



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월10일  
(11) 등록번호 10-1695056  
(24) 등록일자 2017년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01) C07K 14/46 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7003804  
(22) 출원일자(국제) 2011년07월15일  
심사청구일자 2014년07월15일  
(85) 번역문제출일자 2013년02월14일  
(65) 공개번호 10-2013-0059396  
(43) 공개일자 2013년06월05일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/044172  
(87) 국제공개번호 WO 2012/009631  
국제공개일자 2012년01월19일  
(30) 우선권주장  
61/364,698 2010년07월15일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20090253200 A1\*  
WO2009089062 A2  
WO2001017557 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
애드헤론 제라퓨틱스, 인코포레이티드  
미국, 매사추세츠주 02155, 메드퍼드, 스위트  
100, 200 보스턴 애비뉴  
(72) 발명자  
맥아더, 제임스, 지.  
미국, 매사추세츠주 01742, 콩코드, 95 코넬트 스트리트 311  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 19 항

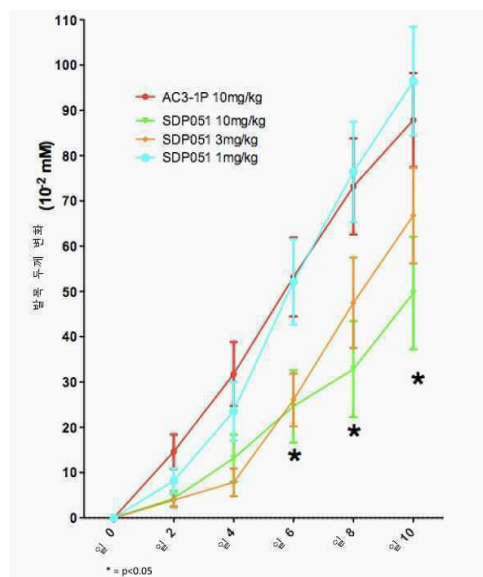
심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 카드헤린-11의 EC1 도메인을 표적으로 하는 인간화 항체 및 관련 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 포유류 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 그러한 항체를 포함하는 조성물(예컨대, 제약 조성물)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 인간화 항체를 치료적으로 유효한 양으로 투여하여 포유류 대상의 카드헤린-11 매개성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 치료하기 적합한 카드헤린-11 매개성 질환은 염증성 질환(예컨대, 류마티스 관절염과 같은 염증성 관절 질환), 섬유증 및 암을 포함한다.

대표도 - 도50



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역과 서열번호 71을 포함하는 항체 가변경쇄영역을 포함하는, 포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하고, 상기 포유류 카드헤린-11 단백질에 대해 길항 작용하는 인간화 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는 포유류의 카드헤린-11 단백질과 하나 이상의 다른 카드헤린-11 단백질의 결합, 포유류 카드헤린-11 단백질을 발현하는 세포의 응집, 효소 발현 유도, 사이토카인 발현 유도, 성장인자 발현 유도, 포유류 카드헤린-11 단백질을 발현하는 세포의 이동 및 연골 파괴로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 카드헤린-11 매개성 활성을 억제하는, 인간화 항체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 전체 항체인, 인간화 항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항체는 항체 단편인, 인간화 항체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 항체 단편은 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 scFv로 이루어진 군에서 선택되는, 인간화 항체.

#### 청구항 6

포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하고, 상기 포유류 카드헤린-11 단백질에 대해 길항 작용하는 인간화 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 염증성 질환, 섬유증, 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 카드헤린-11 매개성 질환의 치료를 위한 제약 조성물로서, 상기 항체는 서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역 및 서열번호 71을 포함하는 항체 가변경쇄영역을 포함하고, 상기 포유류 카드헤린-11 단백질에 대해 길항 작용하는, 제약 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항체는 상기 포유류 카드헤린-11을 발현하는 세포의 응집을 억제하는, 제약 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 항체는 전체 항체인, 제약 조성물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 항체는 항체 단편인, 제약 조성물.

**청구항 10**

제6항에 있어서,

질병 조절 항류마티스 약제를 더 포함하는, 제약 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 질병 조절 항류마티스 약제는 메토틱렉세이트인, 제약 조성물.

**청구항 12**

제6항에 있어서,

항염증제를 더 포함하는, 제약 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 항염증제는 비스테로이드성 항염증제 또는 스테로이드인, 제약 조성물.

**청구항 14**

제1항의 인간화 항체를 암호화하는 분리된 핵산.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 핵산은 벡터에 존재하는, 분리된 핵산.

**청구항 16**

제1항의 인간화 항체를 발현하는 분리된 세포.

**청구항 17**

제6항에 있어서,

상기 카르헤린-11 매개성 질환은 염증성 질환인, 제약 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 염증성 질환은 염증성 관절 질환인, 제약 조성물.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

상기 염증성 관절 질환은 류마티스 관절염인, 제약 조성물.

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원(들)

[0002] 본 출원은 2010년 7월 15일 출원된 미국 가출원 제61/364,698호에 대한 우선권을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에 참조로서 포함된다.

## 배경 기술

[0003] 진행성 만성 관절염 환자는 뼈와 연골 파괴를 포함한 심각한 관절 악화를 겪어, 장기간 통증, 변형증, 관절 기능 상실, 이동성 감소 및 수명 단축으로 이어진다. 관절염은 관절 내 세포 수 및 염증 물질의 증가와 관련이 있으며, 이는 자극, 연골 마모 및 관절선 부종을 초래한다. 몇 가지 상이한 자가면역질환이 관절에 부적절하거나 잘못된 염증을 일으켜, 이러한 질환을 앓는 개체의 관절에 만성 염증을 가져온다고 알려져 있다. 흔한 관절염 질환은 류마티스 관절염, 건선 관절염, 라이터 증후군 및 강직성 척추염을 포함한다.

[0004] 류마티스 관절염은 염증성 관절염의 가장 흔한 형태로, 미국 인구의 약 1% 또는 약 210만 명의 미국인에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 류마티스 관절염은 관절선 또는 관절 윤활막의 염증을 특징으로 하는 만성 질환으로, 시간이 흐르면서 중대한 뼈와 연골 손상으로 이어질 수 있다. 류마티스 관절염은 남성보다 여성에서 더 흔하며, 여성의 무려 3%가 평생 류마티스 관절염을 발달시킬 수 있다. 현재 류마티스 관절염은 원인 불명이다.

- [0005] 류마티스 관절염은 장기간 관절 손상으로 이어질 수 있으며 그 결과, 만성 통증, 기능 상실 및 장애를 가져올 수 있다. 또한, 최근 연구는 류마티스 관절염이 있는 사람, 특히 질병이 잘 통제되지 않는 사람은 심장 질환, 뇌졸중 및 섬유증, 특히 폐 섬유증 발달의 위험이 더 높을 수 있음을 보여 준다.
- [0006] 흡연, 화학물질 노출, 공포증, 사르코이드증, 치료 방사선, 류마티스 관절염 또는 루푸스에 의한 섬유증뿐만 아니라, 특발성 폐 섬유증 및 방사선 유도 섬유증을 포함하는 폐 섬유증은 전 세계적으로 5,000,000명의 환자와 미국에서 500,000 이상의 개체를 괴롭히고 있다. 특발성 폐 섬유증으로 인한 5년 치사율은 대략 80%로, 미국에서만 연간 40,000건의 사망에 달한다. 미국이나 유럽에는 현재 특발성 폐 섬유증에 대한 승인된 치료법이 없다.
- [0007] 따라서, 류마티스 관절염과 기타 염증성 질환으로 말미암은 섬유증과 만성 관절염은 국제적인 건강 부담이다. 이들 및 기타 질환의 예방 및 치료를 위한 새로운 물질을 개발할 필요가 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0008] 일실시예에서, 본 발명은 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 65, 서열번호 67 및 서열번호 69로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 가변중쇄영역을 포함하는, 포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 인간화 항체에 관한 것이다. 특정 실시예에서, 인간화 항체는 포유류 카드헤린-11 단백질을 길항한다. 추가 실시예에서, 인간화 항체는 서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역을 포함한다.
- [0009] 다른 실시예에서, 본 발명은 서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역과 서열번호 71을 포함하는 항체 가변중쇄영역을 포함하는, 포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 인간화 항체에 관한 것이다. 특정 실시예에서, 인간화 항체는 포유류의 카드헤린-11 단백질을 길항한다.
- [0010] 추가적인 실시예에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 포유류 대상(예를 들어, 인간)에서 카드헤린-11 매개성 질환(예를 들어, 염증성 관절 질환)의 치료 방법을 제공한다. 이 방법은 포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하고 포유류의 카드헤린-11 단백질을 길항하는 인간화 항체를 치료적으로 유효한 양으로 대상에 투여하여, 대상에서 바람직한 치료 효과를 가져오는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 인간화 항체는 서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역을 포함한다. 바람직한 실시예에서, 카드헤린-11 매개성 질환은 류마티스 관절염이다.
- [0011] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 포유류의 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 인간화 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 특정 실시예에서, 인간화 항체는 서열번호 69를 포함하는 항체 가변중쇄영역을 포함한다. 추가 실시예에서, 제약 조성물은 질병 조절 항류마티스 약제 또는 항염증제와 같은 제2의 물질을 더 포함한다.
- [0012] 본 발명은 인간에서 카드헤린-11에 의해 매개되는 염증 및 기타 질환의 치료를 위해 향상된 효능을 나타내는 새로운 물질 및 치료법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 정의
- [0014] 본원에 사용한 용어 "카드헤린-11", "Cad-11", 및 "OB-카드헤린"은 자연 발생적인 또는 내인성의 카드헤린-11(예컨대, 포유류의, 예를 들어, 인간의) 단백질을 의미하고, 또한 자연 발생적인 또는 내인성의 카드헤린-11 단백질의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 함유하는 단백질(예컨대, 재조합 단백질, 합성 단백질)을 의미한다. 따라서, 본원에서 상호교환적으로 이용되는 용어 "카드헤린-11", "Cad-11", 및 "OB-카드헤린"은 포유류(예컨대, 인간, 비인간 영장류)에서 자연적으로 발생하는, 예컨대 선택적 접합(alternative splicing) 또는 기타 세포 과정에 의해 생성된 카드헤린-11 단백질(예컨대, 포유류의, 인간의)의 다형성 또는 대립형 변이체 및 기타 이소형을 포함한다. 바람직하게는, 카드헤린-11 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 함유하는 인간 단백질이다(Genbank Accession No. NP001788 및 도 15 참조).
- [0015] 본원에 정의한 바와 같은 "카드헤린-11 길항제"는 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인과 특이적으로 결합하고 세포 내에서 하나 이상의 카드헤린-11 매개성 활성을 억제(예컨대, 감소, 방지)하는 물질(예컨대, 항체, 융합 단백질, 펩티드, 펩티도미메틱, 소분자, 핵산)이다. 카드헤린-11 매개성 활성은 카드헤린-11 단백질의 하나 이상

의 다른 카드헤린-11 단백질과의 동형(homotypic) 방식의 결합, 카드헤린-11을 발현하는 세포의 응집, 효소(예컨대, 콜라게나제, 세린 프로테아제, MMP1, MMP3, MMP13) 발현 또는 활성의 유도 및 사이토카인(예컨대, 염증성 사이토카인) 또는 성장인자(예컨대, IL-6, IL-8 또는 RANKL 또는 TRANCE)의 유도, 카드헤린-11을 발현하는 세포의 이동 및 카드헤린-11 발현 세포에 의한 연골 파괴를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일실시예에서, 카드헤린-11 길항제는 예를 들어, Cad-11 단백질(예컨대, 세포 표면 위에 발현된 Cad-1 단백질)의 EC1 도메인 내의 공유체 서열들과 하나 이상의 다른 Cad-11 단백질(예컨대, 다른 세포 표면 위에 발현된 하나 이상의 Cad-11 단백질)의 EC1 도메인 내의 포켓 서열 사이의 상호작용을 차단함으로써, 카드헤린-11 단백질의 하나 이상의 다른 카드헤린-11 단백질과의 결합을 억제할 수 있다.

[0016] 본원에 사용된 바와 같은, 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 "특이적으로 결합" 하는 카드헤린-11 길항제는, 카드헤린-11 길항제가 다른 카드헤린 단백질(예컨대, MN-카드헤린, 카드헤린-8)의 EC1 도메인에 결합하는 친화도보다 적어도 5배, 바람직하게는 적어도 약 10배 더 큰 친화도(예컨대, 결합 친화도)로 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 결합(예컨대, 생리학적 조건 하에서)하는 카드헤린-11 길항제를 의미한다. 특정 실시예에서, 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 카드헤린-11 길항제는, 카드헤린-11 길항제가 인간 MN-카드헤린의 EC1 도메인의 N 말단 부분인 서열번호 4에 존재하는 에피토프에 결합하는 친화도 및 카드헤린-11 길항제가 인간 카드헤린-8의 EC1 도메인의 N 말단 부분인 서열번호 5에 결합하는 친화도보다 적어도 약 5배, 바람직하게는 적어도 약 10배 더 큰 친화도로 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인의 N 말단 부분인 서열번호 3에 존재하는 에피토프와 결합한다.

[0017] 본원에 사용된 용어 "항체" 는 온전한 항체들 및 항체 단편들(예컨대, 항체의 항원 결합 부위, 예를 들어, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab' F(ab'), 및 dAb 단편) 모두를 아우르고자 의도한 것이다. "항체"는 다클론성 및 단일클론성 항체 모두를 나타내며, 자연적으로 발생한 항체와 제작된 항체를 포함한다. 따라서, 용어 "항체" 는 예를 들어, 인간, 키메라, 인간화, 영장류화, 베니어(veneered), 단쇄 및 도메인 항체(dAb)를 포함한다(예컨대, Harlow *et al.*, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 참조).

[0018] 용어 "에피토프"는 면역 글로불린  $V_H/V_L$  쌍에 의해 전통적으로 결합된 구조의 단위를 의미한다. 에피토프는 항체에 대하여 최소한의 결합 부위를 정의하며, 그 결과 항체 특이성의 표적을 대표한다.

[0019] 용어 "융합 단백질" 은 둘 이상의 외래 폴리펩티드 전부 또는 일부를 포함하는 자연 발생적인, 합성, 반합성 또는 재조합 단일 단백질 분자를 의미한다.

[0020] 용어 "폴리펩티드" 는 아미노산의 고분자를 의미하며, 특정 길이를 나타내지는 않는다. 그러므로 펩티드, 올리고펩티드 및 단백질은 폴리펩티드의 정의 내로 포함된다.

[0021] 본원에 사용한 용어 "펩티드" 는 약 2 내지 약 100개의 아미노산 잔기로 이루어진 화합물을 의미하며, 여기서 하나의 아미노산의 아미노기는 펩티드 결합에 의해 다른 아미노산의 카르복실기와 연결되어 있다. 그러한 펩티드는 전형적으로 길이가 약 100개 아미노산 잔기보다 적으며, 바람직하게는 약 10, 약 20, 약 30, 약 40 또는 약 50개 잔기이다.

[0022] 본원에 사용한 용어 "펩티도미메틱" 은 펩티드 또는 단백질이 아닌 분자이지만, 그들의 구조의 측면들을 모방하는 분자를 의미한다. 펩티도미메틱 길항제는 종래 화학적 방법에 의해 제조할 수 있다(예컨대, Damewood J.R. "Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry" in *Reviews in Computational Biology*, 2007, Vol. 9, pp.1-80, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1996; Kazmierski W.K., *"Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols,"* Humana Press, New Jersey, 1999 참조).

[0023] 본원에 정의한 바와 같은, "치료" 는 특정 치료적 또는 예방적 물질을 대상(예컨대, 포유류, 인간)에 투여하는 것으로, 이는 대상에 바람직한 치료적 또는 예방적 이익을 가져온다.

[0024] 본원에 정의한 바와 같은, "치료요법" 은 하나 이상의 치료적 또는 예방적 물질을 특정 용량(예컨대, 수준, 양)으로 그리고 특정 스케줄에 또는 특정 간격(예컨대, 분, 일, 주, 개월)으로 투여하는 요법이다.

[0025] 본원에 정의한 바와 같은, "치료적으로 유효한 양" 은 (예컨대, 카드헤린-11을 발현하는 세포, 예를 들어, 윤활막 세포의 응집을 억제함으로써) 관절 내 염증 또는 종양의 생성, 성장 또는 전이 억제(즉, 감소, 방지)에 충분한 양과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는, 투여 조건 하에서 바람직한 치료적 또는 예방적 효과를 달성하기에 충분한 양이다. 치료의 실효성(예컨대, 관절 내 염증의 감소 및/또는 관절 내 염증의 예방)은 적절한 방법(예컨대, MRI, NMR, CT와 같은 영상 기법)에 의해 확인할 수 있다.



- [0026] 카드헤린
- [0027] 카드헤린은 동형 방식으로 다른 카드헤린에 결합함으로써 세포 부착을 매개하는, 대규모의  $\text{Ca}^{2+}$  의존성 부착 분자 패밀리에 속한다(MJ Wheelock and KR Johnson, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 207-235 (2003)). 고전적인 카드헤린은 각각 길이가 약 110개 아미노산인 다섯 개의 세포 외 카드헤린(extracellular cadherin, EC) 도메인, 막관통 영역 및 보존 세포질 도메인을 함유하는 단일 통과 막관통 단백질이다. 카드헤린은 EC 도메인 사이의 상동성 정도를 기초로 하여 I유형과 II유형 카드헤린으로 나뉜다. II유형 카드헤린은 인간 카드헤린-5, -6, -8, -11, 및 -12, 및 MN-카드헤린을 포함한다. 세포 간 결합을 매개하는 각각의 세포 외 도메인의 역할의 상대적인 중요성은 불분명하다.
- [0028] 윤활막 세포 내에서의 카드헤린-11 활성
- [0029] 카드헤린-11은 연결된 관절의 윤활액 라이닝에서 윤활막 세포와 윤활막 세포 간 결합을 매개한다(Valencia *et al.*, *J. Exp. Med.* 200(12):1673-1679 (2004); Kiener and Brenner, *Arthritis Res Ther.* 7(2):49-54 (2005)). 인간 IgG<sub>2</sub>의 경첩-CH2-CH3 도메인에 융합된, 인간 카드헤린-11의 총 다섯 개의 세포 외 도메인을 포함한 융합 단백질은 시험관 내에서 윤활액 라이닝 형성을 억제하였다(Kiener *et al.*, *Am. J. Pathol.* 168 (2006)). 또한, 길항적인 항-카드헤린-11 항체 및 쥐 IgG2a의 경첩-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 도메인에 융합된, 쥐 카드헤린-11의 EC1-5를 포함한 융합 단백질은 류마티스 관절염의 쥐 모델에서 염증과 관절 부종을 억제하였다(Lee *et al.*, *Science* 315:1006-1010 (2007)).
- [0030] 카드헤린-11 길항제
- [0031] 본 발명의 카드헤린-11 길항제는 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하고, 세포 내에서 하나 이상의 카드헤린-11 매개성 활성을 억제하는(예컨대, 감소시키는, 방지하는) 임의의 물질일 수 있다. 카드헤린-11 매개성 활성은 세포 표면에서 카드헤린-11을 발현하는 세포의 응집, 예를 들어, 콜라게나제, 세린 프로테아제, MMP1, MMP3, IL-6, IL-8 또는 RANKL/TRANCE와 같은 인자들의 발현 또는 분비를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 물질은 다른 것들 중에서도, 항체, 융합 단백질, 펩티드, 펩티도미메틱, 소분자, 또는 핵산일 수 있다.
- [0032] 카드헤린-11 항체
- [0033] 본원에 기술한 바와 같이, Cad-11의 공여체 서열 및 카드헤린-결합 포켓을 포함하는 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인(예컨대, 서열번호 3)의 N 말단 부분 내의 에피토프에 결합하는 항체는 이러한 단백질의 다른 영역의 에피토프에 결합하는 항체들보다 더욱 효과적으로 시험관 내에서 카드헤린-11 활성을 차단한다(실시예 1 및 실시예 2 참조).
- [0034] 따라서, 일실시예에서, 본 발명은 Cad-11의 공여체 서열 및 카드헤린-11 결합 포켓을 포함하는 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인의 N 말단 부분에 존재하는 에피토프에 결합하는(예컨대, 특이적으로 결합하는) 항체 또는 그의 항원 결합 부위를 제공한다. 용어 "항체" 는 모든 유형의 다클론성 및 단일클론성 항체(예컨대, 인간, 키메라, 인간화, 영장류화, 베니어(veneered), 단쇄, 도메인 항체(dAbs)) 및 항체의 항원 결합 부위(예컨대, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab' F(ab'), dAb)를 아우르고자 의도한 것이다(예컨대, Harlow *et al.*, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 참조). 특정 실시예에서, Cad-11 EC1 도메인 특이성 항체는 인간 항체 또는 인간화 항체이다. Cad-11 EC1 도메인 특이성 항체는 또한 세포 독성 물질과 직접적으로 또는 간접적으로 연관될 수 있다.
- [0035] Cad-11 단백질의 EC1 도메인의 N 말단 부분에 특이적으로 결합하고 Cad-11 단백질의 활성을 억제하는 기타 항체 또는 항체 단편은 또한 종래의 방법 또는 기타 적절한 기법에 의해 생산, 구축, 조작 및/또는 분리될 수 있다. 예를 들어, 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 특이적인 항체는 재조합 포유류(예컨대, 인간) 카드헤린-11 EC1 도메인 펩티드(예컨대, 서열번호 3) 또는 그의 일부분(합성 분자, 예컨대, 합성 펩티드를 포함하는)과 같은 적

당한 면역원에 대항하여 발생시킬 수 있다. 다양한 방법들이 기술되어 있다(예컨대, Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495-497 (1975) and *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976); Milstein *et al.*, *Nature* 266: 550-552 (1977); Koprowski *et al.*, U.S. Patent No. 4,172,124; Harlow, E. and D. Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); *Current Protocols In Molecular Biology*, Vol. 2 (Supplement 27, Summer '94), Ausubel, F.M. *et al.*, Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11, (1991) 참조). 항체는 또한 카드헤린-11의 EC1 도메인을 발현하는 세포(예컨대, 암 세포/세포주) 또는 카드헤린-11의 EC1 도메인을 발현하도록 유전자 조작된 세포(예컨대, 형질감염시킨 세포)로 적절한 숙주(예컨대, 마우스)를 면역화하여 발생시킬 수 있다(예컨대, Chuntharapai *et al.*, *J. Immunol.*, 152:1783-1789 (1994); Chuntharapai *et al.* U.S. Patent No. 5,440, 021 참조). 단일클론성 항체 생산을 위해, 적절한 불멸의 세포주(예컨대, SP2/0 또는 P3X63Ag8.653과 같은 골수종 세포주)를 항체 생산 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생산할 수 있다. 항체 생산 세포는 원하는 항원으로 면역화한 인간 또는 기타 적절한 동물의 말초 혈액, 또는 바람직하게는 비장 또는 림프절로부터 얻을 수 있다. 융합된 세포(하이브리도마)는 선택적인 배양 조건을 이용하여 분리하여, 제한된 희석에 의해 복제할 수 있다. 바람직한 특이성을 나타내는 항체를 생산하는 세포는 적절한 분석법(예컨대, ELISA)에 의해 선별할 수 있다.

[0036] 항체 단편은 효소적 절단에 의해 또는 재조합 기법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 파파인 또는 펩신 절단은 각각 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 발생시킬 수 있다. 필요한 기질 특이성을 나타내는 다른 프로테아제 또한 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 발생시키는 데 이용할 수 있다. 항체는 또한 자연적인 중결 부위의 상류에 하나 이상의 중결 코돈을 도입시킨 항체 유전자를 이용하여 다양한 절단형으로 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 키메라 유전자를 암호화하는 F(ab')<sub>2</sub> 중쇄 부분은 CH<sub>1</sub> 도메인과 중쇄의 경첩 영역을 암호화하는 DNA 서열들을 포함하도록 설계될 수 있다. 상이한 종들로부터 유래한 부분들을 포함하는, 키메라, CDR 접합된 또는 베니어 단일 사슬 항체뿐만 아니라, 단일 사슬 항체 및 인간, 키메라, 인간화 또는 연장유화(CDR 접합된), 또는 베니어 항체 등 또한 본 발명 및 용어 "항체" 에 포함된다. 이들 항체의 다양한 부분들이 종래의 기법에 의해 화학적으로 서로 연결될 수 있거나, 유전자 조작 기법을 이용하여 인접한 단백질로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 키메라 또는 인간화 사슬을 암호화하는 핵산은 인접한 단백질을 생산하고자 발현될 수 있다. 예컨대, Cabilly *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.*, European Patent No. 0,125,023 B1; Boss *et al.*, U.S. Patent No. 4,816,397; Boss *et al.*, European Patent No. 0,120,694 B1; Neuberger, M.S. *et al.*, WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al.*, European Patent No. 0,194,276 B1; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539; Winter, European Patent No. 0,239,400 B1; Queen *et al.*, European Patent No. 0 451 216 B1; and Padlan, E.A. *et al.*, EP 0 519 596 A1 참조. 단일 사슬 항체에 관하여, Newman, R. *et al.*, *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), regarding primatized antibody, and Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 4,946,778 and Bird, R.E. *et al.*, *Science*, 242: 423-426 (1988)) 참조.

[0037] 인간화 항체는 표준 방법을 이용한 합성 또는 재조합 DNA 기술 또는 기타 적절한 기법을 이용하여 생산될 수 있다. 인간화 가변영역을 암호화하기 위한 핵산(예컨대, cDNA) 서열은 이전에 인간화된 가변영역에서 DNA 주형과 같은, 인간 또는 인간화 사슬을 암호화하는 DNA 서열을 변경하기 위한 PCR 돌연변이화 방법을 이용하여 구축될 수 있다(예컨대, Kamman, M., *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17: 5404 (1989)); Sato, K., *et al.*, *Cancer Research*, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B.L. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); and Lewis, A.P. and J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991) 참조). 이러한 방법 및 기타 적절한 방법을 이용하여, 변이체 또한 쉽게 생산될 수 있다. 일실시예에서, 복제된 가변영역(예컨대, dAbs)은 돌연변이될 수 있으며, 원하는 특이성을 나타내는 변이체를 암호화하는 서열들이 선택될 수 있다(예컨대, 파지 라이브러리로부터; 예컨대, Krebber *et al.*, U.S. 5,514,548; Hoogenboom *et al.*, WO 93/06213, published April 1, 1993 참조).

[0038] 예를 들어, 라이브러리(예컨대, 파지 디스플레이 라이브러리)로부터 재조합 항체 또는 항체 결합 부위(예컨대, dAbs)를 선택하거나, 형질전환 동물(예컨대, 마우스)의 면역화에 의존하는 방법들을 포함하는, 필요한 특이성을 나타내는 항체를 생산 또는 분리하는 기타 적절한 방법들이 이용될 수 있다. 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 형질전환 동물들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며(예컨대, Xenomouse<sup>®</sup> (Abgenix, Fremont, CA)), 적절한 방법을 이용하여 생산할 수 있다(예컨대, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Lonberg *et al.*, U.S. Patent No. 5,545,806; Surani *et al.*, U.S. Patent No. 5,545,807; Lonberg *et al.*, WO 97/13852 참조).

- [0039] 일실시예에서, 본 발명은 인간 Cad-11의 EC1 도메인의 최초 약 37개 아미노산에 존재하는 에피토프에 결합하는 Cad-11 항체를 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명은 서열번호 10에 존재하는 에피토프에 결합하는 Cad-11 항체에 관한 것이다. 추가 실시예에서, 본 발명은 서열번호 11을 포함하는 에피토프에 결합하는 Cad-11 항체에 관한 것이다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 서열번호 12에 존재하는 에피토프에 결합하는 Cad-11 항체에 관한 것이다.
- [0040] 일실시예에서, 본 발명은 미국 버지니아 주 20108 머내서스 사서함 1549 American Type Culture Collection(ATCC)에 2009년 1월 8일 기탁된 하이브리도마 H1M1(ATCC 특허 수탁번호 PTA-9699)에 의해 생산된 Cad-11 항체에 관한 것이다. 다른 실시예에서, 본 발명은 미국 버지니아 주 20108 머내서스 사서함 1549 American Type Culture Collection(ATCC)에 2009년 1월 9일 기탁된 하이브리도마 H14(ATCC 특허 수탁번호 PTA-9701)에 의해 생산된 Cad-11 항체를 제공한다.
- [0041] 본 발명은 또한 인간 Cad-11 단백질 또는 그의 EC1 도메인 함유 부분(예컨대, 서열번호 3, 10, 12, 13)에 대한 결합을 위해 하이브리도마 H1M1에 의해 생산된 Cad-11 항체 및/또는 하이브리도마 H14에 의해 생산된 Cad-11 항체와 특이적으로 경쟁하는 항체들을 포함한다. 특정 실시예에서, 하이브리도마 H1M1 및/또는 하이브리도마 H14에 의해 생산된 Cad-11 항체와 특이적으로 경쟁하는 항체는 하이브리도마 H1M1 및/또는 하이브리도마 H14에 의해 생산된 Cad-11 항체가 인간 Cad-11 단백질 또는 그의 EC1 도메인을 함유하는 부분(예컨대, 서열번호 3, 10, 12, 13)에 결합하는 것을 차단한다(예컨대, 억제한다, 줄인다, 방지한다).
- [0042] 게다가, 본 발명은, 적어도 하이브리도마 H1M1에 의해 생산된 Cad-11 항체 및/또는 하이브리도마 H14에 의해 생산된 Cad-11 항체의 인간 Cad-11 단백질 또는 그의 EC1 도메인을 함유하는 부분에 대한 결합 친화도 정도의 인간 Cad-11 단백질 또는 그의 EC1 도메인을 함유하는 부분에 대한 결합 친화도를 나타내는 항체들을 포함한다.
- [0043] 카드헤린-11 융합 단백질
- [0044] 또한, 인간 Cad-11의 EC1 도메인만을 함유한 면역 글로불린 융합 단백질(예컨대, 인간 IgG의 부분에 융합시킨 인간 Cad-11의 EC1 도메인)은 다섯 개의 EC 도메인 모두를 함유한 Cad-11의 EC 영역 가운데 더 많은 부분을 포함한 융합 단백질보다 더욱 효과적으로 시험관 내 Cad-11 활성을 억제했다.
- [0045] 카드헤린-11 길항제는 또한 외래 단백질의 전부 또는 일부에 작동 가능하게 연결된 인간 Cad-11의 EC1 도메인의 적어도 약 N 말단의 35개 아미노산(서열번호 2)을 포함하는 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. "작동 가능하게 연결된" 은 Cad-11 EC1 도메인의 일부와 외래 단백질이 인프레임(in-frame)으로 융합됨을 나타낸다. 외래 단백질은 단백질의 N 말단 또는 C 말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 단백질 서열이 GST 서열의 C 말단에 융합된 GST 융합 단백질일 수 있다. 다른 유형의 융합 단백질은 효소적 융합 단백질, 예를 들어,  $\beta$ -갈락토시다아제 융합 단백질, 이스트 투-하이브리드 GAL 융합 단백질, 폴리 His 융합물, FLAG 표지된 융합 단백질, GFP 융합 단백질, 및 면역 글로불린(Ig) 융합 단백질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 그러한 융합 단백질은 정제(예컨대, 재조합 융합 단백질의)를 촉진시킬 수 있다. 특정 숙주 세포(예컨대, 포유류의 숙주 세포)에서, 단백질의 발현 및/또는 분비는 외래 신호 서열을 이용하여 증가시킬 수 있다. 따라서, 다른 실시예에서, 융합 단백질은 그 N 말단에 외래 신호 서열을 함유한다.
- [0046] EP-A-0 464 533는 면역 글로불린 불변영역의 다양한 부분을 포함하는 융합 단백질을 개시한다. Fc는 치료와 진단에 유용하며, 따라서 예를 들어, 향상된 약물동력학적 성질들을 가져온다(예를 들어, EP-A 0232 262 참조). 신약 개발에서, 예를 들어, 인간 단백질은 길항제 확인을 위한 고속대량 스크리닝 분석법을 목적으로 Fc 부분과 융합되었다(Bennett *et al.*, *Journal of Molecular Recognition* 8:52-58 (1995); Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(16):9459-9471 (1995)). 따라서, 이번 발명은 또한 본 발명의 단백질 Cad-11 길항제와 다양한 하위 클래스의 면역 글로불린(예컨대, IgG, IgM, IgA, IgE)의 중쇄 및/또는 경쇄의 불변영역의 다양한 부분들을 함유하는 가용성 융합 단백질을 포함한다. 본 발명의 면역 글로불린 융합 단백질의 장점은 다음 중 하나 이상을 포함한다: (1) 결과로서 얻어지는 이량체 융합 단백질의 2가 덕분에 다가 리간드에 대한 결합활성 증가, (2) 혈청 반감기 연장, (3) Fc 도메인을 통해 효과기 세포를 활성화하는 능력, (4) 정제의 용이성(예를 들어, 단백질 A 크로마토그래피에 의한), (5) Cad-11에 대한 친화도, 및 (6) Cad-11 매개성 활성을 차단하는 능력.
- [0047] 따라서, 특정 실시예에서, Cad-11 길항제는 포유류의 면역 글로불린 단백질 전부 또는 일부에 작동 가능하게 연결된 EC1 도메인의 N 말단 부분(서열번호 2의 54~90번 아미노산)을 포함하는 카드헤린-11 단백질의 세포 외 영역의 일부를 포함하는 융합 단백질이다. 특정 실시예에서, 본 발명의 면역 글로불린 융합 단백질은 서열번호 2

의 1~609번 아미노산 내에 함유된 다섯 개의 EC 도메인 모두를 포함하는 카드헤린-11의 세포 외 영역의 일부분을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 인간 카드헤린-11 세포 외 영역의 일부분은 예를 들어, 서열번호 2의 1~160번 아미노산, 1~259번 아미노산, 또는 1~269번 아미노산을 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 융합 단백질은 인간 카드헤린-11의 리더(leader)와 프로 영역(pro-region)(서열번호 2의 1~53번 아미노산)이 없어, 외래성 리더 서열을 이용한다. 면역 글로불린 일부분은 쥐와 같은 임의의 척추동물 공급원으로부터 유래할 수 있으나, 바람직하게는 인간 면역 글로불린 단백질이다. 일 실시예에서, 포유류의 면역 글로불린 단백질은 인간 IgG<sub>2</sub> 단백질 또는 인간 IgG<sub>2</sub>의 경첩-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> 부분과 같은 그것의 일부분이다.

[0048] 본 발명의 키메라 또는 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 상이한 단백질 서열(예컨대, Cad-11 EC1 도메인 펩티드 및 포유류의 면역 글로불린)을 암호화하는 DNA 단편은 종래의 기법에 따라 함께 인프레이밍으로 연결된다. 다른 실시예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함한 종래의 기법에 의해 합성될 수 있다. 선택적으로, 나중에 어닐(anneal) 및 재증폭될 수 있는 두 개의 연속적인 핵산 단편들 사이에 상보적인 돌출부를 생기게 하는 앵커 프라이머를 이용하여 핵산 단편들의 PCR 증폭을 행하여, 키메라 핵산 서열을 발생시킬 수 있다(Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, 1992 참조). 나아가, 이미 융합 모이어티(예컨대, GST 모이어티, Fc 모이어티)를 암호화하는 많은 발현 벡터들이 상업적으로 판매되고 있다. 단백질 Cad-11 길항제를 암호화하는 핵산 분자가 이러한 발현 벡터로 복제될 수 있어, 융합 모이어티(예컨대, 면역 글로불린)가 단백질에 인프레이밍으로 연결된다.

[0049] 본 발명의 면역 글로불린 융합 단백질은 단량체, 이량체, 사량체 또는 기타 다량체(예컨대, 고분자)로 제공될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 면역 글로불린 부분의 가변 도메인은 다가성 리간드를 형성하기 위해 예를 들어, 각 V 도메인의 C 말단의 경첩 영역 및 경첩 영역의 시스테인 사이의 이황화결합의 제공; 또는 도메인의 C 말단의 시스테인과 함께 각각의 중쇄의 제공, 여기서 시스테인은 서로 이황화결합으로 결합된다; 또는 Fab 포맷을 생성하기 위한 V-CH 및 V-CH의 생성; 또는 이량체, 삼량체 및 추가적인 다량체 생성을 위한 펩티드 링커(예를 들어, Gly<sub>4</sub>Ser 링커)의 사용에 의해 서로 연결될 수 있다. 예를 들어, 그러한 리간드는 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인 중 하나 또는 둘 다, 그리고 선택적으로 경첩 영역을 포함하는 항체 Fc 영역에 연결될 수 있다. 예를 들어, Fc 영역에 단일 뉴클레오타이드 서열로서 연결된 리간드를 암호화하는 벡터가 그러한 리간드를 제조하는 데(예컨대, 발현에 의해) 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 면역 글로불린 융합 단백질은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그의 유도체(예컨대, 폴리메틸에틸렌 글리콜)의 다량체, 방사성 핵종, 세포독성물질 및 세포독성약물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 기타 모이어티에 접합될 수 있으며, 나중에 생체 내 치료를 위해 이용될 수 있다. 방사성 핵종의 예로는 다른 것들 중에서도 <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>186</sup>Re, 및 <sup>90</sup>Y를 포함한다. 방사선 치료의 기술 분야에서 알려진 바와 같이, 방사성 핵종은 국부적으로 세포를 방사능 처리하여 세포독성 효과를 나타내며, 다양한 세포 내 병변을 초래한다. 융합 단백질에 접합될 수 있는 세포독성약물은 다우노루비신, 독소루비신, 메토티렉세이트 및 미토마이신 C를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 세포독성약물은 DNA, RNA 및 단백질 합성을 포함한 중요한 세포과정들을 방해한다. 당해 분야에 알려진 이러한 부류의 약물의 더욱 완전한 설명과 작용 기전에 대해서는 Goodman, A.G., *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Col, 1990. Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, Fifth Edition, p 768-769, 808-809, 896, Appleton and Lange, Norwalk, Conn을 참조.

[0051] 본원에 사용한 용어 "면역 글로불린 융합 단백질"은 본 발명의 면역 글로불린 융합 단백질의 단편을 포함한다. 그러한 단편들은 본 발명의 범위 내에 있도록 의도한 것이다. 예를 들어, 분자들이 일단 분리되면, 그들은 여전히 인간 Cad-11의 EC1 도메인에 결합할 수 있는 단편을 발생시키도록 프로테아제로 절단할 수 있다.

[0052] 펩티드 길항제

[0053] 본 발명의 카드헤린-11 길항제는 또한 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인에 결합하는 펩티드일 수 있다. 펩티드는 임의의 적절한 L- 및/또는 D-아미노산, 예를 들어, 흔한 α-아미노산(예컨대, 알라닌, 글리신, 발린), 비 α-아미노산(예컨대, β-알라닌, 4-아미노부티르산, 6-아미노카프로산, 사르코신, 스타틴), 및 특이한 아미노산(예컨대, 시트룰린, 호모시트룰린, 호모세린, 노르류신, 노르발린, 오르니틴)을 포함할 수 있다. 펩티드 상의 아미노, 카르복실 및/또는 기타 기능기는 자유롭거나(예컨대, 개질되지 않음) 적절한 보호기로 보호될 수 있다. 아미노 및 카르복실기를 위한 적절한 보호기 및 보호기를 첨가 또는 제거하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있



으며, 예를 들어, Green and Wuts, "*Protecting Groups in Organic Synthesis*" John Wiley and Sons, 1991에 개시되어 있다. 펩티드의 기능기는 또한 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 유도체화될 수 있다(예컨대, 알킬화).

[0054] 펩티드 Cad-11 길항제는 원한다면, 하나 이상의 개질을 포함할 수 있다(예컨대, 아미노산 링커, 아실화, 아세틸화, 아미드화, 메틸화, 말단 개질제(예컨대, 고리화 개질)). 펩티드는 또한 화학적 개질(예컨대, N-메틸-아미노기 치환)을 함유할 수 있다. 또한, 펩티드 길항제는 공지의 및/또는 자연 발생적인 펩티드의 유사체, 예를 들어, 보존적 아미노산 잔기 치환(들)이 있는 펩티드 유사체일 수 있다. 이러한 개질은 펩티드의 카드헤린-11 길항제 활성을 포함한, 펩티드의 다양한 성질(예컨대, 용해도, 결합)을 향상시킬 수 있다.

[0055] 펩티드인 Cad-11 길항제는 선형, 가지형 또는 고리형, 예컨대, 몇 개의 아미드 결합을 포함하는 헤테로원자 고리 구조를 갖는 펩티드일 수 있다. 특정 실시예에서, 펩티드는 고리형 펩티드이다. 그러한 펩티드는 표준 기법을 이용하여 당업자가 생산할 수 있다. 예를 들어, 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생단백질로부터 펩티드가 유래 또는 제거될 수 있거나, 적합한 방법, 예를 들어, 고체상 펩티드 합성(예컨대, 메리필드형(Merrifield-type) 합성)에 의해 펩티드가 합성될 수 있다(예를 들어, Bodanszky *et al.* "*Peptide Synthesis*", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976 참조). 카드헤린-11 길항제인 펩티드는 예를 들어, 재조합 DNA 방법 또는 기타 적합한 방법을 이용해서도 생산될 수 있다(예를 들어, Sambrook J. and Russell D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001 참조).

[0056] 펩티드는 합성되어 소수 내지 다수의 개별 분자 종류를 포함하는 라이브러리로 수집될 수 있다. 그러한 라이브러리는 결합 화학의 방법을 이용하여 제조될 수 있고, 라이브러리가 원하는 생물학적 활성이 있는 펩티드를 포함하는지 확인하기 위한 임의의 적절한 방법을 이용하여 스크리닝 될 수 있다. 그런 다음, 그러한 펩티드 길항제는 적절한 방법을 이용하여 분리할 수 있다.

[0057] 펩티도미메틱 길항제

[0058] 카드헤린-11 길항제는 또한 펩티도미메틱스일 수 있다. 예를 들어, 펩티드와 동일한 기능기가 있는 다당류가 제조될 수 있다. 펩티도미메틱스는 예를 들어, 표적 분자와 결합되거나 결합할 환경에 펩티드 물질의 3차원 구조를 확립함으로써 설계할 수 있다. 펩티도미메틱은 적어도 두 가지 성분, 결합 모이어티 또는 모이어티들과 백본 또는 지지 구조를 포함한다.

[0059] 결합 모이어티는 표적 분자와, 예를 들어, Cad-11의 EC1 도메인 내의 아미노산과 반응하거나 복합체를 형성(예컨대, 소수성 또는 이온성 상호작용을 통해)하는 화학 원자 또는 화학기이다. 예를 들어, 펩티도미메틱 내 결합 모이어티는 펩티드 또는 단백질 길항제 내의 결합 모이어티와 동일할 수 있다. 결합 모이어티는 펩티드 길항제 내의 결합 모이어티와 동일하거나 유사한 방식으로 수용체와 반응하는 원자 또는 화학기일 수 있다. 예를 들어, 카드헤린-11 단백질의 EC1 도메인의 공여체 서열의 펩티드 미메틱스, 예를 들어, Cad-11 단백질의 EC1 도메인 내 포켓 서열에 결합할 수 있는 펩티드 미메틱스를 설계하는 데 컴퓨터 화학이 이용될 수 있다. 펩티드 내의 염기성 아미노산을 위한 펩티도미메틱을 설계하는 데 적합한 결합 모이어티의 예로는 아민, 암모늄, 구아니딘 및 아미드와 같은 질소를 함유하는 기 또는 포스포늄을 포함한다. 산성 아미노산을 위한 펩티도미메틱을 설계하는 데 적합한 결합 모이어티의 예로는 카르복실, 저급 알킬 카르복시산 에스터, 술폰산, 저급 알킬 술폰산 에스터 또는 아인산 또는 그의 에스터를 포함한다.

[0060] 지지 구조는 결합 모이어티 또는 모이어티들에 결합될 때, 펩티도미메틱의 3차원 배열을 제공하는 화학적 개체이다. 지지 구조는 유기성 또는 무기성일 수 있다. 유기성 지지 구조의 예로는 다당류, 유기성 합성 고분자(폴리비닐 알코올 또는 폴리락티드와 같은)의 폴리머 또는 올리고머를 포함한다. 지지 구조가 펩티드 백본 또는 지지 구조와 실질적으로 동일한 크기와 규모를 보유하는 편이 바람직하다. 이는 펩티드 및 펩티도미메틱의 원자의 크기와 결합을 산출하거나 측정하여 확인할 수 있다. 일 실시예에서, 펩티드 결합의 질소는 산소 또는 황으로 치환되어, 예를 들어, 폴리에스터 백본을 형성할 수 있다. 다른 실시예에서, 카르보닐은 술폰닐기 또는 술피닐기로 치환되어, 폴리아미드(예컨대, 폴리술폰아미드)를 형성할 수 있다. 펩티드의 역 아미드가 제조될 수 있다(예컨대, -NHCO-기를 위해 하나 이상의 -CONH-기를 치환하여). 또 다른 실시예에서, 펩티드 백본은 폴리실란 백본으로 치환될 수 있다.

[0061] 이러한 화합물은 공지의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 아미노산의 상응하는  $\alpha$ -아미노기에 대해 하

이드록시기를 치환하여 하이드록시산을 제조하고, 그 이후에 하이드록시산을 에스테르화하고, 선택적으로 부반응을 최소화하기 위하여 염기성 및 산성 결합자들을 차단하여 폴리에스터 펩티도미메틱을 제조할 수 있다. 적당한 화학적 합성 경로의 결정은 화학적 구조 결정 시 일반적으로 쉽게 확인될 수 있다.

[0062] 펩티도미메틱스는 합성되어 소수에서 다수의 개별 분자 종류를 포함하는 라이브러리로 수집될 수 있다. 그러한 라이브러리는 결합 화학의 방법을 이용하여 제조될 수 있고, 라이브러리가 원하는 생물학적 활성이 있는 하나 이상의 펩티도미메틱을 포함하는지 확인하기 위하여 스크리닝 될 수 있다. 그런 다음, 그러한 펩티도미메틱 길항제는 적절한 방법에 의해 분리할 수 있다.

[0063] 소분자 길항제

[0064] 카드헤린-11 길항제는 또한 소분자일 수 있다. 소분자의 예로는 유기 화합물, 유기금속 화합물, 무기 화합물 및 유기, 유기금속 및 무기 화합물의 염을 포함한다. 소분자 내의 원자들은 일반적으로 서로 공유 및/또는 이온결합으로 연결되어 있다. 작은 유기 분자 내의 원자들의 배열은 사슬(예컨대, 탄소-탄소 사슬 또는 탄소-헤테로원자 사슬)을 나타낼 수 있거나, 탄소 원자를 함유하는 고리(예컨대, 벤젠 또는 다환성 시스템), 또는 탄소와 헤테로원자의 조합, 즉, 피리미딘 또는 퀴나졸린과 같은 헤테로사이클을 나타낼 수 있다. 소분자는 임의의 분자량을 나타낼 수 있지만, 그들은 일반적으로, 약 5,000달톤 미만인 분자들을 포함한다. 예를 들어, 그러한 소분자들은 약 1,000달톤 미만일 수 있으며, 바람직하게는 약 750달톤 미만이며, 더욱 바람직하게는 약 500달톤 미만이다. 소분자 및 기타 비 펩티드성 카드헤린-11 길항제는 자연계에서 발견될 수 있고(예컨대, 동정되거나, 분리되거나, 정제된다) 및/또는 합성으로 생산될 수 있다(예컨대, 전통적인 유기 합성, 생물 매개적 합성, 또는 이의 조합에 의해). 예컨대, Ganesan, Drug Discov. Today 7(1): 47-55 (January 2002); Lou, Drug Discov. Today, 6(24): 1288-1294 (December 2001) 참조. 자연적으로 발생하는 소분자의 예로는 호르몬, 신경전달물질, 뉴클레오타이드, 아미노산, 당, 지질 및 그들의 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0065] 본 발명에 따른 소분자 카드헤린-11 길항제 및 그의 생리학적으로 허용 가능한 염은 카드헤린-11 단백질의 동형결합을 억제할 수 있다(예컨대, 다른 카드헤린-11의 결합 포켓에 대한 결합에 대하여, Cad-11 단백질의 EC1 도메인의 공여체 서열과 직접적으로 경쟁하여; 다른 카드헤린-11의 공여체 서열에 대한 결합에 대하여, Cad-11 단백질의 EC1 도메인의 결합 포켓과 직접적으로 경쟁하여).

[0066] 핵산 길항제

[0067] 본 발명의 Cad-11 길항제는 또한 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인에 결합하는 핵산 분자(예컨대, 올리고뉴클레오타이드)일 수 있다. 적절한 핵산 Cad-11 길항제는 고전적인 왓슨-크릭 염기쌍 외의 상호작용들을 통한 높은 친화도와 특이성으로 원하는 특정 분자(예컨대, 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인)에 결합할 수 있는 애포타머를 포함한다(Tuerk and Gold, Science 249:505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346:818 (1990)).

[0068] 파지 디스플레이 또는 단일클론성 항체(MAbs)에 의해 발생된 펩티드 같은 애포타머는 선택된 표적에 특이적으로 결합할 수 있고, 결합을 통해 표적들이 기능할 수 있는 능력을 차단한다. 임의의 서열 올리고뉴클레오타이드의 풀(pool)로부터 시험관 내 선별 과정에 의해 만들어진 애포타머는 성장인자, 전사인자, 효소, 면역 글로불린 및 수용체를 포함한 100개 이상의 단백질을 위해 생성되었다. 전형적인 애포타머는 크기가 10 내지 15kDa(30~45개 뉴클레오타이드)이고, 표적에 나노몰 이하의 친화도로 결합하며, 밀접하게 관련된 표적들을 차별한다(예컨대, 동일한 유전자 패밀리에서 나온 다른 단백질과는 전형적으로 결합하지 않는다). 일련의 구조적 연구 결과들은 애포타머가 항체-항원 복합체에 친화도와 특이성을 제공하는 동일한 유형의 결합 상호작용(수소결합, 정전기적 상보성, 소수성 접촉, 입체적 배제 등)을 사용할 수 있음을 보여주었다.

[0069] 원하는 표적(예컨대, 인간 Cad-11 단백질의 EC1 도메인)에 결합하는 애포타머는 예컨대, 미국 특허 제5,475,096호 및 미국 특허 제5,270,163호에 기술된 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라 알려진 표준 과정을 이용하여 생성 및 확인할 수 있다.

[0070] 카드헤린-11 길항제의 확인

[0071] 소분자를 포함한, 카드헤린-11 결합 특이성이 있는 물질은 스크린, 예를 들어, 화학적 화합물의 고속대량 스크

린 및/또는 라이브러리(예컨대, 화학적, 펩티드, 핵산 라이브러리)에서 확인할 수 있다.

- [0072] 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 항체들은 예를 들어, 시중에서 판매 중인 결합 항체 라이브러리(Dyax Corp., MorphoSys AG)를 스크리닝하여 확인할 수 있다. 적절한 결합 항체 라이브러리와 이들 라이브러리를 스크리닝하는 표준 방법은 Hoet *et al.*, *Nature Biotechnology* 23(3):344-348 (2005) 및 Rauchenberger *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278(40):38194-38205 (2003)에 기술되어 있으며, 그 내용은 본원에 참조로서 포함된다. 그러한 라이브러리 또는 분자들의 모음은 또한 잘 알려진 화학적 방법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0073] 선택적으로 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인에 특이적으로 결합하는 쥐 항체는 예를 들어, EC1 단백질 도메인 또는 EC1 펩티드를 항원에 대한 내성을 무너뜨리는 아주반트와 함께 마우스에 면역화하여, 확인할 수 있다. 이들 항체는 원하는 특이성 및 활성에 대해 스크리닝한 다음, 인간 질병 치료를 위해 적절한 물질을 제조하기 위해 알려진 기법을 이용하여 인간화시킬 수 있다.
- [0074] 화합물 또는 소분자는 화학적 화합물의 여러 가지 이용 가능한 라이브러리로부터, 예를 들어, 하버드대학교의 화학 및 세포생물학 연구소(Institute of Chemistry and Cell Biology at Harvard University)의 라이브러리 및 기타 상업적 공급원으로부터 이용 가능한 라이브러리(예컨대, Chembridge, Peakdale, CEREP, MayBridge, Bionet)뿐만 아니라, 미국 국립암연구소의 화학물질 저장소(Chemical Repository)와 Molecular Libraries Small Molecules Repository(PubChem)로부터 확인할 수 있다. 그러한 라이브러리 또는 분자들의 모음은 또한 결합 화학의 잘 알려진 방법과 같은, 잘 알려진 화학적 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 라이브러리는 카드헤린-11과 결합하여 이를 억제하는 화합물을 확인하기 위하여 스크리닝될 수 있다.
- [0075] 확인된 화합물은 의약 화학의 잘 알려진 방법을 이용한 추가적인 다각화를 위한 선도적인 화합물로서 기능할 수 있다. 예를 들어, 선례의 구조적인 변이체인 화합물의 모음이 준비되어 카드헤린-11 결합 및/또는 억제능에 대해 스크리닝될 수 있다. 이는 화합물의 구조를 생물학적 활성과 연결시키는 구조 활성 관계의 발전을 가져올 수 있다. 적절한 결합 및 억제능이 있는 화합물은 생체 내 이용을 위해 더 개발될 수 있다.
- [0076] 카드헤린-11과 결합하는 물질은 카드헤린-11 길항제 활성에 대해 추가적으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 카드헤린-11 단백질을 포함하는 조성물은 카드헤린-11 단백질에 결합하여 길항작용을 하는 물질을 검출 및/또는 확인하는 스크린 또는 결합 분석법에 이용될 수 있다. 이용에 적합한 조성물은 예를 들어, 카드헤린-11 단백질을 자연적으로 발현하는 세포(예컨대, 윤활막 세포), 그러한 세포의 추출물 및 재조합 카드헤린-11 단백질을 포함한다.
- [0077] 카드헤린-11 단백질에 결합하는 물질은 경쟁적 결합 분석법, 예를 들어, 카드헤린-11이 참조물질에 결합하는 것을 억제하는 시험물질의 능력을 평가하는 분석법에서 확인될 수 있다. 참조물질은 완전한 길이의 Cad-11 단백질 또는 EC1 도메인을 포함하는 그의 일부분일 수 있다. 참조물질은 적절한 표지(예컨대, 방사성 동위원소, 에피토프 표지, 친화도 표지(예컨대, 비오틴과 아비딘 또는 스트렙트아비딘), 스핀 표지, 효소, 형광성 기, 화학 발광 기, 염료, 금속(예컨대, 금, 은), 자성 비드)를 붙일 수 있으며, 분석법에서 카드헤린-11 단백질을 포화시키는 데 필요한 표지된 참조물질의 양을 결정할 수 있다. 카드헤린-11 단백질과 시험물질 사이의 복합체 형성의 특이성은 적절한 대조군(예컨대, 비표지 물질, 표지 단독)을 이용하여 결정할 수 있다.
- [0078] 참조물질과 카드헤린-11 단백질 사이의 복합체 형성을 억제하는 시험물질의 능력은 표지된 참조물질의 특이적 결합을 50% 억제하는 데 필요한 시험물질의 농도(IC<sub>50</sub> 값)로서 결정할 수 있다. 특이적 결합은 바람직하게는 총 결합(예컨대, 복합체 내의 총 표지)에서 비특이적 결합을 뺀 것으로 정의된다. 비특이적 결합은 바람직하게는 과량의 비표지 참조물질 존재 하에서 형성된 복합체에서 여전히 검출되는 표지의 양으로 정의된다. 방법에 이용하기에 적합한 참조물질은 카드헤린-11에 특이적으로 결합하는 분자와 화합물(예컨대, 카드헤린-11에 결합하는 항체)를 포함한다.
- [0079] 카드헤린-11 단백질에 대해 길항작용하는 물질은 카드헤린-11의 하나 이상의 활성에 대해 길항작용하는(감소시키는, 방지하는, 억제하는) 능력, 예를 들어, 결합 활성(예컨대, 동형 Cad-11 결합)과 같은 능력이 있는 물질을 스크리닝하여 확인할 수 있다. 그러한 활성은 적당한 시험관 내 또는 생체 내 분석법을 이용하여 평가할 수 있다. 카드헤린-11 활성에 대한 예시적인 분석법은 이전에 기술된 바 있다(Patel, SD, *et al.*, *Cell* 124: 1255-1268 (2006); Lee *et al.*, *Science* 315:1006-1010 (2007)).
- [0080] 일단 카드헤린-11 길항제가 확인되면, 세포 내에서 카드헤린-11 활성과 관련된 하나 이상의 생물학적 기능 또는 성질을 방해하는(예컨대, 감소시키는, 억제하는, 방지하는) 카드헤린-11 길항제의 능력은 예를 들어, 카드헤린-

11과 관련된 특정한 생물학적 기능 또는 성질을 측정하고자 설계된 세포 기반의 분석법을 이용하여 평가할 수 있다. 카드헤린-11 발현 및/또는 활성과 관련된 것으로 알려진 생물학적 기능 및 성질로는 세포 부착, 세포 이동, 세포 침입, 세포 분리, 세포 응축, 세포 재배열, 조직 무결성 및 구성의 유지, 세포 증식의 접촉 저지 및 암(예컨대, 종양) 세포의 악성 변환(Kiener and Brenner, *Arthritis Res Ther.* 7(2):49-54 (2005)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, Cad-11 길항제는 본원에서 윤활막 세포에 의해 활성 MMP의 생산을 억제하는 것으로 나타났다. 카드헤린의 하나 이상의 생물학적 기능을 평가하는 적절한 분석법은 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있으며(예컨대, Patel, SD, *et al.*, *Cell* 124:1255-1268 (2006) 참조), 예를 들어, 본원에서 기술한 세포 응집 분석(실시예, 재료 및 방법 난 참조)을 포함한다.

[0081]

치료방법

[0082]

임의의 하나의 이론에 얽매이기를 바라지 않지만, Cad-11의 EC1 도메인의 최초 약 35개 아미노산(예컨대, 약 33 내지 약 37개 아미노산)은 동형 카드헤린 결합에 필요하며, Cad-11의 이 영역에 특이적으로 결합하는 물질은 Cad-11 분자들 사이의 결합을 효과적으로 저해할 수 있다고 여겨진다. 따라서, 그러한 물질은 세포(예컨대, 윤활막 세포)에서 Cad-11 발현 또는 활성과 관련된 질환(예컨대, 염증성 질환, 섬유증, 암)의 치료 및 예방에 유용하다. 따라서, 본 발명의 일측면은 인간 카드헤린-11 EC1 도메인 펩티드(서열번호 3)에 결합하는 카드헤린-11 길항제를 치료적으로 유효한 양으로 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상에서 카드헤린-11 매개성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0083]

본원에 사용한 "카드헤린-11 매개성 질환"은 카드헤린-11 단백질을 발현하는 세포를 동반하거나 또는 그에 의해 매개되는(예컨대, 발생되는) 질병, 질환 또는 상태를 나타낸다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 카드헤린-11 매개성 질환은 염증성 질환(예컨대, 염증성 관절 질환), 섬유증 질환(예컨대, 피부에 관한 섬유증, 폐 섬유증) 및 암을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0084]

본 발명의 방법을 이용하여, 포유류(예컨대, 인간)에서 카드헤린-11 매개성 질환은 본 발명의 카드헤린-11 길항제(예컨대, 항체, 융합 단백질, 소분자, 핵산, 펩티드, 펩티도미메틱스)를 예를 들어, 세포의 응집을 억제하거나, 세포의 이동을 억제하거나, 카드헤린-11을 발현하는 세포(예컨대, 윤활막 세포, 섬유모세포, 종양 세포)에 의한 활성 프로테아제 또는 염증성 분자들의 발현을 억제하여, 치료적 이익을 제공하기에 충분한 양으로 투여함으로써 치료할 수 있다.

[0085]

따라서, 본 발명의 일측면은 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 카드헤린-11 길항제를 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상에서 염증성 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 염증성 질환은 일반적으로 프로-염증성 분자(예컨대, 염증성 사이토카인 및 성장인자)의 발현, 면역세포(예컨대, 대식세포, 단핵구, 림프구, 형질세포, 백혈구, 섬유모세포, 중성구, T 세포)의 활성화를 특징으로 한다. 염증성 질환은 예를 들어, 염증성 관절 질환, 염증성 장 질환(예컨대, 크론병, 궤양성 대장염), 건선, 피부염(예컨대, 습진), 신장 아밀로이드증, 사구체신장염, 혈관염, 골반염 질병, 만성 전립샘염, 그레이브 눈병증을 포함한다. 특정 실시예에서, 염증성 질환은 자가면역질환이다.

[0086]

특정 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 카드헤린-11 길항제를 대상에 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상에서 염증성 관절 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 염증성 관절 질환은 연결된 관절의 세포(예컨대, 윤활막 세포)에서 카드헤린-11 발현과 관련이 있거나 카드헤린-11 발현을 특징으로 하는 임의의 질환일 수 있다. 본 발명에 의해 치료할 수 있는 염증성 관절 질환의 예로는 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 라이터 증후군, 강직성 척추염, 소아 만성 관절염, 만성 라임병 및 전신홍반루푸스와 관련된 관절염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시예에서, 염증성 관절 질환은 류마티스 관절염이다.

[0087]

다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 카드헤린-11 길항제를 치료적으로 유효한 양으로 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상에서 섬유증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본원에 사용한 용어 "섬유증"은 회복 또는 반응 과정으로서, 기관 또는 조직에서 과잉의 섬유질 연결 조직의 형성 또는 발달을 나타낸다. 섬유증의 예로는 혈관성 섬유증(예컨대, 폐고혈압과 관련된 혈관성 섬유증), 신장 섬유증, 간 섬유증(예컨대, 경변증), 피부 섬유증(예컨대, 피부 경화증), 폐섬유증(예컨대, 특발성 폐섬유증), 골수 섬유증, 심내막심근 섬유증, 관절의 섬유증, 중피 섬유증, 안구 섬유증, 내장 섬유증 및 간질성 섬유증을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시예에서, 섬유증은 폐섬유증이다. 다른 실시예에서, 섬유증은 피부 섬유증이다.

[0088]

임의의 특정 이론에 얽매이기를 바라지 않지만, 종양 세포의 어떤 유형은 종양 전이를 촉진할 수 있는 카드헤린



-11을 발현한다고 여겨진다. 따라서, 본 발명의 Cad-11 길항제는 대상에서 종양 생성, 성장 및/또는 전이를 억제하는 데 이용될 수 있다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 카드헤린-11 길항제를 치료적으로 유효한 양을 대상에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류의 대상에서 암(예컨대, Cad-11을 발현하는 세포를 특징으로 하는 암)을 치료하는 방법에 관한 것이다. Cad-11 단백질을 발현하는 세포를 동반하는 암은 예를 들어, 백혈병(예컨대, AML, CLL, 전립선암성 백혈병), 폐암(예컨대, 소세포 및 비 소세포 폐 악성 종양), 식도암, 위암, 대장암, 뇌암(예컨대, 별아교세포종, 신경아교종, 아교모세포종, 속질모세포종, 수막종, 신경모세포종), 방광암, 유방암, 자궁경부암, 상피암, 비인두암(예컨대, 구강 또는 후두 편평세포암종), 림프종(예컨대, 여포성 림프종), 자궁암(예컨대, 악성 섬유성 조직구종), 간암(예컨대, 간세포암종), 두경부암(예컨대, 두경부 편평세포암종), 신장암, 남성 생식세포 종양, 악성 중피종, 골수형성이상증후군, 난소암, 췌장 또는 담도암, 전립선암, 갑상선암(예컨대, 산발성 여포성 갑상선종양) 및 요로상피암을 포함할 수 있다.

[0089] 일측면에서, 치료적으로 유효한 양의 카드헤린-11 길항제가 그것을 필요로 하는 환자에게 투여된다. 투여되는 카드헤린-11 길항제의 양(예컨대, 치료적으로 유효한 양)은 본원에 제공된 안내 및 당해 분야에 공지된 기타 방법을 이용하여 임상 의사 결정할 수 있으며, 예를 들어, 선택된 특정 물질, 대상의 나이, 민감도, 약물에 대한 내성, 전반적인 웰빙을 포함한 몇 가지 요인에 의존적이다. 예를 들어, 항체인 Cad-11 길항제의 적절한 투여량은 치료당 약 0.01mg/kg 내지 약 300mg/kg 체중일 수 있고, 바람직하게는 치료당 약 0.01mg/kg 내지 약 100mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 1mg/kg 내지 10mg/kg 체중일 수 있다. 소분자 Cad-11 길항제의 적절한 투여량은 치료당 약 0.001mg/kg 내지 약 100mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 100mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 10mg/kg, 약 0.01mg/kg 내지 약 1mg/kg 체중일 수 있다. 단백질 또는 펩티드(선형, 고리형, 미메틱)인 카드헤린-11 길항제의 적절한 투여량은 펩티드의 혈장 농도가 약 0.1 $\mu$ g/ml 내지 약 200 $\mu$ g/ml이 되게 한다. 특정 물질, 환자 및 암을 위한 투여량 결정은 당해 분야의 당업자의 능력 내에서 쉽게 할 수 있다. 바람직하게는, 투여량은 최소한의 부작용(예컨대, 면역성 반응, 메스꺼움, 현기증, 급성위연동이상항진, 과다점성증후군, 울혈성심장기능상실, 뇌졸중, 폐부종)을 유발하거나 초래하지 않는다.

[0090] 치료적으로 유효한 양의 카드헤린-11 길항제는 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료물질(예컨대, 항염증제, 화학요법제)과 조합하여 투여할 수 있다. 염증성 관절 질환, 특히 류마티스 관절염 치료에 유용한, 본 발명의 Cad-11 길항제와 조합하여 투여할 수 있는 적절한 항염증제는 (i) 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs; 예컨대, 데토프로펜, 디클로페낙, 디플루니살, 에토돌락, 페노프로펜, 플루르비프로펜, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 메클로페나민산, 메페나믹산, 멜록시캄, 나부메톤, 나프록센 소듐, 옥사프로진, 피록시캄, 수린단, 톨메틴, 세레콕시브, 로페콕시브, 아스피린, 콜린 살리실레이트, 살사레이트, 및 소듐 및 마그네슘 살리실레이트); (ii) 스테로이드(예컨대, 코르티손, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론); (iii) 질병 조절 항류마티스 약제(disease modifying antirheumatic drugs, DMARDs; 예컨대, 시클로스포린, 아자치오프린, 메토타렉세이트, 레플루노미드, 시클로포스파미드, 설파살라진, D-페니실라민, 미노사이클린 및 금); 또는 (iv) 재조합 단백질(예컨대, 엔브렐(에타너셉트, 가용성 TNF 수용체), 레미케이드(인플릭시맵, 키메라 단일클론성 항-TNF 항체), 오렌시아(아바타셉트, 가용성 CTLA4 수용체), 악탐라(토실리주맵, IL-6 수용체에 대한 단일클론성 항체) 및 리툭산(리툭시맵, CD20에 대한 단일클론성 항체)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0091] 따라서, 카드헤린-11 길항제는 병용 치료(예컨대, 하나 이상의 다른 치료제와 함께)의 일부로서 투여될 수 있다. Cad-11 길항제는 하나 이상의 다른 치료제의 전, 후, 또는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 카드헤린-11 길항제 및 기타 치료제는 별개의 제제 또는 통합 제제로서 동시에(예컨대, 함께) 공동 투여될 수 있다. 선택적으로, 이 작용물질들은 숙련된 임상 의가 정한 바에 따라 적당한 시간 프레임 내(예컨대, 치료의 제약 효과의 중첩을 허용하기에 충분한 시간)에서 별개의 조성물로서 연속적으로 투여될 수 있다. 카드헤린-11 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제는 단일 용량 또는 복수 용량으로, 원하는 치료 효과(예컨대, 관절 염증의 감소 및/또는 억제)를 달성하기에 적절한 순서와 스케줄로 투여될 수 있다. 적절한 투여량 및 투여 계획은 임상 의사에 의해 결정될 수 있으며, 선택된 작용물질, 약학적 제형 및 투여 경로, 다양한 환자 용인 및 기타 고려사항들에 의존적이다.

[0092] 치료의 효과성(예컨대, 관절 염증의 감소 또는 제거 및/또는 관절 염증의 예방 또는 억제)은 임의의 적절한 방법(예컨대, 영상 기법(MRI, NMR))에 의해 결정될 수 있다.

[0093] 본 발명의 방법에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 Cad-11 길항제는 포유류 대상에 투여되어 염증성 관절 질환을 치료한다. 용어 "포유류 대상"은 본원에서 영장류(예컨대, 인간), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 쥐, 마우스 또는 기타 소과, 양과, 말과, 개과, 고양이과, 설치류 및 쫓과 종들과 같은 포유류를 포함

하는 것으로 정의된다.

- [0094] Cad-11 길항제인 물질은 다양한 경로에 의해 포유류 대상에 투여될 수 있다. 예를 들어, 작용물질은 예를 들어, 국소적으로(예컨대, 크림, 연고), 또는 코(예컨대, 용액, 현탁액)를 포함한, 임의의 적절한 비경구적 또는 경구적 경로로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 예를 들어, 관절 내, 근육 내, 정맥 내, 심실 내, 동맥 내, 척수강 내, 피하 또는 복강 내 투여를 포함할 수 있다. 작용물질은 또한 경구로(예컨대, 캡슐, 현탁액, 정제 또는 식이로), 경피적으로, 피부 내, 국소적으로, 흡입에 의해(예컨대, 기관지 내, 비강 내, 구강 흡입 또는 비강 내 점적), 점막을 관통하여 또는 직장투여로 투여될 수 있다. 투여는 적절히 국소 또는 전신으로 할 수 있으며, 원한다면 1개 초과 경로가 동시에 이용될 수 있다. Cad-11 길항제의 국부적인 투여는 관절 내 주사(예컨대, 작용물질을 관절 내로 직접 주사)에 의해 이루어질 수 있다. 바람직한 투여방식은 선택된 특정 작용물질에 따라 달라질 수 있다. 그러나 전신 정맥 내 또는 피하 투여가 일반적으로 항체에 바람직하다.
- [0095] 전달은 또한 환자의 뇌 또는 체강으로의 주사에 의해 또는 시간 경과에 따라 방출되는(time release) 또는 지속 방출성 매트릭스 전달체 이용에 의해, 또는 마이셀, 겔 및 리포솜을 이용한 현지 전달에 의해 이루어질 수 있다. 분무장치, 분말 흡입기 및 에어로졸화 용액은 기도에 그러한 제제를 투여하는 데 이용할 수 있는 대표적인 방법이다. 전달은 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외로 이루어질 수 있다.
- [0096] 단백질(예컨대, 융합 단백질)인 작용물질은 재조합 단백질의 생체 내 발현을 통해 투여될 수 있다. 생체 내 발현은 적절한 방법(예컨대, 미국 특허 제5,399,346호 참조)에 따른 체세포 발현에 의해 이루어질 수 있다. 나아가, 단백질을 암호화하는 핵산 또한 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 기타 전달용의 적절한 벡터(바람직하게는, 복제 결손 감염성 벡터)로 포함시킬 수 있고, 또는 전달을 위해 단백질을 발현할 수 있는 형질감염된 또는 형질전환된 숙주세포로 도입될 수 있다. 후자의 실시예에서, 세포는 이식(단독으로 또는 장벽 장치에), 주입 또는 그렇지 않으면 치료적으로 유효한 양으로 단백질을 발현하기 위해 유효한 양으로 도입될 수 있다.
- [0097] 핵산을 기초로 한 카드헤린-11 길항제(예컨대, 앵타머)는 여러 가지 방법으로 원하는 포유류 대상으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 발현벡터 또는 숙주세포 내 PCR 생성물로부터 내생적으로 발현될 수 있거나, 이후 포유류 대상의 혈류로 직접 도입될 수 있는(예컨대, 주사, 주입에 의해) 합성 또는 유전자 조작된 조성물(예컨대, 리포솜, 폴리머, 나노입자)로 포장될 수 있다. 항-카드헤린-11 핵산 또는 핵산 발현벡터(예컨대, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 벡터 및 단순 포진 바이러스 벡터, 유전자 조작된 벡터, 비 바이러스 매개성 벡터) 또한 확립된 유전자 치료 전략 및 프로토콜(예컨대, *Tochilin V.P. Annu Rev Biomed Eng* 8:343-375, 2006; *Recombinant DNA and Gene Transfer*, Office of Biotechnology Activities, National Institutes of Health Guidelines 참조)을 이용하여 직접 포유류 대상으로 도입할 수 있다.
- [0098] 카드헤린-11 길항제인 작용물질(예컨대, 소분자)은 제약 또는 생리학적 조성물의 일부로서, 예를 들어, 카드헤린-11 길항제 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제약 조성물의 일부로서 포유류 대상에 투여될 수 있다. 카드헤린-11 길항제를 포함하는 제형 또는 조성물, 또는 카드헤린-11 길항제 및 하나 이상의 다른 치료제(예컨대, 항염증제)를 포함하는 조성물은 선택된 투여경로(예컨대, 용액, 유화액 또는 캡슐)에 따라 달라진다. 적절한 약학적 담체는 카드헤린-11 길항제와 상호작용하지 않는 비활성 성분들을 함유할 수 있다. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA에 기술된 바와 같은 표준 제약 제형 기법이 이용될 수 있다. 비경구 투여를 위한 적절한 약학적 담체는 예를 들어, 멸균수, 생리 식염수, 계균 식염수(약 0.9% mg/ml 벤질 알코올을 함유하는 식염수, 인산 완충 식염수, 헵스 용액, 링거 젖산 등을 포함한다. 제형은 또한 유효성분(예컨대, 유화제, 가용화제, pH 완충제, 습윤제)의 효과성을 향상시키는 소량의 물질을 포함할 수 있다. 조성물의 캡슐화 방법(예를 들어, 경질 젤라틴 또는 시클로덱스트란의 코팅 내로)은 당해 분야에 공지되어 있다. 흡입을 위해, 작용물질은 가용성으로 되거나, 투여를 위한 적절한 디스펜서(예컨대, 애포마이저, 네블라이저 또는 가압 에어로졸 디스펜서)에 로딩될 수 있다.
- [0099] 약학적 작용물질은 중성 화합물 또는 염 또는 에스터로서 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산 또는 타르타르산에서 유래된 염들과 같은 유리 아미노기로 형성된 염들, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 수산화제2철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 염들과 같은 유리 카르복실기로 형성된 염들을 포함한다. 아민 또는 기타 염기성 기를 함유하는 화합물의 염은 예를 들어, 염화수소, 브롬화수소, 아세트산, 과염소산 등과 같은 적절한 유기산 또는 무기산과 반응시켜 얻을 수 있다. 4급 암모늄기가 있는 화합물 또한 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 아세트산염, 과염소산염 등과 같은 짝 음이온을 함유한다. 카르복시산 및 기타 산성 기능기를 함유

하는 화합물의 염은 적절한 염기, 예를 들어, 수산화물 염기와 반응시켜 제조할 수 있다. 산성 기능기의 염은 나트륨 또는 칼륨과 같은 짝 양이온을 함유한다.

### 발명의 효과

[0100] 본 발명은 인간에서 카드헤린-11에 의해 매개되는 염증 및 기타 질환의 치료를 위해 향상된 효능을 나타내는 새로운 물질 및 치료법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0101] 특허 또는 출원 파일은 적어도 하나의 채색된 도면을 함유한다. 색채도면(들)이 있는 이 특허공보 또는 특허출원공개공보의 복사본은 요청 및 필요한 수수료 지불이 있을 때, 특허청이 제공한다.

도 1a는 항-Cad-11 항체 23C6, 13C2 및 27F3를 이용한 카드헤린-11-EC1-5-Fc 융합 단백질 검출을 나타내는 웨스턴 블롯이다(검은색 화살표 참조). 이들 항체는 역시 막에 존재하는 카드헤린-11-EC1-Fc과 카드헤린-11-EC1/2-Fc 융합 단백질을 인식하지 못했다(블롯 상에서 카드헤린-11-EC1-Fc과 카드헤린-11-EC1/2-Fc의 위치를 나타내는 흰색 화살표 참조).

도 1b는 ELISA로 확인한 바와 같이, 공개된 카드헤린-11 항체 13C2, 23C6 및 5F82가 인간의 Cad-11-EC1-5-Fc 융합 단백질에는 결합하나, Cad-11-EC1-Fc 융합 단백질에는 결합하지 않음을 도시하는 그래프이다. 대조적으로 EC1 항체 H1M1은 Cad-11-EC1-Fc 융합 단백질과 Cad-11-EC1-5-Fc 융합 단백질 모두와 결합한다.

도 2는 카드헤린 결합에 관련된 인간 Cad-11(서열번호 3), MN-Cad(서열번호 4), 및 Cad-8(서열번호 5)의 EC1 도메인의 최초의 34개 아미노산의 아미노산 서열 정렬을 도시한다. 카드헤린 반대편 수용체(counter-receptor)의 포켓까지 이어지는 잔기를 함유하는 공여체 서열(donor sequence)은 서열번호 3에서 서열의 왼쪽 절반에서 밑줄로 표시하였고, 포켓 서열의 잔기는 서열의 오른쪽 절반에서 밑줄로 표시하였다.

도 3은 ELISA로 확인한 바와 같이, 카드헤린-11 결합성 Fab가 Cad-11-EC1-Fc 융합 단백질뿐만 아니라, 인간 Cad-11 EC1 도메인 펩티드와 결합하지만, Cad-8 또는 MN-Cad EC1 펩티드와는 결합하지 않음을 도시하는 그래프이다. 클론 7은 Cad-11 EC1 도메인 펩티드와 융합 단백질과는 의미 있는 결합을 보여주었으나, MN-Cad 또는 Cad-8 EC1 도메인 펩티드와는 그렇지 않았다.

도 4는 시험관 내 Cad-11 세포 응집 분석에 따른 데이터를 도시하는 그래프이다. 항-Cad-11 항체 13C2로 만든 Fab 또는 카드헤린-11의 EC1 도메인의 최초 35개의 아미노산을 대상으로 한, 다양한 농도의 항-카드헤린-11 EC1 Fab(EC1 Fab 클론 7로 표시)와 같은 배지에 첨가된 Cad-11 길항제는 Cad-11 매개성 431-D-11 세포 응집을 막는다. 항-카드헤린-11 EC1 Fab(클론 7)는 0.3 $\mu$ g/ml 내지 10 $\mu$ g/ml 범위에서 시험한 모든 농도에서 A-431-D-11 표피 모양암종 세포의 응집을 억제했다. 대조적으로 13C2 항-카드헤린-11 항체로 만든 Fab는 10 $\mu$ g/ml 농도에서만 세포 응집을 억제했다.

도 5는 제2의 시험관 내 Cad-11 세포 응집 분석에 따른 데이터를 도시하는 그래프이다. 431-D-11 세포의 응집 백분율은 SME 배지(대조군으로 표시), 인간 IgG2 경첩(hinge), CH2 및 CH3 도메인에 융합시킨 Cad-11의 EC1 도메인을 포함하는, 다양한 농도의 융합 단백질(Cad-11-EC1-Fc로 표시), 카드헤린-11의 EC1 도메인의 최초 35개 아미노산을 대상으로 한, 다양한 농도의 항-카드헤린-11 EC1 Fab(Cad-11 EC1 Fab로 표시), 또는 다양한 농도의 대조군의 항-녹색 형광 단백질(항-GFP) Fab(GFP fAb로 표시)를 첨가하고 40분 경과 후를 나타낸 것이다. 항-카드헤린-11 EC1 Fab(클론 7)는 3 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml 및 0.1 $\mu$ g/ml 농도에서 Cad-11을 발현하는 431-D-11 세포의 응집을 억제하였다. EC1-Fc 융합 단백질은 3 $\mu$ g/ml 농도에서 431-D-11 세포의 응집을 억제하였다. 이와 대조적으로, 항-GFP Fab는 임의의 시험 농도에서 의미 있게 세포 응집을 억제하지 못했다.

도 6은 세포 외 세포 응집 분석을 이용한 여러 가지 항-카드헤린-11 EC1 Fab, 즉, Cad-11에만 결합 특이성을 나타내는 항-카드헤린-11 EC1 Fab(EC1 fAb 클론 7 및 클론 4), Cad-11과 Cad-8에 결합 특이성을 나타내는 항-카드헤린-11 EC1 Fab(EC1 fAb 클론 6), 또는 Cad-11과 MN-Cad에 결합 특이성을 나타내는 항-카드헤린-11 EC1 Fab(EC1 fAb 클론 5)에 의한 Cad-11 매개성 세포 응집 억제를 도시하는 그래프이다. 시험한 모든 Fab는 대조군(D-11 SME; 왼쪽 막대)에 비해 431-D-11 세포 응집을 억제하였다.

도 7은 시험관 내 세포 응집 분석을 이용하여, Cad-11에만 결합 특이성을 나타내는 항-Cad-11 Fab(EC1 fAb 클론 7) 또는 Cad-11과 MN-Cad에 결합 특이성을 나타내는 항-Cad-11 Fab(EC1 fAb 클론 8)에 의한 Cad-11 매개성 세포 응집 억제를 도시하는 그래프이다. 시험한 Fab들의 특이성은 각 Fab 명칭 옆의 괄호 안에 나타내었다. 두 카

트헤린 특이성 Fab는 모두 GFP에 대해 특이적인 대조군 Fab(왼쪽 막대)에 비해 세포 응집을 억제했다(중간 및 오른쪽 막대).

도 8은 인간 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 융합 단백질(Cad-11-EC1-Fc)의 뉴클레오티드(DNA) 서열(서열번호 6)을 도시한다. 인간 카드헤린-11 세포 외 도메인의 서열은 이탤릭 체로 표시하였고, Bg1II 부위는 밑줄로 표시하였으며, 인간 IgG<sub>2</sub>-Fc1 영역을 암호화하는 서열은 굵은 활자체로 표시하였다.

도 9는 인간 Cad-11-EC1-hIgG2-Fc1 융합 단백질(Cad-11-EC1-Fc)의 아미노산 서열(서열번호 7)을 도시한다. 인간 카드헤린-11 세포 외 도메인의 서열은 이탤릭 체로 표시하였고, Bg1II 부위에 의해 암호화된 서열은 밑줄로 표시하였으며, 인간 IgG<sub>2</sub>-Fc1 영역의 서열은 굵은 활자체로 표시하였다.

도 10은 쿠마시 블루로 염색된 SDS 폴리아크릴아미드 겔의 이미지로, 단백질 A 컬럼을 이용하여 세포 배양액으로부터 정제한 다음, 각각 정제된 Cad-11-EC1-hIgG<sub>2</sub>-Fc1(가운데 레인)과 Cad-11-EC1/2-hIgG<sub>2</sub>-Fc1(오른쪽 레인) 융합 단백질의 단량체 형태에 해당하는 뚜렷한 진한 밴드를 나타낸다. 분자량 표준은 왼쪽 레인에 나타내었다.

도 11은 겨자무 과산화효소(horse radish peroxidase, HRP)에 결합시킨 항-인간 IgG 항체를 이용한 인간 Cad-11-EC1-hIgG<sub>2</sub>-Fc1(가운데 레인) 및 Cad-11-EC1/2-hIgG<sub>2</sub>-Fc1(오른쪽 레인) 융합 단백질 검출을 나타내는 웨스턴 블롯이다. 각 레인에서 뚜렷하게 관찰되는 밴드가 단량체 형태의 융합 단백질의 위치에 해당한다. 불완전환 환원 조건 때문에 이량체 형태의 융합 단백질의 위치도 보인다(강도가 약한, 높은 분자량의 밴드). 분자량 표준은 왼쪽 레인에 나타내었다.

도 12는 Cad-11-EC1-Fc 융합 단백질과 마우스 항-Cad-11 항체인 13C2가 침입(Invasion)이라 표시된 처리하지 않은 세포에 비해, Cad-11을 발현하는 인간 섬유모세포-유사 윤활막세포(fibroblast-like synoviocytes)가 소정의 농도에서 매트릭셀(matrigel) 플러그로 침입하는 것을 억제함을 나타내는 그래프이다. 데이터는 두 개의 독립된 실험으로부터 모은 것이다.

도 13a 및 13b는 두 가지 시험관 내 Cad-11 세포 응집 분석에서 얻은 데이터를 나타내는 그래프이다. Cad-11을 발현하는 431-D-11 세포의 응집 백분율은 SME 배지(대조군으로 표시) 또는 Cad-11 융합 단백질을 첨가한 후 40 분이 경과하였을 때를 나타낸 것이다. 도 13a는 인간 IgG2 경첩, CH2 및 CH3 도메인에 융합시킨 Cad-11의 다섯 개 세포 외 도메인을 포함하는 융합 단백질(Cad-11-EC1-5-Fc로 표시)이 다양한 농도로 존재할 때, 응집 억제를 나타낸다. 도 13b는 인간 IgG2 경첩, CH2 및 CH3 도메인에 융합시킨 Cad-11의 N 말단 세포 외 도메인(EC1 도메인)을 포함하는 융합 단백질(Cad-11-EC1-Fc로 표시) 또는 Cad-11-EC1-5-Fc이 다양한 농도로 존재할 때, 응집 억제를 나타낸다.

도 14a 내지 도 14c는 인간 카드헤린-11 cDNA 서열을 나타낸다(서열번호 1; Genbank Accession No. NM001797 참조).

도 15는 인간 카드헤린-11 단백질 서열을 나타낸다(서열번호 2; Genbank Accession No. NP001788 참조).

도 16은 ELISA로 확인한, 펩티드 4 하이브리도마(HL)의 배지 또는 대조군 하이브리도마 배지(배지) 내 항체의 Cad-11, Cad-8 또는 MN-Cad를 함유하는 단백질과의 결합 수준을 나타내는 그래프이다.

도 17a 내지 도 17c는 H14 항체의 Cad-11을 발현하는 431-D-11 세포에 대한 결합의 척도로서, 세포 염색의 강도(MFI; 평균 형광 강도)를 나타내는 대표도이다.

도 17d 내지 도 17f는 H14 항체가 Cad-11 음성 세포에 결합하지 않음을 나타내는, 도 17a 내지 도 17c과 비교하여 431-D 세포 염색(MFI; 평균 형광 강도)의 부재를 나타내는 대표도이다.

도 17g 내지 도 17i는 H1M1 항체의 Cad-11을 발현하는 431-D-11 세포에 대한 결합의 척도로서, 세포 염색의 강도(MFI; 평균 형광 강도)를 나타내는 대표도이다.

도 18a는 세포 염색의 강도(MFI; 평균 형광 강도)로 측정한 것으로, 다양한 항체 농도에서 H14 항체와 Cad-11을 발현하는 세포의 결합 및 H14와 Cad-11 음성 대조군 세포의 결합 부재를 나타내는 그래프이다.

도 18b는 세포 염색의 강도(MFI; 평균 형광 강도)로 측정한 것으로, 다양한 항체 농도에서 H1M1 항체와 Cad-11을 발현하는 세포의 결합 및 H1M1과 Cad-11 음성 대조군 세포의 결합 부재를 나타내는 그래프이다.

도 19a는 ELISA로 확인한 것으로, 다양한 항체 농도에서 H14 항-Cad-11 항체의 Cad-11 및 Cad-8 EC1 도메인 펩

티드와의 결합 정도를 나타내는 그래프이다.

도 19b는 ELISA로 확인한 것으로, 다양한 항체 농도에서 H14 항-Cad-11 항체와 Cad7, MNCad, Cad9, Cad18, Cad20 또는 Cad24 EC1 도메인 펩티드의 결합 부재를 나타내는 그래프이다.

도 20은 ELISA로 확인한 것으로, 다양한 항체 농도에서 H1M1 항-Cad-11 항체와 Cad-11, Cad-8, Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 및 Cad-24 EC1 도메인 펩티드의 결합을 나타내는 그래프이다.

도 21a는 ELISA로 확인한 것으로, Cad-11 EC1 도메인 융합 단백질(EFL) 및 인간 IgG 대조군(Fc 블록)뿐만 아니라, 다양한 Cad-11 EC1 도메인 펩티드 면역원(PEP1, PEP2, PEP3 및 PEP4)에 대한 H1M1 항-Cad-11 항체의 결합 정도를 나타내는 그래프이다.

도 21b는 ELISA로 확인한 것으로, Cad-11 EC1 도메인 융합 단백질(EFL) 및 인간 IgG 대조군(Fc 블록)뿐만 아니라, 다양한 Cad-11 EC1 도메인 펩티드 면역원(PEP1, PEP2, PEP3 및 PEP4)에 대한 H14 항-Cad-11 항체의 결합 정도를 나타내는 그래프이다.

도 22는 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인의 최초 37개 아미노산 서열 및 펩티드 1 내지 4 각각이 포함하는 이 서열의 부분들을 나타내는 개요도이다. 펩티드 3의 상류(upstream)로서 펩티드 2와 펩티드 4가 공유하는 아미노산 잔기는 박스 영역으로 강조하였다. Cad-11 내 Cad-11의 결합과 직접적으로 관련된 아미노산은 밑줄로 표시하였다.

도 23a는 대조군의 이소형 항체로 처리한, Cad-11을 발현하는 응집된 거대한 세포 덩어리를 나타내는 사진이다.

도 23b는 도 23a에서 관찰된 거대한 덩어리 형성으로 진행되지 않은, H1M1을 처리한 Cad-11을 발현하는 세포의 작은 무리를 나타내는 사진이다.

도 23c는 처리하지 않은 Cad-11 음성 양친 세포가 단일 세포 혹은 두 개의 세포로 이루어진 무리로 남아있음을 나타내는 사진이다.

도 24a는 Cad-11을 발현하는 세포들과 거대한 응집 세포 덩어리의 배양물을 나타내는 사진이다.

도 24b는 H14 Cad-11 EC1 도메인 항체로 처리한 후의, 도 24a에 나타난 것에 대한, Cad-11을 발현하는 세포들과 주로 단일 세포들과 작고 드문드문한 세포 다발들의 배양물을 나타내는 사진이다.

도 25는 처리하지 않은 대조군 마우스에 비해, 점점 더 많은 용량의 H1M1 항-Cad-11 항원으로 처리한 마우스에서 관절염 관련 관절 부종 억제제를 나타내는 그래프이다.

도 26은 처리하지 않은 대조군 마우스에 비해, 이틀마다 H14 또는 H1M1 항-Cad-11 항체를 0.3mg 처리한 마우스에서 관절염 관련 관절 부종 억제제를 나타내는 그래프이다.

도 27은 처리하지 않은 대조군과 비교할 때, 0.3mg의 H1M1 또는 H14 항체가 마우스 모델에서 관절염 발달을 지연시킴을 나타내는 그래프이다.

도 28은 펩티드 3 하이브리도마(HL) 또는 대조군 하이브리도마 배지(배지)의 항체를 함유하는 배지와 Cad-11, Cad-8 및 MN-카드헤린의 EC1-2 도메인 또는 Cad-11 EC1-Fc 융합 단백질과의 결합 정도를 나타내는 그래프이다.

도 29는 펩티드 3 하이브리도마의 항-Cad-11 항체와 인간 Cad-11 단백질을 발현하는 세포(화살표) 및 Neos를 발현한, 비 Cad-11을 발현하는 대조군 세포와의 결합 정도를 나타내는 그래프이다.

도 30a는 배지와 함께 배양한 섬유모세포-유사 유허막세포(FLS)를 나타내는 사진이다. 세포 응집물 및 세포 공정을 통해 연관되는 세포들을 볼 수 있다.

도 30b는 30 $\mu$ g/ml의 대조군 항체와 배양한 FLS를 나타내는 사진이다. 세포 응집물 및 세포 공정을 통해 연관되는 세포들을 볼 수 있다.

도 30c는 30 $\mu$ g/ml의 H1M1 항체와 배양한 FLS를 나타내는 사진이다. 세포 응집물 및 세포 공정을 통해 연관되는 세포들을 거의 볼 수 없다.

도 31은 EC1 영역 외부에 결합하는 기타 Cad-11 항체를 포함한, 대조군에 비해 H1M1 항체와의 접촉 후 매트릭셀로 코팅한 막으로의 FLS 침입 억제제를 나타내는 그래프이다.

도 32는 대조군에 비해 H1M1 항체 투여 후, 관절염의 KBN 마우스 모델에서 관절 부종 억제제를 나타내는 그래프이다.



다.

도 33은 H1M1 가변중쇄 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 도시한다. CDR 정의 및 단백질 서열 넘버링은 카바트(Kabat)를 따른다. CDR 뉴클레오티드 및 단백질 서열은 회색으로 나타내었다.

도 34는 H1M1 가변경쇄 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 도시한다. CDR 정의 및 단백질 서열 넘버링은 카바트(Kabat)를 따른다. CDR 뉴클레오티드 및 단백질 서열은 회색으로 나타내었다.

도 35a 내지 도 35h는 H1M1/SYN0012 인간화 항-Cad-11 항체 변이체 설계에 이용된 5개의 VH 사슬(a-e)(서열번호 60-69) 및 3개의 V<sub>K</sub> (f-h)(서열번호 70-75)로 이루어진 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도시한다. CDR 정의 및 단백질 서열 넘버링은 카바트(Kabat)를 따른다. CDR 뉴클레오티드 및 단백질 서열은 적색으로 나타내었다.

도 36은 pANTVK 및 pANTVhG4 벡터를 나타내는 벡터 다이어그램이다. pANTVK 및 pANTVhG4 벡터 모두는 인트론과 폴리 A 서열을 포함하는 게놈 DNA 단편을 함유한다. 양 사슬 모두의 발현은 CMV 프로모터에 의해 작동된다. 중쇄 벡터 상의 DHFR 미니 유전자가 선별을 위해 이용된다.

도 37은 단백질 A로 정제된 항체의 쿠마시 블루로 염색된 SDS-PAGE 겔을 도시한다. (a) 키메라 항-Cad-11 EC1 IgG4(SYN0014), (b) 인간화 항-Cad-11 항체 변이체(SDP011-SDP151). 크기 표시자는 미리 염색된 단백질 표준 Fermentas PageRuler(Cat. No. SM1811)이다. 주: SDP111은 전개시키지 않았다.

도 38a 내지 38c는 항-Cad-11 경쟁 ELISA의 결과를 나타내는 그래프이다. 재조합 인간 Cad-11 융합 단백질과의 결합을 위해 인간화 항-Cad-11 EC1 항체(SDP011 내지 SDP151)의 단계별 희석액을 비오틴이 부착된 고정된 농도의 쥐 SYN0012 항체에 대하여 시험하였다. 비오틴이 부착된 항체의 결합은 시험 항체 및 대조군 항체의 양이 증가함에 따라 감소한다. a: SDP011 내지 SDP051; b: SDP061 내지 SDP101; c: SDP111 내지 SDP151.

도 39a 내지 도 39o는 Cad-11 펩티드 면역원(각 곡선에서 적색 선)과 카드헤린-7, -8, -9, -11, -18, -20, 및 -24에서 대응하는 상동 서열을 포함하는 펩티드와의 카드헤린 교차반응성 분석에서 인간화 항-Cad-11 항체의 역가 측정을 나타내는 그래프이다. 펩티드 코팅 농도는 500ng/ml였다. a: SDP011; b: SDP021; c: SDP031; d: SDP041; e: SDP051; f: SDP061; g: SDP071; h: SDP081; i: SDP091; j: SDP101; k: SDP111; l: SDP121; m: SDP131; n: SDP141; 및 o: SDP151.

도 40a 내지 도 40d는 인간화 항-Cad-11 항체 (a) SDP031 (서열번호 71,65), (b) SDP051 (서열번호 71,69), (c) SDP061 (서열번호 73,61), (d) SDP071 (서열번호 73,63)의 경쇄 및 중쇄 가변영역 도메인의 아미노산 서열을 도시한다.

도 41a는 Cad-11 펩티드 면역원(적색)과 카드헤린-7, -8, -9, -11, -18, -20, 및 -24에서 대응하는 상동 서열을 포함하는 펩티드와의 카드헤린 교차반응성 분석에서 SDP051의 역가 측정을 나타내는 그래프이다. 펩티드 코팅 농도는 500ng/ml였다.

도 41b는 Cad-11 펩티드 면역원(적색) 또는 카드헤린-8 및 -18에서 대응하는 상동 서열을 포함하는 펩티드와의 카드헤린 교차반응성 분석에서 SDP051의 역가 측정을 나타내는 그래프이다. 펩티드 코팅 농도는 50ng/ml였다.

도 42는 SDP051의 재조합 인간 Cad-11(rhCad-11)에 대한 결합을 나타내는 센소그램(sensogram) 플롯이다.

도 43은 FACS에 의해 측정된 Cad-11을 발현하는 431D-11 세포에 대한 인간화 항-Cad-11 EC1 항체 SDP051 및 SDP071의 항체 농도 의존성 결합을 나타내는 그래프이다(평균 형광 강도(MFI)). Cad-11을 발현하지 않는 431D-11 세포에 대한 결합 부재 또한 나타내었다.

도 44a 내지 도 44c는 FACS에 의해 측정된, 관련된 Cad-20 또는 Cad-24(도 44a), Cad-7 또는 Cad-18(도 44b), 또는 Cad-8 또는 Cad-9(도 44c) 항원을 포함하는 펩티드들이 SDP051 항체의 Cad-11을 발현하는 세포에 결합하는 능력에 미치는 영향에 대하여, Cad-11 항원을 포함하는 펩티드가 SDP051 항체의 Cad-11을 발현하는 세포에 결합하는 능력에 미치는 영향을 측정하는 분석법(평균 형광 강도(MFI))을 이용하여 SDP051 항체의 Cad-11에 대한 특이성을 나타내는 그래프이다.

도 45a 및 도 45b는 25명의 공여자의 PBMC를 이용한 시간 경과별 T세포 면역원성 분석법에 의해 확인한, (a) 쥐/사람 키메라 항-Cad-11 EC1 항체 SYN0014 및 (b) 인간화 항-Cad-11 EC1 항체 SEP051의 면역원성을 나타내는 그래프이다. 각 3회 반복 시료에 대한 결과는 평균을 구하여, 자극지수(Stimulation Index, SI)로 전환하여 정규화하였다. 각 공여자와 함께 각 시점에 대한 SI를 나타내었다. SI = 2.0의 양성 반응을 확인하기 위한 구분선

은 적색 선으로 강조하였고, 유의미한 반응(스튜던트 t-검정에서  $p < 0.05$ )은 (\*)로 표시하였다.

도 46은 이소형 대조군 항체(AC1-P)  $3\mu\text{g}/\text{ml}$  용량과 비교할 때,  $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$  용량의 SDP-051이 FLS 침입을 50% 억제함을 나타내는 그래프이다.

도 47은 이소형 대조군 항체(AC1-P)  $3\mu\text{g}/\text{ml}$  용량과 비교할 때,  $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$  용량의 SDP-051이 MMP 발현을 억제함을 나타내는 그래프이다.

도 48은 AC1-P 대조군 항체로 처리한 마우스에 대해, SDP051로 처리한 마우스에서 관절 부종이 47% 감소하였음을 나타내는 그래프이다.

도 49는 마우스에 투여 후, SDP051 항체의 혈청 수준을 나타내는 그래프이다(KBN 관절염 모델).

도 50은 AC3-1P 대조군 항체로 처리한 마우스에 대해, 상이한 용량의 SDP051 항체를 처리한 마우스에서 발목 두께의 변화를 나타내는 그래프이다(쥐 KBN 관절염 모델; KBN024 연구).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 이하, 본 발명을 다음과 같은 실시예로 설명하지만, 이들 실시예는 어떠한 방식으로든 제한적으로 의도한 것이 아니다.

#### [0103] 실시예

[0104] 실시예 1: 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인의 N 말단 35개 아미노산 내의 에피토프에 대해 결합 특이성을 나타내는 Fab의 확인

[0105] 재료 및 방법

[0106] 웨스턴 블롯

[0107] 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여, 표준 방법을 이용하여 니트로셀룰로스(NC) 막으로 옮겼다. 간단히 NC 막을 트리스 완충 식염수-트윈(TBST)(NaCl  $8.8\text{g}/\text{L}$ , KCl  $0.2\text{g}/\text{L}$ , 트리스 염기  $3\text{g}/\text{L}$ , 트윈-20  $500\text{ul}/\text{L}$ , pH 7.4)으로 행구었다. 막을 TBST에 용해시킨 4% BSA로  $22^\circ\text{C}$ 에서 일정 시간 블로킹하였다. NC막을 TBST로 5분간 행구는 과정을 3회 반복하였다. 마우스 항-인간 Cad-11 항체를 TBST에  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고, NC를  $22^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양하였다. NC막을 TBST로 5분간 행구는 과정을 3회 반복하였다. 겨자무 과산화효소(HRP)와 결합시킨 염소 항-마우스 Ig 항체를 TBST에  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하고, NC막을  $22^\circ\text{C}$ 의 실온에서 1시간이라는 최소 시간 동안 제2 용액에 배양하였다. NC막을 TBST로 5분간 행구는 과정을 3회 반복하였다. 표준 HRP 방법을 이용하여 신호를 발달시켰다.

[0108] ELISA

[0109] 항원(Cad-11-EC-1-Fc  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  또는  $50\mu\text{g}$  또는 카드헤린 펩티드  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 완충액에 희석시켜,  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 플레이트를 코팅하는 데 사용하였다. 플레이트를 세척한 다음, PBS 희석 완충액 내 1.5% BSA, 5% 저지방 우유분말:PBS 내 1.5% BSA, 2.5% 저지방 우유분말, 0.1% 트윈-20으로 블로킹하였다. 다음으로 한 시간동안 플레이트를 항-Cad-11 인간 fAb를 함유하는 세균 용해물 또는 정제된 항-Cad-11 인간 fAb와 함께 배양하였다. 세척 후 2차 항체(1/100으로 희석된, Cy5가 결합된 a-hu-Fab)를 25분간 적용하였다. 그 다음, 플레이트를 세척하고 그 결과로 생겨난 형광을 측정하였다.

[0110] 결과

[0111] 이전에 보고된 카드헤린-11 특이성 항체 세 세트를 이용하여, 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인에 결합하는 능력을 시험하였다. 이들 항체는 카드헤린-11 녹아웃 또는 결손 마우스에서 마우스 카드헤린-11-Fc 융합 단백질 면역원에 대해 발생시킨 항체(Lee *et al.*, *Science* 315:1006-1010 (2007)), CHO 세포에서 생산된 인간 카드헤린-11-Fc 융합 단백질 면역원에 대해 카드헤린-11 야생형 마우스에서 발생시킨 항체(Valencia *et al.*, *J. Exp. Med.* 200(12):1673-1679 (2004)) 및 인간 카드헤린-11의 EC1-3 도메인을 함유하는 세균에서 생산된 단백질에 대해 카드헤린-11 야생형 마우스에서 발생시킨 항체를 포함하였다. 이들 항체들을 대상으로 인간 Cad-11의 EC1

도메인만을 함유한 융합 단백질(카드헤린-11-EC1-Fc), Cad-11의 EC1 도메인과 EC2 도메인만을 함유한 융합 단백질(Cad-11-EC1/2-Fc) 또는 Cad-11의 모든 다섯 개의 EC 도메인을 함유한 융합 단백질(카드헤린-11-EC1-5-Fc)에 결합하는 능력을 웨스턴 분석으로 시험하였다. 시험한 항체들 중 어느 것도 웨스턴 블롯 상에서 EC1-Fc 융합 단백질 또는 EC1-2-Fc 융합 단백질을 인식하지 못했다(도 1a). 그러나 시험한 각각의 세 세트의 항체들은 세포 외 도메인 1에서 5를 전부 포함한 인간 Cad-11-Fc 융합 단백질을 인식하였다(도 1b). 이러한 결과는 시험한 항체들이 인간 Cad-11의 EC1 도메인 또는 EC2 도메인에 결합하지는 않지만, 이 단백질의 세포 외 영역의 어딘가에 있는 에피토프들을 인식하였음을 나타낸다.

[0112] Cad-11 EC1 결합 항체 HIM1과 대조군 항체 MOPC뿐만 아니라, Cad-11을 발현하는 세포 13C2, 23C6, 5F82(Lifespan Science) 및 283416(R&D Systems)에 결합하는 이용 가능한 공개된 항-Cad-11 항체들을 대상으로 ELISA를 이용하여 인간 Cad-11의 EC1 도메인만을 함유한 융합 단백질(카드헤린-11-EC1-Fc) 또는 Cad-11의 모든 다섯 개의 EC 도메인을 함유한 융합 단백질(카드헤린-11-EC1-5-Fc)에 결합하는 능력을 시험하였다. 시험했던 이용 가능한 공개된 항-Cad-11 항체들 중 어느 것도 EC1-Fc를 인식하지 못했다(도 1b, 열린 막대)(283416에 대한 데이터는 여기서 미도시). 그러나 Cad-11 EC1에 결합하는 HIM1 항체는 카드헤린-11-EC1-Fc 및 카드헤린-11-EC1-5-Fc 모두에 결합하였다(도 1b, 닫힌 막대). 대조군 MOPC 항체는 양 융합 단백질 모두와 결합하지 않았다. 이들 결과는 이용 가능한 공개된 항-Cad-11 항체들은 인간 Cad-11의 EC1 도메인과 결합하지 않으나, 이 단백질의 세포 외 영역 어딘가의 에피토프들을 인식함을 나타낸다.

[0113] 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인의 N 말단 35개 아미노산 내의 에피토프에 특이적인 항체를 제조하기 위하여, 인간 Fab를 암호화하는 파지 디스플레이 라이브러리(MorphoSys AG)를 스크리닝하였다. 두 가지 선별 기준, 인간 카드헤린-11 EC1 도메인의 최초 35개 아미노산을 포함한 펩티드에 대한 결합에 양성인 선별 기준과 두 가지 밀접하게 관련되고 매우 상동성이 높은 카드헤린인 카드헤린-8과 MN-카드헤린의 EC1 도메인의 상응하는 펩티드에 대한 결합에 음성인 선별 기준을 이용하여 후보 Fab를 확인하였다(도 2). ELISA는 결합을 평가하는 데 이용하였다.

[0114] 두 번의 스크리닝이 이루어졌다. 첫 번째 스크리닝에서, 카드헤린 EC1 펩티드에 결합한 96개의 Fab 클론들을 ELISA에 의해 확인하였다. 7개의 후보 Fab가 Cad-11 EC-1 펩티드에 결합하였다. 그러나 그들 중 두 개만이 EC-1 펩티드와 EC1-2-Fc 융합 단백질 모두와 결합하였다. 이들 두 Fab 중 하나는 또한 MN-Cad 펩티드에 결합하였다. 따라서 일곱 개의 Fab 클론 중에서 하나만이 EC1-Fc 융합 단백질에 특이적으로 결합하였지만, MN-Cad와 카드헤린-8 EC1 도메인 펩티드 모두와는 결합하지 않았다. 두 번째 스크리닝에서, 유사한 결과가 관찰되었다. 96개의 Fab 중에서 1개(클론 F9)만이 카드헤린-11 EC1 펩티드와 EC1-2-Fc 융합 단백질에 특이성을 나타내고, MN-Cad와 카드헤린-8 EC1 도메인 펩티드에 결합하지 못하였다(도 3). 시험했던 Cad-11 EC1 도메인에 결합하는 Fab의 대부분은 Cad-11의 EEY CAR 서열과 겹치는 EEY CAR 서열을 함유하는 MN-Cad 펩티드와 교차반응성을 나타냈다.

[0115] **실시예 2: 카드헤린-11의 EC1 도메인에 결합하는 Fab는 시험관 내 분석법에서 Cad-11 매개성 세포 응집을 저해한다.**

[0116] 재료 및 방법

[0117] 시험관 내 카드헤린-11 응집 분석

[0118] 431-D 세포는 현탁액에서 자라고, 임의의 카드헤린을 정상적으로 발현하지 않으며 응집하지 않는다. 431-D-11 세포를 유전적으로 변형하여 Cad-11을 발현하게 하였다. 431-D-11 세포를 배지에만 배양시킬 때, 그들은 40분 동안 응집하기 시작하여, 세포 무리들은 웰의 바닥으로 가라앉고, 현탁액 내의 나머지 응집되지 않은 세포들을 측정할 수 있고, 응집된 431-D-11 세포의 백분율을 계산할 수 있다. 응집 분석을 위해, 431-D-11 세포(D-11 세포)들을 플라스크에서 서브컨플루언스(sub-confluence)에 이를 때까지 성장시킨 다음, 0.05% 트립신과 0.53mM EDTA를 이용하여 플라스크로부터 제거하였다. 대략  $2 \times 10^6$  개의 431-D-11 세포를 SME 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose, 0.1M Hepes pH 7.4 및 5U/ml DNase) 2ml에 첨가하여, 시험 작용물질(예컨대, 항체, Fab, 융합 단백질)의 부재 또는 존재 조건 하에서, 얼음 위에서 15분간 전배양하였다. 시험 작용물질과의 전배양 후, 세포를 24웰 플레이트 상의 둥근 바닥 웰에 옮겨, 회전 교반기에서 130rpm으로 회전시키면서 37°C에서 배양하였다. 세포가 응집함에 따라, 그들은 웰의 바닥으로 가라앉는다. 0분과 40분에서, 시료의 가운데에서 200 $\mu$ l를 웰로부터 제거하고, 세포를 고정시키기 위해 8% 글로타르알데하이드 25 $\mu$ l와 혼합하였다. 고정된 세포 시료 200 $\mu$ l를 콜터 카운터 등장성 식염수 9.8ml에 첨가하고, 8 $\mu$ m 내지 24  $\mu$ m 역치로 설정된 콜터 카운터를 이용



하여 계수하였다. 시료당 3회의 세포 계수를 기록하였다. 0분 시점에서 백분율과 비교하여 40분에서의 세포 감소 또는 응집 세포 백분율을 계산하였다.

[0119] 결과

[0120] MN-Cad 또는 Cad-8의 EC1 도메인과 결합하지 않는, 카드헤린-11 EC1 도메인의 N 말단 35개 아미노산 내의 에피토프에 대해 결합 특이성을 나타내는 후보 Fab(클론 F9)를 대상으로 시험관 내 카드헤린-11 세포 응집 분석을 이용하여 Cad-11 매개성 세포 응집을 억제하는 능력을 시험하였다. 후보 Fab는  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서 세포의 카드헤린-11 매개성 응집을 상당히 억제하였다(도 4 및 도 5). 이와는 대조적으로, Cad-11의 EC1/2 도메인 외부의 세포 외 영역의 에피토프에 결합하는 13C2 항체로 만들어진 Fab는  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서만 카드헤린-11 응집을 억제하여, F9 Fab가 Cad-11의 세포 외 도메인의 다른 부분에 결합하는 항체들보다 더 낮은 농도에서 더욱 효과적으로 Cad-11 활성을 억제함을 시사하였다.

[0121] Cad-11 매개성 세포 응집은 Cad-11 단독, Cad-11 및 Cad-8, Cad-11 및 MN-Cad, 또는 Cad-11, Cad-8 및 MN-Cad에 대해 특이적인 다양한 항-카드헤린-11-EC1 도메인 Fab에 의해서도 억제되었다(도 6 및 도 7). 시험했던 모든 카드헤린-EC1-도메인 특이적인 Fab는 대조군 시료들(예컨대, SME 배지(도 6), GFP에 특이적인 Fab(도 7))에 비해 시험관 내에서 세포 응집을 억제하였다.

[0122] **실시예 3: 인간 카드헤린-11의 EC1 도메인을 함유하는 카드헤린-11/면역 글로불린 융합 단백질의 생성**

[0123] 전체 길이의 인간 카드헤린-11 cDNA를 암호화하는 벡터(인간 Cad-11을 Invitrogen pCEP4<sup>®</sup> 벡터의 NotI 및 Kpn-I 부위로 복제한 벡터)로부터 증폭 산물에 EcoRI와 BglII 부위(정방향 프라이머와 역방향 프라이머에서 각각 밀줄 친 서열)를 도입하고자 다음과 같은 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 표준 조건 하에서 중합효소 연쇄 반응법(PCR)을 이용하여 카드헤린-11 EC1 영역을 제조하였다.

[0124] 정방향 프라이머:

[0125] tttttttttgaattcatgaaggagaactactgtttacaagc (서열번호 8)

[0126] EcoRI

[0127] 역방향 프라이머:

[0128] tttttttttgatctctggaccttgacaatgaattccgacgg (서열번호 9)

[0129] BglII

[0130] 증폭산물을 제한효소 EcoRI와 BglII로 소화시키고, 소화산물을 분리하여 상응하는 EcoRI 및 BglII 부위를 이용하여 pFUSE-hIgG2e1-Fc1 벡터(InvivoGen)에 연결시켰다. 연결산물로 톱10 컴피턴트 박테리아(Invitrogen)를 제조사가 기술한 바에 따라 형질전환시키고, 카드헤린-11-EC1-Fc 플라스미드가 있는 박테리아를 제오마이신(zeomycin)으로 선별하였다. 카드헤린-11-EC1-Fc 플라스미드를 분리하여 서열을 분석한 다음, 293F 세포를 일시적으로 형질감염시키는 데 이용하였다. 컨디션드 배지를 수집하고, 카드헤린-11-EC1-Fc 융합 단백질을(서열번호 9)을 탄젠트 흐름 여과를 이용하여 정제한 후, 20 mM HEPES pH 7.4, 137mM NaCl, 3mM KCl 및 1mM  $\text{CaCl}_2$ 에서 평형화된 50/50 혼합 단백질 A/단백질 G 컬럼 상에서 분리한다. 정제된 카드헤린-11-EC1-Fc 융합 단백질을 컬럼으로부터 0.1M 글리신(pH 3) 및 1mM  $\text{CaCl}_2$ 을 이용하여 1M 트리스 pH 7.4 200 $\mu\text{l}$ 와 1mM  $\text{CaCl}_2$ 를 함유하는 관으로 용출시켰다. 그런 다음, Cad-11 융합 단백질과 용출액을 20mM Hepes(pH 7.4), 137mM NaCl, 3mM KCl 및 1mM  $\text{CaCl}_2$ 에 대해 투석시켰다. 단백질의 크기는 SDS PAGE로 확인하였고(도 10), 인간 Fc 영역을 인식하는 항체를 이용한 웨스턴 분석(도 11) 및 N 말단 서열분석(미도시)에 의해 정체를 확인하였다. 위에서 기술한 것과 유사한 기법과 조건을 이용하여 Cad-11-EC1-2-Fc를 생산하였다.

[0131] **실시예 4: Cad-11-EC1-Fc 면역 글로불린 융합 단백질은 시험관 내 분석법에서 Cad-11 매개성 세포 응집을 억제한다**

- [0132] 재료 및 방법
- [0133] 매트릭셀 플러그로의 세포 침입/이동
- [0134] 섬유모세포 유사 운할막세포(fibroblast-like synoviocyte, FLS)의 이동성을 FLS 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose[Sigma #D7777], 10% 우태아혈청[Benchmark #100-106], 1% 페니실린-스트렙토마이신[Gibco 315140-122], 1% L-글루타민[Gibco #25030], 0.5% 젠타마이신[Gibco #15710-064]) 내 매트릭셀 ECM으로 코팅된 트랜스웰에서 평가하였다.  $1 \times 10^4$  개 세포를 함유하는 FLS 배지 내 인간 FLS 세포 현탁액을 0.0750mL의 FLS 배지를 함유하는 24웰 플레이트의 웰의 대조군 인서트 또는 매트릭셀 코팅된 인서트에 첨가하였다. 그런 다음, 플레이트를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 대기의 가슴 조직 배양기에서 22시간 배양하였다.
- [0135] 이동한 세포의 수를 계산하기 위하여, 대조군 인서트의 막의 상부 표면을 면봉으로 닦아 비 침입 세포를 제거하였다. FLS 배지로 적신 면봉을 이용한 두 번째 닦기를 반복하였다. 그런 다음, 대조군 인서트를 고정시키고 분별염색키트[Fisher #122-911]를 이용하여 염색하였다. 인서트를 건조시키고 10배율의 대물렌즈가 있는 현미경을 이용하여 대조군 인서트의 4개의 사분 구간에서 세포를 계수하였다. 3반복 인서트를 계수하고 총계로부터 평균을 구했다.
- [0136] 매트릭셀 인서트를 침입한 세포의 수를 계산하기 위하여, 면봉으로 매트릭셀 인서트의 표면을 닦아 비 침입 세포를 살살 제거하였다. FLS 배지로 적신 면봉을 이용한 두 번째 닦기를 반복하였다. 그런 다음, 인서트를 고정시키고 분별염색키트[Fisher #122-911]를 이용하여 염색하였다. 인서트를 건조시키고 10배율의 대물렌즈가 있는 현미경을 이용하여 대조군 인서트의 4개의 사분 구간에서 세포를 계수하였다. 3반복 인서트를 계수하고 총계로부터 평균을 구했다.
- [0137] 결과
- [0138] Cad-11-EC1-Fc는 3 $\mu$ g/mL의 농도에서 세포 응집을 상당히 억제하였지만, 인간 Cad-11의 모든 다섯 개의 EC 도메인을 함유하는 전체 길이의 Cad-11-EC1-5-Fc 단백질은 100 $\mu$ g/mL의 농도에서 Cad-11 매개성 응집을 억제하였다(도 13). 이러한 데이터는 Cad-11-EC1-Fc 면역 글로불린 융합 단백질이 시험관 내 분석법에서 Cad-11 매개성 세포 응집을 효과적으로 억제함을 나타낸다.
- [0139] 또한, Cad-11-EC1-Fc 면역 글로불린 융합 단백질의 매트릭셀 플러그로의 인간 섬유모세포 유사 운할막세포(FLS)의 침입을 억제하는 능력을 시험관 내에서 시험하였다. 매트릭셀로의 FLS의 침입은 FLS의 매트릭셀로의 이동 뿐만 아니라, 매트릭셀을 분해하기 위하여 FLS에 의한 MMP1, MMP-3, MMP-13, 세린 프로테아제 및 기타 단백질의 발현을 동반하는 복잡한 과정이다. 별도의 분석에서, 우리는 정상적인 섬유질 인서트를 통해 FLS 이동 억제를 전혀 보지 못했다. 이는 EC-Fc 또는 13C2 mAb의 영향력은 매트릭셀(관절 연골 내용)의 분해를 억제한다는 점을 시사한다. Cad-11-EC1-Fc와 쥐 항-Cad-11 mAb 13C2는 모두 두 개의 독립한 실험에서 매트릭셀 플러그로의 FLS 침입을 억제하였다.
- [0140] **실시예 5: 인간 카르헤린-11의 EC1 도메인 펩티드에 대한 항체의 생성**
- [0141] 재료 및 방법
- [0142] Balb/c 마우스를 BSA로 공유 결합시킨 인간 Cad-11 EC1 도메인의 최초 33개 아미노산에 해당하는 펩티드(GWVWN QFFVI EEEYTG PDPVL VGR LH SDIDS GDG (서열번호 10)) 0.01mg으로 1개월의 기간에 걸쳐 격주로 아홉 차례 발 패드에 면역화하였다. 이 펩티드는 본원에서 펩티드 4라 한다. 면역화된 마우스에서 비장을 채취하여 쥐의 융합 파트너인 P3X63-Ag8.653와 융합하여 항체 생산 하이브리도마를 제조하였다. 하이브리도마를 확장시켜 웰당 10개, 3개 또는 0.5개로 서브클로닝하고, 하이브리도마로부터 항-Cad-11 항체 함유 배지를 대상으로 박테리아에서 생산된 Cad-11 EC1-2 도메인을 함유하는 단백질에 특이적으로 결합하는 능력을 ELISA에서 스크리닝하였다. 이들 펩티드 4 하이브리도마로부터 나온 항-Cad-11 항체를 함유하는 배지를 인간 Cad-8 및 MN-카르헤린의 EC1-2 도메인을 포함하는 단백질에 대한 결합의 부재에 대해서도 같이 스크리닝하였다. 96웰 EIA 플레이트를 0.0 내지 0.3mg/mL의 각각의 EC1-2 Cad 단백질 0.05mL로 4°C에서 밤새 코팅한 다음, 식염수 완충액으로 여러 차례 세척하였다. 그 다음, 플레이트를 0.25mL의 카제인-PBS 완충액으로 블로킹한 다음, 식염수 완충액으로 여러 차례 세척하였다. 항-Cad-11 항체를 함유하는 하이브리도마 배지를 아무 것도 섞지 않고 각 웰에서 1시간 동안 22°C에서

배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG 2차 항체의 1/1000 희석액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 30분 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 실온의 TMB(3, 3', 5, 5' -테트라메틸벤지딘) 시약 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 5분간 발색반응을 진행하였다. 반응을 실온의 2N 황산 100 $\mu$ l로 중지시키고 플레이트를 Wallac 1420 마이크로플레이트 리더 상의 450nm에서 관독하였다.

[0143] ELISA 시약을 이용하여 Cad-11, Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18 및 MN-Cad의 EC1 도메인들의 첫 33개 아미노산에 대한 H1M1 및 H14 항-Cad-11 항체의 특이성을 더 시험하였다. Cad-11 EC1 도메인의 G1-G33 영역과 겹친 Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18, MN-Cad의 영역에 해당하는 펩티드들을 합성하여 비오틴에 결합시켰다. PBS-트윈(0.05%)에 용해시킨 이들 펩티드 각각의 30ng/ml 용액 100 $\mu$ l를 96웰 Netraavidin 플레이트의 각 웰에 4℃에서 2~3시간 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 각 웰에 다양한 농도의 항-Cad-11 항체를 22℃에서 1시간 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG 2차 항체의 1/1000 희석액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 30분 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 실온의 TMB(3, 3', 5, 5' -테트라메틸벤지딘) 시약 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 5분간 발색반응을 진행하였다. 반응을 실온의 2N 황산 100 $\mu$ l로 중지시키고 플레이트를 Wallac 1420 마이크로플레이트 리더 상의 450nm에서 관독하였다.

[0144] 양성 항-Cad-11 항체 하이브리도마를 함유하는 웰의 배지를 대상으로 Cad-11을 발현하는 세포에 결합하는 능력을 시험하였다. 냉동시킨 Cad-11을 발현하는 431D 세포를 해동하고 Ca<sup>2+</sup>를 함유하는 헹크 평형 염 용액(Hanks Balanced Saline Solution, HBSS)(0.137M NaCl, 5.4mM KCl, 0.25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0mM MgSO<sub>4</sub> 및 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>)으로 2회 세척한 다음, Ca<sup>2+</sup>를 함유하는 HBSS에 10<sup>6</sup>개 세포/ml로 재현탁시켰다. 10<sup>5</sup>개 세포/웰을 50% 또는 16%의 항-Cad-11 항체 배지로 얼음 위에서 45분간 염색하고, Ca<sup>2+</sup>를 함유하는 HBSS로 2회 세척하고, 1% 농도의 파이크에리트린(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)과 결합시킨 2차 염소 항-마우스 IgG 항체로 얼음 위에서 45분간 염색한 다음, Ca<sup>2+</sup>를 함유하는 HBSS로 2회 세척하였다. 그 다음, 세포를 Ca<sup>2+</sup>와 1% 포르말데히드를 함유하는 HBSS 400 $\mu$ l에 재현탁시킨 후, PE 양성 세포를 FACS 칼리버(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)로 분석하였다.

[0145] 결과

[0146] 펩티드 4 하이브리도마로부터 나온 항-Cad-11 항체를 함유하는 배지는 Cad-11 EC1-2 단백질에 결합하였지만(도 16, HL 대 Cad-11), Cad-8 및 MN-Cad의 EC1-2 도메인을 함유하는 단백질에는 결합하지 않았다(도 16, 각각 HL 대 Cad8 및 HL 대 MNCad). 대조군 하이브리도마 배지는 시험한 카드헤린 단백질 중 어느 것에도 결합하지 않았다(도 16, 배지 대 Cad-11, 배지 대 Cad8 및 배지 대 MNCad). 이러한 데이터는 하이브리도마 내의 펩티드 4에 대해 Cad-11 특이적인 항체의 존재를 나타낸다.

[0147] 본원에서 H1M1 및 H14라고 칭한 두 개의 펩티드 4 하이브리도마는 인간 Cad-11 단백질을 발현하는 세포에 결합하였으나(도 17a 내지 도 17c 및 도 17g 내지 도 17i), 비-Cad-11 대조군 431-D 세포에는 결합하지 않았다(도 17d 내지 도 17f). H1M1으로 지칭된 하이브리도마 세포주는 2009년 1월 8일 기탁되어 A.T.C.C. 특허 수탁번호가 PTA-9699이다. H14로 지칭된 하이브리도마 세포주는 2009년 1월 9일 기탁되어 A.T.C.C. 특허 수탁번호가 PTA-9701이다. 이들 하이브리도마는 시험관 내에서 펩티드 4와 Cad-11을 발현하는 세포 둘 다를 인식하는 항-Cad-11 항체들을 함유한다. Cad-11을 발현하는 세포에 대한 이들 항체의 결합은 H1M1(도 18a)와 H14(도 18b) 대 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI)로부터 나타난 세포 염색 강도의 역가 플롯에서 나타난 바와 같이, 이용한 펩티드 4 항체의 양으로 역가 적정하는 것으로 나타났다.

[0148] H1M1 및 H14 펩티드 4 항-Cad-11 항체는 Cad-7, Cad-8, Cad-20, Cad-24, Cad-9, Cad-18 및 MN-Cad를 포함한 기타 시험한 카드헤린들 중 어느 카드헤린에 대한 것보다 Cad-11에 대한 결합이 >100배 높은 것으로 나타났다. 대부분의 경우, 다른 카드헤린에 대한 H1M1 및 H14 항-Cad-11 항체의 결합은 관찰되지 않았다. 항-Cad-11 항체 H14는 Cad-11에 대해 강력한 결합을 나타냈고(도 19a), Cad-8에 대해서는 468배 더 낮은 결합을 나타냈으며(도 19a), Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 또는 Cad-24에 대해서는 사실상 결합을 나타내지 않았다(도 19b). 이와 마찬가지로, 항-Cad-11 항체 H1M1은 Cad-11에 대해 강력한 결합을 나타냈고(도 20), Cad-8에 대해서는 1500배 더 낮은 결합을 나타냈으며, Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 또는 Cad-24에 대해서는 실질

적으로 결합을 나타내지 않았다(도 20).

[0149] **실시예 6: 항-Cad-11 EC1 도메인 항체 H1M1과 H14는 아미노산 서열 GDP를 포함하는 Cad-11 EC1 도메인 내의 에피토프에 결합한다.**

[0150] 재료 및 방법

[0151] 펩티드 4 Cad-11 EC1 항체 H1M1과 H14가 결합하는 Cad-11 EC1 도메인 내의 에피토프를 결정하기 위하여, EC1 영역의 최초 37개 아미노산을 포괄하는 네 개의 서로 다른 펩티드(도 22 참조)를 ELISA 포맷에 고정시키고, H1M1과 H14 항체가 네 개의 펩티드 각각에 결합하는 능력을 결정하였다. 96웰 Reactibind 플레이트를 펩티드 1(Cad-11 EC1 도메인의 G1-P18 아미노산) 0.3ng/웰, 펩티드 2(Cad-11 EC1 도메인의 G15-N34 아미노산) 0.3ng/웰, 펩티드 3(Cad-11 EC1 도메인의 V19-Y37 아미노산) 0.3ng/웰, 면역원 펩티드 4(Cad-11 EC1 도메인의 G1-G33 아미노산) 0.3ng/웰, 전체 EC1 도메인을 포함하는 융합 단백질(EFL) 20ng, 또는 대조군 인간 Ig(Fc-블록) 20ng 으로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 웰을 PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하고, dH<sub>2</sub>O에 용해시킨 카제인으로 22℃에서 3시간 블로킹한 다음, 다시 PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 서로 다른 펩티드 4 Cad-11 EC1 도메인 항체의 다양한 희석액을 펩티드로 코팅된 웰 또는 단백질로 코팅된 웰로 옮겨, 22℃에서 45분 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 1/1000 희석액 100μl를 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 30분 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 실온의 TMB 시약 100μl/웰을 각 웰에 첨가하고, 발색반응을 22℃에서 5분간 진행하였다. 반응을 실온의 2N 황산 100μl로 중지시키고 플레이트를 Wallac 1420 마이크로플레이트 리더 상의 450nm의 파장에서 판독하였다.

[0152] 결과

[0153] 대조군에 비해 상승된 OD450 플레이트 판독 결과에 의해 나타난 바와 같이 ELISA에서, 1:11의 펩티드 4 항-Cad-11 항체 H1M1(도 21a)과 1:23의 H14(도 21b) 모두 EC1 도메인 융합 단백질(EFL)뿐만 아니라, 펩티드 4(PEP4) 면역원에 결합하였다. 이들 항체 중 어느 것도 인간 IgG 대조군(Fc 블록)에 결합하지 않았다. 또한, ELISA에서 두 항체 모두 펩티드 2(PEP2)와 결합하였지만, 펩티드 1(PEP1) 또는 펩티드 3(PEP3)와는 결합하지 않았다(도 21a 및 도 21b).

[0154] 이러한 결과는 항-Cad-11 EC1 도메인 항체 H1M1과 H14가 중복되는 펩티드 3에는 존재하지 않는, 펩티드 2와 펩티드 4에서 공통적인 에피토프에 결합함을 시사한다. 펩티드 3의 상류로서, 펩티드 2와 펩티드 4가 공유하는 아미노산은 도 22에 나타난 상자 모양의 영역으로 강조하였다. Cap-11 EC1 도메인의 G15에서 시작하는 이들 네 개의 아미노산 GDP(서열번호 11)는 H1M1과 H14 항체가 인식하는 에피토프의 부분일 가능성이 높다.

[0155] **실시예 7: 항-Cad-11 EC1 도메인 항체 H1M1과 H14는 시험관 내에서 Cad-11을 발현하는 세포들의 응집을 억제한다.**

[0156] 재료 및 방법

[0157] Cad-11 매개성 세포 응집을 억제하는 Cad-11 항체의 능력을 평가하기 위하여, H1M1 펩티드 4 항체 30μg/ml를 24 웰 둥근 바닥 폴리프로필렌 플레이트 안의 DMEM-high glucose, 20mM Hepes pH 7.4, 10% FCS 및 10U/ml DNase 0.5ml에 든 75,000개의 Cad-11을 발현하는 A-431-D 편평세포암종 세포와 함께 배양하였다. 24웰 플레이트를 약 60rpm으로 교반하는 플랫폼 위에 놓고, 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>와 함께 밤새 배양하였다. 다음 날, 100배율(H1M1 실험의 경우) 또는 40배율(H14 실험의 경우)로 확대하여 플레이트 사진을 찍은 후, 세포 응집을 평가하였다.

[0158] 결과

[0159] 대조군 이소형 항체(30μg/ml)의 존재 하에, Cad-11을 발현하는 세포는 거대한 덩어리를 형성하였으나(도 23a), Cad-11 음성인 양친 세포는 단일 또는 이중의 세포군으로 남아 있다(도 23c). H1M1을 처리한 Cad-11 세포는 대조군 항체를 이용하여 얻은 거대한 덩어리 형성으로 진행하지 않는 작은 세포 무리로 남아 있었다(도 23b).

[0160] 동일한 분석법을 이용하자, 항-Cad-11 항체 H14 또한 Cad-11 매개성 응집을 억제하는 것으로 나타났다. 양친의



Cad-11을 발현하는 세포는 응집된 세포의 거대한 클러스터를 형성하였지만(도 24a), H14 항체(도 24b)는 세포 클러스터가 작고 드문드문하였으므로, 30 $\mu$ g/ml의 농도에서 응집을 억제하였다. 이러한 결과는 항-Cad-11 항체 H1M1과 H14가 시험관 내에서 Cad-11 매개성 세포 응집을 저해하였음을 나타낸다.

[0161] **실시예 8: 항-Cad-11 EC1 도메인 항체 H1M1과 H14는 류마티스 관절염의 쥐 모델에서 생체 내 관절염 관련 관절 부종을 억제한다.**

[0162] 재료 및 방법

[0163] 연구 1 - 6주령의 수컷 C57/B16 마우스에 0일차와 2일차에 KBN 혈청 150 $\mu$ l를 주사하였다. KBN 혈청을 처리한 마우스에 식염수 주사(도 25, 빈 세모)를 주거나 상이한 용량의 H1M1 항-Cad-11 EC1 항체를 처리하였다. 처리 계획은 0일차에 0.5mg의 항체/마우스 주입과 그 후 이틀마다(q2d) 0.1mg의 항체/마우스 주입(0.5mg + 0.1mg)(도 25, 채워진 세모); 0일차에 0.5mg의 항체/마우스 주입(0.5mg)(도 25, 다이아몬드); 이틀마다(q2d) 0.1mg의 항체/마우스 주입(0.1mg + 0.1mg)(도 25, 네모); 또는 이틀마다(q2d) 0.3mg의 항체/마우스 주입(0.3mg + 0.3mg)(도 25, 원)을 포함하였다. 대조군은 다섯 마리로 이루어졌고, 처리군은 일곱 마리로 이루어졌다. 관절염 관련 관절 부종은 이틀마다 캘리퍼 측정으로 확인하였다.

[0164] 연구 2 - 6주령의 수컷 C57/B16 마우스에 0일차와 2일차에 KBN 혈청 150 $\mu$ l를 주사한 다음, 이틀마다(q2d) 식염수(도 26, 세모) 또는 항-Cad-11 항체인 H1M1(도 26, 네모) 또는 H14(도 26, 원) 중 하나를 이틀마다(q2d) 0.3mg/dose로 처리하였다. 대조군은 다섯 마리로 이루어졌고, 처리군은 일곱 마리로 이루어졌다. 관절염 관련 관절 부종은 이틀마다 캘리퍼 측정으로 확인하였다.

[0165] 결과

[0166] 연구 1 - H1M1 항-Cad-11 항체는 대조군 마우스에 비해 관절 부종을 억제하였다. 이틀마다 0.3mg의 H1M1 항체를 KBN을 처리한 마우스에 투여함으로써, 관절염 관련 관절 부종을 최대도 억제하는 것을 관찰할 수 있었다(도 25, 원).

[0167] 연구 2 - 항-Cad-11 항체 둘 다가 대조군에 비해 관절염 부종을 억제하였다. 이번 연구에서, H14 항체는 대조군 동물과 비교할 때, 관절염 개시를 상당히 지연시켰다(도 27). 대조군의 모든 마우스가 3일차에 관절염을 발달시켰으나, H14 처리한 마우스는 모든 동물이 관절염을 발달시키기 전에 6일을 필요로 하였다.

[0168] 이러한 연구 결과는 인간 Cad-11의 EC1 도메인에 대한 항체가 생체 내에서 관절염의 발달과 중증도를 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0169] **실시예 9: 인간 카드헤린-11의 다른 EC1 도메인 펩티드에 대한 항체의 생성**

[0170] 재료 및 방법

[0171] Balb/c 마우스를 BSA로 공유 결합시킨 인간 Cad-11 EC1 도메인의 19개 아미노산에 해당하는 펩티드 V19-Y37(VLVGRHL SDIDS GDGNI KY (서열번호 12)) 0.01mg으로 1개월의 기간에 걸쳐 격주로 아홉 차례 발 패드에 면역화하였다. 이 펩티드는 본원에서 펩티드 3이라 한다. 면역화된 마우스에서 비장을 채취하여 쥐의 융합 파트너인 P3X63-Ag8.653와 융합하여 항체 생산 하이브리도마를 제조하였다. 이들 하이브리도마를 확장시키고, 하이브리도마로부터 항-Cad-11 항체를 함유하는 배지를 대상으로 박테리아에서 생산된 Cad-11의 EC1-2 도메인에 상응하는 단백질에 결합하는 능력을 스크리닝하였다. 이들 펩티드 3 하이브리도마로부터 나온 항-Cad-11 항체를 함유하는 배지를 Cad-8 및 MN-카드헤린의 EC1-2 도메인을 포함하는 단백질에 대한 결합의 부재에 대해서도 같이 스크리닝하였다. 96웰 EIA 플레이트를 0 내지 300mg/ml의 각각의 EC1-2 Cad 단백질 또는 CHO 세포가 생산한 EC1-Fc 융합 단백질 0.05ml로 4℃에서 밤새 코팅한 다음, 식염수 완충액으로 여러 차례 세척하였다. 그런 다음, 플레이트를 0.25ml의 카제인-PBS 완충액을 이용하여 블로킹한 다음, 식염수 완충액으로 여러 차례 세척하였다. 펩티드 3 항-Cad-11 항체를 함유하는 하이브리도마 배지를 아무 것도 섞지 않고 각 웰에서 1시간 동안 22℃에서 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 염소 항-마우스 IgG 2차 항체의 1/1000 희석액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 30분 배양한 다음, PBS-트윈(0.05%)으로 2회 세척하였다. 실온의 TMB(3, 3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘) 시약 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고, 22℃에서 5분간 발색반응을 진행하였다. 반응을 실온의 2N 황산

100 $\mu$ l로 중지시키고 플레이트를 Wallac 1420 마이크로플레이트 리더 상의 450nm에서 판독하였다.

[0172] 또한, 펩티드 3 하이브리도마의 배지를 대상으로 세포 상에 발현된 인간Cad-11 단백질에 결합하는 능력을 시험하였다. 냉동시킨 Cad-11을 발현하는 431D 세포를 해동하고 Ca<sup>2+</sup>을 함유하는 HBSS에서 2회 세척한 다음, Ca<sup>2+</sup>을 함유하는 HBSS에 10<sup>6</sup>개 세포/ml로 재현탁시켰다. 10<sup>5</sup>개 세포/웰을 50% 또는 16%의 항-Cad-11 항체 배지로 얼음 위에서 45분간 염색하고, Ca<sup>2+</sup>을 함유하는 HBSS로 2회 세척하고, 1% 농도의 파이코에리트린과 결합시킨 2차 염소 항-마우스 IgG 항체로 얼음 위에서 45분간 염색한 다음, 다시 Ca<sup>2+</sup>을 함유하는 HBSS로 2회 세척하였다. 그 다음, 세포를 Ca<sup>2+</sup>와 1% 포름알데히드를 함유하는 HBSS 400 $\mu$ l에 재현탁시킨 후, PE 양성 세포를 FACS 칼리버로 분석하였다.

[0173] 결과

[0174] 펩티드 3 하이브리도마로부터 얻어진 항-Cad-11 항체를 함유하는 배지는 Cad-11 EC1-2 단백질과 EC1-Fc 융합 단백질과 결합하지만(도 28, 각각 HL 대 Cad-11 및 HL 대 Cad-11-EC1), Cad-8과 MN-Cad의 EC1-2 도메인을 함유하는 단백질과는 결합하지 않았다(도 28, 각각 HL 대 Cad8 및 HL 대 MNCad). 대조군 하이브리도마 배지는 카드헤린 단백질 중 어느 것과도 결합하지 않았다(도 28, 배지 대 Cad-11, 배지 대 Cad8 및 배지 대 MNCad).

[0175] 펩티드 3 하이브리도마로부터 얻어진 항-Cad-11 항체 또한 인간 Cad-11 단백질을 발현하는 세포에 결합하였지만(도 29, 화살표 참조), Neos를 발현한 비 Cad-11을 발현하는 대조군 세포에는 결합하지 않았다. 이 결과는 펩티드 3와 Cad-11을 발현하는 세포 둘 다를 인식하는 하이브리도마에 항-Cad-11 항체가 존재함을 시험관 내에서 확인시켜 주었다.

[0176] 실시예 10: 항-Cad-11 EC1 도메인에 특이적인 항체인 H1M1은 시험관 내에서 인간의 일차성 섬유모세포 유사 윤활막 세포의 응집을 방지한다.

[0177] 재료 및 방법

[0178] 응집 분석

[0179] 이번 분석에서, 인간 섬유모세포 유사 윤활막 세포(FLS) 세포주를 FLS 배지(DMEM, 10% FCS, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민, 0.05% 젠타마이신, 1% HEPES)에서 90~100% 컨플루언스까지 배양하였다. 분석 당일, 배지를 FLS로부터 제거하고, 세포를 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 플라스크로부터 제거하고, MM 배지(DMEM, 10% FCS, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민, 0.05% 젠타마이신, 1% HEPES)으로 세척한 다음, 칼슘을 함유한 HBS(0.137M NaCl, 5.4mM, KCl, 0.25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0mM MgSO<sub>4</sub> 및 4.2mM NaHCO)로 2회 세척하였다.

[0180] 트립신으로 처리한 FLS를 MM 배지 내에 4x10<sup>4</sup>개 세포/ml로 재현탁시키고, 2x10<sup>4</sup>개 세포/well을 배지 단독, 이소형 대조군 항체 또는 30 $\mu$ g/ml의 다양한 항-Cad-11 항체를 함유한 24웰 접시에 놓았다. 플레이트를 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하고, 다음 날, 웰을 광학 현미경으로 검사하고 사진을 찍었다.

[0181] FLS 침입능 분석

[0182] H1M1 항체가 다양한 세포 외 매트릭스 단백질로 이루어진 매트릭셀로의 FLS 침입을 억제하는 능력을 시험하기 위하여, 매트릭셀 스포트 웰 시스템을 이용한 침입능 분석을 이용하였다. 이러한 FLS 생물학의 시험관 내 모델은 FLS가 연결된 관절 내 인간 연골을 분해하고 구멍을 뚫는 능력을 모방한다. 이 분석에서, 인간 FLS 세포주를 90~100% 컨플루언스까지 FLS MM 배지에서 배양하였다. 분석 시작 전날, FLS를 혈청이 없는 FLS 배지에서 24시간 동안 혈청기가 처리하였다. 분석 당일, 배지를 혈청기가 처리한 FLS로부터 제거하고, 세포를 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 플라스크로부터 제거한 다음, MM 배지로 세척하고, 칼슘을 함유한 HBS로 2회 세척하였다. 트립신으로 처리한 FLS를 MM 배지에 4x10<sup>5</sup>개 세포/ml로 재현탁시켰다. 준비한 매트릭셀 코팅된 인서트를 FLS을 위한 유사분열물질로서 작용하는, FCS를 함유한 MM 배지가 들어있는 24웰 플레이트에 놓았다. 챔버의 다른 편에는,

$4 \times 10^5$  개 세포/ml의 세포 현탁액  $50 \mu\text{l}$ 를 첨가한, 항체가 없거나 작용 농도의 두 배짜리 처리 항체를 함유하는 MM 배지  $50 \mu\text{l}$ 를 각 웰에 주입한다. FLS와 항체를 함유하는 챔버를  $37^\circ\text{C}$ 의 배양기에 18시간 배양하였다.

[0183] 24시간 후, 세포를 함유한 인서트를 메탄올에 고정시키고, 매트릭셀로 코팅된 막의 외부에 고정된 FLS를 면봉을 이용하여 제거하고, 막을 건조시킨 다음, 프로피듐 요오드(PI)로 실온의 암소에서 30분간 염색하였다. PI 염색을 제거하고, 인서트를 D-글루코스( $1\text{mg/ml}$ )로 세척한 다음, 암소에서 건조시켰다. 막을 잘라내어 형광현미경을 이용하여 슬라이드 상에서 영상을 관찰하고, 막으로 이동한 FLS의 수를 정량하였다.

[0184] 결과

[0185] 배지 또는 대조군 항체와 배양한 FLS는 세포 응집물과 세포과정을 통해 결합하는 광범위한 세포망을 형성하였다(도 30a 및 30B). 이와 대조적으로 항-Cad-11 항체 H1M1으로 처리한 세포는 소수의 세포 응집물과 소수의 연결을 형성하였다(도 30c).

[0186] 상이한 일차성 인간 FLS를 이용한 일련의 FLS 침입능 분석에서,  $30 \mu\text{g/ml}$ 의 H1M1 항체는 일관되게 FLS가 막으로 침입하는 것을 억제하였다. 특히,  $30 \mu\text{g/ml}$  용량의 H1M1은 대조군 항체에 비해 FLS 침입을 80% 억제하였다. 이러한 활성은 13C2 항체를 포함하여, EC1 영역 외부에 결합한 다른 Cad-11 항체들에서 관찰한 것보다 컸다(도 31).

[0187] **실시예 11: H1M1 항체는 KBN 관절염 마우스 모델에서 관절 부종을 억제한다.**

[0188] 재료 및 방법

[0189] 0일차와 2일차에 전달한  $75 \mu\text{l}$ 의 KBN 혈청 2회분 용량 투여로 질병을 유도한 관절염의 KBN 모델에서 항-Cad-11 항체 H1M1을 시험하였다. 7마리의 수컷 C57BL/6 마우스군에 0일차에 시작하여 이틀마다 복강 내로  $10\text{mg/kg}$ 의 H1M1을 투여하고, 마우스의 관절 부종을 매일 모니터링하였다. 발목이 완전히 굽어진 자세로 복사에서 스프링 부하된 다이얼 캘리퍼(Long Island Indicator Service, Hauppauge, NY)로 관절 부종 또는 발목 두께를 측정하였다.

[0190] 결과

[0191] H1M1 항체는 대조군과 비교할 때, 관절 부종을 53% 억제하였다( $p < 0.001$ )(도 32).

[0192] **실시예 12: H1M1 가변 도메인 및 상보성 결정영역의 서열분석**

[0193] 재료 및 방법

[0194] H1M1을 생산하는 하이브리도마 세포의 3개 클론(H1, H17 및 H27)으로부터 RNA를 추출하였다. 각각의 IgGVH, IgMVH, Ig $\kappa$ L 및 IG $\lambda$ VL에 대한 불변영역 프라이머를 함유한 쥐 신호서열에 대한 디제너레이트 프라이머 풀(degenerate primer pools)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 중쇄 가변(V)-영역 RNA를 여섯 개의 디제너레이트 프라이머 풀(HA 내지 HF) 세트를 이용하여 증폭시켰고, 경쇄 V-영역 mRNA를  $\kappa$  클러스터에 대한 일곱 개의 디제너레이트 프라이머 풀 세트( $\kappa$ A 내지  $\kappa$ G)와  $\lambda$  클러스터에 대한 하나의 디제너레이트 프라이머를 이용하여 증폭시켰다(표 1 참조).

[0195] 모든 RNA 시료를 위해서는 중쇄로부터의 증폭 산물을 중쇄 프라이머 풀 B 및 E가 결합된 IgGVH 역전사 프라이머로 역전사한 RNA로부터 얻었다. 증폭산물을 Ig $\kappa$ VL 역전사 프라이머 그리고  $\kappa$  경쇄 프라이머 풀 B, C 및 G로부터 얻었다. 위의 풀 각각의 PCR 산물을 정제하고 복제하여, 각 산물에 대해 적어도 네 개의 클론들을 서열분석하였다.

[0196] H1M1을 생산하는 클론 H1, H17 및 H27의 경우, 단일 기능성 중쇄 및 경쇄 V-영역 서열들을 각 시료에 대해 확인하였고, 세 개의 항체가 동일한 것으로 밝혀졌다(표 2). 중쇄 및 경쇄 V-영역 서열, 그리고 그들의 CDR 서열을 각각 도 33과 도 34에 나타내었다.

[0197] 세 개의 H1M1 하이브리도마 클론으로부터 얻은 중쇄 및 경쇄 V-영역은 그들의 가장 가까운 인간의 생식세포계열 서열에 우수한 상동성을 나타내며(각각 64%와 82%), 개별적인 프레임워크 서열들은 인간의 생식세포계열 데이터 베이스에서 가까운 상동체를 갖는다(표 2). 이렇게 높은 상동성은 강력한 인간화 항체를 생산하는 데 대규모의 유전자 조작이 필요하게 될 가능성을 낮춘다.

[0198]

표 1

[0199]

H1M1 가변 도메인 및 상보성 결정 영역의 서열분석을 위해 이용한 프라이머

명칭	염기	동의성	아미노산 위치	서열	서열번호
MuIgVH5'-A	33	512	-20에서 -13	GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMACTKGRITTT	14
MuIgVH5'-B	34	64	-20에서 -13	GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGYTYCTCTT	15
MuIgVH5'-C	39	-	-20에서 -11	ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT	16
	36	48	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGGCTGTCYTRGBGCTGYCTCTG	17
	39	24	-20에서 -11	ACTAGTCGACATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT	18
MuIgVH5'-D	36	8	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRTYATSTCTT	19
	36	32	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWYYTCATTCCT	20
	36	-	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	21
MuIgVH5'-E	36	8	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	22
	33	24	-20에서 -13	ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAAGTGGRT	23
	35	64	-20에서 -13	ACTAGTCGACATGGGRATGGASCKKIRTCTTMTCT	24
MuIgVH5'-F	35	32	-20에서 -13	ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRITTT	25
	35	-	-20에서 -13	ACTAGTCGACATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	26
	33	-	-20에서 -13	ACTAGTCGACATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	27
	38	-	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	28
MuIgMVH3'-1	32	-	125에서 118	CCCAAGCTTACGAGGGGAAGACATTTGGGAA	29
uIgGVH3'-2	35	32	126에서 119	CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG	30
MuIgκL5'-A	32	32	-20에서 -13	GGGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	31
MuIgκL5'-B	33	-	-20에서 -13	GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCTGCTAT	32
MuIgκL5'-C	39	8	-20에서 -11	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	33
MuIgκL5'-D	42	16	-20에서 -10	ACTAGTCGACATGAGGRCCCTGCTCAGWTTTGGIWTCTT	34
	41	128	-24에서 -14	ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG	35
MuIgκL5'-E	39	4	-20에서 -11	ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCAGGCTCTGSGTT	36
	41	32	-15에서 -5	ACTAGTCGACATGTGGGGAYCGKTTTYAMMCTTTTCAATTG	37
	38	-	-20에서 -11	ACTAGTCGACATGGAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTCC	38
MuIgκL5'-F	36	32	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGAGIMMKTCIMTCAITTCYTGGG	39
	36	96	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGAKGTHCYCIGCTCAGTYCTIRG	40
	35	8	-20에서 -12	ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	41
	37	-	-16에서 -8	ACTAGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	42
MuIgκL5'-G	39	-	-19에서 -10	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGCT	43
	39	8	-22에서 -13	ACTAGTCGACATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT	44
	37	12	-15에서 -7	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTCTGG	45
	37	24	-15에서 -7	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	46
MuIgκL3'-1	30	-	122에서 116	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	47
MuIgλL5'-A	33	128	-20에서 -13	GGGAATTCATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	48
MuIgλL3'-1	32	32	125에서 118	CCCAAGCTTAGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA	49

[0200]

\*Ig 가변영역을 암호화하는 서열의 시작코돈에 대한 프라이머의 아미노산 위치

[0201]

마우스 5' 프라이머 A - B와 3' 프라이머는 10pmol/μl 농도의 각 프라이머를 500pmol 함유한다.

[0202]

마우스 5' 리더 프라이머 C-F(중쇄) 및 D-G(경쇄)는 표시한 서열들의 등물 혼합물(농도(5pmol/μl)에서 각 프라이머 100pmol)을 함유한다.



표 2

[0203]

H1M1 하이브리도마 클론 H1, H17 및 H27의 서열분석

	H쇄	L쇄
CDR 1 길이	5개 아미노산	16개 아미노산
CDR 2 길이	17개 아미노산	7개 아미노산
CDR 3 길이	10개 아미노산	9개 아미노산
가장 가까운 인간 생식세포계열 <sup>b</sup>	IGHV1-46*01 (64%)	IGKV2-29*02 (82%)
가장 가까운 인간 FW1 <sup>b</sup>	IGHV7-4-1*01 (80%)	IGKV2-30*01 (78%)
가장 가까운 인간 FW2 <sup>b</sup>	IGHV3-73*01 (64%)	IGKV2-40*01 (93%)
가장 가까운 인간 FW3 <sup>b</sup>	IGHV1-69*02 (69%)	IGKV2-40*01 (94%)
가장 가까운 인간 J <sup>b</sup>	IGHJ6 (91%)	IGKJ2 또는 IGKJ4 (90%)

[0204]

<sup>a</sup> Kabat에 따른 CDR 정의와 번호 붙이기임.

[0205]

<sup>b</sup> 뒤에 % 상동성을 붙여 나타낸 생식세포계열 ID

[0206]

**실시예 13: 인간화 항-Cad-11 항체의 생성**

[0207]

인간화 항-Cad-11 항체 가변영역 서열 설계

[0208]

SYN0012/H1M1 항체의 결합 성질에 필수적이라고 예상되었던 V 영역 내의 중요한 "구속" 아미노산을 확인하기 위하여, 본원에 기술하였으며 SYN0012 항체라고도 부르는, 쥐의 H1M1 단일클론 항체의 항체 가변(V)영역의 구조적 모델을 스위스 단백질 데이터베이스를 이용하여 만들고 분석하였다. 상보성 결정 영역 내에 함유된 잔기(Kabat 과 Chothia 정의 둘 다를 이용한)는 여러 가지 프레임워크 잔기들과 함께 중요하다고 여겨졌다. SYN0012/H1M1 항체의 VH와 VK 서열은 전형적인 프레임워크 잔기들을 함유하고 있으며, CDR 1, 2 및 3 모티프는 여러 쥐 항체들과 비슷하다.

[0209]

위의 분석으로부터, SYN0012/H1M1 항체의 합성형 인간 서열을 CDRs 외부의 대안들은 폭넓게, 그러나 CDR 서열 내부의 가능성 있는 대체 잔기의 선택 폭은 좁게 하여 제조할 수 있다고 여겨졌다. 예비 분석 결과는 쥐 SYN0012/H1M1 항체 서열에 있는 것과 유사하거나 동일한 CDRs를 제조하기 위해 몇 가지 인간 항체들로부터 상응하는 서열 분절들을 결합할 수 있음을 나타내었다. CDR의 외부 영역 및 측면을 위해서는, 다양하게 선택된 인간 서열 분절들이 인간화 항-Cad-11 항체 V 영역의 가능성 있는 성분들로서 확인되었다.

[0210]

변이체 설계

[0211]

위의 분석 결과를 기초로 하여, SYN0012 인간화 항-Cad-11 항체 변이체를 제조하는 데 이용할 수 있는 서열 분절들의 대규모 예비 세트를 선정하고, 인간 MHC 1형 대립유전자(Perry *et al* 2009)에 대한 펩티드 결합의 인실리코(*in silico*) 분석을 위해, 알려진 항체 서열과 관련된 T 세포 에피토프들(Bryson C, Jones TD and Baker MP. Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools. *Biodrugs* 2010, 24(1): 1-8)의 TCEDTM(T Cell Epitope Database of Antitope LLC, Cambridge UK)를 이용하여 분석하였다. 인간 MHC II형에 대한 중요한 비 인간 생식세포계열 바인더로 확인되었거나 TCEDTM에 대해 상당한 적중률을 기록한 서열 분절들은 버렸다. 이는 분절 세트를 줄여주었으며, 분절들 사이의 접합 부분이 잠재적인 T 세포 에피토프들을 함유하지 않았음을 확실히 하기 위하여 이들을 조합한 것을 다시 위와 같이 분석하였다. 그런 다음, 선정된 분절들을 조합하여 합성을 위한 중쇄 및 경쇄 V 영역을 생산하였다. SYN0012 인간화 항-Cad-11 항체 변이체를 위하여, 다섯 개의 VH 사슬(VH1-VH5; 서열번호 61, 63, 65, 67, 69)과 세 개의 VK 사슬(VK 1- VK3; 서열번호 71, 73, 75)을 도 35a 내지 도 35h에 상술한 바와 같은 서열들로 설계하였다.

- [0212] 합성형 인간 항체 변이체 구축
- [0213] 어닐시키고 연결한 후, PCR 증폭하여 전체 길이의 합성 V 영역을 제공하도록 한 일련의 중첩형 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 SYN0012/H1M1을 위한 모든 변이체 합성형 인간 항체 VH 및 Vκ 영역 유전자들을 합성하였다. 조립된 VH 변이체들은 Mlu I과 Hind III 부위를 이용하여 복제하였고, 조립된 Vκ 변이체들은 Bss HII와 Bam HI 제한효소 부위를 이용하여 IgG4(S241P) VH 사슬과 Vκ 사슬을 위한 pANT 발현 벡터 시스템(Antitope, Cambridge UK)으로 직접 복제하였다(도 36). 모든 구성체를 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0214] 항체의 구축, 발현 및 정제
- [0215] 합성형 IgG4(S241P) VH 및 Vκ 사슬의 모든 15개 조합형을 전기천공법을 통해 NSO 세포로 안정되게 형질도입시키고, 200nM 메토틱세이트(Sigma Cat. No. M8407, Sigma Aldrich, UK)를 이용하여 선별하였다. 각 구성체에 대한 메토틱세이트 저항성 콜로니를 대상으로 IgG4 ELISA를 이용하여 IgG 발현 수준을 시험하여, 최고의 발현 계열을 선별하고, 확장시켜 액체 질소에 냉동시켰다. 15개 인간화 항체 변이체 각각을 발현하는 세포들이 성공적으로 생성되었다.
- [0216] SDP011 (Vκ1/VH1), SDP021 (Vκ1/VH2), SDP031 (Vκ1/VH3), SDP041 (Vκ1/VH4), SDP051 (Vκ1/VH5), SDP061 (Vκ2/VH1), SDP071 (Vκ2/VH2), SDP081 (Vκ2/VH3), SDP091 (Vκ2/VH4), SDP101 (Vκ2/VH5), SDP111 (Vκ3/VH1), SDP121 (Vκ3/VH2), SDP131 (Vκ3/VH3), SDP141 (Vκ3/VH4) 및 SDP151 (Vκ3/VH5)이라는 명칭의 SYN0012의 15개 인간화 IgG4(S241P) 합성형 변이체를 단백질 A 세파로스 컬럼(GE Healthcare Cat. No. 110034-93) 상의 NSO 세포 배양 상층액으로부터 정제하고, 항체를 예측한 아미노산 서열을 기초로 한 흡광계수 ( $E_{c(0.1\%)} = 1.51$ )를 이용하여 OD280nm로 정량하였다. 쥐 IgG1 항-Cad-11 EC1 항체(SYN0011)를 정제하는 동안, 항체가 약 7.5의 pH에서 응집물로서 침전되었음이 밝혀졌다. 따라서, 모든 항체들을 산 처리 후 용출로 pH 약 6.5까지 중화시키고, 10mM 아세트산나트륨 버퍼 pH 5.5(1.4mM 아세트산, 8.6mM 아세트산나트륨)으로 완충액 교환을 하였다. 각 인간화 항-Cad-11 항체 변이체를 정제하고 환원 SDS-PAGE로 분석하였다. 시료를 NuPage 4-12% 비스-트리스 겔(Invitrogen Cat. No. NP0322BOX)에 로딩하고 30분간 200V에서 전개시켰다. 임의의 오염 단백질의 증거 없이, 예측한 크기의 VH 및 Vκ 사슬에 해당하는 밴드가 관찰되었다(도 37).
- [0217] **실시예 14: 인간화 항-Cad-11 항체의 Cad-11 단백질에 대한 결합 특성 분석**
- [0218] 재료 및 방법
- [0219] 정제된 항체의 재조합 인간 Cad-11 EC1에 대한 결합
- [0220] 정제된 인간화 합성형 변이체 항체들(SDP011 내지 SDP151)의 재조합 Cad-11 EC1 인간 IgG1 융합 단백질에 대한 결합을 경쟁 결합 ELISA에서 평가하였다. 인간화 항체 또는 대조군(SYN0012/H1M1) 항체  $5\mu\text{g/ml}$  내지  $0.0022\mu\text{g/ml}$ 의 단계별 희석액을 PBS에 희석시킨  $0.25\mu\text{g/ml}$ 의 재조합 인간 Cad-11 EC1(R&D Systems Cat. No. 1790-CA-050)으로 사전 코팅한 Nunc Immuno MaxiSorp 96웰 넓은 바닥 마이크로티터 플레이트(Fisher Cat. No. DIS-971-030J) 상에 실온에서 1시간 배양하기 전에, 일정한 농도의 비오틴이 부착된 쥐 항-Cad-11 항체인 SYN0012/H1M1( $0.1\mu\text{g/ml}$ , 최종 농도)와 사전 혼합하였다. 비오틴이 부착된 mAb의 결합을 스트렙타비딘-HRP(Sigma Cat. No. S5512)와 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질(Invitrogen Cat. No. 00-2023)로 검출하였다.
- [0221] 카드헤린-펩티드 교차반응성 ELISA
- [0222] 인간화 항-Cad-11 항체 가운데 어느 것이 Cad-11에 대해 가장 큰 특이성을 나타내는지 평가하기 위해, 인간화 항체들을 대상으로 Cad-11 면역원 또는 카드헤린-7, -8, -9, -18, -20, 및 -24에서 얻어진 Cad-11 면역원에 대해 가장 밀접하게 관련 있는 6개의 서열들 중 해당하는 서열들을 포함한, BSA에 연결된 37량체 펩티드에 대한 결합 능력을 ELISA 포맷에서 시험하였다.
- [0223] Reactibind 플레이트(ThermoScientific)를 PBS(pH 7.2)(Gibco(Invitrogen), #20012) 내의 0.05% 트윈(EMD, product code 9480)에 용해시킨, 카드헤린-7, -8, -9, -18, -20, 및 -24에 해당하는, BSA가 결합된 카드헤린

37량체 펩티드(NE 펩티드) 500ng/ml로 4℃에서 밤새 100 $\mu$ l 부피/웰로 코팅하였다. 펩티드를 함유하는 용액을 웰로부터 제거하고, 플레이트를 PBS에 용해시킨 2% 우혈청 알부민(BSA)로 22℃에서 2시간 200 $\mu$ l 부피/웰로 블로킹하였다. 그런 다음, 22℃에서 200 $\mu$ l/웰의 PBS-트윈 0.05%으로 2회 세척하고, 닦아내면서 말렸다. 각 인간화 항-Cad-11 항체의 5 $\mu$ g/ml 내지 8ng/ml의 단계별 희석액을 100 $\mu$ l/웰 부피로 펩티드가 코팅된 웰에 배양하였고, 22℃에서 1시간 배양하였다. 항체 용액을 웰에서 제거하고, 플레이트를 22℃에서 200 $\mu$ l/웰의 PBS-트윈 0.05%으로 2회 세척하고, 닦아내면서 말렸다. 플레이트의 각 웰에 염소-항 마우스 IgG(Pierce # 31432)를 1:1000 희석비율로 100 $\mu$ l/웰 첨가하고, 22℃에서 30분 배양하였다. 2차 항체 용액을 제거하고, 플레이트를 22℃에서 200 $\mu$ l/웰의 PBS-트윈 0.05%으로 2회 세척하고, 닦아내면서 말렸다. 플레이트에 100 $\mu$ l/웰의 테트라메틸벤지딘(TMB) 시약 IgG(Pierce # 34022, 1단계 터보 TMB-ELISA)을 첨가하여 반응을 진행시켰고, 22℃에서 5분간 진행시켰다. 반응을 실온의 2N 황산 100 $\mu$ l를 이용하여 중지시키고, 플레이트를 마이크로플레이트 리더(Wallac 1420) 상의 450nm에서 판독하였다.

[0224] 표면 플라즈몬 공명에서 Cad-11에 대한 결합

[0225] 재조합 his 표지 인간 Cad-11에 대한 SDP051의 친화도를 결정하기 위하여, rhCad-11(R&D Systems)를 단일 농도로 칩에 고정시키고, SDP051에 대한 고분별능 동역학을 결정하였으며, 2-상태 반응 결합 모델은 성공적으로 동역학 데이터에 적합하였다.

[0226] 동역학 데이터는 임의의 가능한 물질 전달 효과를 최소화하기 위해 40 $\mu$ l/분의 유속에서 얻었다. 12.5nM 내지 0.195nM에 이르는 분석물질 농도 시리즈는 계단희석법으로 준비하였다. 동역학 사이클에 걸쳐 표면과 분석물질 모두의 안정성을 점검하기 위하여, 바탕(mAb 없음)과 3.125nM(첫 번째와 마지막 사이클) 농도의 분석물질을 2회 반복하여 동역학 흐름으로 프로그래밍하였다. SDP051을 흡착 단계에서 만곡을 관찰하기에 충분한 360초 동안 Fc 위로 주입하였다.

[0227] Cad-11 세포 결합 분석

[0228] 냉동된 Cad-11을 발현하는 431D 세포(K. Johnson, U. Nebraska, Omaha) 또는 비 Cad-11을 발현하는 양친 431D 세포(K. Johnson, U. Nebraska, Omaha)를 해동하고, 세척하여, 2x10<sup>6</sup>개 세포/ml로 재현탁하고, 각 웰에 50 $\mu$ l를 첨가하였다. 그런 다음, 세포를 얼음 위에서 45분간 1ng/ml 내지 30 $\mu$ g/ml로 농도를 점차 늘려가며 인간화 SDP051 또는 SDP071 항체로 염색하였다. 염색 후, 세포를 1% 우태아용액(FBS)을 함유한 헹크 평형 염 용액(HBSS)로 2회 세척하고 재현탁시켜, 빛을 차단한 채 얼음 위에서 45분간 마우스 항-인간 IgG4-PE(100배 희석)로 염색하였다. 세포를 2차 작용물질로 염색한 후, 세포를 1% FBS를 함유한 HBSS로 2회 세척하고, 1% FBS를 함유한 HBSS에 용해시킨 2% 알데히드 200 $\mu$ l에 재현탁시킨 다음, BD FACS 칼리버로 분석하였다.

[0229] 카드헤린-펩티드 교차반응성 FACS 분석

[0230] 냉동된 Cad-11을 발현하는 431D 세포 또는 비 Cad-11을 발현하는 양친 431D 세포를 해동시켜, 세척하고 2x10<sup>6</sup>개 세포/ml로 재현탁하고, 각 웰에 100,000개의 세포를 첨가하였다. 세포를 농도를 점차 늘려가며 37량체 Cad-11 펩티드 또는 0.5  $\mu$ g/ml SDP051를 함유하는 Cad-7, Cad-8, Cad-9, Cad-18, Cad-20 또는 Cad-24 펩티드로 얼음 위에서 45분간 염색하였다. 염색 후, 세포를 1% 우태아용액(FBS)을 함유한 헹크 평형 염 용액(HBSS)로 2회 세척하고 재현탁시켜, 빛을 차단한 채 얼음 위에서 30분간 염소 항-마우스 IgG-PE(100배 희석) 100 $\mu$ l 로 염색하였다. 세포를 2차 작용물질로 염색 후, 세포를 1% FBS를 함유한 HBSS로 2회 세척하고, 재현탁시켜 1% FBS를 함유한 HBSS에 용해시킨 2% 포르말데히드 200 $\mu$ l에 고정시킨 다음, BD FACS 칼리버로 분석하였다.

[0231] 결과

[0232] Cad-11 융합 단백질에 대한 결합을 두고, 인간화 항-Cad-11 항체들 모두는 SYN0012와 효율적으로 경쟁하였다(도 38a 내지 도 38c). 이는 그들이 SYN0012 또는 Cad-11상의 중첩된 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하고, SYN0012가 재조합 인간 Cad-11에 결합하는 것과 적어도 마찬가지로 더 우수하게 결합함을 나타냈다. 곡선들을 각 항체에 대한 IC50값을 계산하는 데 이용하였으며, 이들을 각 ELISA 플레이트상에 포함시킨 SYN0012의

IC50으로 정규화하여, 플레이트간 비교가 이루어질 수 있게 하였다(표 3). 각 세포주의 발현수준 및 각 항체의 계산된 등전점(pI)도 나타내었다(표 3).

[0233] V<sub>K</sub>/VH5 항체인 SDP051은 가장 높은 특이성으로 Cad-11과 결합하였으며, 다른 카드헤린으로부터의 관련된 항원들보다 Cad-11 항원에 100배 더 많이 결합함을 나타내었다(도 39a 내지 도 39o). 최대의 교차반응성은 Cad-8에 대해서 나타났다. SDP031, SDP061 및 SDP071 또한 Cad-11에 상당한 특이성을 나타내어, 다른 카드헤린으로부터의 관련된 항원들보다 Cad-11 항원에 20배 더 많이 결합함을 나타내었다. SDP031, SDP051, SDP061 및 SDP071에 대한 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열을 도 40a 내지 도 40d에 나타내었다.

### 표 3

[0234] 합성형 인간 항-Cad-11 항체의 특성 분석

Synovex 번호	V 영역 ID	IC50 μg/ml	PI	발현수준 mg/L
SDP011	VK1/VH1	0.91	7.64	20
SDP021	VK1/VH2	0.67	7.78	15
SDP031	VK1/VH3	0.84	7.78	12
SDP041	VK1/VH4	0.65	7.78	13
SDP051	VK1/VH5	0.99	7.78	15
SDP061	VK2/VH1	0.47	7.64	12
SDP071	VK2/VH2	0.33	7.78	10
SDP081	VK2/VH3	0.42	7.78	12
SDP091	VK2/VH4	0.57	7.78	8
SDP101	VK2/VH5	0.53	7.78	10
SDP111	VK3/VH1	0.68	7.64	6
SDP121	VK3/VH2	0.52	7.78	20
SDP131	VK3/VH3	0.55	7.78	15
SDP141	VK3/VH4	0.61	7.78	8
SDP151	VK3/VH5	0.72	7.78	34

[0235] 상대적인 IC50은 시험 항체에 대한 값을 SYN0012에 대한 값으로 나누어 계산하였다. 주어진 항체 발현 수준은 T 플라스크에서 정치배양한 것이다. PI는 계산값이다.

[0236] 500ng/ml의 코팅에서 Cad-11 항원 및 Cad-7, -8, -9, -11, -18, -20, -24 항원에 대한 인간화된 항-Cad-11 항체의 초기 스크리닝에서(도 41a), SDP051은 임의의 다른 카드헤린보다 Cad-11에 훨씬 더 큰 결합을 나타냈다. 최대의 교차반응성 정도는 Cad-8 항원의 경우에 나타났다. 이 같은 분석을 50ng/ml의 더 낮은 항원 코팅 농도와 더 광범위한 일련의 SDP051 항체의 희석용액들로 Cad-11, Cad-8 및 Cad-18 항원을 대상으로 반복하였다(도 41b). 이러한 분석에서, SDP051은 Cad-11에 대해 6.8ng/ml의 EC50을, Cad-8에 대해서는 1421ng/ml의 EC50을 나타내, 200배 이상의 결합차를 나타냈다. Cad-18에 대한 EC50은 관찰된 결합 수준이 낮아서 확립하지 못하였다. 이러한 결과들로부터 SDP051이 Cad-11에 매우 특이적임을 확인할 수 있었다. Cad-11 EC1 도메인 서열을 이용한 BLAST 검색 결과는 가장 근접한 매치가 Cad-7, -8, -9, -11, -18, -20 및 -24 항원 사이에 있음을 나타내었다. Cad-11 EC1 도메인 내의 밝혀진 헥사펩티드 SDP051 결합 에피토프를 이용한 BLAST 검색 결과는 기타 공지의 인간 단백질은 이러한 서열을 보유하고 있지 않음을 나타냈다.

[0237] SDP051은 0.37nM의 평형 해리상수(KD)로 rhCad-11 단백질에 대해 나노몰 이하의 친화도를 나타냈다(표 4).

### 표 4

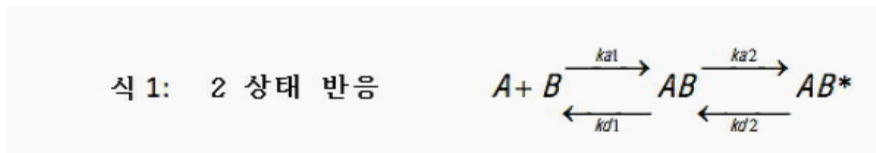
[0238] SDP051의 물리적 성질

mAb	SDP051
ka1 (1/Ms)	6.13x10 <sup>5</sup>
kd1 (1/s)	0.004301
ka2 (1/s)	0.01160
kd2 (1/s)	6.618 x10 <sup>-4</sup>

KD (M)	$3.787 \times 10^{-10}$
$\chi^2$	0.194

[0239] 칩 표면에 대한 특성 확인 및 제어 실험 결과는 단일 밀도로 고정시킨 rhCad-11은 항-Cad-11 항체 상호작용에 대한 동역학 값을 결정하는 데 적합하다는 점을 시사했다.

[0240] 동역학 분석을 위해, 항원이 항체에 결합할 때, 다른 시간 의존적 사건이 발생하고 있음을 나타낸 결합된 반응 제어 결과를 기초로 한 2 상태 반응 모델을 이용하였다(식 1, 도 42). rhCad-11은 동형이량체(homodimer)라서 두 개의 동일한 결합 에피토프를 함유하고 있으므로, 개별 mAb 분자들은 첫 번째 결합부위와 그 다음 두 개의 결합부위 모두를 통해 연속적으로 결합하게 된다.



[0241]

[0242] 세포 결합 분석에서, SDP051과 SDP071은 Cad-11을 발현하는 세포에 대해 용량 의존적인 결합을 나타냈고, Cad-11 음성의 양친 세포주에는 결합을 나타내지 않았다(도 43).

[0243] SDP051의 Cad-11에 대한 특이성을 결정하는 선택적인 방법은 Cad-11을 발현하는 세포에 대한 SDP051의 결합을 서로 다른 카르헤린이 차단하는 능력을 측정하는 것이다. 카르헤린-7, -8, -9, -18, -20, -24 또는 -MN 각각에 대해 이를 수행하였다. Cad-11 펩티드만이 SDP051이 Cad-11<sup>+</sup> 세포에 결합하는 것을 상당히 차단하였다. 분석결과는 도 44a 내지 도 44c에 나타내었다.

[0244] 실시예 15: 인간화 항-Cad-11 EC1 항체인 SDP051은 인간 세포를 이용한 분석에서 낮은 면역원성을 나타낸다.

[0245] 재료 및 방법

[0246] 항체의 정제

[0247] 항체를 발현하는 세포가 포화 상태로 자란 배양액 5L로부터 SDP051을 정제하였다. 상층액을 세포와 부스러기로부터 분리하고, pH 7.4로 조정하여, 멸균 여과하고, 이전에 0.5M NaOH로 살균한 5ml의 하이-트랩 Mab 셀렉트 슈어 단백질 A 친화도 컬럼(Hi-Trap Mab Select Sure protein A affinity columns, GE Healthcare, Amersham, UK)을 통해 유속 5ml/분으로 흘려주었다. 컬럼을 100ml PBS pH7.4로 세척하였다. 0.1M 시트르산나트륨 pH3.0으로 항체를 5ml 분획에 용출시키고, 각 분획은 즉시 0.25ml의 1M 트리스-HCl로 중화시켰다. 280nm에서 UV 흡수에 의해 각 분획의 단백질 함량을 모니터링 하였고, 단백질을 함유하는 분획을 모아, 10mM 아세트산나트륨 pH 5.5로 완충액 교환하고, 농축하였다. 항체를 16/60 세파크릴 S200 컬럼(GE Healthcare, Amersham, UK)을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 더 정제하였다. 주요한 피크 분획들을 수집하고 모아서 멸균 여과하고 Endosafe®-PTSTM(Charles River, Margate, UK)을 이용하여 내독소 수준을 시험하였다. 정제한 항체를 +4℃에 보관하였다. 최종 농도를 계산된 몰 흡광 계수를 이용한 UV 흡수로 결정하였으며, 이때 A280 1.0 = 1.51 mg/ml이었다. 그런 다음, 각 항체를 AIMV 배양 배지(Invitrogen, Paisley, UK)에 100μg/ml로 희석하였다.

[0248] 면역원성 분석

[0249] 국립수혈서비스(National Blood Transfusion Service, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK)로부터 얻은 건강한 공여자의 버피코트(24시간 내에 채취한 혈액의)로부터 PBMC를 분리하였다. Lymphoprep® (Axis-Shield, Dundee, UK)과 밀도 원심분리로 버피코트로부터 PBMC를 분리하고, CD8+ RosetteSep® (StemCell Technologies Inc., London, UK)을 이용하여 CD8+ T세포를 고갈시켰다. 바이오테스트 SSP-PCR 기반의 조직형 검사 키트(Biotest, Landsteinerstraße, Denmark)를 이용하여 HLA-DR 일배체형을 확인하고, '재현성' 대조군 항원(KLH: Pierce, Cramlington, UK)에 대한 T세포 반응을 결정하여 공여자의 특성을 확인하였다. 그런 다음, PMBC를 냉동



시켜 필요할 때까지 액체 질소에 저장하였다.

[0250] 각 공여자의 PBMC를 해동하여, 계수하고, 생존력을 평가하였다. 세포들을 실온의 AIMV 배양 배지(Invitrogen, Paisley, UK)에 소생시켜, AIMV에 재현탁시켜  $4-6 \times 10^6$  PBMC/ml이 되게 하였다. 각 공여자에 대해, 총 1ml의 증식 세포 원액을 24웰 플레이트에 첨가한 벌크 배양액을 확립하였다. 각각의 희석한 시험용 시료 총 1ml을 PBMC에 첨가하여, 시료당 최종 농도가  $50 \mu\text{g/ml}$ 가 되게 하였다. 각 공여자에 대해, 양성 대조군( $100 \mu\text{g/ml}$  KLH로 배양한 세포)과 음성 대조군(배양 배지만으로 배양한 세포) 또한 포함시켰다. 처음 4명의 공여자에 대해, 시험용 시료에 의한 T 세포 반응의 조절에 대해 시험하기 위하여 추가적인 대조군을 포함시켰는데, 시험용 시료와 KLH 모두를 PBMC에 첨가하였다. 이들 시료들을 KLH 단독과 비교하면, 시험용 시료가 증식에 미치는 영향을 평가하는데 이용할 수 있다.

[0251] 배양액을 5%  $\text{CO}_2$ 와 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 총 8일간 배양하였다. 5, 6, 7 및 8일차에 각 웰의 세포들을 살살 재현탁시키고,  $3 \times 100 \mu\text{l}$ 의 일정액을 둥근 바닥 96웰 플레이트의 개별 웰로 옮겼다. 배양액을  $10 \mu\text{l}$  AIMV 배양 배지 내의  $1 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-티미딘(Perkin Elmer® Waltham, Massachusetts, USA)을 규칙적으로 적용시키고, TomTec® Mach III 세포 수확기를 이용하여 여과 매트(Perkin Elmer® Waltham, Massachusetts, USA)상으로 채취하기 전에 추가로 18시간 동안 배양하였다. 각 웰에 대한 Cpm을 paralux, 낮은 백그라운드 계수 모드로 마이크로플레이트 베타 카운터상에서 Meltilex™(Perkin Elmer® Waltham, Massachusetts, USA) 신틸레이션 계수로 결정하였다.

[0252] 세포 증식 분석

[0253] 증식 분석을 위해, 2 이상의 SI(SI=2.0)라는 경험적인 임계수준을 이전에 확립하였으며, 그에 의해 이러한 임계수준 위의 증식 반응을 유도하는 시료는 양성으로 간주하였다(여기에 포함된, 경계선 SI =1.90를 강조하였다). 폭넓은 분석법 개발과 이전의 연구 결과, 이는 많은 수의 위양성 반응을 검출하지 않고 최대 민감도를 허용하는 좁은 임계수준에 대한 최소한의 신호임이 밝혀졌다. 증식 데이터 세트(n=3)에 대해서는, 양성 반응을 통계적 및 경험적인 임계수준으로 정의하였다:

[0254] 1. 비대응 2 시료 스튜던트 t-검정을 이용하여 중간 대조군 웰에 대한 시험 웰의 cpm을 비교한 반응의 유의성 ( $p < 0.05$ )

[0255] 2. 2 이상의 SI(SI=2.0).

[0256] 결과

[0257] 잠재적인 면역원성을 더 평가하기 위하여, 인간화 항-Cad-11 EC1 항체 SDP051을 대상으로 8일간의 분석에서 25명의 서로 다른 인간 T 세포 공여자로부터 CD8이 결핍된 PBMC(CD4 T 세포)의 증식을 유도하는 잠재력을 시험하였다. 양친 쥐 H1M1/SYN0012 항체의 마우스-인간 IgG4 Fc 키메라 버전인 키메라 SYN0014 항체는 공여자의 28%에서 증식을 유도하였지만, SDP051 항체는 어느 T 세포 공여자의 증식도 유도하지 않았다. 이러한 결과는 SDP051이 낮은 면역원성 프로필을 나타낸다는 초기의 인실리코(*in silico*) 결과를 뒷받침한다.

[0258] 대조군 키메라 SYN0014 항체와 인간화 SDP051 항체를 이용한 면역원성과 시간 경과에 따른 증식 분석 결과를 각각 도 45a와 도 45b에 나타내었다. 마우스-인간 키메라 SYN0014 항체는 25명의 공여자 중 7명(공여자의 28%)에서 반응을 촉진하였고, 공여자의 반응 중 하나는 경계선에 있었지만(공여자 16의 경우, 1.98) 여전히 백그라운드와는 유의하게 달랐다( $p < 0.05$ , 도 45a). 인간화 항체 SDP051은 공여자 중 어느 누구에게서도 어떠한 반응을 촉진하지 않아(25명 중 0명 또는 공여자의 0%) 잠재적인 면역원성이 낮음을 나타내었다.

[0259] **실시예 16: 인간화 항-Cad-11 EC1 항체인 SDP051은 윤활막 세포 침입과 MMP3 발현을 억제한다.**

[0260] 재료 및 방법

[0261] FLS 침입능 분석

[0262] 일차성의 인간 FLS 세포주를 90~100% 컨플루언스까지 FLS MM 배지(DMEM, 10% FCS, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민, 0.05% 젠타마이신, 1% HEPES)에서 배양하였다. 분석을 시작하기 전날, FLS를 혈청이 없는 FLS

배지에서 24시간 혈청기아 처리하였다. 분석 당일, 배지를 혈청기아 처리한 FLS로부터 제거하고, 세포를 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 플라스크로부터 제거한 다음, 칼슘을 함유한 HBS로 2회 세척하였다. 트립신으로 처리한 FLS를 MM 배지에  $4 \times 10^5$  개 세포/ml로 재현탁시켰다. 준비한 매트릭젤 코팅된 인서트를 FLS을 위한 화학유인물질로 작용하는 5% 우태아혈청(FCS)을 함유한 MM 배지가 들어있는 24웰 플레이트에 놓았다. 챔버의 다른 편에는,  $6 \mu\text{g/ml}$  또는  $0.6 \mu\text{g/ml}$ 의 SDP051(작용 농도의 두 배) 또는 대조군 AC1-P 항체  $6 \mu\text{g/ml}$ 을 함유하는  $50 \mu\text{l}$ 의 MM 배지를 넣고, 그런 다음 각 웰에  $4 \times 10^5$  개 세포/ml의 세포 현탁액  $50 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. FLS와 항체를 함유하는 챔버를  $37^\circ\text{C}$ 의 배양기에 18시간 배양하였다.

[0263] 24시간 후, 세포를 함유한 인서트를 100% 메탄올에서 30분간  $-20^\circ\text{C}$ 에서 고정시키고, 매트릭젤로 코팅된 막의 내부에 고정된 비 침입 FLS를 면봉을 이용하여 제거하였다. 막을 건조시킨 다음, 프로피듐 요오드(PI)로 실온의 암소에서 30분간 염색하였다. PI 염색을 제거하고, 인서트를 D-글루코스( $1 \text{mg/ml}$ )로 세척한 다음, 암소에서 건조시켰다. 막을 잘라내어 형광현미경을 이용하여 슬라이드 상에서 영상을 관찰하고, 막으로 이동한 FLS의 수를 정량하였다.

[0264] 결과

[0265] Cad-11은 FLS 생물학에 필요한 중요한 카드헤린이다. 그 결과, Cad-11 길항제는 인간 일차성 FLS가 매트릭젤을 분해하고, 매트릭젤 층으로 침입하여, 두 웰을 분리하는 능력을 억제할 것으로 기대된다. 매트릭젤은 다양한 세포 외 매트릭스 단백질로 구성되어 있다. FLS 생물학의 이러한 시험관 내 모델은 연골을 분해하고 연골에 구멍을 뚫는 능력을 포함하는 FLS 생물학의 측면들을 모사한다.

[0266] SDP051은 매트릭젤로의 FLS 침입을 유의미하게 억제하였다. SDP051 항체  $0.3 \mu\text{g/ml}$ 는 이소형 대조군 항체와 비교할 때, 일차성 인간 FLS의 매트릭젤 막으로의 침투를 50% 억제하기에 충분하였다(도 46).

[0267] FLS는 생체 내에서 연골의 분해와 시험관 내 침입능 분석에서 매트릭젤의 분해와 관련된 효소들 가운데 하나로 여겨지는 MMP3를 발현한다. 침입능 분석의 상층액을 세포 고정 전에 채취하여  $-80^\circ\text{C}$ 에서 냉동시켰다. 이러한 상층액을 해동하여, 배양 배지 내 MMP3의 존재 여부를 시험하였다. MMP3 수준은 FCS를 이용하여 이동하도록 자극시킨, 대조군 항체(AC1-P)를 처리한 FLS를 함유하는 웰에서 상당히 증가되었다(도 47). MMP3 수준은 FCS로 자극시킨, SDP051 처리된 FLS에서 유의미하게 감소되었다. 대조군 항체로 처리한 세포와 비교할 때, 수준이 약 50% 감소되었다.

[0268] **실시예 17: 인간화 항-Cad-11 EC1 항체 SDP051은 관절염 동물 모델에서 관절 염증을 억제한다.**

[0269] 관절염의 동물 모델에서 SDP051 항체를 시험하기 위하여, D. Mathis와 C. Benoist가 개발한 관절염의 K/BxN 혈청 전달 모델을 선택하였다(Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, *et al.* From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-61). 이 모델은 광범위한 윤활막염을 나타내며, 따라서 SDP051 항체의 항 염증 및 관절 보호 성질에 대해 우수한 시험이 되었다.

[0270] 6내지 8주령의 C57B1/6 마우스에 0일차와 2일차에  $75 \mu\text{l}$  KBN 혈청(Jackson Labs, Bar Harbor, ME)을 복강 내(IP) 주사하였다. 마우스는 -1일차, 0일차, 1일차, 2일차, 4일차 및 6일차에 SDP051 또는 대조군(AC1-P)  $10 \text{ mg/kg}$ 을 복강 내로 투여 받았다. 스프링 부하된 다이얼 캘리퍼(Mitutoyo 두께 게이지 모델 7308, Long Island Indicator Service, Hauppauge, NY)를 이용하여 연구 0일차, 2일차, 4일차, 6일차 및 10일차에 발목을 완전히 굽힌 자세로 유지시킨 각 마우스의 양쪽 뒷발목의 복사에서 관절 부종, 또는 발목 두께를 측정하였다. 0일차와 측정일의 관절 두께 사이의 차이를 결정하였다. 연구 과정에 걸친 발목 두께의 변화를 도 48에 그래프로 나타내었다. 발목 두께 점수의 차이는 6일차와 8일차, 10일차에서 두드러졌다. 10일차에서 SDP051군의 발목 부종은 대조군의 부종보다 47% 낮았다.

[0271] 10일차에 각 연구 마우스의 배뇨말기 혈액으로부터 혈청을 수집하였다. 혈청을 드라이아이스에서 냉동시켜  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. Cad-11 펩티드를 포획 시약으로 이용하여 ELISA에서 혈청을 시험한 다음, 항-인간 IgG로 SDP051을 검출하여, SDP051의 혈청 수준을 결정하였다. SDP051은 마우스의 혈청에서 쉽게 검출할 수 있었다(도 49).

[0272] 발목을 10일차에 채취하여, 조직병리를 평가하였다. 연골 침식, 뼈 침식 및 염증(세포 침윤물)의 중증도를 연구 군에 대해 맹검된 전문 기술자가 0~5의 점수로 평가하였다. 10일차의 조직병리 결과를 표 5에 요약하였다. SDP051를 처리한 동물은 연골 침식 점수에서 35% 감소를, 뼈 침식 점수에서 27% 감소를, 그리고 염증 점수에서 25% 감소를 나타냈다.

표 5

[0273] 10일차의 조직병리 결과 (KBN013)

항체	발목 조직병리 점수:연골 침식	발목 조직병리 점수:뼈 침식	발목 조직병리 점수:염증
AC1-P	3.1 ( $\pm 0.3$ )	3.7 ( $\pm 0.3$ )	4.4 ( $\pm 0.3$ )
SDP051	2.0 ( $\pm 0.4$ )*	2.7 ( $\pm 0.4$ )	3.3 ( $\pm 0.5$ )

[0274] \* =  $p < 0.05$ ;  $\pm$  = 평균의 표준오차

[0275] **실시예 18: KBN 관절염 모델에서 SDP051 용량 반응**

[0276] 0일차와 2일차에 마우스에 KBN 혈청을 투여하였다. 0일차와 2일차, 4일차, 6일차에 마우스에 10, 3, 또는 1mg/kg의 SDP051 또는 대조군 AC3-1-P를 복강 내 투여하였다. 발목 두께의 변화를 도 5에 나타내었다. 3 또는 10mg/kg의 SDP051를 처리한 마우스에서 발목 두께의 감소 경향이 보였다. 10mg/kg군에서의 발목 부종의 감소는 6일차와 8일차, 10일차에 유의했다. 10일차에 이 군의 발목 부종은 대조군의 부종보다 44% 낮았다. 일련의 연구에 걸쳐, 10mg/kg의 SDP051은 유의하게 발목 부종을 감소시켰다. 3mg/kg에서는 발목 부종 감소 경향이 있었다.

[0277] **실시예 19. SDP051은 류마티스 관절염 병리에 연루된 사이토카인을 감소시킨다.**

[0278] 0일, 1일, 2일, 4일 및 6일차에 10mg/kg의 SDP051 또는 AC3-1-P 대조군 항체를 마우스의 꼬리 정맥으로 정맥 내 투여하였다. 6일차에는 SDP051군은 대조군보다 33% 낮은 발목 관절 부종을 나타냈다(표 6). 다음과 같이 이들 마우스로부터 7일차에 채취한 발목을 대상으로 사이토카인 분석을 하였다. 발목 관절을 채취하여, 피부와 털을 제거하고, 관절을 액체 질소에 즉시 얼렸다. 그런 다음, 관절을 균질화 완충액(2mM PMSF(Sigma part# P7626)와 1X 프로테아제 억제제 콕테일(Sigma part #P8340), 0.1M 인도메타신을 포함한 Affymetrix 조직 균질화 완충액(part# PC6002))에 용해시켜 원심분리하고, 그 결과로 얻어진 상층액을 대상으로 복합분석법(OceanRidge Biosciences)에서 다양한 사이토카인과 케모카인의 수준을 분석하였다.

[0279] SDP051 처리군은 뼈 파괴세포 분화인자인 가용성 RANKL(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand; sRANKL), 뼈 파괴세포/림프구 케모카인인 대식세포 염증성 단백질-1(Macrophage Inflammatory Protein-1, MIP1 $\alpha$ ), 단핵구 케모카인인 단핵구 화학주성 단백질-1(Monocyte Chemotactic Protein-1, MCP1), 과립성 백혈구-대식세포 콜로니 자극인자(Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF) 및 백혈구 케모카인인 RNATES(Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)의 수준의 29% 내지 51% 감소를 나타냈다(표 6). IL-6 또는 TNF $\alpha$ 의 수준에는 영향이 거의 없거나 없었다. 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)에서는 약간의 증가를 나타냈으나, IL-23은 시험군에서 검출할 수 없었다.

[0280] 제안된 SDP051의 작용 기전은 항체가 마우스 관절의 섬유모세포 유사 윤활막세포의 Cad-11에 결합하여, 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인과 케모카인의 발현을 감소시킨다는 것이다. 사실, SDP051 처리군에서는 류마티스 관절염 환자의 관절에서 MCP-1, RANTES 및 MIP1 $\alpha$  포함한, FLS 생물학에 관련이 있다고 제안되는 몇몇 백혈구 케모카인의 감소가 있었다(Garcia-Vicuna R, Gomez-Gaviro M, Dominguez-Luis M, Pec M, Gonzalez-Alvaro M, Alvaro-Gracia M and Diaz-Gonzalez F, 2004 Arth & Rheum, 50, pp3866-3877)(표 6). 또한, sRANKL은 뼈모세포 발달의 중요한 매개자이며, RANKL 발현은 다양한 염증성 사이토카인에 의해 FLS 상에 유도된다(Hashizume M, Hayakawa N and Mihara M, 2008, Rheumatology 47 pp.1635-1640). SDP051을 처리한 마우스는 관절에서 sRANKL 수준의 감소를 나타냈다(표 6). 이러한 효과들은 근소하긴 하지만, 이러한 변화들의 국소 영역에 미치는 영향은 증폭될 수 있다.

표 6



[0281] KBN018 연구에서 7일차의 사이토카인 수준

시험군	발목두께변화 (1/100mm)	GM-CSF	IL-23	IL-6	MCP-1	MIP1 알파	RANTES	sRANKL	TNF 알 파	VEGF
AC3-1-P	39.29 ( $\pm 8.3$ )	4.9	0.0	26.1	188.0	99.5	20.5	327.7	2.2	17.3
SDP051	26.07 ( $\pm 8.6$ )	3.4	0.0	24.0	126.9	58.5	14.5	154.0	2.2	20.1
미처리	해당 없음	2.3	5.4	1.7	21.8	10.7	11.1	17.2	0.1	15.5

[0282] 본원에 인용한 모든 특허와 공개된 출원 및 참고문헌의 관련된 교시내용은 전체로서 참조로 포함된다.

[0283] 본 발명은 그의 실시예를 참조로 하여 특별히 나타내고 설명하였지만, 형태와 세부 사항들의 다양한 변경이 첨부된 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고서도 이루어질 수 있음을 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 이해할 것이다.

## 수탁번호

기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : ATCCPTA-9699

수탁일자 : 20090108

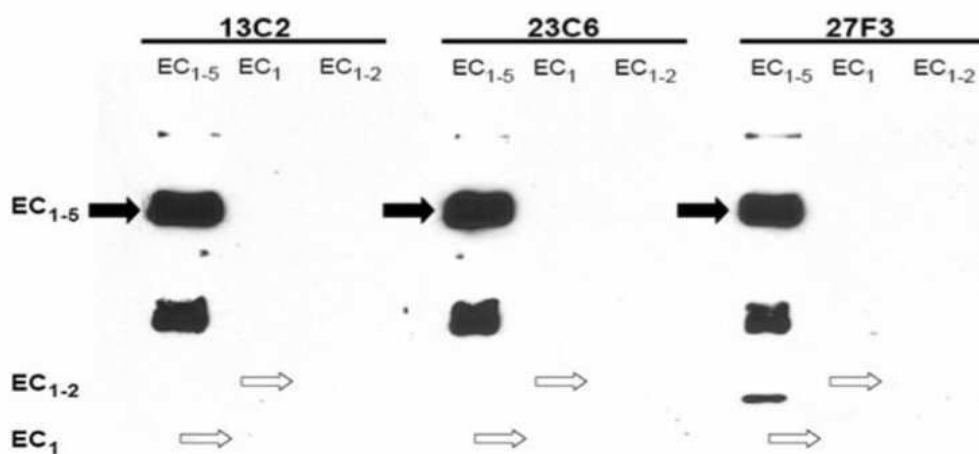
기탁기관명 : American Type Culture Collection

수탁번호 : ATCCPTA-9701

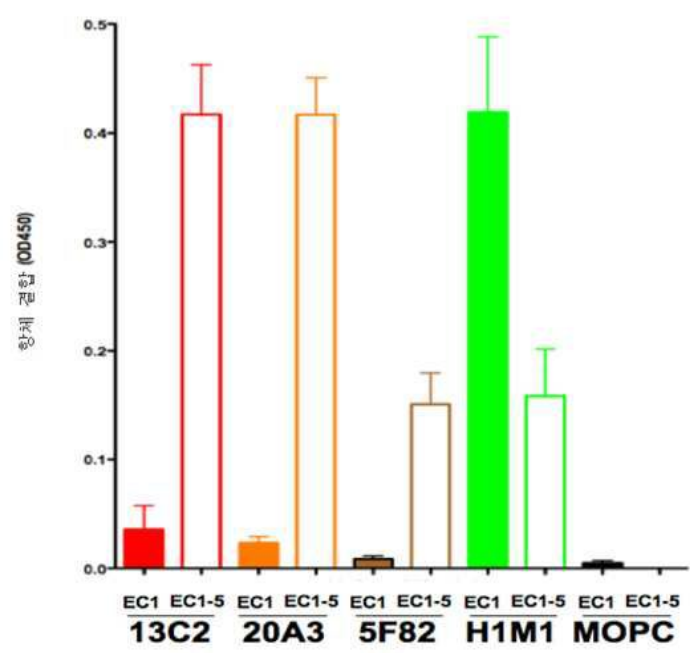
수탁일자 : 20090109

## 도면

### 도면1a



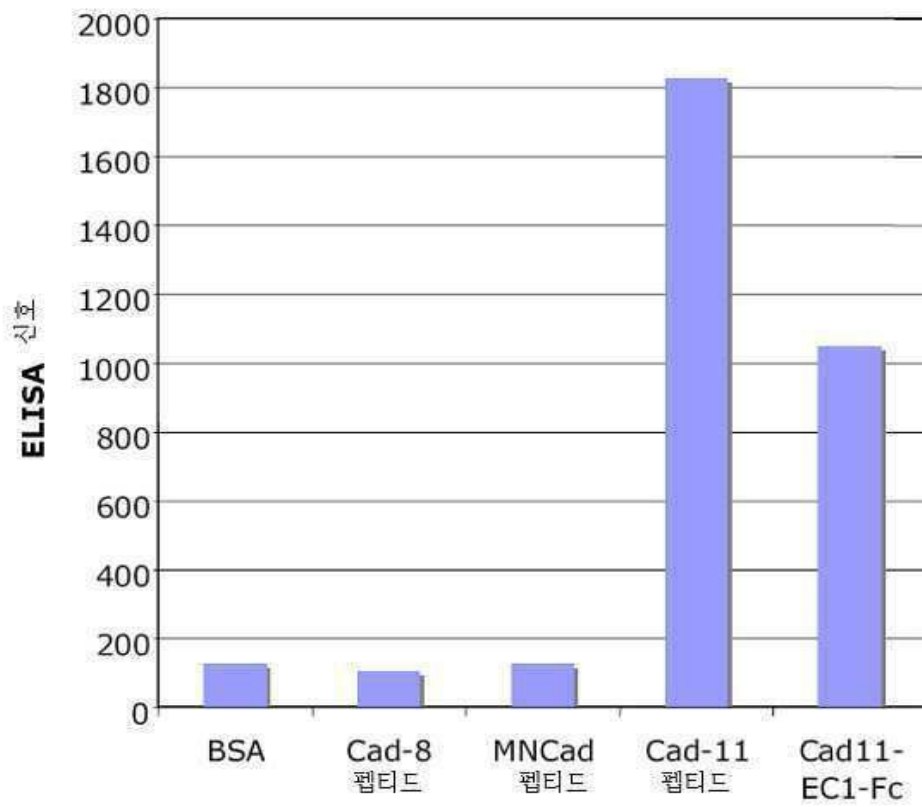
도면1b



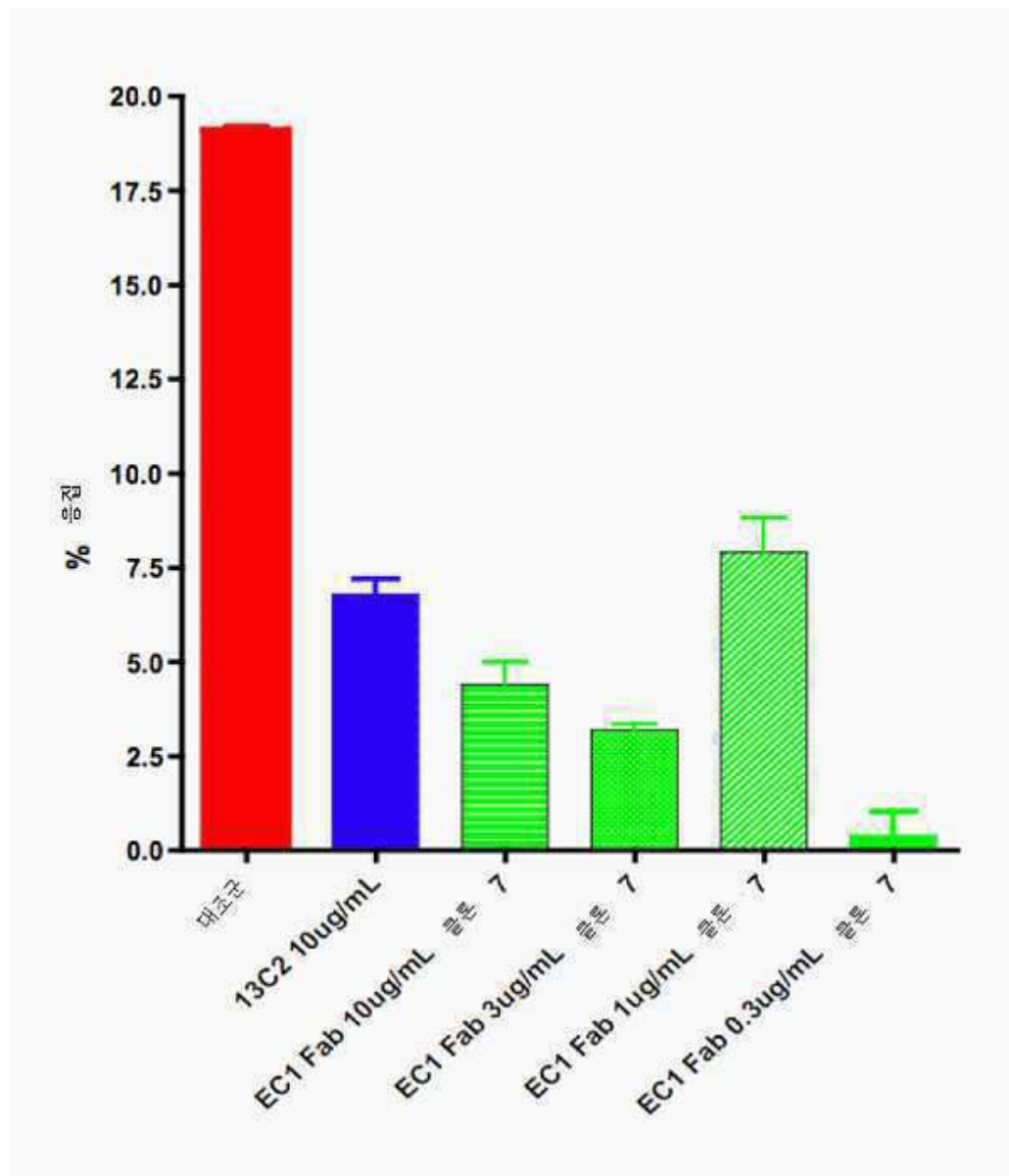
도면2

인간 Cad-11	GWVWN QFFV	EEYTG PDPVL VGRLH SDIDS GDGN	(SEQ ID NO:3)
인간 Cad-8	GWVWN QMFVL	EEFSG PEPIL VGRLH TDLDP GSKK	(SEQ ID NO:4)
인간 MN-Cad	SWVWN QFFVL	EEYTG TDPLY VGKLH SDMDR GDGS	(SEQ ID NO:5)

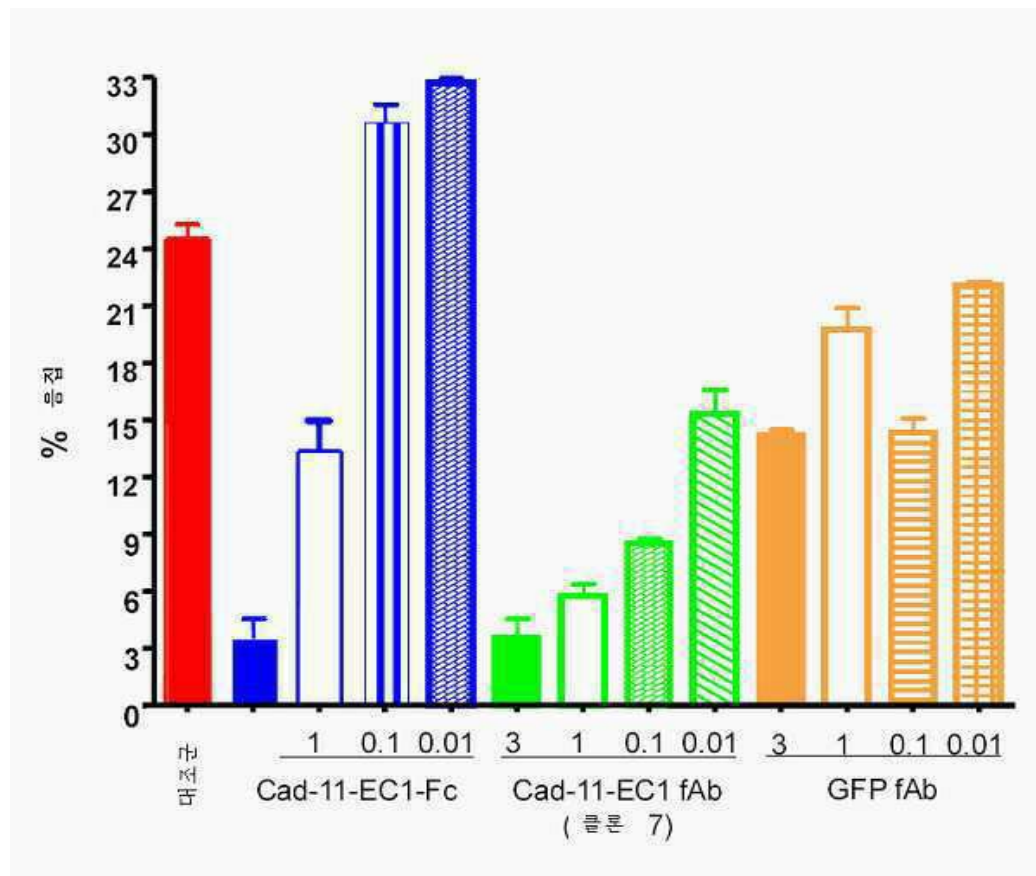
도면3



도면4

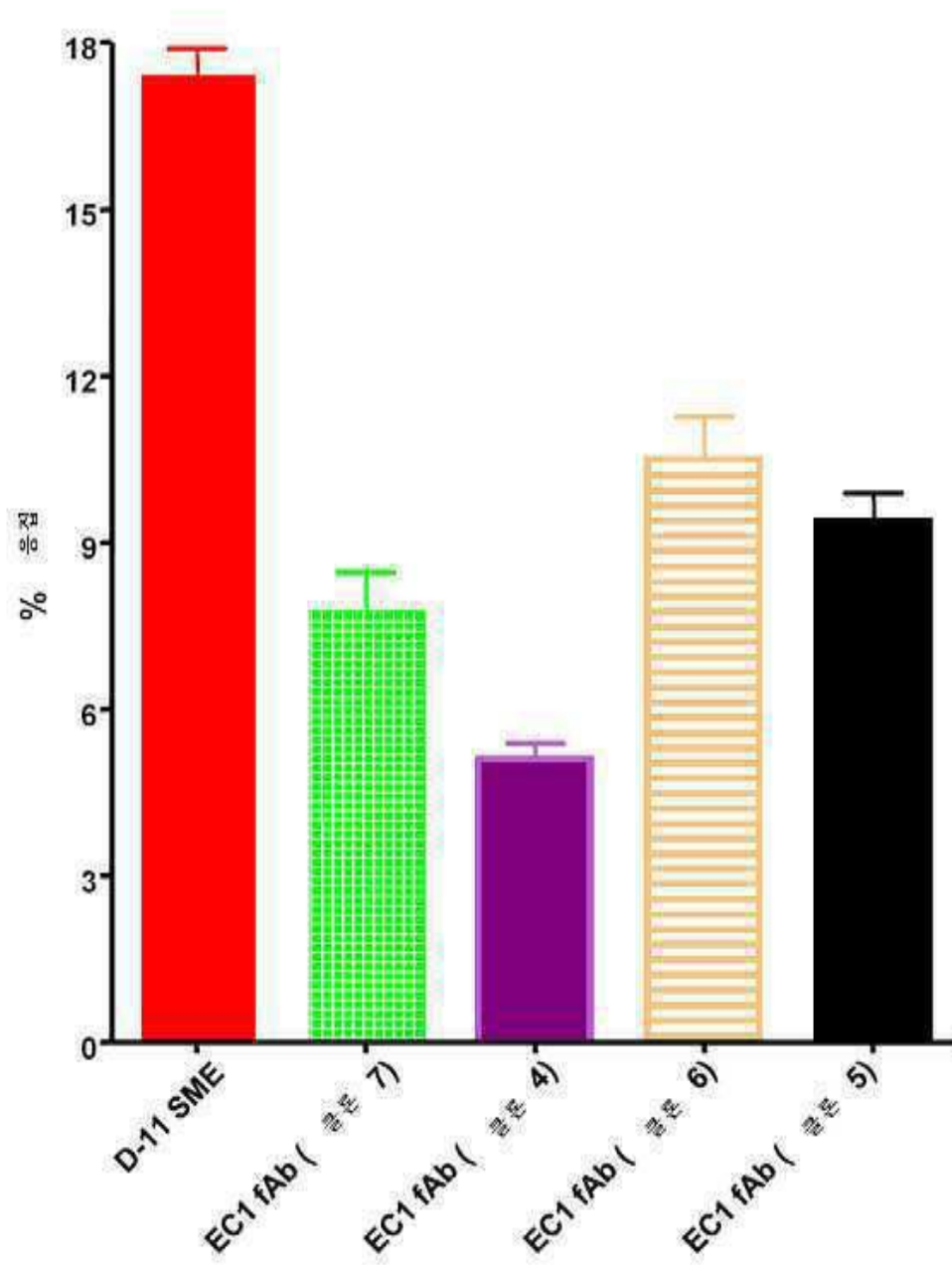


도면5

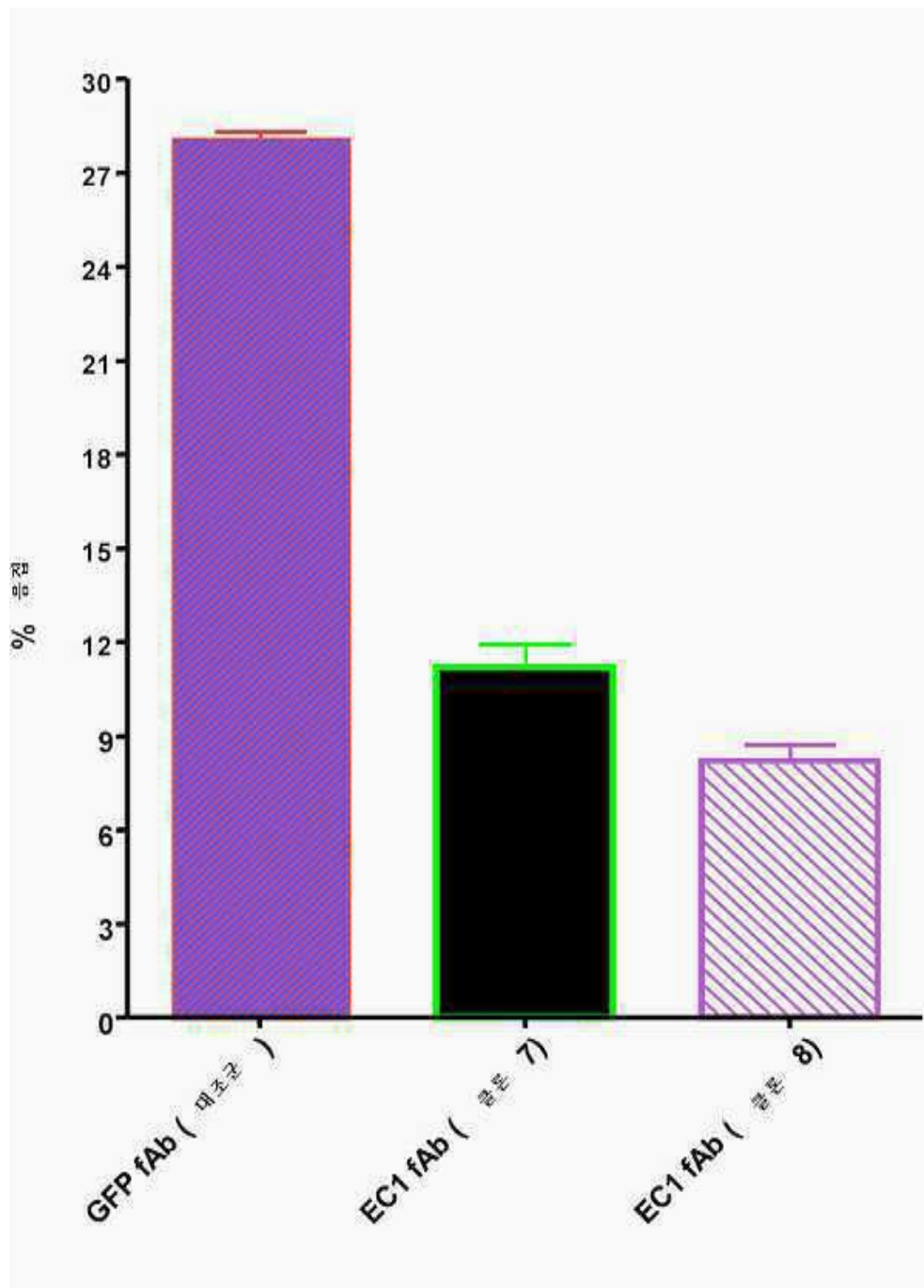




도면6



도면7



도면8

```

ATGAAGGAGAACTACTGTTTACAAGCCGCCCTGGTGTGCCTGGGCATGCTGTGCCACAGCCATGCCTTTGC
CCCAGAGCGGCGGGGGGCACCTGCGGCCCTCCTTCATGGGCACCATGAGAAGGGCAAGGAGGGGCGAGGT
GCTACAGCGCTCCAAGCGTGGCTGGGTCTGGAACCAAGTTCTTCGTGATAGAGGAGTACACCGGGCCTGAC
CCCGTGCTTGTGGGCAGGCTTCATTCAGATATTGACTCTGGTGATGGGAACATTAAATACATTCTCTCAGGGG
AAGGAGCTGGAACCATTTTTGTGATTGATGACAAATCAGGGAACATTGATGCCACCAAGACGTTGGATCGAG
AAGAGAGAGCCCAAGTACACGTTGATGGCTCAGGCGGTGGACAGGGACACCAATCGGCCACTGGAGCCACC
GTGCGAATTCATTGTCAAGGTCCAGAGATCTGTGGAGTGCCACCTTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGA
CCTTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTGATGATCTCCAGAACCCCTGAGGTCACGT
GCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCC
AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCGAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACCTCCCATGCT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCTGTCT
CCGGGTAAATGAGTGCCACGGCTAGCTGG (SEQ ID NO:6)

```

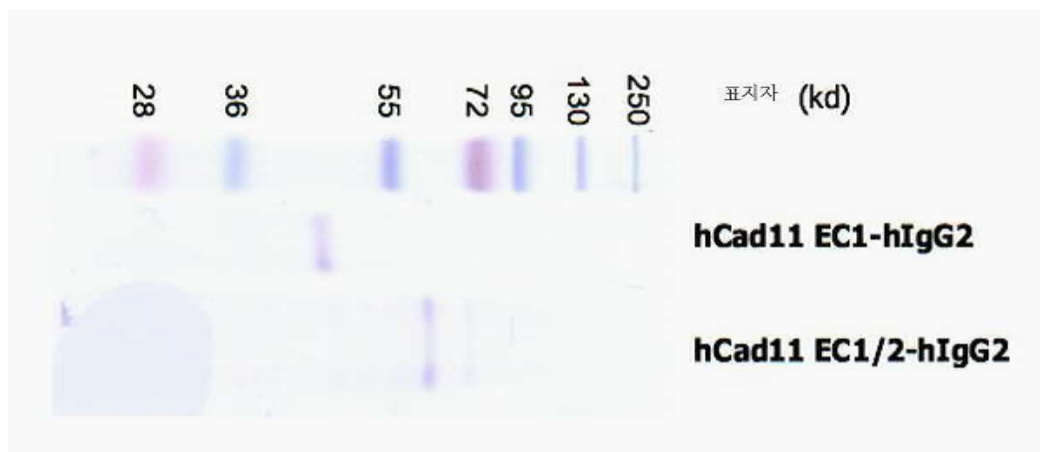
도면9

```

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGKEGQVLQRSKR
GWVWNQFFVIEEYTGPDPLVGLRLHSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFVIDDKSGNI
HATKTLTREERAQYTLMAQAVDRDNRPLEPPSEFIVKVQ
RSVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPPGKVPRLA (SEQ ID NO:7)

```

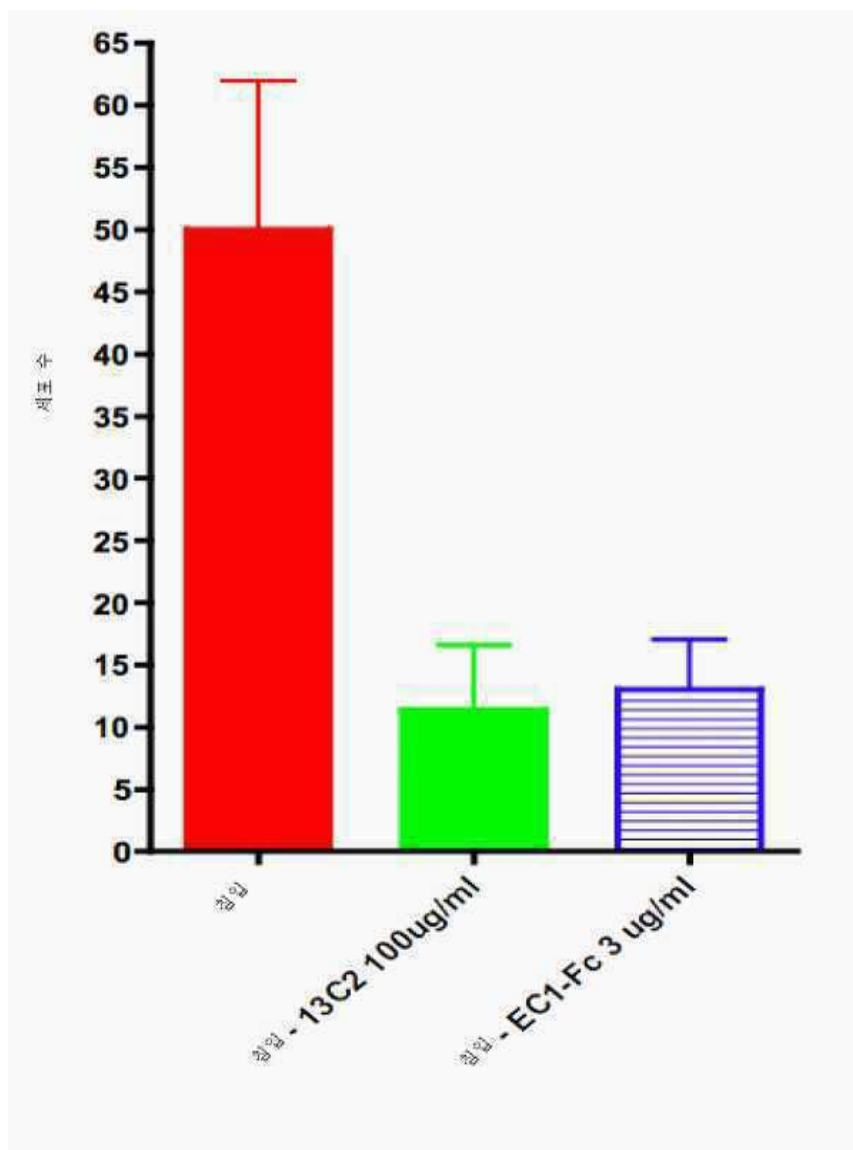
도면10



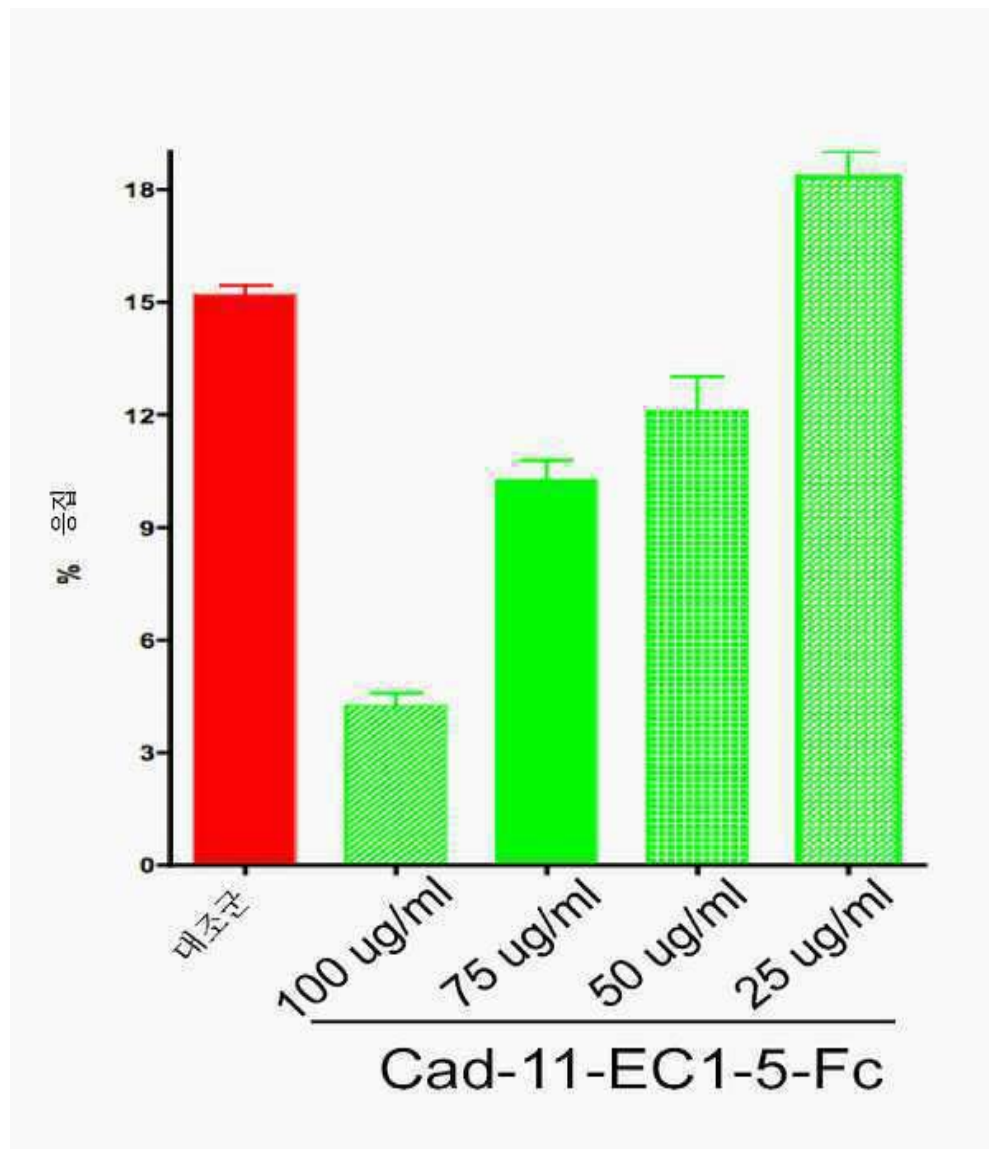
도면11



도면12

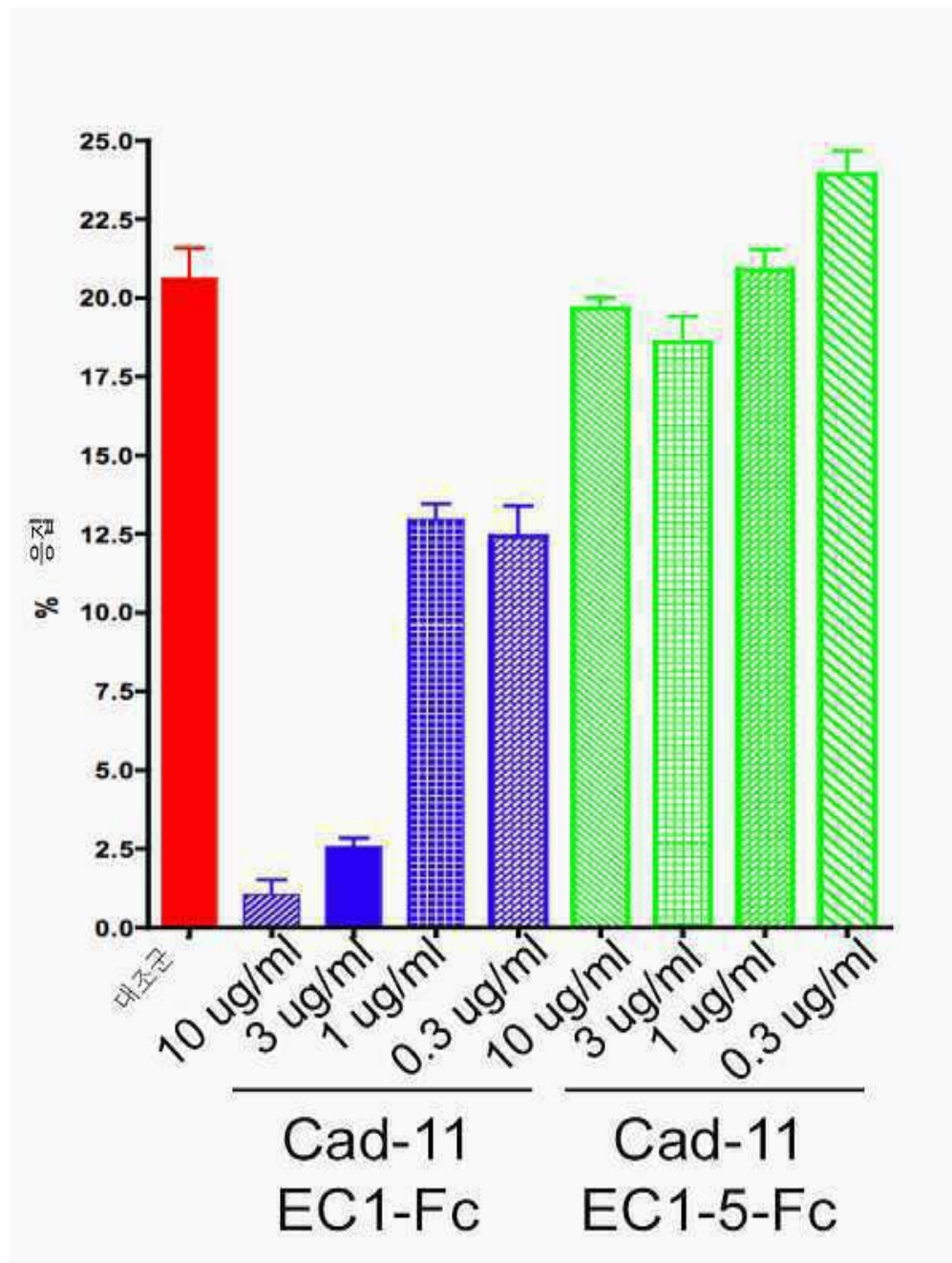


도면13a





도면13b



도면14a

```

1  agatgcgcgcg ggggcgcgc cgcgcgcgcg ctgacttggtg aatgggacgcg ggactggggc
61  cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggaatg ggcgcgcgga ggttgcgtec
121 accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc
181 gtgttgatcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc
241 aaglatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag
301 etcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac
361 cctcagcaag accacgcgac agttgggtga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta
421 ccacgtaac aaaaatgaag gagaactact gttacaagc cgcctgggtg tgcctgggca
481 tgcgtgacca cagccatgcc ttgccccag agcggcgggg gcacctgcgg cctccttcc
541 atgggaccca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg
601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggac tgacccctg cttgtgggca
661 ggttcatttc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaa
721 gagctggaac catttttctg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagcgt
781 tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcgggtggc agggacacca
841 atcgcccaat ggagccacgc tcggaattca ttgtcaaggc ccaggacatt aatgacaacc
901 ctcggaggtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagagggtc aatgtgggaa
961 cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca
1021 agttagtgtg cagtatcttc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta
1081 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cactgtgtga
1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg cgggactctc agggacaacc aaagtgaaga
1201 tcacactgac cgtgtcaat gacaacccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt
1261 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaagct aaagatccag
1321 acattggaga aaatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggg atggaatcgt
1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg aggggggtgt aaagctgaaa aaacctgtag
1441 attttgaaac caaagagacc tatagcttga aggtagaggc agccaaacgtg cacatcgacc
1501 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag
1561 atgctgatga gccccctatg ttcttgcccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg
1621 cagctgctgg caccgtgggt gggagagtgc atgccaaga cctgatgct gccaacagcc

```

도면14b

```

1681 cgataaggtta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag attttttact attaatccag
1741 aggatgggttt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaancagcc tggctcaaca
1801 tcaactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcacagga agccaaagtc ccagtggcca
1861 ttagggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgcctcttat gaagggttca
1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgtttaca attagtgcag
1981 atgacaagga tgacacggcc aatggacca gatttatctt cagcctaccc cctgaaatca
2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcagcc gtgtacgccc
2101 ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgccata gtgtacagcg
2161 atggcgccat cccgccatg agtagracca acaccctcac catcaaaagtc tgcgggtgcg
2221 acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga
2281 gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgctt gcacgtcatc tctcctggtc attgtagtat
2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg
2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aaggggttgg ggaagaagac acagaagcct
2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatccc cgcacaagaca
2521 tcaaacctga gtatcagtae atgcctagac ctgggtcccg gccagcgccc aacagcgtag
2581 atgtcgatga cttcacaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggtcctc
2641 cttatgactc cattcaaatc tacgggtatg aaggcagggg ctcagtgccc gggctcctga
2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg
2761 gacctcgltt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt
2821 cttacaataa acgatacaaa ttgggcctta agaactgtgt ctggcggtct caagaatcta
2881 gaagatgtgt aaacaggatc ttttttaaat caaggaaagg ctcattttaa acaggcaag
2941 tttttacagag aggalacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga
3001 aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa
3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg
3121 aagggaattt gtttatgtgt tatgaacatc caagtcttcc tttttttta agttgtcaaa
3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttccg cttaaactct
3241 ggacactcta tatgtagtgc attttttaac ttgaaatata taatattcag ccagctttaa
3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgtaa
3361 ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgcagat

```

도면14c

```

3421 ataactgtct tgttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt
3481 tgtacaattt taaagttctt atttttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa
3541 gaaaaatgta cggcatcaca ctttatattt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag
3601 cttcaatata agaagcaatc ttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa (SEQ ID
NO:1)

```

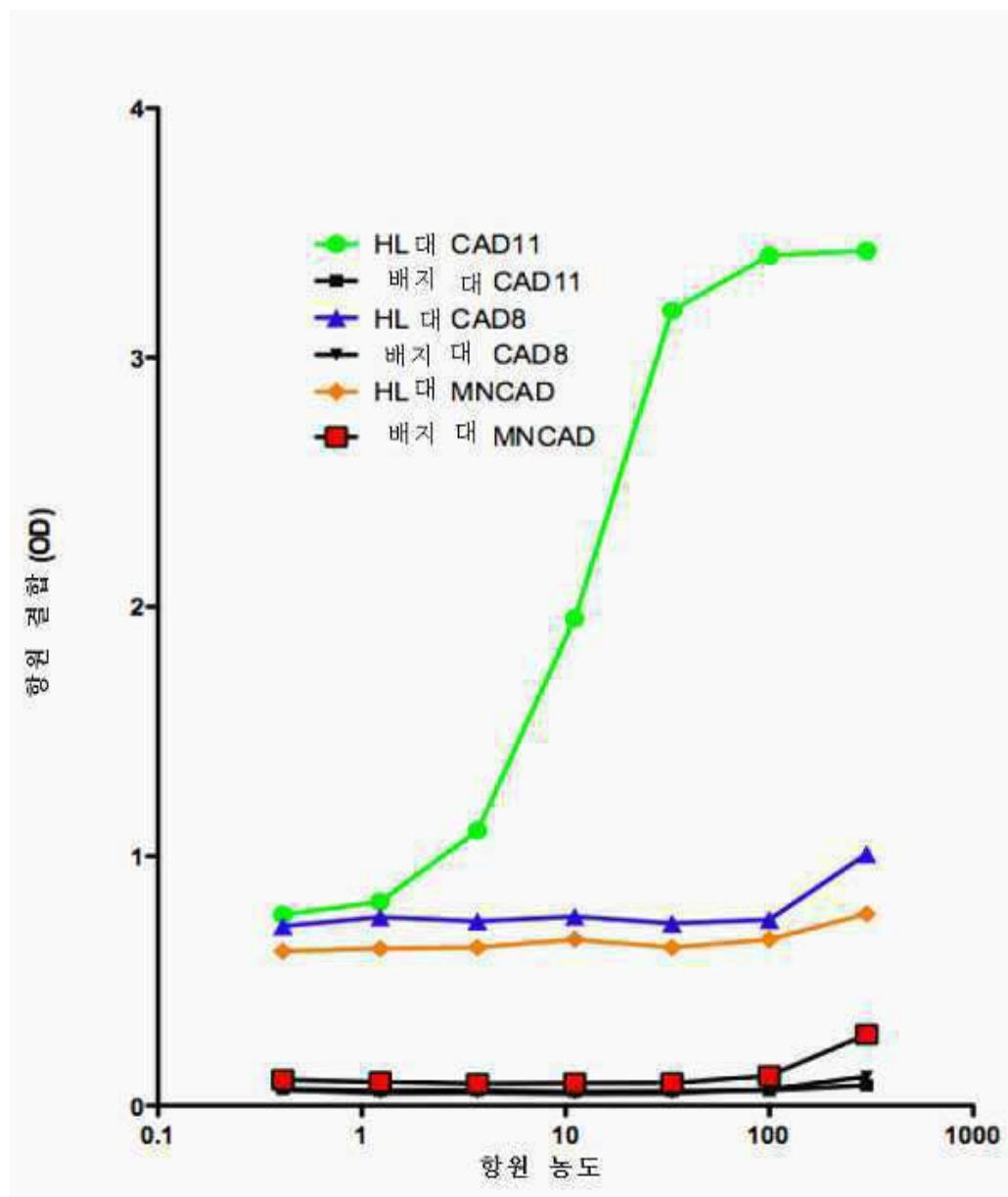
도면15

```

1  mkenyclqaa lvelgmichs hafaperrgh lrpsfghhe kgkeggvlqr skrgwvwnqf
61  fvieeytgpd pvlvgrlhad idsgdgniky ilsegegagti fviddkegni hatktldree
121  raqytlmaga vdrdtmrple ppsefiykvq dindnppefl hetuhanvpe rsnvgtsviq
181  vtsadaddpt ygnsaklvys ileggpyfsv eaqtgiirta lpmndreake eyhvviqakd
241  mgghmgglsg ttkvtitltd vndnppkfpq svyqmsvsea avpgeevgrv kakdpdigen
301  glvtynivdg dgmesfeitt dyetqegvik lkkpvdftk rayslkveaa nvhidpkfis
361  ngpfkdtvtv kisvedadep pmflapsyih evgenaaagt vvgrvhakdp daanspirys
421  idrhtdlrdr ftinpedgfi kttkpldree tawlnitvfa aeihnrhgea kvpvairvld
481  vndnapkfaa pyegficesd gtkplangpi vtisaddkdd tangprfifs lppeiinhpn
541  ftvrdrndnt agvyarrggf srqkqdlyll pivisdggip pmsstntlti kvcgcdvnga
601  llscnaeayi lnaglstgal iailacivil lvivvlftl rrqkkepliv feedvreni
661  ityddegge eateaafiat lqnpdgingf iprkdikpey qymprpglrp apnsvdvddf
721  intriqeadn dptappydsi qiygyegrgs vagslssles attdslddyd ylgmwgprfk
781  kladlygskd tfddds (SEQ ID NO: 2)

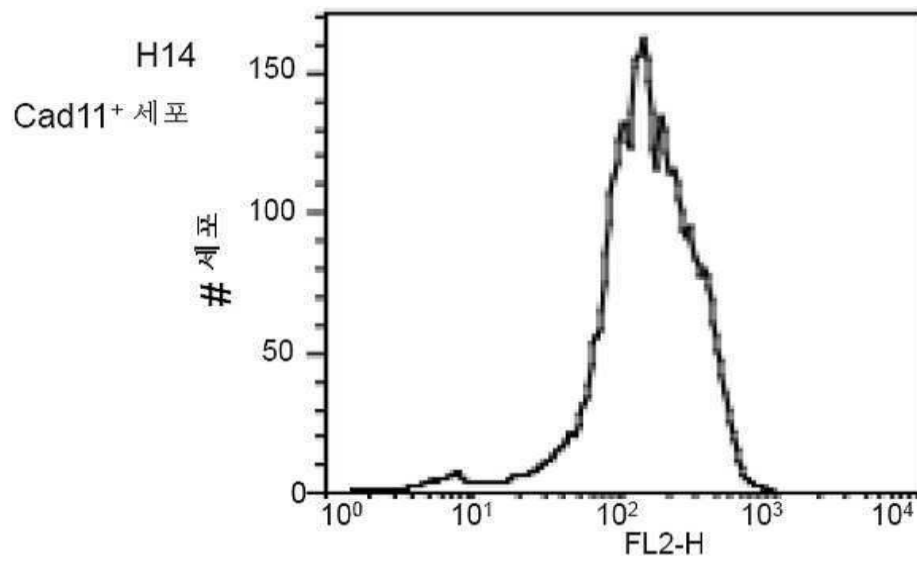
```

도면16

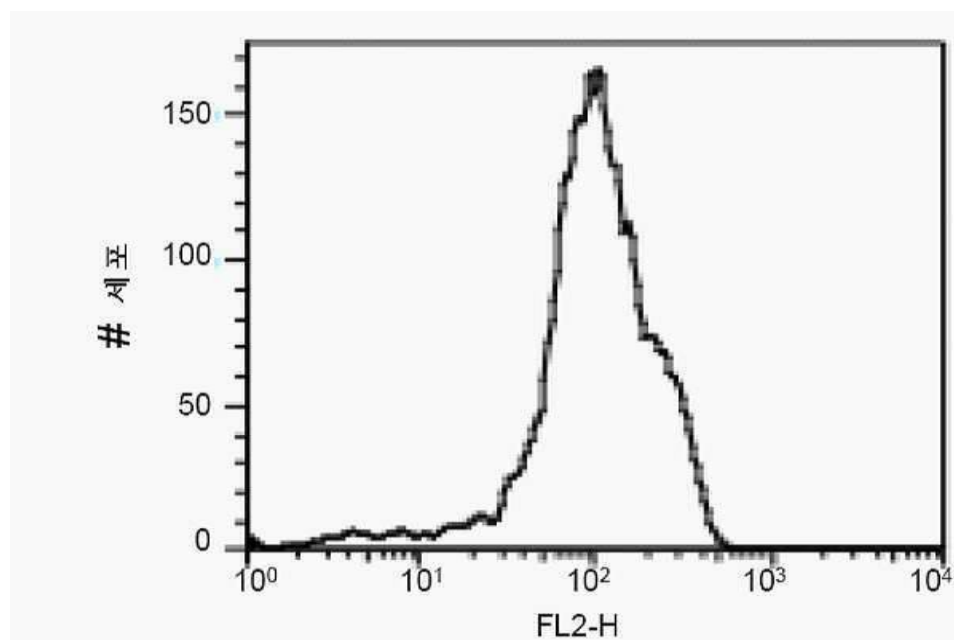




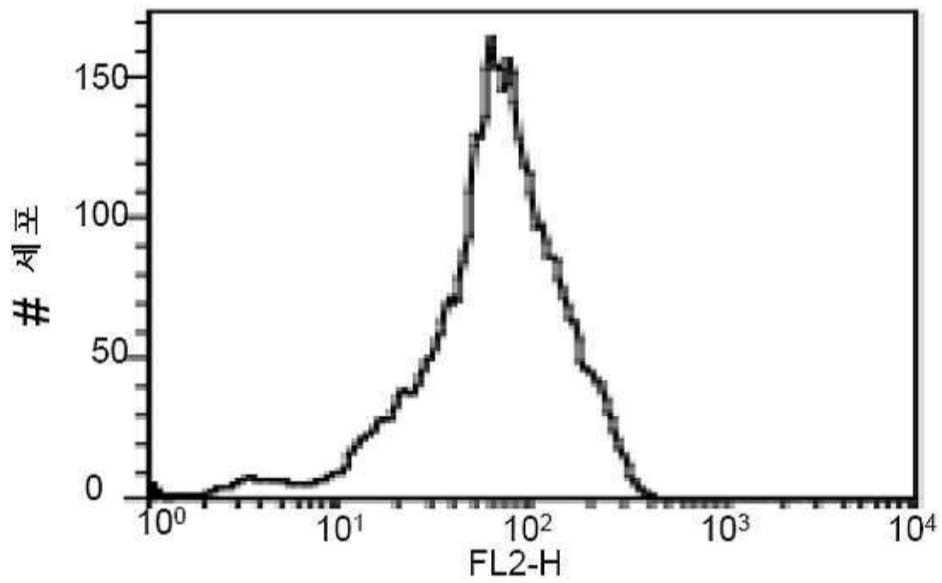
도면17a



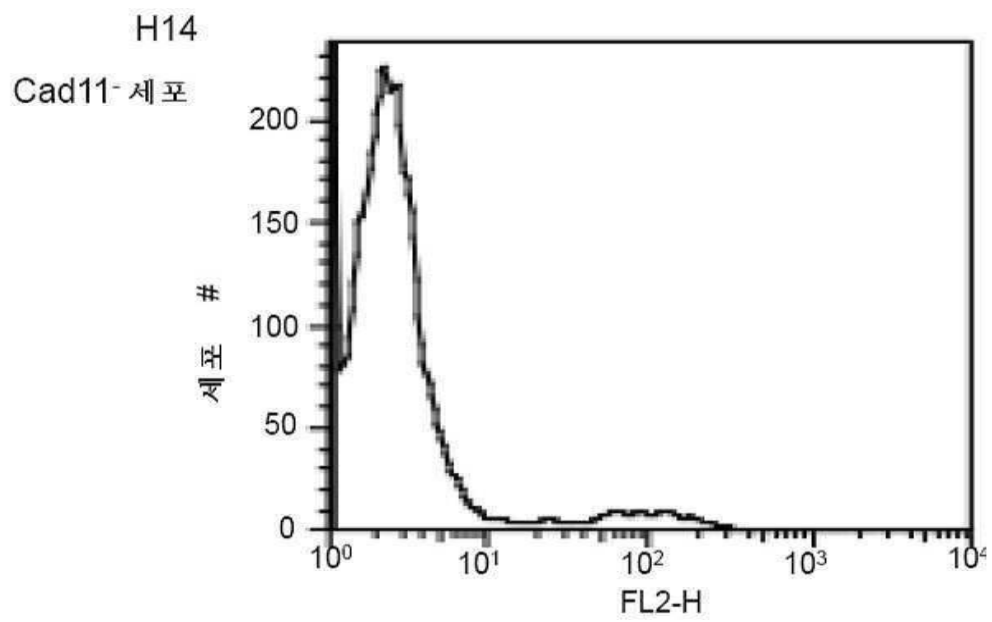
도면17b



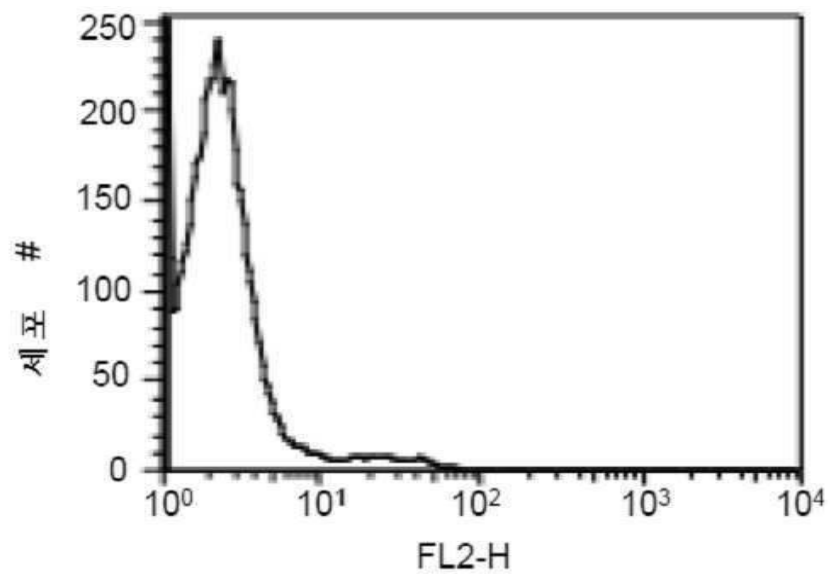
도면17c



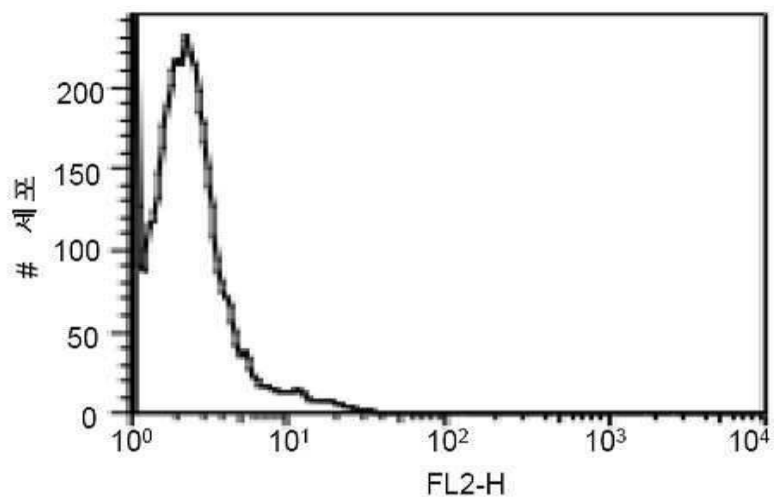
도면17d



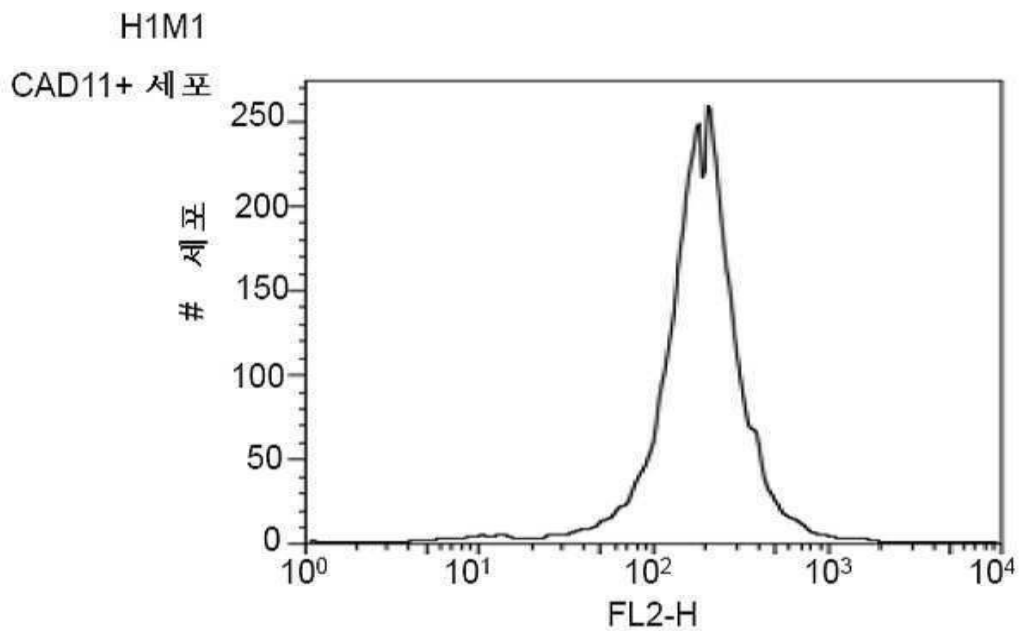
도면17e



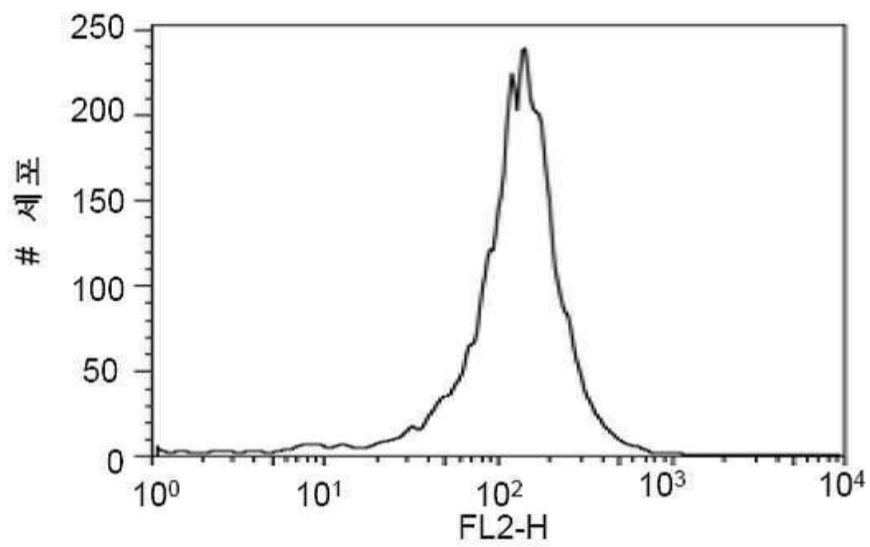
도면17f



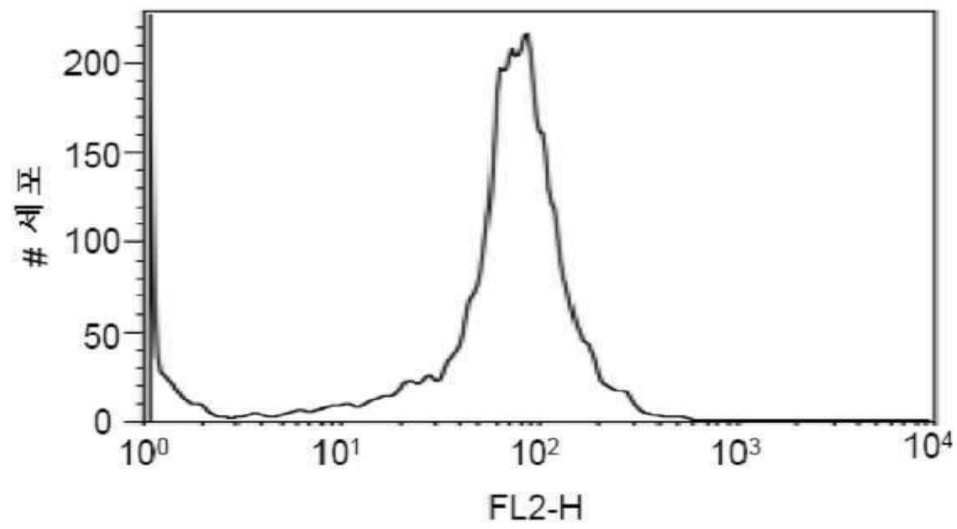
도면17g



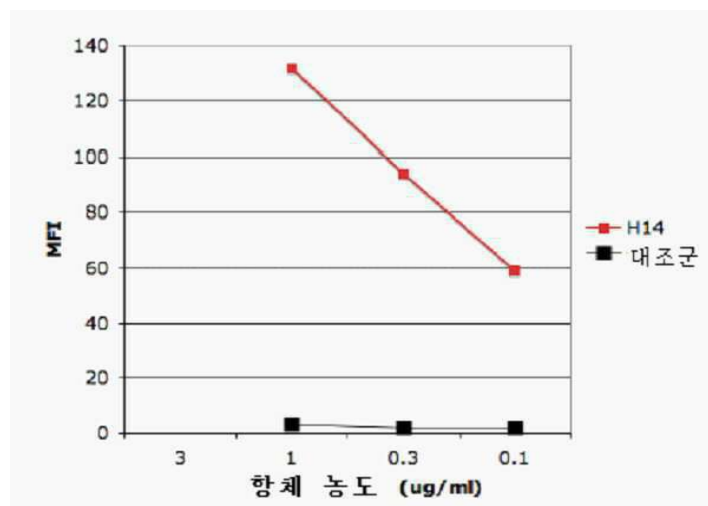
도면17h



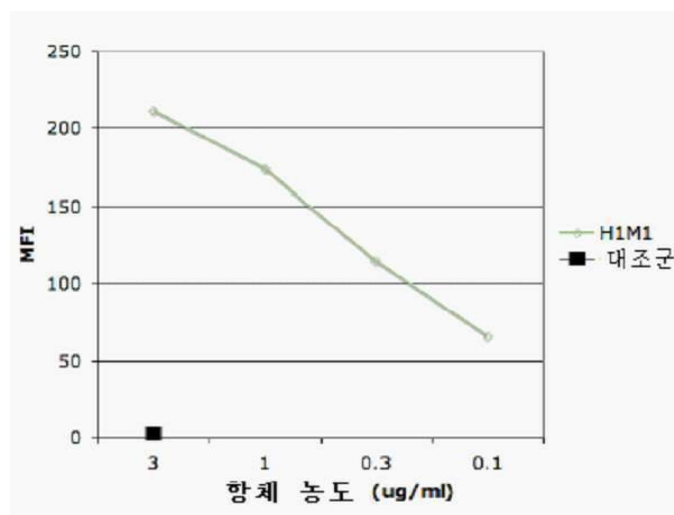
도면17i



도면18a

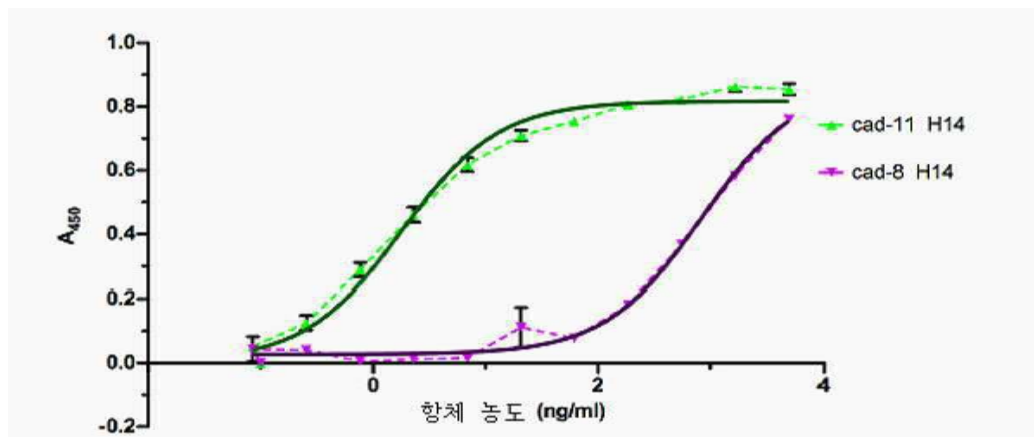


도면18b

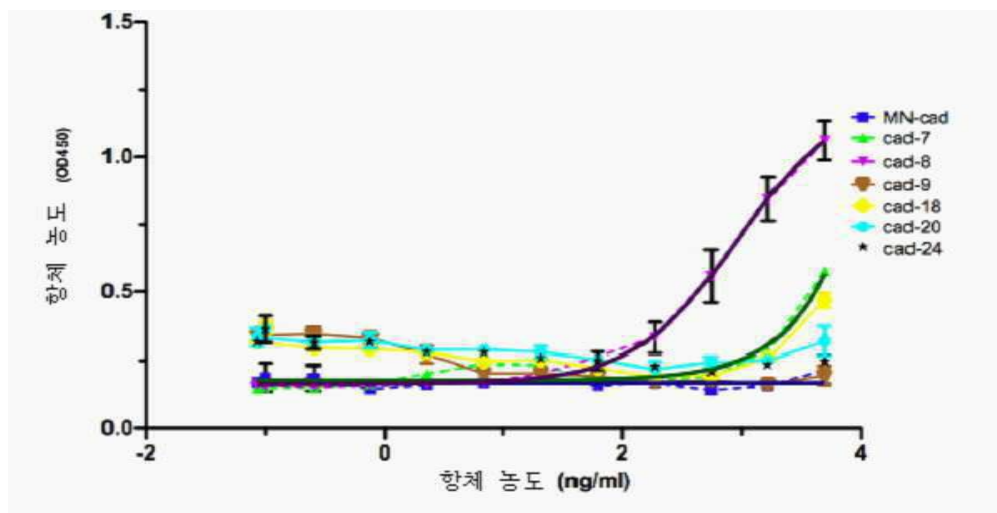




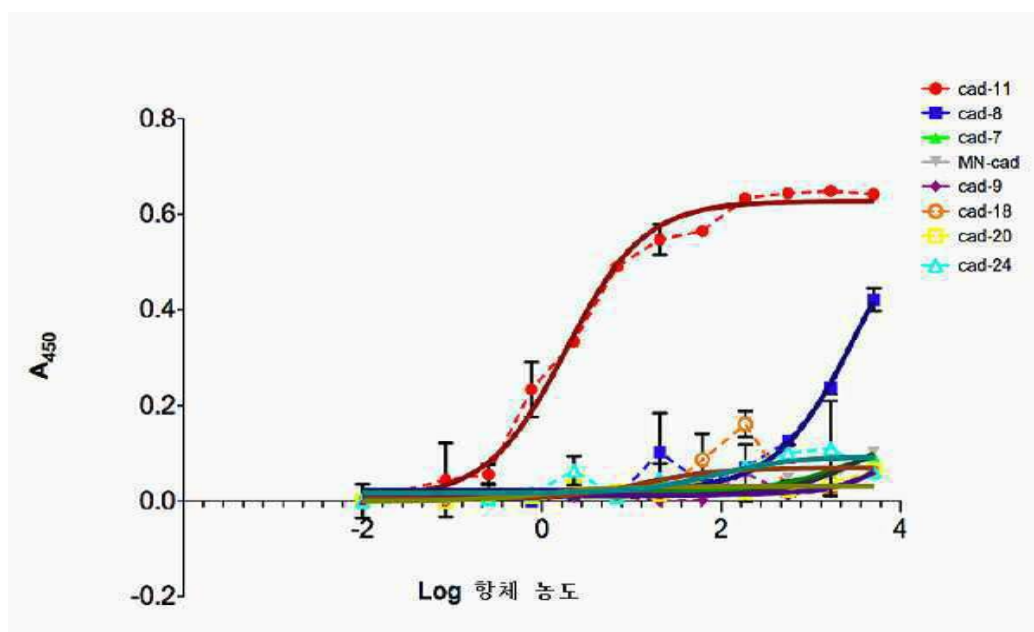
도면19a



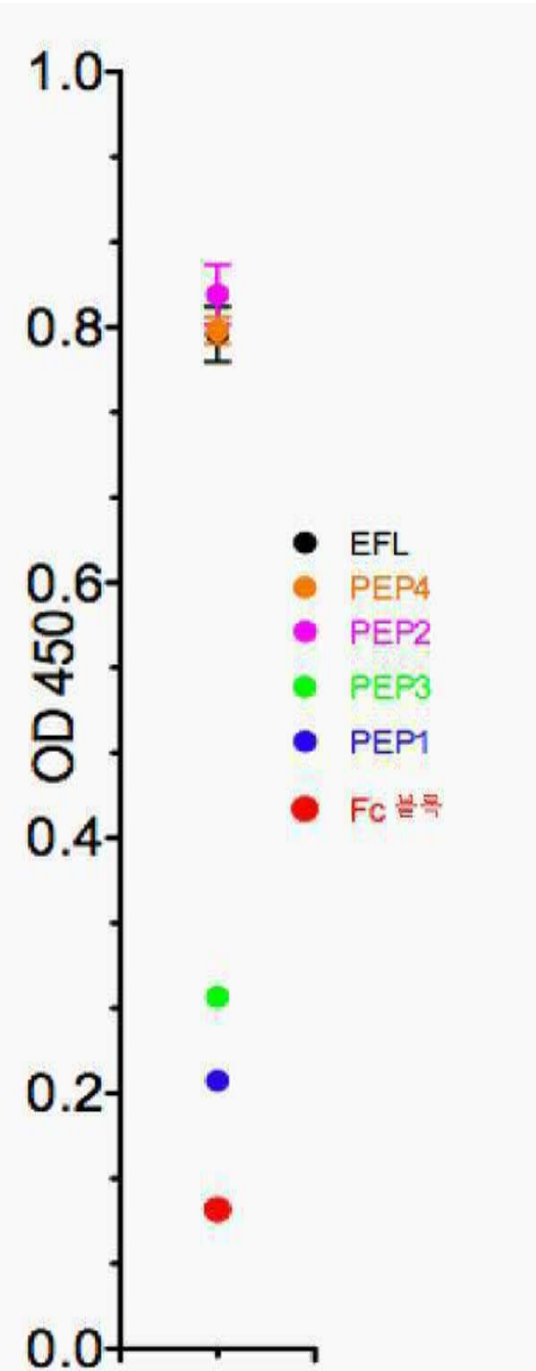
도면19b



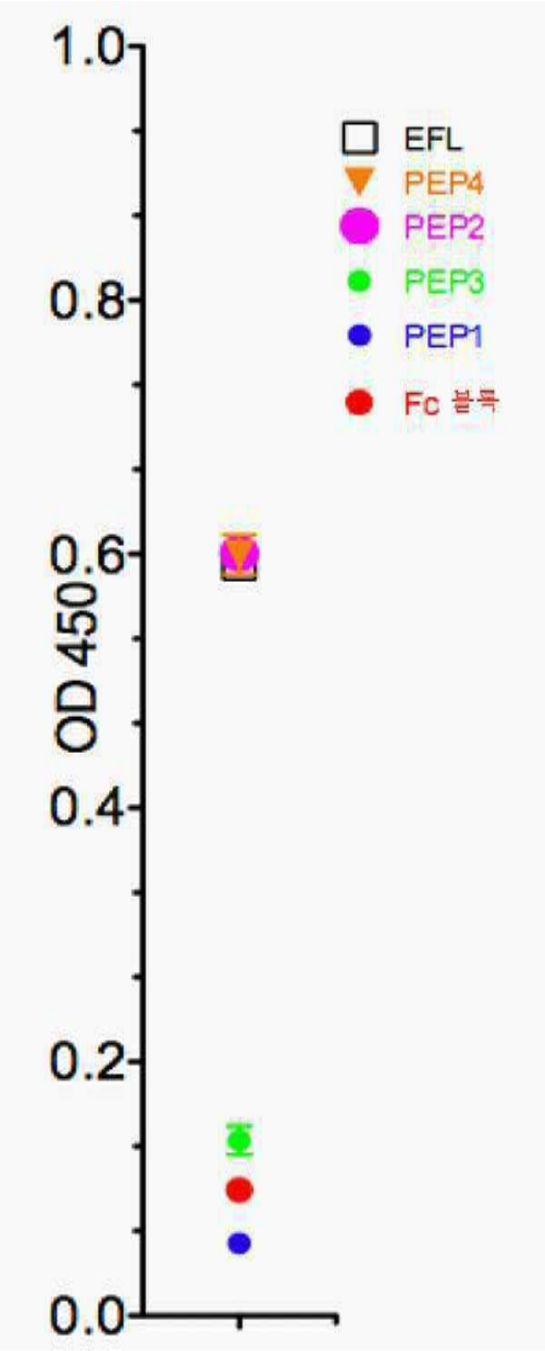
도면20



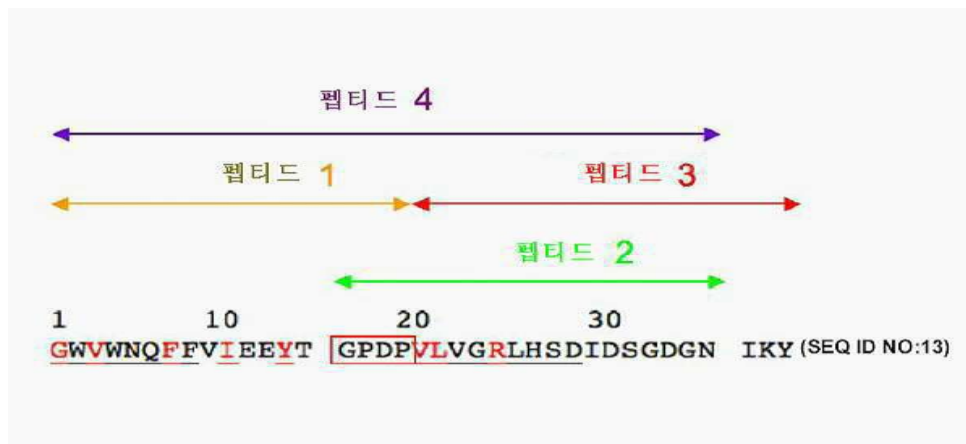
도면21a



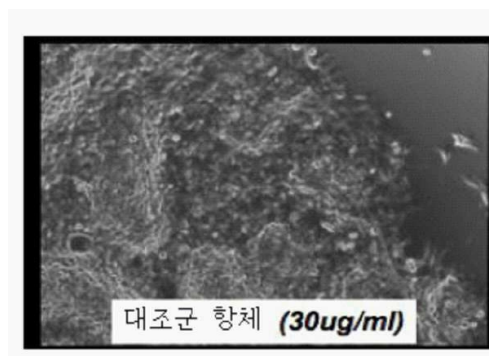
도면21b



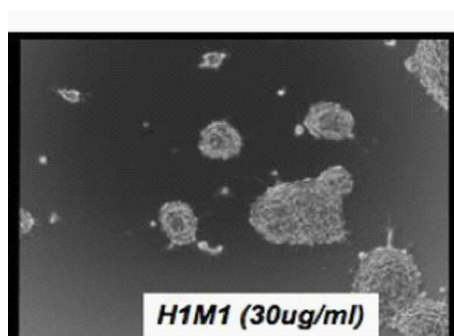
도면22



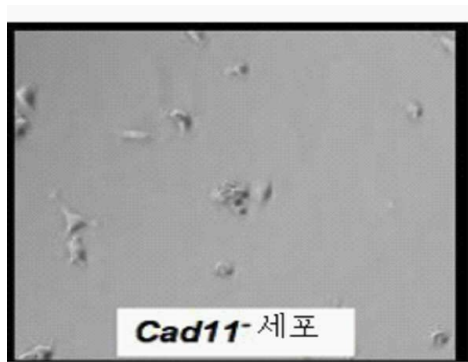
도면23a



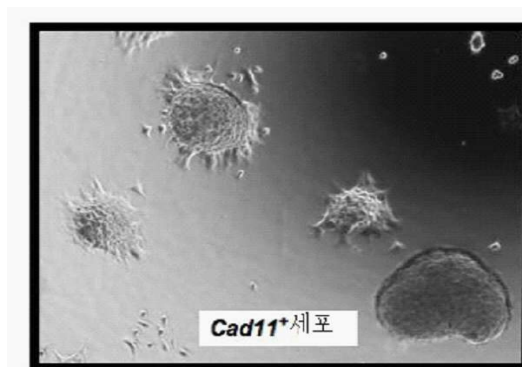
도면23b



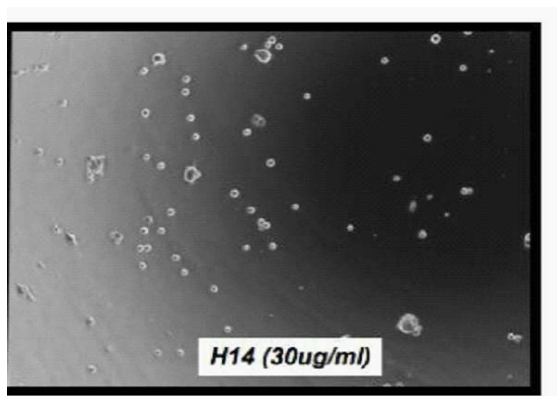
도면23c



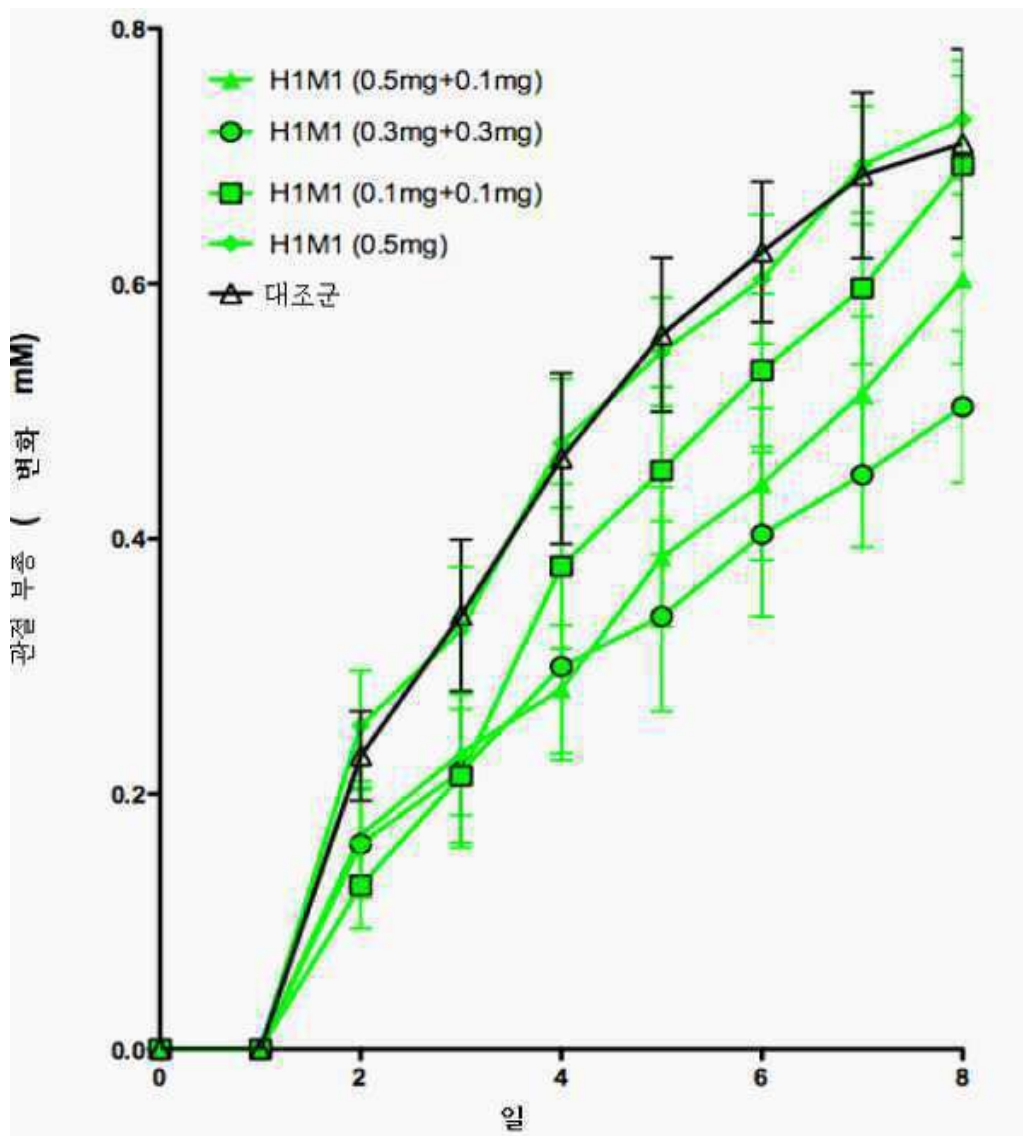
도면24a



도면24b

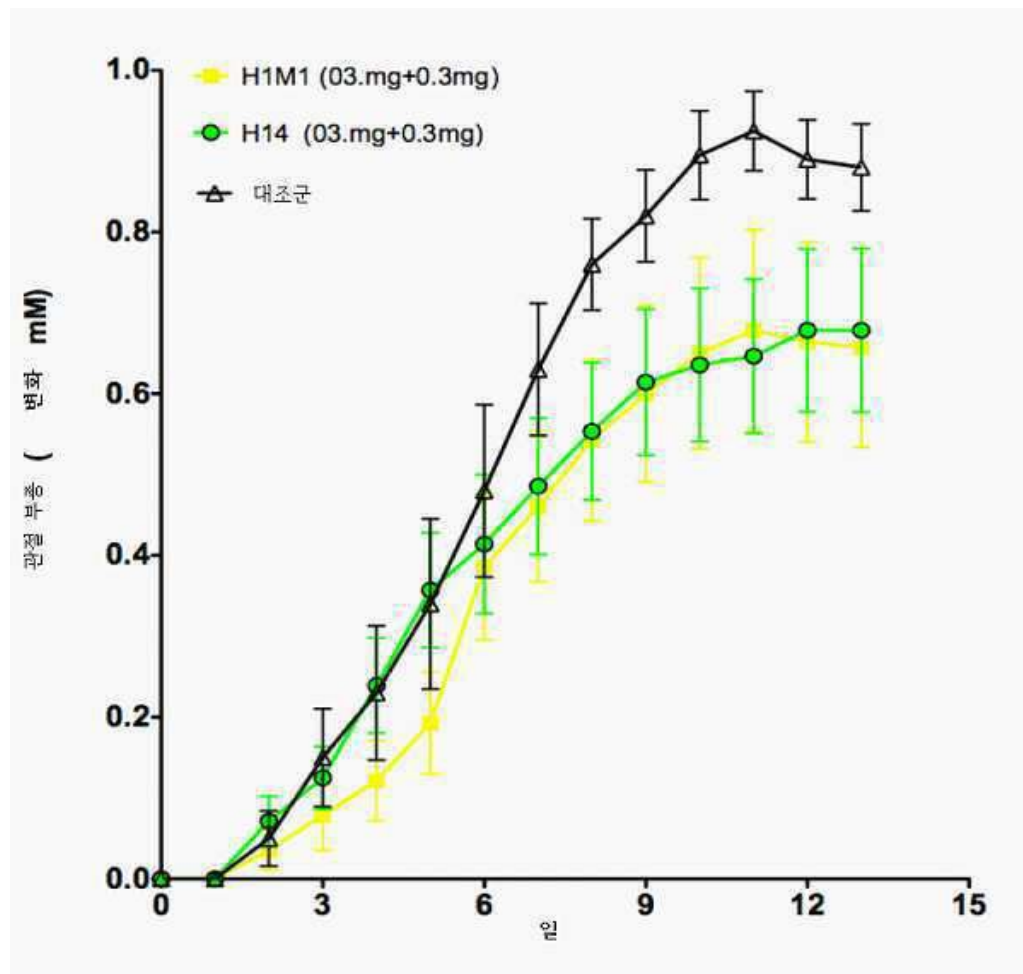


도면25

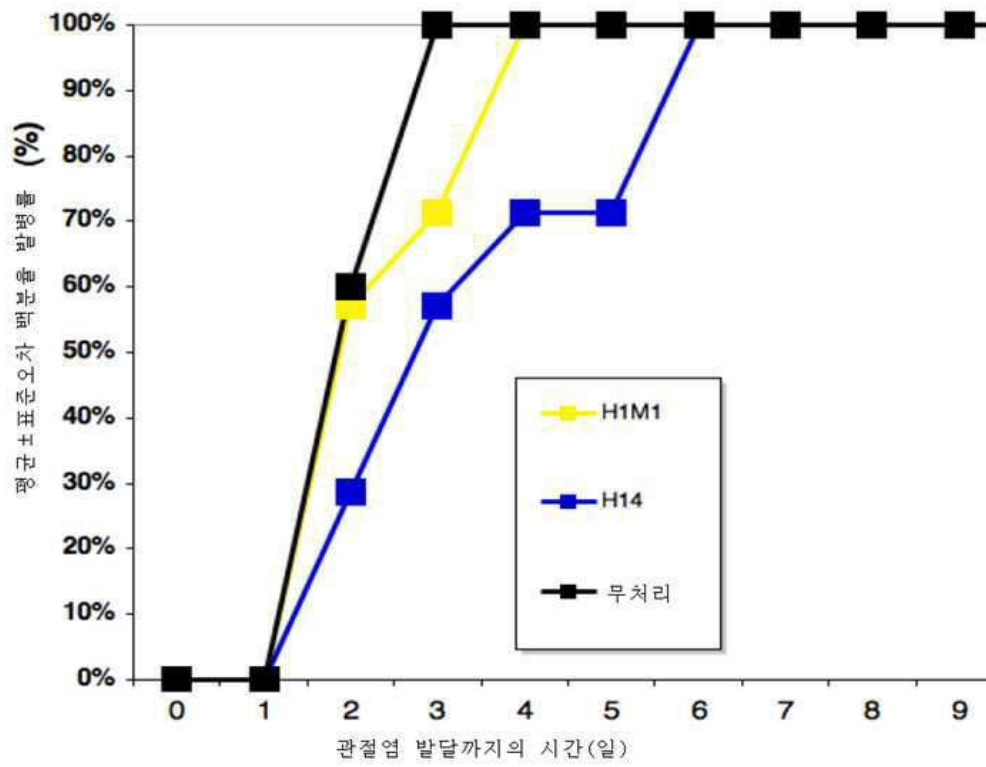




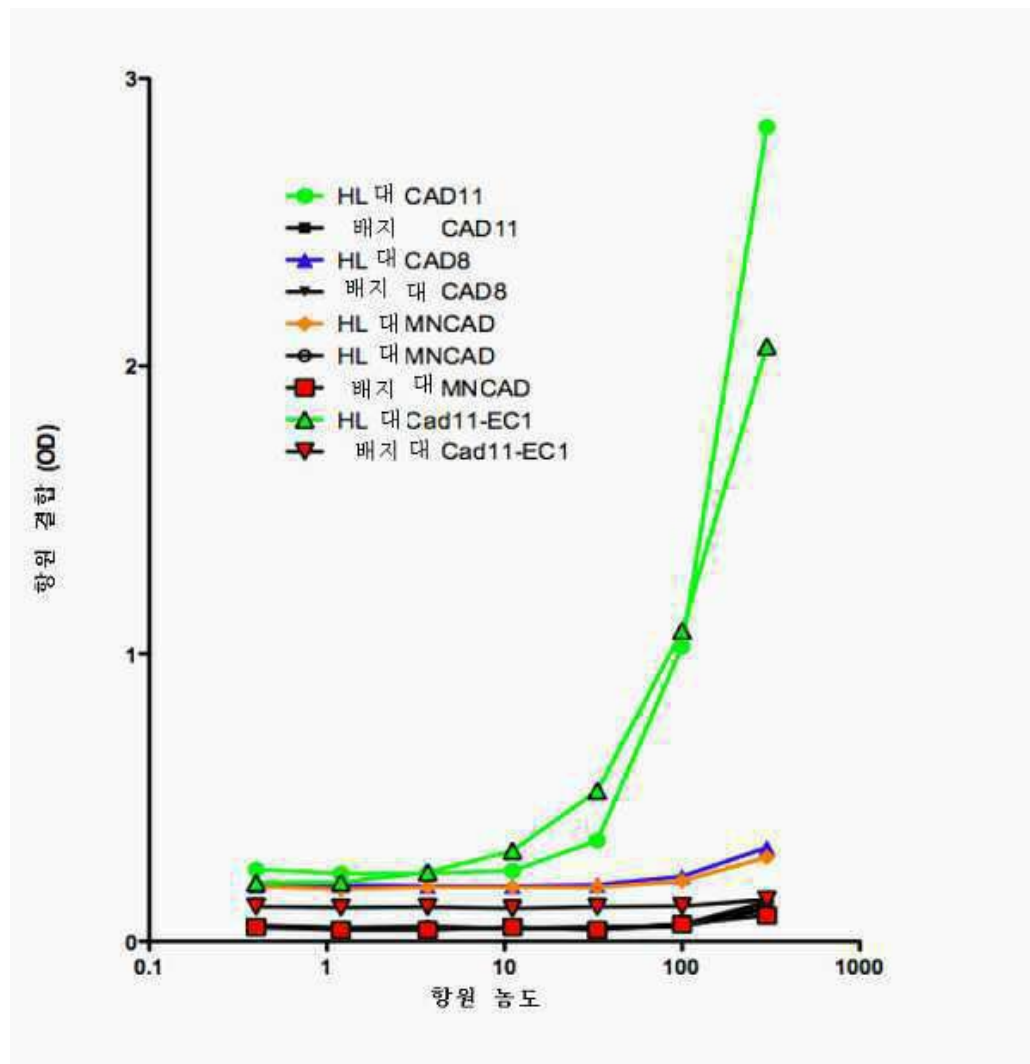
도면26



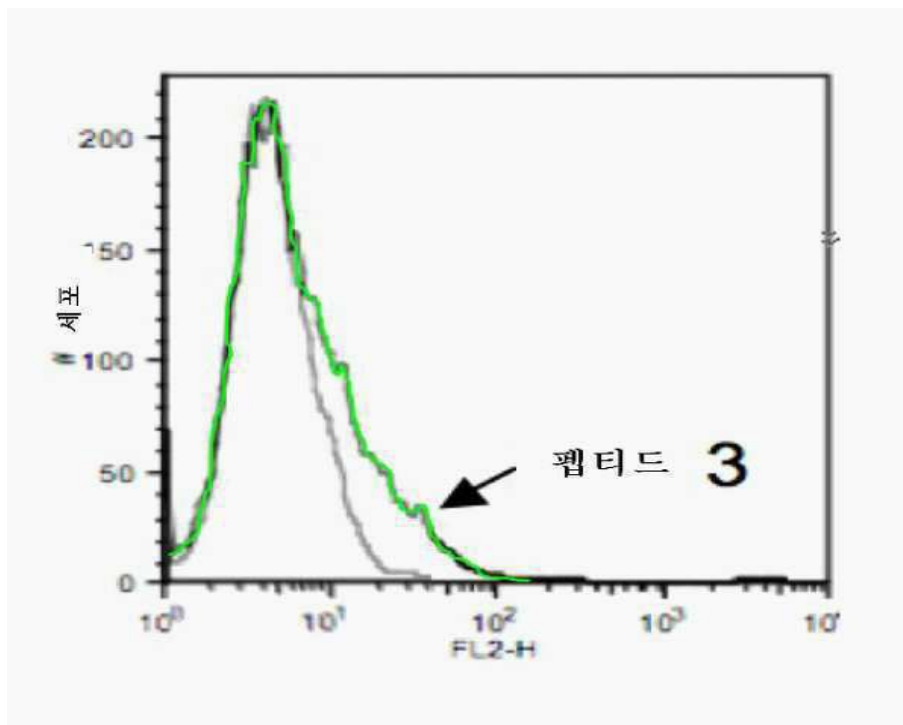
도면27



도면28



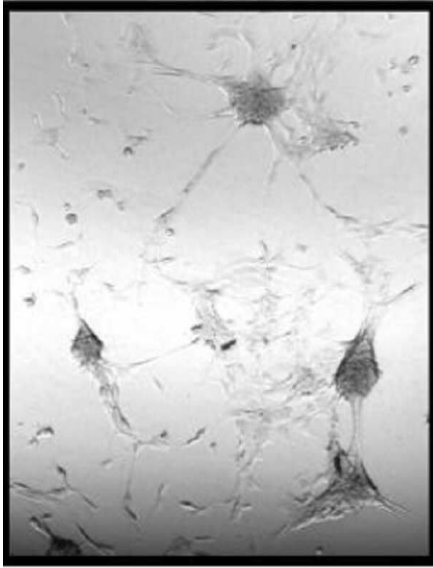
도면29



도면30a



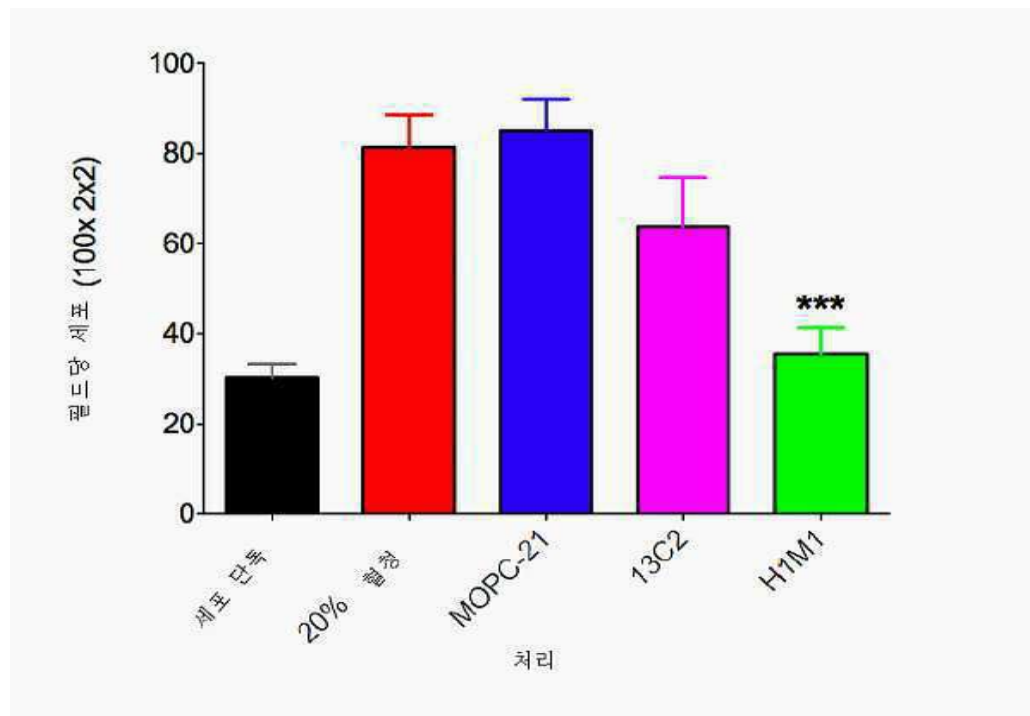
도면30b



도면30c

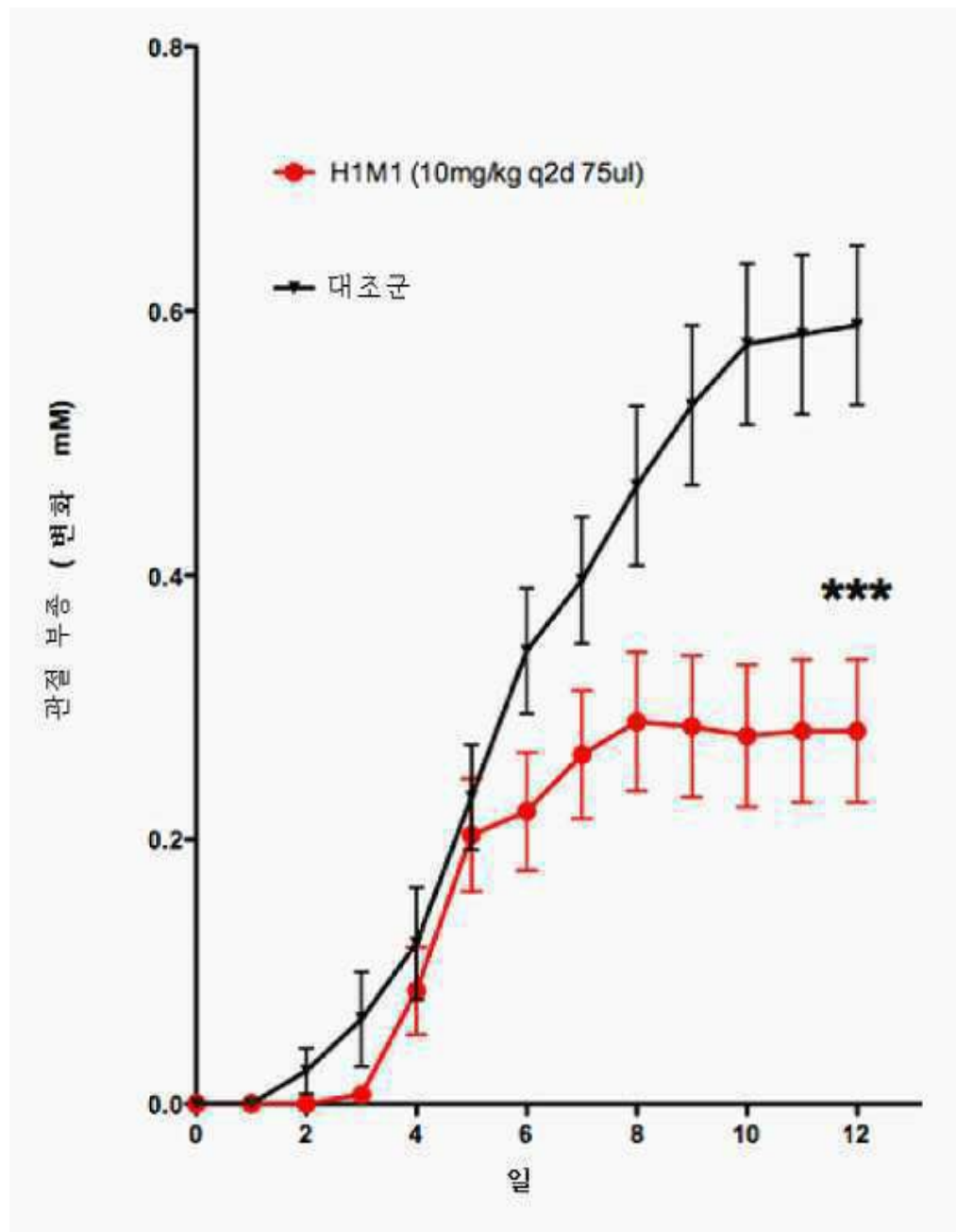


도면31

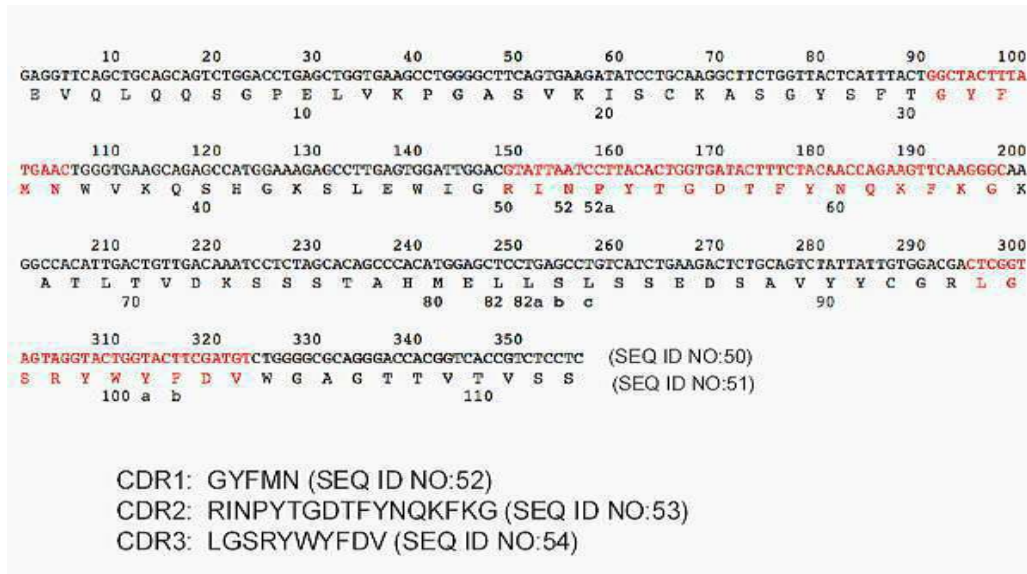




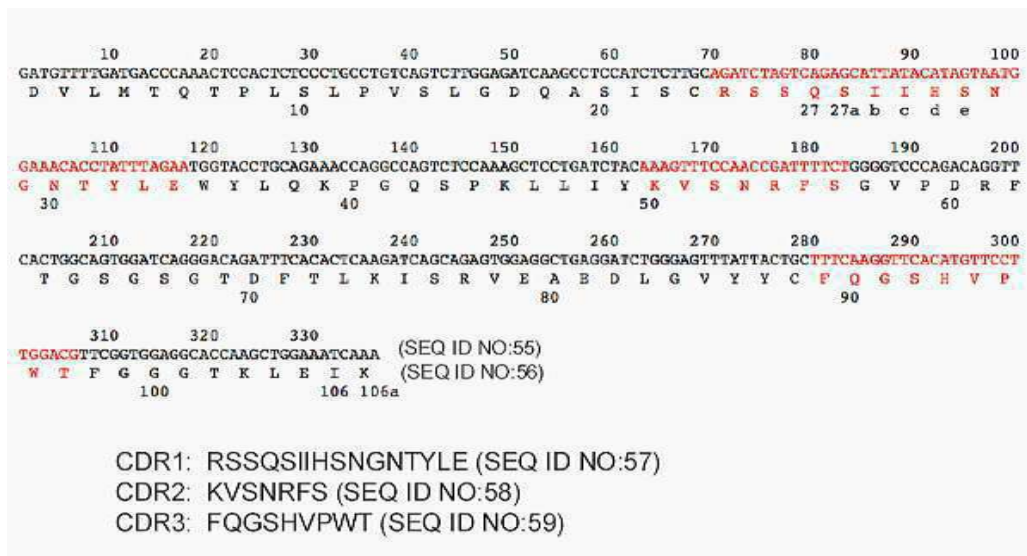
도면32



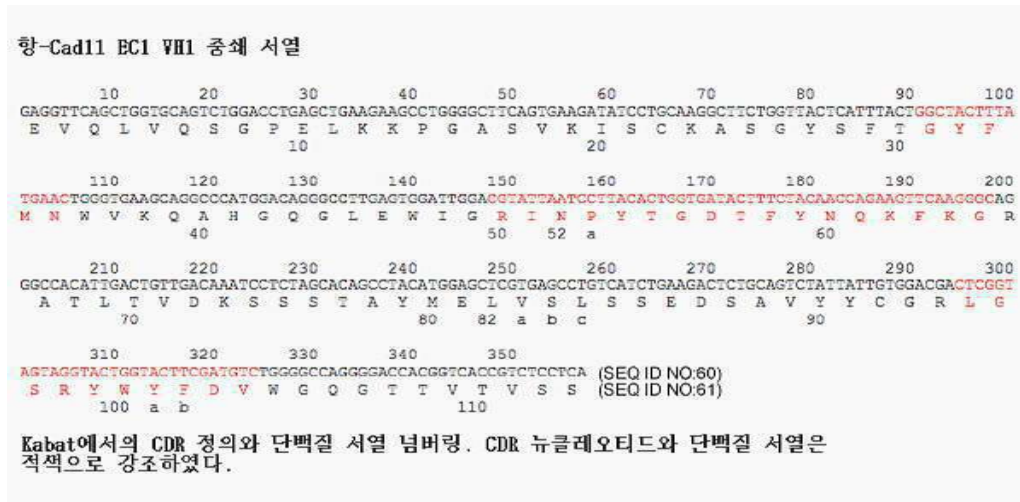
도면33



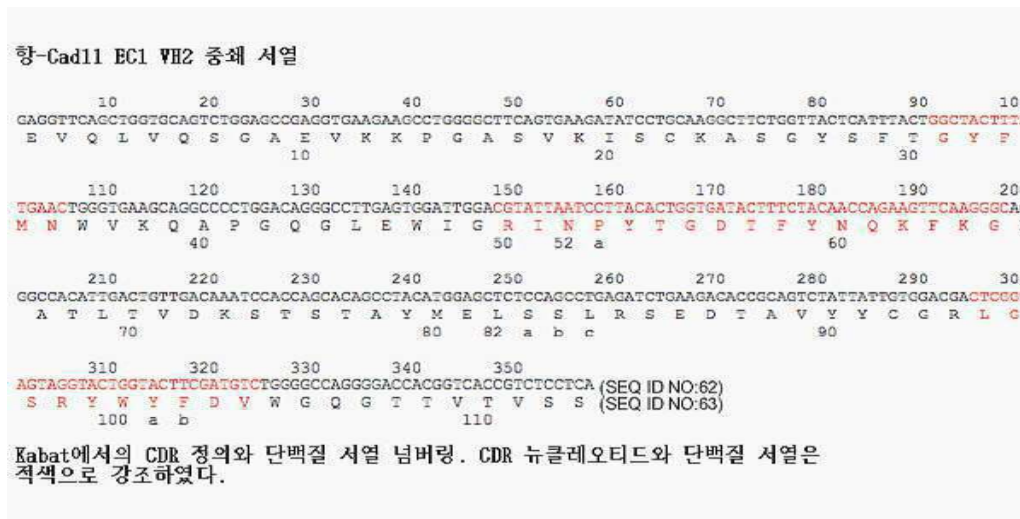
도면34



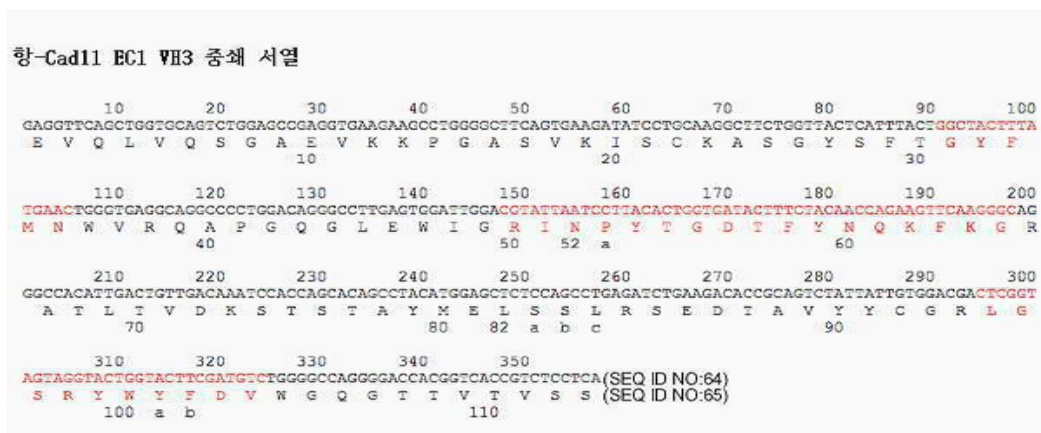
도면35a



도면35b



도면35c



도면35d

항-Cad11 EC1 VH4 중쇄 서열

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCGGTTCATCTTTACTGGCTACTTIA									
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y F									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGAACCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTTACACTGGTGATCTTTCTACAACCAGAASTTCAAGGGCAG									
M N W V R Q A P G Q G L E W I G R I N P Y T G D T F Y N Q K F K G R									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCACAATCAGTGTGACAAATCCACACAGCAGCCATACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTGAAGACACCGCAGTCTATTATTGTGGACGACCTCGGT									
A T I T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C G R L G									
310	320	330	340	350					
AGTAGTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGGACACGGGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:66)									
S R Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:67)									

도면35e

항-Cad11 EC1 VH5 중쇄 서열

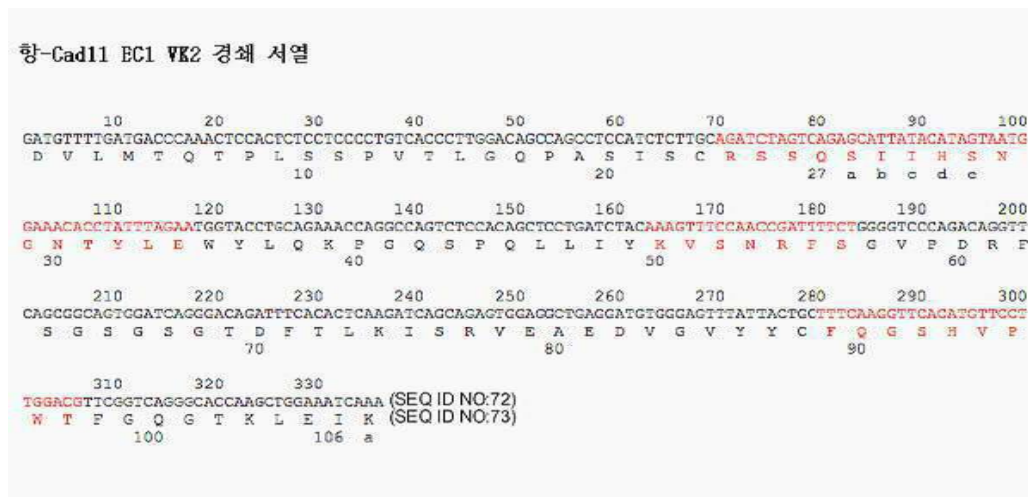
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCGGTTCATCTTTACTGGCTACTTIA									
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y F									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGAACCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTTACACTGGTGATCTTTCTACAACCAGAASTTCAAGGGCAG									
M N W V R Q A P G Q G L E W I G R I N P Y T G D T F Y N Q K F K G R									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GSTGACAACTCAGTGTGACAAATCCACACAGCAGCCATACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTGAAGACACCGCAGTCTATTATTGTGGACGACCTCGGT									
V T I T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C G R L G									
310	320	330	340	350					
AGTAGTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGGACACGGGTCACCGTCTCTCTCA (SEQ ID NO:68)									
S R Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:69)									

도면35f

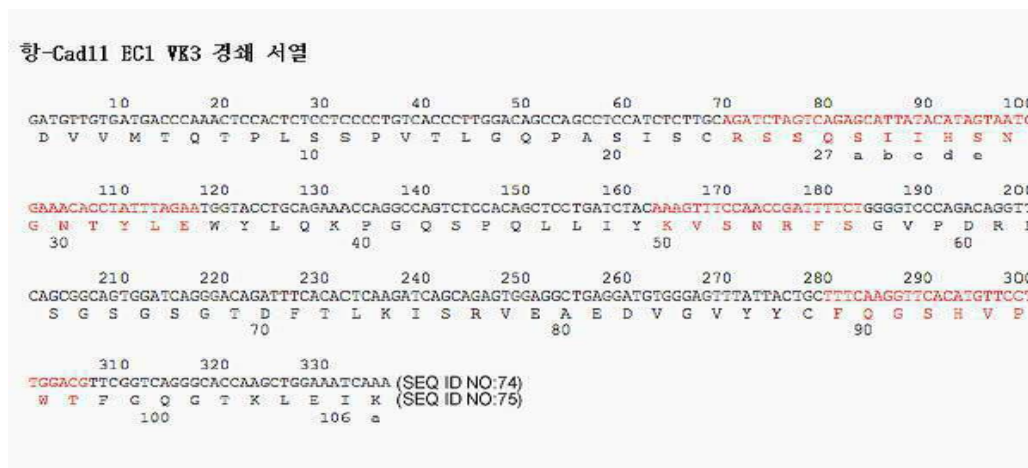
항-Cad11 EC1 VK1 경쇄 서열

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTTTGATGACCCAAATCCACTCTCCCTCCCGTGCACCCTTGGACAGCCAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTATACATAGTAATG									
D V L M T Q T P L S S P V T L G Q P A S I S C R S S Q S I I H S N									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTCTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT									
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGGTTCACATGTTCTCT									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V P									
310	320	330							
TGGACGTTCCGTACGGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:70)									
W T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:71)									

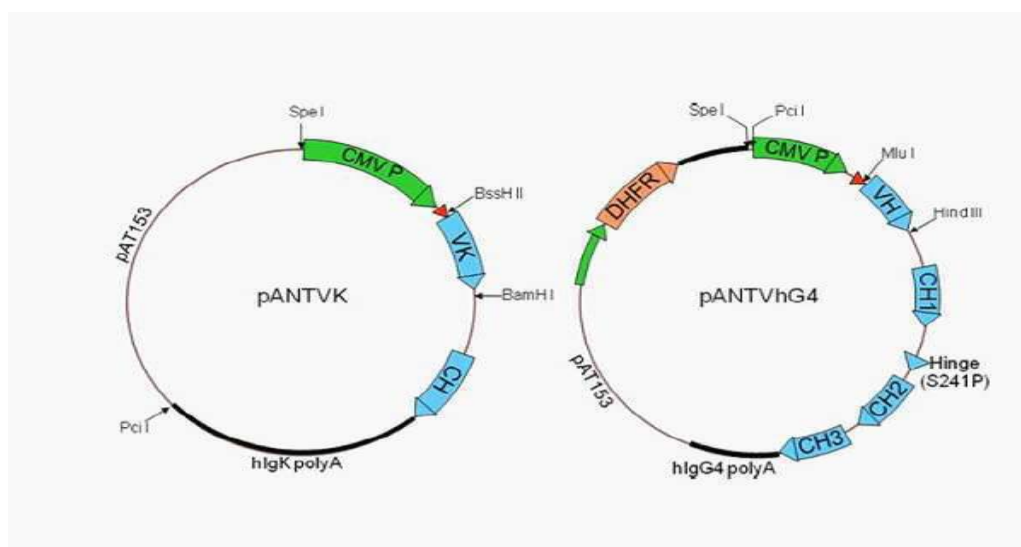
도면35g



도면35h

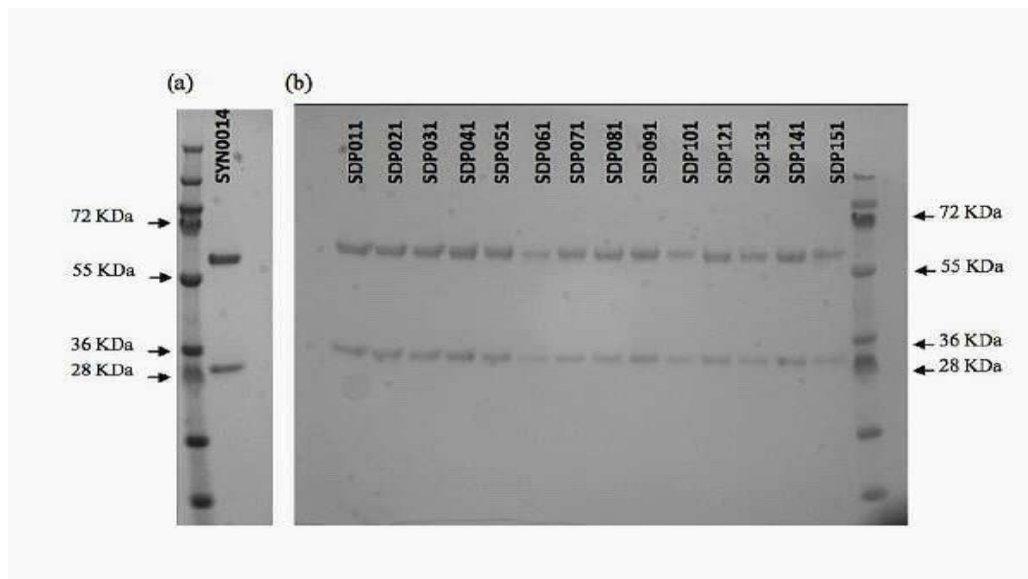


도면36

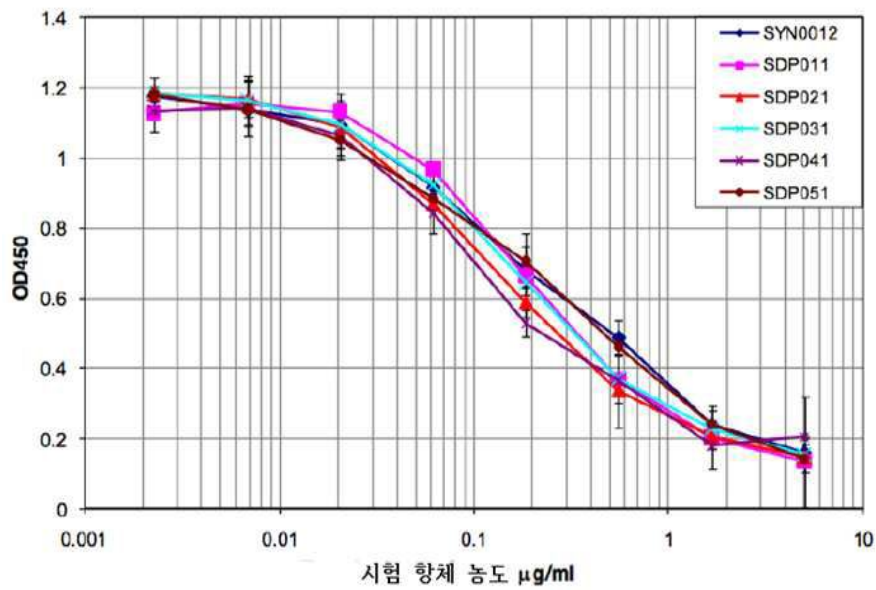




도면37

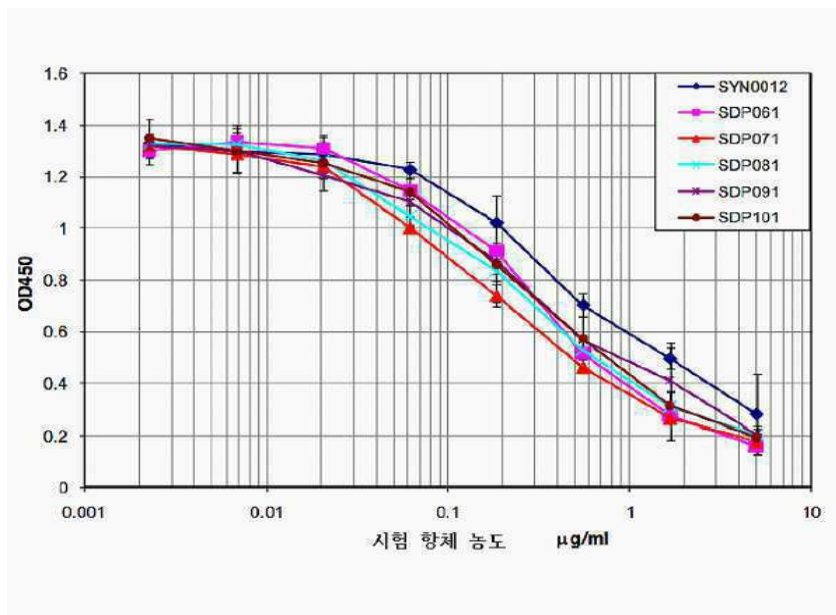


도면38a

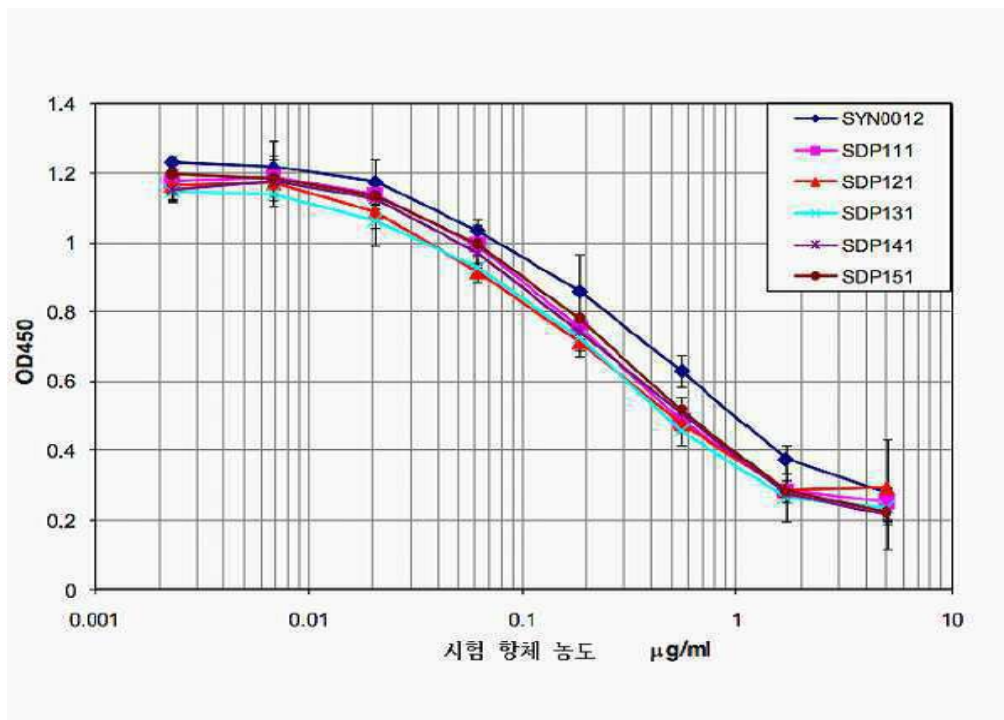




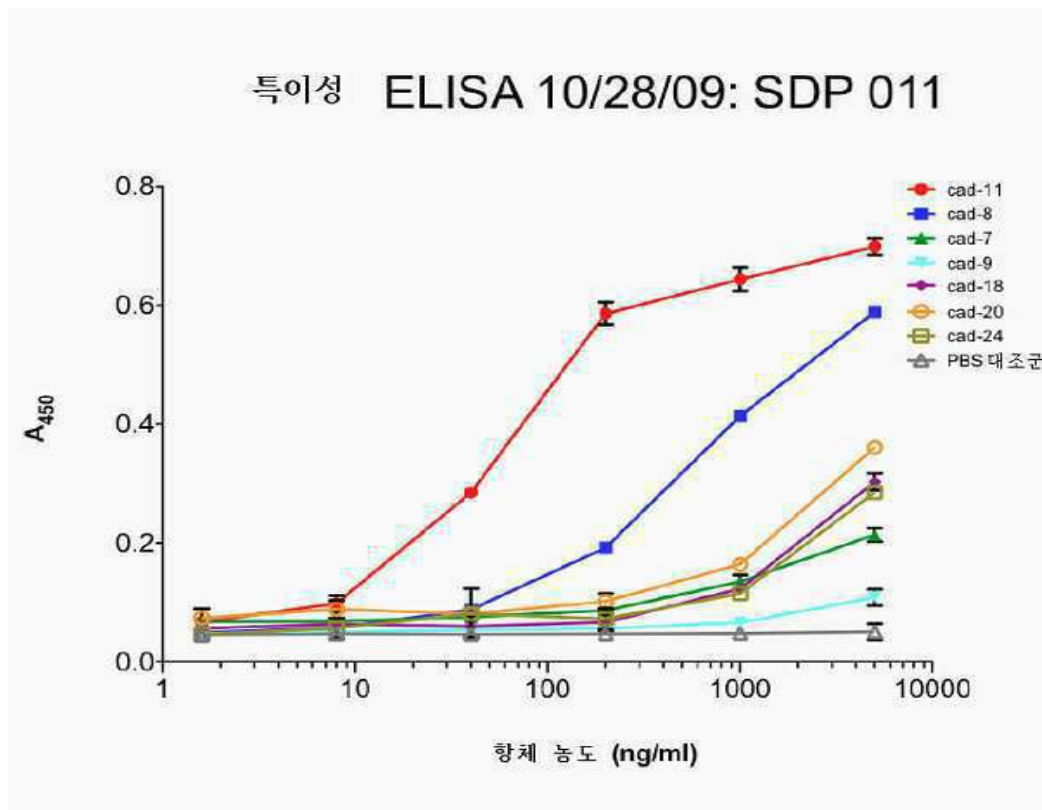
도면38b



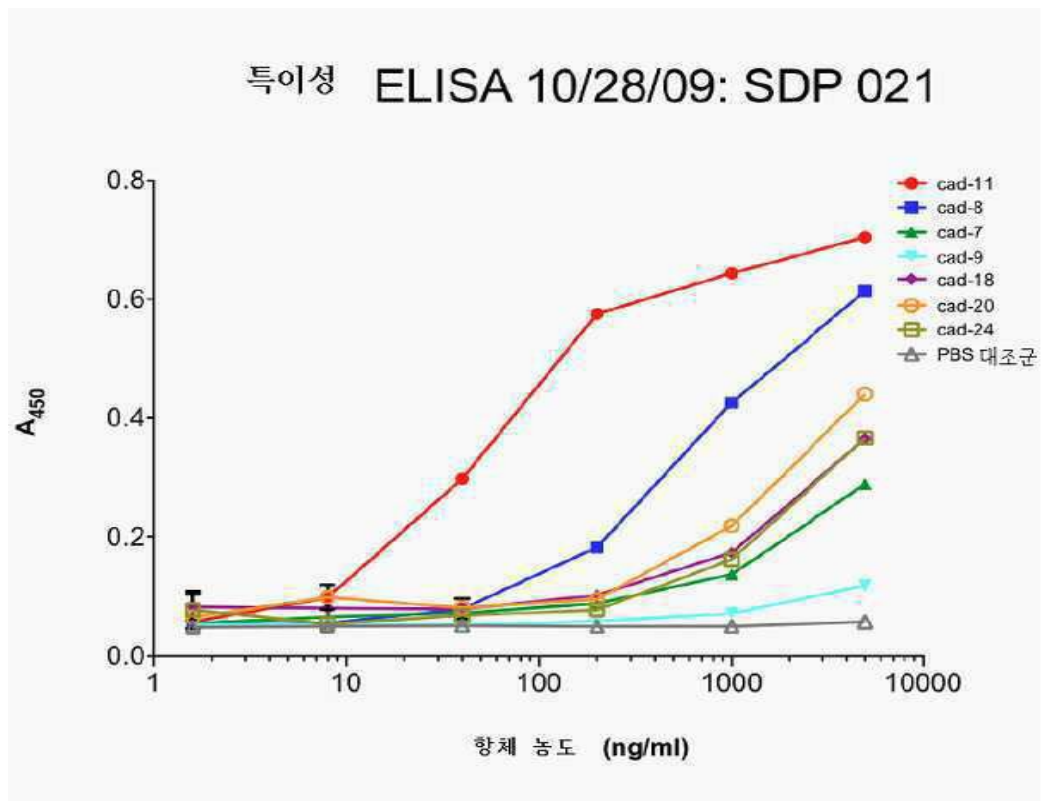
도면38c



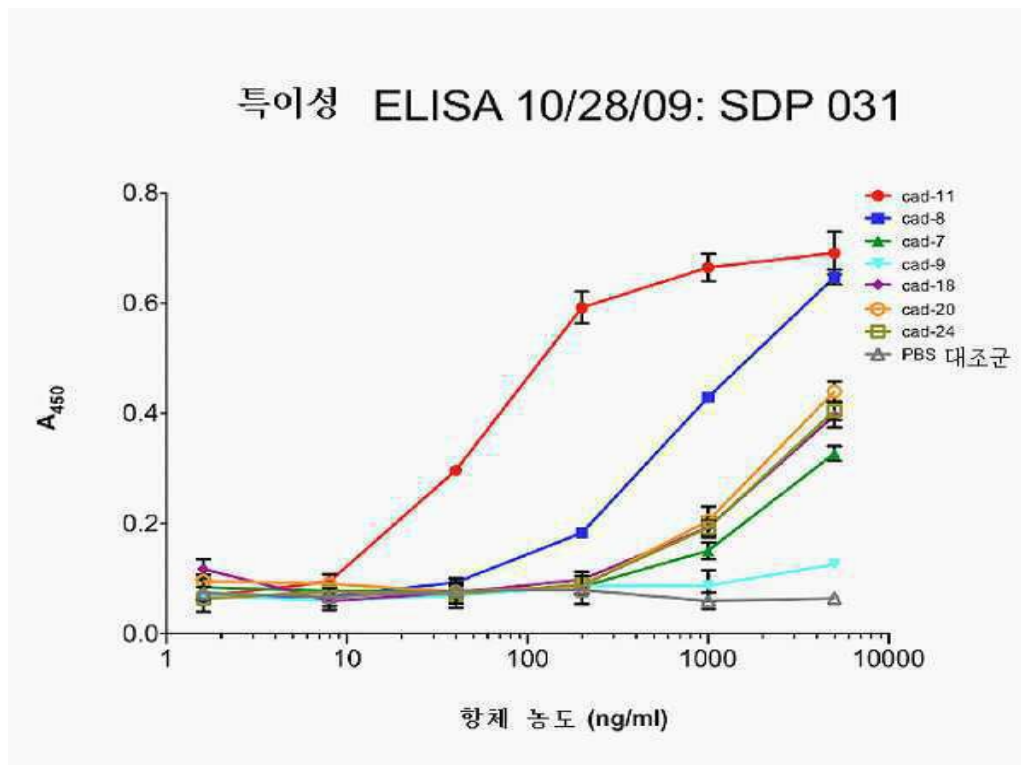
도면39a



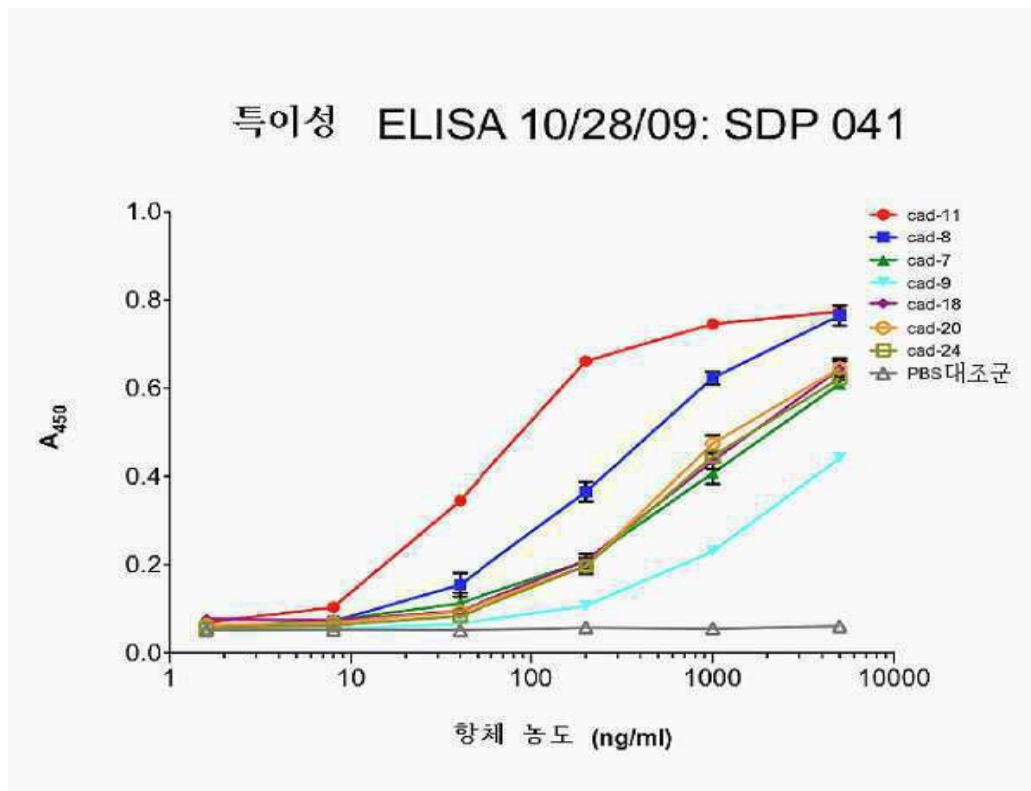
도면39b



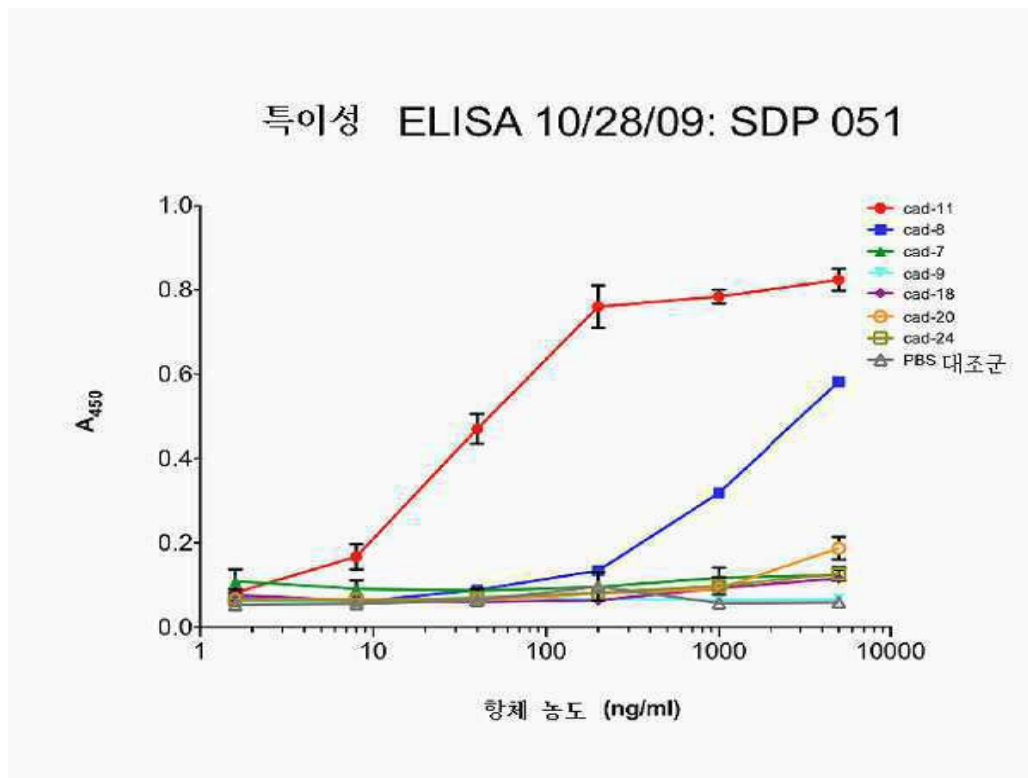
도면39c



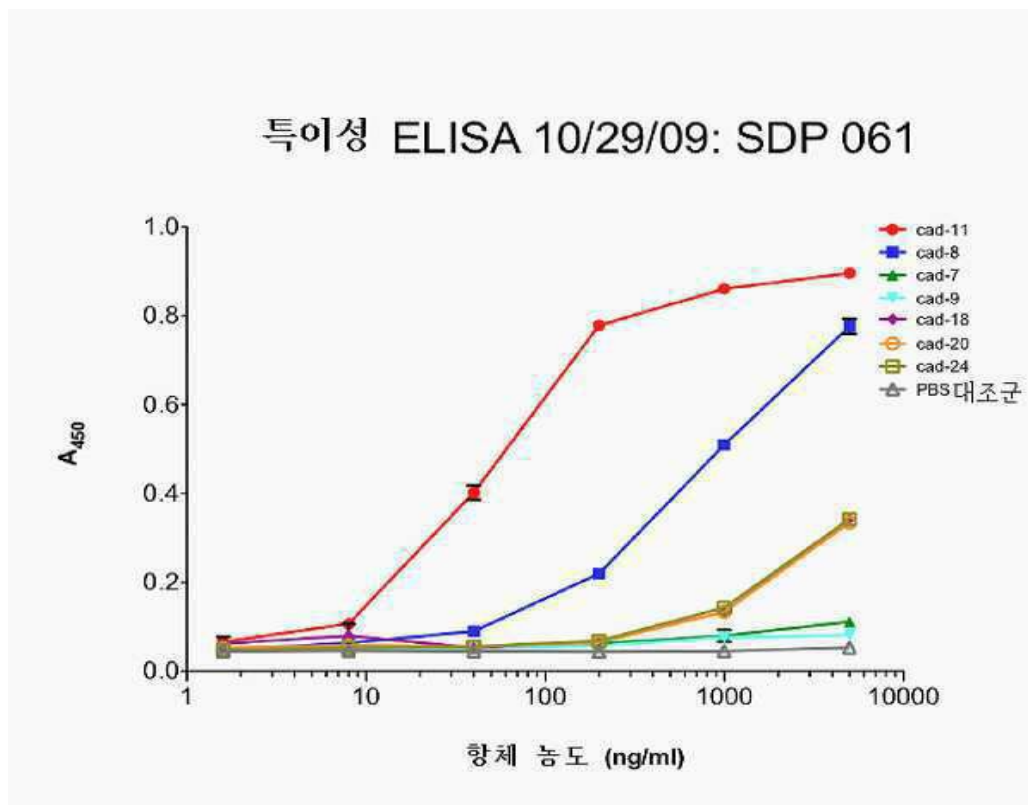
도면39d



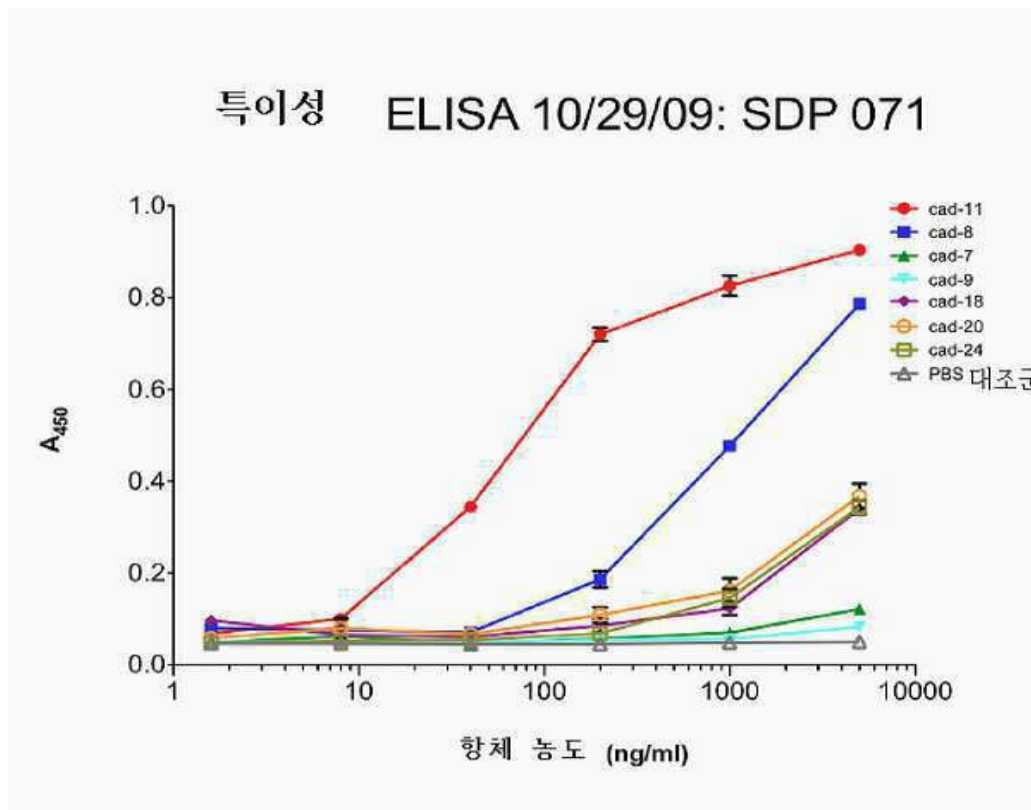
도면39e



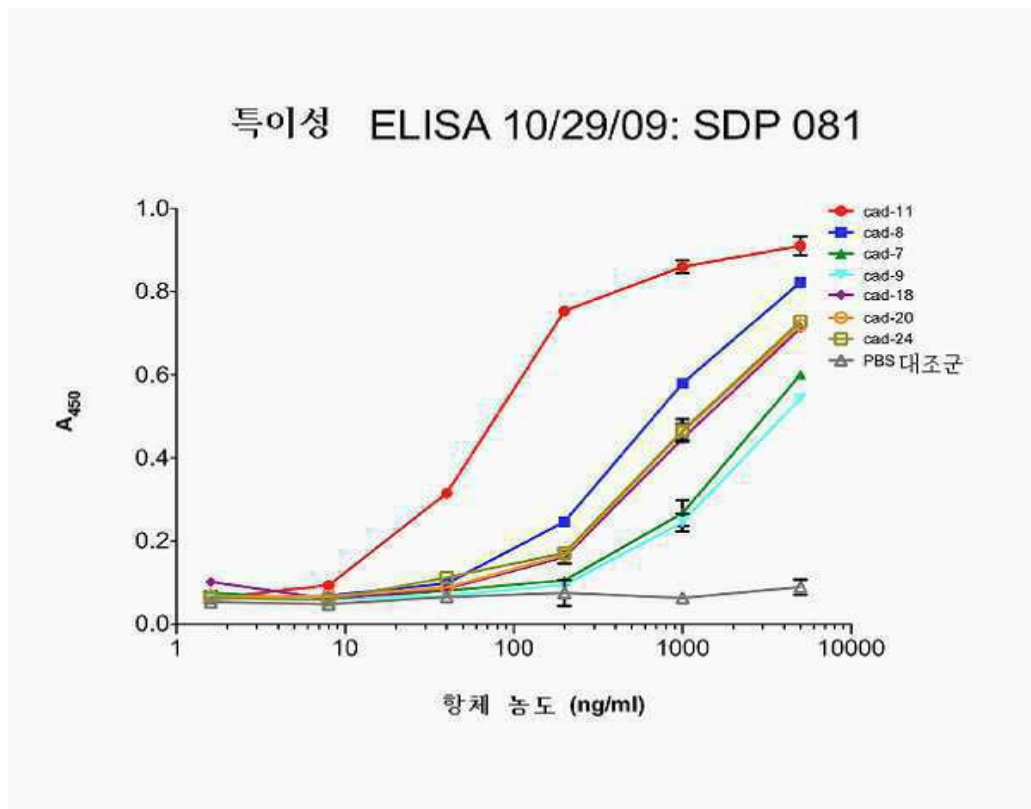
도면39f



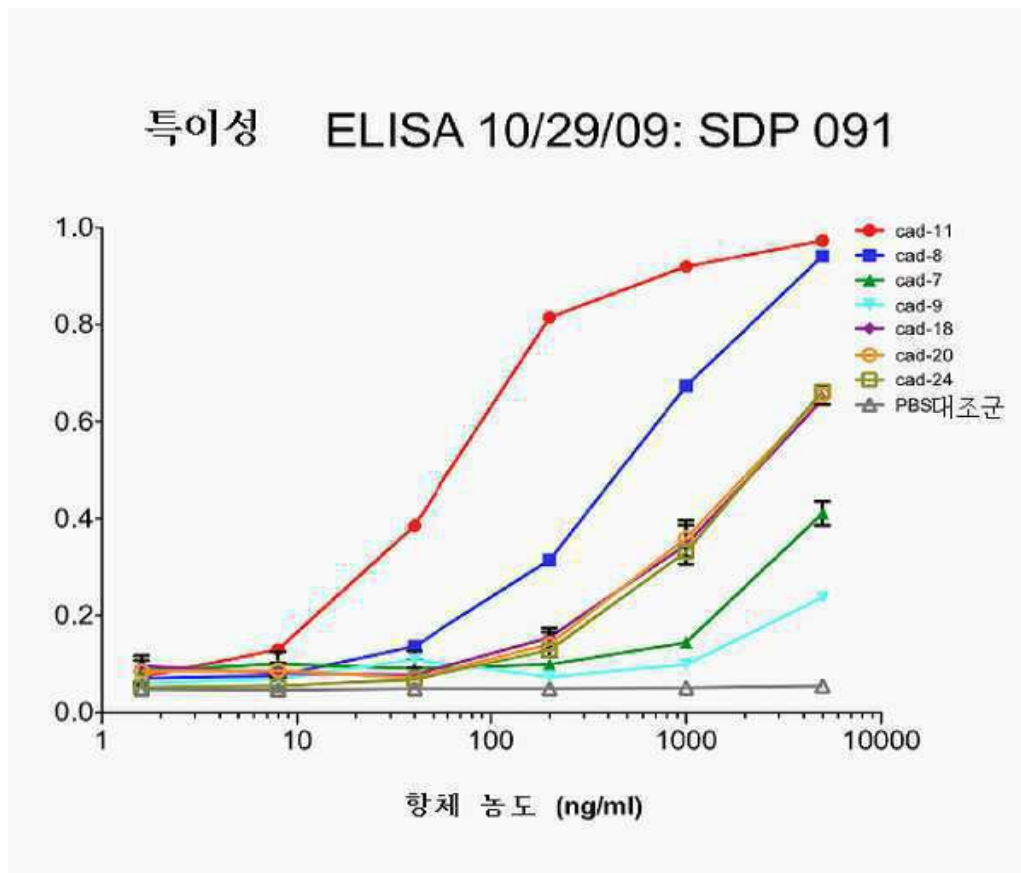
도면39g



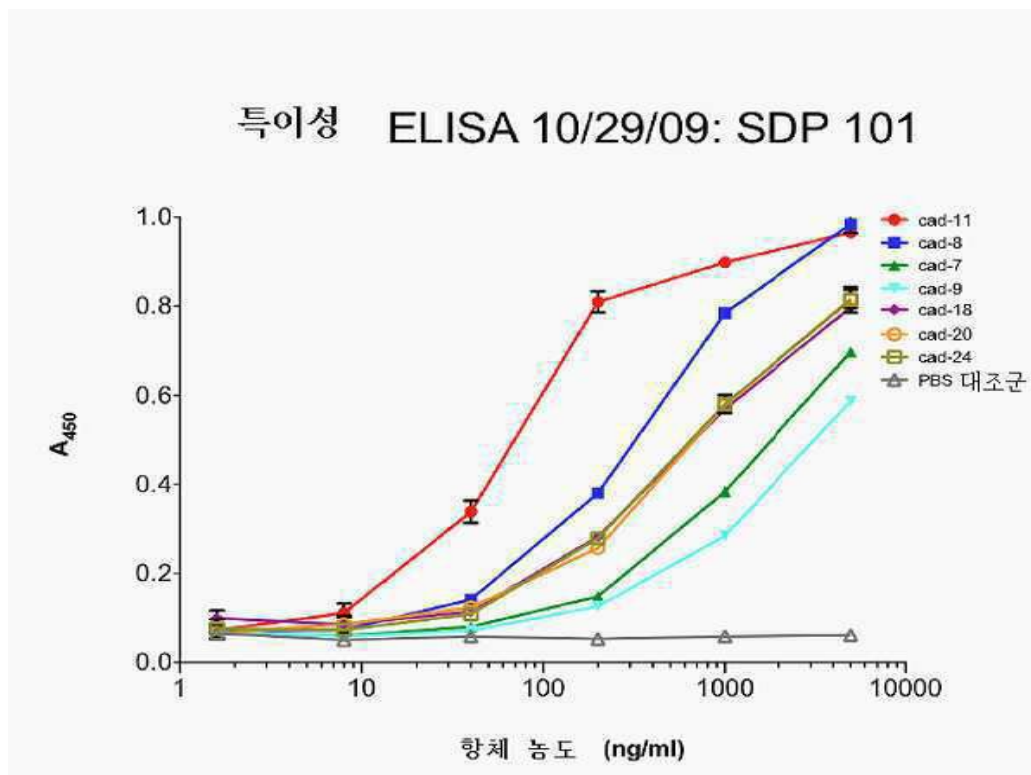
도면39h



도면39i

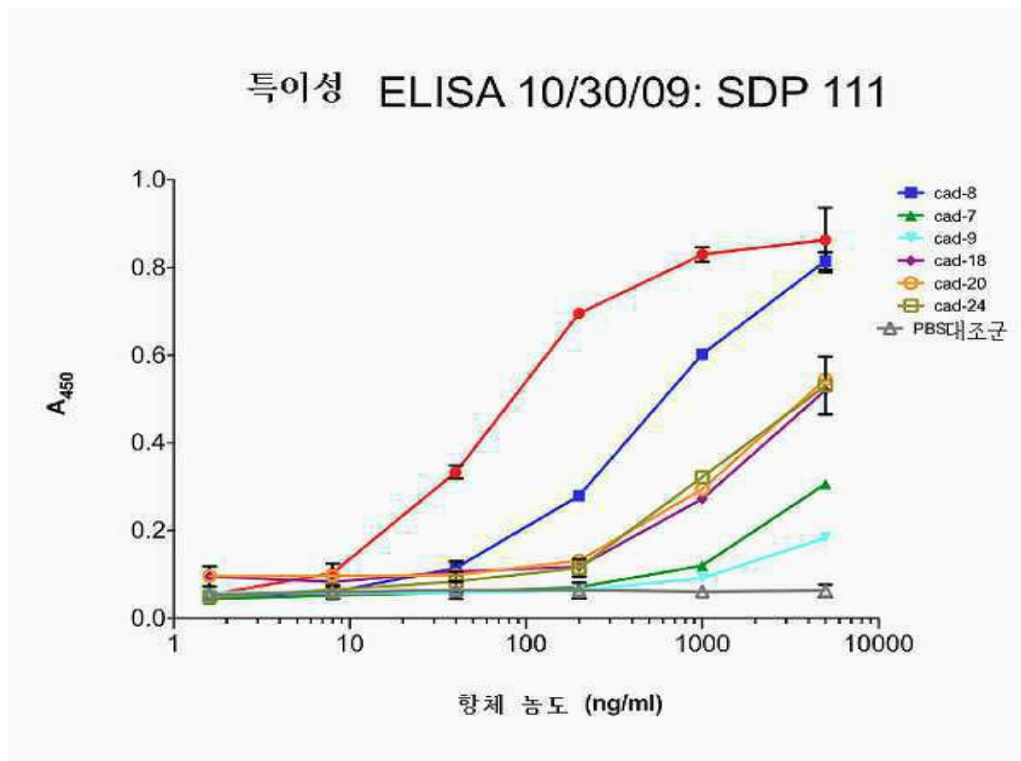


도면39j

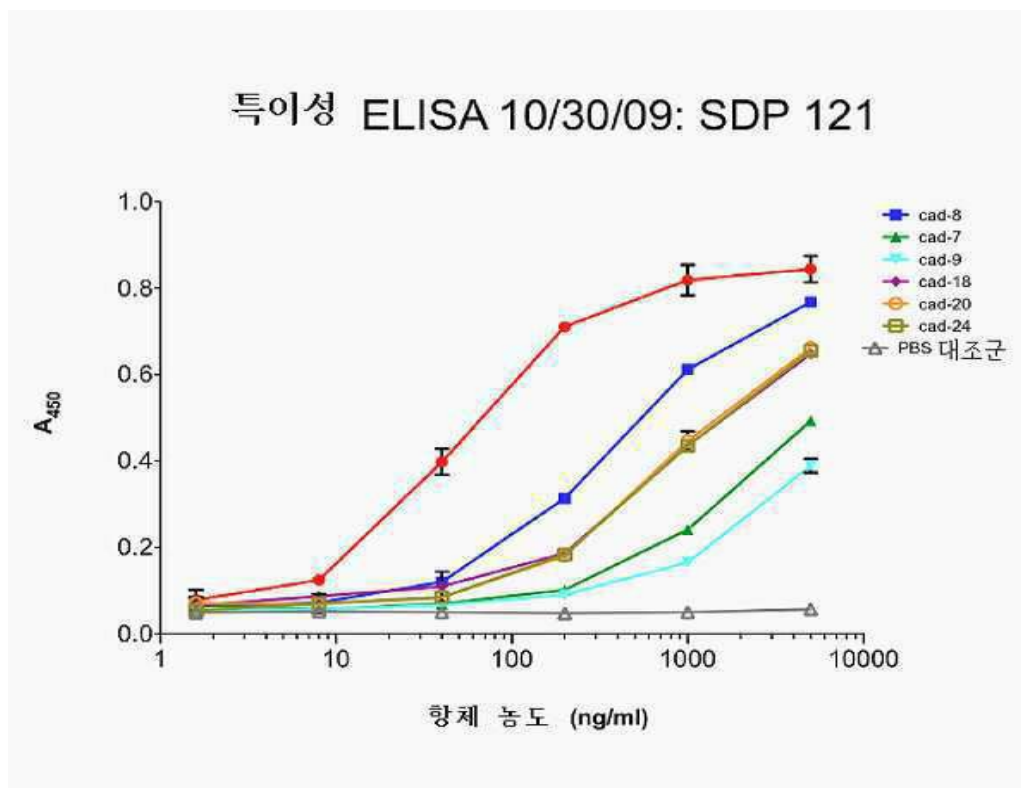




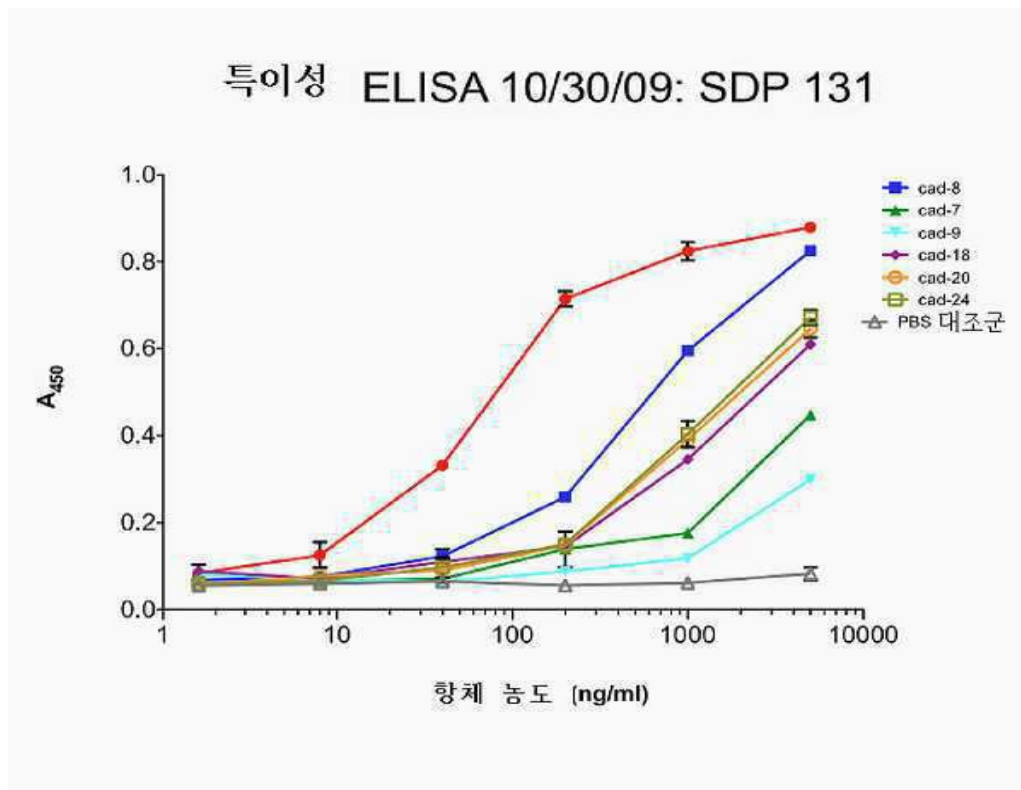
도면39k



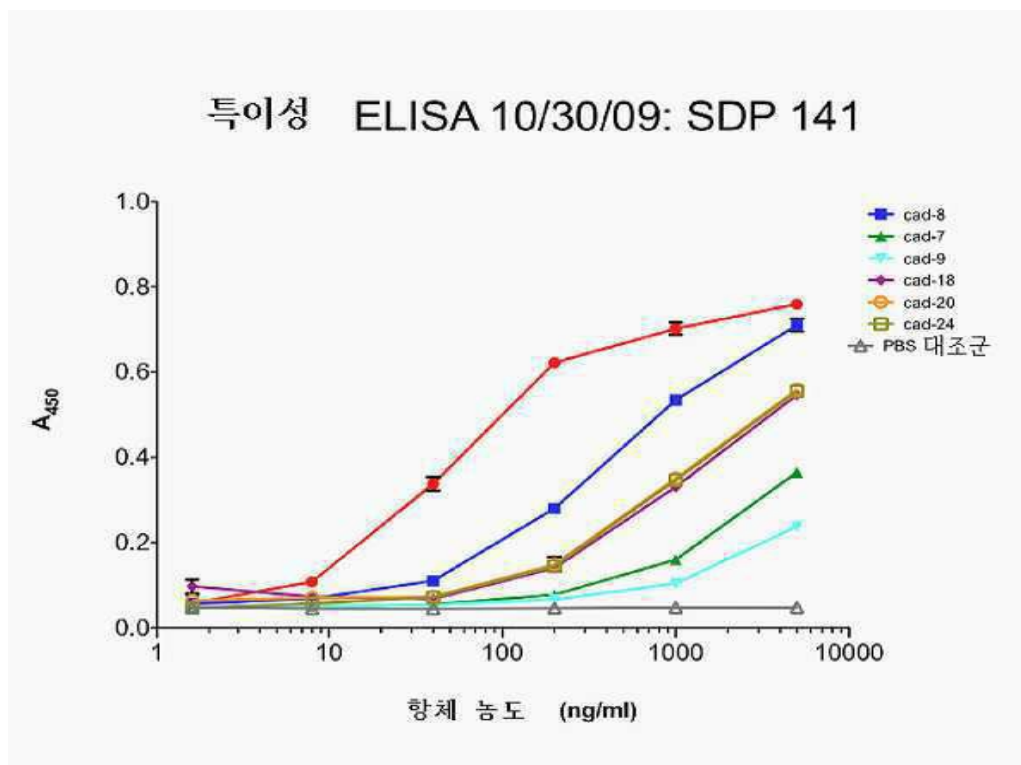
도면39l



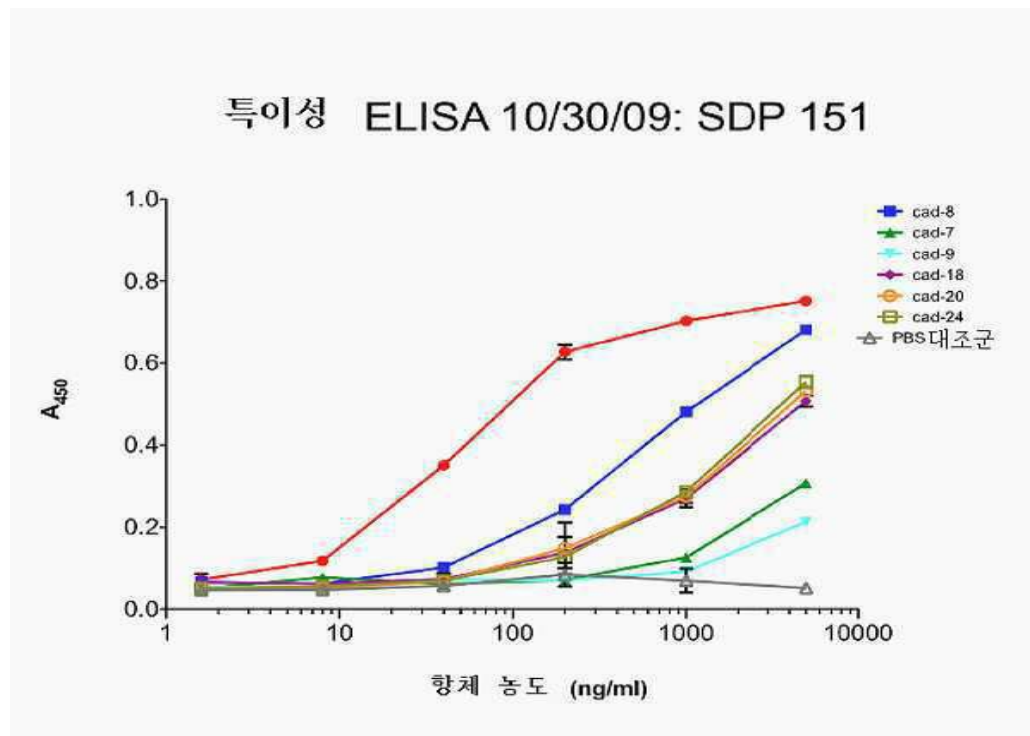
도면39m



도면39n



도면39o



도면40a

>SDP031\_경쇄

DVLMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
 NRFGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIK  
 (SEQ ID NO:71)

>SDP031\_중쇄

EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVRQAPGQGLEWIGRINPYT  
 GDTFYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCGRLGSRYYWYFDVWG  
 QGTTVTVSS (SEQ ID NO:65)

도면40b

>SDP051\_ 경쇄

DVLMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
NRFSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO:71)

>SDP051\_ 중쇄

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYFMNWRQAPGQGLEWIGRINPYT  
GDTFYNQKFKGRVTITVDKSTAYMELSSLRSEDVAVYYCGRLGSRWYFDVWGQ  
GTTVTVSS (SEQ ID NO:69)

도면40c

>SDP061\_ 경쇄

DVLMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
NRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO:73)

>SDP061\_ 중쇄

EVQLVQSGPELKKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWKQAHGQGLEWIGRINPYT  
GDTFYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMELVSLSEDSAVYYCGRLGSRWYFDVWGQ  
GTTVTVSS (SEQ ID NO:61)

도면40d

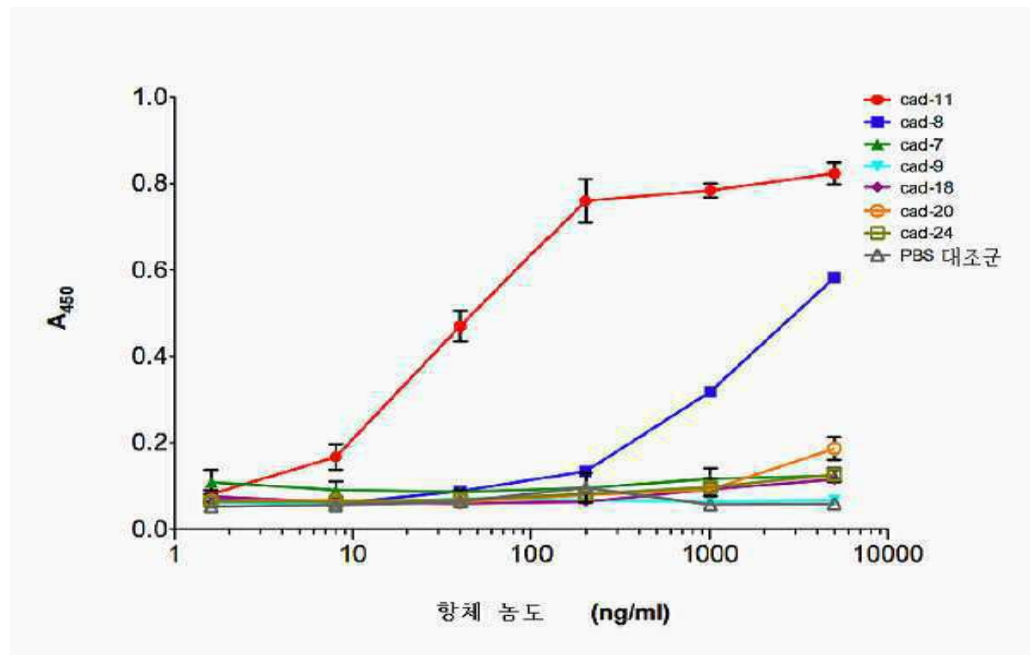
>SDP071\_ 경쇄

DVLMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDP  
RFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:73)

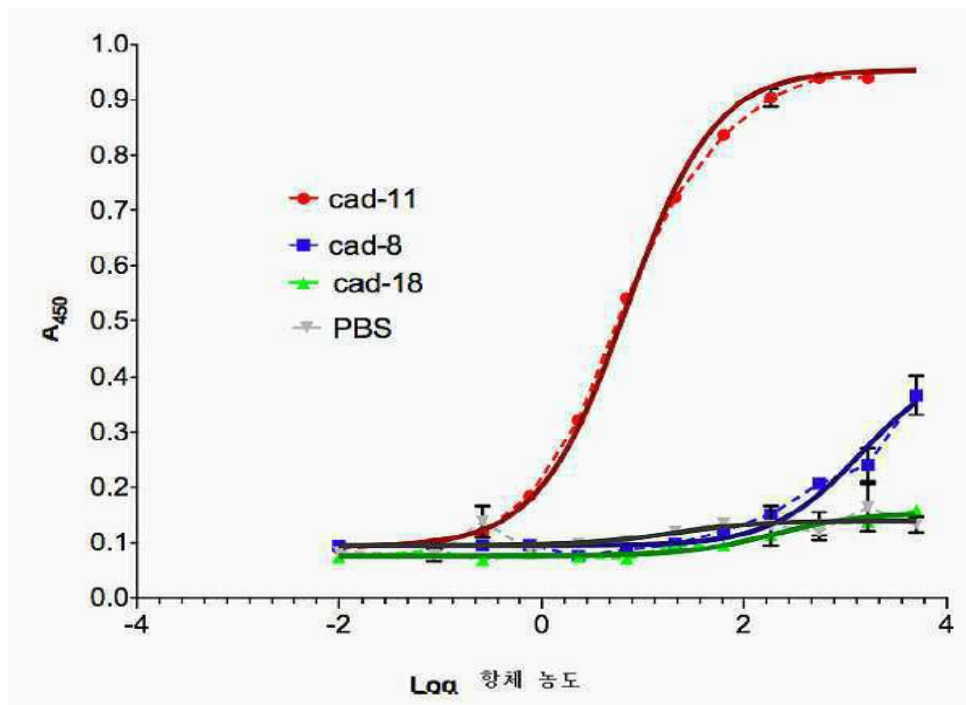
>SDP071\_ 중쇄

EVQLVQSGAEVKKPGASYVKISCKASGYSFTGYFMNWVKQAPGQGLEWIGRINPYTGDTFYNQK  
FKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCGRLGSRWYFDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID  
NO:63)

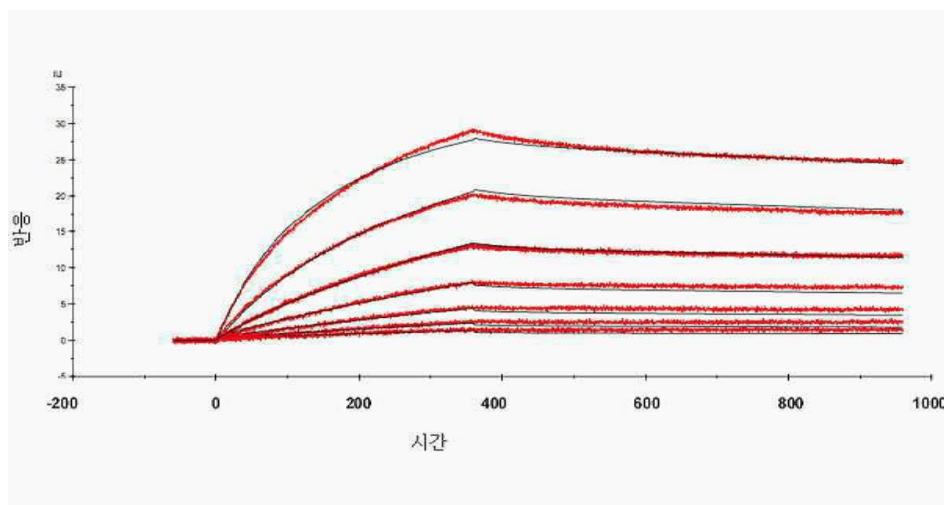
도면41a



도면41b

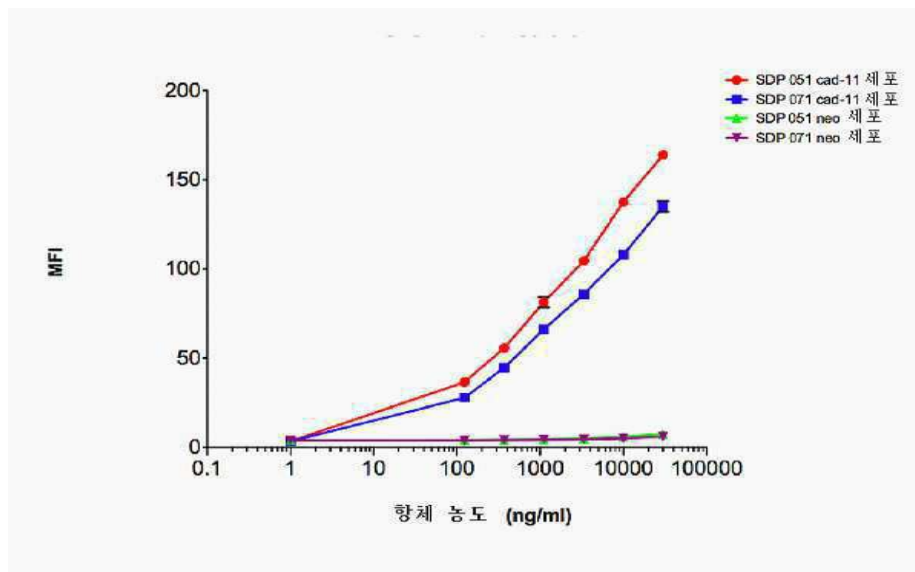


도면42

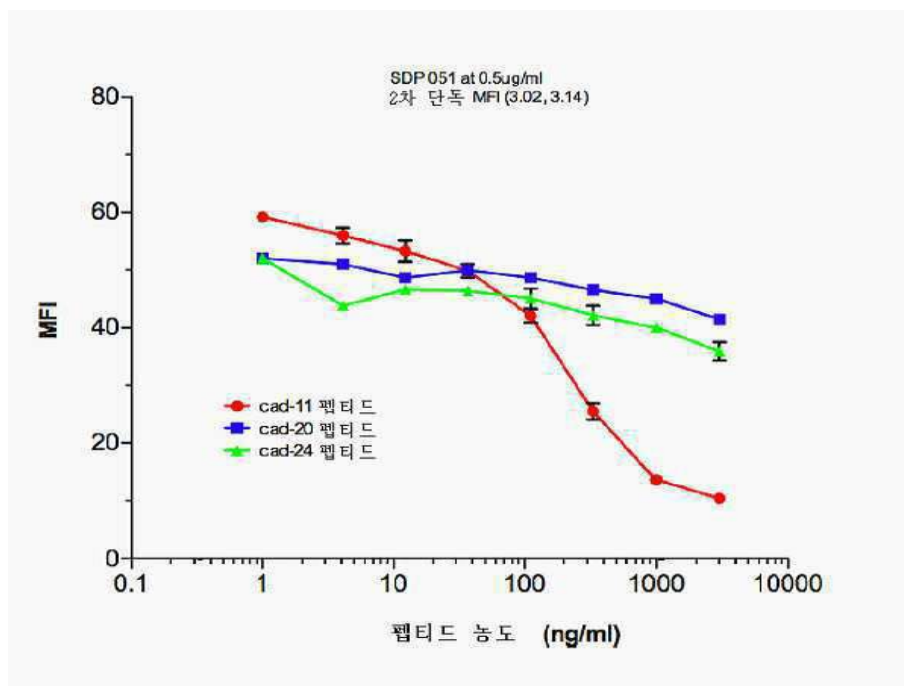




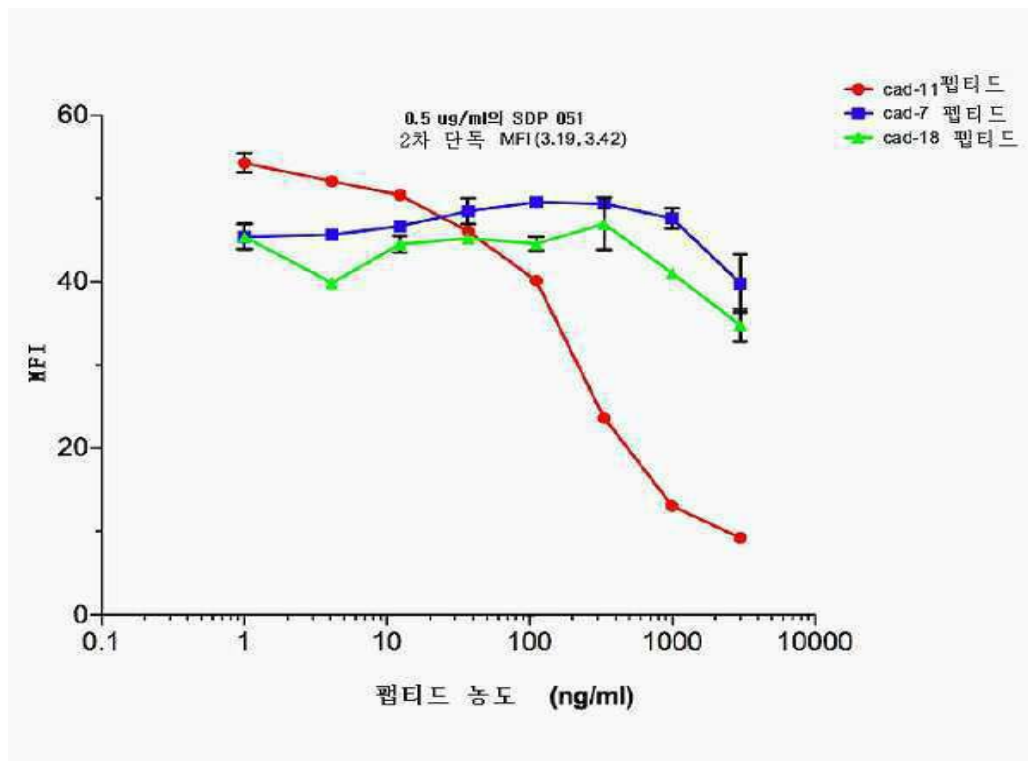
도면43



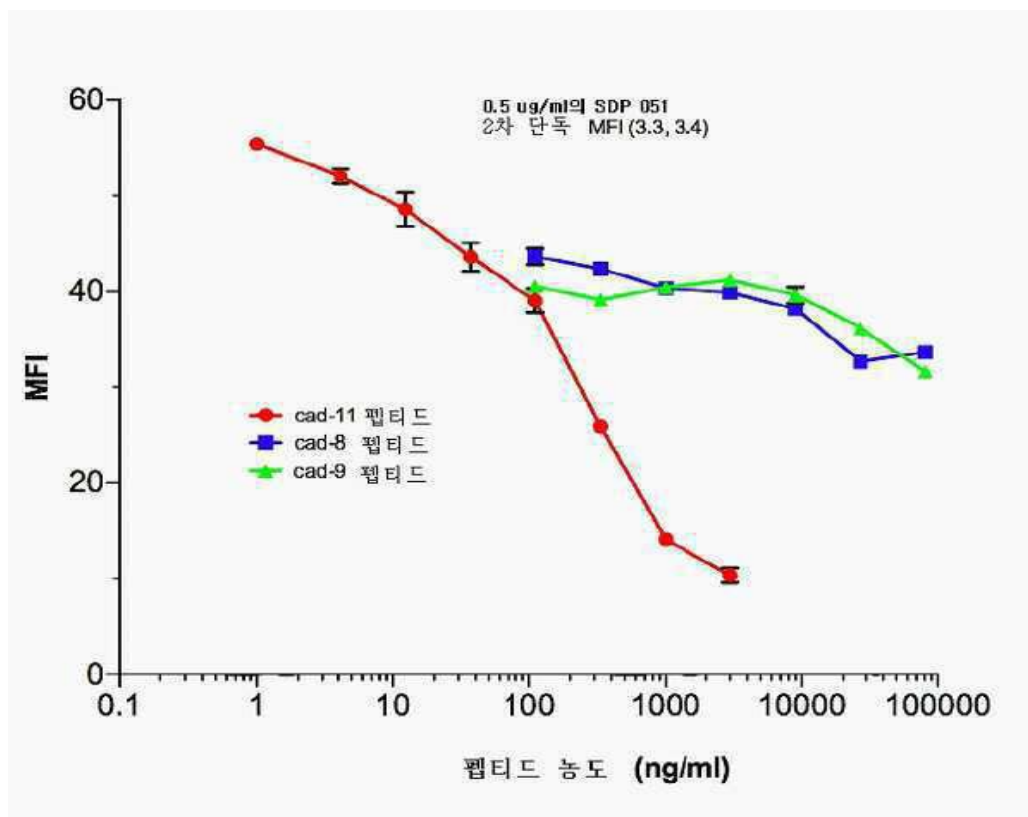
도면44a



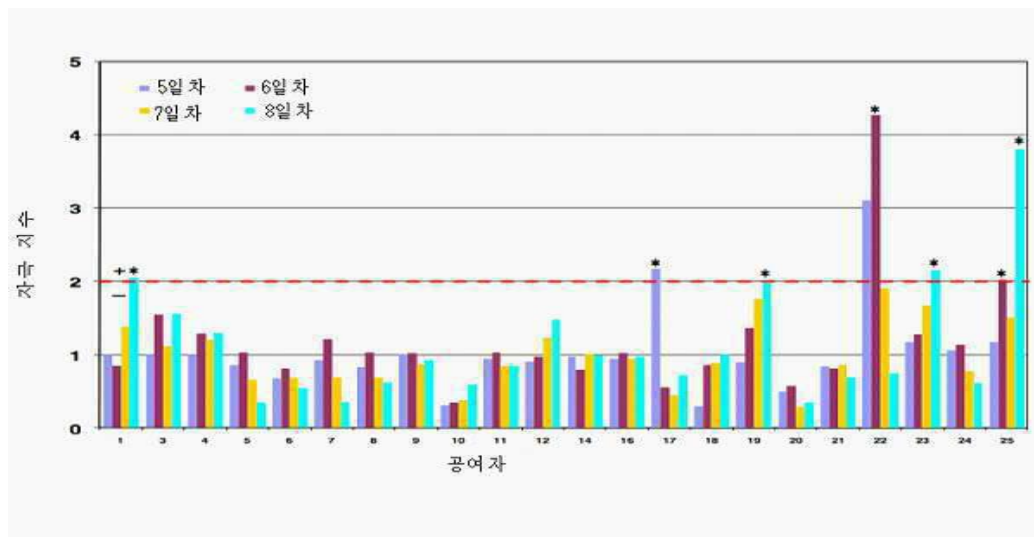
도면44b



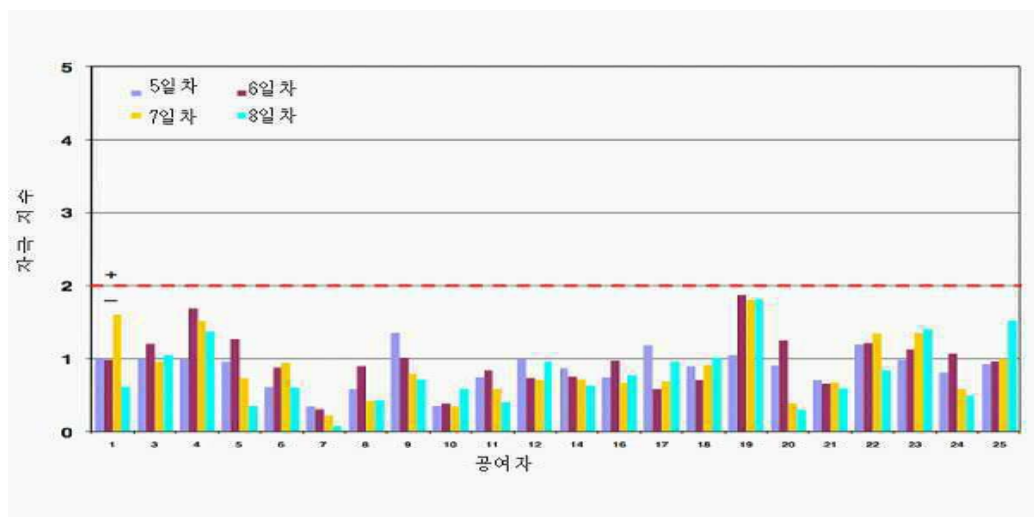
도면44c



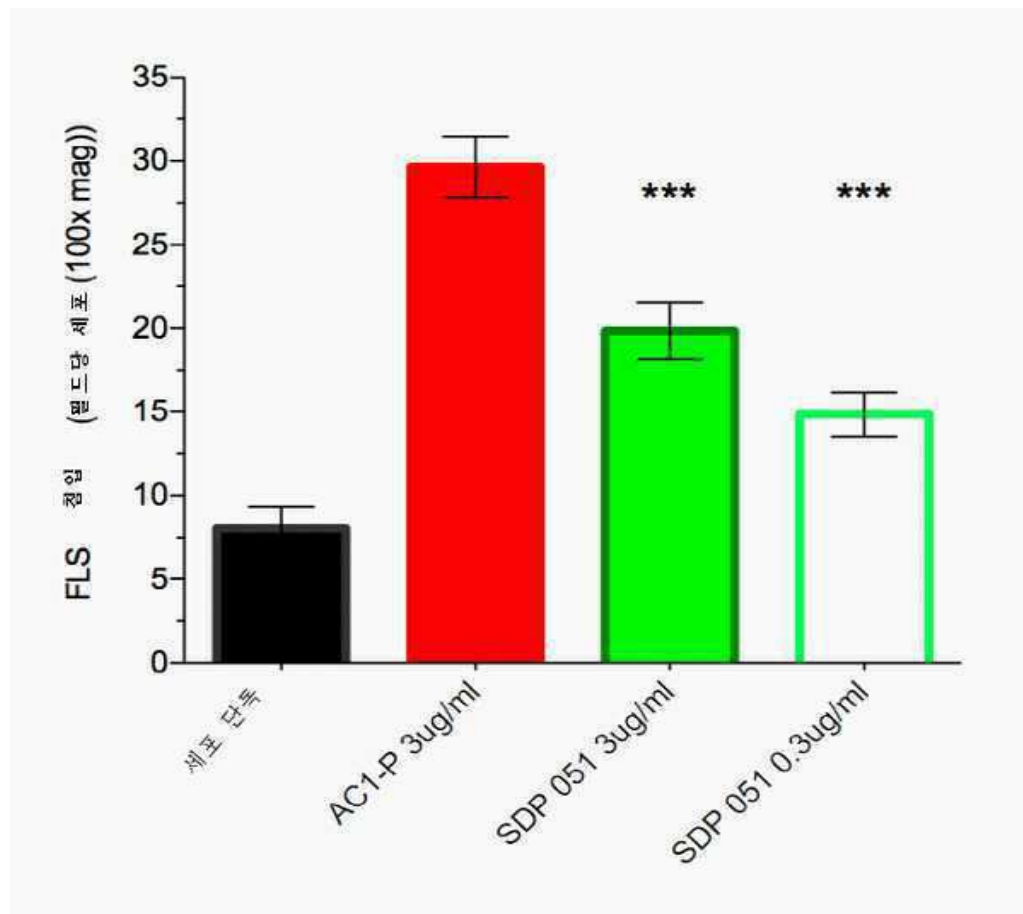
도면45a



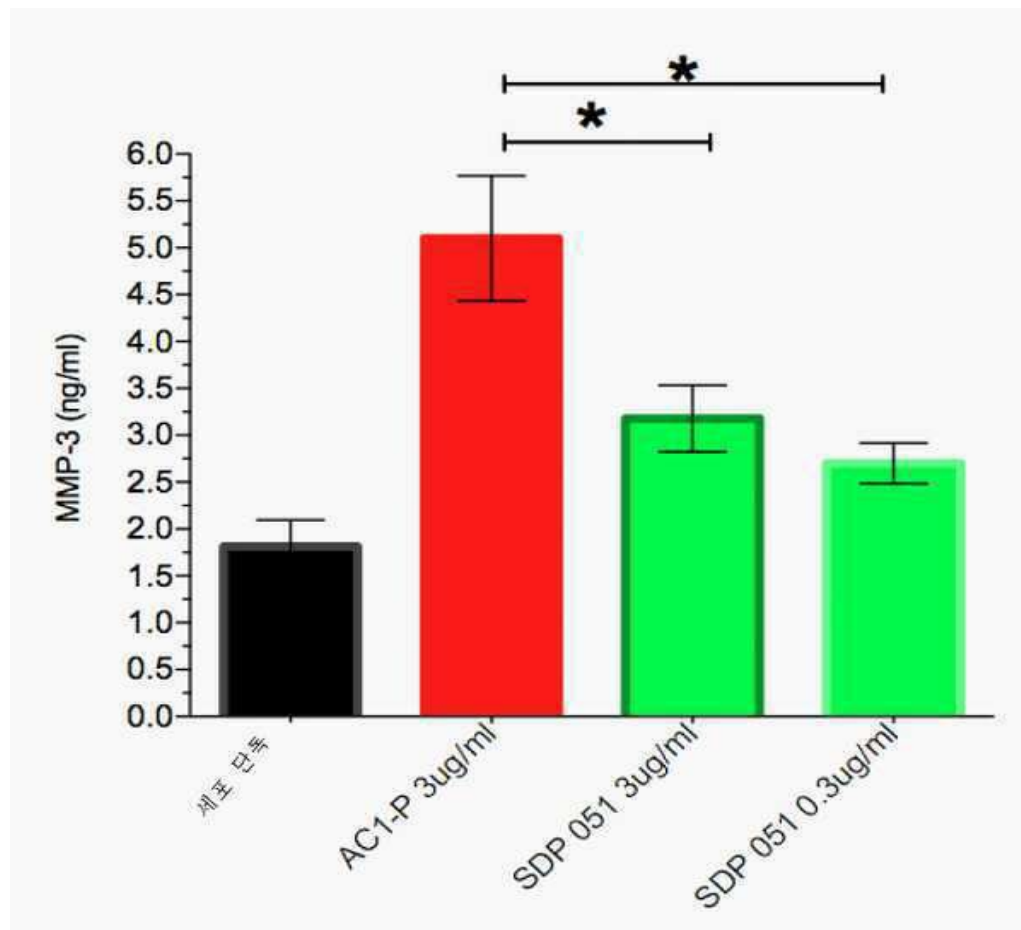
도면45b



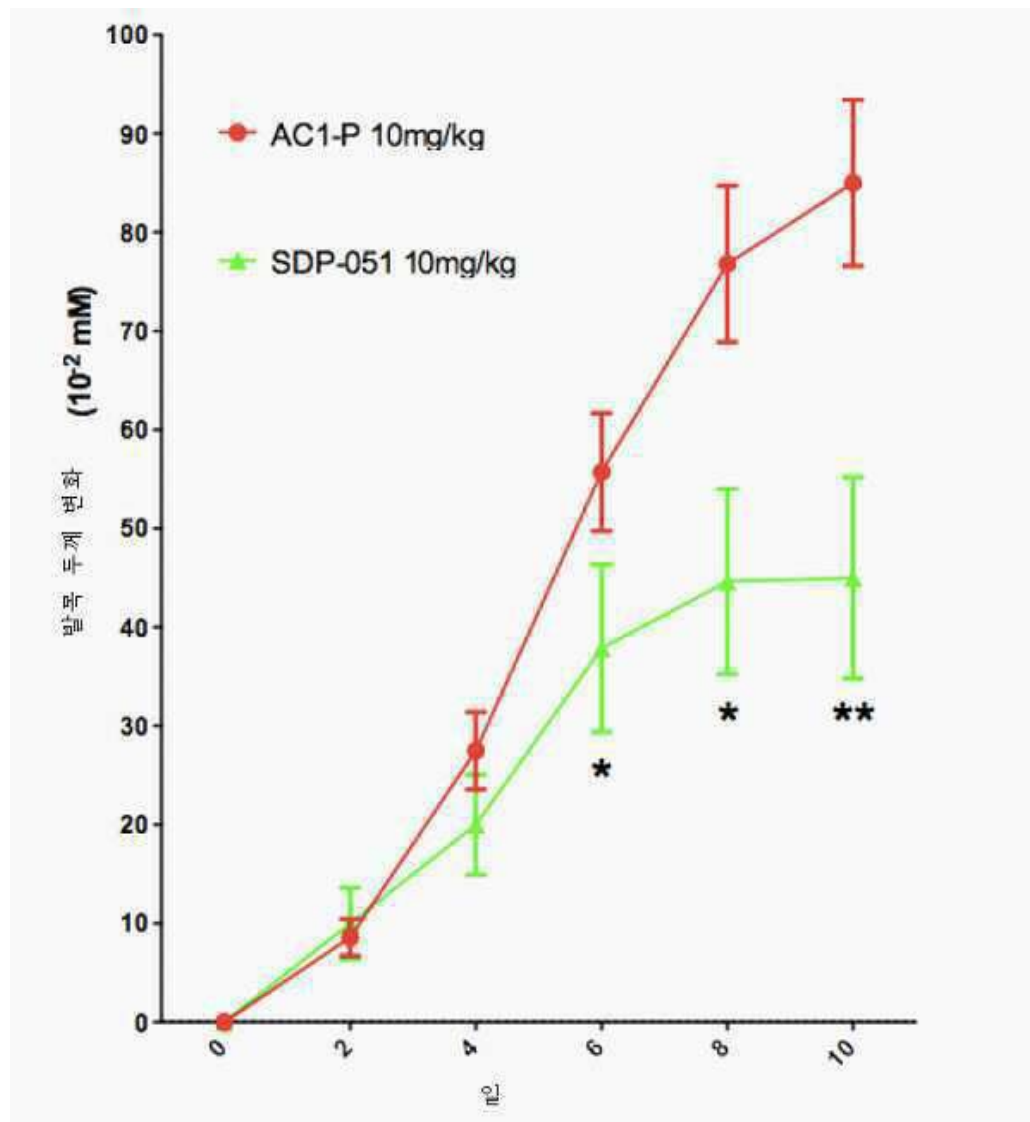
도면46



도면47

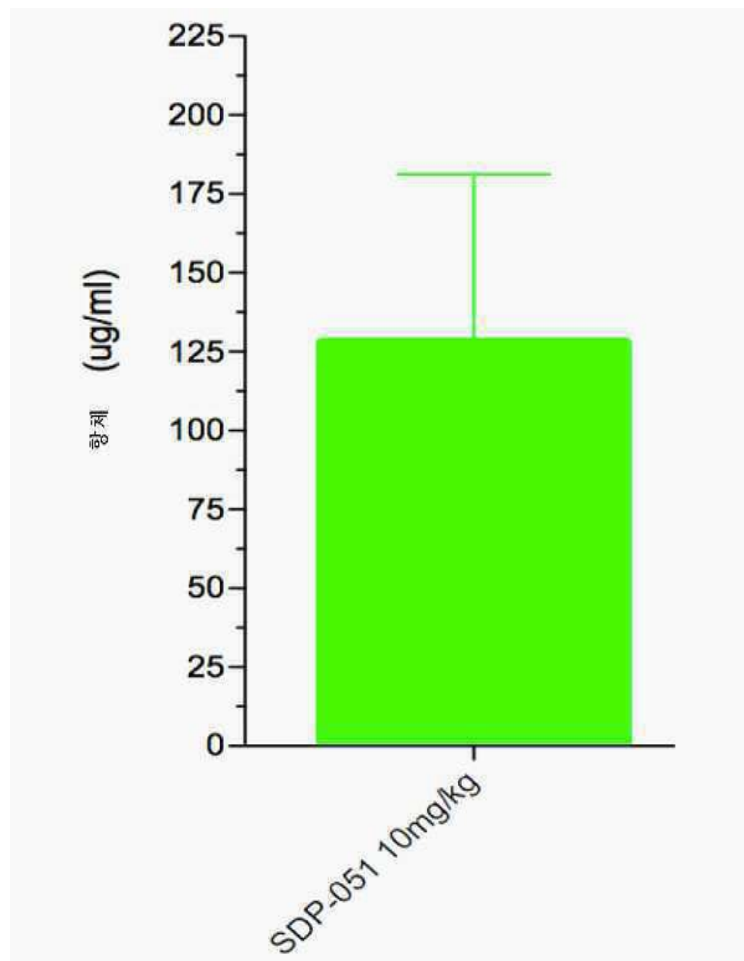


도면48

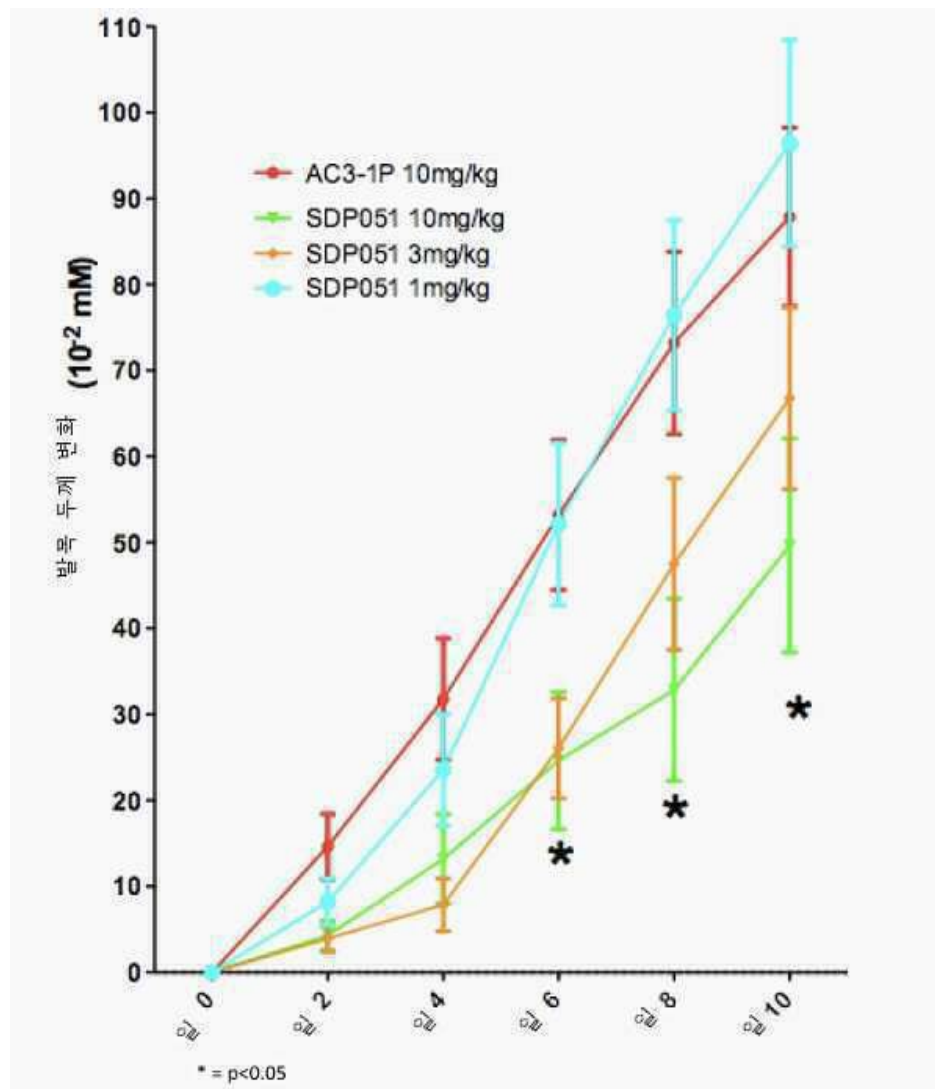




도면49



도면50



## 서열 목록

- <110> Synovex Corporation
- <120> HUMANIZED ANTIBODIES TARGETING THE EC1 DOMAIN OF CADHERIN-11 AND RELATED COMPOSITIONS AND METHODS
- <130> IPA130040
- <150> US 61/364,698
- <151> 2010-07-15
- <160> 75
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 3654
- <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agatgccgcg ggggccgctc gcagccgcg ctgacttggt aatgggaccg ggactggggc	60
cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcgga ggttgcgtcc	120
accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc	180
gtgttgatcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc	240
aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag	300
ctcaaccagc agagacattc catcccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac	360
cctcagcaag accaccgtac agttgggtgga aggggtgaca gctgcattct cctgtgccta	420
ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cgccctgtgtg tgcctgggca	480
tgctgtgcca cagccatgcc ttgtccccag agcggcgggg gcacctgcgg cctccttcc	540
atgggcacca tgagaagggc aaggaggggc aggtgctaca gcgtccaag cgtggctggg	600
tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccccggtg cttgtgggca	660
ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcagggaag	720
gagctggaac catttttgtg attgatgaca aatcaggga cattcatgcc accaagacgt	780
tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca	840
atcgccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc	900
ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa	960
cgtagtaat ccagggtgaca gcttcagatg cagatgaccc cacttatgga aatagcgcca	1020
agttagtgtg cagtatcctc gaaggacaac cctatttttc ggtggaagca cagacaggta	1080
tcacagAAC agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac cacgtggtga	1140
tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg gcggactctc agggacaacc aaagtgacga	1200
tcacactgac cgatgtcaat gacaaccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt	1260
ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag	1320
acattggaga aaatggctta gtcacataca atattgttga tggagatggt atggaatcgt	1380
ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg aggggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag	1440
attttgaaac caaaagagcc tatagcttga aggtagaggc agccaacgtg cacatcgacc	1500
cgaagttaa cagcaatggc cctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag	1560
atgctgatga gccccatg ttcttggtccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg	1620
cagctgctgg caccgtggtt gggagagtgc atccaaaga ccctgatgct gccaacagcc	1680
cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttact attaatccag	1740

aggatggttt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaacagcc tggctcaaca	1800
tcactgtctt tgcagcagaa atccacaatc ggcatcagga agccaaagtc ccagtggcca	1860
ttaggtcct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgccccctat gaaggtttca	1920
tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag	1980
atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatattatct cagcctaccc cctgaaatca	2040
ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc	2100
ggcgtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgccata gtgatcagcg	2160
atggcggcat cccgccatg agtagacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg	2220
acgtgaacgg ggcactgctc tcctgcaacg cagaggccta cattctgaac gccggcctga	2280
gcacaggcgc cctgatcgcc atcctcgctc gcatcgctcat tctcctggtc attgtagtat	2340
tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg	2400
tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aaggggttgg ggaagaagac acagaagcct	2460
ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca	2520
tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgccc aacagcgtgg	2580
atgtcgtatg cticcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc	2640
cttatgactc cattcaaac tacggttatg aaggcagggg ctcagtggcc gggtccctga	2700
gtccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg	2760
gacctggtt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt	2820
cttaacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta	2880
gaagatgtgt aaacaggtat tttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaag	2940
ttttacagag aggatacatt taataaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga	3000
aatacctttt ctcacaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaacttcg ctagaaaaaa	3060
aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg	3120
aagggaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtcttcc tttttttta agttgtcaaa	3180
gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaaactct	3240
ggacactcta tatgtatgac atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa	3300
cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcatc aatcttgta	3360
ctgctgattc ttgtaaatct ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgccagat	3420
ataactgtct tgtttcagtg agagacgccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt	3480

tgtacaattt taaagttctt attttagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa 3540

gaaaatgtta cggcatcaca cttatatatt atgaacattg tactgttgct ttaatatgag 3600

cttcaatata agaagcaatc ttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa 3654

<210> 2

<211> 796

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala

100 105 110

Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala

115 120 125

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

130 135 140

Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190	
Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe			
195	200	205	
Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met			
210	215	220	
Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp			
225	230	235	240
Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile			
245	250	255	
Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Ser Val			
260	265	270	
Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly			
275	280	285	
Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr			
290	295	300	
Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr			
305	310	315	320
Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp			
325	330	335	
Phe Glu Thr Lys Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val			
340	345	350	
His Ile Asp Pro Lys Phe Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val			
355	360	365	
Thr Val Lys Ile Ser Val Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu			
370	375	380	
Ala Pro Ser Tyr Ile His Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr			
385	390	395	400
Val Val Gly Arg Val His Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro			
405	410	415	
Ile Arg Tyr Ser Ile Asp Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr			
420	425	430	
Ile Asn Pro Glu Asp Gly Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg			



435                      440                      445  
 Glu Glu Thr Ala Trp Leu Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His  
 450                      455                      460  
 Asn Arg His Gln Glu Ala Lys Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp  
  
 465                      470                      475                      480  
 Val Asn Asp Asn Ala Pro Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile  
 485                      490                      495  
 Cys Glu Ser Asp Gln Thr Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr  
 500                      505                      510  
 Ile Ser Ala Asp Asp Lys Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile  
 515                      520                      525  
 Phe Ser Leu Pro Pro Glu Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg  
 530                      535                      540  
  
 Asp Asn Arg Asp Asn Thr Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe  
 545                      550                      555                      560  
 Ser Arg Gln Lys Gln Asp Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp  
 565                      570                      575  
 Gly Gly Ile Pro Pro Met Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val  
 580                      585                      590  
 Cys Gly Cys Asp Val Asn Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala  
 595                      600                      605  
 Tyr Ile Leu Asn Ala Gly Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu  
  
 610                      615                      620  
 Ala Cys Ile Val Ile Leu Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu  
 625                      630                      635                      640  
 Arg Arg Gln Lys Lys Glu Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val  
 645                      650                      655  
 Arg Glu Asn Ile Ile Thr Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp  
 660                      665                      670  
 Thr Glu Ala Phe Asp Ile Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn  
 675                      680                      685

Gly Phe Ile Pro Arg Lys Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro  
690 695 700  
Arg Pro Gly Leu Arg Pro Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe  
705 710 715 720  
Ile Asn Thr Arg Ile Gln Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro  
725 730 735  
Tyr Asp Ser Ile Gln Ile Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala  
740 745 750  
Gly Ser Leu Ser Ser Leu Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp

755 760 765  
Tyr Asp Tyr Leu Gln Asn Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp  
770 775 780  
Leu Tyr Gly Ser Lys Asp Thr Phe Asp Asp Asp Ser  
785 790 795

<210> 3  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 3

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

Gly Asn

<210> 4  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4

Gly Trp Val Trp Asn Gln Met Phe Val Leu Glu Glu Phe Ser Gly Pro  
1 5 10 15  
Glu Pro Ile Leu Val Gly Arg Leu His Thr Asp Leu Asp Pro Gly Ser

20 25 30

Lys Lys

<210> 5

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapeins

<400> 5

Ser Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Thr

1 5 10 15

Asp Pro Leu Tyr Val Gly Lys Leu His Ser Asp Met Asp Arg Gly Asp

20 25 30

Gly Ser

<210> 6

<211> 1145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ig fusion protein

<400> 6

atgaaggaga actactgttt acaagccgcc ctggtgtgcc tgggcatgct gtgccacagc 60

catgcctttg cccagagcgc gcgggggcac ctgcggccct ccttccatgg gcacccatgag 120

aagggaagg aggggcaggt gctacagcgc tccaagcgtg gctgggtctg gaaccagttc 180

ttcgtgatag aggagtacac cgggcctgac cccgtgcttg tgggcaggct tcattcagat 240

attgactctg gtgatgggaa cattaataac attctctcag gggaaggagc tggaaccatt 300

tttgtgattg atgacaaatc aggggaacatt catgccacca agacgttgga tcgagaagag 360

agagcccagt acacgttgat ggctcaggcg gtggacaggg acaccaatcg gccactggag 420

ccaccgtcgg aattcattgt caaggtccag agatctgtgg agtggccacc ttgcccagca 480

ccacctgtgg caggaccttc agtcttcttc ttcccccaa aaccaagga caccctgatg 540

atctccagaa cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccag 600

gtccagttca acttggtacgt ggacggcatg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg 660

gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac 720

tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc 780  
 gagaaaaacca tctccaaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 840  
 ccatccccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 900  
 taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 960  
 accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tcctttcttc tctacagcaa gctcacctg 1020

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtctg 1080  
 cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgagt gccacggcta 1140  
 gctgg 1145

<210> 7

<211> 380

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ig fusion protein

<400> 7

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala

100 105 110

Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala

115 120 125

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

130 135 140

Phe Ile Val Lys Val Gln Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 145                      150                      155                      160  
 Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
  
                          165                      170                      175  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
                          180                      185                      190  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
                          195                      200                      205  
 Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
                          210                      215                      220  
 Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp  
 225                      230                      235                      240  
  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
                          245                      250                      255  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
                          260                      265                      270  
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
                          275                      280                      285  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
                          290                      295                      300  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
                          325                      330                      335  
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
                          340                      345                      350  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
                          355                      360                      365  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Ala  
                          370                      375                      380

<210> 8

<211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 8  
 tttttttttg aattcatgaa ggagaactac tgtttacaag c 41  
 <210> 9  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 9  
 ttttttttta gatctctgga ccttgacaat gaattccgac gg 42  
 <210> 10  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro  
 1 5 10 15  
 Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp  
 20 25 30  
 Gly  
 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
 Gly Pro Asp Pro  
 1  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT



<213> Homo sapiens

<400> 12

Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn

1 5 10 15

Ile Lys Tyr

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro

1 5 10 15

Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp

20 25 30

Gly Asn Ile Lys Tyr

35

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 14

gggaattcat grasttskkg ytmactkgr ttt

33

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 15

gggaattcat graatgsasc tgggtywtc tctt

34

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 16

actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcct 39

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 17

actagtcgac atggctgtcy trgbgctgyt cytctg 36

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 18

actagtcgac atggvttggs tgtggamctt gcyattcct 39

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 19

actagtcgac atgaaatgca gctggrtyat sttctt 36

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 20

actagtcgac atggrcagrc ttacwtyytc attcct 36

<210> 21  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 21  
 actagtcgac atgatgggtgt taagtcttct gtacct 36  
 <210> 22  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 22  
 actagtcgac atgggatgga gctrtatcat sytctt 36  
 <210> 23  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 23  
 actagtcgac atgaagwtgt ggbtraactg grt 33  
 <210> 24  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (25)  
 <223> n = inosine  
 <400> 24  
 actagtcgac atggratgga sckknrtctt tmtct 35  
 <210> 25  
 <211> 35  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 25

actagtcgac atgaacttyg ggytsagmtt grttt 35

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 26

actagtcgac atgtacttgg gactgagctg tgtat 35

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 27

actagtcgac atgagagtgc tgattctttt gtg 33

<210>

28

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 28

actagtcgac atggattttg ggctgatttt ttttattg 38

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 29

cccaagctta cgagggggaa gacatttggg aa 32

<210> 30

<211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <220><221> misc\_feature  
  
 <222> (30)  
 <223> n = inosine  
 <400> 30  
 cccaagcttc cagggreccar kggataracn grtgg 35  
 <210> 31  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 31  
 gggaattcat gragwcacac wycaggtct tt 32  
 <210> 32  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 32  
 gggaattcat ggagacagac acactcctgc tat 33  
  
 <210> 33  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 33  
 actagtcgac atggagwcag acacactsct gytatgggt 39  
 <210> 34  
 <211> 42  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<220><221> misc\_feature

<222> (37)

<223> n = inosine

<400> 34

actagtcgac atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt 42

<210> 35

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 35

actagtcgac atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g 41

<210> 36

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 36

actagtcgac atgagtgtgc ycactcaggt cctggsgtt 39

<210> 37

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 37

actagtcgac atgtggggay cgktttyamm cttttcaatt g 41

<210>

38

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 38  
actagtcgac atggaagccc cagctcagct tctcttcc 38

<210> 39  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<220><221> misc\_feature  
<222> (16)..(22)  
<223> n = inosine  
<400> 39  
actagtcgac atgagmmkt cnmttcantt cytggg 36

<210> 40  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<220><221> misc\_feature  
<222> (22)..(34)  
<223> n = inosine  
<400> 40  
actagtcgac atgakgthcy cngctcagyt yctnrg 36

<210> 41  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<400> 41  
actagtcgac atggtrtccw casctcagtt ccttg 35

<210> 42  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer



<400> 42  
actagtcgac atgtatatat gttgttgct tatttct 37

<210> 43  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<400> 43  
actagtcgac atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgct 39

<210> 44  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<400> 44  
actagtcgac atggatttgc argtgcagat twtcagctt 39

<210> 45  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<400> 45  
actagtcgac atggtyctya tvtccttgct gttctgg 37

<210> 46  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer  
<400> 46  
actagtcgac atggtyctya tvtttrctgct gctatgg 37

<210> 47  
<211> 30  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 47

cccaagctta ctggatgggtg ggaagatgga 30

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 48

gggaattcat ggctggayt ycwctywtmy tct 33

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<220><221> misc\_feature

<222> (24)

<223> n = inosine

<400> 49

cccaagctta gctcytcwgw gganggyggr aa 32

<210> 50

<211> 356

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 50

gaggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctgggta ctcatctact ggctacttta tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggacgt attaatcctt aacttggtga tactttctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca aatcctctag cacagcccac 240

atggagctcc tgagcctgtc atctgaagac tctgcagtct attatgttg acgactcgg 300

agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctctc 356

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable heavy chain sequence

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable heavy chain CDR1

<400> 52

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable heavy chain CDR2

<400> 53

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

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable heavy chain CDR3

<400> 54

Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 55

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable light chain coding sequence

<400> 55

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcattata catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 56

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable light chain sequence

<400> 56

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

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable light chain CDR1

<400> 57

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable light chain CDR2

<400> 58

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> H1M1 variable light chain CDR3

<400> 59

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210>

60

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 60

gaggttcagc tggatgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60  
tcctgcaagg ctcttggtta ctcatctact ggctacttta tgaactgggt gaagcaggcc 120  
catggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acactggtga tactttctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgttgaca aatcctctag cacagcctac 240  
atggagctcg tgagcctgtc atctgaagac tctgcagtct attattgtgg acgactcgg 300  
agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 61

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ala His Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Val Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 62

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 62

gaggttcagc tgggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg ctcttggtta ctcatctact ggctacttta tgaactgggt gaagcaggcc 120

cctggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt aactgggtga tactttctac 180

aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgttgaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctct ccagcctgag atctgaagac accgcagtct attattgtgg acgactcggg 300

agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 63

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 64

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 64

gaggttcagc tgggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgaagg cttctggtta ctcatttact ggctacttta tgaactgggt gaggcaggcc 120



cctggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acactggtga tactttctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag ggccacattg actgttgaca aatccaccag cacagcctac 240

atggagctct ccagcctgag atctgaagac accgcagtct attattgtgg acgactcgg 300  
agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 65

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 66

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 66

gaggttcagc tgggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagggtg 60  
tcctgcaagg ctctcgttta ctcatcttact ggctacttta tgaactgggt gaggcaggcc 120  
cctggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatacctt acactgggtga tactttctac 180

aaccagaagt tcaagggcag ggccacaatc actgttgaca aatccaccag cacagcctac 240  
atggagctct ccagcctgag atctgaagac accgcagtct attattgtgg acgactcgggt 300  
agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 68

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 68

gaggttcagc tggatgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60  
tcctgcaagg cttctgggta ctcatttact ggctacttta tgaactgggt gaggcaggcc 120

cctggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acactggtga tactttctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag ggtgacaatc actgttgaca aatccaccag cacagcctac 240  
atggagctct ccagcctgag atctgaagac accgcagtct attattgtgg acgactcggt 300  
agtaggtact ggtacttcga tgtctggggc caggggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 69

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Leu Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 70

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 70

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc tcccctgtca cccttggaca gccagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcattata catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300

tggacgttcg gtcagggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 71

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

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

<210> 72

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 72

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc tcccctgtca cccttgaca gccagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcattata catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180  
 tctgggtcc cagacaggtt cagcggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctc 300  
 tggacgttcg gtcagggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 73

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

1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile His Ser  
                          20                      25                      30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                          35                      40                      45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                          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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85                      90                      95  
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100                      105                      110

<210> 74

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> coding sequence for humanized antibody chain

<400> 74

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc tcccctgtca cccttggaca gccagcctcc 60

atctcttgca gatctagtc gagcattata catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120  
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt 180  
tctgggggtcc cagacaggtt cagcggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240  
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300  
tggacgttcg gtcagggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> humanized antibody chain

<400> 75

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95  
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110