티드로 구성된다. 이하, N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4의 발현을 위한 벡터는 "pCI-FLAG-hROBO4-28"로서 지칭된다. 인간 ROBO4 세포외 영역/도메인 결실 변이체 발현 벡터들 중, 예를 들면, 서열번호 2의 아미노산 번호 46 내지 1007로 구성된 ROBO4의 발현을 위한 벡터는 ROBO4의 신호 서열(서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 27의 아미노산들) + FLAG 서열(DYKDDDDK) + 세포외 영역-결실된 ROBO4(서열번호 2의 아미노산 번호 46 내지 1007의 아미노산들)로 구성된다. 이 벡터는 "pCI-hROBO4-46"으로서 지칭된다. 마찬가지로, ROBO4의 세포외 영역에서 부분 결실을 갖는 ROBO4를 코딩하는 벡터들은 각각 "pCI-hROBO4-132", "pCI-hROBO4-210", "pCI-hROBO4-225" 및 "pCI-hROBO4-341"로서 지칭된다.

[0337] 상기 벡터에 클로닝된 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4 또는 인간 ROBO4의 세포외 영역/도메인 결실 변이체 각각의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3, 5, 7, 9, 11 또는 13에 제시되어 있다. 또한, 상응하는 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4 또는 인간 ROBO4의 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열은 서열번호 4, 6, 8, 10, 12 또는 14에 제시되어 있다.

[0338] 1)-1-4 인간 ROBO4 세포내 영역 결실 변이체 발현 벡터의 제조

[0339] 인간 ROBO4의 서열번호 2의 아미노산 번호 1 내지 511로 표시된 아미노산 서열로 구성된 영역(이하, 이 영역은 "hROBO4-ΔC"로서 지칭됨)을 포함하는 단백질의 발현을 위한 벡터를 구축하기 위해, pCI-hROBO4를 주형으로서 사용하고 hROBO4-ΔC를 위한 하기 프라이머 세트 및 퀵체인지(QuikChange) XL 부위-지정된 돌연변이유발 키트(아질런트 테크놀로지스 인코포레이티드(Agilent Technologies, Inc.)에 의해 제조됨)를 사용하여 인간 ROBO4의 511번째 아미노산을 코딩하는 코돈 바로 다음에 정지 코돈을 삽입함으로써 hROBO4-ΔC 발현 벡터(이하, "pCI-hROBO4-ΔC"로서 지칭됨)를 제조하였다:

[0340] 프라이머 8F: 5'-cagatataccagtgaggatgcctgaatcctaaaacacaggatggatc-3', 및
프라이머 8R: 5'-gatccatcctgtgttttaggattcaggcatcctcactggtatatctg-3'.

[0341] 1)-2 마우스 ROBO4 발현 벡터의 제조

[0342] 마우스 심장 퀵-클론 cDNA(타카라 바이오 인코포레이티드(Takara Bio Inc.)에 의해 제조됨)를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0343] 프라이머 9F: 5'-ggtaccgccatgggacaaggagaggagccgagagcagccatg-3', 및
프라이머 9R: 5'-gcggccgcggaggaatcaccagccttgggcacagcaccag-3'.

[0344] 수득된 PCR 생성물을 pCR-Blunt II-TOPO 벡터(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨) 내로 도입하여 마우스 ROBO4 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. KpnI 및 NotI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 마우스 ROBO4 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 KpnI과 NotI 사이에 도입하여 마우스 ROBO4 발현 벡터(이하, "pCI-mROBO4"로서 지칭됨)를 제조하였다. 이 벡터에 클로닝된 마우스 ROBO4 유전자 내의 ORF 부위의 서열은 서열번호 15의 뉴클레오티드 7 내지 3051에 제시되어 있다. 또한, 마우스 ROBO4의 아미노산 서열은 서열번호 16에 제시되어 있다.

[0345] 1)-3 래트 ROBO4 발현 벡터의 제조

[0346] 래트 비장 퀵-클론 cDNA(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0347] 프라이머 10F: 5'-ggtaccgccatgggacaaggagaggagctgagagcagcc-3', 및
프라이머 10R: 5'-gcggccgcggaggaatcaccagccttgggcacaacacc-3'.

[0348] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 래트 ROBO4 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. KpnI 및 NotI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 래트 ROBO4 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 KpnI과 NotI 사이에 도입하여 래트 ROBO4 발현 벡터(이하, "pCI-raROBO4"로서 지칭됨)를 제조하였다. 래트 ROBO4 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 17에 제시되어 있다. 이 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 18에 제시되어 있다.

[0349] 1)-4 N-말단 FLAG-태그부착된 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 발현 벡터의 제조

[0350] 사이노몰구스 원숭이 신장 총 RNA로부터 합성된 cDNA를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0351] 프라이머 11F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagaaagcctccggg-3', 및
프라이머 11R: 5'-ggagtaatctacaggagaagcaccagccttg-3'.

[0352] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 각각의 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA(이하, cynoROBO4-1 또는 cynoROBO4-2로서 지칭됨)를 포함하는 2종의 클로닝 벡터(이하, 이들 벡터들은 각각 pCR-cynoROBO4-1 및 pCR-cynoROBO4-2로서 지칭됨)를 제조하였다.

[0353] 그 다음, pCR-cynoROBO4-1 또는 pCR-cynoROBO4-2를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0354] 프라이머 12F: 5'-ggatccgccatgggctctggaggagaaagcctccg-3', 및
프라이머 12R: 5'-gcggccgctcaggagtaatctacaggagaagcaccagccttg-3'.

[0355] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 각각의 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. BamHI 및 NotI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 상응하는 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 BamHI과 NotI 사이에 도입하여 2종의 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 발현 벡터들(이하, 각각 pCI-cynoROBO4-1 및 pCI-cynoROBO4-2로서 지칭됨)을 제조하였다.

[0356] 그 다음, pCR-cynoROBO4-1 또는 pCR-cynoROBO4-2를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0357] 프라이머 13F: 5'-ggtaccgccatgggctctggaggagaaagcctccgaggctcccgggcttcccggcctctgctgctcctgctcatcatgggag
gcatggctgattacaaggatgacgacgataagcaggactccccgccccagatcctagtccac-3', 및 프라이머 12R.

[0358] 수득된 PCR 생성물을 pCR-TOPO 벡터(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨) 내로 도입하여 N-말단 FLAG-태그부착된 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA를 포함하는 각각의 클로닝 벡터를 제조하였다. KpnI 및 NotI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 상응하는 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 KpnI과 NotI 사이에 도입하여 N-말단 FLAG-태그부착된 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 발현 벡터(이하, 각각 "pCI-FLAG-cynoROBO4-1" 및 "pCI-FLAG-cynoROBO4-2"로서 지칭됨)를 제조하였다. pCI-FLAG-cynoROBO4-1 및 pCI-FLAG-cynoROBO4-2 각각에 클로닝된 사이노몰구스 원숭이 ROBO4 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 각각 서열번호 19 및 21에 제시되어 있다. 각각의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열은 각각 서열번호 20 및 22에 제시되어 있다.

[0359] 1)-5 N-말단 FLAG-태그부착된 인간 ROBO1 발현 벡터의 제조

[0360] 인간 심장 퀵-클론 cDNA(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0361] 프라이머 13F: 5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcaccatgattgcggagcccgctcacttttacctg-3', 및
프라이머 13R: 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgctttcagtttcctctaattcttc-3'.

[0362] 수득된 PCR 생성물 및 pDONR221 벡터(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)에 대한 BP 반응을 수행하여 인간 ROBO1 cDNA를 포함하는 공여자 벡터를 제조하였다.

[0363] 그 다음, 상기 공여자 벡터를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0364] 프라이머 14F: 5'-gcggccgcatgattgcggagcccgctcacttttacctgtttggattaatatgtctctgttcaggctcccgtcttgattacaaggatg
acgacgataagcgtcaggaagattttccacctcgcattgttg-3', 및
프라이머 14R: 5'-gctagctcagctttcagtttcctctaattcttc-3'.

[0365] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 N-말단 FLAG-태그부착된 인간 ROBO1 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. NheI 및 NotI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 N-말단 FLAG-태그부착된 인간 ROBO1 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 NheI과 NotI 사이에 도입하여 발현 벡터(이하, "pCI-FLAG-hROBO1"로서 지칭됨)를 제조하였다. N-말단 FLAG-태그부착된 인간 ROBO1 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 23에 제시되어 있다. 이 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 24에 제시되어 있다.

[0366] 1)-6 인간 ROBO2 발현 벡터의 제조

[0367] 인간 폐 퀵-클론 cDNA(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0368] 프라이머 15F: 5'-gcggccgcatgagtctgctgatgtttacacaactactg-3', 및
프라이머 15R: 5'-gctagcctataattcacctgtaaactgtccttgactgttg-3'.

[0369] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 인간 ROBO2 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. NotI 및 NheI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 인간 ROBO2 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 NotI과 NheI 사이에 도입하여 발현 벡터(이하, "pCI-hROBO2"로서 지칭됨)를 제조하였다. 인간 ROBO2 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 25에 제시되어 있다. 이 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 아미노산 서열은 서열번호 26에 제시되어 있다.

[0370] 1)-7 인간 ROBO3 발현 벡터의 제조

[0371] 인간 ROBO3/pENTR223.1(오픈 바이오시스템스(Open Biosystems)에 의해 제조됨)을 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0372] 프라이머 16F: 5'-gcggccgcatgctgcgctacctgctgaaaacgctgctg-3', 및
프라이머 16R: 5'-gctagctcatcttggttcctctcggcgtttctgtcc-3'.

[0373] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터 내로 도입하여 인간 ROBO3 cDNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. NotI 및 NheI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 인간 ROBO3 cDNA를 절단하고 pCI 벡터의 NotI과 NheI 사이에 도입하여 발현 벡터(이하, "pCI-hROBO3"으로서 지칭됨)를 제조하였다. 이 벡터에 클로닝된 인간 ROBO3 유전자 내의 ORF 부위의 서열은 서열번호 27의 뉴클레오티드 35 내지 4192에 제시되어 있다. 또한, 인간 ROBO3의 아미노산 서열은 서열번호 28에 제시되어 있다.

[0374] (실시예 2) 단일클론 항체의 제조

[0375] 2)-1 항원성 단백질의 제조

[0376] rROBO4-ECD를 발현시키기 위해, 293펙틴(fectin)(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)을 사용하여 프리스타일(FreeStyle) 293-F 세포(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)를 pEF6-ROBO4-ECD로 형질감염시키고 8% CO_2 조건 하에서 6일 동안 37℃에서 배양하였다. 배양의 완료 후, 배양 용액을 원심분리로 수집하고 rROBO4-ECD 정제 스톡(stock)으로서 사용하였다. 15000의 분자량 컷오프를 갖는 투석 튜브를 이용하여 수득된 배양 상청액을 20 mM 트리스-HCl(pH 7.5)에 대해 투석하고 필터(0.45 ㎛)를 통해 여과한 후, 20 mM 트리스-HCl(pH 7.5)로 평형화된 하이트랩(HiTrap) 16/10 Q XL(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨)에 첨가하였다. NaCl 구배(20 mM 트리스-HCl, pH 7.5/0.2 M NaCl, 20 mM 트리스-HCl, pH 7.5/1 M NaCl)를 이용하여 용출을 수행하였다. 용출 분획의 부분을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(이하, "SDS-PAGE"로서 약칭됨)으로 분리하였다. 그 다음, 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루 염색(이하, "CBB 염색"으로서 약칭됨)으로 염색하고 웨스턴 블롯팅으로 검출하여 rROBO4-ECD를 함유하는 분획을 확인하였다. 그 다음, rROBO4-ECD를 함유하는 분획을 수집하고 PBS로 평형화된 하이로드(HiLoad) 16/60 수퍼덱스 75 pg(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨)에 첨가하였다. PBS로 용출한 후, 용출 분획의 부분을 SDS-PAGE로 분리하였다. 그 다음, 겔을 CBB 염색으로 염색하고 웨스턴 블롯팅으로 검출하여 rROBO4-ECD를 함유하는 분획을 확인하였다. rROBO4-ECD를 함유하는 분획을 수집하고 면역화를 위한 항원 및 결합 친화성 분석을 위한 항원으로서 사용하였다. BCA 단백질 분석 시약(피어스 바이오테크놀로지 인코포레이티드(Pierce Biotechnology, Inc.)에 의해 제조됨)을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다.

[0377] 2)-2 면역화

[0378] 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였다. 0일째 날, rROBO4-ECD와 프로인트 완전 항원보강제의 혼합물 50 ㎍을 각각의 마우스에게 피하 또는 피내 투여하였다. 7일째 날, 14일째 날 및 21일째 날, rROBO4-ECD와 프로인트 불완전 항원보강제의 혼합물 50 ㎍을 상기 마우스에게 피하 또는 피내 투여하였다. 38일째 날, rROBO4-ECD 50 ㎍을 상기 마우스에게 복강내 투여하였다. 42일째 날, 마우스 림프절 또는 비장을 수집하여 하이브리도마 제조에 사용하였다.

[0379] 2)-3 하이브리도마 제조

[0380] 하이브리뮨(Hybrimune) 하이브리도마 제조 시스템(사이토 펄스 사이언시스 인코포레이티드(Cyto Pulse Sciences, Inc.)에 의해 제조됨)을 이용하여 림프절 세포 또는 비장 세포와 마우스 골수종 SP2/0-ag14 세포를 전기적으로 융합시키고 클로나셀(ClonaCell)-HY 선택 배지 D(스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드(StemCell Technologies Inc.)에 의해 제조됨)로 희석하고 배양하였다. 보이는 하이브리도마 콜로니를 수집하여 단일클론 하이브리도마를 제조하였다. 수집된 각각의 하이브리도마 콜로니를 배양하고, 수득된 하이브리도마 배양 상청액을 항-ROBO4 항체 생성 하이브리도마에 대해 스크리닝하였다.

[0381] 2)-4 항체 스크리닝

[0382] 2)-4-1 세포-ELISA를 위한 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0383] HEK293 세포를, 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 중의 7.5 x 10^5개 세포/㎖로 조절하였다. 리포펙타민 2000(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)을 사용하여 세포를 pCI-hROBO4 또는 음성 대조군 pCI-모의물로 형질감염시키고, 96웰 절반 면적 플레이트(코닝 인코포레이티드(Corning Inc.)에 의해 제조됨)에 50 ㎕/웰의 농도로 분배하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 수득된 형질감염된 세포들을 서로 부착시키면서 세포-ELISA에서 사용하였다.

[0384] 2)-4-2 유동 세포측정 분석을 위한 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0385] HEK293T 세포를 225-cm^2 플라스크(스미토모 베이켈라이트 컴파니 리미티드(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)에 의해 제조됨)에 1.125 x 10^7개 세포/플라스크의 농도로 접종하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 리포펙타민 2000을 사용하여 HEK293T 세포를 pCI-ROBO4 또는 음성 대조군 pCI-모의물로 형질감염시키고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 밤새 더 배양하였다. 다음 날, 발현 벡터로 형질감염된 HEK293T 세포를 TrypLE 익스프레스(Express)(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)로 처

리하고 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지로 세척한 후 5% FBS를 함유하는 PBS에 현탁하였다. 수득된 세포 현탁액을 유동 세포측정 분석에서 사용하였다.

[0386] 2)-5 세포-ELISA

[0387] 발현 벡터로 형질감염된 HEK293 세포(상기 2)-4-1에서 제조됨)로부터 상청액을 제거한 후, 하이브리도마 배양 상청액을 pCI-hROBO4로 형질감염된 HEK293 세포 및 pCI-모의물로 형질감염된 HEK293 세포 각각에 첨가하고, 세포를 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 각각의 웰 내의 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 5% FBS를 함유하는 PBS로 500배 희석된, 염소에서 생성된 항-마우스 IgG-퍼록시다제 항체(시그마-알드리치 코포레이션(Sigma-Aldrich Corp.)에 의해 제조됨)를 상기 세포에 첨가하고, 세포를 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 각각의 웰 내의 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 5회 세척하였다. 그 다음, OPD 용해 용액(0.05 M 구연산삼나트륨, 0.1 M 인산수소이나트륨 12수화물, pH 4.5)에 각각 0.4 mg/㎖ 및 0.6%(부피/부피)의 농도로 용해된 OPD 착색 용액(o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(와코 퓨어 케미칼 인더스트리스 리미티드(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)에 의해 제조됨) 및 H_2O_2를 25 ㎕/웰의 농도로 상기 세포에 첨가하였다. 간헐적으로 교반하면서 착색 반응을 수행하고 1 M HCl을 25 ㎕/웰의 농도로 첨가하여 중지시켰다. 그 다음, 플레이트 판독기(엔비젼(ENVISION); 퍼킨 엘머 인코포레이티드(Perkin Elmer, Inc.)에 의해 제조됨)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포막 표면 상에서 발현된 ROBO4에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하는 하이브리도마를 선택하기 위해, 음성 대조군 pCI-모의물로 형질감염된 HEK293 세포에 비해 pCI-hROBO4로 형질감염된 HEK293 세포에서 보다 높은 흡광도를 나타내는 배양 상청액 중의 하이브리도마를 항-ROBO4 항체 생성 양성 하이브리도마로서 선택하였다.

[0388] 2)-6 유동 세포측정 분석

[0389] 2)-5 세포-ELISA에서 양성으로 확인된 각각의 하이브리도마에 의해 생성된 항체는 ROBO4에 결합한다는 것을 유동 세포측정으로 더 확인하였다. 2)-4-2에서 제조된 HEK293T 세포 현탁액을 원심분리하였다. 상청액의 제거 후, 하이브리도마 배양 상청액을 pCI-hROBO4로 형질감염된 세포 및 pCI-모의물로 형질감염된 세포 각각에 첨가하고, 발생된 현탁액을 1시간 동안 4℃에서 방치하였다. 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 2회 세척하였다. 그 다음, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1000배 희석된 항-마우스 IgG FITC 접합체(시그마-알드리치 코포레이션에 의해 제조됨) 또는 5% FBS를 함유하는 PBS로 320배 희석된 항-래트 IgG FITC 접합체(시그마-알드리치 코포레이션에 의해 제조됨)를 상기 세포에 첨가하고, 발생된 현탁액을 1시간 동안 4℃에서 방치하였다. 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 3회 세척한 후, 5% FBS 및 2 ㎍/㎖ 7-아미노악티노마이신 D(몰레큘라 프로브스(Molecular Probes)에 의해 제조됨)를 함유하는 PBS에 재현탁하고, 유동 세포측정기(FC500; 벡크만 코울터 인코포레이티드(Beckman Coulter, Inc.)에 의해 제조됨)를 이용하여 검출하였다. 플로우조(Flowjo)(트리스타 인코포레이티드(TreeStar Inc.)에 의해 제조됨)를 이용하여 데이터를 분석하였다. 7-아미노악티노마이신 D 양성 사멸 세포를 게이팅(gating)으로 배제한 후, 생존 세포에 대한 FITC 형광 강도의 막대그래프를 작성하였다. pCI-ROBO4로 형질감염된 HEK293T 세포의 막대그래프가 음성 대조군 pCI-모의물로 형질감염된 293T 세포의 막대그래프에 비해 더 강한 형광 강도 영역으로 이동되어 있는 샘플을 생성하는 하이브리도마를 항-ROBO4 항체 생성 하이브리도마로서 수득하였다. 수득된 하이브리도마에 의해 생성된 항-ROBO4 항체들은 각각 MAb1, MAb2, MAb3 및 MAb4로서 명명되었다.

[0390] 2)-7 단일클론 항체의 동종형분류

[0391] 마우스 단일클론 동종형분류 키트 또는 래트 단일클론 동종형분류 키트(에이비디 세로텍에 의해 제조됨)를 사용하여 각각의 단일클론 항체의 동종형을 결정하였다. 결과는 IgG1(MAb1 및 MAb2) 및 IgG2b(MAb3 및 MAb4)이었다.

[0392] 2)-8 단일클론 항체의 제조

[0393] 하이브리도마 배양 상청액(이하, "항체 정제 스톡"으로서 지칭됨)으로부터 각각의 단일클론 항체를 정제하였다.

[0394] 항체 정제 스톡을 다음과 같이 제조하였다: 8 내지 9 x 10^7개의 하이브리도마를 1272-cm^2 플라스크(코닝 인코포레이티드에 의해 제조됨)에 접종하고 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 20% 울트라-로우(Ultra-LoW) IgG 태아 소혈청을 함유하는 하이브리도마 SFM 배지(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)에서 4일 동안 배양한 후, 상청액을 수집하였다.

[0395] 하이트랩(Hitrap) 단백질 G HP 또는 하이트랩 맙셀렉트 슈어(MabSelect SuRe)(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨)를 사용하여 항체를 정제하였다. 하이트랩 단백질 G HP의 경우, 항체 정제 스톡을 컬

럼에 첨가하고 결합 완충제(0.02 M 인산나트륨, pH 7.0)로 세척한 후, 0.1 M 글리신(pH 2.7)으로 용출하였다. 대조적으로, 하이트랩 맙셀렉트 슈어의 경우, 항체 정제 스톡을 컬럼에 첨가하고 PBS로 세척한 후, 2 M 아르기닌-HCl(pH 4.0)로 용출하였다. 용출된 항체 용액을 중화한 후, 완충제를 PBS로 교체하였다. BCA 단백질 분석 시약을 사용하여 하이트랩 단백질 G HP로 정제된 항체의 농도를 측정하였다. 마우스 IgG2a(알앤드디 시스템스 인코포레이티드(R&D systems, Inc.)에 의해 제조됨)를 보정 곡선용 표준물로서 사용하였다. 대안적으로, POROS G 20 ㎛ 컬럼 PEEK(4.6 mm x 50 mm, 0.83 mℓ)(어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드에 의해 제조됨)에 결합된 항체의 용출물에서 흡광도(O.D. 280 nm)를 측정함으로써 하이트랩 맙셀렉트 슈어로 정제된 항체의 농도를 측정하였다. 구체적으로, PBS로 희석된 항체 샘플을 평형 완충제(30.6 mM 인산이수소나트륨 12수화물, 19.5 mM 인산일칼륨, 0.15 M NaCl, pH 7.0)로 평형화된 POROS G 20 ㎛에 첨가하였다. 컬럼을 평형 완충제로 세척한 후, 컬럼에 결합된 항체를 용출제(0.1%(부피/부피) HCl, 0.15 M NaCl)로 용출하였다. 용출물 중의 흡광도(O.D. 280 nm)의 피크 면적을 측정하고, 농도를 하기 방정식에 따라 계산하였다: 항체 샘플 농도(mg/mℓ) = (항체 샘플의 피크 면적)/(표준물(인간 IgG1)의 피크 면적) x 표준물의 농도(mg/mℓ) x 샘플의 희석비.

[0396] (실시예 3) ROBO4 다운스트림 신호의 활성화의 검출

[0397] 3)-1 인터류킨-8(IL-8) 프로모터 영역을 반응 요소로서 포함하는 리포터 벡터의 제조

[0398] IL-8 프로모터 영역 DNA를 주형으로서 사용하고 하기 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다:

[0399] 프라이머 17F: 5'-ggtaccgataaggaacaaataggaag-3', 및
프라이머 17R: 5'-gagctcagcttgtgtgctctgctgtc-3'.

[0400] 수득된 PCR 생성물을 pCR4Blunt-TOPO 벡터에 도입하여 IL-8 프로모터 영역(-253 내지 -59) DNA를 포함하는 클로닝 벡터를 제조하였다. KpnI 및 SacI을 사용하여 상기 클로닝 벡터로부터 IL-8 프로모터 영역(-253 내지 -59) DNA를 절단하고 pGL4.15 벡터(프로메가 코포레이션에 의해 제조됨) 사이에 도입하여 IL-8 프로모터 영역을 반응 요소로서 포함하는 리포터 벡터를 제조하였다. IL-8 프로모터 영역(-253 내지 -59) DNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 29에 제시되어 있다.

[0401] 3)-2 핵 인자-κB(NF-κB), 인터페론 감마 활성화 서열(GAS), 인터페론에 의해 자극되는 반응 요소(ISRE) 또는 형질감염 등급 T 세포 인자(TCF)를 반응 요소로서 포함하는 리포터 벡터

[0402] pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] 벡터(프로메가 코포레이션에 의해 제조됨), pGAS-TA-Luc 벡터(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨), pISRE-TA-Luc 벡터(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨) 및 TOPflash(밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.)에 의해 제조됨)를, 각각 NF-κB, GAS, ISRE 또는 TCF를 반응 요소로서 포함하는 리포터 벡터로서 사용하였다. 대안적으로, 반응 서열 무함유 pTA-Luc 벡터(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 음성 대조군으로서 사용하였다. pRL-TK 벡터(타카라 바이오 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 내부 대조군으로서 사용하였다.

[0403] 3)-3 인간 ROBO4를 일시적으로 발현하는 세포에서 변화하는 신호의 분석

[0404] HEK293 세포를 96웰 플레이트(콜라겐 I으로 코팅됨; 아사히 글라스 컴파니 리미티드(Asahi Glass Co., Ltd.)에 의해 제조됨)에 2 x 10^4개 세포/웰의 농도로 접종하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 퓨진(FuGene)6 형질감염 시약을 사용하여 HEK293 세포를 pCI-ROBO4, pCI-ROBO4-ΔC 또는 음성 대조군 pCI-모의물, 및 3)-1 및 3)-2에 기재된 각각의 리포터 벡터로 형질감염시키고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 밤새 더 배양하였다. 다음 날, 듀얼-글로(Dual-Glo) 루시퍼라제 분석 시스템(프로메가 코포레이션에 의해 제조됨)을 이용하여 플레이트 판독기(미쓰라스(Mithras); 버쏠드 테크놀로지스 게엠베하 앤드 컴파니 카게(Berthold Technologies GmbH & Co, KG)에 의해 제조됨)에서 각각의 웰의 초파리 루시퍼라제 및 레닐라(Renilla) 루시퍼라제 활성을 발광 강도로서 측정하고, 각각의 웰의 리포터 활성을 하기 방정식에 따라 계산하였다: 리포터 활성 = 초파리 루시퍼라제 활성 유래의 발광 강도/레닐라 루시퍼라제 활성 유래의 발광 강도. 결과적으로, 음성 대조군 pCI-모의물로 형질감염된 세포에 비해 pCI-hROBO4로 형질감염된 세포에서 IL-8 프로모터 활성만이 증가되었다(도 1). 뿐만 아니라, pCI-hROBO4로 형질감염된 세포에서 검출된 IL-8 프로모터 활성의 증가는 pCI-hROBO4-ΔC(hROBO4의 세포내 영역 결실 돌연변이체)로 형질감염된 세포에서 급격히 약화되었는데, 이것은 pCI-hROBO4로 형질감염된 세포에서 검출된 IL-8 프로모터 활성의 증가가 ROBO4의 세포내 영역을 필요로 한다는 것을 입증한다(도 2). 따라서, pCI-hROBO4로 형질감염된 세포에서의 IL-8 프로모터 활성의 증가는 ROBO4 다운스트림 신호의 활성화가 검출된다는 것을 입증하였다.

[0405] (실시예 4) MAb1의 성질

[0406] 4)-1 MAb1에 의한 ROBO4 다운스트림 신호의 활성화

[0407] pCI-hROBO4로 형질감염된 세포 또는 pCI-모의물로 형질감염된 세포(상기 3)-3에서 제조됨)를 밤새 배양하였다. 다음 날, 각각의 항-ROBO4 항체(MAb1, MAb2, MAb3 또는 MAb4) 또는 음성 대조군 마우스 IgG1(알앤드디 시스템스 인코포레이티드에 의해 제조됨)을 0, 0.3125, 1.25, 5 및 20 ㎍/㎖ 또는 0, 0.25, 1, 4 및 16 ㎍/㎖의 농도로 상기 세포에 첨가하고, 세포를 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 5시간 동안 배양하였다. 그 다음, 듀얼-글로 루시퍼라제 분석 시스템(프로메가 코포레이션에 의해 제조됨)을 이용하여 플레이트 판독기(미쓰라스)에서 각각의 웰의 초파리 루시퍼라제 및 레닐라 루시퍼라제 활성을 발광 강도로서 측정하고, 각각의 웰의 리포터 활성을 하기 방정식에 따라 계산하였다: 리포터 활성 = 초파리 루시퍼라제 활성 유래의 발광 강도/레닐라 루시퍼라제 활성 유래의 발광 강도. 결과적으로, 음성 대조군 마우스 IgG는 인간 ROBO4를 일시적으로 발현하는 세포에서 IL-8 프로모터 활성에 영향을 미치지 않은 반면, MAb1은 IL-8 프로모터 활성을 증가시켰다(도 3). MAb1에서와 같이, MAb2도 IL-8 프로모터 활성을 증가시킨 반면, MAb3 또는 MAb4는 IL-8 프로모터 활성을 증가시키지 않았다(도 4). pCI-모의물 세포에서, MAb1 또는 MAb2는 IL-8 프로모터 활성을 증가시키지 않았다. 이들 결과는 MAb1이 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시키고 ROBO4에 대한 모든 항체들이 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시키지는 않는다는 것을 입증하였다.

[0408] ROBO4 다운스트림 신호의 활성을 증가시키지 않는 것으로 확인된 MAb3 및 MAb4를 교차-연결 항체(아피퓨어(AffiPure) 염소 항-마우스 IgG Fc 단편 특이적, 카탈로그 번호 115-005-071, 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))(1개의 MAb3 또는 MAb4 분자 당 2개의 교차-연결 항체 분자)의 존재 하에서 프로모터 활성에 대해 평가하였다. 결과적으로, 상기 두 항체들의 경우 프로모터 활성의 증가가 관찰되었다.

[0409] 4)-2 HUVEC 이동 시험

[0410] HUVEC(쿠라보 인더스트리스 리미티드(KURABO INDUSTRIES LTD.)에 의해 제조됨)를 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 0.1% BSA를 함유하는 휴메디아(HuMedia)-EB2(쿠라보 인더스트리스 리미티드에 의해 제조됨)에서 밤새 배양한 후, 0.1% BSA를 함유하는 휴메디아-EB2를 사용하여 4 x 10^5개 세포/㎖로 조절하였다. 4 x 10^5개 세포/㎖의 농도를 갖는 세포 현탁액 0.25 ㎖를, 젤라틴으로 코팅된 막을 갖는 비디 팔콘 플루오로블록(BD Falcon FluoroBlok) 24 멀티웰 삽입체 시스템(공극 크기: 8 ㎛) 내의 챔버 상층에 첨가하였다. 그 다음, 0.1% BSA 및 10 ng/㎖ 인간 VEGF165(펩프로텍 인코포레이티드(PeproTech Inc.)에 의해 제조됨) 또는 인간 bFGF(비디 바이오사이언시스) 및 2 ㎍/㎖ 마우스 IgG2a 또는 각각의 항-ROBO4 항체(MAb1, MAb2, MAb3 또는 MAb4)를 함유하는 휴메디아-EB2를 상기 챔버의 하층에 첨가하였다. 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 2시간 내지 3시간 동안 항온처리한 후, 하층으로 이동한 HUVEC를, 4 ㎍/㎖ 칼세인-AM(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)을 함유하는 휴메디아-EB2로 15분 동안 염색하였다. 그 다음, 플레이트 판독기(플렉스스테이션(FlexStation); 몰레큘라 디바이시스 엘엘씨(Molecular Devices, LLC.))를 이용하여 각각의 웰의 형광 강도(여기 파장/형광 파장: 485 nm/538 nm)를 측정하고, 각각의 웰에서 이동 세포의 양을 하기 방정식에 따라 계산하였다: 이동 세포의 양 = HUVEC로 보충된 웰의 형광 강도 - HUVEC로 보충되지 않은 웰의 형광 강도. 결과적으로, MAb1은 VEGF 또는 bFGF에 의해 유도된 HUVEC의 이동을 억제하였다(도 5). MAb1에서와 같이, MAb2도 bFGF에 의해 유도된 HUVEC의 이동을 억제한 반면, MAb3 또는 MAb4는 상기 세포 이동을 억제하지 않았다(도 6). 이들 결과는 항-ROBO4 항체에 의한 IL-8 프로모터 활성의 증가가 HUVEC 이동에 대한 억제 활성과 상관관계를 갖는다는 것을 입증하였다.

[0411] 4)-3 교차-종 반응성

[0412] 4)-3-1 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0413] HEK293 세포를 60-mm 디쉬(코닝 인코포레이티드에 의해 제조됨)에 1.5 x 10^6개 세포/디쉬의 농도로 접종하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 퓨진6 형질감염 시약을 사용하여 HEK293 세포를 pCI-hROBO4, pCI-mROBO4, pCI-raROBO4, pCI-FLAG-cynoROBO4-1, pCI-FLAG-cynoROBO4-2, pCI-hROBO1, pCI-hROBO2 또는 pCI-hROBO3으로 형질감염시키고 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 밤새 더 배양하였다. 다음 날, 발현 벡터로 형질감염된 세포를 TrypLE 익스프레스(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)로 처리하고, 5% FBS를 함유하는 PBS로 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 현탁하였다. 수득된 세포 현탁액을 유동 세포측정 분석에서 사용하였다.

[0414] 4)-3-2 유동 세포측정 분석

[0415] 4)-3-1에서 제조된 각각의 세포 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 그 다음, MAb1 또는 음성 대조군 마우스 IgG2a를 발현 벡터로 형질감염된 2 x 10^5개의 세포에 10 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1000배 희석된 항-마우스 IgG FITC 접합체를 상기 세포에 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 3회 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁하고, 유동 세포측정기(BD FACSCalibur)를 이용하여 검출하였다. 플로우조를 이용하여 데이터를 분석하였다. FITC 형광 강도의 막대그래프를 작성하였다. MAb1의 막대그래프가 음성 대조군 마우스 IgG2a의 막대그래프에 비해 보다 강한 형광 강도 영역으로 이동하였을 때 상기 항체가 교차-종 방식으로 결합한다는 결론을 내렸다. 교차-종 반응성 연구의 결과는 MAb1이 마우스 ROBO4 또는 래트 ROBO4에 결합하지 않지만 인간 ROBO4 및 사이노몰구스 원숭이 ROBO4에는 결합한다는 것을 입증하였다(도 7).

[0416] 4)-4 결합 특이성

[0417] 4)-4-1 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0418] HEK293 세포를 60-mm 디쉬(코닝 인코포레이티드에 의해 제조됨)에 1.2 x 10^6개 세포/디쉬 또는 1.5 x 10^6개 세포/디쉬의 농도로 접종하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 퓨진6 형질감염 시약을 사용하여 HEK293 세포를 pCI-hROBO4, pCI-FLAG-hROBO1, pCI-hROBO2 또는 pCI-hROBO3으로 형질감염시키고 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 밤새 더 배양하였다. 다음 날, 발현 벡터로 형질감염된 세포를 TrypLE 익스프레스(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)로 처리하고, 5% FBS를 함유하는 PBS로 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 현탁하였다. 수득된 세포 현탁액을 유동 세포측정 분석에서 사용하였다.

[0419] 4)-4-2 유동 세포측정 분석

[0420] 4)-4-1에서 제조된 각각의 세포 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 그 다음, MAb1, 양성 대조군 인간 ROBO4 항체(알앤드디 시스템스 인코포레이티드에 의해 제조됨), 마우스에서 생성된 단일클론 항-FLAG M2 항체(시그마-알드리치 코포레이션에 의해 제조됨), 인간 ROBO2 항체(알앤드디 시스템스 인코포레이티드에 의해 제조됨), 단일클론 항-인간 ROBO3 항체(알앤드디 시스템스 인코포레이티드에 의해 제조됨), 또는 음성 대조군 마우스 IgG1 또는 마우스 IgG2a를 발현 벡터로 형질감염된 2 x 10^5개의 세포에 10 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1000배 희석된 항-마우스 IgG FITC 접합체를 상기 세포에 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 3회 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁하고, 유동 세포측정기(BD FACSCalibur)를 이용하여 검출하였다. 플로우조를 이용하여 데이터를 분석하였다. FITC 형광 강도의 막대그래프를 작성하였다. MAb1의 막대그래프가 음성 대조군 마우스 IgG1 또는 마우스 IgG2a의 막대그래프에 비해 보다 강한 형광 강도 영역으로 이동하였을 때 상기 항체가 특이적 방식으로 결합한다는 결론을 내렸다. 상기 결과는 MAb1이 hROBO1, hROBO2 또는 hROBO3에 결합하지 않지만 hROBO4에는 특이적으로 결합한다는 것을 입증하였다(도 8). 이와 관련하여, 양성 대조군 항체를 사용하여 hROBO4, hROBO1, hROBO2 및 hROBO3 각각이 세포막 상에서 발현된다는 것을 확인하였다(도 8).

[0421] 4)-5 에피토프 결정

[0422] 4)-5-1 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0423] HEK293 세포를 60-mm 디쉬(코닝 인코포레이티드에 의해 제조됨)에 1.5 x 10^6개 세포/디쉬의 농도로 접종하고, 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 밤새 배양하였다. 다음 날, 퓨진6 형질감염 시약을 사용하여 HEK293 세포를 pCI-FLAG-hROBO4-28, pCI-FLAG-hROBO4-46, pCI-FLAG-hROBO4-132, pCI-FLAG-hROBO4-210, pCI-FLAG-hROBO4-225 또는 pCI-FLAG-hROBO4-341로 형질감염시키고 5% CO_2 조건 하에서 37℃에서 밤새 더 배양하였다. 다음 날, 발현 벡터로 형질감염된 세포를 TrypLE 익스프레스(라이프 테크놀로지스 코포레이션에 의해 제조됨)로 처리하고, 5% FBS를 함유하는 PBS로 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 현탁하였다. 수득된 세포 현탁액을 유동 세포측정 분석에서 사용하였다.

[0424] 4)-5-2 유동 세포측정 분석

[0425] 4)-5-1에서 제조된 각각의 세포 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 그 다음, MAb1, 마우스에서 생성된 양성 대조군 단일클론 항-FLAG M2 항체 또는 음성 대조군 마우스 IgG2a를 발현 벡터로 형질감염된 2 x 10^5개의 세포에 10 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 5% FBS를 함유하는 PBS로 1000배 희석된 항-마우스 IgG FITC 접합체를 상기 세포에 첨가하고, 발생된 현탁액을 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 세포를, 5% FBS를 함유하는 PBS로 3회 세척한 후, 5% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁하고, 유동 세포측정기(BD FACSCalibur, 비디 바이오사이언시스)를 이용하여 검출하였다. 플로우조를 이용하여 데이터를 분석하였다. FITC 형광 강도의 막대그래프를 작성하였다. MAb1의 막대그래프가 음성 대조군 마우스 IgG2a의 막대그래프에 비해 보다 강한 형광 강도 영역으로 이동하였을 때 상기 항체가 세포에 결합한다는 결론을 내렸다. 상기 결과는 MAb1이 pCI-FLAG-hROBO4-28, pCI-FLAG-hROBO4-46 또는 pCI-FLAG-hROBO4-132로 형질감염된 세포에 결합하고 pCI-FLAG-hROBO4-210, pCI-FLAG-hROBO4-225 또는 pCI-FLAG-hROBO4-341로 형질감염된 세포에는 결합하지 않는다는 것을 입증하였다. 따라서, MAb1은 서열번호 2에 제시된 인간 ROBO4의 아미노산 132 내지 209의 아미노산 서열을 인식한다는 것이 밝혀졌다(도 9). 이와 관련하여, 양성 대조군 항-FLAG 항체를 사용하여 각각의 세포내 영역/도메인 결실 변이체가 세포막 상에서 발현된다는 것을 확인하였다(도 9).

[0426] 4)-6 레이저-유도된 맥락막 혈관신생을 갖는 원숭이 모델에서의 약물 효능 평가

[0427] 4)-6-1 마취

[0428] 메데토미딘 염산염(니폰 젠야쿠 고교 컴파니 리미티드(Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.)에 의해 제조됨)을 0.04 mg/kg의 복용량으로 각각의 사이노몰구스 원숭이에게 근육내 주사하였다. 그로부터 15분 후, 케타민 염산염(다이이치 산쿄 컴파니 리미티드(Daiichi Sankyo Co., Ltd.)에 의해 제조됨)을 15 mg/kg의 복용량으로 상기 사이노몰구스 원숭이에게 근육내 주사하였다.

[0429] 4)-6-2 모델 제조

[0430] 4)-6-1에서 마취된 각각의 사이노몰구스 원숭이를 원숭이 의자에 억류시켰다. 눈 표면의 마취/진통 처리를 위해 4% 자일로카인(Xylocaine) 점안제(아스트라제네카 피엘씨(AstraZeneca plc)에 의해 제조됨)를 양 눈에 도포하였다. 산동(mydriasis)을 위해 5 mg/㎖ 트로픽아미드 - 5 mg/㎖ 페닐에프린 염산염 혼합물 점안제(산텐 파마슈티칼 컴파니 리미티드(Santen Pharmaceutical Co., Ltd.)에 의해 제조됨)를 눈에 도포하였다. 녹색 레이저 광응고기 오큐라이트(OcuLight) GLx(이리덱스 코포레이션(Iridex Corp.)에 의해 제조됨)를 이용하여 망막의 황반 영역을 레이저 조사(조사된 열의 양: 350 내지 500 mW, 조사 시간: 0.1초, 점 크기: 50 ㎛, 점의 수: 6개 또는 9개의 점)로 열적으로 손상시켰다.

[0431] 4)-6-3 시험 물질의 투여

[0432] 모델 제조 후 7일째 날, 33G 나노패스(Nanopass) 바늘을 결막으로부터 유리체 내로 삽입하고, PE20 폴리에틸렌 튜브를 통해 100 ㎕ 해밀톤 주사기를 이용하여 50 ㎕의 비히클 또는 13.2 mg/㎖의 MAb1을 2분에 걸쳐 상기 유리체 내로 주사하였다. 4개의 눈을 포함하는 각각의 군에 대해 시험을 수행하였다. 투여의 완료 후, 0.5% 레보플록사신 수화물 점안제(산텐 파마슈티칼 컴파니 리미티드에 의해 제조됨)를 눈에 도포하였다.

[0433] 4)-6-4 약물 효능 평가

[0434] 모델 제조 후 7일째 날, 14일째 날 및 21일째 날, 마취 하에서 하이브리드 안저 카메라 CX-1(캐논 인코포레이티드(Canon Inc.)에 의해 제조됨)을 이용하여 상용적인 방법으로 안저를 촬영하였다. 그 다음, 10% 플루오레세인을 0.1 ㎖/kg의 복용량으로 정맥내 주사하였다. 플루오레세인의 정맥내 주사의 완료 후, 형광 혈관조영술을 1분 내지 최대 6분마다 수행하였다. 이미지 데이터를 저장하고, 플루오레세인이 축적된 부위의 면적을 이미지 분석기(윈루프(WinRoof), 미타니 코포레이션(Mitani Corp.)에 의해 제조됨)를 이용하여 계산하였다. 새로 형성된 혈관의 양을 하기 방정식에 따라 계산하였다: 새로 형성된 혈관의 양 = 모델 제조 후 21일째 날 플루오레세인이 축적된 부위의 면적 - 모델 제조 후 7일째 날 플루오레세인이 축적된 부위의 면적. 비히클을 투여받은 군과 MAb1을 투여받은 군 사이에 새로 형성된 혈관의 양을 비교한 결과, MAb1을 투여받은 군에서 4개의 눈 중 3개의 눈이 새로 형성된 혈관의 양을 감소시킨다는 것을 확인하였지만, 남은 1개의 눈과 비히클 군 사이에는 새로 형성된 혈관의 양에서의 차이가 확인되지 않았다. 이것은 MAb1의 투여가 레이저-유도된 맥락막 혈관신생을 억제하였다는 것을 의미한다(도 10).

[0435] (실시예 5) MAb1 cDNA의 클로닝 및 서열결정

[0436] 5)-1 MAb1 중쇄 및 경쇄의 N-말단 아미노산 서열의 결정

[0437] MAb1의 중쇄 및 경쇄의 N-말단 아미노산 서열을 결정하기 위해, 실시예 2)-8에서 정제된 MAb1을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이로써 겔에서 분리된 단백질을 상기 겔로부터 세퀴-블롯(Sequi-Blot) PVDF 막(바이오-라드 라보라토리스 인코포레이티드)으로 옮긴 후 세척 완충제(25 mM NaCl, 10 mM 붕산나트륨 완충제, pH 8.0)로 세척한 다음, 염색 용액(50% 메탄올, 20% 아세트산, 0.05% 쿠마시 브릴리언트 블루)에 5분 동안 침지시켜 염색한 후, 90% 메탄올로 탈색하였다. PVDF 막 상에서 가시화된 중쇄에 상응하는 밴드 부분(보다 작은 이동을 갖는 밴드) 및 경쇄에 상응하는 밴드 부분(보다 큰 이동을 갖는 밴드)을 절단하였다. 프로사이스(Procise) cLC 단백질 서열결정기 모델 492cLC(어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드)를 이용하여 그들 각각의 N-말단 아미노산 서열을 자동 에드만(Edman) 방법(문헌(Edman et al., (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80) 참조)에 따라 확인하였다. 결과적으로, MAb1의 중쇄에 상응하는 밴드의 N-말단 아미노산 서열은 EVQLVESGGGLVKPGGSLKL이고, 경쇄에 상응하는 밴드의 N-말단 아미노산 서열은 DAVMTQTPLSLPVSL이었다.

[0438] 5)-2 MAb1 생성 하이브리도마로부터의 mRNA의 제조

[0439] MAb1의 중쇄 및 경쇄 코딩 cDNA들을 클로닝하기 위해, mRNA 단리 키트(로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science))를 사용하여 MAb1 생성 하이브리도마로부터 mRNA를 제조하였다.

[0440] 5)-3 MAb1 cDNA의 클로닝 및 서열결정

[0441] MAb1 중쇄 및 경쇄 각각의 γ1 및 κ 동종형(실시예 2)-7 및 5-1)을 기초로 결정된 중쇄 및 경쇄의 N-말단 아미노산 서열, 및 카바트와 그의 동료들에 의해 구축된 항체 아미노산 서열 데이터베이스(문헌(Strausberg, R. L., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99. 16899-16903) 및 문헌(Kabat, E. A., et al. (1991) in Sequences of Proteins of Immunological Interest Vol. I and II, U. S. Department of Health and Human Services) 참조)를 참조하여 항체 유전자의 코딩 영역의 5'-말단 서열 및 상기 항체 유전자의 정지 코돈 함유 3'-말단 서열 각각에 혼성화하는 여러 올리고뉴클레오티드 프라이머들을 합성하였다. 5)-2에서 제조된 mRNA 및 타카라 원 스텝(One Step) RNA PCR 키트(AMV)(타카라 바이오 인코포레이티드)를 사용하여 중쇄 및 경쇄 코딩 cDNA들을 증폭하였다. 그 결과, 하기 프라이머 세트를 사용하여 항체의 중쇄 및 경쇄 코딩 cDNA들을 성공적으로 증폭하였다:

[0442] 중쇄에 대한 프라이머 세트

[0443] LYHF6: 5'-cctcaccatgaactttgg-3'
G1EVR1: 5'-aagatatcttatttaccaggagagtgggagag-3'

[0444] 경쇄에 대한 프라이머 세트

[0445] MK19EIF1: 5'-aagaattcatgaagttgcctgttagg-3'
KEVR1: 5'-aagatatcttaacactcattcctgttgaagct-3'

[0446] pEF6/V5-His TOPO TA 발현 키트(인비트로겐 코포레이션(Invitrogen Corp.))를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 중쇄 및 경쇄 cDNA들을 별도로 클로닝하였다. 유전자 서열결정기("ABI PRISM 3700 DNA 분석기; 어플라이드 바이오시스템스" 또는 "어플라이드 바이오시스템스 3730x1 분석기; 어플라이드 바이오시스템스")를 이용하여 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역을 코딩하는 클로닝된 cDNA들의 뉴클레오티드 서열을 결정하였다. GeneAmp 9700(어플라이드 바이오시스템스 인코포레이티드)을 이용하여 서열결정 반응을 수행하였다.

[0447] MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 결정된 뉴클레오티드 서열은 서열번호 30에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 31에 제시되어 있다. 마우스 항체 MAb1의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 32에 제시되어 있고 그의 아미노산 서열은 서열번호 33에 제시되어 있다.

[0448] (실시예 6) 키메라 MAb1(cMAb1)의 제조

[0449] 6)-1 발현 벡터 pCMA-LK, pCMA-G1 및 pCMA-G2의 제조

[0450] 6)-1-1 인간화된 키메라 경쇄 발현 벡터 pCMA-LK의 구축

[0451] 플라스미드 pcDNA3.3-TOPO/LacZ(인비트로겐 코포레이션)를 제한효소 XbaI 및 PmeI로 분해하고, 인-퓨전 어드밴티지(In-Fusion Advantage) PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드(Clontech Laboratories,

Inc.))를 사용하여 대략 5.4 kB의 수득된 단편을, 인간 κ 쇄 분비 신호 및 인간 κ 쇄 불변 영역을 코딩하는 DNA 서열(서열번호 34)을 포함하는 DNA 단편에 연결하여 pcDNA3.3/LK를 제조하였다.

[0452] pcDNA3.3/LK를 주형으로서 사용하고 하기 제시된 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행하였다. 대략 3.8 kB의 수득된 단편을 인산화한 후 자가-연결함으로써, CMV 프로모터의 다운스트림에서 신호 서열 코딩 서열, 클로닝 부위 및 인간 κ 쇄 불변 영역 코딩 서열을 갖는 인간화된 키메라 경쇄 발현 벡터 pCMA-LK를 pcDNA3.3/LK로부터 구축하였다.

[0453] 프라이머 세트

[0454] 3.3-F1: 5'-tataccgtcgacctctagctagagcttggc-3'
3.3-R1: 5'-gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-3'

[0455] 6)-1-2 인간화된 키메라 IgG1형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G1의 구축

[0456] pCMA-LK를 XbaI 및 PmeI로 분해하여 κ 쇄 분비 신호 및 인간 κ 쇄 불변 영역을 코딩하는 서열을 제거하였다. 인-퓨전 어드밴티지 PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드)를 사용하여 발생된 DNA 단편을, 인간 중쇄 신호 서열 및 인간 IgG1 불변 영역의 아미노산들을 코딩하는 DNA 서열(서열번호 35)을 포함하는 DNA 단편에 연결함으로써, CMV 프로모터의 다운스트림에서 신호 서열 코딩 서열, 클로닝 부위 및 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 코딩 서열을 갖는 인간화된 키메라 IgG1형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G1을 구축하였다.

[0457] 6)-1-3 인간화된 키메라 IgG2형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G2의 구축

[0458] pCMA-LK를 XbaI 및 PmeI로 분해하여 κ 쇄 분비 신호 및 인간 κ 쇄 불변 영역을 코딩하는 서열을 제거하였다. 인-퓨전 어드밴티지 PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드)를 사용하여 발생된 DNA 단편을, 인간 중쇄 신호 서열 및 인간 IgG2 불변 영역의 아미노산들을 코딩하는 DNA 서열(서열번호 36)을 포함하는 DNA 단편에 연결함으로써, CMV 프로모터의 다운스트림에서 신호 서열 코딩 서열, 클로닝 부위 및 인간 IgG2 중쇄 불변 영역 코딩 서열을 갖는 인간화된 키메라 IgG2형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G2를 구축하였다.

[0459] 6)-2 키메라 MAb1 경쇄 발현 벡터의 구축

[0460] MAb1의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 주형으로서 사용하고 KOD-Plus-(도요보 컴파니 리미티드(TOYOBO CO., LTD)) 및 하기 제시된 프라이머 세트를 사용하여 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 포함하는 부위를 증폭하고, 인-퓨전 어드밴티지 PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드)를 사용하여 인간화된 키메라 항체 경쇄 발현을 위한 일반 목적 벡터 pCMA-LK의 제한효소 BsiWI-절단된 부위 내로 삽입함으로써 키메라 MAb1 경쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-LK/MAb1 L"로서 명명하였다. 키메라 MAb1 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 37에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 38에 제시되어 있다. 서열번호 37의 뉴클레오티드 1 내지 60은 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 37의 뉴클레오티드 61 내지 402는 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 37의 뉴클레오티드 403 내지 717은 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 38의 아미노산 번호 1 내지 20은 신호 서열의 아미노산을 나타낸다. 서열번호 38의 아미노산 번호 21 내지 134는 가변 영역의 아미노산을 나타낸다. 아미노산 135 내지 239는 불변 영역의 아미노산을 나타낸다.

[0461] 경쇄용 프라이머 세트

[0462] MAb1 LF: 5'-tctccggcgcgtacggcgatgctgtgatgacccaaactccactctcc-3'
MAb1 LR: 5'-ggaggggggcggccacagcccgtttgatttccagcttggtgcctcc-3'

[0463] 6)-3 키메라 MAb1 IgG1형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0464] MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 주형으로서 사용하고 KOD-Plus-(도요보 컴파니 리미티드) 및 하기 제시된 프라이머 세트를 사용하여 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 증폭하고, 인-퓨전 어드밴티지 PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드)를 사용하여 인간화된 키메라 IgG1형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G1의 제한효소 BsiWI-절단된 부위 내로 삽입함으로써 키메라 MAb1 IgG1형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G1/MAb1 H"로서 명명하였다. 키메라 MAb1 IgG1형 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 39에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 40에 제시되어 있다. 서열번호 39의 뉴클레오티드 1 내지 57은 신호 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 39의 뉴클레오티드 58 내지 411은 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 39의 뉴클레오티드 412 내지 1401은 불변 영역을 코딩하

는 뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 서열번호 40의 아미노산 번호 1 내지 19는 신호 서열의 아미노산을 나타낸다. 서열번호 40의 아미노산 번호 20 내지 137은 가변 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. 아미노산 138 내지 467은 불변 영역의 아미노산 서열을 나타낸다.

[0465] IgG1형 중쇄용 프라이머 세트

[0466] MAb1 HF: 5'-cagatgggtgctgagcgaagtgcagctggtggagtctgggggag-3'
MAb1 H1R: 5'-ttggtggaggctgagctgactgtgagagtggtgccgtggccccag-3'

[0467] 6)-4 키메라 MAb1 IgG2형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0468] MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 주형으로서 사용하고 KOD-Plus-(도요보 컴파니 리미티드) 및 하기 제시된 프라이머 세트를 사용하여 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA를 포함하는 부위를 증폭하고, 인-퓨전 어드밴티지 PCR 클로닝 키트(클론텍 라보라토리스 인코포레이티드)를 사용하여 인간화된 키메라 IgG2형 중쇄 발현 벡터 pCMA-G2의 제한효소 BsiWI-절단된 부위 내로 삽입함으로써 키메라 MAb1 IgG2형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G2/MAb1"로서 명명하였다. 키메라 MAb1 IgG2형 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 41에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 42에 제시되어 있다.

[0469] IgG2형 중쇄용 프라이머 세트

[0470] MAb1 HF: 5'-cagatgggtgctgagcgaagtgcagctggtggagtctgggggag-3'
MAb1 2R: 5'-ttggtgctggctgagctgactgtgagagtggtgccgtggccccag-3'

[0471] (실시예 7) IgG1형 키메라 MAb1 항체 및 IgG2형 키메라 MAb1 항체의 제조

[0472] 7)-1 IgG1형 키메라 MAb1 항체 및 IgG2형 키메라 MAb1 항체의 제조

[0473] 프리스타일 293-F 세포(인비트로겐 코포레이션)를 매뉴얼에 따라 하위배양하고 배양하였다. 대수생장기에 있는 1.2×10^9개 세포의 프리스타일 293-F 세포(인비트로겐 코포레이션)를 3 ℓ 페른바흐(Fernbach) 삼각 플라스크(코닝 인코포레이티드)에 접종하고 프리스타일 293 발현 배지(인비트로겐 코포레이션)를 사용하여 1.0×10^6개 세포/㎖로 희석한 후, 37℃에서 90 rpm에서 8% CO_2 항온처리기 내에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 3.6 mg의 폴리에틸렌이민(폴리사이언시스 인코포레이티드(Polysiences Inc.), #24765)을 20 ㎖의 옵티-프로(Opti-Pro) SFM 배지(인비트로겐 코포레이션)에 용해시켰다. 그 다음, 퓨어링크 하이퓨어(PureLink HiPure) 플라스미드 키트(인비트로겐 코포레이션)를 사용하여 제조한 H 쇄 발현 벡터(0.4 mg) 및 L 쇄 발현 벡터(0.8 mg)를 20 ㎖의 옵티-프로 SFM 배지(인비트로겐 코포레이션)에 현탁하였다. 20 ㎖의 발현 벡터/옵티-프로 SFM 혼합물 용액을 20 ㎖의 폴리에틸렌이민/옵티-프로 SFM 혼합물 용액에 첨가하고, 혼합물을 점진적으로 교반하고 5분 동안 더 방치한 후 프리스타일 293-F 세포에 첨가하였다. 세포를 37℃에서 90 rpm에서 8% CO_2 항온처리기 내에서 7일 동안 진탕배양하고 수득된 배양 상청액을 일회용 캡슐 필터(어드밴텍(Advantec), #CCS-045-E1H)를 통해 여과하였다.

[0474] pCMA-G1/MAb1 H와 pCMA-LK/MAb1 L의 조합 및 pCMA-G2/MAb1 H와 pCMA-LK/MAb1 L의 조합에 의해 수득된 IgG1형 키메라 MAb1 항체 및 IgG2형 키메라 MAb1 항체는 각각 "cMAb1-1" 및 "cMAb1-2"로서 약칭된다. 용어"cMAb1"은 IgG1형 키메라 MAb1 항체 및 IgG2형 키메라 MAb1 항체 둘다를 의미한다.

[0475] 7)-2 cMAb1-1 및 cMAb1-2의 정제

[0476] 상기 7-1)에서 수득된 배양 상청액을 (4℃ 내지 6℃에서) r단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. r단백질 A 친화성 크로마토그래피 정제 후 완충제 교체 단계를 실온에서 수행하였다. 먼저, 1100 내지 1200 ㎖의 배양 상청액을 PBS로 평형화된 맙셀렉트 슈어(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨, 하이트랩 컬럼; 부피 1 ㎖ x 2개가 연결됨)에 적용하였다. 전체 배양 용액을 컬럼에 넣은 후, 컬럼을 PBS로 세척하였다. 그 다음, 2 M 아르기닌 염산염 용액(pH 4.0)을 사용하여 용출을 수행함으로써 항체 함유 분획을 수집하였다. 탈염 컬럼(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨, 하이트랩 탈염 컬럼; 부피 5 ㎖ x 2개가 연결됨)을 사용하여 이 분획 중의 완충제를 PBS로 교체하였다. 마지막으로, 원심분리 UF 필터 장치 비바스핀(VIVASPIN)20(분자량 컷오프: 30 K, 사르토리우스(Sartorius), 4℃)을 사용하여 분획을 20.0 mg/㎖ 이상의 IgG 농도로 농축하고 정제 샘플로서 사용하였다.

[0477] 7)-3 cMAb1-1 및 cMAb1-2의 성질

[0478] 7)-3-1 ROBO4 다운스트림 신호의 활성화

[0479] 인간 IgG(시그마-알드리치 코포레이션에 의해 제조됨)를 음성 대조군으로서 사용하였고, 인간 IgG, cMAb1-1 또는 cMAb1-2를 0.313 ㎍/㎖의 최종 농도로 배지에 첨가하였다는 점을 제외하고 4)-1의 방법에 따라 이 시험을 수행하였다. 그 결과, 음성 대조군 인간 IgG는 인간 ROBO4를 일시적으로 발현하는 세포에서 IL-8 프로모터 활성에 영향을 미치지 않은 반면, cMAb1-1 및 cMAb1-2는 IL-8 프로모터 활성을 증가시켰다(도 11). 이들 결과는 cMAb1-1 또는 cMAb1-2가 MAb1에서와 같이 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시킨다는 것을 입증하였다.

[0480] 7)-3-2 HUVEC 이동 시험

[0481] 인간 IgG를 음성 대조군으로서 사용하였고, 인간 IgG, cMAb1-1 또는 cMAb1-2를 0.5 ㎍/㎖의 최종 농도로 배지에 첨가하였다는 점을 제외하고 4)-2의 방법에 따라 이 시험을 수행하였다. 그 결과, cMAb1-1 또는 cMAb1-2는 bFGF에 의해 유도된 HUVEC의 이동을 억제하였다(도 12). 이들 결과는 cMAb1-1 또는 cMAb1-2가 MAb1에서와 같이 HUVEC의 이동을 억제한다는 것을 입증하였다.

[0482] (실시예 8) 마우스 항-인간 ROBO4 단일클론 항체 MAb1의 인간화된 항체의 디자인

[0483] 8)-1 MAb1의 인간화된 버전의 디자인

[0484] 8)-1-1 MAb1 가변 영역의 분자 모델링

[0485] MAb1 가변 영역의 분자 모델링을 일반적으로 공지된 상동성 모델링 방법(Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991))으로 수행하였다. 이로써 결정된 MAb1 가변 영역의 1차 서열을 단백질 데이터 은행(Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007))에 등록된 인간 면역글로불린 가변 영역의 1차 서열(x-선 결정 구조로부터 유도된 3차원 구조로서 입수가능함)과 비교하였다. 그 결과, 3FFD는 골격을 결여한 항체들 사이에 MAb1 중쇄 가변 영역에 대한 그의 가장 높은 서열 상동성 때문에 선택되었다. 또한, 1T66은 MAb1 경쇄 가변 영역에 대한 그의 가장 높은 서열 상동성 때문에 선택되었다. MAb1 중쇄 및 경쇄에 상응하는 3FFD 및 1T66의 배위의 조합으로부터 "골격 모델"을 수득함으로써 골격 영역의 3차원 구조를 작성하였다. MAb1의 CDR들의 경우, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 및 CDRH2를 문헌(Thornton et al., J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996))의 분류에 따라 각각 클러스터 16A, 7A, 9A, 10A 및 10B로 배정하였다. H3 규칙(FEBS letter 399, 1-8 (1996))을 이용하여 CDRH3을 k(7)B로 분류하였다. 그 후, 각각의 CDR의 전형적인 입체구조를 골격 모델 내로 도입하였다.

[0486] 마지막으로, 불리한 원자간 접촉을 배제하기 위한 에너지 계산을 수행하여 에너지 관점에서 MAb1 가변 영역일 가능성이 높은 분자 모델을 수득하였다. 상업적으로 입수가능한 단백질 3차원 구조 예측 프로그램 프라임(Prime) 및 배위 검색 프로그램 마크로모델(MacroModel)(슈로딩거 엘엘씨(Schrodinger, LLC))을 이용하여 이들 절차들을 수행하였다.

[0487] 8)-1-2 인간화된 MAb1 아미노산 서열의 디자인

[0488] 각각의 인간화된 MAb1 항체(hMAb1)를 일반적으로 공지된 CDR 이식 방법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))으로 구축하였다. 골격 영역 내의 아미노산의 상동성을 기초로 2종의 상이한 수용자 항체들을 선택하였다. MAb1 골격 영역의 서열을 카바트 항체 아미노산 서열 데이터베이스(Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) 내의 모든 인간 골격들과 비교하였다. 그 결과, B3 항체가 골격 영역에 대한 그의 83% 서열 상동성 때문에 수용자로서 선택되었다. B3 골격 영역의 아미노산 잔기들을 MAb1의 아미노산 잔기들과 정렬하여 사용된 상이한 아미노산들의 위치를 확인하였다. 상기 구축된 MAb1의 3차원 모델을 사용하여 상기 잔기들의 이들 위치를 분석하였다. 그 다음, 수용자 상으로 이식될 공여자 잔기를 문헌(Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989))에 의해 제공된 기준에 따라 선택하였다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 일부 선택된 공여자 잔기를 수용자 항체 내로 삽입하여 인간화된 MAb1의 서열을 구축하였다. 또한, 하기 실시예에 기재된 바와 같이, hMAb1의 각각의 CDR 내의 1개 내지 3개 아미노산 잔기(들)를 다른 아미노산 잔기로 치환시켜 hMAb1 변이체를 구축하였다.

[0489] 8)-2 cMAb1 중쇄의 인간화

[0490] 8)-2-1 hMAb1-H1형 중쇄:

[0491] 서열번호 42로 표시된 cMAb1-2 중쇄에서 아미노산 32(라이신)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 38(라이신)을 아르기닌으로 치환시키고 아미노산 59(쓰레오닌)를 알라닌으로 치환시키고 아미노산 61(글루탐산)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 63(아르기닌)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 95(글루탐산)를 라이신으로 치환시

키고 아미노산 103(세린)을 아스파라긴으로 치환시키고 아미노산 107(세린)을 알라닌으로 치환시키고 아미노산 112(메티오닌)를 발린으로 치환시키고 아미노산 114(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 129(히스티딘)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 132(쓰레오닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 133(류신)을 발린으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 중쇄를 "hMAb1-H1형 중쇄"로서 명명하였다.

[0492] hMAb1-H1형 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 56에 제시되어 있다. 서열번호 56의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 19로 구성된 서열, 아미노산 잔기 20 내지 137로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 138 내지 463으로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 56의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 50 내지 54로 구성된 서열, 아미노산 잔기 69 내지 85로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 118 내지 126으로 구성된 서열은 각각 CDRH1 서열, CDRH2 서열 및 CDRH3 서열에 상응한다. 서열번호 56의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 55에 제시되어 있다. 서열번호 55의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 57로 구성된 서열, 뉴클레오티드 58 내지 411로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 412 내지 1389로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 서열 및 중쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 55의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 56의 아미노산 서열은 각각 도 31 및 32에도 제시되어 있다.

[0493] 8)-2-2 hMAb1-H2형 중쇄:

[0494] 서열번호 42로 표시된 cMAb1-2 중쇄에서 아미노산 32(라이신)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 38(라이신)을 아르기닌으로 치환시키고 아미노산 59(쓰레오닌)를 알라닌으로 치환시키고 아미노산 61(글루탐산)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 63(아르기닌)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 72(아스파라긴)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 95(글루탐산)를 라이신으로 치환시키고 아미노산 103(세린)을 아스파라긴으로 치환시키고 아미노산 107(세린)을 알라닌으로 치환시키고 아미노산 112(메티오닌)를 발린으로 치환시키고 아미노산 114(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 129(히스티딘)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 132(쓰레오닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 133(류신)을 발린으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 중쇄를 "hMAb1-H2형 중쇄"로서 명명하였다.

[0495] hMAb1-H2형 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 58에 제시되어 있다. 서열번호 58의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 19로 구성된 서열, 아미노산 잔기 20 내지 137로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 138 내지 463으로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 58의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 50 내지 54로 구성된 서열, 아미노산 잔기 69 내지 85로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 118 내지 126으로 구성된 서열은 각각 CDRH1 서열, CDRH2 서열 및 CDRH3 서열에 상응한다. 서열번호 58의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 57에 제시되어 있다. 서열번호 57의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 57로 구성된 서열, 뉴클레오티드 58 내지 411로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 412 내지 1389로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 서열 및 중쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 57의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 58의 아미노산 서열은 각각 도 33 및 34에도 제시되어 있다.

[0496] 8)-2-3 hMAb1-H3형 중쇄:

[0497] 서열번호 42로 표시된 cMAb1-2 중쇄에서 아미노산 32(라이신)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 38(라이신)을 아르기닌으로 치환시키고 아미노산 59(쓰레오닌)를 알라닌으로 치환시키고 아미노산 61(글루탐산)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 95(글루탐산)를 라이신으로 치환시키고 아미노산 103(세린)을 아스파라긴으로 치환시키고 아미노산 107(세린)을 알라닌으로 치환시키고 아미노산 112(메티오닌)를 발린으로 치환시키고 아미노산 114(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 129(히스티딘)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 132(쓰레오닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 133(류신)을 발린으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 중쇄를 "hMAb1-H3형 중쇄"로서 명명하였다.

[0498] hMAb1-H3형 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 60에 제시되어 있다. 서열번호 60의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 19로 구성된 서열, 아미노산 잔기 20 내지 137로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 138 내지 463으로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 60의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 50 내지 54로 구성된 서열, 아미노산 잔기 69 내지 85로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 118 내지 126으로 구성된 서열은 각각 CDRH1 서열, CDRH2 서열 및 CDRH3 서열에 상응한다. 서열번호 60의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 59에 제시되어 있다. 서열번호 59의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 57로 구성된 서열, 뉴클레오티드 58 내지 411로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 412 내지 1389로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 서열 및 중쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 59의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 60의 아미노산 서열은 각각 도 35 및 36에도 제시되어 있다.

[0499] 8)-2-4 hMAb1-H4형 중쇄:

[0500] 서열번호 42로 표시된 cMAb1-2 중쇄에서 아미노산 32(라이신)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 38(라이신)을 아르기닌으로 치환시키고 아미노산 59(쓰레오닌)를 알라닌으로 치환시키고 아미노산 61(글루탐산)을 글리신으로 치환시키고 아미노산 72(아스파라긴)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 95(글루탐산)를 라이신으로 치환시키고 아미노산 103(세린)을 아스파라긴으로 치환시키고 아미노산 107(세린)을 알라닌으로 치환시키고 아미노산 112(메티오닌)를 발린으로 치환시키고 아미노산 114(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 129(히스티딘)를 글루타민으로 치환시키고 아미노산 132(쓰레오닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 133(류신)을 발린으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 중쇄를 "hMAb1-H4형 중쇄"로서 명명하였다.

[0501] hMAb1-H4형 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호 62에 제시되어 있다. 서열번호 62의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 19로 구성된 서열, 아미노산 잔기 20 내지 137로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 138 내지 463으로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 및 중쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 62의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 50 내지 54로 구성된 서열, 아미노산 잔기 69 내지 85로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 118 내지 126으로 구성된 서열은 각각 CDRH1 서열, CDRH2 서열 및 CDRH3 서열에 상응한다. 서열번호 62의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 61에 제시되어 있다. 서열번호 61의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 57로 구성된 서열, 뉴클레오티드 58 내지 411로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 412 내지 1389로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 중쇄 가변 영역 서열 및 중쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 61의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 62의 아미노산 서열은 각각 도 37 및 38에도 제시되어 있다.

[0502] 8)-3 MAb1 경쇄의 인간화

[0503] 8)-3-1 hMAb1-L1형 경쇄:

[0504] 서열번호 38로 표시된 cMAb1 경쇄에서 아미노산 22(알라닌)를 이소류신으로 치환시키고 아미노산 27(쓰레오닌)을 세린으로 치환시키고 아미노산 34(세린)를 쓰레오닌으로 치환시키고 아미노산 37(아스파르트산)을 글루탐산으로 치환시키고 아미노산 38(글루타민)을 프롤린으로 치환시키고 아미노산 62(페닐알라닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 84(류신)를 프롤린으로 치환시키고 아미노산 108(페닐알라닌)을 발린으로 치환시키고 아미노산 112(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 125(글리신)를 프롤린으로 치환시키고 아미노산 129(류신)를 발린으로 치환시키고 아미노산 130(글루탐산)을 아스파르트산으로 치환시키고 아미노산 134(알라닌)를 쓰레오닌으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 경쇄를 "hMAb1-L1형 경쇄"로서 명명하였다.

[0505] hMAb1-L1형 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호 64에 제시되어 있다. 서열번호 64의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 20으로 구성된 서열, 아미노산 잔기 21 내지 134로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 135 내지 239로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 64의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 44 내지 59로 구성된 서열, 아미노산 잔기 75 내지 81로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 114 내지 122로 구성된 서열은 각각 CDRL1 서열, CDRL2 서열 및 CDRL3 서열에 상응한다. 서열번호 64의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 63에 제시되어 있다. 서열번호 63의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 60으로 구성된 서열, 뉴클레오티드 61 내지 402로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 403 내지 717로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 경쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 63의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 64의 아미노산 서열은 각각 도 39 및 40에도 제시되어 있다.

[0506] 8)-3-2 hMAb1-L2형 경쇄:

[0507] 서열번호 38로 표시된 cMAb1 경쇄에서 아미노산 22(알라닌)를 이소류신으로 치환시키고 아미노산 27(쓰레오닌)을 세린으로 치환시키고 아미노산 34(세린)를 쓰레오닌으로 치환시키고 아미노산 37(아스파르트산)을 글루탐산으로 치환시키고 아미노산 38(글루타민)을 프롤린으로 치환시키고 아미노산 52(세린)를 글루탐산으로 치환시키고 아미노산 54(글리신)를 라이신으로 치환시키고 아미노산 56(쓰레오닌)을 류신으로 치환시키고 아미노산 62(페닐알라닌)를 류신으로 치환시키고 아미노산 84(류신)를 프롤린으로 치환시키고 아미노산 108(페닐알라닌)을 발린으로 치환시키고 아미노산 112(페닐알라닌)를 티로신으로 치환시키고 아미노산 125(글리신)를 프롤린으로 치환시키고 아미노산 129(류신)를 발린으로 치환시키고 아미노산 130(글루탐산)을 아스파르트산으로 치환시키고 아미노산 134(알라닌)를 쓰레오닌으로 치환시킴으로써 디자인된 인간화된 MAb1 경쇄를 "hMAb1-L2형 경쇄"로서 명명하였다.

[0508] hMAb1-L2형 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호 66에 제시되어 있다. 서열번호 66의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 1 내지 20으로 구성된 서열, 아미노산 잔기 21 내지 134로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 135 내지 239로

구성된 서열은 각각 신호 서열, 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역에 상응한다. 서열번호 66의 아미노산 서열에서 아미노산 잔기 44 내지 59로 구성된 서열, 아미노산 잔기 75 내지 81로 구성된 서열 및 아미노산 잔기 114 내지 122로 구성된 서열은 각각 CDRL1 서열, CDRL2 서열 및 CDRL3 서열에 상응한다. 서열번호 66의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 65에 제시되어 있다. 서열번호 65의 뉴클레오티드 서열에서 뉴클레오티드 1 내지 60으로 구성된 서열, 뉴클레오티드 61 내지 402로 구성된 서열 및 뉴클레오티드 403 내지 717로 구성된 서열은 각각 신호 서열, 경쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 불변 영역 서열을 코딩한다. 서열번호 65의 뉴클레오티드 서열 및 서열번호 66의 아미노산 서열은 각각 도 41 및 42에도 제시되어 있다.

[0509] (실시예 9) 인간화된 MAb1의 제조

[0510] 9)-1 인간화된 MAb1 중쇄 발현 벡터의 구축

[0511] 9)-1-1 hMAb1-H1형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0512] 서열번호 56의 아미노산 20 내지 137로 표시된 hMAb1-H1형 중쇄 가변 영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA를 합성하고(진아트(GeneArt) 인공 유전자 합성 서비스) 제한효소 BlpI로 절단하였다. 수득된 DNA 단편을 인간화된 키메라 IgG2형 중쇄 발현 벡터(pCMA-G2)의 제한효소 BlpI-절단된 부위에 삽입하여 hMAb1-H1형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G2/hMAb1-H1"로서 명명하였다. hMAb1-H1형 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 55에 제시되어 있다.

[0513] 9)-1-2 hMAb1-H2형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0514] 9)-1-1에서 구축된 pCMA-G2/hMAb1-H1을 주형으로서 사용하고 하기 제시된 프라이머 세트 및 퀵체인지 XL 부위-지정된 돌연변이유발 키트(아질런트 테크놀로지스 인코포레이티드)를 사용하여 hMAb1-H2형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G1/hMAb1-H2"로서 명명하였다. hMAb1-H2형 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 57에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 58에 제시되어 있다.

[0515] 프라이머 세트:

[0516] H-N53Q-F: 5'-gggtggcaaccatcagccaaggcggcacctacacctac-3'
H-N53Q-R: 5'-gtaggtgtaggtgccgccttggctgatggttgccaccc-3'

[0517] 9)-1-3 hMAb1-H3형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0518] 서열번호 60의 아미노산 20 내지 137로 표시된 hMAb1-H3형 중쇄 가변 영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA를 합성하고(진아트 인공 유전자 합성 서비스) 제한효소 BlpI로 절단하였다. 수득된 DNA 단편을 인간화된 키메라 IgG2형 중쇄 발현 벡터(pCMA-G2)의 제한효소 BlpI-절단된 부위에 삽입하여 hMAb1-H3형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G2/hMAb1-H3"으로서 명명하였다. hMAb1-H3형 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 59에 제시되어 있다.

[0519] 9)-1-4 hMAb1-H4형 중쇄 발현 벡터의 구축

[0520] 9)-1-3에서 구축된 pCMA-G2/hMAb1-H3을 주형으로서 사용하고 하기 제시된 프라이머 세트 및 퀵체인지 XL 부위-지정된 돌연변이유발 키트(아질런트 테크놀로지스 인코포레이티드)를 사용하여 hMAb1-H4형 중쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-G1/hMAb1-H4"로서 명명하였다. hMAb1-H4형 중쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 61에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 62에 제시되어 있다.

[0521] 프라이머 세트:

[0522] H-N53Q-F: 5'-gggtggcaaccatcagccaaggcggcacctacacctac-3'
H-N53Q-R: 5'-gtaggtgtaggtgccgccttggctgatggttgccaccc-3'

[0523] 9)-2 인간화된 MAb1 경쇄 발현 벡터의 구축

[0524] 9)-2-1 hMAb1-L1형 경쇄 발현 벡터의 구축

[0525] 서열번호 64의 아미노산 21 내지 134로 표시된 hMAb1-L1형 경쇄 가변 영역을 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA를 합성하고(진아트 인공 유전자 합성 서비스) 제한효소 BsiWI로 절단하였다. 수득된 DNA 단편을 인간화된 키메라 항체 경쇄 발현을 위한 일반 목적 벡터(pCMA-LK)의 제한효소 BsiWI-절단된 부위에 삽입하여 hMAb1-L1형 경쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-LK/hMAb1-L1"로서 명명하였다. hMAb1-L1형 경쇄의 뉴클레오티

드 서열은 서열번호 63에 제시되어 있다.

[0526] 9)-2-2 hMAb1-L2형 경쇄 발현 벡터의 구축

[0527] 9)-2-1에서 구축된 pCMA-LK/hMAb1-L1을 주형으로서 사용하고 KOD-Plus-(도요보 컴파니 리미티드) 및 프라이머 세트 A 및 B 각각을 사용하여 DNA 단편을 PCR로 수득하고 프라이머 세트 C를 사용하여 중첩 연장 PCR로 연결함으로써 hMAb1-L2형 경쇄를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA를 제조하였다. 이 DNA를 제한효소 XbaI 및 PmeI로 절단하여 DNA 단편을 수득한 후, 이 DNA 단편을 인간화된 키메라 항체 경쇄 발현을 위한 일반 목적 벡터(pCMA-LK)의 제한효소 XbaI/PmeI-절단된 부위에 삽입하여 hMAb1-L2형 경쇄 발현 벡터를 구축하였다. 수득된 발현 벡터를 "pCMA-LK/hMAb1-L2"로서 명명하였다. hMAb1-L2형 경쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 65에 제시되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열번호 66에 제시되어 있다.

[0528] 프라이머 세트 A

[0529] L inf-F: 5'-gcctccggactctagagccaccatggtgctgcagacccaggtgttc-3'
L-EKL-R: 5'-caggtacaggttcttgttctcgttttccaggctctggctgcttctgcagc-3'

[0530] 프라이머 세트 B

[0531] L-EKL-F: 5'-gaaaacgagaacaagaacctgtacctgaactggtatctgcagaagcccg-3'
L inf-R: 5'-tagcctcccccgtttaaacgggcccctaacactcccccctg-3'

[0532] 프라이머 세트 C

[0533] L inf-F: 5'-gcctccggactctagagccaccatggtgctgcagacccaggtgttc-3'
L inf-R: 5'-tagcctcccccgtttaaacgggcccctaacactcccccctg-3'

[0534] (실시예 10) 인간화된 MAb1의 제조

[0535] 10-7-1) 인간화된 MAb1의 제조

[0536] 프리스타일 293-F 세포(인비트로겐 코포레이션)를 매뉴얼에 따라 하위배양하고 배양하였다.

[0537] 대수생장기에 있는 1.2 x 10^9개 세포의 프리스타일 293-F 세포(인비트로겐 코포레이션)를 3 ℓ 페른바흐 삼각 플라스크(코닝 인코포레이티드)에 접종하고 프리스타일 293 발현 배지(인비트로겐 코포레이션)를 사용하여 1.0 x 10^6개 세포/㎖로 희석한 후, 37℃에서 90 rpm에서 8% CO_2 항온처리기 내에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 3.6 mg의 폴리에틸렌이민(폴리사이언시스 인코포레이티드, #24765)을 20 ㎖의 옵티-프로 SFM 배지(인비트로겐 코포레이션)에 용해시켰다. 그 다음, 퓨어링크 하이퓨어 플라스미드 키트(인비트로겐 코포레이션)를 사용하여 제조한 H 쇄 발현 벡터(0.4 mg) 및 L 쇄 발현 벡터(0.8 mg)를 20 ㎖의 옵티-프로 SFM 배지(인비트로겐 코포레이션)에 현탁하였다. 20 ㎖의 발현 벡터/옵티-프로 SFM 혼합물 용액을 20 ㎖의 폴리에틸렌이민/옵티-프로 SFM 혼합물 용액에 첨가하고, 혼합물을 점진적으로 교반하고 5분 동안 더 방치한 후 프리스타일 293-F 세포에 첨가하였다. 세포를 37℃에서 90 rpm에서 8% CO_2 항온처리기 내에서 7일 동안 진탕배양하고 수득된 배양 상청액을 일회용 캡슐 필터(어드밴텍, #CCS-045-E1H)를 통해 여과하고 7)-2에 기재된 방식과 동일한 방식으로 정제하였다.

[0538] pCMA-G2/hMAb1-H1과 pCMA-LK/hMAb1-L1의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-1040"으로서 명명하였다. pCMA-G2/hMAb1-H2와 pCMA-LK/hMAb1-L1의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-1140"으로서 명명하였다. pCMA-G2/hMAb1-H2와 pCMA-LK/hMAb1-L2의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-1143"으로서 명명하였다. pCMA-G2/hMAb1-H3과 pCMA-LK/hMAb1-L1의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-2040"으로서 명명하였다. pCMA-G2/hMAb1-H4와 pCMA-LK/hMAb1-L1의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-2140"으로서 명명하였다. pCMA-G2/hMAb1-H4와 pCMA-LK/hMAb1-L2의 조합에 의해 수득된 인간화된 MAb1 항체를 "H-2143"으로서 명명하였다.

[0539] (실시예 11) 항-ROBO4 인간화된 항체의 성질

[0540] 11)-1 결합 친화성

[0541] 비아코어 3000(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨)을 이용하되 고정된 항체를 리간드로서 사용하고 항원을 분석물로서 사용하여 각각의 항체와 rROBO4-ECD 사이의 해리 상수를 측정하였다. 아민 커플링 방법으로 센서 칩 CM5(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨) 상에 고정된 항-인간

IgG 항체(지이 헬쓰케어 바이오-사이언시스 코포레이션에 의해 제조됨)를 통해 대략적으로 80 RU의 항체를 결합시켰다. 사용된 런닝 완충제는 0.05% 계면활성제 P20을 함유하는 PBS이었다. 항원의 연속 희석 용액(0.1 내지 200 nM)을 항체-결합된 칩 상에 300초 동안 30 ㎕/분의 유속으로 첨가하였다. 그 후, 해리 단계를 300초 동안 모니터링하였다. 3 M $MgCl_2$을 30초 동안 10 ㎕/분의 유속으로 재생 용액으로서 첨가하였다. 분석 소프트웨어(비아에발루션(BIAevalution) 소프트웨어, 버전 4.1)의 1:1 결합 모델을 이용하여 데이터를 분석함으로써 결합 속도 상수 k_{on}, 해리 속도 상수 k_{off} 및 해리 상수(K_D; $K_D = k_{off}/k_{on}$)를 계산하였다. 그 결과, K_D 값은 H-1040의 경우 0.41 nM이었고 H-1143의 경우 3.5 nM이었고 H-1140의 경우 3.9 nM이었고 H-2040의 경우 0.40 nM이었고 H-2143의 경우 1.7 nM이었고 H-2140의 경우 1.8 nM이었다.

[0542] 11)-2 ROBO4 다운스트림 신호의 활성화

[0543] 인간 IgG를 음성 대조군으로서 사용하였고, 인간 IgG, H-1040, H-1140, H-1143, H-2040, H-2140, H-2143 또는 cMAb1-2를 0.63 ㎍/㎖의 최종 농도로 배지에 첨가하였다는 점을 제외하고 4)-1의 방법에 따라 이 시험을 수행하였다. 그 결과, 음성 대조군 인간 IgG는 인간 ROBO4를 일시적으로 발현하는 세포에서 IL-8 프로모터 활성에 영향을 미치지 않은 반면, 모든 항-ROBO4 인간화된 항체들은 cMAb1-2와 동등한 수준에서 IL-8 프로모터 활성을 증가시켰다(도 49). 이들 결과는 모든 항-ROBO4 인간화된 항체들이 MAb1에서와 같이 ROBO4의 다운스트림 신호를 활성화시킨다는 것을 입증하였다.

[0544] 11)-3 HUVEC 이동 시험

[0545] 인간 IgG를 음성 대조군으로서 사용하였고, 인간 IgG, H-1143, H-2140 또는 H-2143을 0.5 ㎍/㎖의 최종 농도로 배지에 첨가하였다는 점을 제외하고 4)-2의 방법에 따라 이 시험을 수행하였고, 플레이트 판독기(엔비젼; 퍼킨엘머 인코포레이티드)를 이용하여 각각의 웰의 형광 강도(여기 파장/형광 파장: 485 nm/538 nm)를 측정하였다. 그 결과, H-1143, H-2140 또는 H-2143은 bFGF에 의해 유도된 HUVEC의 이동을 억제하였다(도 50). 추가로, H-1140은 HUVEC 이동에 대한 억제 활성을 보였다. 이들 결과는 H-1140, H-1143, H-2140 또는 H-2143이 HUVEC의 이동을 억제한다는 것을 입증하였다.

[0546] 11)-4 교차-종 반응성

[0547] 11)-4-1 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0548] 세포를 4)-3-1의 방법에 따라 제조하였다.

[0549] 11)-4-2 유동 세포측정 분석

[0550] 인간 IgG를 음성 대조군으로서 사용하였고, FITC-아피니퓨어 염소 항-인간 IgG(Fcɣ 단편 특이적)(잭슨 이뮤노리서치 라보라토리스 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 2차 항체로서 사용하였고, 유동 세포측정기(FC500; 벡크만 코울터 인코포레이티드에 의해 제조됨)를 검출기로서 사용하였다는 점을 제외하고 4)-3-2의 방법에 따라 이 시험을 수행하였다. 그 결과, H-1143, H-2140 또는 H-2143은 모항체 MAb1에서와 같이 마우스 ROBO4 또는 래트 ROBO4에 결합하지 않았지만 인간 ROBO4 및 사이노몰구스 원숭이 ROBO4에는 결합한다는 것이 밝혀졌다(도 51, 52 및 53). 추가로, H-1140은 H-1143, H-2140 및 H-2143과 동일한 결과를 보였다.

[0551] 11)-5 H-1140, H-1143, H-2140 또는 H-2143의 결합 특이성

[0552] 11)-5-1 항원 유전자 발현 세포의 제조

[0553] pCI-FLAG-hROBO4-28을 인간 ROBO4 발현 벡터로서 사용하였다는 점을 제외하고 4)-4-1의 방법에 따라 세포를 제조하였다.

[0554] 11)-5-2 유동 세포측정 분석

[0555] 인간 IgG 또는 마우스 IgG2A를 음성 대조군으로서 사용하였고, 마우스 IgG에 대한 플루오레세인-접합된 염소 IgG 분획(카펠 라보라토리스 인코포레이티드(Cappel Laboratories, Inc.)에 의해 제조됨) 또는 FITC-아피니퓨어 염소 항-인간 IgG(Fcɣ 단편 특이적)를 2차 항체로서 사용하였고, 유동 세포측정기(FC500)를 검출기로서 사용하였다는 점을 제외하고 4)-4-2의 방법에 따라 이 시험을 수행하였다. 결과적으로, H-1143, H-2140 또는 H-2143은 모항체 MAb1에서와 같이 hROBO1, hROBO2 또는 hROBO3에 결합하지 않았지만 hROBO4에는 특이적으로 결합한다는 것이 밝혀졌다(도 54). 추가로, H-1140은 H-1143, H-2140 및 H-2143과 동일한 결과를 보였다. 이와 관련하여, 양성 대조군 항체를 사용하여 hROBO4, hROBO1, hROBO2 및 hROBO3 각각이 세포막 상에서 발현된다는 것을 확인하

였다(도 54).

[0556] 11)-6 레이저-유도된 맥락막 혈관신생을 갖는 원숭이 모델에서의 약물 효능 평가

[0557] 11)-6-1 마취

[0558] 메데토미딘 염산염을 0.08 mg/kg의 복용량으로 각각의 사이노몰구스 원숭이에게 근육내 주사하였다. 그로부터 15분 후, 케타민 염산염을 15 mg/kg의 복용량으로 상기 사이노몰구스 원숭이에게 근육내 주사하였다.

[0559] 11)-6-2 모델 제조

[0560] 11)-6-1에서 마취된 각각의 사이노몰구스 원숭이를 누운 자세로 스테인레스 작업 테이블 상에 억류시켰다. 산동을 위해 5 mg/㎖ 트로픽아미드 - 5 mg/㎖ 페닐에프린 염산염 혼합물 점안제를 눈에 도포하였다. 녹색 레이저 광응고기 오큐라이트 GLx를 이용하여 망막의 황반 영역을 레이저 조사(조사된 열의 양: 500 ㎽, 조사 시간: 0.1초, 점 크기: 50 ㎛, 점의 수: 9개의 점)로 열적으로 손상시켰다. 작업 후, 크라빗(Cravit) 점안제를 작업처리된 눈에 적가하였다.

[0561] 11)-6-3 시험 물질의 투여

[0562] 모델 제조 후 7일째 날, 각각의 사이노몰구스 원숭이를 마취한 후, 누운 자세로 스테인레스 작업 테이블 상에 억류시켰다. 그 다음, 멸균 정제수로 4배 희석된 PA IODO 안구 및 눈 세척 용액(니텐 파마슈티칼 컴파니 리미티드(Nitten Pharmaceutical Co., Ltd.))을 눈에 도포하여 외부 눈을 소독하였다. 33G 바늘을 결막으로부터 유리체 내로 삽입하고, 1 ㎖ 주사기를 이용하여 1.1 mg/0.05 ㎖로 조절된 식염수 또는 0.05 ㎖의 H-2143을 상기 유리체 내로 주사하였다. 투여의 완료 후, 면봉을 이용하여 눈 및 귀용 린데론(Rinderon)-A 연고를 결막에 도포하고 눈의 개방 및 폐쇄를 통해 눈 표면 전체에 펴 발랐다.

[0563] 11)-6-4 약물 효능 평가

[0564] 모델 제조 후 7일째 날, 14일째 날 및 21일째 날, 마취 하에서 하이브리드 안저 카메라 CX-1을 이용하여 상용적인 방법으로 안저를 촬영하였다. 그 다음, 플루오레세인을 0.05 ㎖/kg의 복용량으로 정맥내 주사하였다. 플루오레세인의 정맥내 주사의 완료 후, 형광 혈관조영술을 1분 내지 최대 10분마다 수행하고, 이미지 데이터를 저장하였다. 이미지 데이터로부터, 문헌(Zahn G et al., Arch. Ophthalmol. 2009 127: 1329-1335)의 방법에 따라 플루오레세인이 축적된 각각의 레이저-조사된 부위의 형광 강도를 기초로 중증도를 1 내지 5 등급의 규모로 분류하였다. 그 다음, 모든 레이저-조사된 부위들 중에서 중증도 분류에서 4 및 5 등급에 상응하는 부위의 비를 백분율 기준으로 계산하여 맥락막 혈관신생을 평가하였다. 식염수를 투여받은 군과 H-2143을 투여받은 군 사이에 맥락막 혈관신생을 비교한 결과, 4 및 5 등급의 비는 식염수를 투여받은 군에서 모델 제조로부터의 시간의 경과에 따라 증가한 반면, 이러한 증가는 H-2143을 투여받은 군에서 관찰되지 않았다. 이것은 H-2143의 투여가 레이저-유도된 맥락막 혈관신생을 억제하였다는 것을 의미한다(도 55).

[0565] [산업상 이용가능성]

[0566] 본 발명에 의해 제공된 항체의 사용은 혈관신생 질환, 예컨대, 삼출성 연령 관련 황반 변성, 당뇨망막병증, 황반 부종, 양성 또는 악성 종양, 아테롬성동맥경화증, 수정체뒤섬유증식, 혈관종, 만성 염증, 안구 혈관신생 질환, 증식성 망막병증, 혈관신생 녹내장, 각막 조직 이식 또는 다른 조직 이식의 면역 거부, 류마티스 관절염, 건선, 급성 염증, 패혈증 또는 비만의 치료 또는 예방, 및 상기 혈관신생 질환의 검사 또는 진단을 가능하게 한다.

[0567] [서열목록의 무형식 텍스트]

[0568] 서열번호 1: 전장 인간 ROBO4 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 13)

[0569] 서열번호 2: 인간 ROBO4의 아미노산 서열(도 14)

[0570] 서열번호 3: N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0571] 서열번호 4: N-말단 FLAG-태그부착된 전장 인간 ROBO4의 아미노산 서열

[0572] 서열번호 5: 서열번호 2의 아미노산 46 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0573] 서열번호 6: 서열번호 2의 아미노산 46 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부

착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열

[0574] 서열번호 7: 서열번호 2의 아미노산 132 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0575] 서열번호 8: 서열번호 2의 아미노산 132 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열

[0576] 서열번호 9: 서열번호 2의 아미노산 210 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0577] 서열번호 10: 서열번호 2의 아미노산 210 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열

[0578] 서열번호 11: 서열번호 2의 아미노산 225 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0579] 서열번호 12: 서열번호 2의 아미노산 225 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열

[0580] 서열번호 13: 서열번호 2의 아미노산 341 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0581] 서열번호 14: 서열번호 2의 아미노산 341 내지 1007의 아미노산 서열로 구성된 인간 ROBO4의 N-말단 FLAG-태그부착된 세포외 영역/도메인 결실 변이체의 아미노산 서열

[0582] 서열번호 15: 마우스 ROBO4 cDNA의 뉴클레오티드 서열

[0583] 서열번호 16: 마우스 ROBO4의 아미노산 서열

[0584] 서열번호 17: 래트 ROBO4 cDNA의 뉴클레오티드 서열

[0585] 서열번호 18: 래트 ROBO4의 아미노산 서열

[0586] 서열번호 19: 원숭이 ROBO4 cDNA1의 뉴클레오티드 서열

[0587] 서열번호 20: 원숭이 ROBO4 아미노산 서열 1

[0588] 서열번호 21: 원숭이 ROBO4 cDNA2의 뉴클레오티드 서열

[0589] 서열번호 22: 원숭이 ROBO4 아미노산 서열 2

[0590] 서열번호 23: 인간 ROBO1 cDNA의 뉴클레오티드 서열

[0591] 서열번호 24: 인간 ROBO1의 아미노산 서열

[0592] 서열번호 25: 인간 ROBO2 cDNA의 뉴클레오티드 서열

[0593] 서열번호 26: 인간 ROBO2의 아미노산 서열

[0594] 서열번호 27: 인간 ROBO3 cDNA의 뉴클레오티드 서열

[0595] 서열번호 28: 인간 ROBO4의 아미노산 서열

[0596] 서열번호 29: IL-8 프로모터 영역의 뉴클레오티드 서열

[0597] 서열번호 30: MAb1 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 15)

[0598] 서열번호 31: MAb1 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(도 16)

[0599] 서열번호 32: MAb1 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 17)

[0600] 서열번호 33: MAb1 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(도 18)

[0601] 서열번호 34: 인간 κ 쇄 분비 신호 및 인간 κ 쇄 불변 영역의 아미노산을 코딩하는 cDNA를 포함하는 뉴클레오티드 서열

[0602] 서열번호 35: 인간 중쇄 신호 서열 및 인간 IgG1 불변 영역의 아미노산을 코딩하는 cDNA를 포함하는 뉴클레오티

드 서열

[0603] 서열번호 36: 인간 중쇄 신호 서열 및 인간 IgG2 불변 영역의 아미노산을 코딩하는 cDNA를 포함하는 뉴클레오티드 서열

[0604] 서열번호 37: cMAb1 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 19)

[0605] 서열번호 38: cMAb1 경쇄의 아미노산 서열(도 20)

[0606] 서열번호 39: cMAb1-1 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 21)

[0607] 서열번호 40: cMAb1-1 중쇄의 아미노산 서열(도 22)

[0608] 서열번호 41: cMAb1-2 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 23)

[0609] 서열번호 42: cMAb1-2 중쇄의 아미노산 서열(도 24)

[0610] 서열번호 43: MAb1 중쇄 CDRH1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0611] 서열번호 44: MAb1 중쇄 CDRH1의 아미노산 서열(도 25)

[0612] 서열번호 45: MAb1 중쇄 CDRH2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0613] 서열번호 46: MAb1 중쇄 CDRH2의 아미노산 서열(도 26)

[0614] 서열번호 47: MAb1 중쇄 CDRH3의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0615] 서열번호 48: MAb1 중쇄 CDRH3의 아미노산 서열(도 27)

[0616] 서열번호 49: MAb1 경쇄 CDRL1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0617] 서열번호 50: MAb1 경쇄 CDRL1의 아미노산 서열(도 28)

[0618] 서열번호 51: MAb1 경쇄 CDRL2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0619] 서열번호 52: MAb1 경쇄 CDRL2의 아미노산 서열(도 29)

[0620] 서열번호 53: MAb1 경쇄 CDRL3의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0621] 서열번호 54: MAb1 경쇄 CDRL3의 아미노산 서열(도 30)

[0622] 서열번호 55: hMAb1-H1형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 31)

[0623] 서열번호 56: hMAb1-H1형 중쇄의 아미노산 서열(도 32)

[0624] 서열번호 57: hMAb1-H2형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 33)

[0625] 서열번호 58: hMAb1-H2형 중쇄의 아미노산 서열(도 34)

[0626] 서열번호 59: hMAb1-H3형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 35)

[0627] 서열번호 60: hMAb1-H3형 중쇄의 아미노산 서열(도 36)

[0628] 서열번호 61: hMAb1-H4형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 37)

[0629] 서열번호 62: hMAb1-H4형 중쇄의 아미노산 서열(도 38)

[0630] 서열번호 63: hMAb1-L1형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 39)

[0631] 서열번호 64: hMAb1-L1형 경쇄의 아미노산 서열(도 40)

[0632] 서열번호 65: hMAb1-L2형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(도 41)

[0633] 서열번호 66: hMAb1-L2형 경쇄의 아미노산 서열(도 42)

[0634] 서열번호 67: hMAb1-H2 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH1(도 43)

[0635] 서열번호 68: hMAb1-H2 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH2(도 44)

[0636] 서열번호 69: hMAb1-H2 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH3(도 45)

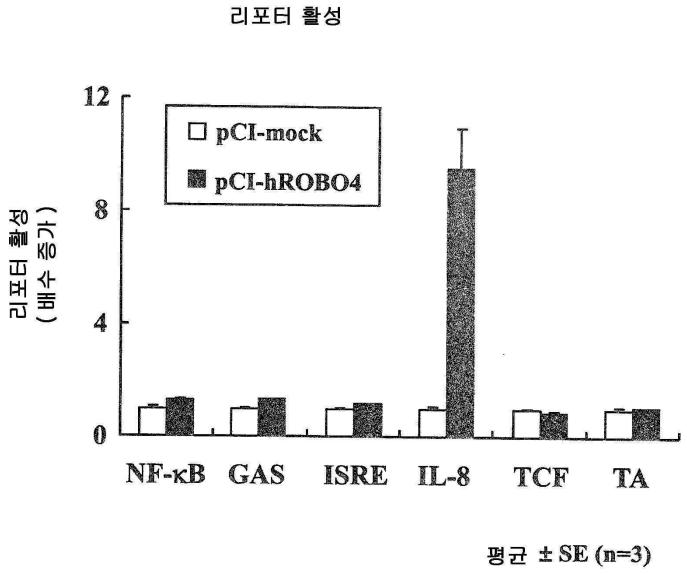
[0637] 서열번호 70: hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL1(도 46)

[0638] 서열번호 71: hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL2(도 47)

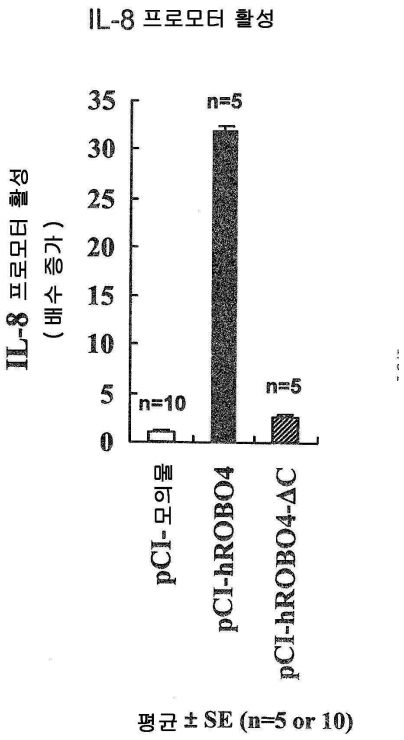
[0639] 서열번호 72: hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL3(도 48)

도면

도면1

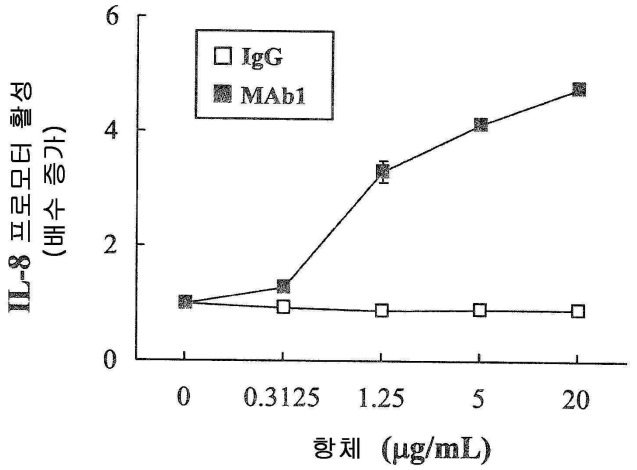


도면2



도면3

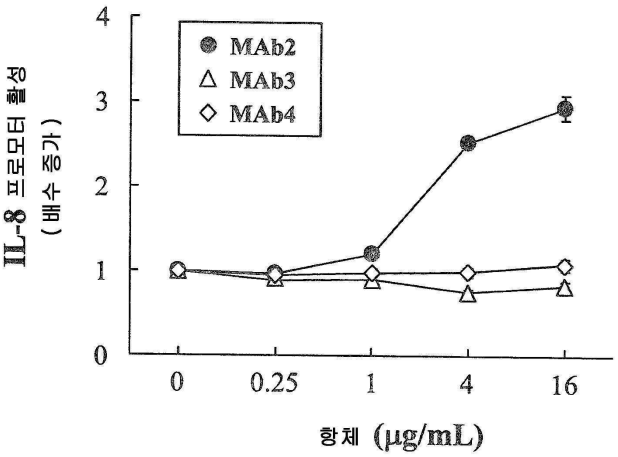
IL-8 프로모터 활성



평균 ± SE (n=3)

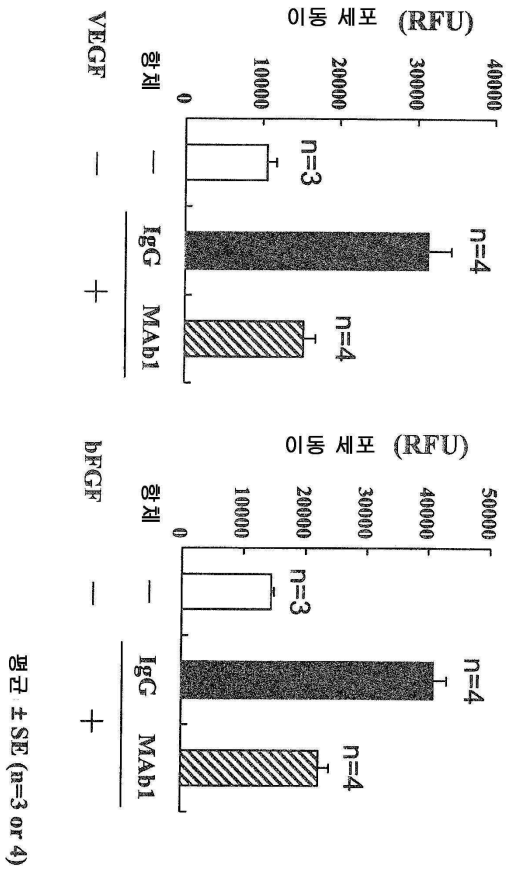
도면4

IL-8 프로모터 활성

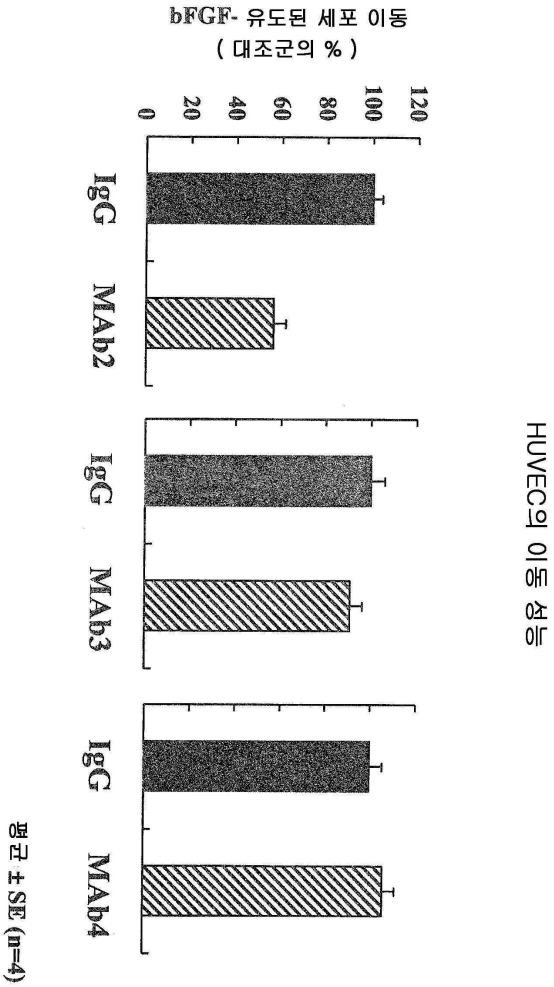


평균 ± SE (n=3)

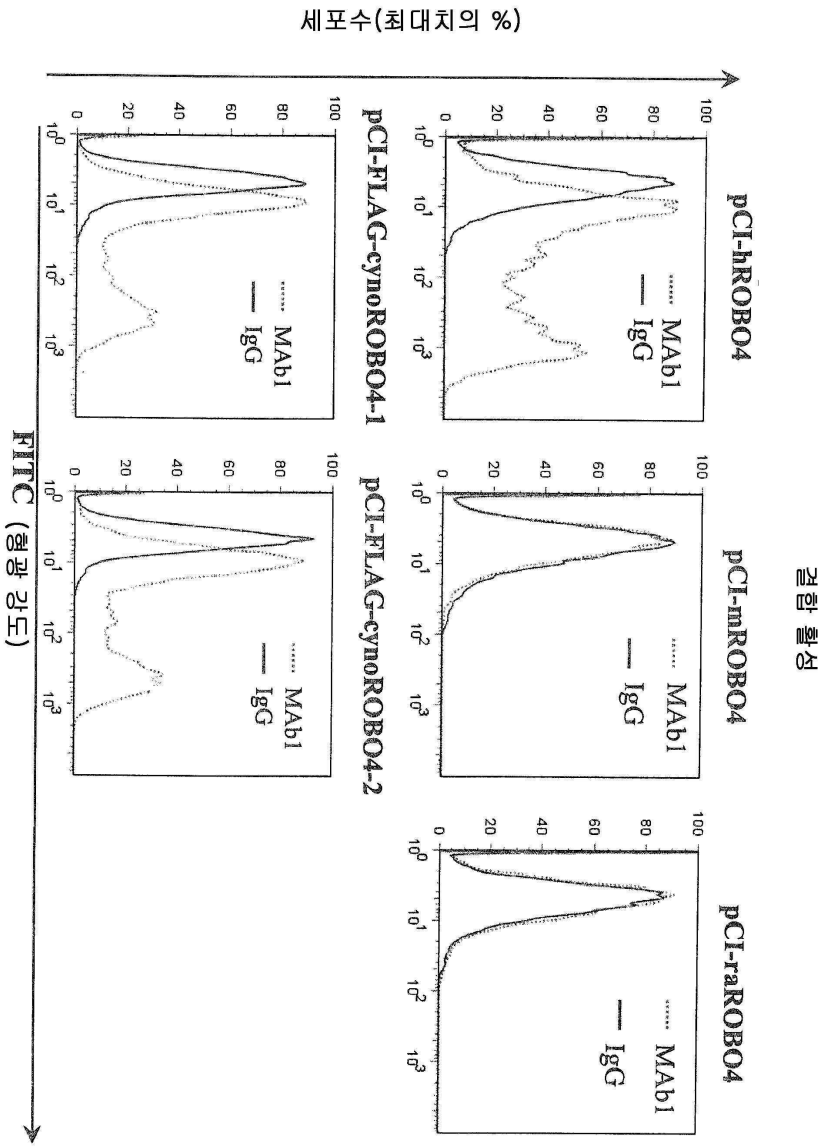
도면5


HUVEC의 이동 성능
이동 세포 (RFU)
40000
30000
20000
10000
0
n=3
n=4
n=4
VEGF
−
+
항체
−
IgG
MAb1
이동 세포 (RFU)
50000
40000
30000
20000
10000
0
n=3
n=4
n=4
bFGF
−
+
항체
−
IgG
MAb1
평균 ± SE (n=3 or 4)

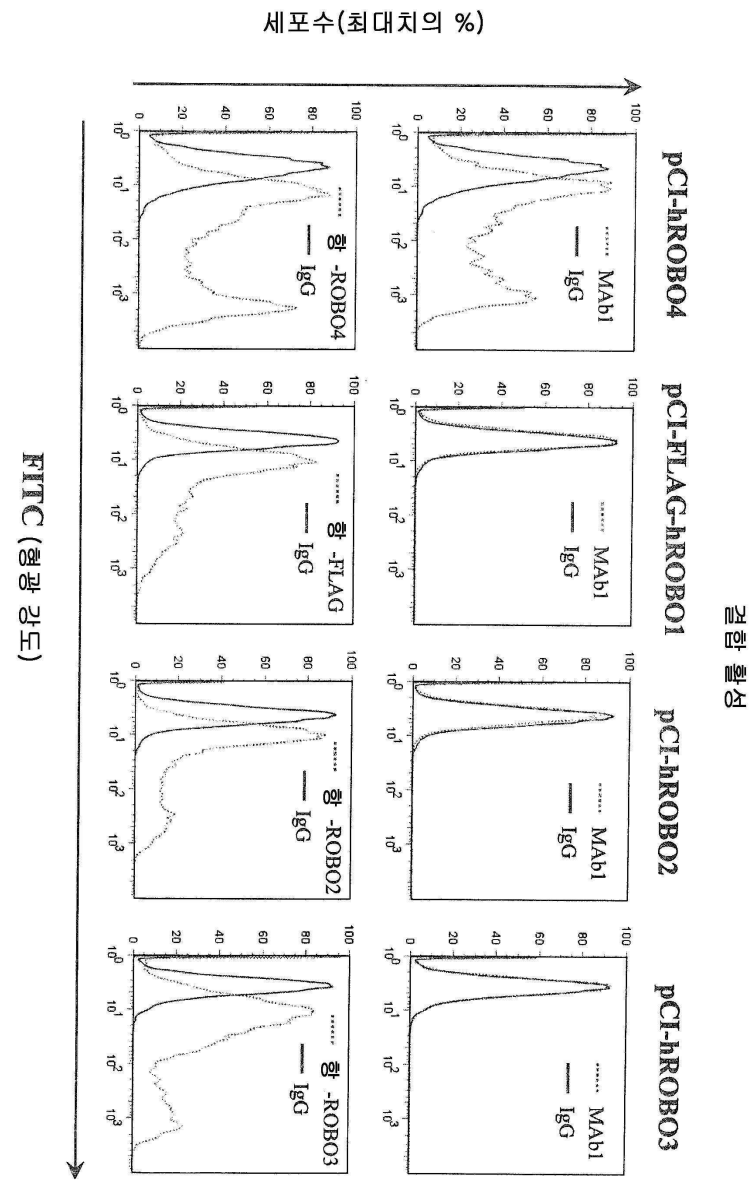
도면6


bFGF- 유도된 세포 이동
(대조군의 %)
0
20
40
60
80
100
120
IgG
MAb2
IgG
MAb3
IgG
MAb4
HUVEC의 이동 성능
평균 ± SE (n=4)

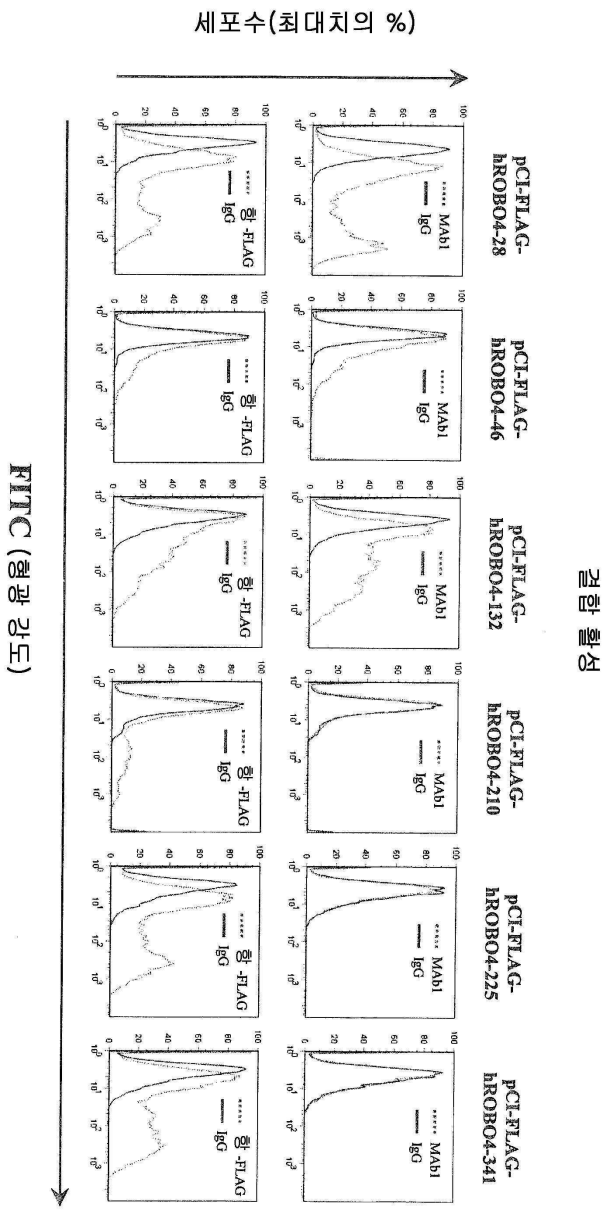
도면7


세포수(최대치의 %)
결합 활성
pCI-hROBO4
pCI-mROBO4
pCI-raROBO4
pCI-FLAG-cynoROBO4-1
pCI-FLAG-cynoROBO4-2
MAb1
IgG
FITC (형광 강도)

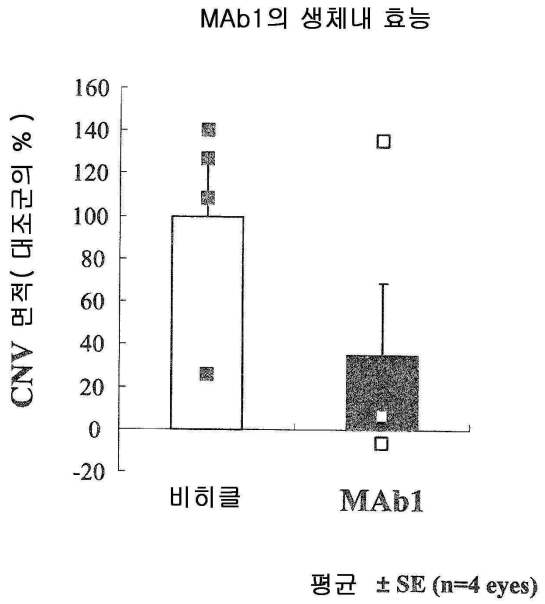
도면8


세포수(최대치의 %)
결합 활성
FITC (형광 강도)
pCI-hROBO4
pCI-FLAG-hROBO1
pCI-hROBO2
pCI-hROBO3
MAb1
IgG
항 -ROBO4
항 -FLAG
항 -ROBO2
항 -ROBO3

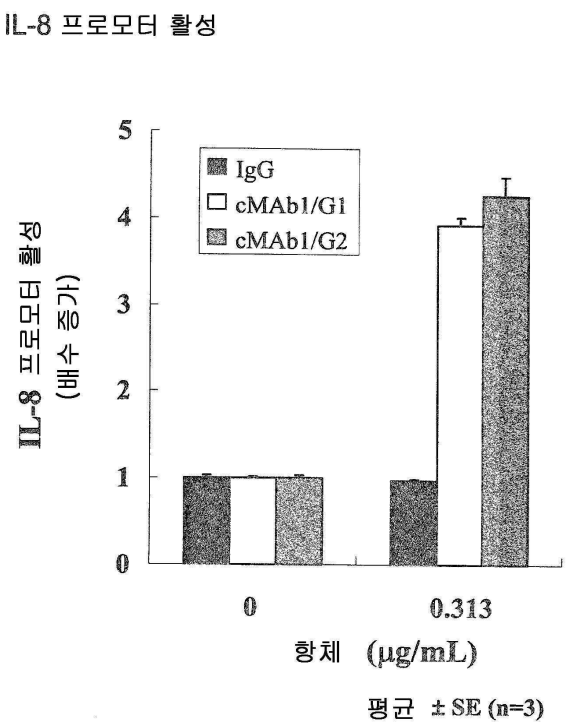
도면9


세포수(최대치의 %)
FITC (형광 강도)
결합 활성
pCI-FLAG-hROBO4-28
pCI-FLAG-hROBO4-46
pCI-FLAG-hROBO4-132
pCI-FLAG-hROBO4-210
pCI-FLAG-hROBO4-225
pCI-FLAG-hROBO4-341
MAb1
IgG
항-FLAG

도면10

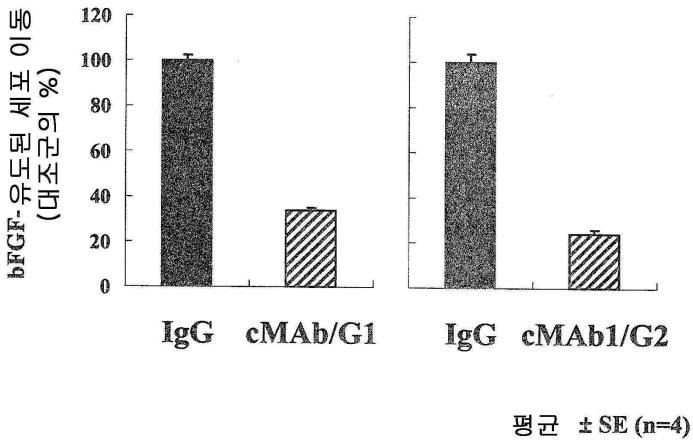

MAb1의 생체내 효능
CNV 면적 (대조군의 %)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
비히클
MAb1
평균 ± SE (n=4 eyes)

도면11


IL-8 프로모터 활성
IL-8 프로모터 활성
(배수 증가)
5
4
3
2
1
0
IgG
cMAb1/G1
cMAb1/G2
0
0.313
항체 (μg/mL)
평균 ± SE (n=3)

도면12

HUVEC의 이동 성능



평균 ± SE (n=4)

도면13

전장 인간 ROBO4를 코딩하는 cDNA(서열번호 1)

atgggctctggaggagacagcctcctgggggcaggggttccctgcctctgctgctcctgctcatcatgggaggcatggctcag
gactccccgccccagatcctagtccacccccaggaccagctgttccagggccctggccctgccaggatgagctgccaagcctca
ggccagccacctcccaccatccgctggttgctgaatgggcagcccctgagcatggtgcccccagacccacaccacctcctgcctg
atgggacccttctgctgctacagccccctgcccggggacatgcccacgatggccaggccctgtccacagacctgggtgtctaca
catgtgaggccagcaaccggcttggcacggcagtcagcagaggcgctcggctgtctgtggctgtcctccgggaggatttccag
atccagcctcgggacatggtggctgtggtgggtgagcagtttactctggaatgtgggccgccctggggccacccagagcccac
agtctcatggtggaaagatgggaaacccctggccctccagcccggaaggcacacagtgtccgggggtccctgctgatggca
agagcagagaagagtgacgaagggacctacatgtgtggccaccaacagcgcaggacatagggagagccgcgcagccc
gggtttccatccaggagccccaggactacacggagcctgtggagcttctggctgtgcgaattcagctggaaaatgtgacactg
ctgaacccggatcctgcagagggccccaagcctagaccggcggtggctcagctggaaggtcagtggccctgctgcgcctgc
ccaatcttacacggccttgttcaggacccagactgccccgggaggccagggagctccgtgggcagaggagctgctggccggct
ggcagagcgcagagcttggaggcctccactggggccaagactacgagttcaaagtgagaccatcctctggccgggctcgagg
ccctgacagcaacgtgctgctcctgaggctgccggaaaaagtgcccagtgccccacctcaggaagtgactctaaagcctggca
atggcactgtctttgtgagctgggtcccaccacctgctgaaaaccacaatggcatcatccgtggctaccaggtctggagcctgg
gcaacacatcactgccaccagccaactggactgtagttggtgagcagacccagctggaaatcgccacccatatgccaggctcc
tactgcgtgcaagtggctgcagtcactggtgctggagctggggagcccagtagacctgtctgcctccttttagagcaggccatg
gagcgagccacccaagaacccagtgagcatggtccctggaccctggagcagctgagggctaccttgaagcggcctgaggtca
ttgccacctgcggtgttgcactctggctgctgcttctgggcaccgccgtgtgtatccaccgccggcgccgagctagggtgcacct
gggcccaggtctgtacagatataccagtgaggatgccatcctaaaacacaggatggatcacagtgactcccagtggttggca
gacacttggcgttccacctctggctctcgggacctgagcagcagcagcagcctcagcagtcggctgggggcggatgcccgggga
cccactagactgtcgtcgctccttgctctcctgggactcccgaagccccggcgtgcccctgcttccagacaccagcacttttttatg
gctccctcatcgctgagctgccctccagtaccccagccaggccaagtccccaggtcccagctgtcaggcgcctcccaccccagct
ggcccagctctccagcccctgttccagctcagacagcctctgcagccgcaggggactctcttctccccgcttgtctctggcccctgc
agaggcttggaaggccaaaaagaagcaggagctgcagcatgccaacagttccccactgctccggggcagccactccttgga
gctccgggcctgtgagttaggaaatagaggttccaagaaccttcccaaagcccaggagctgtgccccaagctctggttgcct
ggcgggccctgggaccgaaactcctcagctcctcaaatgagctggttactcgtcatctccctccagcacccctctttcctcatgaa
actcccccaactcagagtcaacagacccagcctccggtggcaccacaggctccctcctccatcctgctgccagcagcccccatcc
ccatccttagcccctgcagtccccctagccccccaggcctcttccctctctggccccagcccagcttccagtcgcctgtccagctcctc
actgtcatccctgggggaggatcaagacagcgtgctgacccctgaggaggtagccctgtgcttggaactcagtgagggtgag
gagactcccaggaacagcgtctctcccatgccaagggctccttcaccccccaccacctatgggtacatcagcgtcccaacagcc
tcagagttcacggacatgggcaggactggaggaggggtggggcccaagggggagtcttgctgtgcccacctcggccctgcc
tcacccccaccccccagcgagggctccttagccaatggttggggctcagcctctgaggacaatgccgccagcgccagagccagc
cttgtcagctcctccgatggctccttcctcgctgatgctcactttgcccgggccctggcagtggctgtggatagctttggtttcggt
ctagagcccagggaggcagactgcgtcttcatagatgcctcatcacctccctccccacgggatgagatcttcctgaccccaac
ctctccctgcccctgtgggagtggaggccagactggttggaagacatggaggtcagccacacccagcggctgggaaggggg
atgcctccctggccccctgactctcagatctcttcccagagaagtcagctccactgtcgtatgcccaaggctggtgcttctcctgt
agattactcctga

정지 코돈

도면14

인간 ROBO4의 전장 아미노산 서열(서열번호 2)

MGSGGDSLLGGRGSLPLLLLLLIMGGMAQDSPPQILVHPQDQLFQGPGPARMSCQAS
GQPPPTIRWLLNGQPLSMVPPDPHHLLPDGTLLLLQPPARGHAHDGQALSTDLGVY
TCEASNRLGTAVSRGARLSVAVLREDFQIQPRDMVAVVGEQFTLECGPPWGHPEPTV
SWWKDGKPLALQPGRHTVSGGSLLMARAEKSDEGTYMCVATNSAGHRESRAARVS
IQEPQDYTEPVELLAVRIQLENVTLLNPDPAEGPKPRPAVWLSWKVSGPAAPAQSYT
ALFRTQTAPGGQGAPWAEELLAGWQSAELGGLHWGQDYEFKVRPSSGRARGPDSN
VLLLRLPEKVPSAPPQEVTLKPGNGTVFVSWVPPPAENHNGIIRGYQVWSLGNTSLP
PANWTVVGEQTQLEIATHMPGSYCVQVAAVTGAGAGEPSRPVCLLLEQAMERATQE
PSEHGPWTLEQLRATLKRPEVIATCGVALWLLLLGTAVCIHRRRRARVHLGPGLYRY
TSEDAILKHRMDHSDSQWLADTWRSTSGSRDLSSSSSLSSRLGADARDPLDCRRSL
LSWDSRSPGVPLLPDTSTFYGSLIAELPSSTPARPSPQVPAVRRLPPQLAQLSSPCSSS
DSLCSRRGLSSPRLSLAPAEAWKAKKKQELQHANSSPLLRGSHSLELRACELGNRG
SKNLSQSPGAVPQALVAWRALGPKLLSSSNELVTRHLPPAPLFPHETPPTQSQQTQP
PVAPQAPSSILLPAAPIPILSPCSPPSPQASSLSGPSPASSRLSSSSLSSLGEDQDSVLTP
EEVALCLELSEGEETPRNSVSPMPRAPSPPTTYGYISVPTASEFTDMGRTGGGVGPK
GGVLLCPPRPCLTPTPSEGSLANGWGSASEDNAASARASLVSSSDGSFLADAHFARA
LAVAVDSFGFGLEPREADCVFIDASSPPSPRDEIFLTPNLSLPLWEWRPDWLEDMEV
SHTQRLGRGMPPWPPDSQISSQRSQLHCRMPKAGASPVDYS

도면15

MAb1의 중쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 30)

gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttca
gtacctatgccatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtaatggtggtacttacacct
actatccagacagtgtgaagggtcgattcaccatctccagagacaatgccgagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgagg
tctgaggacacggccatgtatttctgtgcaagactaatctactatgattaccttgactactggggccacggcaccactctcacagtctc
ctca

도면16

MAb1 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 31)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTPEKRLEWVATISNGGTYTY
YPDSVKGRFTISRDNAENTLYLQMSSLRSEDTAMYFCARLIYYDYLDYWGHGTTLTVSS

도면17

MAb1의 경쇄 가변 영역을 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 32)

gatgctgtgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgcaggtctagtcagagccttga
aaacagtaatggaaacacctatttgaactggtacttccagaaaccaggccagtctccacagctcctgatctacagggtttccaaccg
attttctggggtcctagacaggttcagtggtagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaagatt
tcggagtttatttctgcctccaagttactcatgtcccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgggct

도면18

MAb1 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 33)

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYFQKPGQSPQLLIYRVS
NRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYFCLQVTHVPWTFGGGTKLEIKRA

도면19

도 19는 cMAb1의 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 37)을 보여준다.

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgatgctgtgatgacccaaactccactctc
cctgcctgtcagtcttggagatcaagcctccatctcttgcaggtctagtcagagccttgaaaacagtaatggaaacacctatttgaac
tggtacttccagaaaccaggccagtctccacagctcctgatctacagggtttccaaccgattttctggggtcctagacaggttcagtgg
tagtggatcagggacagatttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaagatttcggagtttatttctgcctccaagttactca
tgtcccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgggctgtggccgcccctccgtgttcatcttccccctccgacg
agcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggac
aacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctga
ccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagc
ttcaacaggggggagtgt

분비 신호 서열(1-60), 가변 영역(61-402), 불변 영역(403-717)

도면20

cMAb1 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 38)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNW
YFQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYFCLQVTHVP
WTFGGGTKLEIKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

분비 신호 서열(1-20), 가변 영역(21-134), 불변 영역(135-239)

도면21

cMAb1-1의 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 39)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaagtgcagctggtggagtctggggg
aggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtacctatgccatgtcttgggttc
gccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtaatggtggtacttacacctactatccagacagtgtgaa
gggtcgattcaccatctccagagacaatgccgagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacggcc
atgtatttctgtgcaagactaatctactatgattaccttgactactggggccacggcaccactctcacagtcagctcagcctcca
ccaagggcccaagcgtcttcccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgccctgggctgcctggtcaagg
actacttccccgaacccgtgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccgctgtcctgcagtc
ctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagca
cctgaactcctgggggacgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtca
catgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgc
caagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggc
cagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgg
tcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggccagcccgagaacaactacaagaccacccctcc
cgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctc
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacccagaagagcctctccctgtctcccggcaaa

분비 신호 서열(1-57), 가변 영역 (58-411), 불변 영역(412-1401)

도면22

cMAb1-1 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 40)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWV
RQTPEKRLEWVATISNGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAENTLYLQMSSLRSEDTAMY
FCARLIYYDYLDYWGHGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-467)

도면23

cMAb1-2의 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 41)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaagtgcagctggtggagtctgggggaggc
ttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtacctatgccatgtcttgggttcgccagact
ccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtaatggtggtacttacacctactatccagacagtgtgaagggtcgattcac
catctccagagacaatgccgagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacggccatgtatttctgtgcaag
actaatctactatgattaccttgactactggggccacggcaccactctcacagtcagctcagccagcaccaagggcccttccgtgttcc
ctctggcccctttgtagccgttccaccagcgagtccaccgccgcccttggctgtctggtgaaggactacttccctgagcctgtgaccgtga
gctggaactccggagcccttaccagcggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtccagcggcctttactccctgagctccgtggtg
accgtgcctagctccaacttcggcacccaaacctacacctgtaacgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagaccgt
ggagcgtaagtgttgtgtggagtgtcctccttgtcctgccctcctgtggccggaccttccgtgttccttttccctcctaagcctaaggac
accctgatgatcagccgtacccctgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaggtgcagttcaactggtac
gtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgtgaggagcaattcaacagcaccttccgtgtggtgtccgtgcttacc
gtggtgcaccaagactggctgaacggcaaggagtacaagtgtaaggtgagcaacaagggacttcctgcccctatcgagaagacca
tctccaagaccaagggccaacctcgtgagcctcaagtgtacaccttcctcctagccgtgaggagatgaccaagaaccaagtgtccc
ttacctgtctggtgaagggcttctaccctagcgacatcgccgtggagtgggagtccaacggacaacctgagaacaactacaagacc
acccctcctatgcttgacagcgacggctccttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtcccgttggcaacaaggcaacgtgtt
cagctgttccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccaaaagagcctttccctgagccctggaaag

분비 신호 서열(1-57), 가변 영역(58-411), 불변 영역(412-1389)

도면24

cMAb1-2 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 42)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWV
RQTPEKRLEWVATISNGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAENTLYLQMSSLRSEDTAMY
FCARLIYYDYLDYWGHGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSN
TKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-463)

도면25

MAb1의 중쇄 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 44)

TYAMS

도면26

MAb1의 중쇄 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 46)
TISNGGTYTYYPDSVKG

도면27

MAb1의 중쇄 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 48)
LIYYDYLDY

도면28

MAb1의 경쇄 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 50)
RSSQSLENSNGNTYLN

도면29

MAb1의 경쇄 CDRL2의 아미노산 서열(서열번호 52)
RVSNRFS

도면30

MAb1의 경쇄 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 54)
LQVTHVPWT

도면31

hMAb1-H1형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 55)
atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagctggtggaaagcg
gcggaggcctggtgcagcctggcggctctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcacctacgccatg
agctgggtccgacaggcccctggcaagggactggaatgggtggcaaccatcagcaacggcggcacctacacctactac
cccgacagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctg
cgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagactgatctactacgactacctggactactggggccagggcaccc
tggtcaccgtcagctcagccagcaccaagggcccttccgtgttccctctggccccttgtagccgttccaccagcgagtccac
cgccgcccttggctgtctggtgaaggactacttccctgagcctgtgaccgtgagctggaactccggagcccttaccagcg
gcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtccagcggcctttactccctgagctccgtggtgaccgtgcctagctccaactt
cggcacccaaacctacacctgtaacgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagaccgtggagcgtaagt
gttgtgtggagtgtcctccttgtcctgcccctcctgtggccggaccttccgtgttccttttccctcctaagcctaaggacaccc
tgatgatcagccgtacccctgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaggtgcagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgtgaggagcaattcaacagcaccttccgtgtggt
gtccgtgcttaccgtggtgcaccaagactggctgaacggcaaggagtacaagtgtaaggtgagcaacaagggacttcc
tgcccctatcgagaagaccatctccaagaccaagggccaacctcgtgagcctcaagtgtacaccctcctcctagccgtg
aggagatgaccaagaaccaagtgtccctacctgtctggtgaagggcttctaccctagcgacatcgccgtggagtggga
gtccaacggacaacctgagaacaactacaagaccaccccctcctatgcttgacagcgacggctccttcttcctgtacagca
agctgaccgtggacaagtcccgttggcaacaaggcaacgtgttcagctgttccgtgatgcacgaggccctgcacaacca
ctacacccaaaagagcctttccctgagccctggaaag
분비 신호 서열(1-57), 가변 영역(58-411), 불변 영역(412-1389)

도면32

hMAb1-H1형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 56)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS
WVRQAPGKGLEWVATISNGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARLIYYDYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-463)

도면33

hMAb1-H2형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 57)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagctggtggaaagcg
gcggaggcctggtgcagcctggcggctctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcacctacgccatg
agctgggtccgacaggcccctggcaagggactggaatgggtggcaaccatcagccaaggcggcacctacacctactac
cccgacagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctg
cgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagactgatctactacgactacctggactactggggccagggcaccc
tggtcaccgtcagctcagccagcaccaagggcccttccgtgttccctctggccccttgtagccgttccaccagcgagtccac
cgccgcccttggctgtctggtgaaggactacttccctgagcctgtgaccgtgagctggaactccggagcccttaccagcg
gcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtccagcggcctttactccctgagctccgtggtgaccgtgcctagctccaactt
cggcacccaaacctacacctgtaacgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagaccgtggagcgtaagt
gttgtgtggagtgtcctccttgtcctgcccctcctgtggccggaccttccgtgttccttttccctcctaagcctaaggacaccc
tgatgatcagccgtacccctgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaggtgcagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgtgaggagcaattcaacagcaccttccgtgtggt
gtccgtgcttaccgtggtgcaccaagactggctgaacggcaaggagtacaagtgtaaggtgagcaacaagggacttcc
tgcccctatcgagaagaccatctccaagaccaagggccaacctcgtgagcctcaagtgtacaccttcctcctagccgtg
aggagatgaccaagaaccaagtgtccttacctgtctggtgaagggcttctaccctagcgacatcgccgtggagtggga
gtccaacggacaacctgagaacaactacaagaccacccctcctatgcttgacagcgacggctccttcttcctgtacagca
agctgaccgtggacaagtcccgttggcaacaaggcaacgtgttcagctgttccgtgatgcacgaggccctgcacaacca
ctacacccaaaagagcctttccctgagccctggaaag

분비 신호 서열(1-57), 가변 영역(58-411), 불변 영역(412-1389)

도면34

hMAb1-H2형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 58)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS
WVRQAPGKGLEWVATISQGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARLIYYDYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-463)

도면35

hMAb1-H3형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 59)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagctggtggaaagcg
gcggaggcctggtgcagcctggcggctctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcacctacgccatg
agctgggtccgacaggcccctggcaagcggctggaatgggtggcaaccatcagcaacggcggcacctacacctactac
cccgacagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctg
cgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagactgatctactacgactacctggactactggggccagggcaccc
tggtcaccgtcagctcagccagcaccaagggcccttccgtgttccctctggccccttgtagccgttccaccagcgagtccac
cgccgcccttggctgtctggtgaaggactacttccctgagcctgtgaccgtgagctggaactccggagcccttaccagcg
gcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtccagcggcctttactccctgagctccgtggtgaccgtgcctagctccaactt
cggcacccaaacctacacctgtaacgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagaccgtggagcgtaagt
gttgtgtggagtgtcctccttgtcctgccctcctgtggccggaccttccgtgttccttttccctcctaagcctaaggacaccc
tgatgatcagccgtacccctgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaggtgcagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgtgaggagcaattcaacagcaccttccgtgtggt
gtccgtgcttaccgtggtgcaccaagactggctgaacggcaaggagtacaagtgtaaggtgagcaacaagggacttcc
tgcccctatcgagaagaccatctccaagaccaagggccaacctcgtgagcctcaagtgtacaccctcctcctagccgtg
aggagatgaccaagaaccaagtgtcccttacctgtctggtgaagggcttctaccctagcgacatcgccgtggagtggga
gtccaacggacaacctgagaacaactacaagaccacccctcctatgcttgacagcgacggctccttcttcctgtacagca
agctgaccgtggacaagtcccgttggcaacaaggcaacgtgttcagctgttccgtgatgcacgaggccctgcacaacca
ctacacccaaaagagcctttccctgagccctggaaag

분비 신호 서열(1-57), 가변 영역(58-411), 불변 영역(412-1389)

도면36

hMAb1-H3형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 60)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS
WVRQAPGKRLEWVATISNGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARLIYYDYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-463)

도면37

hMAb1-H4형 중쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 61)

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagcgaggtgcagctggtggaaagcg
gcggaggcctggtgcagcctggcggctctctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcacctacgccatg
agctgggtccgacaggcccctggcaagcggctggaatgggtggcaaccatcagccaaggcggcacctacacctactac
cccgacagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacaacgccaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctg
cgggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagactgatctactacgactacctggactactggggccagggcaccc
tggtcaccgtcagctcagccagcaccaagggcccttccgtgttccctctggccccttgtagccgttccaccagcgagtccac
cgccgcccttggctgtctggtgaaggactacttccctgagcctgtgaccgtgagctggaactccggagcccttaccagcg
gcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtccagcggcctttactccctgagctccgtggtgaccgtgcctagctccaactt
cggcacccaaacctacacctgtaacgtggaccacaagcctagcaacaccaaggtggacaagaccgtggagcgtaagt
gttgtgtggagtgtcctccttgtcctgcccctcctgtggccggaccttccgtgttccttttccctcctaagcctaaggacaccc
tgatgatcagccgtacccctgaggtgacctgtgtggtggtggacgtgtcccacgaggaccctgaggtgcagttcaactg
gtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgtgaggagcaattcaacagcaccttccgtgtggt
gtccgtgcttaccgtggtgcaccaagactggctgaacggcaaggagtacaagtgtaaggtgagcaacaagggacttcc
tgcccctatcgagaagaccatctccaagaccaagggccaacctcgtgagcctcaagtgtacacccttcctcctagccgtg
aggagatgaccaagaaccaagtgtcccttacctgtctggtgaagggcttctaccctagcgacatcgccgtggagtggga
gtccaacggacaacctgagaacaactacaagaccacccctcctatgcttgacagcgacggctccttcttcctgtacagca
agctgaccgtggacaagtcccgttggcaacaaggcaacgtgttcagctgttccgtgatgcacgaggccctgcacaacca
ctacacccaaaagagcctttccctgagccctggaaag

분비 신호 서열(1-57), 가변 영역(58-411), 불변 영역(412-1389)

도면38

hMAb1-H4형 중쇄의 아미노산 서열(서열번호 62)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMS
WVRQAPGKRLEWVATISQGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARLIYYDYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

분비 신호 서열(1-19), 가변 영역(20-137), 불변 영역(138-463)

도면39

hMAb1-L1형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 63)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatcgtgatgacccagag
ccccctgagcctgcccgtgacactgggcgagcctgccagcatcagctgcagaagcagccagagcctggaaaacagcaa
cggcaacacctacctgaactggtatctgcagaagcccggccagtccccccagctgctgatctaccgggtgtccaaccggt
tcagcggcgtgcccgacagattcagcggcagcggctccggcaccgacttcaccctgaagatcagccgggtggaagccg
aggacgtgggcgtgtactactgtctgcaggtcacacacgtgccctggaccttcggccctggcaccaaggtggacatcaa
gcgtacggtggccgcccctccgtgttcatcttcccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgc
ctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccag
gagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgacta
cgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacagggg
ggagtgt

분비 신호 서열(1-60), 가변 영역(61-402), 불변 영역(403-717)

도면40

hMAb1-L1형 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 64)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSLENSNGNT
YLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCLQVTHVPWTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

분비 신호 서열(1-20), 가변 영역(21-134), 불변 영역(135-239)

도면41

hMAb1-L2형 경쇄를 코딩하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(서열번호 65)

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatcgtgatgacccagag
ccccctgagcctgcccgtgacactgggcgagcctgccagcatcagctgcagaagcagccagagcctggaaaacgagaa
caagaacctgtacctgaactggtatctgcagaagcccggccagtccccccagctgctgatctaccgggtgtccaaccggt
tcagcggcgtgcccgacagattcagcggcagcggctccggcaccgacttcaccctgaagatcagccgggtggaagccg
aggacgtgggcgtgtactactgtctgcaggtcacacacgtgccctggaccttcggccctggcaccaaggtggacatcaa
gcgtacggtggccgcccccctccgtgttcatcttcccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgc
ctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccag
gagagcgtgaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgacta
cgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacagggg
ggagtgt

분비 신호 서열(1-60), 가변 영역(61-402), 불변 영역(403-717)

도면42

hMAb1-L2형 경쇄의 아미노산 서열(서열번호 66)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPLSLPVTLGEPASISCRSSQSLENENKNL
YLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCLQVTHVPWTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

분비 신호 서열(1-20), 가변 영역(21-134), 불변 영역(135-239)

도면43

hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH1의 아미노산 서열(서열번호 67)

TYAMS

도면44

hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH2의 아미노산 서열(서열번호 68)

TISQGGTYTYYPDSVKG

도면45

hMAb1-H2형 또는 hMAb1-H4형 중쇄의 CDRH3의 아미노산 서열(서열번호 69)

LIYYDYLDY

도면46

hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL1의 아미노산 서열(서열번호 70)

RSSQSLENENKNLYLN

도면47

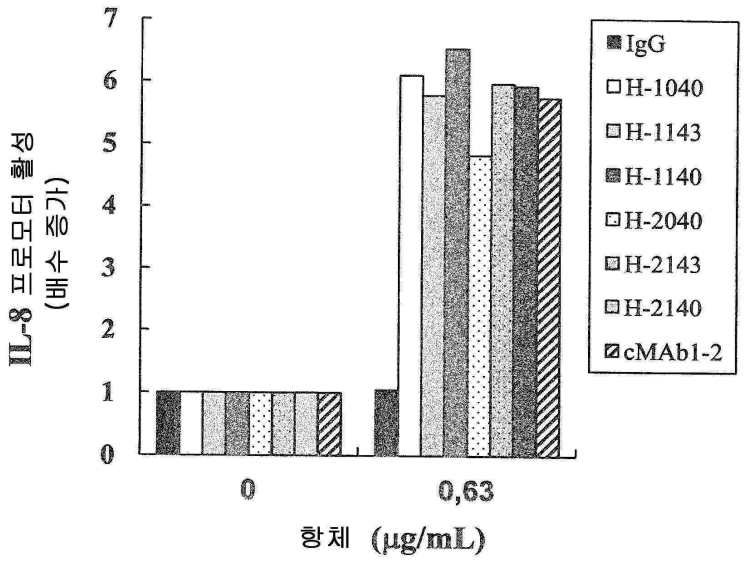
hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL2의 아미노산 서열(서열번호 71)
RVSNRFS

도면48

hMAb1-L2형 경쇄의 CDRL3의 아미노산 서열(서열번호 72)
LQVTHVPWT

도면49

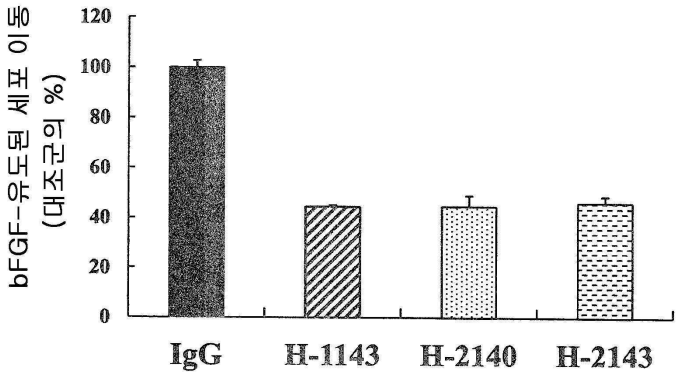
IL-8 프로모터 활성 분석



평균 (n=2)

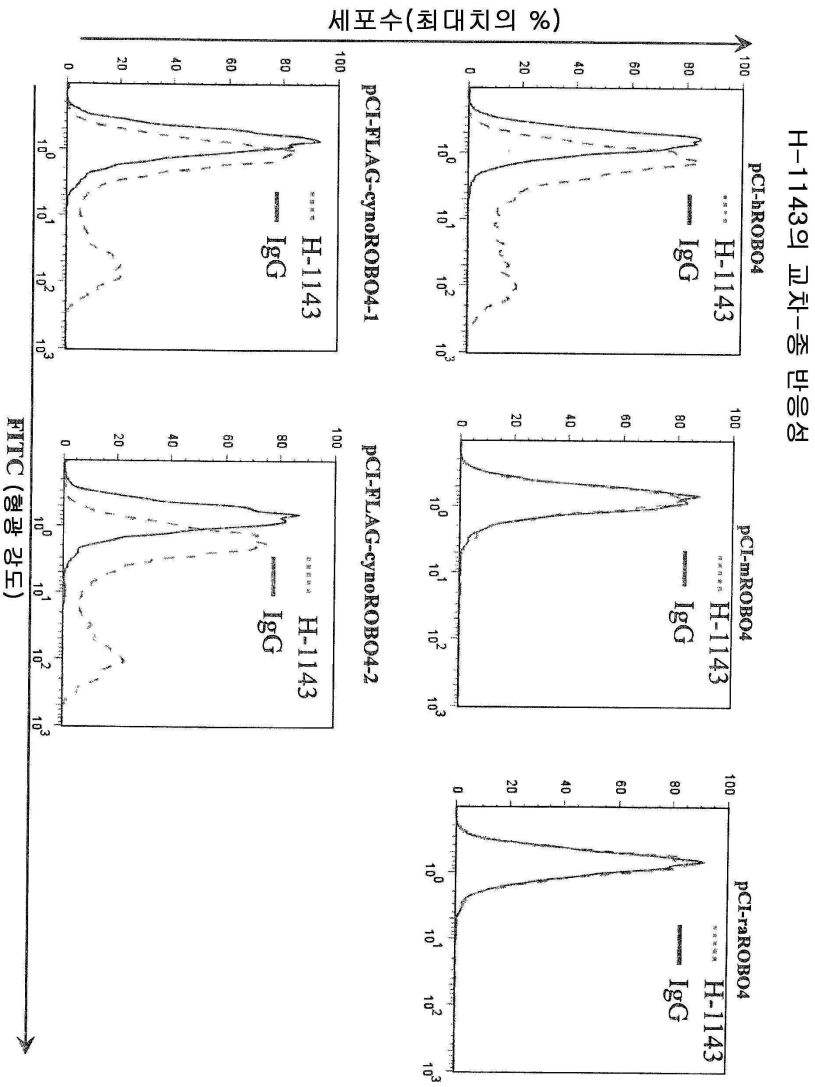
도면50

bFGF-유도된 HUVEC 이동 분석

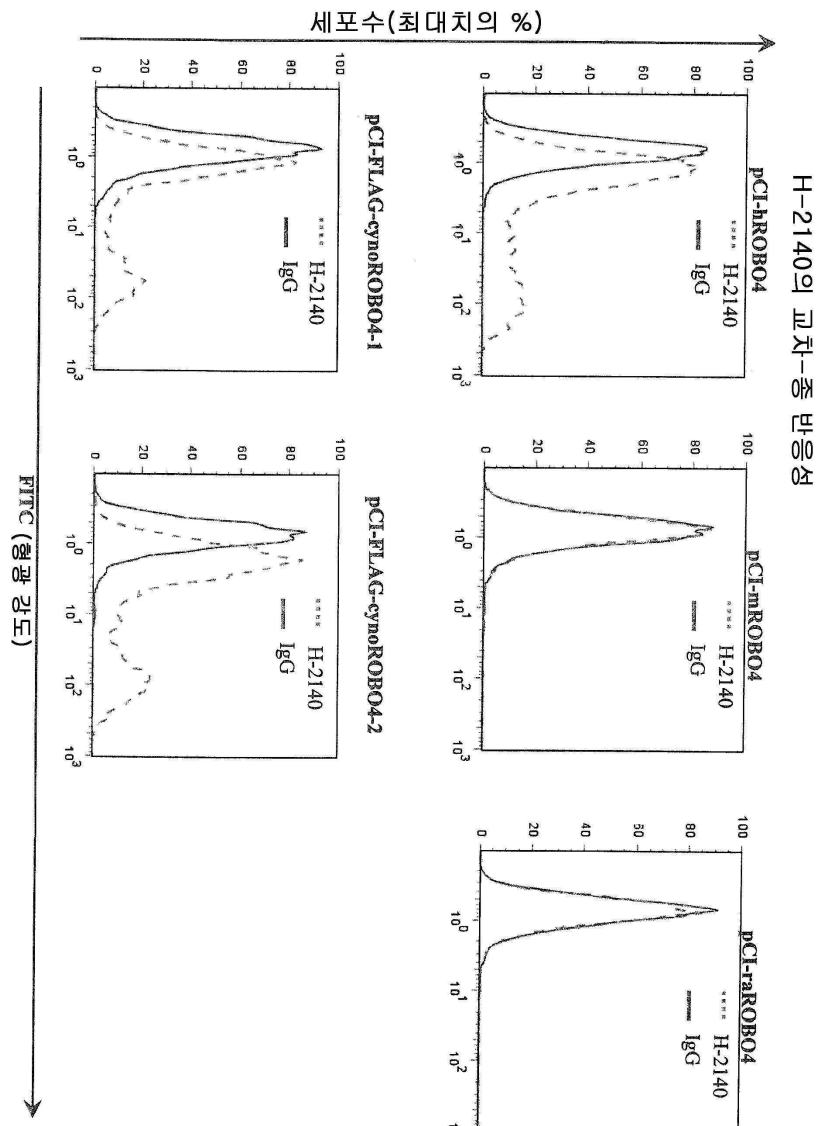


Average ± SE (n=4)

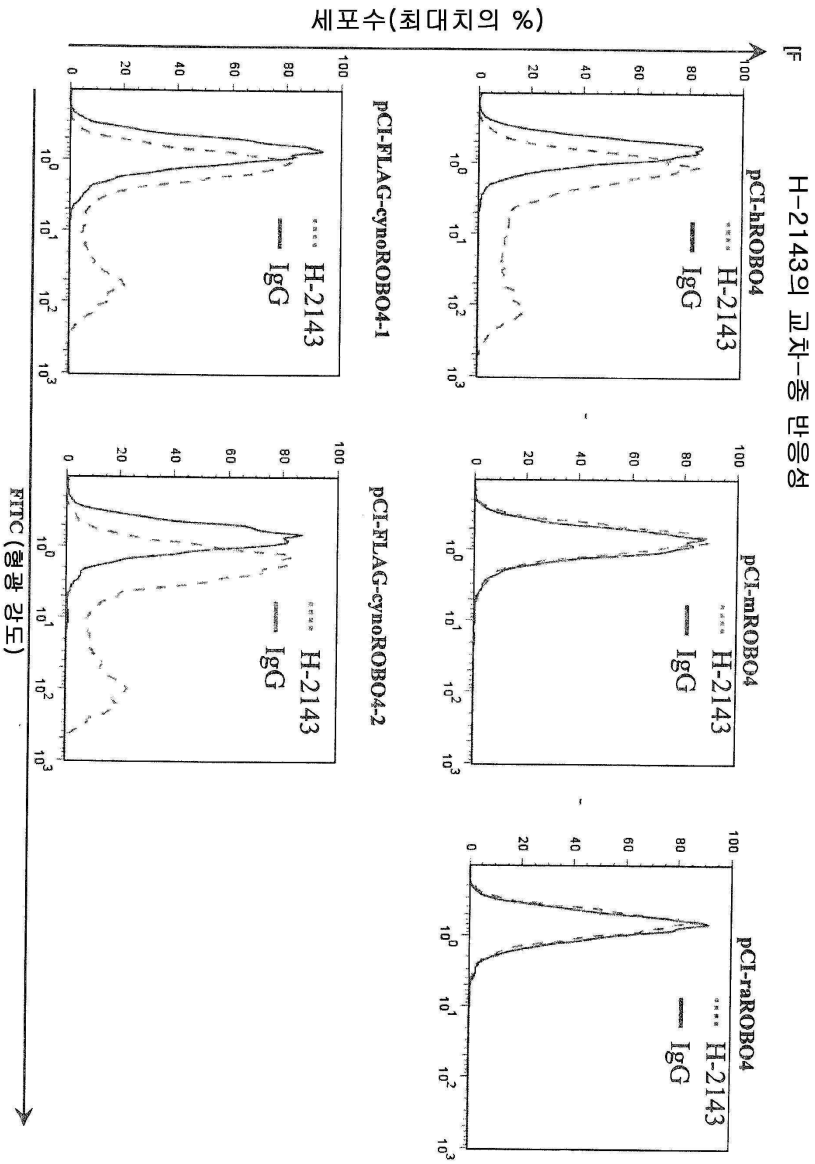
도면51


H-1143의 교차-종 반응성
세포수(최대치의 %)
FITC (형광 강도)
pCI-hROBO4
pCI-mROBO4
pCI-raROBO4
pCI-FLAG-cynoROBO4-1
pCI-FLAG-cynoROBO4-2
H-1143
IgG

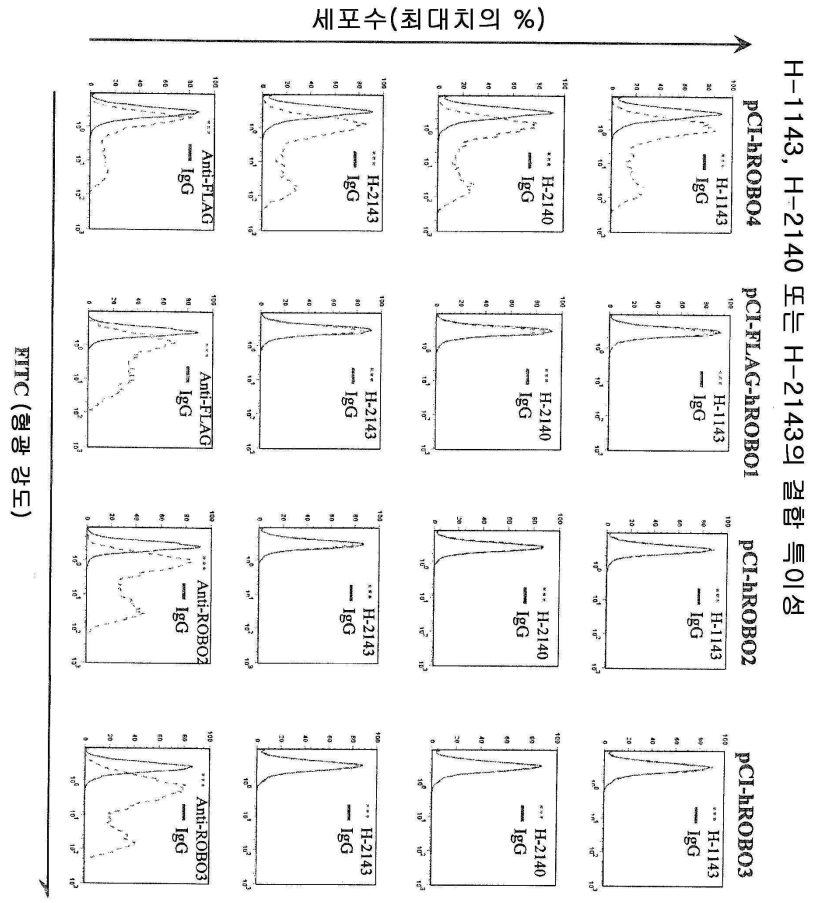
도면52


H-2140의 교차-종 반응성
세포수(최대치의 %)
FITC (형광 강도)
pCI-hROBO4
pCI-mROBO4
pCI-raROBO4
pCI-FLAG-cynoROBO4-1
pCI-FLAG-cynoROBO4-2
H-2140
IgG

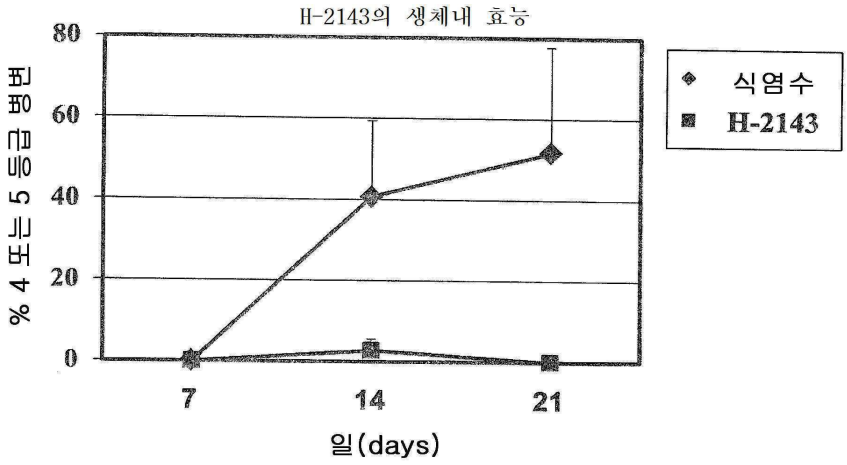
도면53


[F
H-2143의 교차-종 반응성
세포수(최대치의 %)
pCI-hROBO4
pCI-mROBO4
pCI-raROBO4
pCI-FLAG-cynoROBO4-1
pCI-FLAG-cynoROBO4-2
H-2143
IgG
FITC (형광 강도)

도면54



도면55



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Anti-ROBO4 antibody

<130> U1999 PCT S3

<140> PCT/IB2013/053312

<141> 2013-04-26

<150> JP 2012-103929

<151> 2012-04-27

<150> JP 2013-011042

<151> 2013-01-24

<160> 121

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3024

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgggctctg gaggagacag cctcctgggg ggcaggggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tcaggactcc ccgccccaga tcctagtcca cccccaggac 120

cagctgttcc agggccctgg ccctgccagg atgagctgcc aagcctcagg ccagccacct 180

cccaccatcc gctggttgct gaatgggcag cccctgagca tggtgccccc agacccacac 240

cacctcctgc ctgatgggac ccttctgctg ctacagcccc ctgcccgggg acatgcccac 300

gatggccagg ccctgtccac agacctgggt gtctacacat gtgaggccag caaccggctt 360

ggcacggcag tcagcagagg cgctcggctg tctgtggctg tcctccggga ggatttccag 420

atccagcctc gggacatggt ggctgtggtg ggtgagcagt ttactctgga atgtgggccg 480

ccctggggcc acccagagcc cacagtctca tggtggaaag atgggaaacc cctggccctc 540

cagcccggaa ggcacacagt gtccgggggg tccctgctga tggcaagagc agagaagagt 600

gacgaaggga cctacatgtg tgtggccacc aacagcgcag gacataggga gagccgcgca 660

gcccgggttt ccatccagga gccccaggac tacacggagc ctgtggagct tctggctgtg 720

cgaattcagc tggaaaatgt gacactgctg aacccggatc ctgcagaggg ccccaagcct 780

agaccggcgg tgtggctcag ctggaaggtc agtggccctg ctgcgcctgc ccaatcttac 840

acggccttgt tcaggaccca gactgccccg ggaggccagg gagctccgtg ggcagaggag 900

ctgctggccg gctggcagag cgcagagctt ggaggcctcc actggggcca agactacgag 960

ttcaaagtga gaccatcctc tggccgggct cgaggccctg acagcaacgt gctgctcctg 1020

aggctgccgg aaaaagtgcc cagtgcccca cctcaggaag tgactctaaa gcctggcaat 1080

ggcactgtct ttgtgagctg ggtcccacca cctgctgaaa accacaatgg catcatccgt 1140

ggctaccagg tctggagcct gggcaacaca tcactgccac cagccaactg gactgtagtt 1200

ggtgagcaga cccagctgga aatcgccacc catatgccag gctcctactg cgtgcaagtg 1260

gctgcagtca ctggtgctgg agctggggag cccagtagac ctgtctgcct ccttttagag 1320

caggccatgg agcgagccac ccaagaaccc agtgagcatg gtccctggac cctggagcag 1380

ctgagggcta ccttgaagcg gcctgaggtc attgccacct gcggtgttgc actctggctg 1440

ctgcttctgg gcaccgccgt gtgtatccac cgccggcgcc gagctagggt gcacctgggc 1500

ccaggtctgt acagatatac cagtgaggat gccatcctaa aacacaggat ggatcacagt 1560

gactcccagt ggttggcaga cacttggcgt tccacctctg gctctcggga cctgagcagc 1620

agcagcagcc tcagcagtcg gctgggggcg gatgcccggg acccactaga ctgtcgtcgc 1680

tccttgctct cctgggactc ccgaagcccc ggcgtgcccc tgcttccaga caccagcact 1740

ttttatggct ccctcatcgc tgagctgccc tccagtaccc cagccaggcc aagtccccag 1800

gtcccagctg tcaggcgcct cccaccccag ctggcccagc tctccagccc ctgttccagc 1860

tcagacagcc tctgcagccg caggggactc tcttctcccc gcttgtctct ggcccctgca 1920

gaggcttgga aggccaaaaa gaagcaggag ctgcagcatg ccaacagttc cccactgctc 1980

cggggcagcc actccttgga gctccgggcc tgtgagttag gaaatagagg ttccaagaac 2040

ctttcccaaa gcccaggagc tgtgccccaa gctctggttg cctggcgggc cctgggaccg 2100

aaactcctca gctcctcaaa tgagctggtt actcgtcatc tccctccagc acccctcttt 2160

cctcatgaaa ctcccccaac tcagagtcaa cagacccagc ctccggtggc accacaggct 2220

ccctcctcca tcctgctgcc agcagccccc atccccatcc ttagcccctg cagtccccct 2280

agcccccagg cctcttccct ctctggcccc agcccagctt ccagtcgcct gtccagctcc 2340

tcactgtcat ccctggggga ggatcaagac agcgtgctga cccctgagga ggtagccctg 2400

tgcttggaac tcagtgaggg tgaggagact cccaggaaca gcgtctctcc catgccaagg 2460

gctccttcac cccccaccac ctatgggtac atcagcgtcc caacagcctc agagttcacg 2520

gacatgggca ggactggagg aggggtgggg cccaaggggg gagtcttgct gtgcccacct 2580

cggccctgcc tcacccccac ccccagcgag ggctccttag ccaatggttg gggctcagcc 2640

tctgaggaca atgccgccag cgccagagcc agccttgtca gctcctccga tggctccttc 2700

ctcgctgatg ctcactttgc ccgggccctg gcagtggctg tggatagctt tggtttcggt 2760

ctagagccca gggaggcaga ctgcgtcttc atagatgcct catcacctcc ctccccacgg 2820

gatgagatct tcctgacccc caacctctcc ctgcccctgt gggagtggag gccagactgg 2880

ttggaagaca tggaggtcag ccacacccag cggctgggaa gggggatgcc tccctggccc 2940

cctgactctc agatctcttc ccagagaagt cagctccact gtcgtatgcc caaggctggt 3000

gcttctcctg tagattactc ctga 3024

<210> 2

<211> 1007

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu Phe Gln Gly Pro Gly Pro

35 40 45

Ala Arg Met Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gln Pro Pro Pro Thr Ile Arg

50 55 60

Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu Ser Met Val Pro Pro Asp Pro His

65 70 75 80

His Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg

85 90 95

Gly His Ala His Asp Gly Gln Ala Leu Ser Thr Asp Leu Gly Val Tyr

100 105 110

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

115 120 125

Arg Leu Ser Val Ala Val Leu Arg Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Trp Gly His Pro Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys

165 170 175

Pro Leu Ala Leu Gln Pro Gly Arg His Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu

180 185 190

Leu Met Ala Arg Ala Glu Lys Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Met Cys Val

195 200 205

Ala Thr Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser

210 215 220

Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val

225 230 235 240

Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Glu

245 250 255

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

260 265 270

Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr

275 280 285

Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro Trp Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gly

290 295 300

Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu

305 310 315 320

Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn

325 330 335

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

340 345 350

Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val

355 360 365

Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr His Met Pro Gly Ser Tyr

405 410 415

Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser

420 425 430

Arg Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Gln

435 440 445

Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr

450 455 460

Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala Leu Trp Leu

465 470 475 480

Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Arg

485 490 495

Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Glu Asp Ala Ile

500 505 510

Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr

515 520 525

Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu

530 535 540

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

545 550 555 560

Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser Asp Ser Leu

610 615 620

Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg Leu Ser Leu Ala Pro Ala

625 630 635 640

Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Ala Asn Ser

645 650 655

Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu Glu Leu Arg Ala Cys Glu

660 665 670

Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val

675 680 685

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

690 695 700

Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg His Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe

705 710 715 720

Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val

725 730 735

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala Pro Ile Pro

740 745 750

Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser

755 760 765

Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu

850 855 860

Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala

865 870 875 880

Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser

885 890 895

Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val

900 905 910

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

915 920 925

Val Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Glu Ile Phe
930 935 940

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

945 950 955 960

Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Met
965 970 975

Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu
980 985 990

His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser
995 1000 1005

<210> 3

<211> 3045

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-28

<400> 3

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataagcagga ctccccgccc 120

cagatcctag tccaccccca ggaccagctg ttccagggcc ctggccctgc caggatgagc 180

tgccaagcct caggccagcc acctcccacc atccgctggt tgctgaatgg gcagcccctg 240

agcatggtgc ccccagaccc acaccacctc ctgcctgatg ggacccttct gctgctacag 300

ccccctgccc ggggacatgc ccacgatggc caggccctgt ccacagacct gggtgtctac 360

acatgtgagg ccagcaaccg gcttggcacg gcagtcagca gaggcgctcg gctgtctgtg 420

gctgtcctcc gggaggattt ccagatccag cctcgggaca tggtggctgt ggtgggtgag 480

cagtttactc tggaatgtgg gccgccctgg ggccacccag agcccacagt ctcatggtgg 540

aaagatggga aacccctggc cctccagccc ggaaggcaca cagtgtccgg ggggtccctg 600

ctgatggcaa gagcagagaa gagtgacgaa gggacctaca tgtgtgtggc caccaacagc 660

gcaggacata gggagagccg cgcagcccgg gtttccatcc aggagcccca ggactacacg 720

gagcctgtgg agcttctggc tgtgcgaatt cagctggaaa atgtgacact gctgaacccg 780

gatcctgcag agggccccaa gcctagaccg gcggtgtggc tcagctggaa ggtcagtggc 840

cctgctgcgc ctgcccaatc ttacacggcc ttgttcagga cccagactgc cccgggaggc 900

caaggagctc cgtgggcaga ggagctgctg gccggctggc agagcgcaga gcttggaggc 960

ctccactggg gccaagacta cgagttcaaa gtgagaccat cctctggccg ggctcgaggc 1020

cctgacagca acgtgctgct cctgaggctg ccggaaaaag tgcccagtgc cccacctcag 1080

gaagtgactc taaagcctgg caatggcact gtctttgtga gctgggtccc accacctgct 1140

gaaaaccaca atggcatcat ccgtggctac caggtctgga gcctgggcaa cacatcactg 1200

ccaccagcca actggactgt agttggtgag cagacccagc tggaaatcgc cacccatatg 1260

ccaggctcct actgcgtgca agtggctgca gtcactggtg ctggagctgg ggagcccagt 1320

agacctgtct gcctcctttt agagcaggcc atggagcgag ccacccaaga acccagtgag 1380

catggtccct ggaccctgga gcagctgagg gctaccttga agcggcctga ggtcattgcc 1440

acctgcggtg ttgcactctg gctgctgctt ctgggcaccg ccgtgtgtat ccaccgccgg 1500

cgccgagcta gggtgcacct gggcccaggt ctgtacagat ataccagtga ggatgccatc 1560

ctaaaacaca ggatggatca cagtgactcc cagtggttgg cagacacttg gcgttccacc 1620

tctggctctc gggacctgag cagcagcagc agcctcagca gtcggctggg ggcggatgcc 1680

cgggacccac tagactgtcg tcgctccttg ctctcctggg actcccgaag ccccggcgtg 1740

cccctgcttc cagacaccag cacttttat ggctccctca tcgctgagct gccctccagt 1800

accccagcca ggccaagtcc ccaggtccca gctgtcaggc gcctcccacc ccagctggcc 1860

cagctctcca gcccctgttc cagctcagac agcctctgca gccgcagggg actctcttct 1920

ccccgcttgt ctctggcccc tgcagaggct tggaaggcca aaaagaagca ggagctgcag 1980

catgccaaca gttccccact gctccggggc agccactcct tggagctccg ggcctgtgag 2040

ttaggaaata gaggttccaa gaacctttcc caaagcccag gagctgtgcc ccaagctctg 2100

gttgcctggc gggccctggg accgaaactc ctcagctcct caaatgagct ggttactcgt 2160

catctccctc cagcacccct ctttcctcat gaaactcccc caactcagag tcaacagacc 2220

cagcctccgg tggcaccaca ggctccctcc tccatcctgc tgccagcagc ccccatcccc 2280

atccttagcc cctgcagtcc ccctagcccc caggcctctt ccctctctgg ccccagccca 2340

gcttccagtc gcctgtccag ctcctcactg tcatccctgg gggaggatca agacagcgtg 2400

ctgacccctg aggaggtagc cctgtgcttg gaactcagtg agggtgagga gactcccagg 2460

aacagcgtct ctcccatgcc aagggctcct tcacccccca ccacctatgg gtacatcagc 2520

gtcccaacag cctcagagtt cacggacatg ggcaggactg gaggaggggt ggggcccaag 2580

gggggagtct tgctgtgccc acctcggccc tgcctcaccc ccacccccag cgagggctcc 2640

ttagccaatg gttggggctc agcctctgag gacaatgccg ccagcgccag agccagcctt 2700

gtcagctcct ccgatggctc cttcctcgct gatgctcact ttgcccgggc cctggcagtg 2760

gctgtggata gctttggttt cggtctagag cccagggagg cagactgcgt cttcatagat 2820

gcctcatcac ctccctcccc acgggatgag atcttcctga cccccaacct ctccctgccc 2880

ctgtgggagt ggaggccaga ctggttggaa gacatggagg tcagccacac ccagcggctg 2940

ggaaggggga tgcctccctg gccccctgac tctcagatct cttcccagag aagtcagctc 3000

cactgtcgta tgcccaaggc tggtgcttct cctgtagatt actcc 3045

<210> 4

<211> 1015

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-28aa

<400> 4

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Gln Asp Ser Pro Pro Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp
35 40 45

Gln Leu Phe Gln Gly Pro Gly Pro Ala Arg Met Ser Cys Gln Ala Ser
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu
65 70 75 80

Ser Met Val Pro Pro Asp Pro His His Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu
85 90 95

Leu Leu Leu Gln Pro Pro Ala Arg Gly His Ala His Asp Gly Gln Ala
100 105 110

Leu Ser Thr Asp Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser Asn Arg Leu
115 120 125

Gly Thr Ala Val Ser Arg Gly Ala Arg Leu Ser Val Ala Val Leu Arg
130 135 140

Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Met Val Ala Val Val Gly Glu
145 150 155 160

Gln Phe Thr Leu Glu Cys Gly Pro Pro Trp Gly His Pro Glu Pro Thr
165 170 175
Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Ala Leu Gln Pro Gly Arg
180 185 190
His Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Leu Met Ala Arg Ala Glu Lys Ser
195 200 205
Asp Glu Gly Thr Tyr Met Cys Val Ala Thr Asn Ser Ala Gly His Arg
210 215 220

Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr
225 230 235 240
Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr
245 250 255
Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Glu Gly Pro Lys Pro Arg Pro Ala Val
260 265 270
Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr
275 280 285

Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro
290 295 300
Trp Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gly Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly
305 310 315 320
Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly
325 330 335
Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu
340 345 350

Lys Val Pro Ser Ala Pro Pro Gln Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn
355 360 365
Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn
370 375 380
Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val Trp Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu
385 390 395 400
Pro Pro Ala Asn Trp Thr Val Val Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile

405 410 415

Ala Thr His Met Pro Gly Ser Tyr Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr
420 425 430
Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser Arg Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu
435 440 445
Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Gln Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp
450 455 460
Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala
465 470 475 480

Thr Cys Gly Val Ala Leu Trp Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys
485 490 495
Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Arg Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr
500 505 510
Arg Tyr Thr Ser Glu Asp Ala Ile Leu Lys His Arg Met Asp His Ser
515 520 525
Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg
530 535 540

Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Asp Ala
545 550 555 560
Arg Asp Pro Leu Asp Cys Arg Arg Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg
565 570 575
Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro Asp Thr Ser Thr Phe Tyr Gly Ser
580 585 590
Leu Ile Ala Glu Leu Pro Ser Ser Thr Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln
595 600 605

Val Pro Ala Val Arg Arg Leu Pro Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser
610 615 620
Pro Cys Ser Ser Ser Asp Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser
625 630 635 640
Pro Arg Leu Ser Leu Ala Pro Ala Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys
645 650 655

Gln Glu Leu Gln His Ala Asn Ser Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His
660 665 670

Ser Leu Glu Leu Arg Ala Cys Glu Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn
675 680 685

Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala Leu Val Ala Trp Arg
690 695 700

Ala Leu Gly Pro Lys Leu Leu Ser Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg
705 710 715 720

His Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln
725 730 735

Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile
740 745 750

Leu Leu Pro Ala Ala Pro Ile Pro Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro
755 760 765

Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg
770 775 780

Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Leu Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val
785 790 795 800

Leu Thr Pro Glu Glu Val Ala Leu Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu
805 810 815

Glu Thr Pro Arg Asn Ser Val Ser Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro
820 825 830

Pro Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Val Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr
835 840 845

Asp Met Gly Arg Thr Gly Gly Gly Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu
850 855 860

Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser
865 870 875 880

Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala
885 890 895

Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala

900 905 910

His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Gly

915 920 925

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

930 935 940

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

945 950 955 960

Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His

965 970 975

Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Met Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln

980 985 990

Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly

995 1000 1005

Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser

1010 1015

<210> 5

<211> 2997

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-46 na

<400> 5

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataagcctgg ccctgccagg 120

atgagctgcc aagcctcagg ccagccacct cccaccatcc gctggttgct gaatgggcag 180

cccctgagca tggtgccccc agacccacac cacctcctgc ctgatgggac ccttctgctg 240

ctacagcccc ctgcccgggg acatgcccac gatggccagg ccctgtccac agacctgggt 300

gtctacacat gtgaggccag caaccggctt ggcacggcag tcagcagagg cgctcggctg 360

tctgtggctg tcctccggga ggatttccag atccagcctc gggacatggt ggctgtggtg 420

ggtgagcagt ttactctgga atgtgggccg ccctggggcc acccagagcc cacagtctca 480

tggtggaaag atgggaaacc cctggccctc cagcccggaa ggcacacagt gtccgggggg 540

tccctgctga tggcaagagc agagaagagt gacgaaggga cctacatgtg tgtggccacc 600

aacagcgcag gacataggga gagccgcgca gcccgggttt ccatccagga gccccaggac 660

tacacggagc ctgtggagct tctggctgtg cgaattcagc tggaaaatgt gacactgctg 720

aacccggatc ctgcagaggg ccccaagcct agaccggcgg tgtggctcag ctggaaggtc 780

agtggccctg ctgcgcctgc ccaatcttac acggccttgt tcaggaccca gactgccccg 840

ggaggccagg gagctccgtg ggcagaggag ctgctggccg gctggcagag cgcagagctt 900

ggaggcctcc actggggcca agactacgag ttcaaagtga gaccatcctc tggccgggct 960

cgaggccctg acagcaacgt gctgctcctg aggctgccgg aaaaagtgcc cagtgcccca 1020

cctcaggaag tgactctaaa gcctggcaat ggcactgtct ttgtgagctg ggtcccacca 1080

cctgctgaaa accacaatgg catcatccgt ggctaccagg tctggagcct gggcaacaca 1140

tcactgccac cagccaactg gactgtagtt ggtgagcaga cccagctgga aatcgccacc 1200

catatgccag gctcctactg cgtgcaagtg gctgcagtca ctggtgctgg agctggggag 1260

cccagtagac ctgtctgcct ccttttagag caggccatgg agcgagccac ccaagaaccc 1320

agtgagcatg gtccctggac cctggagcag ctgagggcta ccttgaagcg gcctgaggtc 1380

attgccacct gcggtgttgc actctggctg ctgcttctgg gcaccgccgt gtgtatccac 1440

cgccggcgcc gagctagggt gcacctgggc ccaggtctgt acagatatac cagtgaggat 1500

gccatcctaa aacacaggat ggatcacagt gactcccagt ggttggcaga cacttggcgt 1560

tccacctctg gctctcggga cctgagcagc agcagcagcc tcagcagtcg gctgggggcg 1620

gatgcccggg acccactaga ctgtcgtcgc tccttgctct cctgggactc ccgaagcccc 1680

ggcgtgcccc tgcttccaga caccagcact ttttatggct ccctcatcgc tgagctgccc 1740

tccagtaccc cagccaggcc aagtccccag gtcccagctg tcaggcgcct cccaccccag 1800

ctggcccagc tctccagccc ctgttccagc tcagacagcc tctgcagccg caggggactc 1860

tcttctcccc gcttgtctct ggcccctgca gaggcttgga aggccaaaaa gaagcaggag 1920

ctgcagcatg ccaacagttc cccactgctc cggggcagcc actccttgga gctccgggcc 1980

tgtgagttag gaaatagagg ttccaagaac ctttcccaaa gcccaggagc tgtgccccaa 2040

gctctggttg cctggcgggc cctgggaccg aaactcctca gctcctcaaa tgagctggtt 2100

actcgtcatc tccctccagc acccctcttt cctcatgaaa ctcccccaac tcagagtcaa 2160

cagacccagc ctccggtggc accacaggct ccctcctcca tcctgctgcc agcagccccc 2220

atccccatcc ttagcccctg cagtcccccc agcccccagg cctcttccct ctctggcccc 2280

agcccagctt ccagtcgcct gtccagctcc tcactgtcat ccctgggggа ggatcaagac 2340

agcgtgctga cccctgagga ggtagccctg tgcttggaac tcagtgaggg tgaggagact 2400

cccaggaaca gcgtctctcc catgccaagg gctccttcac cccccaccac ctatgggtac 2460

atcagcgtcc caacagcctc agagttcacg gacatgggca ggactggagg aggggtgggg 2520

cccaaggggg gagtcttgct gtgcccacct cggccctgcc tcacccccac ccccagcgag 2580

ggctccttag ccaatggttg gggctcagcc tctgaggaca atgccgccag cgccagagcc 2640

agccttgtca gctcctccga tggctccttc ctcgctgatg ctcactttgc ccgggccctg 2700

gcagtggctg tggatagctt tggtttcggt ctagagccca gggaggcaga ctgcgtcttc 2760

atagatgcct catcacctcc ctccccacgg gatgagatct tcctgacccc caacctctcc 2820

ctgcccctgt gggagtggag gccagactgg ttggaagaca tggaggtcag ccacacccag 2880

cggctgggaa gggggatgcc tccctggccc cctgactctc agatctcttc ccagagaagt 2940

cagctccact gtcgtatgcc caaggctggt gcttctcctg tagattactc cgctagc 2997

<210> 6

<211> 999

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-46aa

<400> 6

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp

20 25 30

Asp Asp Lys Pro Gly Pro Ala Arg Met Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Leu Leu Asn Gly Gln Pro Leu Ser Met

50 55 60

Val Pro Pro Asp Pro His His Leu Leu Pro Asp Gly Thr Leu Leu Leu

65 70 75 80

Leu Gln Pro Pro Ala Arg Gly His Ala His Asp Gly Gln Ala Leu Ser

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Met Val Ala Val Val Gly Glu Gln Phe

130 135 140

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

195 200 205

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

260 265 270

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

325 330 335

Pro Ser Ala Pro Pro Gln Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr
340 345 350
Val Phe Val Ser Trp Val Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile
355 360 365
Ile Arg Gly Tyr Gln Val Trp Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Pro Pro

370 375 380

Ala Asn Trp Thr Val Val Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr

385 390 395 400

His Met Pro Gly Ser Tyr Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala

405 410 415

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

420 425 430

Met Glu Arg Ala Thr Gln Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu

435 440 445

Glu Gln Leu Arg Ala Thr Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys

450 455 460

Gly Val Ala Leu Trp Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His

465 470 475 480

Arg Arg Arg Arg Ala Arg Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr

485 490 495

Thr Ser Glu Asp Ala Ile Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser

500 505 510

Gln Trp Leu Ala Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu

515 520 525

Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Asp Ala Arg Asp

530 535 540

Pro Leu Asp Cys Arg Arg Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro

545 550 555 560

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

565 570 575

Ala Glu Leu Pro Ser Ser Thr Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro

580 585 590

Ala Val Arg Arg Leu Pro Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser Pro Cys

595 600 605

Ser Ser Ser Asp Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg

610 615 620

Leu Ser Leu Ala Pro Ala Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu
625 630 635 640
Leu Gln His Ala Asn Ser Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu

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

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

770 775 780
Pro Glu Glu Val Ala Leu Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Thr
785 790 795 800
Pro Arg Asn Ser Val Ser Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Thr
805 810 815
Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Val Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr Asp Met
820 825 830
Gly Arg Thr Gly Gly Gly Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys

835 840 845
Pro Pro Arg Pro Cys Leu Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala
850 855 860
Asn Gly Trp Gly Ser Ala Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala

865 870 875 880

Ser Leu Val Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe

885 890 895

Ala Arg Ala Leu Ala Val Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Gly Leu Glu

900 905 910

Pro Arg Glu Ala Asp Cys Val Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser

915 920 925

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

930 935 940

Glu Trp Arg Pro Asp Trp Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln

945 950 955 960

Arg Leu Gly Arg Gly Met Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser

965 970 975

Ser Gln Arg Ser Gln Leu His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser

980 985 990

Pro Val Asp Tyr Ser Ala Ser

995

<210> 7

<211> 2733

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-132na

<400> 7

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataaggtggc tgtcctccgg 120

gaggatttcc agatccagcc tcgggacatg gtggctgtgg tgggtgagca gtttactctg 180

gaatgtgggc cgccctgggg ccacccagag cccacagtct catggtggaa agatgggaaa 240

cccctggccc tccagcccgg aaggcacaca gtgtccgggg ggtccctgct gatggcaaga 300

gcagagaaga gtgacgaagg gacctacatg tgtgtggcca ccaacagcgc aggacatagg 360

gagagccgcg cagcccgggt ttccatccag gagccccagg actacacgga gcctgtggag 420

cttctggctg tgcgaattca gctggaaaat gtgacactgc tgaacccgga tcctgcagag 480

ggccccaagc ctagaccggc ggtgtggctc agctggaagg tcagtggccc tgctgcgcct 540

gcccaatctt acacggcctt gttcaggacc cagactgccc cgggaggcca gggagctccg 600
tgggcagagg agctgctggc cggctggcag agcgcagagc ttggaggcct ccactggggc 660
caagactacg agttcaaagt gagaccatcc tctggccggg ctcgaggccc tgacagcaac 720
gtgctgctcc tgaggctgcc ggaaaaagtg cccagtgccc cacctcagga agtgactcta 780
aagcctggca atggcactgt ctttgtgagc tgggtcccac cacctgctga aaaccacaat 840
ggcatcatcc gtggctacca ggtctggagc ctgggcaaca catcactgcc accagccaac 900
tggactgtag ttggtgagca gacccagctg gaaatcgcca cccatatgcc aggctcctac 960

tgcgtgcaag tggctgcagt cactggtgct ggagctgggg agcccagtag acctgtctgc 1020
ctccttttag agcaggccat ggagcgagcc acccaagaac ccagtgagca tggtccctgg 1080
accctggagc agctgagggc taccttgaag cggcctgagg tcattgccac ctgcggtgtt 1140
gcactctggc tgctgcttct gggcaccgcc gtgtgtatcc accgccggcg ccgagctagg 1200
gtgcacctgg gcccaggtct gtacagatat accagtgagg atgccatcct aaaacacagg 1260
atggatcaca gtgactccca gtggttggca gacacttggc gttccacctc tggctctcgg 1320
gacctgagca gcagcagcag cctcagcagt cggctggggg cggatgcccg ggacccacta 1380

gactgtcgtc gctccttgct ctcctgggac tcccgaagcc ccggcgtgcc cctgcttcca 1440
gacaccagca ctttttatgg ctccctcatc gctgagctgc cctccagtac cccagccagg 1500
ccaagtcccc aggtcccagc tgtcaggcgc ctcccacccc agctggccca gctctccagc 1560
ccctgttcca gctcagacag cctctgcagc cgcaggggac tctcttctcc ccgcttgtct 1620
ctggcccctg cagaggcttg gaaggccaaa aagaagcagg agctgcagca tgccaacagt 1680
tccccactgc tccggggcag ccactccttg gagctccggg cctgtgagtt aggaaataga 1740
ggttccaaga acctttccca aagcccagga gctgtgcccc aagctctggt tgcctggcgg 1800

gccctgggac cgaaactcct cagctcctca aatgagctgg ttactcgtca tctccctcca 1860
gcacccctct ttcctcatga aactccccca actcagagtc aacagaccca gcctccggtg 1920
gcaccacagg ctccctcctc catcctgctg ccagcagccc ccatccccat ccttagcccc 1980
tgcagtcccc ctagccccca ggcctcttcc ctctctggcc ccagcccagc ttccagtcgc 2040
ctgtccagct cctcactgtc atccctgggg gaggatcaag acagcgtgct gacccctgag 2100
gaggtagccc tgtgcttgga actcagtgag ggtgaggaga ctcccaggaa cagcgtctct 2160
cccatgccaa gggctccttc acccccccacc acctatgggt acatcagcgt cccaacagcc 2220

tcagagttca cggacatggg caggactgga ggaggggtgg ggcccaaggg gggagtcttg 2280

ctgtgcccac ctcggccctg cctcaccccc acccccagcg agggctcctt agccaatggt 2340

tggggctcag cctctgagga caatgccgcc agcgccagag ccagccttgt cagctcctcc 2400

gatggctcct tcctcgctga tgctcacttt gcccgggccc tggcagtggc tgtggatagc 2460

tttggtttcg gtctagagcc cagggaggca gactgcgtct tcatagatgc ctcatcacct 2520

ccctccccac gggatgagat cttcctgacc cccaacctct ccctgcccct gtgggagtgg 2580

aggccagact ggttggaaga catggaggtc agccacaccc agcggctggg aaggggggatg 2640

cctccctggc cccctgactc tcagatctct tcccagagaa gtcagctcca ctgtcgtatg 2700

cccaaggctg gtgcttctcc tgtagattac tcc 2733

<210> 8

<211> 911

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-132aa

<400> 8

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Val Ala Val Leu Arg Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg
35 40 45

Asp Met Val Ala Val Val Gly Glu Gln Phe Thr Leu Glu Cys Gly Pro
50 55 60

Pro Trp Gly His Pro Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys
65 70 75 80

Pro Leu Ala Leu Gln Pro Gly Arg His Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu
85 90 95

Leu Met Ala Arg Ala Glu Lys Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Met Cys Val
100 105 110

Ala Thr Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser
115 120 125

Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val

130 135 140

Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Glu
145 150 155 160

Gly Pro Lys Pro Arg Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly
165 170 175

Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr
180 185 190

Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro Trp Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gly
195 200 205

Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu
210 215 220

Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn
225 230 235 240

Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu Lys Val Pro Ser Ala Pro Pro Gln
245 250 255

Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val
260 265 270

Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val
275 280 285

Trp Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Pro Pro Ala Asn Trp Thr Val Val
290 295 300

Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr His Met Pro Gly Ser Tyr
305 310 315 320

Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser
325 330 335

Arg Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Gln
340 345 350

Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr
355 360 365

Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala Leu Trp Leu
370 375 380

Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Arg
385 390 395 400
Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Glu Asp Ala Ile
405 410 415

Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr
420 425 430
Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu
435 440 445
Ser Ser Arg Leu Gly Ala Asp Ala Arg Asp Pro Leu Asp Cys Arg Arg
450 455 460
Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro
465 470 475 480

Asp Thr Ser Thr Phe Tyr Gly Ser Leu Ile Ala Glu Leu Pro Ser Ser
485 490 495
Thr Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro Ala Val Arg Arg Leu Pro
500 505 510
Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser Asp Ser Leu
515 520 525
Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg Leu Ser Leu Ala Pro Ala
530 535 540

Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Ala Asn Ser
545 550 555 560
Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu Glu Leu Arg Ala Cys Glu
565 570 575
Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val
580 585 590
Pro Gln Ala Leu Val Ala Trp Arg Ala Leu Gly Pro Lys Leu Leu Ser
595 600 605

Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg His Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe
610 615 620
Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val

625 630 635 640

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala Pro Ile Pro

645 650 655

Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser

660 665 670

Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu

755 760 765

Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala

770 775 780

Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser

785 790 795 800

Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val

805 810 815

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

820 825 830

Val Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Glu Ile Phe

835 840 845

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

850 855 860

Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Met

865 870 875 880

Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu
885 890 895

His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser
900 905 910

<210> 9

<211> 2505

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-210na

<400> 9

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataagaccaa cagcgcagga 120

catagggaga gccgcgcagc ccgggtttcc atccaggagc cccaggacta cacggagcct 180

gtggagcttc tggctgtgcg aattcagctg gaaaatgtga cactgctgaa cccggatcct 240

gcagagggcc ccaagcctag accggcggtg tggctcagct ggaaggtcag tggccctgct 300

gcgcctgccc aatcttacac ggccttgttc aggacccaga ctgccccggg aggccaggga 360

gctccgtggg cagaggagct gctggccggc tggcagagcg cagagcttgg aggcctccac 420

tggggccaag actacgagtt caaagtgaga ccatcctctg gccgggctcg aggccctgac 480

agcaacgtgc tgctcctgag gctgccggaa aaagtgccca gtgccccacc tcaggaagtg 540

actctaaagc ctggcaatgg cactgtcttt gtgagctggg tcccaccacc tgctgaaaac 600

cacaatggca tcatccgtgg ctaccaggtc tggagcctgg gcaacacatc actgccacca 660

gccaactgga ctgtagttgg tgagcagacc cagctggaaa tcgccaccca tatgccaggc 720

tcctactgcg tgcaagtggc tgcagtcact ggtgctggag ctggggagcc cagtagacct 780

gtctgcctcc ttttagagca ggccatggag cgagccaccc aagaacccag tgagcatggt 840

ccctggaccc tggagcagct gagggctacc ttgaagcggc ctgaggtcat tgccacctgc 900

ggtgttgcac tctggctgct gcttctgggc accgccgtgt gtatccaccg ccggcgccga 960

gctagggtgc acctgggccc aggtctgtac agatatacca gtgaggatgc catcctaaaa 1020

cacaggatgg atcacagtga ctcccagtgg ttggcagaca cttggcgttc cacctctggc 1080

tctcgggacc tgagcagcag cagcagcctc agcagtcggc tgggggcgga tgcccgggac 1140

ccactagact gtcgtcgctc cttgctctcc tgggactccc gaagccccgg cgtgcccctg 1200

cttccagaca ccagcacttt ttatggctcc ctcatcgctg agctgccctc cagtacccca 1260

gccaggccaa gtccccaggt cccagctgtc aggcgcctcc caccccagct ggcccagctc 1320

tccagcccct gttccagctc agacagcctc tgcagccgca ggggactctc ttctccccgc 1380

ttgtctctgg cccctgcaga ggcttggaag gccaaaaaga agcaggagct gcagcatgcc 1440

aacagttccc cactgctccg gggcagccac tccttggagc tccgggcctg tgagttagga 1500

aatagaggtt ccaagaacct ttcccaaagc ccaggagctg tgccccaagc tctggttgcc 1560

tggcgggccc tgggaccgaa actcctcagc tcctcaaatg agctggttac tcgtcatctc 1620

cctccagcac ccctctttcc tcatgaaact cccccaactc agagtcaaca gacccagcct 1680

ccggtggcac cacaggctcc ctcctccatc ctgctgccag cagcccccat ccccatcctt 1740

agcccctgca gtccccctag cccccaggcc tcttccctct ctggccccag cccagcttcc 1800

agtcgcctgt ccagctcctc actgtcatcc ctgggggagg atcaagacag cgtgctgacc 1860

cctgaggagg tagccctgtg cttggaactc agtgagggtg aggagactcc caggaacagc 1920

gtctctccca tgccaagggc tccttcaccc cccaccacct atgggtacat cagcgtccca 1980

acagcctcag agttcacgga catgggcagg actggaggag gggtggggcc caaggggga 2040

gtcttgctgt gcccacctcg gccctgcctc acccccaccc ccagcgaggg ctccttagcc 2100

aatggttggg gctcagcctc tgaggacaat gccgccagcg ccagagccag ccttgtcagc 2160

tcctccgatg gctccttcct cgctgatgct cactttgccc gggccctggc agtggctgtg 2220

gatagctttg gtttcggtct agagcccagg gaggcagact gcgtcttcat agatgcctca 2280

tcacctccct ccccacggga tgagatcttc ctgaccccca acctctccct gcccctgtgg 2340

gagtggaggc cagactggtt ggaagacatg gaggtcagcc acacccagcg gctgggaagg 2400

gggatgcctc cctggccccc tgactctcag atctcttccc agagaagtca gctccactgt 2460

cgtatgccca aggctggtgc ttctcctgta gattactccg ctagc 2505

<210> 10

<211> 835

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-210aa

<400> 10

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp
20 25 30

Asp Asp Lys Thr Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg
35 40 45
Val Ser Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu
50 55 60

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

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

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

Pro Ser Arg Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala
260 265 270
Thr Gln Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg

275 280 285

Ala Thr Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala Leu

290 295 300

Trp Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg

305 310 315 320

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

325 330 335

Ala Ile Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala

340 345 350

Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser

355 360 365

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

370 375 380

Arg Arg Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Ser Thr Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro Ala Val Arg Arg

420 425 430

Leu Pro Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser Asp

435 440 445

Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg Leu Ser Leu Ala

450 455 460

Pro Ala Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Ala

465 470 475 480

Asn Ser Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu Glu Leu Arg Ala

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Leu Ser Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg His Leu Pro Pro Ala Pro
530 535 540
Leu Phe Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro
545 550 555 560
Pro Val Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala Pro
565 570 575

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

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

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

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

770 775 780

Asp Trp Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg

785 790 795 800

Gly Met Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser

805 810 815

Gln Leu His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr

820 825 830

Ser Ala Ser

835

<210> 11

<211> 2454

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-225na

<400> 11

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataagatcca ggagccccag 120

gactacacgg agcctgtgga gcttctggct gtgcgaattc agctggaaaa tgtgacactg 180

ctgaacccgg atcctgcaga gggccccaag cctagaccgg cggtgtggct cagctggaag 240

gtcagtggcc ctgctgcgcc tgcccaatct tacacggcct tgttcaggac ccagactgcc 300

ccgggaggcc agggagctcc gtgggcagag gagctgctgg ccggctggca gagcgcagag 360

cttggaggcc tccactgggg ccaagactac gagttcaaag tgagaccatc ctctggccgg 420

gctcgaggcc ctgacagcaa cgtgctgctc ctgaggctgc cggaaaaagt gcccagtgcc 480

ccacctcagg aagtgactct aaagcctggc aatggcactg tctttgtgag ctgggtccca 540

ccacctgctg aaaaccacaa tggcatcatc cgtggctacc aggtctggag cctgggcaac 600

acatcactgc caccagccaa ctggactgta gttggtgagc agacccagct ggaaatcgcc 660

acccatatgc caggctccta ctgcgtgcaa gtggctgcag tcactggtgc tggagctggg 720

gagcccagta gacctgtctg cctccttta gagcaggcca tggagcgagc cacccaagaa 780

cccagtgagc atggtccctg gaccctggag cagctgaggg ctaccttgaa gcggcctgag 840

gtcattgcca cctgcggtgt tgcactctgg ctgctgcttc tgggcaccgc cgtgtgtatc 900

caccgccggc gccgagctag ggtgcacctg ggcccaggtc tgtacagata taccagtgag 960

gatgccatcc taaaacacag gatggatcac agtgactccc agtggttggc agacacttgg 1020

cgttccacct ctggctctcg ggacctgagc agcagcagca gcctcagcag tcggctgggg 1080

gcggatgccc gggacccact agactgtcgt cgctccttgc tctcctggga ctcccgaagc 1140

cccggcgtgc ccctgcttcc agacaccagc acttttttatg gctccctcat cgctgagctg 1200

ccctccagta ccccagccag gccaagtccc caggtcccag ctgtcaggcg cctcccaccc 1260

cagctggccc agctctccag cccctgttcc agctcagaca gcctctgcag ccgcagggga 1320

ctctcttctc cccgcttgtc tctggcccct gcagaggctt ggaaggccaa aaagaagcag 1380

gagctgcagc atgccaacag ttccccactg ctccggggca gccactcctt ggagctccgg 1440

gcctgtgagt taggaaatag aggttccaag aacctttccc aaagcccagg agctgtgccc 1500

caagctctgg ttgcctggcg ggccctggga ccgaaactcc tcagctcctc aaatgagctg 1560

gttactcgtc atctccctcc agcacccctc tttcctcatg aaactccccc aactcagagt 1620

caacagaccc agcctccggt ggcaccacag gctccctcct ccatcctgct gccagcagcc 1680

cccatcccca tccttagccc ctgcagtccc cctagccccc aggcctcttc cctctctggc 1740

cccagcccag cttccagtcg cctgtccagc tcctcactgt catccctggg ggaggatcaa 1800

gacagcgtgc tgacccctga ggaggtagcc ctgtgcttgg aactcagtga gggtgaggag 1860

actcccagga acagcgtctc tcccatgcca agggctcctt cacccccccac cacctatggg 1920

tacatcagcg tcccaacagc ctcagagttc acggacatgg gcaggactgg aggaggggtg 1980

gggcccaagg ggggagtctt gctgtgccca cctcggccct gcctcacccc cacccccagc 2040

gagggctcct tagccaatgg ttggggctca gcctctgagg acaatgccgc cagcgccaga 2100

gccagccttg tcagctcctc cgatggctcc ttcctcgctg atgctcactt tgcccgggcc 2160

ctggcagtgg ctgtggatag ctttggtttc ggtctagagc ccagggaggc agactgcgtc 2220

ttcatagatg cctcatcacc tccctcccca cgggatgaga tcttcctgac ccccaacctc 2280

tccctgcccc tgtgggagtg gaggccagac tggttggaag acatggaggt cagccacacc 2340

cagcggctgg gaagggggat gcctccctgg ccccctgact ctcagatctc ttcccagaga 2400

agtcagctcc actgtcgtat gcccaaggct ggtgcttctc ctgtagatta ctcc 2454

<210> 12

<211> 818

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-225aa

<400> 12

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp

20 25 30

Asp Asp Lys Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu

35 40 45

Leu Ala Val Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg

85 90 95

Thr Gln Thr Ala Pro Gly Gly Gln Gly Ala Pro Trp Ala Glu Glu Leu

100 105 110

Leu Ala Gly Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln

115 120 125

Asp Tyr Glu Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro

130 135 140

Asp Ser Asn Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu Lys Val Pro Ser Ala

145 150 155 160

Pro Pro Gln Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr Val Phe Val

165 170 175

Ser Trp Val Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Val Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr His Met Pro

210 215 220

Gly Ser Tyr Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly

225 230 235 240

Glu Pro Ser Arg Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg

245 250 255

Ala Thr Gln Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu
260 265 270
Arg Ala Thr Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala
275 280 285
Leu Trp Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg

290 295 300
Arg Ala Arg Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Glu
305 310 315 320
Asp Ala Ile Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu
325 330 335
Ala Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser
340 345 350
Ser Ser Leu Ser Ser Arg Leu Gly Ala Asp Ala Arg Asp Pro Leu Asp

355 360 365
Cys Arg Arg Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro
370 375 380
Leu Leu Pro Asp Thr Ser Thr Phe Tyr Gly Ser Leu Ile Ala Glu Leu
385 390 395 400
Pro Ser Ser Thr Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro Ala Val Arg
405 410 415
Arg Leu Pro Pro Gln Leu Ala Gln Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser

420 425 430
Asp Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg Leu Ser Leu
435 440 445
Ala Pro Ala Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His
450 455 460
Ala Asn Ser Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser His Ser Leu Glu Leu Arg
465 470 475 480
Ala Cys Glu Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro

485 490 495
Gly Ala Val Pro Gln Ala Leu Val Ala Trp Arg Ala Leu Gly Pro Lys

500 505 510

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

515 520 525

Pro Leu Phe Pro His Glu Thr Pro Pro Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln

530 535 540

Pro Pro Val Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Pro Ala Ala

545 550 555 560

Pro Ile Pro Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser

565 570 575

Ser Leu Ser Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser Ser

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Ser Val Ser Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Tyr Gly

625 630 635 640

Tyr Ile Ser Val Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr Asp Met Gly Arg Thr

645 650 655

Gly Gly Gly Val Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg

660 665 670

Pro Cys Leu Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp

675 680 685

Gly Ser Ala Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val

690 695 700

Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala

705 710 715 720

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

725 730 735

Ala Asp Cys Val Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp

740 745 750

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

755 760 765

Pro Asp Trp Leu Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly

770 775 780

Arg Gly Met Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg

785 790 795 800

Ser Gln Leu His Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp

805 810 815

Tyr Ser

<210> 13

<211> 2106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-341na

<400> 13

atgggctctg gaggagacag cctcctcggc ggcagaggtt ccctgcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tgattacaag gatgacgacg ataagaggct gccggaaaaa 120

gtgcccagtg ccccacctca ggaagtgact ctaaagcctg gcaatggcac tgtctttgtg 180

agctgggtcc caccacctgc tgaaaaccac aatggcatca tccgtggcta ccaggtctgg 240

agcctgggca acacatcact gccaccagcc aactggactg tagttggtga gcagacccag 300

ctggaaatcg ccacccatat gccaggctcc tactgcgtgc aagtggctgc agtcactggt 360

gctggagctg gggagcccag tagacctgtc tgcctccttt tagagcaggc catggagcga 420

gccacccaag aacccagtga gcatggtccc tggaccctgg agcagctgag ggctaccttg 480

aagcggcctg aggtcattgc cacctgcggt gttgcactct ggctgctgct tctgggcacc 540

gccgtgtgta tccaccgccg gcgccgagct agggtgcacc tgggcccagg tctgtacaga 600

tataccagtg aggatgccat cctaaaacac aggatggatc acagtgactc ccagtggttg 660

gcagacactt ggcgttccac ctctggctct cgggacctga gcagcagcag cagcctcagc 720

agtcggctgg gggcggatgc ccgggaccca ctagactgtc gtcgctcctt gctctcctgg 780

gactcccgaa gccccggcgt gcccctgctt ccagacacca gcacttttta tggctccctc 840

atcgctgagc tgccctccag taccccagcc aggccaagtc cccaggtccc agctgtcagg 900

cgcctcccac cccagctggc ccagctctcc agcccctgtt ccagctcaga cagcctctgc 960

agccgcaggg gactctcttc tccccgcttg tctctggccc ctgcagaggc ttggaaggcc 1020

aaaaagaagc aggagctgca gcatgccaac agttccccac tgctccgggg cagccactcc 1080

ttggagctcc gggcctgtga gttaggaaat agaggttcca agaacctttc ccaaagccca 1140

ggagctgtgc cccaagctct ggttgcctgg cgggccctgg gaccgaaact cctcagctcc 1200

tcaaatgagc tggttactcg tcatctccct ccagcacccc tctttcctca tgaaactccc 1260

ccaactcaga gtcaacagac ccagcctccg gtggcaccac aggctccctc ctccatcctg 1320

ctgccagcag cccccatccc catccttagc ccctgcagtc cccctagccc ccaggcctct 1380

tccctctctg gccccagccc agcttccagt cgcctgtcca gctcctcact gtcatccctg 1440

ggggaggatc aagacagcgt gctgacccct gaggaggtag ccctgtgctt ggaactcagt 1500

gagggtgagg agactcccag gaacagcgtc tctcccatgc caagggctcc ttcacccccc 1560

accacctatg ggtacatcag cgtcccaaca gcctcagagt tcacggacat gggcaggact 1620

ggaggagggg tggggcccaa ggggggagtc ttgctgtgcc cacctcggcc ctgcctcacc 1680

cccacccccа gcgagggctc cttagccaat ggttggggct cagcctctga ggacaatgcc 1740

gccagcgcca gagccagcct tgtcagctcc tccgatggct ccttcctcgc tgatgctcac 1800

tttgcccggg ccctggcagt ggctgtggat agctttggtt tcggtctaga gcccagggag 1860

gcagactgcg tcttcataga tgcctcatca cctccctccc cacgggatga gatcttcctg 1920

acccccaacc tctccctgcc cctgtgggag tggaggccag actggttgga agacatggag 1980

gtcagccaca cccagcggct gggaaggggg atgcctccct ggccccctga ctctcagatc 2040

tcttcccaga gaagtcagct ccactgtcgt atgcccaagg ctggtgcttc tcctgtagat 2100

tactcc 2106

<210> 14

<211> 702

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG-hROBO4-341aa

<400> 14

Met Gly Ser Gly Gly Asp Ser Leu Leu Gly Gly Arg Gly Ser Leu Pro

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Met Gly Gly Met Ala Asp Tyr Lys Asp Asp

20 25 30

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

35 40 45

Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Thr Val Phe Val Ser Trp Val Pro

50 55 60

Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val Trp

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr His Met Pro Gly Ser Tyr Cys

100 105 110

Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser Arg

115 120 125

Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Gln Glu

130 135 140

Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr Leu

145 150 155 160

Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Ala Leu Trp Leu Leu

165 170 175

Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Arg Val

180 185 190

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

195 200 205

Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr Trp

210 215 220

Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro Asp

260 265 270

Thr Ser Thr Phe Tyr Gly Ser Leu Ile Ala Glu Leu Pro Ser Ser Thr

275 280 285

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

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

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

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

530 535 540

Gly Pro Lys Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu Thr

545 550 555 560

Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala Ser

565 570 575

Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser Asp

580 585 590

Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val Ala

595 600 605

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

610 615 620

Phe Ile Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Glu Ile Phe Leu

625 630 635 640

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

645 650 655

Glu Asp Met Glu Val Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Met Pro

660 665 670

Pro Trp Pro Pro Asp Ser Gln Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu His

675 680 685

Cys Arg Met Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser

690 695 700

<210> 15

<211> 3045

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

atgggacaag gagaggagcc gagagcagcc atgggctctg gaggaacggg cctcctgggg 60

acggagtggc ctctgcctct gctgctgctt ttcatcatgg gaggtgaggc tctggattct 120

ccaccccaga tcctagttca cccccaggac cagctacttc agggctctgg cccagccaag 180

atgaggtgca gatcatccgg ccaaccacct cccactatcc gctggctgct gaatgggcag 240

cccctcagca tggccacccc agacctacat tacctttgc cggatgggac cctcctgtta 300

catcggccct ctgtccaggg acggccacaa gatgaccaga acatcctctc agcaatcctg 360

ggtgtctaca catgtgaggc cagcaaccgg ctgggcacag cagtgagccg gggtgctagg 420

ctgtctgtgg ctgtcctcca ggaggacttc cagatccaac ctcgggacac agtggccgtg 480

gtgggagaga gcttggttct tgagtgtggt cctccctggg gctacccaaa accctcggtc 540

tcatggtgga aagacgggaa acccctggtc ctccagccag ggaggcgcac agtatctggg 600

gattccctga tggtgtcaag agcagagaag aatgactcgg ggacctatat gtgtatggcc 660

accaacaatg ctgggcaacg ggagagccga gcagccaggg tgtctatcca ggaatcccag 720

gaccacaagg aacatctaga gcttctggct gttcgcattc agctggaaaa tgtgaccctg 780

ctaaaccccg aacctgtaaa aggtcccaag cctgggccat ccgtgtggct cagctggaag 840

gtgagcggcc ctgctgcacc tgctgagtca tacacagctc tgttcaggac tcagaggtcc 900

cccagggacc aaggatctcc atggacagag gtgctgctgc gtggcttgca gagtgcaaag 960

cttgggggtc tccactgggg ccaagactat gaattcaaag tgagaccgtc ctccggccgg 1020

gctcgaggcc ctgacagcaa tgtgttgctc ctgaggctgc ctgaacaggt gcccagtgcc 1080

ccacctcaag gagtgacctt aagatctggc aacggtagtg tctttgtgag ttgggctcca 1140

ccacctgctg aaagccataa tggtgtcatc cgtggttacc aggtctggag cctgggcaat 1200

gcctcattgc ctgctgccaa ctggaccgta gtgggtgaac agacccagct ggagatcgcc 1260

acacgactgc caggctccta ttgtgtgcaa gtggctgcag tcactggagc tggtgctgga 1320

gaactcagta cccctgtctg cctcctttta gagcaggcca tggagcaatc agcacgagac 1380

cccaggaaac atgttccctg gaccctggaa cagctgaggg ccaccttgag acgaccagaa 1440

gtcattgcca gtagtgctgt cctactctgg ttgctgctac taggcattac tgtgtgtatc 1500

tacagacgac gcaaagctgg ggtgcacctg ggcccaggtc tgtacagata caccagcgag 1560

gacgccattc taaaacacag gatggaccac agtgactccc catggctggc agacacctgg 1620

cgttccacct ctggctctcg agacctgagc agcagcagca gccttagtag tcggctggga 1680

ttggaccctc gggacccact agagggcagg cgctccttga tctcctggga ccctcggagc 1740

cccggtgtac ccctgcttcc agacacgagc acgttttacg gctccctcat tgcagagcag 1800

ccttccagcc ctccagtccg gccaagcccc aagacaccag ctgctaggcg ctttccatcc 1860

aagttggctg gaacctccag cccctgggct agctcagata gtctctgcag ccgcagggga 1920

ctctgttccc cacgcatgtc tctgacccct acagaggctt ggaaggccaa aaagaagcag 1980

gaattgcacc aagctaacag ctccccactg ctccggggca gccaccccat ggaaatctgg 2040

gcctgggagt tgggaagcag agcctccaag aacctttctc aaagcccagg agaagcgccc 2100

cgagccgtgg tatcctggcg tgctgtggga ccacaacttc accgcaactc cagtgagctg 2160

gcatctcgtc cactccctcc aacacccctt tctcttcgtg gagcttccag tcatgaccca 2220

cagagccagt gtgtggagaa gctccaagct ccctcctctg acccactgcc agcagcccct 2280
ctctccgtcc tcaactcttc cagaccttcc agcccccagg cctctttcct ctcctgtcct 2340
agcccatcct ccagcaacct gtccagctcc tcgctgtcat ccttagagga ggaggaggat 2400
caggacagcg tgctcacccc cgaggaggta gccctgtgtc tggagctcag tgatggggag 2460
gagacaccca cgaacagtgt atctcctatg ccaagagctc cttccccgcc aacaacctat 2520
ggctatatca gcataccaac ctgctcagga ctggcagaca tgggcagagc tggcgggggc 2580
gtggggtctg aggttgggaa cttactgtat ccacctcggc cctgccccac ccctacaccc 2640

agcgagggct ccctggccaa tggttggggc tcagcttctg aggacaatgt ccccagcgcc 2700
agggccagcc tggttagctc ttctgatggc tccttcctcg ctgatactca ctttgctcgt 2760
gccctggcag tggctgtgga tagctttggc ctcagtctgg atcccaggga agctgactgt 2820
gtcttcactg atgcctcatc acctccctcc cctcggggtg atctctccct gacccgaagc 2880
ttctctctgc ctttgtggga gtggaggcca gactggttgg aagatgctga gatcagccac 2940
acccagaggc tggggagggg gctgcctccc tggcctcctg attctagggc ctcttcccag 3000
cgaagttggc taactggtgc tgtgcccaag gctggtgatt cctcc 3045

<210> 16
<211> 1015
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 16

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Asn Ile Leu Ser Ala Ile Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser

115 120 125

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

130 135 140

Val Leu Gln Glu Asp Phe Gln Ile Gln Pro Arg Asp Thr Val Ala Val

145 150 155 160

Val Gly Glu Ser Leu Val Leu Glu Cys Gly Pro Pro Trp Gly Tyr Pro

165 170 175

Lys Pro Ser Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Val Leu Gln

180 185 190

Pro Gly Arg Arg Thr Val Ser Gly Asp Ser Leu Met Val Ser Arg Ala

195 200 205

Glu Lys Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Met Cys Met Ala Thr Asn Asn Ala

210 215 220

Gly Gln Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser Ile Gln Glu Ser Gln

225 230 235 240

Asp His Lys Glu His Leu Glu Leu Leu Ala Val Arg Ile Gln Leu Glu

245 250 255

Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Glu Pro Val Lys Gly Pro Lys Pro Gly

260 265 270

Pro Ser Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala

275 280 285

Glu Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Arg Ser Pro Arg Asp Gln

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu Phe Lys Val Arg Pro

325 330 335

Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn Val Leu Leu Leu Arg

340 345 350

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

355 360 365

Ser Gly Asn Gly Ser Val Phe Val Ser Trp Ala Pro Pro Pro Ala Glu

370 375 380

Ser His Asn Gly Val Ile Arg Gly Tyr Gln Val Trp Ser Leu Gly Asn

385 390 395 400

Ala Ser Leu Pro Ala Ala Asn Trp Thr Val Val Gly Glu Gln Thr Gln

405 410 415

Leu Glu Ile Ala Thr Arg Leu Pro Gly Ser Tyr Cys Val Gln Val Ala

420 425 430

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

435 440 445

Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Gln Ser Ala Arg Asp Pro Arg Lys His

450 455 460

Val Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr Leu Arg Arg Pro Glu

465 470 475 480

Val Ile Ala Ser Ser Ala Val Leu Leu Trp Leu Leu Leu Leu Gly Ile

485 490 495

Thr Val Cys Ile Tyr Arg Arg Arg Lys Ala Gly Val His Leu Gly Pro

500 505 510

Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Glu Asp Ala Ile Leu Lys His Arg Met

515 520 525

Asp His Ser Asp Ser Pro Trp Leu Ala Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser

530 535 540

Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Arg Leu Gly

545 550 555 560

Leu Asp Pro Arg Asp Pro Leu Glu Gly Arg Arg Ser Leu Ile Ser Trp

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Thr Ser Ser Pro Trp Ala Ser Ser Asp Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly

625 630 635 640

Leu Cys Ser Pro Arg Met Ser Leu Thr Pro Thr Glu Ala Trp Lys Ala

645 650 655

Lys Lys Lys Gln Glu Leu His Gln Ala Asn Ser Ser Pro Leu Leu Arg

660 665 670

Gly Ser His Pro Met Glu Ile Trp Ala Trp Glu Leu Gly Ser Arg Ala

675 680 685

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

690 695 700

Ser Trp Arg Ala Val Gly Pro Gln Leu His Arg Asn Ser Ser Glu Leu

705 710 715 720

Ala Ser Arg Pro Leu Pro Pro Thr Pro Leu Ser Leu Arg Gly Ala Ser

725 730 735

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

740 745 750

Ser Asp Pro Leu Pro Ala Ala Pro Leu Ser Val Leu Asn Ser Ser Arg

755 760 765

Pro Ser Ser Pro Gln Ala Ser Phe Leu Ser Cys Pro Ser Pro Ser Ser

770 775 780

Ser Asn Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Leu Glu Glu Glu Glu Asp

785 790 795 800

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

805 810 815

Ser Asp Gly Glu Glu Thr Pro Thr Asn Ser Val Ser Pro Met Pro Arg

820 825 830

Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Ile Pro Thr Cys
835 840 845
Ser Gly Leu Ala Asp Met Gly Arg Ala Gly Gly Gly Val Gly Ser Glu
850 855 860
Val Gly Asn Leu Leu Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Pro Thr Pro Thr Pro
865 870 875 880
Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala Ser Glu Asp Asn

885 890 895
Val Pro Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe
900 905 910
Leu Ala Asp Thr His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val Ala Val Asp Ser
915 920 925
Phe Gly Leu Ser Leu Asp Pro Arg Glu Ala Asp Cys Val Phe Thr Asp
930 935 940
Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Gly Asp Leu Ser Leu Thr Arg Ser

945 950 955 960
Phe Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp Leu Glu Asp Ala
965 970 975
Glu Ile Ser His Thr Gln Arg Leu Gly Arg Gly Leu Pro Pro Trp Pro
980 985 990
Pro Asp Ser Arg Ala Ser Ser Gln Arg Ser Trp Leu Thr Gly Ala Val
995 1000 1005
Pro Lys Ala Gly Asp Ser Ser
1010 1015

<210> 17
<211> 3063
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus
<400> 17
atgggacaag gagaggagct gagagcagcc gttgactctg gaggaatggg cctcctgggg 60
actaagtgtc ctctgcctct actgcttctt ttcatcatgg gaggcaaggc tctggattct 120
ccaccccaga tcctagttca tccccaggac cagctacttc agggctccgg gccggccaag 180

atgagttgca gagcatcggg ccaaccactt cccactatcc gctggctgct gaatgggcag 240

cccctcagca tggcgacccc agacctacat tacctccaat cagatgggac cctcctgcta 300

catcggcccc ctacccatgg acggccgcaa gacgaccaga acattctctc agcaatcctg 360

ggtgtctaca catgtgaggc cagcaaccgg ctgggcacag cagtgagccg gggtgctagg 420

ctgtctgtgg ctgtcctcca ggaggacttc cgaatccaac ctcgggacac agtggccgtg 480

gtgggcgaga gcttggttct cgagtgtggt cctccctggg gctacccaaa gccttcagtc 540

tcctggtgga aagatgggaa acccctggtc ctccagccag ggaagcgcac agtgtctggg 600

gattctctga tggtggcaag agcagagaag aatgacacgg ggacctatat gtgtatggcc 660

accaacaatg ccggacaacg ggagagtcgg gcagccaggg tgtctatcca ggagtcaccg 720

gaccacaagg agcatctaga gcttctggct gttcgaattc agctggaaaa tgtgaccctg 780

ctgaacccag aacctgtaaa aggccccaag cctgggccag ctgtgtggct cagctggaag 840

gtgagcggcc ctgctgcacc tgcccagtca tacacagccc tgttcagggc gcagagggac 900

cccagggacc agggatctcc atggacagag gtgctgctgg atggcttgct gaatgcaaag 960

cttgggggtc tccgctgggg ccaagactac gaattcaaag tgagaccgtc ctccggccgg 1020

gctcgaggcc ctgatagcaa tgtgttgctc ctgaggctgc ctgaacaggt gcccagtgcc 1080

ccacctcaag aagtgaccct aagacctggc aacggtagtg tctttgtgag ttgggcccca 1140

cctcctgctg aaaaccataa cggtttcatc cgtggctacc aggtctggag cctgggcaat 1200

gcctcattgc ctgctgccaa ctggaccgta gtgggtgaac agacacagct ggagattgcc 1260

gcacgaatgc caggctccta ttgtgtgcag gtggctgcag tcactggtgc tggggctgga 1320

gagcccagta tccctgtctg cctcctttta gagcaggcca tggagcaatc agcacgagac 1380

cccagtaaac atgtttcctg gaccctggaa cagctgaggg ccaccttgaa acgaccagaa 1440

gtcattgcca gtggtgccgt cctgctctgg ttgctgctcc taggcattgc tgtgtgtatc 1500

tacaggcgac ggaaagctgg ggtgcacctg ggcccaggtc tctacagata caccagtgag 1560

gatgccattt taaaacacag gatggaccac agtgactccc catggctggc agacacctgg 1620

cgctccacct ctggctctag agatctgagc agcagcagca gcctcagtag tcgactagga 1680

gtggaccctc gggacccact ggacggcagg cgttccttga tctcctggga cccccggagc 1740

cccggtgtac ccctgcttcc agacactagc acgttttacg gctccctcat tgcagagcag 1800

acttccagcc ctccagtccg gccaagcccg cagacgccag ctgctaggcg ccttccaccc 1860

aagctgaccg gaacctccag cccctgggct agctcagata gtctctgcag ccgcagggga 1920

ctctgttccc cacgcatgtc tctggcccct gcagaggctt ggaaggccaa aaagaagcag 1980

gaactgcacc aagctaacag ctccccgctg ctccagggta gccaccccat ggaaatctgg 2040

gcctgggagt tgggaagcag agcctccaag aacctttctc aaagcccggg cccaaacact 2100

tgttccccac gagaagctcc cggagcagtg gtagcctggc gtgccctggg accacaactt 2160

caccgcaact ccagtgagct agcagctcgt ccactccctc cgacacccct ttctcttcgt 2220

ggagccccca gtcatgatcc gcagagccag tgtgtggaga agctccaagc tccctcctct 2280

gacccactgc cagcagcccc tctctccgtc ctcaactctt ccaggccttc cagcccccag 2340

gcctctttcc tctctgttcc tagcccagga tccagcaacc tgtccagctc ctcactgtca 2400

tccttagagg aggaggatca ggacagtgta ctcacccctg aggaggtagc cctgtgtctg 2460

gagctcagtg atggggagga gacacccacg aacagtgtat ctcctatgcc aagagctcct 2520

tcacccccag caacctatgg ctatatcagc ataccaacct cctcaggact ggcagacatg 2580

ggcagagctg gtgggggcgt ggggtctgag gtcgggaact tactgtgccc acctcggctc 2640

tgccccacac ctacacccag cgagggctcc ctggccaatg gttggggctc agcttcagag 2700

gacaatgtcc ccagcgccag ggccagcctg gttagctctt ctgatggctc cttccttgct 2760

gacgctcact ttgctcgtgc cctggcagtg gctgtggaca gcttcggttt cagtctggag 2820

cccagggaag ctgactgtgt ctttactgat gcctcatcac ccccatcccc tcgggatgat 2880

ctttctctga cccgaagctt ctctctgcca ctgtgggagt ggaggccaga ctggttggaa 2940

gatgctgaga tcaaccacac ccagaggctg gggaggggggc tgcctccctg gcctcctgat 3000

tctagagtct cttcccagcg aagttggctc actggtgttg tgcccaaggc tggtgattcc 3060

tcc 3063

<210> 18

<211> 1021

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 18

Met Gly Gln Gly Glu Glu Leu Arg Ala Ala Val Asp Ser Gly Gly Met
1 5 10 15

Gly Leu Leu Gly Thr Lys Cys Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Phe Ile
20 25 30

Met Gly Gly Lys Ala Leu Asp Ser Pro Pro Gln Ile Leu Val His Pro
35 40 45

Gln Asp Gln Leu Leu Gln Gly Ser Gly Pro Ala Lys Met Ser Cys Arg

```
    50                  55                  60
Ala Ser Gly Gln Pro Leu Pro Thr Ile Arg Trp Leu Leu Asn Gly Gln
65                  70                  75                  80

Pro Leu Ser Met Ala Thr Pro Asp Leu His Tyr Leu Gln Ser Asp Gly
                85                  90                  95
Thr Leu Leu Leu His Arg Pro Pro Thr His Gly Arg Pro Gln Asp Asp
            100                 105                 110
Gln Asn Ile Leu Ser Ala Ile Leu Gly Val Tyr Thr Cys Glu Ala Ser
        115                 120                 125
Asn Arg Leu Gly Thr Ala Val Ser Arg Gly Ala Arg Leu Ser Val Ala
    130                 135                 140

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

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

Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala
        275                 280                 285
Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Ala Gln Arg Asp Pro Arg Asp Gln
    290                 295                 300
```

Gly Ser Pro Trp Thr Glu Val Leu Leu Asp Gly Leu Leu Asn Ala Lys
305 310 315 320
Leu Gly Gly Leu Arg Trp Gly Gln Asp Tyr Glu Phe Lys Val Arg Pro
325 330 335

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

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

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

Asp His Ser Asp Ser Pro Trp Leu Ala Asp Thr Trp Arg Ser Thr Ser
530 535 540
Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Arg Leu Gly

545 550 555 560

Val Asp Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Arg Arg Ser Leu Ile Ser Trp

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Ser Pro Gln Thr Pro Ala Ala Arg Arg Leu Pro Pro Lys Leu Thr Gly

610 615 620

Thr Ser Ser Pro Trp Ala Ser Ser Asp Ser Leu Cys Ser Arg Arg Gly

625 630 635 640

Leu Cys Ser Pro Arg Met Ser Leu Ala Pro Ala Glu Ala Trp Lys Ala

645 650 655

Lys Lys Lys Gln Glu Leu His Gln Ala Asn Ser Ser Pro Leu Leu Gln

660 665 670

Gly Ser His Pro Met Glu Ile Trp Ala Trp Glu Leu Gly Ser Arg Ala

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

His Arg Asn Ser Ser Glu Leu Ala Ala Arg Pro Leu Pro Pro Thr Pro

725 730 735

Leu Ser Leu Arg Gly Ala Pro Ser His Asp Pro Gln Ser Gln Cys Val

740 745 750

Glu Lys Leu Gln Ala Pro Ser Ser Asp Pro Leu Pro Ala Ala Pro Leu

755 760 765

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

770 775 780

Ser Val Pro Ser Pro Gly Ser Ser Asn Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser

785 790 795 800

Ser Leu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Val
805 810 815
Ala Leu Cys Leu Glu Leu Ser Asp Gly Glu Glu Thr Pro Thr Asn Ser
820 825 830
Val Ser Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Ala Thr Tyr Gly Tyr
835 840 845

Ile Ser Ile Pro Thr Ser Ser Gly Leu Ala Asp Met Gly Arg Ala Gly
850 855 860
Gly Gly Val Gly Ser Glu Val Gly Asn Leu Leu Cys Pro Pro Arg Leu
865 870 875 880
Cys Pro Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly
885 890 895
Ser Ala Ser Glu Asp Asn Val Pro Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser
900 905 910

Ser Ser Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu
915 920 925
Ala Val Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Ser Leu Glu Pro Arg Glu Ala
930 935 940
Asp Cys Val Phe Thr Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Asp
945 950 955 960
Leu Ser Leu Thr Arg Ser Phe Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro
965 970 975

Asp Trp Leu Glu Asp Ala Glu Ile Asn His Thr Gln Arg Leu Gly Arg
980 985 990
Gly Leu Pro Pro Trp Pro Pro Asp Ser Arg Val Ser Ser Gln Arg Ser
995 1000 1005
Trp Leu Thr Gly Val Val Pro Lys Ala Gly Asp Ser Ser
1010 1015 1020

<210> 19
<211> 3021
<212> DNA
<213> Macaca fascicularis

<400> 19

atgggctctg gaggagaaag cctccggggg tcccgggctt cccggcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggcatggc tcaggactcc ccgccccaga tcctagtcca cccgcaagac 120

cagctgttcc agggccctgg ccctgccagg atgagctgcc gagcctcggg ccagccacct 180

cccaccatcc gctggctgct gaatgggcag cccctgagca tggtgccccc agacccacac 240

cacctcctgc ctgatgggac ccttctgctg ctgcagcccc ctgcctgggg acatgcccac 300

gatggccagg ccctgtccac agaccttggt gtctacacat gtgaggccag caaccggctg 360

ggcacagcag tcagcagagg cgctcggctc tctgtggctg tcctccggga ggatttccag 420

atccagcctc gggacatggt agctgtggtg ggtgagcagt taactctgga atgtgggccg 480

ccctggggcc acccagagcc cacagtctca tggtggaaag atgggaaacc cctggtcctc 540

cagcctggaa ggtacacggt gtccgggggg tccctgctga tggcaagagc agagaagagt 600

gacgcagggg cctacatgtg tgtggccgcc aacagcgcag gacacaggga gagccacgca 660

gcccgggtgt ccatccagga gccccaggac tacacagagc ctgtggagct tttggctgtg 720

cgaattcagc tggaaaatgt gacactgctg aacccggacc ccgcaaaggg ccccaagcct 780

ggaccggctg tgtggctcag ctggaaggtg agcggccctg ctgcacctgc ccaatcttac 840

acggccttgt tcaggaccca gactgccccg ggagaccagg gagctccatg gacagaggag 900

ctgctggctg gctggcagag cgcagagctt ggaggcctcc actggggcca agactatgag 960

ttcaaagtga gaccatcctc cggccgggct cgaggccctg acagcaacgt gctgctcctg 1020

aggctgccgg aaaaagtgcc cagtgcccca ccccaggagg tgaccctaaa acctggcaat 1080

ggcagtgtcc ttgtgagctg ggtcccacca cctgctgaaa accacaatgg catcatccgt 1140

ggctaccagg tctggagcct gggcaacacg tcactgcccc cagccaactg gactgtggtt 1200

ggtgagcaga cccagctgga aatcgccacc cgcatgccag gctcctactg tgtgcaagtg 1260

gctgcagtca ctggtgctgg agctggggaa cccagtagcc ctgtctgcct ccttttagag 1320

caggccatgg agcgagccac ccgagaaccc agtgagcatg gtccctggac cctggagcag 1380

ctgagggcca ccttgaagcg gcctgaggtc attgccacct gtggtgttgt gctctggctg 1440

ctgcttctgg gcaccgctgt gtgtatccac cgccggcgcc gagctggggt gcacctaggc 1500

ccaggtctgt acagatatac cagtaaggac gccatcctaa aacacaggat ggatcacagt 1560

gactcccagt ggttggcaga cacttggcgt tccacctctg gctctcggga cttgagcagc 1620

agcagcagcc tcagcagtag gctgggggcg gacccccggg acccgctaga ctgtcgtcgc 1680

tccttgctct cctgggactc ccgaagcccc ggcgtgcccc tgcttccaga caccagcact 1740

ttttatggct ccctcatcgc tgagctgccc tccagtcccc cagccaggcc aagtccccag 1800
gtcccagctg tcaggcgcct accaccccag ctggcccgac tttccagccc ctgttccagc 1860
tcagacagcc tctgcagcca caggggattc tcttctccac gcttgtctct ggcacctaca 1920
gaggcttgga aggccaaaaa gaagcaggag ctgcagcatg tcaacagttc cccactgctc 1980
cggggcagcc aacccttgga gctccgggcc tgtgagttgg gaaatagagg ttccaagaac 2040
ctttcccaaa gcccaggagc tgtgccccaa gctctggttg cttggcgggc cctgggaccg 2100
aaactcctca gctcctcaaa tgagctggtt actcgtcctc tccctccagc acccctcttt 2160

cctcatgaaa ctccccaaac tcagagtcaa cagacccagc ctccggtggc accacaggct 2220
ccctcctcca tcctgctggc aacagccccc attcccatcc ttagcccctg cagtcccctt 2280
agccctcagg cctcttccct ctctggcccc agcccagctt ccagtcacct gtccagctct 2340
tcactgtcat ccctggggga ggatcaagac agcgtgctga cccctgagga ggtagccctg 2400
tgtttggaac tcagtgaggg tgaggagact cccaggaaca gcgtctctcc catgccaaga 2460
gctccttcac cccccaccac ctatgggtat atcagcaccc caacagcctc agagttcacg 2520
ggcatggaca ggaccggagg aggggtgggg tccgaggggg gagtcttgct gtgcccacct 2580

cggccctgcc tcacccccac ccccagcgag ggctccttag ccaatggttg gggctcagcc 2640
tctgaggaca atgctgccag cgccagagcc agccttgtca gctcctccga tggctccttc 2700
ctcgctgatg cccactttgc ccgggccctg gcagtggcag tggatagctt tggttttggt 2760
ctagagccca gggaggcaga ctgcgtcttc acagatgcct catcacctcc ctccccaagg 2820
gatgacatct tcctgacccc caacctctcc ctgcccctgt gggagtggag gccagactgg 2880
ttggaagaca tggaggtcaa ccacacccag ctgctgggaa gggggatgcc tccctggtcc 2940
cctgactctc ggatctcttc ccagagaagt cagctccact gtcctgtgcc caaggctggt 3000

gcttctcctg tagattactc c 3021

<210> 20

<211> 1007

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 20

Met Gly Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Gly Ser Arg Ala Ser Arg Pro
1 5 10 15

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

```
            20                  25                  30
Gln Ile Leu Val His Pro Gln Asp Gln Leu Phe Gln Gly Pro Gly Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Lys
                245                 250                 255
Gly Pro Lys Pro Gly Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly
            260                 265                 270
```

Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr
275 280 285
Ala Pro Gly Asp Gln Gly Ala Pro Trp Thr Glu Glu Leu Leu Ala Gly
290 295 300

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

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

Ser Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Arg
435 440 445
Glu Pro Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr
450 455 460
Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Val Leu Trp Leu
465 470 475 480
Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Gly
485 490 495

Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Lys Asp Ala Ile
500 505 510
Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr

515 520 525

Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu

530 535 540

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

545 550 555 560

Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Pro

565 570 575

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

580 585 590

Pro Pro Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro Ala Val Arg Arg Leu Pro

595 600 605

Pro Gln Leu Ala Arg Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser Asp Ser Leu

610 615 620

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

625 630 635 640

Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Val Asn Ser

645 650 655

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

660 665 670

Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

Pro His Glu Thr Pro Gln Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val

725 730 735

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Ala Thr Ala Pro Ile Pro

740 745 750

Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser

755 760 765

Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser His Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser
770 775 780
Leu Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Val Ala Leu
785 790 795 800
Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Thr Pro Arg Asn Ser Val Ser
805 810 815

Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser
820 825 830
Thr Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr Gly Met Asp Arg Thr Gly Gly Gly
835 840 845
Val Gly Ser Glu Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu
850 855 860
Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala
865 870 875 880

Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser
885 890 895
Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val
900 905 910
Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Gly Leu Glu Pro Arg Glu Ala Asp Cys
915 920 925
Val Phe Thr Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Asp Ile Phe
930 935 940

Leu Thr Pro Asn Leu Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp
945 950 955 960
Leu Glu Asp Met Glu Val Asn His Thr Gln Leu Leu Gly Arg Gly Met
965 970 975
Pro Pro Trp Ser Pro Asp Ser Arg Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu
980 985 990
His Cys Pro Val Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser
995 1000 1005

<210> 21

<211> 3021

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<400> 21

atgggctctg gaggagaaag cctccggggg tcccgggctt cccggcctct gctgctcctg 60

ctcatcatgg gaggtatggc tcaggactcc ccgccccaga tcctagtcca cccgcaagac 120

cagctgttcc agggccctgg ccctgccagg atgagctgcc gagcctcggg ccagccacct 180

cccaccatcc gctggctgct gaatgggcag cccctgagca tggtaccccc agacccacac 240

cacctcctgc ctgatgggac ccttctgctg ctgcagcccc ctgcccgggg acatgcccac 300

gatggccagg ccctgtccac agaccttggt gtctacacat gtgaggccag caaccggctg 360

ggcacagcag tcagcagagg cgctcggctc tctgtggctg tcctccggga ggatttccag 420

atccagcctc gggacatggt agctgtggtg ggtgagcagt taactctgga atgtgggccg 480

ccctggggcc acccagagcc cacagtctca tggtggaaag atgggaaacc cctggtcctc 540

cagcccggaa ggtacacggt gtccgggggg tccctgctga tggcaagagc agagaagagt 600

gacacagggg cctacatgtg tgtggccgcc aacagcgcag gacacaggga gagccgcgca 660

gcccgggtgt ccatccagga gccccaggac tacacagagc ctgtggagct tttggctgtg 720

cgaattcagc tggaaaatgt gacactgctg aacccggacc ccgcaaaggg ccccaagcct 780

ggaccggctg tgtggctcag ctggaaggtg agcggccctg ctgcacctgc ccaatcttac 840

acggccttgt tcaggaccca gactgccccg ggagaccagg gagctccatg gacagaggag 900

ctgctggctg gctggcagag cgcagagctt ggaggcctcc actggggcca agactatgag 960

ttcaaagtga gaccatcctc cggccgggct cgaggccctg acagcaacgt gctgctcctg 1020

aggctgccgg aaaaagtgcc cagtgcccca ccccaggagg tgaccctaaa acctggcaat 1080

ggcagtgtcc ttgtgagctg ggtcccacca cctgctgaaa accacaatgg catcatccgt 1140

ggctaccagg tctggagcct gggcaacacg tcactgcccc cagccaactg gactgtggtt 1200

ggtgagcaga cccagctgga aatcgccacc cgcatgccag gctcctactg tgtgcaagtg 1260

gctgcagtca ctggtgctgg agctggggaa cccagtagcc ctgtctgcct ccttttagag 1320

caggccatgg agcgagccac ccgagaactc agtgagcatg gtccctggac cctggagcag 1380

ctgagggcca ccttgaagcg gcctgaggtc attgccacct gtggtgttgt gctctggctg 1440

ctgcttctgg gcaccgctgt gtgtatccac cgccggcgcc gagctggggt gcacctaggc 1500

ccaggtctgt acagatatac cagtaaggac gccatcctaa aacacaggat ggatcacagt 1560

gactcccagt ggttggcaga cacttggcgt tccacctctg gctctcggga cttgagcagc 1620

agcagcagcc tcagcagtag gctgggggcg gacccccggg acccgctaga ctgtcgtcgc 1680

tccttgctct cctgggactc ccgaagcccc ggcgtgcccc tgcttctaga caccagcact 1740

ttttatggct ccctcatcgc tgagctgccc tccagtcccc tagccaggcc aagtccccag 1800

gtcccagctg tcaggcgcct accaccccag ctggcccgac tttccagccc ctgttccagc 1860

tcagacagcc tctgcagcca caggggactc tcttctccac gcttgtctct ggcacctaca 1920

gaggcttgga aggccaaaaa gaagcaggag ctgcagcatg tcaacagttc cccactgctc 1980

cggggcagcc aacccttgga gctccgggcc tgtgagttgg gaaacagagg ttccaagaac 2040

ctttcccaaa gcccaggagc tgtgccccaa gctctggttg cttggcgggc cctgggaccg 2100

aaactcctca gctcctcaaa tgagctggtt actcgtcctc tccctccagc acccctcttt 2160

cctcatgaaa ctccccaaac tcagagtcaa cagacccagc ctccggtggc accacaggct 2220

ccctcctcca tcctgctggc aacagccccc attcccatcc ttagcccctg cagtccccct 2280

agccctcagg cctcttccct ctctggcccc agcccagctt ccagtcacct gtccagctct 2340

tcactgtcat ccctggggga ggatcaagac agcgtgctga cccctgagga ggtagccctg 2400

tgtttggaac tcagtgaggg tgaggagact cccaggaaca gcgtctctcc catgccaaga 2460

gctccttcac cccccaccac ctatgggtat atcagcaccc caacagcctc agagttcacg 2520

ggcatggaca ggaccggagg aggggtgggg tccgaggggg gagtcttgct gtgcccacct 2580

cggccctgcc tcacccccac ccccagcgag ggctccttag ccaatggttg gggctcagcc 2640

tctgaggaca atgctgccag tgccagagcc agccttgtca gctcctccga tggctccttc 2700

ctcgctgatg cccactttgc ccgggccctg gcagtggcag tggatagctt tggttttggt 2760

ctagagccca gggaggcaga ctgcgtcttc acagatgcct catcacctcc ctccccaagg 2820

gatgacatct tcctgacccc caacctctcc ctgcccctgt gggagtggag gccagactgg 2880

ttggaagaca tggaggtcaa ccacacccag ctgctgggaa gggggatgcc tccctggtcc 2940

cctgactctc ggatctcttc ccagagaagt cagctccact gtcctgtgcc caaggctggt 3000

gcttctcctg tagattactc c 3021

<210> 22

<211> 1007

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 22

Met Gly Ser Gly Gly Glu Ser Leu Arg Gly Ser Arg Ala Ser Arg Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

Pro Trp Gly His Pro Glu Pro Thr Val Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys
165 170 175
Pro Leu Val Leu Gln Pro Gly Arg Tyr Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu
180 185 190
Leu Met Ala Arg Ala Glu Lys Ser Asp Thr Gly Ala Tyr Met Cys Val
195 200 205
Ala Ala Asn Ser Ala Gly His Arg Glu Ser Arg Ala Ala Arg Val Ser
210 215 220

Ile Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Thr Glu Pro Val Glu Leu Leu Ala Val
225 230 235 240
Arg Ile Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu Leu Asn Pro Asp Pro Ala Lys
245 250 255
Gly Pro Lys Pro Gly Pro Ala Val Trp Leu Ser Trp Lys Val Ser Gly
260 265 270

Pro Ala Ala Pro Ala Gln Ser Tyr Thr Ala Leu Phe Arg Thr Gln Thr
275 280 285

Ala Pro Gly Asp Gln Gly Ala Pro Trp Thr Glu Glu Leu Leu Ala Gly
290 295 300

Trp Gln Ser Ala Glu Leu Gly Gly Leu His Trp Gly Gln Asp Tyr Glu
305 310 315 320

Phe Lys Val Arg Pro Ser Ser Gly Arg Ala Arg Gly Pro Asp Ser Asn
325 330 335

Val Leu Leu Leu Arg Leu Pro Glu Lys Val Pro Ser Ala Pro Pro Gln
340 345 350

Glu Val Thr Leu Lys Pro Gly Asn Gly Ser Val Leu Val Ser Trp Val
355 360 365

Pro Pro Pro Ala Glu Asn His Asn Gly Ile Ile Arg Gly Tyr Gln Val
370 375 380

Trp Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Pro Pro Ala Asn Trp Thr Val Val
385 390 395 400

Gly Glu Gln Thr Gln Leu Glu Ile Ala Thr Arg Met Pro Gly Ser Tyr
405 410 415

Cys Val Gln Val Ala Ala Val Thr Gly Ala Gly Ala Gly Glu Pro Ser
420 425 430

Ser Pro Val Cys Leu Leu Leu Glu Gln Ala Met Glu Arg Ala Thr Arg
435 440 445

Glu Leu Ser Glu His Gly Pro Trp Thr Leu Glu Gln Leu Arg Ala Thr
450 455 460

Leu Lys Arg Pro Glu Val Ile Ala Thr Cys Gly Val Val Leu Trp Leu
465 470 475 480

Leu Leu Leu Gly Thr Ala Val Cys Ile His Arg Arg Arg Arg Ala Gly
485 490 495

Val His Leu Gly Pro Gly Leu Tyr Arg Tyr Thr Ser Lys Asp Ala Ile
500 505 510

Leu Lys His Arg Met Asp His Ser Asp Ser Gln Trp Leu Ala Asp Thr

```
        515                 520                 525
Trp Arg Ser Thr Ser Gly Ser Arg Asp Leu Ser Ser Ser Ser Ser Leu
    530                 535                 540

Ser Ser Arg Leu Gly Ala Asp Pro Arg Asp Pro Leu Asp Cys Arg Arg
545                 550                 555                 560
Ser Leu Leu Ser Trp Asp Ser Arg Ser Pro Gly Val Pro Leu Leu Leu
                565                 570                 575
Asp Thr Ser Thr Phe Tyr Gly Ser Leu Ile Ala Glu Leu Pro Ser Ser
            580                 585                 590
Pro Leu Ala Arg Pro Ser Pro Gln Val Pro Ala Val Arg Arg Leu Pro
        595                 600                 605

Pro Gln Leu Ala Arg Leu Ser Ser Pro Cys Ser Ser Ser Asp Ser Leu
    610                 615                 620
Cys Ser His Arg Gly Leu Ser Ser Pro Arg Leu Ser Leu Ala Pro Thr
625                 630                 635                 640
Glu Ala Trp Lys Ala Lys Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Val Asn Ser
                645                 650                 655
Ser Pro Leu Leu Arg Gly Ser Gln Pro Leu Glu Leu Arg Ala Cys Glu
            660                 665                 670

Leu Gly Asn Arg Gly Ser Lys Asn Leu Ser Gln Ser Pro Gly Ala Val
        675                 680                 685
Pro Gln Ala Leu Val Ala Trp Arg Ala Leu Gly Pro Lys Leu Leu Ser
    690                 695                 700
Ser Ser Asn Glu Leu Val Thr Arg Pro Leu Pro Pro Ala Pro Leu Phe
705                 710                 715                 720
Pro His Glu Thr Pro Gln Thr Gln Ser Gln Gln Thr Gln Pro Pro Val
                725                 730                 735

Ala Pro Gln Ala Pro Ser Ser Ile Leu Leu Ala Thr Ala Pro Ile Pro
            740                 745                 750
Ile Leu Ser Pro Cys Ser Pro Pro Ser Pro Gln Ala Ser Ser Leu Ser
        755                 760                 765
```

Gly Pro Ser Pro Ala Ser Ser His Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser
770 775 780
Leu Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Leu Thr Pro Glu Glu Val Ala Leu
785 790 795 800

Cys Leu Glu Leu Ser Glu Gly Glu Glu Thr Pro Arg Asn Ser Val Ser
805 810 815
Pro Met Pro Arg Ala Pro Ser Pro Pro Thr Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser
820 825 830
Thr Pro Thr Ala Ser Glu Phe Thr Gly Met Asp Arg Thr Gly Gly Gly
835 840 845
Val Gly Ser Glu Gly Gly Val Leu Leu Cys Pro Pro Arg Pro Cys Leu
850 855 860

Thr Pro Thr Pro Ser Glu Gly Ser Leu Ala Asn Gly Trp Gly Ser Ala
865 870 875 880
Ser Glu Asp Asn Ala Ala Ser Ala Arg Ala Ser Leu Val Ser Ser Ser
885 890 895
Asp Gly Ser Phe Leu Ala Asp Ala His Phe Ala Arg Ala Leu Ala Val
900 905 910
Ala Val Asp Ser Phe Gly Phe Gly Leu Glu Pro Arg Glu Ala Asp Cys
915 920 925

Val Phe Thr Asp Ala Ser Ser Pro Pro Ser Pro Arg Asp Asp Ile Phe
930 935 940
Leu Thr Pro Asn Leu Ser Leu Pro Leu Trp Glu Trp Arg Pro Asp Trp
945 950 955 960
Leu Glu Asp Met Glu Val Asn His Thr Gln Leu Leu Gly Arg Gly Met
965 970 975
Pro Pro Trp Ser Pro Asp Ser Arg Ile Ser Ser Gln Arg Ser Gln Leu
980 985 990

His Cys Pro Val Pro Lys Ala Gly Ala Ser Pro Val Asp Tyr Ser
995 1000 1005

<210> 23

<211> 4845

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atgattgcgg agcccgctca cttttacctg tttggattaa tatgtctctg ttcaggctcc 60

cgtcttgatt acaaggatga cgacgataag cgtcaggaag attttccacc tcgcattgtt 120

gaacaccctt cagacctgat tgtctcaaaa ggagaacctg caactttgaa ctgcaaagct 180

gaaggccgcc ccacacccac tattgaatgg tacaaagggg gagagagagt ggagacagac 240

aaagatgacc ctcgctcaca ccgaatgttg ctgccgagtg gatctttatt tttcttacgt 300

atagtacatg gacggaaaag tagacctgat gaaggagtct atgtctgtgt agcaaggaat 360

taccttggag aggctgtgag ccacaatgca tcgctggaag tagccatact tcgggatgac 420

ttcagacaaa acccttcgga tgtcatggtt gcagtaggag agcctgcagt aatggaatgc 480

caacctccac gaggccatcc tgagcccacc atttcatgga agaaagatgg ctctccactg 540

gatgataaag atgaaagaat aactatacga ggaggaaagc tcatgatcac ttacacccgt 600

aaaagtgacg ctggcaaata tgtttgtgtt ggtaccaata tggttgggga acgtgagagt 660

gaagtagccg agctgactgt cttagagaga ccatcatttg tgaagagacc cagtaacttg 720

gcagtaactg tggatgacag tgcagaattt aaatgtgagg cccgaggtga ccctgtacct 780

acagtacgat ggaggaaaga tgatggagag ctgcccaaat ccagatatga aatccgagat 840

gatcatacct tgaaaattag gaaggtgaca gctggtgaca tgggttcata cacttgtgtt 900

gcagaaaata tggtgggcaa agctgaagca tctgctactc tgactgttca agttgggtct 960

gaacctccac attttgttgt gaaaccccgt gaccaggttg ttgctttggg acggactgta 1020

acttttcagt gtgaagcaac cggaaatcct caaccagcta ttttctggag gagagaaggg 1080

agtcagaatc tacttttctc atatcaacca ccacagtcat ccagccgatt ttcagtctcc 1140

cagactggcg acctcacaat tactaatgtc cagcgatctg atgttggtta ttacatctgc 1200

cagactttaa atgttgctgg aagcatcatc acaaaggcat atttggaagt tacagatgtg 1260

attgcagatc ggcctccccc agttattcga caaggtcctg tgaatcagac tgtagccgtg 1320

gatggcactt tcgtcctcag ctgtgtggcc acaggcagtc cagtgcccac cattctgtgg 1380

agaaaggatg gagtcctcgt ttcaacccaa gactctcgaa tcaaacagtt ggagaatgga 1440

gtactgcaga tccgatatgc taagctgggt gatactggtc ggtacacctg cattgcatca 1500

acccccagtg gtgaagcaac atggagtgct tacattgaag ttcaagaatt tggagttcca 1560

gttcagcctc caagacctac tgacccaaat ttaatcccta gtgccccatc aaaacctgaa 1620

gtgacagatg tcagcagaaa tacagtcaca ttatcgtggc aaccaaattt gaattcagga 1680

gcaactccaa catcttatat tatagaagcc ttcagccatg catctggtag cagctggcag 1740

accgtagcag agaatgtgaa aacagaaaca tctgccatta aaggactcaa acctaatgca 1800

atttaccttt tccttgtgag ggcagctaat gcatatggaa ttagtgatcc aagccaaata 1860

tcagatccag tgaaaacaca agatgtccta ccaacaagtc agggggtgga ccacaagcag 1920

gtccagagag agctgggaaa tgctgttctg cacctccaca accccaccgt cctttcttcc 1980

tcttccatcg aagtgcactg gacagtagat caacagtctc agtatataca aggatataaa 2040

attctctatc ggccatctgg agccaaccac ggagaatcag actggttagt ttttgaagtg 2100

aggacgccag ccaaaaacag tgtggtaatc cctgatctca gaaagggagt caactatgaa 2160

attaaggctc gccctttttt taatgaattt caaggagcag atagtgaaat caagtttgcc 2220

aaaaccctgg aagaagcacc cagtgcccca ccccaaggtg taactgtatc caagaatgat 2280

ggaaacggaa ctgcaattct agttagttgg cagccacctc cagaagacac tcaaaatgga 2340

atggtccaag agtataaggt ttggtgtctg ggcaatgaaa ctcgatacca catcaacaaa 2400

acagtggatg gttccacctt ttccgtggtc attccctttc ttgttcctgg aatccgatac 2460

agtgtggaag tggcagccag cactggggct gggtctgggg taaagagtga gcctcagttc 2520

atccagctgg atgcccatgg aaaccctgtg tcacctgagg accaagtcag cctcgctcag 2580

cagatttcag atgtggtgaa gcagccggcc ttcatagcag gtattggagc agcctgttgg 2640

atcatcctca tggtcttcag catctggctt tatcgacacc gcaagaagag aaacggactt 2700

actagtacat acgcgggtat cagaaaagta acttaccaga gaggaggcga agctgtcagc 2760

agtggaggga ggcctggact tctcaacatc agtgaacctg ccgcgcagcc atggctggca 2820

gacacgtggc ctaatactgg caacaaccac aatgactgct ccatcagctg ctgcacggca 2880

ggcaatggaa acagcgacag caacctcact acctacagtc gcccagctga ttgtatagca 2940

aattataaca accaactgga taacaaacaa acaaatctga tgctccctga gtcaactgtt 3000

tatggtgatg tggaccttag taacaaaatc aatgagatga aaaccttcaa tagcccaaat 3060

ctgaaggatg ggcgttttgt caatccatca gggcagccta ctccttacgc caccactcag 3120

ctcatccagt caaacctcag caacaacatg aacaatggca gcggggactc tggcgagaag 3180

cactggaaac cactgggaca gcagaaacaa gaagtggcac cagttcagta caacatcgtg 3240

gagcaaaaca agctgaacaa agattatcga gcaaatgaca cagttcctcc aactatccca 3300

tacaaccaat catacgacca gaacacagga ggatcctaca acagctcaga ccggggcagt 3360

agtacatctg ggagtcaggg gcacaagaaa ggggcaagaa cacccaaggt accaaaacag 3420

ggtggcatga actgggcaga cctgcttcct cctcccccag cacatcctcc tccacacagc 3480

aatagcgaag agtacaacat ttctgtagat gaaagctatg accaagaaat gccatgtccc 3540

gtgccaccag caaggatgta tttgcaacaa gatgaattag aagaggagga agatgaacga 3600

ggccccactc cccctgttcg gggagcagct tcttctccag ctgccgtgtc ctatagccat 3660

cagtccactg ccactctgac tccctcccca caggaagaac tccagcccat gttacaggat 3720

tgtccagagg agactggcca catgcagcac cagcccgaca ggagacggca gcctgtgagt 3780

cctcctccac caccacggcc gatctcccct ccacatacct atggctacat ttcaggaccc 3840

ctggtctcag atatggatac ggatgcgcca gaagaggaag aagacgaagc cgacatggag 3900

gtagccaaga tgcaaaccag aaggcttttg ttacgtgggc ttgagcagac acctgcctcc 3960

agtgttgggg acctggagag ctctgtcacg gggtccatga tcaacggctg gggctcagcc 4020

tcagaggagg acaacatttc cagcggacgc tccagtgtta gttcttcgga cggctccttt 4080

ttcactgatg ctgactttgc ccaggcagtc gcagcagcgg cagagtatgc tggtctgaaa 4140

gtagcacgac ggcaaatgca ggatgctgct ggccgtcgac attttcatgc gtctcagtgc 4200

cctaggccca caagtcccgt gtctacagac agcaacatga gtgccgccgt aatgcagaaa 4260

accagaccag ccaagaaact gaaacaccag ccaggacatc tgcgcagaga aacctacaca 4320

gatgatcttc caccacctcc tgtgccgcca cctgctataa agtcacctac tgcccaatcc 4380

aagacacagc tggaagtacg acctgtagtg gtgccaaaac tcccttctat ggatgcaaga 4440

acagacagat catcagacag aaaaggaagc agttacaagg ggagagaagt gttggatgga 4500

agacaggttg ttgacatgcg aacaaatcca ggtgatccca gagaagcaca ggaacagcaa 4560

aatgacggga aaggacgtgg aaacaaggca gcaaaacgag accttccacc agcaaagact 4620

catctcatcc aagaggatat tctaccttat tgtagaccta cttttccaac atcaaataat 4680

cccagagatc ccagttcctc aagctcaatg tcatcaagag gatcaggaag cagacaaaga 4740

gaacaagcaa atgtaggtcg aagaaatatt gcagaaatgc aggtacttgg aggatatgaa 4800

agaggagaag ataataatga agaattagag gaaactgaaa gctga 4845

<210> 24

<211> 1614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ile Ala Glu Pro Ala His Phe Tyr Leu Phe Gly Leu Ile Cys Leu

1 5 10 15

Cys Ser Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Arg Gln

20 25 30

Glu Asp Phe Pro Pro Arg Ile Val Glu His Pro Ser Asp Leu Ile Val

35 40 45

Ser Lys Gly Glu Pro Ala Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro

50 55 60

Thr Pro Thr Ile Glu Trp Tyr Lys Gly Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp

65 70 75 80

Lys Asp Asp Pro Arg Ser His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu

85 90 95

Phe Phe Leu Arg Ile Val His Gly Arg Lys Ser Arg Pro Asp Glu Gly

100 105 110

Val Tyr Val Cys Val Ala Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser His

115 120 125

Asn Ala Ser Leu Glu Val Ala Ile Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn

130 135 140

Pro Ser Asp Val Met Val Ala Val Gly Glu Pro Ala Val Met Glu Cys

145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Gly His Pro Glu Pro Thr Ile Ser Trp Lys Lys Asp

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Pro Val Pro Thr Val Arg Trp Arg Lys Asp Asp Gly Glu Leu Pro

260 265 270

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

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

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

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

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Ala Thr Pro Thr Ser Tyr Ile Ile Glu Ala Phe Ser His Ala Ser Gly

565 570 575

Ser Ser Trp Gln Thr Val Ala Glu Asn Val Lys Thr Glu Thr Ser Ala

580 585 590

Ile Lys Gly Leu Lys Pro Asn Ala Ile Tyr Leu Phe Leu Val Arg Ala

595 600 605

Ala Asn Ala Tyr Gly Ile Ser Asp Pro Ser Gln Ile Ser Asp Pro Val

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Gln Arg Glu Leu Gly Asn Ala Val Leu His Leu His Asn Pro Thr

645 650 655

Val Leu Ser Ser Ser Ser Ile Glu Val His Trp Thr Val Asp Gln Gln

660 665 670

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

675 680 685

Asn His Gly Glu Ser Asp Trp Leu Val Phe Glu Val Arg Thr Pro Ala

690 695 700

Lys Asn Ser Val Val Ile Pro Asp Leu Arg Lys Gly Val Asn Tyr Glu

705 710 715 720

Ile Lys Ala Arg Pro Phe Phe Asn Glu Phe Gln Gly Ala Asp Ser Glu

725 730 735

Ile Lys Phe Ala Lys Thr Leu Glu Glu Ala Pro Ser Ala Pro Pro Gln

740 745 750

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

755 760 765

Ser Trp Gln Pro Pro Pro Glu Asp Thr Gln Asn Gly Met Val Gln Glu
770 775 780
Tyr Lys Val Trp Cys Leu Gly Asn Glu Thr Arg Tyr His Ile Asn Lys
785 790 795 800
Thr Val Asp Gly Ser Thr Phe Ser Val Val Ile Pro Phe Leu Val Pro
805 810 815
Gly Ile Arg Tyr Ser Val Glu Val Ala Ala Ser Thr Gly Ala Gly Ser
820 825 830

Gly Val Lys Ser Glu Pro Gln Phe Ile Gln Leu Asp Ala His Gly Asn
835 840 845
Pro Val Ser Pro Glu Asp Gln Val Ser Leu Ala Gln Gln Ile Ser Asp
850 855 860
Val Val Lys Gln Pro Ala Phe Ile Ala Gly Ile Gly Ala Ala Cys Trp
865 870 875 880
Ile Ile Leu Met Val Phe Ser Ile Trp Leu Tyr Arg His Arg Lys Lys
885 890 895

Arg Asn Gly Leu Thr Ser Thr Tyr Ala Gly Ile Arg Lys Val Thr Tyr
900 905 910
Gln Arg Gly Gly Glu Ala Val Ser Ser Gly Gly Arg Pro Gly Leu Leu
915 920 925
Asn Ile Ser Glu Pro Ala Ala Gln Pro Trp Leu Ala Asp Thr Trp Pro
930 935 940
Asn Thr Gly Asn Asn His Asn Asp Cys Ser Ile Ser Cys Cys Thr Ala
945 950 955 960

Gly Asn Gly Asn Ser Asp Ser Asn Leu Thr Thr Tyr Ser Arg Pro Ala
965 970 975
Asp Cys Ile Ala Asn Tyr Asn Asn Gln Leu Asp Asn Lys Gln Thr Asn
980 985 990
Leu Met Leu Pro Glu Ser Thr Val Tyr Gly Asp Val Asp Leu Ser Asn
995 1000 1005
Lys Ile Asn Glu Met Lys Thr Phe Asn Ser Pro Asn Leu Lys Asp

1010 1015 1020

Gly Arg Phe Val Asn Pro Ser Gly Gln Pro Thr Pro Tyr Ala Thr
1025 1030 1035
Thr Gln Leu Ile Gln Ser Asn Leu Ser Asn Asn Met Asn Asn Gly
1040 1045 1050
Ser Gly Asp Ser Gly Glu Lys His Trp Lys Pro Leu Gly Gln Gln
1055 1060 1065
Lys Gln Glu Val Ala Pro Val Gln Tyr Asn Ile Val Glu Gln Asn
1070 1075 1080

Lys Leu Asn Lys Asp Tyr Arg Ala Asn Asp Thr Val Pro Pro Thr
1085 1090 1095
Ile Pro Tyr Asn Gln Ser Tyr Asp Gln Asn Thr Gly Gly Ser Tyr
1100 1105 1110
Asn Ser Ser Asp Arg Gly Ser Ser Thr Ser Gly Ser Gln Gly His
1115 1120 1125
Lys Lys Gly Ala Arg Thr Pro Lys Val Pro Lys Gln Gly Gly Met
1130 1135 1140

Asn Trp Ala Asp Leu Leu Pro Pro Pro Pro Ala His Pro Pro Pro
1145 1150 1155
His Ser Asn Ser Glu Glu Tyr Asn Ile Ser Val Asp Glu Ser Tyr
1160 1165 1170
Asp Gln Glu Met Pro Cys Pro Val Pro Pro Ala Arg Met Tyr Leu
1175 1180 1185
Gln Gln Asp Glu Leu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Arg Gly Pro Thr
1190 1195 1200

Pro Pro Val Arg Gly Ala Ala Ser Ser Pro Ala Ala Val Ser Tyr
1205 1210 1215
Ser His Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro Ser Pro Gln Glu Glu
1220 1225 1230
Leu Gln Pro Met Leu Gln Asp Cys Pro Glu Glu Thr Gly His Met
1235 1240 1245

```
Gln His  Gln Pro Asp Arg Arg  Arg Gln Pro Val Ser  Pro Pro Pro
    1250                 1255                 1260

Pro Pro  Arg Pro Ile Ser Pro  Pro His Thr Tyr Gly  Tyr Ile Ser
    1265                 1270                 1275
Gly Pro  Leu Val Ser Asp Met  Asp Thr Asp Ala Pro  Glu Glu Glu
    1280                 1285                 1290
Glu Asp  Glu Ala Asp Met Glu  Val Ala Lys Met Gln  Thr Arg Arg
    1295                 1300                 1305
Leu Leu  Leu Arg Gly Leu Glu  Gln Thr Pro Ala Ser  Ser Val Gly
    1310                 1315                 1320

Asp Leu  Glu Ser Ser Val Thr  Gly Ser Met Ile Asn  Gly Trp Gly
    1325                 1330                 1335
Ser Ala  Ser Glu Glu Asp Asn  Ile Ser Ser Gly Arg  Ser Ser Val
    1340                 1345                 1350
Ser Ser  Ser Asp Gly Ser Phe  Phe Thr Asp Ala Asp  Phe Ala Gln
    1355                 1360                 1365
Ala Val  Ala Ala Ala Ala Glu  Tyr Ala Gly Leu Lys  Val Ala Arg
    1370                 1375                 1380

Arg Gln  Met Gln Asp Ala Ala  Gly Arg Arg His Phe  His Ala Ser
    1385                 1390                 1395
Gln Cys  Pro Arg Pro Thr Ser  Pro Val Ser Thr Asp  Ser Asn Met
    1400                 1405                 1410
Ser Ala  Ala Val Met Gln Lys  Thr Arg Pro Ala Lys  Lys Leu Lys
    1415                 1420                 1425
His Gln  Pro Gly His Leu Arg  Arg Glu Thr Tyr Thr  Asp Asp Leu
    1430                 1435                 1440

Pro Pro  Pro Pro Val Pro Pro  Pro Ala Ile Lys Ser  Pro Thr Ala
    1445                 1450                 1455
Gln Ser  Lys Thr Gln Leu Glu  Val Arg Pro Val Val  Val Pro Lys
    1460                 1465                 1470
Leu Pro  Ser Met Asp Ala Arg  Thr Asp Arg Ser Ser  Asp Arg Lys
```

1475 1480 1485

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

1490 1495 1500

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

1505 1510 1515

Gln Gln Asn Asp Gly Lys Gly Arg Gly Asn Lys Ala Ala Lys Arg

1520 1525 1530

Asp Leu Pro Pro Ala Lys Thr His Leu Ile Gln Glu Asp Ile Leu

1535 1540 1545

Pro Tyr Cys Arg Pro Thr Phe Pro Thr Ser Asn Asn Pro Arg Asp

1550 1555 1560

Pro Ser Ser Ser Ser Ser Met Ser Ser Arg Gly Ser Gly Ser Arg

1565 1570 1575

Gln Arg Glu Gln Ala Asn Val Gly Arg Arg Asn Ile Ala Glu Met

1580 1585 1590

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

1595 1600 1605

Leu Glu Glu Thr Glu Ser

1610

<210> 25

<211> 4605

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 25

atgagtctgc tgatgtttac acaactactg ctctgtggat ttttatatgt tcgggttgat 60

ggatcgcgtc ttcgccagga ggactttccc ccgcggattg tggagcatcc ttccgatgtc 120

atcgtctcta agggcgagcc cacgactctg aactgcaagg cggagggccg gccaacgccc 180

accattgagt ggtacaaaga tggggagcga gtggagactg acaaggacga tccccggtcc 240

cacaggatgc ttctgcccag cggatcctta ttcttcttgc gcatcgtgca cgggcgcagg 300

agtaaacctg atgaaggaag ctacgtttgt gttgcgagga actatcttgg tgaagcagtg 360

agtcgaaatg cgtctctgga agtggcattg ttacgagatg acttccgaca aaaccccaca 420

gatgttgtag tggcagctgg agagcctgca atcctggagt gccagcctcc ccggggacac 480

ccagaaccca ccatctactg gaaaaaagac aaagttcgaa ttgatgacaa ggaagaaaga 540

ataagtatcc gtggtggaaa actgatgatc tccaatacca ggaaaagtga tgcagggatg 600

tatacttgtg ttggtaccaa tatggtggga gaaagggaca gtgacccagc agagctgact 660

gtctttgaac gacccacatt tctcaggagg ccaattaacc aggtggtact ggaggaagaa 720

gctgtagaat ttcgttgtca agtccaagga gatcctcaac caactgtgag gtggaaaaag 780

gatgatgcag acttgccaag aggaaggtat gacatcaaag acgattacac actaagaatt 840

aaaaagacca tgagtacaga tgaaggcacc tatatgtgta ttgctgagaa tcgggttgga 900

aaaatggaag cctctgctac actcaccgtc cgagctcgcc ctgttgctcc cccacagttt 960

gtggttcggc caagagatca gattgttgct caaggtcgaa cagtgacatt tccctgtgaa 1020

actaaaggaa acccacagcc agctgttttt tggcagaaag aaggcagcca gaacctactt 1080

ttcccaaacc aaccccagca gcccaacagt agatgctcag tgtcaccaac tggagacctc 1140

acaatcacca acattcaacg ttccgacgcg ggttactaca tctgccaggc tttaactgtg 1200

gcaggaagca ttttagcaaa agctcaactg gaggttactg atgttttgac agatagacct 1260

ccacctataa ttctacaagg cccagccaac caaacgctgg cagtggatgg tacagcgtta 1320

ctgaaatgta aagccactgg tgatcctctt cctgtaatta gctggttaaa ggagggattt 1380

acttttccgg gtagagatcc aagagcaaca attcaagagc aaggcacact gcagattaag 1440

aatttacgga tttctgatac tggcacttat acttgtgtgg ctacaagttc aagtggagag 1500

acttcctgga gtgcagtgct ggatgtgaca gagtctggag caacaatcag taaaaactat 1560

gatttaagtg acctgccagg gccaccatcc aaaccgcagg tcactgatgt tactaagaac 1620

agtgtcacct tgtcctggca gccaggtacc cctggaaccc ttccagcaag tgcatatatc 1680

attgaggctt tcagccaatc agtgagcaac agctggcaga ccgtggcaaa ccatgtaaag 1740

accaccctct atactgtaag aggactgcgg cccaatacaa tctacttatt catggtcaga 1800

gcgatcaacc cccaaggtct cagtgaccca agtcccatgt cagatcctgt gcgcacacaa 1860

gatatcagcc caccagcaca aggagtggac cacaggcaag tgcagaaaga gctaggagat 1920

gtccttgtcc gtcttcataa tccagttgtg ctgactccca ccacggttca ggtcacatgg 1980

acggttgatc gccaacccca gtttatccaa ggctaccgag tgatgtatcg tcagacttca 2040

ggtctgcagg cgacatcttc gtggcagaat ttagatgcca aagtcccgac tgaacgaagt 2100

gctgtcttag tcaacctgaa aaaggggtg acttatgaaa ttaaagtacg gccatatttt 2160

aatgagttcc aaggaatgga tagtgaatct aaaacggttc gtactactga agaagcccca 2220

agtgccccac cacagtctgt cactgtactg acagttggaa gctacaatag cacaagtatt 2280

agtgtttcct gggatcctcc tcctccagat caccagaatg gaattatcca agaatacaag 2340

atctggtgtc taggaaatga aacgcgattc catatcaaca aaactgtgga tgcagccatt 2400

cggtccgtaa taattggtgg attattccca ggtattcaat accgggtaga ggttgcagct 2460

agtaccagtg caggggttgg agtaaagagt gagccacagc caataataat cgggagacgc 2520

aatgaagttg tcattactga aaacaataac agcataactg agcaaatcac tgatgtggtg 2580

aagcaaccag cctttatagc tggtattggt ggtgcctgct gggtaattct gatgggtttt 2640

agcatatggt tgtattggcg aagaaagaag aggaagggac tcagtaatta tgctgttacg 2700

tttcaaagag gagatggagg actaatgagc aatggaagcc gtccaggtct tctcaatgct 2760

ggtgatccca gctatccatg gcttgctgat tcttggccag ccacgagctt gccagtaaat 2820

aatagcaaca gtggcccaaa tgagattgga aattttggcc gtggagatgt gctgccacca 2880

gttccaggcc aaggggataa aacagcaacg atgctctcag atggagccat ttatagtagc 2940

attgacttca ctaccaaaac cagttacaac agttccagcc aaataacaca ggctacccca 3000

tatgccacga cacagatctt gcattccaac agcatacatg aattggctgt cgatctgcct 3060

gatccacaat ggaaaagctc aattcagcaa aaaacagatc tgatgggatt tggttattct 3120

ctacctgatc agaacaaagg taacaatggt gggaaaggtg gaaaaaagaa gaaaaataaa 3180

aactcttcta aaccacagaa aaacaatgga tccacttggg ccaatgtccc tctacctccc 3240

cccccagtcc agccccttcc tggcacggag ctggaacact atgcagtgga acaacaagaa 3300

aatggctatg acagtgatag ctggtgccca ccattgccag tacaaactta cttacaccaa 3360

ggtctggaag atgaactgga agaagatgat gatagggtcc caacacctcc tgttcgaggc 3420

gtggcttctt ctcctgctat ctcctttgga cagcagtcca ctgcaactct tactccatcc 3480

ccacgggaag agatgcaacc catgctgcag gctcacctgg atgagttgac aagagcctat 3540

cagtttgata tagcaaaaca aacatggcac attcaaagca ataatcaacc tccacagcct 3600

ccagttccac cgttaggtta tgtgtctgga gccttgattt ctgatttgga aacggatgtt 3660

gcagatgatg atgccgacga cgaagaggaa gctttagaaa tccccaggcc cctgagagca 3720

ctggaccaga ctcctggatc cagcatggac aatctagaca gctctgtgac aggttcaatg 3780

gtaaatggat ggggctctgc atctgatgag gatcgtaact tttctagtca tagatctagt 3840

gtaggtagct cctcagatgg ctctatcttt gccagcggca gttttgcaca agcactggtg 3900

gcagcagcag ataaagctgg ttttaggctg gatggaacca gccttacaag aacaggaaaa 3960

gcctttacct cctctcaaag acctcgacct accagcccat tttctactga cagtaacacc 4020

agtgcagccc tgagtcaaag tcagaggcct cggcccacta aaaaacacaa gggagggcgg 4080

atggaccaac aaccagcatt gcctcatcga agggaaggaa tgacagatga tcttccacca 4140

ccaccagatc ccccgccagg tcagggttta aggcagcaaa taggcccgag ccagcaggct 4200

ggtaacgtgg aaaactcagc agagagaaaa ggaagctctc tagagagaca acatgcatcc 4260
agcttagaag acacaaagag ctcattggat tgtccagcta gaacctccct agagtggcag 4320
cgacaaaccc aggaatggat aagctccaca gaacgacaag aagatatacg gaaagcccca 4380
cacaaacaag gtgtcggatc agaggaggcc ttggtgccct atagcaagcc cagtttccca 4440
tctccaggtg gccacagctc atcaggaaca gcttcttcta agggatccac tggacctagg 4500
aaaaccgagg tgttgagagc aggccaccag cgcaatgcca gcgaccttct tgacatagga 4560
tatatgggct ccaacagtca aggacagttt acaggtgaat tatag 4605

<210> 26
<211> 1534
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

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

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

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

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

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

370 375 380
Ile Gln Arg Ser Asp Ala Gly Tyr Tyr Ile Cys Gln Ala Leu Thr Val

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Asp Arg Pro Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr

420 425 430

Leu Ala Val Asp Gly Thr Ala Leu Leu Lys Cys Lys Ala Thr Gly Asp

435 440 445

Pro Leu Pro Val Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly

450 455 460

Arg Asp Pro Arg Ala Thr Ile Gln Glu Gln Gly Thr Leu Gln Ile Lys

465 470 475 480

Asn Leu Arg Ile Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser

485 490 495

Ser Ser Gly Glu Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser

500 505 510

Gly Ala Thr Ile Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro

515 520 525

Pro Ser Lys Pro Gln Val Thr Asp Val Thr Lys Asn Ser Val Thr Leu

530 535 540

Ser Trp Gln Pro Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile

545 550 555 560

Ile Glu Ala Phe Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala

565 570 575

Asn His Val Lys Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn

580 585 590

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

595 600 605

Asp Pro Ser Pro Met Ser Asp Pro Val Arg Thr Gln Asp Ile Ser Pro

610 615 620

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

625 630 635 640

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

690 695 700
Asn Leu Lys Lys Gly Val Thr Tyr Glu Ile Lys Val Arg Pro Tyr Phe
705 710 715 720
Asn Glu Phe Gln Gly Met Asp Ser Glu Ser Lys Thr Val Arg Thr Thr
725 730 735
Glu Glu Ala Pro Ser Ala Pro Pro Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Val
740 745 750
Gly Ser Tyr Asn Ser Thr Ser Ile Ser Val Ser Trp Asp Pro Pro Pro

755 760 765
Pro Asp His Gln Asn Gly Ile Ile Gln Glu Tyr Lys Ile Trp Cys Leu
770 775 780
Gly Asn Glu Thr Arg Phe His Ile Asn Lys Thr Val Asp Ala Ala Ile
785 790 795 800
Arg Ser Val Ile Ile Gly Gly Leu Phe Pro Gly Ile Gln Tyr Arg Val
805 810 815
Glu Val Ala Ala Ser Thr Ser Ala Gly Val Gly Val Lys Ser Glu Pro

820 825 830
Gln Pro Ile Ile Ile Gly Arg Arg Asn Glu Val Val Ile Thr Glu Asn
835 840 845
Asn Asn Ser Ile Thr Glu Gln Ile Thr Asp Val Val Lys Gln Pro Ala
850 855 860
Phe Ile Ala Gly Ile Gly Gly Ala Cys Trp Val Ile Leu Met Gly Phe
865 870 875 880
Ser Ile Trp Leu Tyr Trp Arg Arg Lys Lys Arg Lys Gly Leu Ser Asn

885 890 895

Tyr Ala Val Thr Phe Gln Arg Gly Asp Gly Gly Leu Met Ser Asn Gly

900 905 910

Ser Arg Pro Gly Leu Leu Asn Ala Gly Asp Pro Ser Tyr Pro Trp Leu

915 920 925

Ala Asp Ser Trp Pro Ala Thr Ser Leu Pro Val Asn Asn Ser Asn Ser

930 935 940

Gly Pro Asn Glu Ile Gly Asn Phe Gly Arg Gly Asp Val Leu Pro Pro

945 950 955 960

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

965 970 975

Ile Tyr Ser Ser Ile Asp Phe Thr Thr Lys Thr Ser Tyr Asn Ser Ser

980 985 990

Ser Gln Ile Thr Gln Ala Thr Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Ile Leu His

995 1000 1005

Ser Asn Ser Ile His Glu Leu Ala Val Asp Leu Pro Asp Pro Gln

1010 1015 1020

Trp Lys Ser Ser Ile Gln Gln Lys Thr Asp Leu Met Gly Phe Gly

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

Gly Lys Lys Lys Lys Asn Lys Asn Ser Ser Lys Pro Gln Lys Asn

1055 1060 1065

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

1070 1075 1080

Gln Pro Leu Pro Gly Thr Glu Leu Glu His Tyr Ala Val Glu Gln

1085 1090 1095

Gln Glu Asn Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Trp Cys Pro Pro Leu Pro

1100 1105 1110

Val Gln Thr Tyr Leu His Gln Gly Leu Glu Asp Glu Leu Glu Glu

1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

Pro Ser Pro Arg Glu Glu Met Gln Pro Met Leu Gln Ala His Leu

1160 1165 1170

Asp Glu Leu Thr Arg Ala Tyr Gln Phe Asp Ile Ala Lys Gln Thr

1175 1180 1185

Trp His Ile Gln Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro Pro Val Pro

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

Asp Val Ala Asp Asp Asp Ala Asp Asp Glu Glu Glu Ala Leu Glu

1220 1225 1230

Ile Pro Arg Pro Leu Arg Ala Leu Asp Gln Thr Pro Gly Ser Ser

1235 1240 1245

Met Asp Asn Leu Asp Ser Ser Val Thr Gly Ser Met Val Asn Gly

1250 1255 1260

Trp Gly Ser Ala Ser Asp Glu Asp Arg Asn Phe Ser Ser His Arg

1265 1270 1275

Ser Ser Val Gly Ser Ser Ser Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Gly

1280 1285 1290

Ser Phe Ala Gln Ala Leu Val Ala Ala Ala Asp Lys Ala Gly Phe

1295 1300 1305

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

1310 1315 1320

Ser Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr Ser Pro Phe Ser Thr Asp Ser

1325 1330 1335

Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ser Gln Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr

1340 1345 1350

Lys Lys His Lys Gly Gly Arg Met Asp Gln Gln Pro Ala Leu Pro

1355 1360 1365

His Arg Arg Glu Gly Met Thr Asp Asp Leu Pro Pro Pro Pro Asp

1370 1375 1380

Pro Pro Pro Gly Gln Gly Leu Arg Gln Gln Ile Gly Pro Ser Gln

1385 1390 1395

Gln Ala Gly Asn Val Glu Asn Ser Ala Glu Arg Lys Gly Ser Ser

1400 1405 1410

Leu Glu Arg Gln His Ala Ser Ser Leu Glu Asp Thr Lys Ser Ser

1415 1420 1425

Leu Asp Cys Pro Ala Arg Thr Ser Leu Glu Trp Gln Arg Gln Thr

1430 1435 1440

Gln Glu Trp Ile Ser Ser Thr Glu Arg Gln Glu Asp Ile Arg Lys

1445 1450 1455

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

1460 1465 1470

Tyr Ser Lys Pro Ser Phe Pro Ser Pro Gly Gly His Ser Ser Ser

1475 1480 1485

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

1490 1495 1500

Val Leu Arg Ala Gly His Gln Arg Asn Ala Ser Asp Leu Leu Asp

1505 1510 1515

Ile Gly Tyr Met Gly Ser Asn Ser Gln Gly Gln Phe Thr Gly Glu

1520 1525 1530

Leu

<210> 27

<211> 4161

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgctgcgct acctgctgaa aacgctgctg cagatgaact tgttcgcgga ctctctggcc 60

ggggacatct ccaactccag cgagctgctc ttgggcttca actcctcgct ggcggcgctc 120

aaccacaccc tgctgcctcc cggcgatccc tctctcaacg ggtcaagggt aggaccggag 180

gacgctatgc cccgcatcgt ggagcagccg ccagatctgc tggtctcccg aggcgagccc 240

gccacgttgc cctgccgcgc tgaaggccga ccccgaccca acattgagtg gtacaagaac 300

ggggcgcgtg tggccactgt gcgggaggat ccgcgtgcgc accgcctgct gctgcccagc 360

ggcgccctct tcttcccgcg catcgtgcac gggcgccgcg cgcggccgga cgaaggtgtc 420

tacacttgcg tggctcgcaa ctacctgggg gcagcagcga gcagaaacgc ctcgctggaa 480

gtggcagtcc tccgtgatga tttccggcag tctcctggaa acgtggtggt ggcagtgggg 540

gagccagcag tactggaatg cgtgcccccc cgcggccacc cggagccttc cgtgtcctgg 600

aggaaggacg gtgcaagact caaggaagag gaaggaagga tcacgatccg tggagggaag 660

ctgatgatgt cacatacact caagagcgat gcaggcatgt atgtgtgcgt agcctccaac 720

atggcgggag aacgggagag tgcggcagct gaagtcatgg tactggagcg tccctcattc 780

ctgcgcagac cagtgaatca ggtggtcctg gctgatgccc ctgtgacttt cctatgtgag 840

gtgaaggggg atcccccacc tcgtctacgc tggcgcaagg aggatgggga actgcccaca 900

ggcaggtatg agatccggag tgaccacagc ctttggattg ggcatgtgag tgccgaagat 960

gagggaacgt acacctgtgt ggcggagaac agtgtgggcc gcgctgaagc atctggctcc 1020

ctcagtgttc acgtcccacc ccagttggtg acccagcccc aggaccagat ggcagctcct 1080

ggagagagcg tggctttcca gtgcgagacc aaaggaaacc ccccacctgc catcttctgg 1140

cagaaggagg ggagtcaggt cctgcttttc cccagtcagt cacttcagcc gacggggcgc 1200

ttctcagtgt ctccaagagg ccaacttaac atcaccgcgg tgcagcgtgg ggatgctggg 1260

tactacgtgt gccaggctgt cagtgtggct ggcagcatcc tggccaaggc cctgctggag 1320

ataaaaggag cctctttgga tgggctgcct cctgtcatcc tccagggacc agccaatcag 1380

acgctggtgc ttggctcctc cgtgtggctg ccctgcagag tgactgggaa ccctcaaccc 1440

agtgtccgat ggaagaagga tgggcagtgg ctgcaggggg atgacctcca gttcaagaca 1500

atggccaacg gtaccctgta catcgccaat gtgcaggaga tggacatggg cttctacagc 1560

tgcgtggcca agagttccac aggggaagcc acatggagcg gctggcttaa gatgcgggaa 1620

gactggggag tatcaccaga ccccctaca gaacccagtt cccctccggg ggctccctct 1680

cagccagtgg tcactgagat caccaagaac agcattaccc tgacctggaa gcccaaccca 1740

caaactgggg ctgcagtcac gtcttatgtg atagaggcct tcagcccagc agctggcaac 1800

acatggcgta ctgtggcaga tggcgtgcag ctggagacac acacagtcag cggtctgcag 1860

cccaatacca tctacctgtt tctggttcga gcagtgggag cctggggcct cagtgagccc 1920

agccccgtct ctgagcctgt ccgtacacag gatagcagcc cctctaggcc agtggaggac 1980

ccatggagag gccagcaggg actggcggaa gtggctgtgc gcctgcagga gcccatagtc 2040

ctgggacccc ggaccctgca ggtgtcctgg actgtggatg gcccagtcca gctggtgcaa 2100

ggtttccggg tgtcttggag ggtagcaggc cctgagggag gaagctggac aatgttggac 2160

ctacagtccc caagccagca aagtactgtg ctaagaggac tccctccagg gacccaaatc 2220

cagatcaagg tgcaagccca aggccaggag gggctggggg ctgaaagcct ctctgtgacc 2280

aggagcattc ctgaggaggc ccccagtggc cccccacagg gagtggcggt ggccttgggg 2340

ggtgatggca acagcagtat cactgtgtcc tgggaacctc cactcccctc ccagcaaaat 2400

ggggtcatca cggaatacca gatctggtgc ctgggcaatg agagccgctt tcacctcaat 2460

cgatctgcag caggctgggc acgctccgca atgctccgag gactggtgcc cggtctcctc 2520

tatcgaaccc tggtcgcggc ggccaccagc gcaggcgtgg gcgtgcccag tgccccagtg 2580

ctggtgcagc tgccgtcccc gccggacctg gagcccgggc tggaggtggg cgcggggctg 2640

gcggtgcggc tggcgagggt gctgcgggag cccgccttcc tcgcgggcag cggcgcagcc 2700

tgcggggcgc tgcttctcgg gctctgcgcc gccctctact ggcgccggaa acagcgcaaa 2760

gagctcagcc actacacggc ctcttttgcc tacacaccgg cagtgtcctt cccgcactca 2820

gagggcctct ctggagccag ttccaggcca cccatgggcc ttggccccgc cccctactca 2880

tggctggcag attcgtggcc ccacccatct cgaagcccct cggcccagga acccagggga 2940

agctgctgcc ctagcaatcc tgacccggac gacagatatt acaacgaagc gggaatctcc 3000

ctgtatctag ctcagacggc caggggcacg gccgcccctg gcgagggtcc tgtctatagc 3060

accattgacc cagcgggggа ggagctgcag accttccatg ggggcttccc ccaacatccc 3120

tcaggagatc tgggtccctg gagccagtac gctcctccag agtggagcca gggggacagt 3180

ggagccaagg gaggcaaagt gaagcttctg gggaaacctg tgcagatgcc ctctctgaac 3240

tggccagaag ccctgccccc acctcctcct tcttgtgaac tgagctgcct agaagggccg 3300

gaggaggagc tggagggcag ctcagagcca gaggagtggt gcccgccaat gcctgagaga 3360

agtcacctga cggagcccag ctccagtgga gggtgcctgg tcaccccatc ccgaagggaa 3420

acccccctctc ccacaccttc ctatggacag cagtccacag ccactcttac accctcacct 3480

cctgaccctc cccagccccc aactgacatg ccccatctcc atcagatgcc caggagggtg 3540

ccccttgggc cgagttcccc tctcagtgta tcccagccca tgctgggcat ccgtgaagcg 3600

aggcctgctg gcttgggtgc tggccctgca gcctcacccc acctcagccc cagtcctgcc 3660

cctagcacag ccagcagtgc cccaggcaga acctggcagg ggaatgggga gatgactccc 3720

ccacttcaag gaccccgtgc tcgattccgg aagaaaccca aggctcttcc ctacaggagg 3780

gagaacagtc ctggggactt gcccccacca cccttgccac cgccagagga agaggcgagc 3840

tgggccctag agctgagggc agcaggcagc atgtcctccc tggagcggga gcgcagtggg 3900

gagaggaaag cggtccaggc cgtgcccctg gcagcccagc gggtgctcca cccagatgaa 3960

gaggcctggc tcccatacag cagaccaagc ttcctgtccc ggggccaggg caccagcaca 4020

tgttccacgg ccggcagcaa ctcttccagg ggctccagca gctctagggg ctcccggggc 4080

cctggccgga gccggagtcg gagtcagagc cggagccaga gccaaaggcc aggacagaaa 4140

cgccgagagg aaccaagatg a 4161

<210> 28

<211> 1386

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Leu Arg Tyr Leu Leu Lys Thr Leu Leu Gln Met Asn Leu Phe Ala

1 5 10 15

Asp Ser Leu Ala Gly Asp Ile Ser Asn Ser Ser Glu Leu Leu Leu Gly

20 25 30

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

35 40 45

Asp Pro Ser Leu Asn Gly Ser Arg Val Gly Pro Glu Asp Ala Met Pro

50 55 60

Arg Ile Val Glu Gln Pro Pro Asp Leu Leu Val Ser Arg Gly Glu Pro

65 70 75 80

Ala Thr Leu Pro Cys Arg Ala Glu Gly Arg Pro Arg Pro Asn Ile Glu

85 90 95

Trp Tyr Lys Asn Gly Ala Arg Val Ala Thr Val Arg Glu Asp Pro Arg

100 105 110

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

115 120 125

Val His Gly Arg Arg Ala Arg Pro Asp Glu Gly Val Tyr Thr Cys Val

130 135 140

Ala Arg Asn Tyr Leu Gly Ala Ala Ala Ser Arg Asn Ala Ser Leu Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Ala Val Gly Glu Pro Ala Val Leu Glu Cys Val Pro Pro Arg Gly

180 185 190

His Pro Glu Pro Ser Val Ser Trp Arg Lys Asp Gly Ala Arg Leu Lys

195 200 205

Glu Glu Glu Gly Arg Ile Thr Ile Arg Gly Gly Lys Leu Met Met Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Ala Gly Glu Arg Glu Ser Ala Ala Ala Glu Val Met Val Leu Glu

245 250 255

Arg Pro Ser Phe Leu Arg Arg Pro Val Asn Gln Val Val Leu Ala Asp

260 265 270

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

275 280 285

Leu Arg Trp Arg Lys Glu Asp Gly Glu Leu Pro Thr Gly Arg Tyr Glu

290 295 300

Ile Arg Ser Asp His Ser Leu Trp Ile Gly His Val Ser Ala Glu Asp

305 310 315 320

Glu Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Glu Asn Ser Val Gly Arg Ala Glu

325 330 335

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

340 345 350

Pro Gln Asp Gln Met Ala Ala Pro Gly Glu Ser Val Ala Phe Gln Cys

355 360 365

Glu Thr Lys Gly Asn Pro Pro Pro Ala Ile Phe Trp Gln Lys Glu Gly

370 375 380

Ser Gln Val Leu Leu Phe Pro Ser Gln Ser Leu Gln Pro Thr Gly Arg

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Asp Ala Gly Tyr Tyr Val Cys Gln Ala Val Ser Val Ala Gly Ser

420 425 430

Ile Leu Ala Lys Ala Leu Leu Glu Ile Lys Gly Ala Ser Leu Asp Gly

435 440 445

Leu Pro Pro Val Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Val Leu

450 455 460

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

465 470 475 480

Ser Val Arg Trp Lys Lys Asp Gly Gln Trp Leu Gln Gly Asp Asp Leu

485 490 495

Gln Phe Lys Thr Met Ala Asn Gly Thr Leu Tyr Ile Ala Asn Val Gln

500 505 510

Glu Met Asp Met Gly Phe Tyr Ser Cys Val Ala Lys Ser Ser Thr Gly

515 520 525

Glu Ala Thr Trp Ser Gly Trp Leu Lys Met Arg Glu Asp Trp Gly Val

530 535 540

Ser Pro Asp Pro Pro Thr Glu Pro Ser Ser Pro Pro Gly Ala Pro Ser

545 550 555 560

Gln Pro Val Val Thr Glu Ile Thr Lys Asn Ser Ile Thr Leu Thr Trp

565 570 575

Lys Pro Asn Pro Gln Thr Gly Ala Ala Val Thr Ser Tyr Val Ile Glu

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Tyr Leu Phe Leu Val Arg Ala Val Gly Ala Trp Gly Leu Ser Glu Pro

625 630 635 640

Ser Pro Val Ser Glu Pro Val Arg Thr Gln Asp Ser Ser Pro Ser Arg

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Ser Trp Thr Val Asp Gly Pro Val Gln Leu Val Gln Gly Phe Arg Val

690 695 700

Ser Trp Arg Val Ala Gly Pro Glu Gly Gly Ser Trp Thr Met Leu Asp

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

Ser Gly Pro Pro Gln Gly Val Ala Val Ala Leu Gly Gly Asp Gly Asn

770 775 780

Ser Ser Ile Thr Val Ser Trp Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Gln Asn

785 790 795 800

Gly Val Ile Thr Glu Tyr Gln Ile Trp Cys Leu Gly Asn Glu Ser Arg

805 810 815

Phe His Leu Asn Arg Ser Ala Ala Gly Trp Ala Arg Ser Ala Met Leu

820 825 830

Arg Gly Leu Val Pro Gly Leu Leu Tyr Arg Thr Leu Val Ala Ala Ala

835 840 845

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

850 855 860

Pro Ser Pro Pro Asp Leu Glu Pro Gly Leu Glu Val Gly Ala Gly Leu

865 870 875 880

Ala Val Arg Leu Ala Arg Val Leu Arg Glu Pro Ala Phe Leu Ala Gly

885 890 895

Ser Gly Ala Ala Cys Gly Ala Leu Leu Leu Gly Leu Cys Ala Ala Leu

900 905 910

Tyr Trp Arg Arg Lys Gln Arg Lys Glu Leu Ser His Tyr Thr Ala Ser

915 920 925

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

930 935 940

Gly Ala Ser Ser Arg Pro Pro Met Gly Leu Gly Pro Ala Pro Tyr Ser

945 950 955 960

Trp Leu Ala Asp Ser Trp Pro His Pro Ser Arg Ser Pro Ser Ala Gln

965 970 975

Glu Pro Arg Gly Ser Cys Cys Pro Ser Asn Pro Asp Pro Asp Asp Arg

980 985 990

Tyr Tyr Asn Glu Ala Gly Ile Ser Leu Tyr Leu Ala Gln Thr Ala Arg

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Pro Ala Gly Glu Glu Leu Gln Thr Phe His Gly Gly Phe Pro Gln

1025 1030 1035

His Pro Ser Gly Asp Leu Gly Pro Trp Ser Gln Tyr Ala Pro Pro

1040 1045 1050

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

1055 1060 1065

Leu Leu Gly Lys Pro Val Gln Met Pro Ser Leu Asn Trp Pro Glu

1070 1075 1080

Ala Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ser Cys Glu Leu Ser Cys Leu Glu

1085 1090 1095

Gly Pro Glu Glu Glu Leu Glu Gly Ser Ser Glu Pro Glu Glu Trp

1100 1105 1110

Cys Pro Pro Met Pro Glu Arg Ser His Leu Thr Glu Pro Ser Ser

1115 1120 1125

Ser Gly Gly Cys Leu Val Thr Pro Ser Arg Arg Glu Thr Pro Ser

1130 1135 1140

Pro Thr Pro Ser Tyr Gly Gln Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro

1145 1150 1155

Ser Pro Pro Asp Pro Pro Gln Pro Pro Thr Asp Met Pro His Leu

1160 1165 1170

His Gln Met Pro Arg Arg Val Pro Leu Gly Pro Ser Ser Pro Leu

1175 1180 1185

Ser Val Ser Gln Pro Met Leu Gly Ile Arg Glu Ala Arg Pro Ala

1190 1195 1200

Gly Leu Gly Ala Gly Pro Ala Ala Ser Pro His Leu Ser Pro Ser

1205 1210 1215

Pro Ala Pro Ser Thr Ala Ser Ser Ala Pro Gly Arg Thr Trp Gln

1220 1225 1230

Gly Asn Gly Glu Met Thr Pro Pro Leu Gln Gly Pro Arg Ala Arg

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

Pro Gly Asp Leu Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu

1265 1270 1275

Ala Ser Trp Ala Leu Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ser Met Ser Ser

1280 1285 1290

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

1295 1300 1305

Pro Leu Ala Ala Gln Arg Val Leu His Pro Asp Glu Glu Ala Trp

1310 1315 1320

Leu Pro Tyr Ser Arg Pro Ser Phe Leu Ser Arg Gly Gln Gly Thr

1325 1330 1335

Ser Thr Cys Ser Thr Ala Gly Ser Asn Ser Ser Arg Gly Ser Ser

1340 1345 1350

Ser Ser Arg Gly Ser Arg Gly Pro Gly Arg Ser Arg Ser Arg Ser

1355 1360 1365

Gln Ser Arg Ser Gln Ser Gln Arg Pro Gly Gln Lys Arg Arg Glu

1370 1375 1380

Glu Pro Arg

1385

<210> 29

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-8 promoter region

<400> 29

gataaggaac aaataggaag tgtgatgact caggtttgcc ctgaggggat gggccatcag 60

ttgcaaatcg tggaatttcc tctgacataa tgaaaagatg agggtgcata agttctctag 120

tagggtgatg atataaaaag ccaccggagc actccataag gcacaaactt tcagagacag 180

cagagcacac aagct 195

<210> 30

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 30

gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt acctatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtaatg gtggtactta cacctactat 180

ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccgagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtgc aagactaatc 300

tactatgatt accttgacta ctggggccac ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 32

gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacttccaga aaccaggcca gtctccacag ctcctgatct acagggtttc caaccgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttcggagtt tatttctgcc tccaagttac tcatgtcccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ct 342

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Ala

<210> 34

<211> 449

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagacccag gtgttcatct ccctgctgct 60

gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc 120

cgtgttcatc ttcccccccct ccgacgagca gctgaagtcc ggcaccgcct ccgtggtgtg 180

cctgctgaat aacttctacc ccagagaggc caaggtgcag tggaaggtgg acaacgccct 240

gcagtccggg aactcccagg agagcgtgac cgagcaggac agcaaggaca gcacctacag 300

cctgagcagc accctgaccc tgagcaaagc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg 360

cgaggtgacc caccagggcc tgagctcccc cgtcaccaag agcttcaaca gggggggagtg 420

ttaggggccc gtttaaacgg gggaggcta 449

<210> 35

<211> 1132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human H-chain signal and IgG1 constant DNA

<400> 35

gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttcctcctgc tggtggcagc 60

tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc ctccaccaag 120

ggcccaagcg tcttcccccc ggcaccctcc tccaagagca cctctggcgg cacagccgcc 180

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaacccgtga ccgtgagctg gaactcaggc 240

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctgc agtcctcagg actctactcc 300

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 360

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 420

aaaactcaca catgcccacc ctgcccagca cctgaactcc tgggggggacc ctcagtcttc 480

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 540

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 600

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccc cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg 660

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 720

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggc 780

cagccccggg aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 840

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 900

gagagcaatg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ctcccgtgct ggactccgac 960

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggcaac 1020

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacaccca gaagagcctc 1080

tccctgtctc ccggcaaatg agatatcggg cccgtttaaa cgggggaggc ta 1132

<210> 36

<211> 1118

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gcctccggac tctagagcca ccatgaaaca cctgtggttc ttcctcctgc tggtggcagc 60

tcccagatgg gtgctgagcc aggtgcaatt gtgcaggcgg ttagctcagc cagcaccaag 120

ggcccttccg tgttccctct ggcccccttgt agccgttcca ccagcgagtc caccgccgcc 180

cttggctgtc tggtgaagga ctacttccct gagcctgtga ccgtgagctg gaactccgga 240

gcccttacca gcggcgtgca caccttccct gccgtgctgc agtccagcgg cctttactcc 300

ctgagctccg tggtgaccgt gcctagctcc aacttcggca cccaaaccta cacctgtaac 360

gtggaccaca agcctagcaa caccaaggtg gacaagaccg tggagcgtaa gtgttgtgtg 420

gagtgtcctc cttgtcctgc ccctcctgtg gccggacctt ccgtgttcct tttccctcct 480

aagcctaagg acaccctgat gatcagccgt acccctgagg tgacctgtgt ggtggtggac 540

gtgtcccacg aggaccctga ggtgcagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 600

aacgccaaga ccaagcctcg tgaggagcaa ttcaacagca ccttccgtgt ggtgtccgtg 660

cttaccgtgg tgcaccaaga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgagcaac 720

aagggacttc ctgcccctat cgagaagacc atctccaaga ccaagggcca acctcgtgag 780

cctcaagtgt acacccttcc tcctagccgt gaggagatga ccaagaacca agtgtccctt 840

acctgtctgg tgaagggctt ctaccctagc gacatcgccg tggagtggga gtccaacgga 900

caacctgaga acaactacaa gaccacccct cctatgcttg acagcgacgg ctccttcttc 960

ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc cgttggcaac aaggcaacgt gttcagctgt 1020

tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacacccaaa agagcctttc cctgagccct 1080

ggaaagtgat atcgggcccg tttaaacggg ggaggcta 1118

<210> 37

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1 L chain na

<400> 37

atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 120

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 180

tacttccaga aaccaggcca gtctccacag ctcctgatct acagggtttc caaccgattt 240

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 300

agcagagtgg aggctgaaga tttcggagtt tatttctgcc tccaagttac tcatgtcccg 360

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgtggccgc cccctccgtg 420

ttcatcttcc ccccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt ggtgtgcctg 480

ctgaataact tctaccccag agaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540

tccgggaact cccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 600

agcagcaccc tgaccctgag caaagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgag 660

gtgacccacc agggcctgag ctcccccgtc accaagagct tcaacagggg ggagtgt 717

<210> 38

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1 L chain aa

<400> 38

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Phe Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

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

Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 39

<211> 1401

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1-1 H chain na

<400> 39

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtacc tatgccatgt cttgggttcg ccagactccg 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtaatggtg gtacttacac ctactatcca 240

gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccgagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt tctgtgcaag actaatctac 360

tatgattacc ttgactactg gggccacggc accactctca cagtcagctc agcctccacc 420

aagggcccaa gcgtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg cggcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaacccg tgaccgtgag ctggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cccgctgtcc tgcagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgccc accctgccca gcacctgaac tcctgggggg accctcagtc 780

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccccgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

cgggtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

ggccagcccc gggaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc 1320

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctctccctgt ctcccggcaa a 1401

<210> 40

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1-1 H chain aa

<400> 40

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

His Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 41

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1-2 H chain na

<400> 41

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgaa 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtacc tatgccatgt cttgggttcg ccagactccg 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtaatggtg gtacttacac ctactatcca 240

gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccgagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt tctgtgcaag actaatctac 360

tatgattacc ttgactactg gggccacggc accactctca cagtcagctc agccagcacc 420

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgtagccgtt ccaccagcga gtccaccgcc 480

gcccttggct gtctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgag ctggaactcc 540

ggagccctta ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtccag cggcctttac 600

tccctgagct ccgtggtgac cgtgcctagc tccaacttcg gcacccaaac ctacacctgt 660

aacgtggacc acaagcctag caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg taagtgttgt 720

gtggagtgtc ctccttgtcc tgcccctcct gtggccggac cttccgtgtt ccttttccct 780

cctaagccta aggacaccct gatgatcagc cgtacccctg aggtgacctg tgtggtggtg 840

gacgtgtccc acgaggaccc tgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cacaacgcca agaccaagcc tcgtgaggag caattcaaca gcaccttccg tgtggtgtcc 960

gtgcttaccg tggtgcacca agactggctg aacggcaagg agtacaagtg taaggtgagc 1020

aacaagggac ttcctgcccc tatcgagaag accatctcca agaccaaggg ccaacctcgt 1080

gagcctcaag tgtacaccct tcctcctagc cgtgaggaga tgaccaagaa ccaagtgtcc 1140

cttacctgtc tggtgaaggg cttctaccct agcgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac 1200

ggacaacctg agaacaacta caagaccacc cctcctatgc ttgacagcga cggctccttc 1260

ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgttggc aacaaggcaa cgtgttcagc 1320

tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc aaaagagcct ttccctgagc 1380

cctggaaag 1389

<210> 42

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cMAb1-2 H chain aa

<400> 42

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

His Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205
Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
225 230 235 240
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 43

acctatgcca tgtct 15

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Thr Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 45

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 45

accattagta atggtggtac ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg t 51

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 47

ctaatctact atgattacct tgactac 27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Tyr

1 5

<210> 49

<211> 48

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 49

aggtctagtc agagccttga aaacagtaat ggaaacacct atttgaac 48

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 51

agggtttcca accgattttc t 21

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 53

ctccaagtta ctcatgtccc gtggacg 27

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Leu Gln Val Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 55

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T1H

<400> 55

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

gtgcagctgg tggaaagcgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggctctct gagactgagc 120

tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc tacgccatga gctgggtccg acaggccccct 180

ggcaagggac tggaatgggt ggcaaccatc agcaacggcg gcacctacac ctactacccc 240

gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag actgatctac 360

tacgactacc tggactactg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc agccagcacc 420

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgtagccgtt ccaccagcga gtccaccgcc 480

gcccttggct gtctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgag ctggaactcc 540

ggagcccttа ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtccag cggcctttac 600

tccctgagct ccgtggtgac cgtgcctagc tccaacttcg gcacccaaac ctacacctgt 660

aacgtggacc acaagcctag caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg taagtgttgt 720

gtggagtgtc ctccttgtcc tgcccctcct gtggccggac cttccgtgtt ccttttccct 780

cctaagccta aggacaccct gatgatcagc cgtacccctg aggtgacctg tgtggtggtg 840

gacgtgtccc acgaggaccc tgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cacaacgcca agaccaagcc tcgtgaggag caattcaaca gcaccttccg tgtggtgtcc 960

gtgcttaccg tggtgcacca agactggctg aacggcaagg agtacaagtg taaggtgagc 1020

aacaagggac ttcctgcccc tatcgagaag accatctcca agaccaaggg ccaacctcgt 1080

gagcctcaag tgtacaccct tcctcctagc cgtgaggaga tgaccaagaa ccaagtgtcc 1140

cttacctgtc tggtgaaggg cttctaccct agcgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac 1200

ggacaacctg agaacaacta caagaccacc cctcctatgc ttgacagcga cggctccttc 1260

ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgttggc aacaaggcaa cgtgttcagc 1320

tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc aaaagagcct ttccctgagc 1380

cctggaaag 1389

<210> 56

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T1H aa

<400> 56

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 57

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T2H na

<400> 57

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

gtgcagctgg tggaaagcgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggctctct gagactgagc 120

tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc tacgccatga gctgggtccg acaggccccct 180

ggcaagggac tggaatgggt ggcaaccatc agccaaggcg gcacctacac ctactacccc 240

gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag actgatctac 360

tacgactacc tggactactg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc agccagcacc 420

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgtagccgtt ccaccagcga gtccaccgcc 480

gcccttggct gtctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgag ctggaactcc 540

ggagccctta ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtccag cggcctttac 600

tccctgagct ccgtggtgac cgtgcctagc tccaacttcg gcacccaaac ctacacctgt 660

aacgtggacc acaagcctag caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg taagtgttgt 720

gtggagtgtc ctccttgtcc tgcccctcct gtggccggac cttccgtgtt ccttttccct 780

cctaagccta aggacaccct gatgatcagc cgtacccctg aggtgacctg tgtggtggtg 840

gacgtgtccc acgaggaccc tgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cacaacgcca agaccaagcc tcgtgaggag caattcaaca gcaccttccg tgtggtgtcc 960

gtgcttaccg tggtgcacca agactggctg aacggcaagg agtacaagtg taaggtgagc 1020

aacaagggac ttcctgcccc tatcgagaag accatctcca agaccaaggg ccaacctcgt 1080

gagcctcaag tgtacaccct tcctcctagc cgtgaggaga tgaccaagaa ccaagtgtcc 1140

cttacctgtc tggtgaaggg cttctaccct agcgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac 1200

ggacaacctg agaacaacta caagaccacc cctcctatgc ttgacagcga cggctccttc 1260

ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgttggc aacaaggcaa cgtgttcagc 1320

tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc aaaagagcct ttccctgagc 1380

cctggaaag 1389

<210> 58

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T2H aa

<400> 58

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 59

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T3H na

<400> 59

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

gtgcagctgg tggaaagcgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggctctct gagactgagc 120

tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc tacgccatga gctgggtccg acaggccccct 180

ggcaagcggc tggaatgggt ggcaaccatc agcaacggcg gcacctacac ctactacccc 240

gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag actgatctac 360

tacgactacc tggactactg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc agccagcacc 420

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgtagccgtt ccaccagcga gtccaccgcc 480

gcccttggct gtctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgag ctggaactcc 540

ggagccctta ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtccag cggcctttac 600

tccctgagct ccgtggtgac cgtgcctagc tccaacttcg gcacccaaac ctacacctgt 660

aacgtggacc acaagcctag caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg taagtgttgt 720

gtggagtgtc ctccttgtcc tgcccctcct gtggccggac cttccgtgtt ccttttccct 780

cctaagccta aggacaccct gatgatcagc cgtacccctg aggtgacctg tgtggtggtg 840

gacgtgtccc acgaggaccc tgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cacaacgcca agaccaagcc tcgtgaggag caattcaaca gcaccttccg tgtggtgtcc 960

gtgcttaccg tggtgcacca agactggctg aacggcaagg agtacaagtg taaggtgagc 1020

aacaagggac ttcctgcccc tatcgagaag accatctcca agaccaaggg ccaacctcgt 1080

gagcctcaag tgtacaccct tcctcctagc cgtgaggaga tgaccaagaa ccaagtgtcc 1140

cttacctgtc tggtgaaggg cttctaccct agcgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac 1200

ggacaacctg agaacaacta caagaccacc cctcctatgc ttgacagcga cggctccttc 1260

ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgttggc aacaaggcaa cgtgttcagc 1320

tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc aaaagagcct ttccctgagc 1380

cctggaaag 1389

<210> 60

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T3H aa

<400> 60

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu
50 55 60

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 61

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T4H na

<400> 61

atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt gctgagcgag 60

gtgcagctgg tggaaagcgg cggaggcctg gtgcagcctg gcggctctct gagactgagc 120

tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc tacgccatga gctgggtccg acaggccccct 180

ggcaagcggc tggaatgggt ggcaaccatc agccaaggcg gcacctacac ctactacccc 240

gacagcgtga agggccggtt caccatcagc cgggacaacg ccaagaacac cctgtacctg 300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag actgatctac 360

tacgactacc tggactactg gggccagggc accctggtca ccgtcagctc agccagcacc 420

aagggccctt ccgtgttccc tctggccccc tgtagccgtt ccaccagcga gtccaccgcc 480

gcccttggct gtctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgaccgtgag ctggaactcc 540

ggagccctta ccagcggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtccag cggcctttac 600

tccctgagct ccgtggtgac cgtgcctagc tccaacttcg gcacccaaac ctacacctgt 660

aacgtggacc acaagcctag caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg taagtgttgt 720

gtggagtgtc ctccttgtcc tgcccctcct gtggccggac cttccgtgtt ccttttccct 780

cctaagccta aggacaccct gatgatcagc cgtacccctg aggtgacctg tgtggtggtg 840

gacgtgtccc acgaggaccc tgaggtgcag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900

cacaacgcca agaccaagcc tcgtgaggag caattcaaca gcaccttccg tgtggtgtcc 960

gtgcttaccg tggtgcacca agactggctg aacggcaagg agtacaagtg taaggtgagc 1020

aacaagggac ttcctgcccc tatcgagaag accatctcca agaccaaggg ccaacctcgt 1080

gagcctcaag tgtacaccct tcctcctagc cgtgaggaga tgaccaagaa ccaagtgtcc 1140

cttacctgtc tggtgaaggg cttctaccct agcgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac 1200

ggacaacctg agaacaacta caagaccacc cctcctatgc ttgacagcga cggctccttc 1260

ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgttggc aacaaggcaa cgtgttcagc 1320

tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacaccc aaaagagcct ttccctgagc 1380

cctggaaag 1389

<210> 62

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T4H aa

<400> 62

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu
50 55 60

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

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 63

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T1L na

<400> 63

atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60

gacatcgtga tgacccagag ccccctgagc ctgcccgtga cactgggcga gcctgccagc 120

atcagctgca gaagcagcca gagcctggaa aacagcaacg gcaacaccta cctgaactgg 180

tatctgcaga agcccggcca gtcccccccag ctgctgatct accgggtgtc caaccggttc 240

agcggcgtgc ccgacagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 300

agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtc tgcaggtcac acacgtgccc 360

tggaccttcg gccctggcac caaggtggac atcaagcgta cggtggccgc cccctccgtg 420

ttcatcttcc cccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt ggtgtgcctg 480

ctgaataact tctaccccag agaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540

tccgggaact cccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 600

agcagcaccc tgaccctgag caaagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgag 660

gtgacccacc agggcctgag ctcccccgtc accaagagct tcaacagggg ggagtgt 717

<210> 64

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T1L aa

<400> 64

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
115 120 125

Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

165 170 175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 65
<211> 717
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hMAb1-T2L na
<400> 65

atggtgctgc agacccaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctccgg cgcgtacggc 60
gacatcgtga tgacccagag ccccctgagc ctgcccgtga cactgggcga gcctgccagc 120
atcagctgca gaagcagcca gagcctggaa aacgagaaca agaacctgta cctgaactgg 180
tatctgcaga agcccggcca gtcccccccag ctgctgatct accgggtgtc caaccggttc 240
agcggcgtgc ccgacagatt cagcggcagc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 300

agccgggtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactactgtc tgcaggtcac acacgtgccc 360
tggaccttcg gccctggcac caaggtggac atcaagcgta cggtggccgc cccctccgtg 420
ttcatcttcc ccccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgcctccgt ggtgtgcctg 480
ctgaataact tctaccccag agaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
tccgggaact cccaggagag cgtgaccgag caggacagca aggacagcac ctacagcctg 600
agcagcaccc tgaccctgag caaagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgag 660
gtgacccacc agggcctgag ctcccccgtc accaagagct tcaacagggg ggagtgt 717

<210> 66

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hMAb1-T2L aa

<400> 66

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Leu Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Glu Asn Glu Asn Lys Asn Leu Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Leu Gln Val Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys

115 120 125

Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Thr Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRH2-2

<400> 68

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

1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Leu Asp Tyr

1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDRL1-2

<400> 70

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

1 5 10 15

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Leu Gln Val Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 73

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> primer 1F

<400> 73

aaaggtacca ccatgggctc tggaggagac agcctcctg 39

<210> 74

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 1R

<400> 74

aaagatatcc tgctccaggg tccagggacc atgctcact 39

<210> 75

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer2F

<400> 75

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagcaggac 120

tccccgcccc agatcctagt ccac 144

<210> 76

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 2R

<400> 76

gctagcggag taatctacag gagaagcacc agccttg 37

<210> 77

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 3F

<400> 77

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagcctggc 120

cctgccagga tgagctgcca ag 142

<210> 78

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 4F

<400> 78

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taaggtggct 120

gtcctccggg aggatttcca gatc 144

<210> 79

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 5F

<400> 79

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagaccaac 120

agcgcaggac atagggagag cc 142

<210> 80

<211> 143

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 6F

<400> 80

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagatccag 120

gagccccagg actacacgga gcc 143

<210> 81

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 7F

<400> 81

ggtaccgcca tgggctctgg aggagacagc ctcctcggcg gcagaggttc cctgcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagaggctg 120

ccggaaaaag tgcccagtgc ccca 144

<210> 82

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 8F

<400> 82

cagatatacc agtgaggatg cctgaatcct aaaacacagg atggatc 47

<210> 83

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 8R

<400> 83

gatccatcct gtgttttagg attcaggcat cctcactggt atatctg 47

<210> 84

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 9F

<400> 84

ggtaccgcca tgggacaagg agaggagccg agagcagcca tg 42

<210> 85

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 9R

<400> 85

gcggccgcgg aggaatcacc agccttgggc acagcaccag 40

<210> 86

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 10F

<400> 86

ggtaccgcca tgggacaagg agaggagctg agagcagcc 39

<210> 87

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 10R

<400> 87

gcggccgcgg aggaatcacc agccttgggc acaacacc 38

<210> 88

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 11F

<400> 88

ggtaccgcca tgggctctgg aggagaaagc ctccggg 37

<210> 89

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 11R

<400> 89

ggagtaatct acaggagaag caccagcctt g 31

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 12F

<400> 90

ggatccgcca tgggctctgg aggagaaagc ctccg 35

<210> 91

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 12R

<400> 91

gcggccgctc aggagtaatc tacaggagaa gcaccagcct tg 42

<210> 92

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 18F

<400> 92

ggtaccgcca tgggctctgg aggagaaagc ctccgaggct cccgggcttc ccggcctctg 60

ctgctcctgc tcatcatggg aggcatggct gattacaagg atgacgacga taagcaggac 120

tccccgcccc agatcctagt ccac 144

<210> 93

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 13F

<400> 93

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatgatt gcggagcccg ctcactttta 60

cctg 64

<210> 94

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 13R

<400> 94

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc gctttcagtt tcctctaatt cttc 54

<210> 95

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 14F

<400> 95

gcggccgcat gattgcggag cccgctcact tttacctgtt tggattaata tgtctctgtt 60

caggctcccg tcttgattac aaggatgacg acgataagcg tcaggaagat tttccacctc 120

gcattgttg 129

<210> 96

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 14R

<400> 96

gctagctcag ctttcagttt cctctaattc ttc 33

<210> 97

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 15F

<400> 97

gcggccgcat gagtctgctg atgtttacac aactactg 38

<210> 98

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer 15R

<400> 98

gctagcctat aattcacctg taaactgtcc ttgactgttg 40

<210> 99

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 16F

<400> 99

gcggccgcat gctgcgctac ctgctgaaaa cgctgctg 38

<210> 100

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 16R

<400> 100

gctagctcat cttggttcct ctcggcgttt ctgtcc 36

<210> 101

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 17F

<400> 101

ggtaccgata aggaacaaat aggaag 26

<210> 102

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 17R

<400> 102

gagctcagct tgtgtgctct gctgtc 26

<210> 103

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu

20

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 104

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

1 5 10 15

<210> 105

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer LYHF6

<400> 105

cctcaccatg aactttgg 18

<210> 106

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer G1EVR1

<400> 106

aagatatctt atttaccagg agagtgggag ag 32

<210> 107

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MK19EIF1

<400> 107

aagaattcat gaagttgcct gttagg 26

<210> 108

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer KEVR1

<400> 108

aagatatctt aacactcatt cctgttgaag ct 32

<210> 109

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 3. 3-F1

<400> 109

tataccgtcg acctctagct agagcttggc 30

<210> 110

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 3. 3-R1

<400> 110

gctatggcag ggcctgccgc cccgacgttg 30

<210> 111

<211> 47

<212> DNA

<213> primer MAb1 LF

<400> 111

tctccggcgc gtacggcgat gctgtgatga cccaaactcc actctcc 47

<210> 112

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MAb1 LR

<400> 112

ggaggggggcg gccacagccc gtttgatttc cagcttggtg cctcc 45

<210> 113

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MAb1 HF

<400> 113

cagatgggtg ctgagcgaag tgcagctggt ggagtctggg ggag 44

<210> 114

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MAb1 H1R

<400> 114

ttggtggagg ctgagctgac tgtgagagtg gtgccgtggc cccag 45

<210> 115

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer MAb1 2R

<400> 115

ttggtgctgg ctgagctgac tgtgagagtg gtgccgtggc cccag 45

<210> 116

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer H-N53Q-F

<400> 116

gggtggcaac catcagccaa ggcggcacct acacctac 38

<210> 117

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer H-N53Q-R

<400> 117

gtaggtgtag gtgccgcctt ggctgatggt tgccaccc 38

<210> 118

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer L inf-F

<400> 118

gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagacccag gtgttc 46

<210> 119

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer L-EKL-R

<400> 119

caggtacagg ttcttgttct cgttttccag gctctggctg cttctgcagc 50

<210> 120

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer L-EKL-F

<400> 120

gaaaacgaga acaagaacct gtacctgaac tggtatctgc agaagcccg 49

<210> 121

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer L inf-R

<400> 121

tagcctcccc cgtttaaacg ggcccctaac actcccccct g 41