



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월03일
(11) 등록번호 10-1169254
(24) 등록일자 2012년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/42 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7018962
(22) 출원일자(국제) 2003년05월22일
심사청구일자 2008년05월09일
(85) 번역문제출일자 2004년11월23일
(65) 공개번호 10-2005-0008736
(43) 공개일자 2005년01월21일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2003/000425
(87) 국제공개번호 WO 2003/099196
국제공개일자 2003년12월04일
(30) 우선권주장
149820 2002년05월23일 이스라엘(IL)
(56) 선행기술조사문헌
US05897862 A1

(73) 특허권자
모르-리서치 어플리케이션즈 리미티드
이스라엘 49170 페타치 티크바 키리아트 메탈론
피.오. 박스 7590 하시빔 스트리트 23
큐어 테크 리미티드
이스라엘 야브네 81227 하야르콘 스트리트 42
(72) 발명자
하르디 브리타
이스라엘 텔아비브 69120 엘리야후 하킴 스트리트 6
조네스 스티븐 타르란
영국 헤르트포드셔어 더블유.디.7 8에이.지. 라드
레트 크리스티처치크레센트 1
클라퍼 레아
이스라엘 지바타임 53230 벤-지온 스트리트 10
(74) 대리인
정삼영

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **종양질병 또는 면역결핍의 치료를 위한 인간화된 면역조절단일항체**

(57) 요약

본 발명은 면역자극 효과를 가지는 인간화된 단일클론항체를 제공한다. 본 항체는 B 림프아구 세포에 특이적으로 결합하고, 말초혈액 림프구의 증식과 활성을 유도하며, 암으로부터 고통받는 환자에게 투여할 때 항암 효과를 도출할 수 있다.

대표도

```

ATGATTACAGGTCAGAGTATATCACTCTCTCTAATCAAGTGGTCACTGATTAATGTC
1  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 60
TACCTAAATGTCACGCTCTAATAGTCAGAGAGATTAATCAAGAGTCACTATACAGG
M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I N S

AGAGGACAAATGTTCTCACCAGTCTCCAGATCATGCTCGATCTCCAGGAGAGAG
61  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 120
TCTCTCTTTACAGAGAGTGGTCAAGTCTTTTATACAGAGTCAAGTGGTGGTGGTTC
R D Q I Y L T Q S P A I M S A S P G B K

GTCACTATACAGTTCAGTTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG
121  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 180
CACTGATTTAGAGTTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG
V T I T C B A R S S V S Y M H W F Q Q K

CCAGGCACTCTCTCCAACTCTGATTTATAGGACATCCAACTCTGATTTCTGATTTCTG
181  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 240
GTTCTCTTGAAGAGGTTTGAAGACCTAAATATCTCTAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG
P G T S F K L W I Y R T S N L A S G V P

GCTCACTTCAGTTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAG
241  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 300
CAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG
A R F S G S G S G T S Y C L T I S E M E

GCTGAGATGCTCCCACTTATTACTCCAGCAAGAGGATTTCCCACTCACTTCAGGTCAGG
301  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 360
CACTTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGG
A R D A A T Y Y C Q G R S S F P L T F G

TCGGGACAAAGTTGAAATAAA
361  - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 4 - - - - - 384
AGGCTCTTTCACTTATTTT
S G T K L R I K

```

특허청구의 범위

청구항 1

BATRH_A/BATR_{KA} (SEQ. ID NO. 20/SEQ. ID NO. 15),

BATRH_B/BATR_{KA} (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 15),

BATRH_B/BATR_{KB} (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 16),

BATRH_C/BATR_{KB} (SEQ. ID NO. 22/SEQ. ID NO. 16),

BATRH_B/BATR_{KD} (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 18), 또는

BATRH_C/BATR_{KD} (SEQ. ID NO. 22/SEQ. ID NO. 18)

의 군으로부터 선택된 가변 영역을 포함하는, 인간화된 단일클론 항체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 전체 길이 항체인 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 항체는 이소형태의 IgG인 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 이소형태 서브클래스는 IgG1 또는 IgG4로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서, 인간 카파 불변영역을 가지는 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 고체 상에서 고정화되거나, 이형 화합물과 접합된 검출가능한 표지로 더 표지되는 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제 1 항에 있어서, CDR 이식을 사용한 재조합 DNA 기술에 의하여 생산되는 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체.

청구항 20

제 1 항, 제 9 항, 제 10 항, 제 11 항, 제 14 항, 제 16 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 인간화된 단일클론 항체를 코딩하는, 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 21

삭제

청구항 22

제 20 항에 있어서, SEQ ID NO. 87, SEQ ID NO. 88, SEQ ID NO. 89로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 23

삭제

청구항 24

제 20 항에 있어서, SEQ ID NO. 90, SEQ ID NO. 91 및 SEQ ID NO. 92로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 25

제 20 항의 분리된 폴리뉴클레오티드 중 하나를 포함하는 벡터.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 프로모터, 하나 이상의 저항 유전자, Kozak 서열, 복제 원점, 하나 이상의 선택 마커 유전자, 인핸서 요소, 전사 종결자, 단일 펩티드, 게놈

인간 카파 불변영역, 게놈 인간 IgG 불변영역으로 구성되는 군으로부터 선택된 구성요소를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 또는 바이러스인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 28

제 27 항에 있어서, pKN110, pG1D200, pG1KD210, pUC 또는 pBR322로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 29

제 25 항에 있어서, SEQ ID NO. 93의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 30

제 25 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 항체를 발현할 수 있는 숙주세포.

청구항 32

제 30 항에 있어서, 상기 숙주세포는 진핵 또는 원핵으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 33

제 30 항에 있어서, CHO, CHOdhfr, NSO, COS 또는 COS7 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 숙주세포.

청구항 34

제 1 항, 제 9 항, 제 10 항, 제 11 항, 제 14 항, 제 16 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 인간화된 단일클론 항체를 활성 성분으로 포함하고, 상기 항체는 림프구에 결합하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌종, 멜라닌종의 폐전이, 직장결장암, 직장결장암의 간전이, 전립선 암, 림프종 및 백혈병 치료용 약학적 조성물.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 안정제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 멜라닌종, 멜라닌종의 폐전이, 직장결장암, 직장결장암의 간전이, 전립선 암, 림프종 및 백혈병 치료용 약학적 조성물.

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

제 1 항, 제 9 항, 제 10 항, 제 11 항, 제 14 항, 제 16 항 또는 제 19 항 중 어느 한 항의 인간화된 단일클론 항체 생산 방법으로서,

(i) 숙주세포를 상기 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나의 벡터로 트랜스펙션하거나, 또는 숙주세포를 상기 항체의 중쇄 또는 경쇄 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 각각 포함하는 2 벡터로 동시-트랜스펙션하는 단계;

(ii) 상기 항체가 발현되도록 (i)의 숙주세포를 인큐베이션하는 단계; 및

(iii) (ii)의 숙주세포 인큐베이션으로부터 항체를 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화된 단일클론 항체 생산 방법.

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

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 면역요법 분야에 관련되고, 보다 상세하게는 다양한 징후의 요법, 특히 암의 치료에 유용한 인간화된 단일클론항체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 여러가지 형태인 암은 인간에서 사망의 주된 원인이다. 가장 널리 사용되는 암의 치료법은 외과수술, 방사선 및 화학요법이다. 특히 T-세포 반응의 수준에서 면역조절의 분자 세포적 기초에 대한 최근의 빠른 기술 발전은 암백신의 발전을 포함하는 면역요법적 접근의 새로운 기반을 제공한다. 어떠한 단일클론항체는 T 세포의 표면 상의 결정기에 결합하는 능력을 포함하는 면역조절 활성을 가지고, 이러한 세포들의 증식, 활성 또는 분화를 유도하는 것으로 나타났다.

[0003] 생쥐 하이브리도마로부터 유래한 단일클론항체는 인간 환자로 주사되었을 때 면역원이 되는 상당한 길이의 아미노산 서열을 함유하기 때문에, 초기 치료 후에 종종 항체의 치료 효능이 제거된다. 소위 "키메라항체" (즉, 생쥐 가변영역이 인간 불변영역에 연결됨)의 생산이 어느정도 성공적으로 증명되었으나, 중요한 면역원성 장애가 남아있다.

[0004] 재조합 DNA 기술이 공여체 생쥐 또는 쥐 면역글로불린으로부터 상보성 결정영역 (CDR)과 조합된 인간 프레임워크영역 (FR)을 함유하는 면역글로불린을 생산하기 위하여 사용되어졌다. 이러한 새로운 단백질은 "모양이 고쳐진 (reshaped)" 또는 "인간화된" 면역글로불린이라고 하며, "인간화"로 명명되는 과정에 의하여 공여체 면역글로불린은 그것의 CDR을 인간 프레임워크와 조합함으로써 인간-유사 면역글로불린으로 전환된다. 인간화된 단일클론 항체는 원항체와 동일한 항원에 결합하지만, 인간에 주사되었을 때 적은 면역원성을 가지기 때문에 중요하다.

[0005] US Patent No. 6,294,654는 불변 도메인 프레임워크의 주요한 윤곽을 유지하면서 면역글로불린에 1 또는 그 이상의 비-CDR 루프로 통합된 외래 항원성 펩티드를 가지는 수식된 면역글로불린 분자 또는 기능단편 또는 그들의

부분을 공개하였다. 치료 또는 예방적 사용을 위한 수식된 항체의 용도가 더 공개되었다.

- [0006] US Patent No. 6,074,635는 항원의 부재에서 T 세포를 인터류킨-2, 인터류킨-6 및 종양괴사인자 알파, 또는 그들의 동등한 작용 단편으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 2 시토카인의 조합과 접촉하는 것을 포함하는 시험관 내에서 T 세포의 항원 비의존적 활성화에 대한 방법을 공개하였다.
- [0007] US Patent No. 5,658,741은 T-세포의 활성화 증식을 유도하는 방법을 공개하였는데, 상기 방법은 (a) 다수의 T-세포 특이적 단일클론항체를 7 - 20 % 중량의 아민기와 적어도 100,000 달톤 (dalton)의 분자량을 가지는 아미노텍스트란 분자와 접합하고, 상기 항체 대 상기 아미노텍스트란의 몰비는 2 보다 크거나 같고, (b) 상기 접합체를 상기 T 세포를 함유한 샘플과 반응하여, 상기 T 세포에 상기 접합된 항체의 결합에 영향을 주고, 상기 T 세포의 활성화 증식을 유도하는 것을 포함한다.
- [0008] Queen et al.의 US Patent 5,585,089는 공여체 면역글로불린으로부터 CDR 그리고 인간 수용체 면역글로불린 중 및 경쇄로부터 중쇄 및 경쇄 가변영역 프레임워크를 가지는 인간화된 면역글로불린을 공개하였으며, 인간화된 면역글로불린은 적어도 10^7 M^{-1} 의 친화도 상수 및 공여체 면역글로불린의 그것에 약 4 배 보다 크지 않게 항원에 특이적으로 결합하고, 상기 인간화된 면역글로불린은 공여체 면역글로불린 프레임워크 외부 Kabat 및 Chothia CDR로부터의 아미노산을 포함하고, 상기 공여체 아미노산은 수용체 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 프레임워크에서 대응하는 아미노산을 대체하고, 그리고 상기 각 공여체 아미노산은 (I) 공여체 면역글로불린 서열에서의 CDR에 인접하고, 또는 (II) 상기 인간화된 면역글로불린에서의 CDR의 4 Å 거리 내에서 원자를 함유한다.
- [0009] Winter의 US Patent 5,225,539는 변화된 항체 또는 그들의 항원-결합 단편을 공개하며, 상기 항체 또는 항원-결합 단편의 가변 도메인은 제 1 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 영역 및 제 2 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 CDR을 가지고, 상기 제 2 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인은 항원 결합 특이성, 항원 결합 친화성, 중, 과 또는 아과에 있어서 상기 제 1 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인과 다르다.
- [0010] US 5,225,539 및 US Patent 5,585,089는 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자 (이하, 당업자)에 의하여 변화된 항체, 특히 인간화된 단일클론 항체의 합성을 수행하기 위한 충분한 도구와 설명을 제공하지 않는다.
- [0011] 참고문헌에 의하여 본원에 수록된 본 발명의 발명자 중 1 인의 US Patent No. 5,897,862는 단일클론항체 또는 그들의 항원 결합 단편을 공개하며, 상기 단일클론항체는 (i) Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)에서 Accession No. I-1397로 보관된 하이브리도마 세포주에 의하여 분비되거나, (ii) (i)의 항체와 동일한 항원성 에피토프를 인식한다. US 5,897,862에서 공개된 단일클론항체는 "Daudi" 세포, 인간 B 림프아구 세포주에 대한 것으로 제시되고, 뮤린 (murine) 림프구 및 인간 말초혈액 T 세포를 자극하는 것으로 나타난다 (Hardy et al., Cell Immunol. 118:22, 1989). 본 뮤린 항체는 또한 본원에서 이하 mBAT-1로 명명한다. 또한 mBAT-1은 인간 기원의 암종 (Hardy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:5756, 1997)을 포함한 여러가지 형태의 암종에서 항암 및 면역자극 효과를 나타낸다 (Hardy et al., Int. J. Oncol. 19:897, 2001).
- [0012] 참고문헌에 의하여 본원에 수록된 본 발명의 발명자 중 1 인의 국제출원 WO 00/58363은 mBAT-1의 중쇄 가변영역 및/또는 카파 경쇄 가변영역 또는 mBAT-1의 중쇄 가변영역 및/또는 카파 경쇄 가변영역과 적어도 70 %의 동일성을 가지는 중쇄 가변영역 및/또는 카파 경쇄 가변영역을 가지는 단일클론항체를 공개한다.
- [0013] 뮤린 기원의 CDR 및 인간 기원의 FR를 포함하는 인간화된 단일클론항체가 면역 반응을 도출할 수 있고, 더 나아가 항암 활성을 나타낼 수 있다는 것이 가르쳐지거나 제안된 것은 종래기술의 어디에도 없다. 더구나, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 합성은 예상할 수 없거나 종래기술에 기초될 수 없다는 것이 당해 기술분야에서 잘 알려진 바이므로, 기능적인 인간화된 단일클론 항체를 설계하는 믿을 만한 방법에 대한 필요가 있다.
- [0014] **발명의 개요**
- [0015] 본 발명의 목적은 B 림프아구 세포에 결합하고 말초혈액 림프구의 증식과 활성을 유도하는 인간화된 단일클론 면역조절 항체 (이후 본원에서 또한 hBAT-1로 명명)를 제공하는 것이다. 상기 hBAT-1은 B 림프아구 세포에 결합하고 말초혈액 림프구의 증식과 활성을 유도하며 더 나아가 암종을 가지는 환자에게 주사될 때 항암 효과를 도출하는 종래 공지된 뮤린 단일클론 면역조절 항체 (이후 본원에서 또한 mBAT-1로 명명)에 기초한다.
- [0016] 본 발명은 각 합성 단계에 대한 합리적 근거와 함께 mBAT-1의 인간화 과정의 상세한 설명을 제공한다. 그러므로 본 발명에서 제공되는 인간화 과정의 설명은 당업자에 의한 mBAT-1과는 다른 BAT 항체의 인간화에 적합하다.

- [0017] 인간화된 BAT-1 항체의 투여는 암의 치료적 예방, 검출 또는 치료에 대한 방법을 제공한다. 본 발명에 의하여 제공되는 것으로 본 BAT-1 항체의 인간화된 형태를 가지고 그들을 필요로하는 환자의 치료는 키메릭 BAT-1 항체로 치료하는 것 보다 상당히 더 효율적이며, 면역원성 역반응을 피할 수 있다.
- [0018] 본 발명은 인간화된 BAT-1 항체가 모체 무린 BAT-1 항체에 의하여 유도되는 것 보다 더 큰 항암 효과를 유도하는 것으로 나타난 기대하지 않은 발견에 부분적으로 기초된다.
- [0019] 첫번째 관점에 관하여, 본 발명은 공여체 면역글로불린으로부터 적어도 하나의 CDR과 수용체 면역글로불린으로부터 하나의 FR을 포함하는 인간화된 단일클론항체를 제공한다.
- [0020] 하나의 구체예에 관하여, 본 발명은 공여체 면역글로불린으로부터 적어도 하나의 CDR과 수용체 면역글로불린으로부터 하나의 FR을 포함하는 인간화된 단일클론항체를 제공한다.
- [0021] 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 단일클론 면역조절 항체를 제공하며, 여기에서 CDR의 공여체는 무린 단일클론 BAT-1 항체 (mBAT-1)이다.
- [0022] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 단일클론 면역조절 항체를 제공하며, 여기에서 FR이 유래되는 수용체는 인간 면역글로불린이다.
- [0023] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 공여체 무린 단일클론 BAT-1 항체 (mBAT-1)로부터 적어도 하나의 CDR과 수용체 인간 면역글로불린으로부터 유래된 FR을 포함하는 단일클론 면역조절 항체를 제공하며, 여기에서 인간화된 단일클론 항체는 mBAT-1 단일클론 항체의 생물학적 활성을 보유하고 인간 환자에서 상기 무린 항체보다 적은 면역원성이다.
- [0024] 또 다른 구체예에 관하여, 인간화된 BAT-1 항체의 경쇄 가변영역은 식 $FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4}$ 에 의하여 특징되며, 상기 각 FR은 인간화된 BAT-1 항체의 독립적인 하나의 프레임워크 영역이고, 각 CDR은 단일클론 mBAT-1 항체의 독립적인 CDR이다.
- [0025] 또 다른 구체예에 관하여, 인간화된 BAT-1 항체의 중쇄 가변영역은 식 $FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4}$ 에 의하여 특징되며, 상기 각 FR은 인간화된 BAT-1 항체의 독립적인 하나의 프레임워크 영역이고, 각 CDR은 단일클론 mBAT-1 항체의 독립적인 CDR이다.
- [0026] 상세한 구체예에 관하여, 본 발명은 인간 TEL9 항체의 경쇄 가변영역으로부터 유래한 FR을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0027] 다른 상세한 구체예에 관하여, 본 발명은 FR_{L1} , [EIVLT QSPSS LSASV GDRV T ITC; SEQ. ID NO. 1]; FR_{L2} , [W (F 또는 Y) QKPG KAPKL (W 또는 L) IY; SEQ. ID NO. 2]; FR_{L3} , [GVPSR FSGSG SGT (D 또는 S) (Y 또는 F) (C 또는 T) LTINS LQPED FATYY C; SEQ. ID NO. 3]; FR_{L4} , [FGGGT KLEIK; SEQ. ID NO. 4]로 구성되는 군으로부터 선택된 인간 TEL9 항체의 경쇄 가변영역으로부터 유래한 FR 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0028] 또 다른 상세한 구체예에 관하여, 본 발명은 인간 hsighv1295 항체의 중쇄 가변영역으로부터 유래한 FR를 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0029] 또 다른 상세한 구체예에 관하여, 본 발명은 FR_{H1} , [Q (I 또는 V) QLV QSGSE LKKPG ASVKI SCKAS GY (T 또는 S) F (T 또는 S); SEQ. ID NO. 5]; FR_{H2} , [WV (R 또는 K) QAPGQ GL (Q 또는 K) WMG; SEQ. ID NO. 6]; FR_{H3} , [RF (V 또는 A) FSLDT SV (N 또는 S) TAYLQ ITSL (T 또는 N) AEDTG MYFC (V 또는 A) (R 또는 K); SEQ. ID NO. 7]; FR_{H4} , [WGQGT LVTVS S; SEQ. ID NO. 8]으로 구성되는 군으로부터 선택되는 인간 hsighv1295 항체의 중쇄 가변영역으로부터 유래한 FR 아미노산 서열을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0030] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 CDR_{L1} [SARSS VSYMH; SEQ. ID NO. 9]; CDR_{L2} [RTSNL AS; SEQ. ID NO. 10]; CDR_{L3} [QQRSS FPLT; SEQ. ID NO. 11]로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 하나의 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공하며, 상기 CDR은 무린 BAT-1으로부터 유래하고, 아래첨자 "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄를 나타낸다.
- [0031] 또 다른 상세한 구체예에 관하여, 본 발명은 CDR_{H1} [NYGMN; SEQ. ID NO. 12]; CDR_{H2} [WINTD SGEST YAEF KG; SEQ. ID NO. 13]; CDR_{H3} [VG YDA LDY; SEQ. ID NO. 14]으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함

하는 하나의 중쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.

- [0032] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체는 인간 면역글로불린 불변영역을 가지는 전체 길이 항체, 특히 서브클래스 $\gamma 1$ 또는 $\gamma 4$ 의 단일클론 IgG, 단일 사슬 항체, $F(ab')_2$ 단편 또는 $F(ab)$ 또는 F_v 를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아닌 항체 단편, 표지된 항체, 고정화된 항체, 이중화합물로 접합된 항체로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0033] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 $BATR_{kA}$ (SEQ. ID NO. 15), $BATR_{kB}$ (SEQ. ID NO. 16), $BATR_{kC}$ (SEQ. ID NO. 17), $BATR_{kD}$ (SEQ. ID NO. 18)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 경쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0034] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 $BATRH_A$ (SEQ. ID NO. 20), $BATRH_B$ (SEQ. ID NO. 21), $BATRH_C$ (SEQ. ID NO. 22), $BATRH_D$ (SEQ. ID NO. 23) 또는 $BATRH_E$ (SEQ. ID NO. 24)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 중쇄 가변영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0035] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 $BATRH_A/BATR_{kA}$ (SEQ. ID NO. 20/SEQ. ID NO. 15), $BATRH_B/BATR_{kA}$ (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 15), $BATRH_B/BATR_{kB}$ (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 16), $BATRH_C/BATR_{kB}$ (SEQ. ID NO. 22/SEQ. ID NO. 16), $BATRH_B/BATR_{kD}$ (SEQ. ID NO. 21/SEQ. ID NO. 18), 또는 $BATRH_C/BATR_{kD}$ (SEQ. ID NO. 22/SEQ. ID NO. 18)로 구성되는 군으로부터 선택되는 가변영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다.
- [0036] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체는 CDR 이식을 사용한 재조합 DNA 기술에 의하여 생성된다.
- [0037] 두번째 관점에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 폴리뉴클레오티드는 전체 인간화된 단일클론 항체 또는 경쇄 가변영역 또는 중쇄 가변영역 또는 본 인간화된 단일클론 항체의 가변영역의 양 사슬을 코드할 수 있다. 본 발명은 더 나아가 본 발명의 인간화된 단일클론 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 결과적으로, 본 인간화된 BAT-1 항체는 중쇄 및 경쇄 벡터의 동시-트랜스펙션 (co-transfection) 또는 경쇄 및 중쇄 폴리뉴클레오티드 서열 양자를 포함하는 단일 벡터의 트랜스펙션에 의하여 숙주세포에서 발현될 수 있다.
- [0038] 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0039] 다른 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 카파 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 상기 카파 경쇄 가변영역은 SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0040] 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO. 87, SEQ ID NO. 88, SEQ ID NO. 89로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0041] 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하며, 상기 중쇄 가변영역은 SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0042] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 중쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO. 90, SEQ ID NO. 91, SEQ ID NO. 92로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0043] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 인간화된 BAT-1 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0044] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0045] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 전체 인간화된 단일클론 항체, 경쇄 가변영역, 중쇄 가변영역, 가변영역의 양쇄로 구성되는 군으로부터 선택되는 본 발명의 인간화된 단일클론 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

- [0046] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 카파 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공하며, 상기 카파 경쇄 가변영역은 SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 16, SEQ ID NO. 17, SEQ ID NO. 18로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0047] 또 다른 구체예에 관하여, 본 벡터는 저항 유전자, 프로모터, 신호 펩티드, 폴리A 전사 종결자, 선택 마커, 게놈 인간 카파 불변영역으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나의 구성요소를 코딩하는 적어도 하나의 서열을 더 포함한다.
- [0048] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 벡터의 구성요소는 앰피실린 저항 유전자, 네오마이신 저항 유전자, HCMV 즉발 초기 프로모터, 게놈 인간 카파 불변영역, 생쥐 면역글로불린 신호 펩티드 서열, Kozak 서열, 인트론 신호 서열, BGH 폴리A 전사 종결자, Neo/G418 선택 마커, 햄스터 dhfr 선택 마커로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0049] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공하며, 상기 중쇄 가변영역은 SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0050] 또 다른 구체예에 관하여, 본 벡터는 저항 유전자, 프로모터, 신호 펩티드, 폴리A 전사 종결자, 선택 마커, 게놈 인간 Ig 불변영역으로 구성되는 군으로부터 선택된 구성요소를 코딩하는 적어도 하나의 서열을 더 포함한다.
- [0051] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 벡터의 구성요소는 앰피실린 저항 유전자, 네오마이신 저항 유전자, HCMV 즉발 초기 프로모터, 게놈 인간 IgG1 불변영역, 생쥐 면역글로불린 신호 펩티드 서열, Kozak 서열, 인트론 신호 서열, BGH 폴리A 전사 종결자, Neo/G418 선택 마커, 햄스터 dhfr 선택 마커로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0052] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 pKN110-BATR_{KA}, pKN110-BATR_{KB} 및 pKN110-BATR_{KD}으로 구성되는 군으로부터 선택되는 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 카파 경쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0053] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 pG1D110-BATRH_A, pG1D110-BATRH_B, pG1D110-BATRH_C로 구성되는 군으로부터 선택되는 본 발명의 인간화된 단일클론 항체의 중쇄 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0054] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명은 SEQ ID NO. 93의 본 발명의 완전한 인간화된 단일클론 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0055] 세번째 관점에 관하여, 본 발명은 저장, 전파, 항체 생산 및 치료적 적용의 목적으로 본 발명의 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 함유하는 세포를 제공한다.
- [0056] 다른 구체예에 관하여, 숙주세포는 CHO, CHOdhfr, NSO, COS, COS7으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0057] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 진단 및 치료의 용도로 본 발명의 항체를 활성 성분으로서 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0058] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명의 항체를 활성 성분으로서 포함하는 약학적 조성물은 바람직하게는 암의 치료를 위하여 사용된다.
- [0059] 또 다른 구체예에 관하여, 본 약학적 조성물은 환자에서 제 1 기 또는 제 2 기 암의 검출 후 또는 암으로 발달하는 높은 위험을 가지는 환자의 예방적 치료로서 투여될 수 있다.
- [0060] 또 다른 바람직한 구체예에 관하여, 본 발명의 인간화된 단일클론 항체는 다양한 암에서 항암 효과를 도출한다.
- [0061] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 활성 성분으로서 본 발명의 항체를 포함하는 효과적인 양의 약학적 조성물을 그들을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 이상, 특히 암의 진단 또는 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0062] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명의 항체는 그것과 추가적 또는 상승적 방식으로 작용할 수 있는 다른 약물의 투여와 함께, 이전에, 또는 후에 투여된다.
- [0063] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명의 항체는 시토카인, IL-1 (인터류킨-1), IL-2, IL-6, INF- α (인터페론- α),

세포 백신, 항체, T-세포 자극 항체, 항암 치료 항체로 구성되는 군으로부터 선택되는 약물의 투여와 함께, 이전에, 또는 후에 투여된다.

[0064] 본 발명의 특별한 구체예에 관하여, 인간화된 BAT 단일클론 항체는 그들의 기능 또는 활성에 있어서 ATCC # (PTA-5189)로 보관된 세포에 의하여 생산된 것과 동일하다.

[0065] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 첨부된 청구항으로부터 명백하게 될 것이다.

발명의 상세한 설명

[0102] I. 정 의

[0103] 편의를 위하여 발명의 상세한 설명, 실시예 및 청구의 범위에서 사용되는 특정 용어가 설명된다.

[0104] 용어 "항체"는 최광의로 사용되고, 상세하게는 단일클론 항체 (전체 길이 단일클론 항체를 포함) 및 그들이 희망하는 생물학적 활성을 가지는 한 항체 단편을 포함한다. "항체 단편"은 전체 길이 항체의 한 부분, 일반적으로 항원 결합 또는 그들의 가변영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 F_v 단편; diabody; 선형 항체; 단일사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성되는 다중특이적 항체를 포함한다.

[0105] 본원에서 사용되는 것으로 용어 "단일클론 항체"는 단일 항원성 위치 대하여 고도의 특이성인 항체를 나타낸다. 본 발명에 관하여 사용되는 단일클론 항체는 재조합 DNA 방법에 의하여 제조될 수 있다 (예를 들어, Cabilly et al.의 U. S. Patent 4,816,567 참고).

[0106] 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 정의되는 추가변영역 잔기와는 다른 가변 도메인 잔기이다. 본원에서 사용되어질 때 용어 "추가변영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 나타낸다. 추가변영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 항원의 에피토프에 결합하는 것을 우선적으로 담당한다. FR 및 CDR의 범위는 정확하게 정의되어졌다 (Kabat et al., ibid 참고).

[0107] 본원에서 사용되는 것으로, 용어 "인간화된 항체"는 인간 항체로부터의 프레임워크 영역과 비-인간 (대개 생쥐 또는 쥐) 면역글로불린으로부터 1 또는 그 이상의 CDR을 포함하는 항체를 나타낸다. CDR을 제외한 인간화된 단일클론 항체의 부분들은 필수적으로 원 인간 면역글로불린 서열의 상응하는 부분들과 동일하다. 중요하게, 인간화된 단일클론 항체는 CDR을 제공하는 공여체 항체와 동일한 항원에 결합하는 것이 기대된다. 더 상세하게는 예를 들어, Medical Research Council, UK로 양도된 U. S. Pat. No. 5,225,539 참고하면 된다.

[0108] 발현 "인간 항체"는 인간에서 실질적으로 존재하는 유전자 또는 대립유전자, 변형체 또는 그들의 뮤텐트에 의하여 코딩되는 항체를 의미하는 것으로 의도된다.

[0109] 본원에서 사용되는 것으로, 용어 "공여체" 또는 "모체" 면역글로불린은 CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린을 나타낸다.

[0110] 본원에서 사용되는 것으로, 용어 "수용체"는 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린을 나타낸다.

[0111] 본원에서 사용되는 것으로, 용어 "발현 벡터"는 코딩 서열과 특별한 숙주세포에서 동작가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 적절한 핵산 서열을 함유하는 재조합 DNA 분자를 나타낸다. 본 발명은 숙주세포 계능 내로 통합되는 발현 벡터 뿐만 아니라 숙주 계능 내로 통합되지 않고 남아 있는 벡터를 포괄한다는 것을 주의하여야 한다.

[0112] 본원에서 언급되는 것으로 용어 "유전학적으로 수식된 세포"는 예로서 흥미로운 폴리펩티드를 코딩하는 바이러스에 의하는 것과 같은 벡터에 의하여 트랜스펙션 또는 감염되는 세포를 나타내며, 상기 세포는 상기 폴리펩티드를 발현할 수 있다. 특별히 본 발명의 내용에서, 유전학적으로 수식된 세포는 본 발명의 항체를 발현하고 분비할 수 있다.

[0113] 용어 "트랜스펙션"은 숙주세포 내로 DNA의 도입을 나타낸다. 코딩 서열은 트랜스펙션된 세포에서 발현될 수 있다는 것을 주의하여야 한다. 예를 들어, CaPO₄ 및 일렉트로포레이션과 같은 트랜스펙션에 대한 수 많은 방법들은 통상적인 기술을 가진 자에게 알려진다.

[0114] 본원에서 사용되는 것으로, 용어 "항암 효과"는 암 부피의 감소, 암세포 수의 감소, 전이의 수의 감소, 기대 수명의 증가, 또는 암과 연관된 다양한 생리적 증상의 완화에 의하여 명백해질 수 있는 생물학적 효과를 나타낸다. 또한 "항암 효과"는 제 1 장소에서의 암의 발생을 예방하는데 있어서 본 발명의 항체의 능력에 의하

여 맹백하게 된다. 그것의 주어진 특징에 의하여, 본 발명의 항체는 급성 암 치료 뿐만 아니라 암 예방의 양자에서 사용될 수 있다.

[0115] 본원에서 용어 "첨가제"는 화합물의 투여를 촉진하기 위하여 약학적 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 나타낸다. 첨가제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 여러가지 당 및 전분의 형태, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물 유 및 폴리에틸렌 글리콜을 제한 없이 포함한다. 또한 약학적 조성물은 1 또는 그 이상의 추가적인 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0116] 용어 "중합효소 연쇄 반응" ("PCR")은 U. S. Pat. Nos. 4,683,195; 4,683,202, 및 4,965,188에서 공개된 방법들을 나타낸다.

[0117] II. 본 발명을 수행하기 위한 바람직한 양식

[0118] a. 항체 제조

[0119] BAT-1 항체를 인간화하기 위하여, mBAT-1으로 명명되는 비-인간 항체 출발 물질이 제조되고, 인간화된 변형체의 설계 및 제조가 따른다. 공여체 비-인간 항체 가변 도메인의 선택, 항체 유전자 서열을 인간화 및 희망하는 인간화된 단일클론 항체를 생산을 포함하는 본 발명의 몇 가지 관점이 다음 섹션에서 설명된다.

[0120] (i) 비-인간화된 항체의 제조

[0121] 뮤린 BAT-1 단일클론 항체는 이전에 US Patent 5,897,862에서 설명되었다. 따라서, 단일클론 뮤린 BAT-1 항체를 생산하는 대표적인 하이브리도마 세포주는 1994년 1월 28일에 기탁번호 I-1397으로 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institute Pasteur, 25, Rue du Docteur Roux, 75724, Paris, Cedex 15에 기탁되었다.

[0122] 택일적으로, 뮤린 BAT-1으로부터 생산된 것으로 키메릭 $\gamma 1/\kappa$ BAT-1 항체가 인간화된 BAT-1의 생산을 위하여 사용될 수 있다. 키메릭 BAT-1 항체 및 그것의 생산은 PCT application No. WO 00/58363에서 설명된다.

[0123] (ii) 인간화된 단일클론 항체의 설계 전략

[0124] 본 발명은 공여체 항체, 바람직하게는 생쥐 항체가 공여체 항체의 CDR을 인간 프레임워크와 조합하여 인간-유사 항체로 전환되는 방법을 통하여 BAT-1 항체의 인간화의 과정을 공개한다. 특정 구체예에 있어서, 특히 인간화된 단일클론 항체의 결합 친화도 및 다른 특성을 향상시킬 수 있는 곳에서 인간화된 단일클론 항체의 아미노산 서열 변형체를 생산하는 것이 바람직할 수 있다. 수용체 인간 항체의 선택이 상세하게 설명되는 것을 포함한 본 방법은 공여체 BAT-1 항체 및 선택된 인간 수용체 항체 양자로부터 치환, 삽입 또는 결실의 위치를 선택하는데 적용된다. 본원 하기에서 제공되는 항체 인간화에 대한 포괄적인 분석 및 가이드라인은 종래기술에서 공개되지 않았고 변화된 활성 항체의 제조를 위하여 중요하다.

[0125] 인간화된 단일클론 항체의 설계는 바람직하게 비-인간 항체 가변영역의 중쇄 및 경쇄 (또한 이후 본원에서 각각 V_H 및 V_L 로 명칭)의 서열 분석에 의하여 개시된다. 그러한 분석은 비-인간화된 항체 및 다른 생쥐 가변영역의 V_L 및 V_H 의 아미노산 서열 사이의 비교를 포함한다. 하나의 바람직한 구체예에 있어서, 비교는 Kabat 데이터베이스 (Kabat et al., *ibid*)에서 가변영역이 나누어진 서브그룹의 공통 서열로 더 수행될 수 있다. 가변영역의 다른 요소의 분류는 본 발명의 비-인간화된 항체의 V_L 및 V_H 에 유사한 면역글로불린 가변영역의 선택을 촉진하고 구조적으로 해결된다.

[0126] 인간 카파 경쇄 가변영역 (또한 이후 본원에서 V_K 로 명명), 및 인간화된 단일클론 항체 (또한 수용체 항체로 명명)의 가변영역의 기초로서 작용하는 V_H 의 선택은 바람직하게 인간 면역글로불린의 공통 서열에 따라 비-인간 항체의 V_L 및 V_H 를 분류함으로써 개시된다. 특히, 비-인간화된 항체의 V_L 이 비교되고, 결과적으로 Kabat (Kabat et al., *ibid*)에 의하여 정의된 4 개의 인간 카파 경쇄 가변영역 서브그룹의 공통서열에 따라 카테고리되었다. 유사하게, 비-인간화 항체의 V_H 가 비교되고 3 개의 인간 중쇄 가변영역 서브그룹의 공통서열에 따라 카테고리되었다.

[0127] 수용체 인간 V_K 및 V_H 의 선택은 바람직하게 본 발명의 모체 비-인간 항체의 V_L 및 V_H 와 공중이 이용가능한 인간 가변영역의 개별 서열의 저장된 서열 전체 사이의 비교를 수행하여 진행된다. 적절한 인간 V_K 및 V_H 은 모 비-인간 항체에 가장 근접한 매치에 기초하여 선택된다.

- [0128] 공여체 및 인간화된 단일클론 항체의 서열 분석과 적절한 분자 모형에 대한 참고자료는 항원 결합 또는 적합한 항체 구조의 유지와 연관될 수 있는 잔기들과 인간화된 단일클론 항체의 구조를 향상시키기 위하여 제거 또는 치환되어야 하는 잔기들을 식별하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0129] 그러므로 비-인간 및 인간화된 단일클론 항체의 가변영역의 분자 모형은 인간화된 단일클론 항체의 설계를 보조하기 위하여 제조될 수 있다. 이러한 구조들의 모형화는 분석 과정에서 결정되는 가변영역 요소의 분류에 기초하고 예를 들어, 상동성 및 *ab initio* 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 상응하는 X-선 결정학 구조는 Brookhaven 데이터베이스로부터 얻을 수 있다.
- [0130] FR, CDR, 및 루프 구조와 같은 본 발명의 비-인간 항체의 가변영역 내의 요소들은 구조적으로 해결된 유사한 면역글로불린 가변영역으로부터의 요소들로 모형화된다. 입체적 부조화가 모형에서 확인되고 결과적으로 잘못 짝지어진 결사슬이 치환을 위하여 선택된다. 구조 배치를 위한 특별히 바람직한 접근은 Chothia와 그의 동료들에 의하여 설명된 것들 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontane et al., *ibid*)에 기초한 canonical 분류에 따른 구조 요소의 카테고리를 포함한다. 구조 예측을 위한 바람직한 접근은 데이터베이스 검색 또는 CONGEN 검색 (Brucoleri, R. E. et al., *Biopolymers* 26: 137, 1987)을 포함한다. 인간화된 단일클론 항체의 기초로서 작용하는 선택된 인간 V_K 및 V_H는 유사하게 모형화되고 그들의 아미노산 서열은 그들 잔기들의 어떤 것이 결합 친화성을 역으로 풍부하게 할 것인지를 결정하기 위하여 연구되었다.
- [0131] 에너지 최소화는 바람직하게 명백한 입체 부조화에 대한 모형을 조절한 후에 적용된다. 에너지 최소화는 바람직하지 않은 원자 접촉을 구제하고 반 데르 발스 및 정전기적 상호작용을 최적화 하기 위하여 여기에서 충족된다.
- [0132] 상기 설계된 과정의 결과로서 BAT-1의 인간화된 단일클론 항체 변형체는 수용체 항체 또는 공여체 항체에서는 발견되지 않는 추가 또는 치환된 보존적 아미노산 잔기를 포함한다. 원 공여체 또는 수용체 항체에 포함된 아미노산 잔기의 결실이 또한 적용될 수 있다. 이러한 수식들은 항체 수행을 개량하기 위하여 만들어지고 필수적으로 항원 결합 또는 다른 면역글로불린 기능에 영향이 없다. 수식에 대한 가장 흥미로운 자리는 초가변 루프를 포함하지만, FR변화가 또한 고려된다. 항원 결합에 연관된 초가변영역 잔기 또는 FR잔기는 일반적으로 비교적 보존적 방법으로 치환된다. 본 발명에서 적용될 수 있는 보존적 치환은 다음 선택을 포함한다: Val, Ile; Ser, Thr; Lys, Arg; Phe, Tyr; Trp, Leu; Asp, Ser; Cys, Thr; Gln, Lys; Val, Ala; Asn, Ser; Thr, Asn.
- [0133] (iii) 인간화된 단일클론 항체 변형체의 구성
- [0134] 일반적으로, BAT-1 항체 변형체는 하기에 더 설명되는 것과 같은 재조합 세포 인큐베이션으로 간단하게 제조될 수 있다. 여기에서 재조합 합성이 바람직하지만, 화학적 합성에 의하여 펩티드를 제조하거나 천연 자원으로부터 그들을 정제하는 것이 알려져 있다.
- [0135] 본원에서 설명된 것처럼 본 발명을 수행하는데 적합한 분자생물학 기술 및 CDR 이식 프로토콜은 당업자에게 알려진다. 적절한 교시가 부록을 포함한 그들 전체로 참고문헌에 의하여 본원에 통합된 *inter alia*, Sambrook et al., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989); Ausubel et al., (*Protocols In Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York 1987, 1988, 1989); US Patent Nos. 5,225,539 및 5,585,089를 포함하는 많은 매뉴얼 및 최초 공개에서 설명된다.
- [0136] BAT-1 경쇄 및 중쇄 CDR의 아미노산 서열이 여기에서 동정되고 도 5 및 도 6에서 도해되었다: CDR_{L1} (도 5에서 SEQ. ID NO. 9 및 SEQ L1): SARSS VSYMH; CDR_{L2} (도 5에서 SEQ. ID NO. 10 및 SEQ L2): RTSNL AS; CDR_{L3} (도 5에서 SEQ. ID NO. 11 및 SEQ L3): QQRSS FPLT; CDR_{H1} (도 6에서 SEQ. ID NO. 12 및 SEQ H1): NYGMN; CDR_{H2} (도 6에서 SEQ. ID NO. 13 및 SEQ H2): WINTD SGEST YAEFF KG; CDR_{H3} (도 6에서 SEQ. ID NO. 14 및 SEQ H3): VGYDALDY.
- [0137] 이러한 아미노산 서열을 사용하여, 이러한 CDR을 코딩하는 올리고뉴클레오티드가 본 발명에서 사용되기 위하여 합성될 수 있다. 또한 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 클로닝을 촉진하거나 제한 위치를 도입하기 위하여 이러한 BAT-1 CDR에 추가하여 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본 발명의 이러한 관점에 적합한 올리고뉴클레오티드 합성 기술은 당업자에게 잘 알려졌고, 몇가지 상업적으로 이용가능한 자동화된 합성기를 사용하여 수행될 수 있다. 추가적으로, 본원에 대한 CDR을 코딩하는 DNA는 상업적인 DNA 합성 업체의 용역으로부터 획득할 수 있다. 그러므로 천연 자원으로부터 BAT-1 CDR의 재클로닝은 필요하지 않다. mBAT-1 CDR은 인간화된 BAT-1 변

형체를 생산하기 위하여 인간 항체 내로 이식된다. 본 내용에서 인간 항체는 설계된 인간 또는 엔지니어링된 항체로 나타나는 어떠한 항체, 어떤 관점으로는 인간 면역 시스템과 양립가능한 것을 나타낸다는 것은 당연할 것이다. 본 목적을 위하여 특히 바람직한 것은 널리 환자에서 역 면역 반응을 나타내지 않는 항체이다.

[0138] CDR-이식된 인간화된 BAT-1 항체를 구성하기 위하여, BAT-1 CDR을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드는 상기 참고문헌에서 설명된 것들과 같은 잘 알려진 재조합 기술을 사용하여 항체 중쇄 및 경쇄 및 그들의 단편을 코딩하는 다른 DNA로 통합될 수 있다. 특히, BAT-1 CDR은 본 발명에 따라서 실질적으로 어떠한 세트의 FR 내로 도입될 수 있다. 다양한 인간 항체 유전자가 공중이 접근 가능한 보관의 형태로 이용될 수 있고, 적합한 항체 유전자는 상기 설명된 것과 같은 서열로부터 합성될 수 있다. 이것에 관련하여 폴리뉴클레오타이드를 클로닝하고 조작하기 위하여 적용된 바람직한 기술은 제시된 방법 및 실시예에 의하여 설명된다.

[0139] mBAT-1 및 모양이 고쳐진 BAT-1 경쇄 (도 5) 및 중쇄 (도 6) FR 및 수식된 FR의 아미노산 서열이 본원에서 동정되었다: FR_{L1} (SEQ. ID NO. 1): EIVLT QSPSS LSASV GDRVT ITC; FR_{L2} (SEQ. ID NO. 2): WXaaQQK PGKAP KLXbbI Y, 상기 Xaa = F, Y 및 Xbb = W, L; FR_{L3} (SEQ. ID NO. 3): GVPSR FSGSG SGTXaaXbb XccLTIN SLQPE DFATY YC, 상기 Xaa = D, S; Xbb = Y, F 및 Xcc = C, T; FR_{L4} (SEQ. ID NO. 4): FGGGT KLEIK; FR_{H1} (SEQ. ID NO. 5): QXaaQLV QSGSE LKKPG ASVKI SCKAS GYXbbFXcc, 상기 Xaa = I, V; Xbb = T, S; Xcc = T, S; FR_{H2} (SEQ. ID NO. 6): WVXaaQA PGQL XbbWMG, 상기 Xaa = R, K; Xbb = Q, K; FR_{H3} (SEQ. ID NO. 7): RFXaaFS LDTSV XbbTAYL QITSL XccAEDT GMYFC XddXee, 상기 Xaa = V, A; Xbb = N, S; Xcc = T, N; Xdd = V, A; Xee = R, K; FR_{H4} (SEQ. ID NO. 8): WQQT LTVS S.

[0140] BAT-1 CDR 및/또는 인간 항체로부터 기원된 특이적 FR 잔기를 코딩하는 올리고뉴클레오타이드가 인간화된 BAT-1 변형체의 V_K 또는 V_H를 코딩하는 DNA 내로 코돈을 도입하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 이러한 관점에 관하여, 추가적인 코돈은 BAT-1 CDR로부터 유래하지 않은 것들 뿐만 아니라 CDR을 구성하는 것들을 포함할 수 있다. 이러한 추가적인 염기들은 CDR이 이형 기원으로부터 FR에 연결하는 것을 촉진하기 위하여 포함될 수 있다. 그들은 본 목적을 위하여 제한 위치 또는 중첩 상보성 지역을 포함할 수 있다. 주형 DNA는 전형적으로 단일 가닥 DNA (ssDNA) 벡터이다.

[0141] BAT-1 중 및 경쇄의 CDR은 특히 클로닝되거나 합성적 DNA 또는 RNA 내에 염기를 결실, 삽입 및 변화하기 위한 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 인간화된 단일클론 항체 내로 통합 후에 또한 수식될 수 있다. 이 말단에 적합한 위치-특이적 돌연변이화 기술은 당업자에게 잘 알려졌고, 재조합 DNA 기술에 대한 전문적인 참고문헌에 도해되었다. 이러한 방법은 실질적으로 어떠한 희망하는 변화를 BAT-1 CDR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 내 또는 닫힌 중쇄 또는 경쇄 유전자의 다른 위치 내로 도입하기 위하여 사용될 수 있다.

[0142] 더 짧은 중첩된 단일 가닥 DNA로부터 더 긴 이중 가닥 DNA의 합성은 당업자에게 잘 알려진다. 마찬가지로, 평활 말단 DNA 및 적어도 부분적으로 중첩된 상보성 말단을 가진 것들을 포함하는 DNA의 말단-대-말단 연결이 잘 알려진다. 이러한 기술은 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 대한 전문적인 참고문헌에 도해되었다.

[0143] 인간 BAT-1 가변영역의 모든 변형의 구성은 바람직하게 Stemmer (Stemmer et al., GENE 164: 49, 1995)에 의하여 설명된 것과 같이 수행되었다. 필수적으로, 본 방법은 다수의 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 (올리고)로부터 긴 DNA 서열의 합성에 적합하다. 본 방법은 조립 프로세스 동안 점점 길어지는 DNA 단편을 만들기 위하여 종래의 PCR 기술을 사용하는 DNA 폴리머라아제에 의존한다. 일단 새로운 가변영역 유전자가 합성되면, 바람직하게 상기 참고문헌에서 설명된 것과 같은 컴피턴트 세포 내로 형질전환되는 벡터 내로 서브클로닝된다. 추정적인 양성 클론이 적절한 프라이머를 사용한 PCR-검색 및/또는 제한 절단에 의하여 동정될 수 있다.

[0144] 확인된 양성 클론으로부터 선택된 개별적 클론들은 이중가닥-DNA (ds-DNA)로 시퀀싱될 수 있다. 바람직하게, 결과적인 ds-DNA는 시퀀싱에 의하여 PCR-유도된 착오가 검사될 수 있고, 다른 클론으로부터 정확한 단편을 서브클로닝하여 교정될 수 있다.

[0145] 확인된 양성 클론으로부터 BAT-1 변형체의 인간화된 V_K 또는 V_H를 함유하는 선택된 클론의 DNA는 직접적으로 인간 경쇄 및 중 불변영역을 각각 포함하는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 인간화된 BAT-1 CDR-이식된 완전한 항체 변형체, 또는 인간화된 BAT-1 CDR-이식된 항체를 코딩하는 DNA가 일단 조립되면, 그것은 종래 기술에 의하여 전파 및 발현을 위한 벡터 내로 삽입될 수 있다. 이러한 방법으로 원하는 양의 항체가 획득될 수 있다.

[0146] (iv) 인간화된 BAT-1 항체 변형체의 발현

- [0147] 또한 본 발명은 완전한 인간화된 BAT-1 항체, 완전한 경쇄 또는 가변영역, 완전한 중쇄 또는 가변영역을 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 코딩 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주세포를 제공한다.
- [0148] BAT-1 항체의 재조합체 생산을 위하여, 상기 항체 또는 그것의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 분리되고 더 나아가 클로닝, 증폭 또는 발현을 위하여 복제 가능한 벡터 내로 삽입된다. 항체를 코딩하는 DNA는 쉽게 분리되고 종래의 과정 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용)을 사용하여 시퀀싱된다. 일반적으로 다음의 1 또는 그 이상을 포함하지만 여기에 한정되지 않는 많은 벡터들이 이용된다: 단일 서열, 복제 원점, 1 또는 그 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.
- [0149] 발현을 위하여, 인간화된 BAT-1 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 그러한 벡터는 당업자에게 잘 알려진다. 면역글로불린 또는 바이러스성 프로모터와 같은 발현 조절 서열이 폴리뉴클레오티드의 상부에 도입된다. dhfr 유전자 또는 당업자에 잘 알려진 다른 적합한 선택 마커와 같은 선택 마커가 벡터에 포함된 상기 폴리뉴클레오티드를 발현하는 숙주세포의 선택을 가능하게 하기 위하여 벡터 내에 포함된다.
- [0150] 하나의 구체예에 있어서, 숙주세포는 내재성으로 항체를 생산하지만, 택일적인 구체예에 있어서, 세포는 항체를 생산하기 위하여 유전적으로 수식된다. 내재성으로 항체를 생산하는 세포의 예는 하이브리도마, 림포마, 플라스마사이토마 및 EBV 형질전환 세포를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 세포는 항체를 생산하기 위하여 항체 분자를 코딩하는 벡터를 트랜스펙션하는 것과 같은 종래의 방법에 의하여 유전적으로 수식될 수 있다.
- [0151] 용도에 있어서, 인간화된 BAT-1 항체 또는 그들의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 세포 내로 트랜스펙션될 수 있다. 트랜스펙션 방법은 당업자에게 잘 알려졌고 그러한 방법은 본 발명의 적용을 위하여 적합하다. 발현 벡터를 발현하는 세포는 발현 벡터 또는 동시-트랜스펙션에 사용되는 벡터 내에 통합된 선택 마커를 사용하여 선택된다. 항체를 발현하는 세포는 enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) 검사법 또는 당업자에게 잘 알려진 다른 적합한 방법에 의하여 검색될 수 있다.
- [0152] 본 인간화된 BAT-1 항체 변형체는 완전한 항체 또는 항체의 F_v 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 트랜스펙션에 의하여 숙주세포로 도입될 수 있다. 또한 인간화된 BAT-1 항체 변형체는 (i) 항체의 가변 또는 완전한 경쇄 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 (ii) 항체의 가변 또는 완전한 중쇄 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 동시-트랜스펙션에 의하여 숙주세포로 도입될 수 있다.
- [0153] 가장 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 항체는 항체의 경 및 중 가변영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일 벡터의 트랜스펙션에 의하여 생산된다. 가장 바람직하게, 본 발명은 모양이 고쳐진 BAT-1의 경쇄 및 중쇄 부위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 각각 연결된 두 개의 프로모터를 더 포함한다. 유사한 숙주세포에서 수행된 트랜스펙션 또는 동시-트랜스펙션에도 불구하고 본 BAT-1 항체의 결과적인 발현은 본 항체의 경쇄 또는 중쇄 부위를 각각 코딩하는 두 개의 벡터로 동시-트랜스펙션 후에 그것의 발현보다 우수하다.
- [0154] 본 인간화된 BAT-1 항체 변형체는 조류, 곤충, 세균 또는 효모세포를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아닌 어떠한 적절한 세포 형태에서 발현될 수 있다. 포유동물 세포의 예는 인간, 토끼, 설치류 (예를 들어, 생쥐, 쥐) 및 보바인 (bovine) 세포를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구체예에 있어서, 세포는 골수종 세포, Chinese hamster ovary (CHO) 세포, COS 세포, COS7 세포 또는 섬유아세포이다.
- [0155] 항체-생산 세포주는 당업자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 인큐베이션될 수 있다. 그러한 기술은 다양한 실험실 매뉴얼 및 최초 공개에서 설명된다. 예를 들어, 아래에서 설명된 바와 같이 본 발명에서 사용되기에 적합한 기술은 부록을 포함하여 그 전체가 본원의 참고문헌에 통합된 current protocols in immunology, Coligan et al., (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, N. Y. 1991)에서 설명된다.
- [0156] 본 발명의 인간화된 단일클론 항체는 저장을 위하여 냉동 또는 동결건조될 수 있고, 사용 전에 적합한 캐리어에 재구성될 수 있다. 이 기술은 종래 면역글로불린에 효과적인 것으로 나타났고 알려진 동결건조 및 재구성 기술이 적용될 수 있다. 동결건조 및 재구성은 여러 정도로 항체 활성 손실을 이룰 수 있으므로 사용되는 수준은 보충하기 위하여 조절되어야 한다는 것은 당업자라면 이해될 것이다.
- [0157] (v) 인간화된 BAT-1 항체의 정제
- [0158] 재조합 기술을 사용하여, 본 항체는 세포 내, 주변세포질 내, 또는 배지 내로 직접 분비되어 생산될 수 있다.

만약 항체가 세포내에서 생산된다면, 첫 단계로서 숙주세포 또는 용균된 단편의 입자 데브리는 예를 들어, 원심 분리 또는 초원심분리에 의하여 제거된다. Carter et al., (Biotechnology 10: 163, 1992)은 E. coli의 주변 세포질로 분비되는 항체를 분리하는 과정을 설명한다. 간단하게, 세포 페이스트는 아세트산 나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에서 약 30 분 이상 녹여진다. 세포 데브리는 원심분리에 의하여 제거될 수 있다.

[0159] 가장 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 항체는 배지 내로 분비되고, 그러한 발현 시스템으로부터의 상등액은 일반적으로 우선 예를 들어, Amicon 또는 Millipore ultrafiltration unit인 상업적으로 이용 가능한 단백질 농축 필터를 사용하여 농축된다. 프로테아제 저해제가 단백질을 분해를 저해하기 위하여 앞 단계 중 어떠한 곳에 포함될 수 있고, 우연한 오염원의 성장을 방지하기 위하여 항생물질이 포함될 수 있다.

[0160] 세포로부터 제조되는 본 항체 조성물은 예를 들어, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피와 같은 바람직한 정제 기술인 특히 단백질을 가진 친화성 크로마토그래피를 가지고 당해 기술 분야에서 잘 알려진 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 친화성 리간드가 부착된 기질은 대부분 아가로오스이지만, 다른 기질을 이용할 수 있다. 조절된 포어 글래스 또는 폴리 (스티렌다이비닐) 벤젠과 같은 기계적으로 안정한 기질은 아가로오스로 이를 수 있는 것 보다 더 빠른 유속과 더 짧은 프로세스를 가능하게 한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함하는 곳에서, Bakerbond ABXTM 레진 (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)이 정제를 위하여 유용하다. 이온-교환 컬럼, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSETM 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 레진 상의 크로마토그래피 (폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱, SDS-page, 황산 암모늄 침전과 같은 단백질 정제의 다른 기술들이 회수되는 항체에 따라 또한 이용가능하다.

[0161] (vi) 세포주의 보관

[0162] 본 발명의 대표적인 구체예에 관하여, 본 인간화된 BAT 단일클론 항체는 2003년 5월 9일에 ATCC # (PTA-5189)로 기탁된 세포에 의하여 생산된 것들과 그들의 기능 또는 활성에 있어서 동등하다.

[0163] III. 약리학

[0164] (i) 약학적 조성물

[0165] 본 발명은 또한 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0166] 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 진단 및 치료에 사용하기 위하여 활성 성분으로서 본 발명의 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 환자에게 투여하기에 적합한 용액, 현탁액, 사용되기 전에 적합한 운반체와의 재구성 또는 희석을 위한 동결건조된 분말, 캡슐 및 정제를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아닌 어떠한 약학적 형태가 될 수 있다. 본 발명에서 공개된 약학적 조성물은 다른 것들 중에 진단, 예측 및 치료를 위하여 치료제와 본 항체를 포함하는 생리학적으로 허용되는 접합체를 제공하기 위하여 어떠한 약학적으로 허용되는 희석액과 담체를 더 포함할 수 있다.

[0167] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 기술 분야에서 공지된 프로세스, 예를 들어, 종래의 혼합, 용해, 입자화, 마쇄, 분쇄, 당의정-제조, 가루화, 에멀전화, 캡슐화, 포착화 또는 동결건조 프로세스의 수단에 의하여 제조될 수 있다.

[0168] 그러므로 본 발명에 따른 사용을 위한 약학적 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 조제로 활성 성분의 프로세스를 촉진하는 첨가제 및 보조제를 포함하는 1 또는 그 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하는 종래의 방식으로 제제 될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0169] 주사를 위하여, 본 발명의 화합물은 수용액, 바람직하게 Hank's 용액, Ringer's 용액, 또는 생리적 염 완충액과 같은 생리학적으로 양립가능한 완충액으로 제제될 수 있다. 점막을 통한 투여를 위하여, 투과되는 장벽에 적합한 투과제가 제제에 사용된다. 그러한 투과제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜은 당해 기술 분야에서 일반적으로 공지되었다. 경구적으로 사용될 수 있는 약학적 조성물은 푸쉬-피트 (push-fit) 캡슐을 포함한다.

[0170] 흡입에 의한 투여를 위하여, 본 발명에 따라 사용되는 분자는 예를 들어, 다이클로로다이플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로메탄 또는 이산화탄소와 같은 적합한 추진제를 사용한 압축된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달된다. 압축된 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 제안된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함에 의하여 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취분기에서 사용을 위한 예를

들어, 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 폴리펩티드의 혼합 분말 및 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말을 함유하게 제제될 수 있다.

[0171] 비경구적 투여를 위한 약학적 조성물은 수용성 형태의 활성 성분의 수용액을 포함한다. 추가적으로, 활성 성분의 현탁액은 적절한 유성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 바람직한 천연 또는 합성 담체는 당해 기술 분야에서 공지된다. 선택적으로, 현탁액은 또한 안정화제 또는 화합물의 용해성을 증가시켜서 고농도 용액의 제조를 가능하게 하는 제제를 함유할 수 있다. 택일적으로, 활성 성분은 사용 전에 예를 들어, 살균 비-발열원 물과 같은 적합한 운반체로 재구성하기 위하여 분말 형태로 될 수 있다.

[0172] 본 발명의 내용으로 사용하기에 적합한 약학적 조성물은 의도된 목적을 이루기에 효과적인 양으로 활성 성분이 함유된 조성물을 포함한다. 투여를 위한 모든 제제는 선택된 투여 경로에 적합한 투여량이 되어야만 한다. 더욱 상세하게, "치료적으로 효과적인" 투여량은 치료되는 환자의 질병의 징후를 예방, 경감 또는 약화시키는데 효과적인 화합물의 양을 의미한다. 치료적으로 효과적인 양의 결정은 특히 본원에서 제공된 상세한 설명에 비추어 당업자의 능력 내이다.

[0173] 본원에서 설명된 조성물의 독성 및 치료적 효율은 예를 들어, 세포 인큐베이션 또는 실험 동물에서 표준 약학적 과정에 의하여 목적 화합물에 대한 IC_{50} (50 % 저해를 제공하는 농도) 및 최대 저항 투여량을 결정함으로써 결정될 수 있다. 이러한 세포 인큐베이션 검정 및 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에 사용하기 위한 투여량 범위를 결정하는데 사용될 수 있다. 투여량은 적용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 다양하게 될 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태의 견지에서 각 내과의사에 의하여 선택될 수 있다. 처리된 상태의 심각성 또는 반응성에 의존하여, 투여량은 또한 수 일 내지 수 주 또는 치료가 효과적이거나 또는 질병 상태의 완화가 이루어질 때까지 지속되는 치료 과정을 가진 지연 방출 조성물의 단일 투여가 될 수 있다. 투여되는 조성물의 양은 치료되는 환자, 고통의 심각성, 투여의 방식, 처방 내과의사의 판단, 및 모든 다른 상관 인자에 의존하는 것은 물론이다.

[0174] (ii) 치료 방법

[0175] 여러가지 치료적 시도에 대하여 유용하지만, 본 발명에 관한 항체는 본 발명의 바람직한 구체예에 따라서 암의 치료를 위하여 사용된다. 본 발명에 관한 단일클론 항체는 다양한 암에서 항암 효과를 나타낸다. 본 발명의 범위 내에서, 본 발명의 효과적인 양의 항체를 환자에게 투여함으로써 암치료를 위한 신규 hBAT-1의 사용 방법을 제공한다. 용어 "효과적인 양"은 치료적 효과를 이루는데 요구되는 항체의 양을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 치료적 최종 결과를 이루기에 효과적인 양은 예를 들어, 암의 형태 및 환자의 상태의 심각성 (즉, 암의 단계)을 포함하는 수 많은 인자들 및 항체와 함께 추가적 또는 상승적 방식으로 작용하는 다른 약물과 함께 동시-투여되는지에 의존할 수 있다. 항체는 환자에서 제 1 기 또는 제 2 기 암의 검출 후 또는 방사선에 노출된 개인 또는 유전적 전-경향 (pre-disposition)을 가지는 것과 같은 암화의 고 위험을 가지는 환자의 예방적 치료로서 투여될 수 있다.

[0176] 본 발명은 추가적으로 인간화된 BAT-1 항체 변형체 또는 활성 성분으로서 상기 항체를 포함하는 조성물을 가지고 그들을 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0177] 또 다른 구체예에 관하여, 본 발명은 활성 성분으로서 본 발명의 항체를 포함하는 효과적인 양의 약학적 조성물을 그것을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질병 또는 장애, 특히 암의 진단 또는 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0178] 치료 방법은 환자에게 본 발명의 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 또한 치료 방법은 IL-1 (인터류킨-1), IL-2, IL-6 및 IFN- α (인터페론- α)와 같은 시토카인 또는 어떠한 T-세포 자극 항체 또는 다른 항암 치료 항체와 같은 다른 항체를 포함하는 추가적인 활성 조성물로 치료와 동시에, 전에, 또는 후에 환자에게 본 발명의 항체 또는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 하나의 구체예에 있어서, 환자는 인간이다. 다른 구체예에 있어서, 예방, 치료 또는 검출되는 질병은 암이다.

[0179] 상기 조성물의 투여는 전형적으로 비경구적 투여, 예를 들어, 정맥 내 (i.v.), 복막 내 (i.p.), 근육 내 주사 (i.m.)의 수단에 의하여 이루어질 수 있다. 치료 방법은 본 발명에 관한 항체의 약학적 조성물을 포함할 수 있다. 택일적으로 또는 선택적으로, 치료 방법은 생체 외 또는 생체 내에서 자가 또는 이계 세포 치료를 포함할 수 있다.

[0180] 본 항체의 항암 활성을 증가시키기 위하여, 추가적 또는 상승적 방식으로 작용할 수 있는 다른 약물의 투여와

함께, 이전에, 또는 후에 본 발명의 항체를 투여하는 것이 유리하다. 예는 IL-1 (인터류킨-1), IL-2, IL-6 및 IFN- α (인터페론- α)를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아닌 다양한 시토카인 뿐만 아니라 T-세포 자극 항체, 또는 항암 치료적 항체를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아닌 세포 백신 또는 추가적인 항체를 포함한다.

[0181] 본 발명의 항체는 면역계의 증식, 세포용해 또는 자극 활성 상에서 항체의 활성 또는 다른 효과는 치료적 효과를 가질 수 있는 예를 들어, HIV 감염 초기 단계에서 또는 혈구 수에서 CD4⁺ T 세포의 감소를 나타내는 환자 (AIDS의 원인 바이러스)에서, 다양한 자가면역 이상, 또는 어떠한 경우의 유전적 또는 후천성 면역 결핍에서와 같은 곳에서 암과는 다른 다양한 질병의 치료에 유용할 수 있다. AIDS 환자에서, 본 항체는 아직 질병의 발달된 어떠한 징후를 가지지 않는 환자, 또는 HIV 감염 프로세스의 초기 단계의 환자에 투여될 수 있다.

[0182] 본 발명의 내용으로 환자에게 투여되는 항체 또는 조성물의 투여량은 장기간 환자에서 유익한 치료적 반응으로 영향을 주거나 암 성장을 저해하는데 충분하여야 한다. 그러므로, 본 항체 또는 조성물은 질병을 경감, 감소, 치료 또는 적어도 부분적으로 멈추는데 효과적인 양으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0183] 투여량은 생산된 치료적 조성물의 활성 및 환자의 상태 뿐만 아니라 치료되는 환자의 체중 또는 표면적에 의하여 결정될 것이다. 또한 투여량 및 투여 단위는 특별한 환자에서 특별한 치료적 조성물의 투여와 함께 하는 어떠한 부작용의 존재, 특성, 및 범위에 의하여 결정될 것이다. 투여되는 효과적인 양의 치료적 조성물을 결정하는데 있어서, 내과의사는 순환 플라즈마 수준, 독성, 및 질병의 진전을 평가하는 것이 필요하다.

[0184] 지금 일반적으로 설명된 본 발명과 동일한 것은 본 발명의 제한의 의도가 아닌 도해의 방법에 의한 방법으로 제공되는 다음의 실시예에 참고 문헌을 통하여 더 쉽게 이해 될 것이다.

실시예

[0185] **실시예 1**

[0186] **생쥐 BAT-1 카파 경쇄 가변영역 (V_K)의 서열 분석**

[0187] BAT-1 V_K 영역의 DNA 및 아미노산 서열이 도 1에 보여진다. 아미노산 서열은 다른 생쥐 가변영역 및 또는 Kabat 데이터베이스 (Kabat et al., *ibid*)에서 세분된 가변영역의 서브그룹의 보존 서열과 비교된다. 이러한 분석으로부터 BAT-1 V_K 영역은 생쥐 카파 서브그룹 IV (동일성 = 88.38 %; 유사성 = 92.45 %) 및 생쥐 카파 서브그룹 VI (동일성 = 87.74 %; 유사성 = 89.62 %)의 양 보존 서열과 가장 밀접하게 매치되는 것으로 나타났다. BAT-1 카파 경쇄 가변영역 (즉, CDR에서 아미노산 없이)의 FR이 단지 생쥐 서브그룹 IV 및 VI과 비교되었을 때, 백분율 동일성은 양쪽에 대해 정확하게 90.00 %로 증가하는 반면에, 백분율 유사성은 양 보존 서열에 대하여 다시 92.50 %로 증가한다. 그러나, 양 카파 서브그룹들에 대한 밀접한 유사성에도 불구하고, 무린 BAT-1 V_K 영역은 생쥐 서브그룹 VI으로 분류되어야 한다고 결정되었다.

[0188] 생쥐 서브그룹 VI의 선택 이유는 Chothia 및 그의 동료에 의하여 정의된 것으로 (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987; *Nature* 34:877, 1989; *J. Mol. Biol.* 227:799, 1992; Tramontano et al., *ibid*), BAT-1 V_K 영역의 초가변 루프의 canonical 분류에 관련된다. Chothia에 따라서, 각 CDR: CDR1 (L1), CDR2 (L2) 및 CDR3 (L3)는 canonical 클래스 1이었다 (도 2). 중요하게, 10 아미노산 canonical 클래스 1 L1 초가변 루프는 Kabat 서브그룹 VI으로 고정된 생쥐 V_K 영역에서 단지 나타난다.

[0189] CDR 관련된 루프 구조에 대한 가장 제한적 canonical 클래스는 Martin 및 Thornton (Martin et al, *ibid*)에 의하여 최근에 정의되었으며, 이러한 두 가지는 도 2에 설명된다. 이러한 새로운 canonical 클래스 정의의 용도는 그들의 엄격성에 놓여 있고, 다음으로 각 클래스에서 소위 수 많은 프레임워크 canonical 잔기의 존재에 관련된다. 이러한 "엑스트라", 잠재적인 중요 잔기의 중요성은 인간화된 BAT-1 항체를 설계할 때 나타난다. 루프 L1 및 L2는 각각 Martin canonical 클래스 1/10A 및 1/7A로 쉽게 할당되지만, L3 루프는 그것이 이용가능한 어떠한 클래스와 완전하게 매치되지 않는다. 그것이 가장 밀접하게 매치되는 클래스는 클래스 1/9A 이지만, 이 클래스에 맞추기 위해서는 실제로 존재하지 않는 BAT-1의 V_K 영역에서 위치 28에 잔기가 있어야만 한다. BAT-1 V_K에 가장 밀접한 생쥐 카파 경쇄 가변영역 생식계열 유전자는 H4이며, 또한 그것은 10 아미노산 L1 루프 (표 1)를 함유한다. 단지 12 미스매치가 H4 생식계열 서열 및 BAT-1 V_K 영역 사이에서 발견된다. 이러한 미스매치의 대부분은 FR에 위치된 단지 4 차이를 가진 CDR에서 위치된다. 이러한 미스매치의 대부분은 FR3의 위치 72 (kabat 수)에서 시스테인을 제외하고는 매우 보존적 변화이다. 중요한 canonical 잔기 (위치 71)에 바로 인접한 그것의 위치는 시스테인이 항원 결합에서 중요한 역할을 가질 것이라는 것을 제안한다. 그럼에도 불구하고

고, 상기 예를 종합하면, BAT-1 서열은 전형적인 생쥐 V_K 영역이라는 것을 제안한다.

표 1a

Seq. 명칭	¹ Id. Res.	² 유린 BAT VK 대 생쥐 생식계열 VK의 잔기 1 - 50
BAT	106	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWQQKPGTSPKL
H4	83S.....S.....Y.Y.....S...
H3/O	83M.....S.....Y.....S.....
x1		
R9	83M.....S.....I.....Y.....
H13	81L.....M.....S.....Y.Y.....RS...
H8	81L.....M.....S.....X.....S.....
H1	81M.....S.....V.S..LY.Y.....S...
H9	81	..L.....M.....S.....Y.....S.....
R2	76	E.L.....IA.....S.....N.Y.....S...
T3B	75	---.....A..L.....M.....S.S.....V.S..L..Y.....S.....
R11	74	EN.....A.....M.....S.S.....V.S.NL..Y.....S...T.
H6/X	74	E.....TA..L.Q.....S.....Y.....S.....
24		
L8	74	EN.....A..L.....M.....S.S.....V.S..L..Y.....S.....
R1/sl	72	EN.....A..L.Q...M.....S.S.....V.S..L..Y.....S.A...
07b		
R13	72	EN.....L.....MS.R.S.....N..Y.Y...SDA...
H2	67	G.....TT.T.F...N.....S.....IN..I..Y.....S.NT...
Seq. 명칭	¹ Id. Res.	유린 BAT VK 대 생쥐 생식계열 VK의 잔기 51 - 99

표 1b

BAT	106	WIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP
H4	83	P.....S.....S.....YH.Y.
H3/O	83	R...D..K.....S.....S.....W..N.
x1		
R9	83	R...D..K.....S.....S.....H...Y.
H13	81	P...L.....S.....S.....W..N.
H8	81	...SI.....S.....SVK.....W..S.
H1	81	...S.....S.....S.....F...Y.QY.
H9	81	P...D.....F.....S.I..S.....H...Y.
R2	76	I...GI.....FSF..NS....V.....Y.
T3B	75	P...G.....V.....S.....S.....W..Y.
R11	74	F.....E...P.....S.....SV.....W.GY.
H6/X	74	P...EI.K.....S.....S.....I.....WNYPL
24		
L8	74	...G.....A.I..S....S....ND.....W.GY.
R1/sl	72	PL.H.....S.....SV....D.....W.GY.
07b		
R13	72	...Y....P.....N..S....S..G.....FT.S.
H2	67	QX..K..D.P....TL.....S....SV.....W.GY.

1BAT 서열과 동등한 잔기의 수
2점 []는 BAT VK 및 생쥐 생식계열 VK 사이의 매치를 나타내며, 선 []은 아미노산의 부재를 나타낸다.

실시예 2

생쥐 BAT-1 중쇄 가변영역의 서열 분석

BAT-1 V_H 영역의 DNA 및 아미노산 서열은 도 3에서 나타난다. 실시예 1에서 주어진 것과 유사한 분석이 BAT-1 V_H 영역에 대하여 유도되어 kabat 데이터베이스 (Kabat et al., ibid)에서 여러가지 생쥐 중쇄 서브그룹의 보존 서열에 밀접한 매치를 나타내는 것을 결정하였다. 다음으로 밀접한 Kabat 서브그룹 보존 서열은 서브그룹 IIa를 가지는 (동일성 = 59.83 %; 유사성 = 66.67 %), mBAT-1의 생쥐 중쇄 가변영역 아미노산 서열과 여러가지 서브그룹의 보존 서열 사이의 동일성은 60.64 %로 측정된 반면에, 유사성은 69.23 %로 계산되었다. 그러나, BAT-1 V_H 영역의 단지 FR이 생쥐 서브그룹 IIa와 비교될 때, 백분율 동일성은 54.02 %로 감소하는 반면에, 유사성은 62.06 %로 떨어진다. 역으로, BAT-1 V_H 영역의 FR에서 발견되는 여러가지 생쥐 서브그룹에 대하여 수행된 동일한 비교는 65.52 % 동일성 및 74.71 % 유사성을 나타낸다.

Chothia 및 그의 동료들에 의하여 정의된 바와 같이, BAT-1 V_H 영역의 초가변영역의 canonical 클래스가 분석되

어졌을 때 (도 4), CDR1 및 CDR2 루프 (H1)는 Chothia canonical 클래스 1 루프와 매치된다. 그러나, H3 루프가 나타내는 다양한 범위의 크기 및 아미노산 구성에 기인하여 CDR3 루프 구조 (H3)에 할당되는 클래스는 없다.

[0196] Martin 및 Thornton (Martin et al., *ibid*)에 의하여 정의되는 CDR 루프 구조에 대한 더 엄격한 canonical 클래스를 사용하여, H1 루프는 Martin canonical 클래스 1/10A에 매치된다고 결정하는 것은 용이한 문제이다. 그러나, H2 루프에 대하여, 밀접한 Martin canonical 클래스는 클래스 2/10A일지라도, 클래스를 할당하는 것은 더 어렵다. 불행하게도, H2 루프에 아미노산 Asp53는 이 위치에 대한 기대된 잔기에 매치되지 않기 때문에 (즉, Ala, Gly, Tyr, Ser, Lys, Thr 또는 Asn), 매치는 또한 완전하지 않다.

[0197] 동정된 mBAT-1 V_H에 대한 가장 밀접한 생쥐 중쇄 가변영역 생식계열 유전자는 VMS2/VGK4이다 (표 2). 그러므로 상기에는 mBAT-1 서열은 전형적인 생쥐 V_H 가변영역이라는 것을 명확하게 제안한다.

표 2a

Seq. 명칭 / Id. Res.	² 유린 BAT VH 대 생쥐 생식계열 VH의 잔기 1 - 50
BAT / 117	QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTNYGMN WVKQAPGKGLKWMG
VMS2/VGK4 / 92
VMS9/VGK1A / 251 / 90
VGK6 / 89
VFM11/VGK1 B / 89
264 / 88T...S.....
VFM1/281/VG K7 / 87D.S.H.....
VMS1/141/VG K3 / 84A.H.....
161 / 84
VGK5 / 79	--.....TA..Q...QKM.....I.
VGK2 / 77	---.....R.....TA..Q...QKM.....I.
V104A/VAR10 4A / 57	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.
VH105 / 57	.V..Q.....V...AS.....S.YIH.....R..Q..E.I.
VAR104 / 56	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XR.AQ..E.I.
J558-43y / 56	.V..Q.....V...AS.R.....S.NIH.....R..Q..E.I.
J558-122B / 55	.V..Q.....VR..TS.....IT.W.....XR..Q.XE.I.
37A11 / 55	.V..L...A..M...AS.....T...SS.WIE.....R..H..E.I.
VH104A / 55	.V..Q.....VR..TS.....LT.W.....XM..Q..E.I.
VAR100 / 54	.V..Q.....VR..LS..L.....I.IT.W.....R..Q..E.I.
Seq. 명칭 / Id. Res.	² 유린 BAT VH 대 생쥐 생식계열 VH의 잔기 51 - 101
BAT / 117	WINTDSG--ESTYABEFKGRFAFSLETSANTAYLQINNINNEDTATYFCVR
VMS2/VGK4 / 92NT....P.....S.....K.....A.
VMS9/VGK1A / 251 / 90YT....P...DD.....S.....K.....A.

[0198]

표 2b

VGK6/89ET....P...DD.....S.....K.....--
VFM11/VGK1 B/89YT....P...DD.....S.....K...M....A.
264/88Y....VP...DD.....S.....K.....A.
VFM1/281/VG K7/87ET....P...DD.....S.....K.....A.
VMS1/141/VG K3/84	.KY.NT....P...GDD.....S.....K...M....A.
161/84YT....P...DD.....C.S.....K.Q.....----
VGK5/79H....VPK...D.....S.....K...M.....--
VGK2/77H....VPK...D.....S.....S..K.....--
V104A/VAR10 4A/57	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VH105/57	Y.YPRD....STN.N.K...KATLTAD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VAR104/56	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.
J558-43y/56	..YPGD....NTK.N.K...KTTLTADK.SS...M.LSS.TS..S.V...A.
J558-122B/55	Q.FPA....STN.N.M...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.VH..A.
37A11/55	K.LPG....STN.N.K...KAK.TADI.S...M.LSS.TS..S.V.Y.A.
VH104A/55	A.FPAG....STN.NQM...KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V...A.
VAR100/54	Q.FPA....STN.N.M.E.KATLTVD..SS...M.LSS.TS..S.V.Y.A.

1은 BAT 서열과 동등한 잔기의 수.

2점 [J]은 BAT VH와 생쥐 생식계열 VH 사이의 매치를 나타내고 선 [J]은 아미노산의 부재를 나타낸다.

[0199]

[0200]

실시예 3

[0201]

인간화된 BAT-1 V_K 항체 변형체의 설계

[0202]

BAT-1 항체의 인간화된 가변영역의 설계에 있어서 첫 단계는 인간화된 BAT-1 V_K 영역의 기초로서 작용할 수 있는 인간 카파 경쇄 가변영역의 선택이다. 이러한 프로세스의 보조로서, BAT-1 V_K 영역이 Kabat 및 그의 동료들에 의하여 정의된 것과 같은 (Kabat et al., ibid), 4 인간 카파 경쇄 가변영역 서브그룹의 보존 서열과 먼저 비교되었다.

[0203]

생쥐 BAT-1 경쇄 가변영역은 인간 카파 경쇄 서브그룹 I 및 인간 카파 경쇄 서브그룹 III의 보존 서열과 매우 유사하다. 인간 카파 경쇄 서브그룹 I의 경우에서, 생쥐 BAT-1 V_K 영역은 전체 가변영역에 걸쳐서 63.21 % 동일성을 나타내고, 단지 FR 내에서는 70.00 % 동일성을 나타낸다. 유사성에 대하여 측정되었을 때, 이러한 값은 전체적으로 71.70 %로 증가하고, 단지 FR 내에서는 80.00 %로 증가한다. 인간 카파 경쇄 서브그룹 III의 경우에, 생쥐 BAT-1 생쥐 BAT-1 V_K 영역은 전체 가변영역에 걸쳐서 65.09 % 동일성을 나타내고, 단지 FR 내에서는 68.75 % 동일성을 나타낸다. 유사성에 대하여 측정되었을 때, 이러한 값은 전체적으로 74.53 %로 증가하고, 단지 FR 내에서는 80.00 %로 증가한다. 결과적으로, 잘 매치되는 광범위한 인간 카파 경쇄 가변영역 서열이 나타나지만, 특히 FR에 관하여, 인간 카파 경쇄 서브그룹 I 내에서 발견되는 것과 부분적으로 더 동일하다.

[0204]

생쥐 BAT-1 V_K 영역은 다음으로 공중에 이용가능한 인간 가변영역의 개별적 서열의 모든 기록된 예와 비교되었다. 표 3은 본 분석을 통하여 확인된 생쥐 BAT-1 V_K 영역에 가장 잘 매치되는 15를 나타낸다. 전체적으로, 검색 알고리즘은 생쥐 BAT-1 V_K 영역 (표 4)에 가장 잘 매치되는 것으로서 항체 TEL9으로부터 인간 V_K 영역을 선택했다 (Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581, 1991). 본 인간 서열은 전체적으로 67.93 %의 BAT-1 V_K 영역과 전체적인 동일성을 가지고, 단지 FR 내에서 72.50 % 동일성을 가진다. 유사성에 관하여 측정되었을 때, 이러한 값은 전체적으로 77.36 %로 증가하고, 단지 FR 내에서는 82.50 %로 증가하였다. 결과적으로, TEL9 카파 경쇄 가변영역 FR이 BAT-1 항체 카파 경쇄 가변영역의 인간화를 위한 인간 수용체 서열로 선택되었다. 다음으로 이것은 BAT-1 카파 경쇄 (BATR_{K_A})의 제 1 인간화된 버전 (version)의 기초가 되었고, 이것은 필수적으로 BAT-1 V_K 영역의 CDR 및 TEL9 V_K 영역을 포함한다.

[0205]

설계 프로세스의 다음 단계는 이러한 아미노산 잔기의 어떠한 것이 항원과의 상호작용을 통해 직접적으로 또는 CDR 루프의 입체구조 또는 방향성을 변화함에 의하여 간접적으로 항원에 결합을 역으로 풍부하게 하는지를 결정하기 위하여 인간 수용체 TEL9 V_K 영역 FR의 아미노산 서열을 연구하는 것이다. 이것은 BAT-1 가변영역 즉, V_K 및 V_H 영역의 모형을 이용하여 비로소 가능하게 되는 어려운 프로세스이다. 모형화 프로세스는 실시예 5에서 상세하게 주어진다. 그럼에도 불구하고, 항원 결합에 영향을 주는 것으로 나타난 생쥐 BAT-1 FR의 어떠한 아미노산은 인간화된 BAT-1 항체에서 보존을 위하여 고려된다. 보존된 무린 잔기를 결정하는데 있어서, 다음 관점이 지적된다:

표 3a

명칭	¹ ID	2유린 BAT V _k 대 가장 동일성 있는 15 인간 V _k		
		³ SCSCCcccsCccccccscscCCcscssscscsssscccccCC		
잔기		1	2	3
1-36		0123456789012345678901234567890123456	ABCDEF890123456	
		⁴ v v =====L1=====vv		
BAT	100	-QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSARS-----	SVSYMHWF	
TEL9	64.8	E.....SSL...V.DR....R.SQ	SISN.LN.Y	
Vclone47	63.3	D..M.....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y	
SiP055	63.3	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS_.LA.Y	
039741	63.9	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS_.LA.Y	
AC32	63.9	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS_.LA.Y	
AC21B	64.5	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS_.LA.Y	
B9601(Vg-Jk2)	62.7	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS_.LA.Y	

[0206]

표 3b

LS1	62.4	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS..LA.Y
TR1.21	63.0	EL.M....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
AC18	63.0	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVSG.LA.Y
19.E7	63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVS..LA.Y
STRAb SA-1A	63.0	D.QM....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
Viclone49	62.4	D.M....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
MP6	62.4	D.QM....SSL...V.DR....R.SQ	SIS..LN.Y
AC33	63.6	E.....TL.L....RA.LS.R.SQ	SVG.SLA.Y
ccccssccCsCCCCccccccsSCCScCCCCCSCCSCcccccccs			
잔기	4	5	6 7 8
37-80	78901234567890123456789012345678901234567890	vvvv==L2===	v v vv v
BAT	100	QQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYCLTISRMEA	
TEL9	64.8KA...L..AA.T.Q....S.....DFT...NSLQP	
Viclone47	63.3KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
SiP055	63.3QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
039741	63.9QA.R.L..DA..K.T.....DFT...SL.P	
AC32	63.9QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
AC21B	64.5QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
B9601(Vg-Jk2)	62.7QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
LS1	62.4	..R..QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
TR1.21	63.0KA...L..AA..Q....S.....DFT...SLQP	
AC18	63.0QA.R.L..D.F.R.T.I.....DFT...SL.P	
19.E7	63.6QA.R.L..DA..R.T.I.....DFT...SL.P	
STRAb SA-1A	63.0KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
Viclone49	62.4KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
MP6	62.4KA...L..AA.S.Q....S.....DFT...SLQP	
AC33	63.6QA.R.LV.D...R.T.I.....DFT...SL.P	
sccccCCcccc cccccCcscccc			
잔기	9	10	
81-107	123456789012345678901234567890123456A7	=====L3=====	v
BAT	100	EDAATYYCQ QRSSFP-----LTFGSGTKLEI-K	
TEL9	64.8	..F.....TN... ..G.....	
Viclone47	63.3	..F.....SY.T.G...V... ..	
SiP055	63.3	..F.V.....NW. R...Q.....	
039741	63.9	..F.V.....S_KW.G...V... ..	
AC32	63.9	..F.V.....NW.PG...V... ..	
AC21B	64.5	..F.V.....NW.G...V... ..	
B9601(Vg-Jk2)	62.7	..F.V.....NW.P Y...Q.....	
LS1	62.4	..F.V.....NW.G...V... ..	
TR1.21	63.0	..F.....SY.T. F...G...V... ..	
AC18	63.0	..F.V.....Y.W.PG...V... ..	
19.E7	63.6	..F.V.....NW.P...VD... ..	
STRAb SA-1A	63.0	..F.....SY.T.G...V... ..	
Viclone49	62.4	..F.....SY.T. R...Q...V... ..	
MP6	62.4	..F.....SY.P.PV Y...Q.....	
AC33	63.6	..F.D.....EW.G...V... ..	

11D-유린 BAT V_k 영역과 인간 V_k 서열의 백분을 동일성.
 2점 [.]은 BAT V_k 및 생쥐 생식계열 V_k 사이의 매치를 나타내고,
 선 [-]은 아미노산 부재를 나타내고, 인간 V_k 서열에서 밀출된 잔기는
 그들의 밀접한 인간 V_k 유전자와 다른 것을 나타낸다.
 S/C는 Fv의 표면 또는 코어 상의 CDR의 5 Å 내에 위치한 아미노산을
 나타내고, s/c는 Fv의 표면 또는 코어 상의 CDR의 5 Å 보다 더 떨어져
 위치한 아미노산을 나타낸다.
 4v는 FR에 위치한 Vernier 잔기 (Footer et al., J. Mol. Biol. 224:487, 1992)를 나타낸다.

[0207]

표 4a

명칭	¹ ID	² 전체	³ 표면	코어	⁴ Kabat CDR	⁵ FR	³ FR 표면	⁴ FR 코어	⁶ FR 부근 CDR	
BAT Vκ	100.0	106	23	81	26	80	17	63	32	
TEL9	64.8	70	11	59	13	58	10	50	26	
V1 clone47	63.3	69	11	59	13	57	10	50	26	
SiP055	63.3	69	11	59	13	57	10	50	26	
039741	63.9	69	11	59	13	57	10	50	26	
AC32	63.9	69	11	59	13	57	10	50	26	
AC21B	64.5	69	11	59	13	57	10	50	26	
B9601 (Vg-Jk2)	62.7	69	11	59	13	57	10	50	26	
LS1	62.4	68	11	59	13	57	10	50	26	
TR1.21	63.0	68	11	58	13	57	10	50	26	
AC18	63.0	68	11	58	13	57	10	50	26	
19.E7	63.6	68	11	58	12	57	10	50	26	
STRAb SA-1A	63.0	68	11	58	12	57	10	49	26	
V1clone49	62.4	68	11	58	12	57	10	49	26	
MP6	62.4	68	11	58	12	57	10	49	25	
AC33	63.6	68	11	58	12	57	10	49	25	
명칭	⁷ Vernier	⁸ Vκ	⁸ J	밀접한 인간 생식계	⁹ L1 크기	L2 크기	L3 크기	¹⁰ L1 클래스	L2 클래스	L3 클래스
BAT Vκ	14	94	12		10	7	9	?	1/7A	?
TEL9	12	60	10	DPK8-Vd+	11	동일	동일	2/11A	동일	?
V1 clone47	12	60	10	V3b+	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
SiP055	12	60	10	3A7	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
039741	12	59	10	3A7						
AC32	12	59	10	3A7	11	동일	10	2/11A	동일	?
AC21B	12	59	10	3A7	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
B9601 (Vg-Jk2)	12	59	10	3A7	11	동일	10	2/11A	동일	?
LS1	12	59	10	3A7	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
TR1.21	12	59	10	V3b+	11	동일	동일	?	동일	1/9A
AC18	12	59	10	3A7	11	동일	10	2/11A	동일	?
19.E7	12	59	10	3A7	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
STRAb SA-1A	12	59	10	V3b+	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A

표 4b

V1clone49	12	59	10	V3b+	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A
MP6	12	59	10	V3b+	11	동일	11	2/11A	동일	?
AC33	12	59	10	3A7	11	동일	동일	2/11A	동일	1/9A

1ID-무린 BAT Vκ 영역과 인간 Vκ 서열의 백분율 동일성.
2무린 BAT Vκ 영역 전체와 비교될 때 인간 Vκ 영역의 전체에서 동일한 잔기의 모든 수.
3표면 (FR 표면)-표면 상의 동일 (FR) 잔기의 수.
4코어 (FR 코어)-Fv 도메인의 (FR) 코어 내의 동일한 잔기의 수.
5CDR/FR-CDR 또는 FR 내의 동일한 잔기의 수.
6FR 부근 CDR-CDR의 5 Å 내에서 FR 아미노산 중의 동일한 잔기의 수.
7Vernier-14 Vernier 아미노산 중의 동일한 잔기의 수 (Foote et al., *ibid*).
8Vκ (J 사슬)-Vκ (J 사슬) 유전자 내의 동일한 잔기의 수.
9L1 내지 L3 크기-각 CDR의 잔기의 수.
10L1 내지 L3 클래스-Martin & Thornton (Martin et al., *ibid*)에 따른 CDR의 canonical 클래스.

- [0208]
- [0209]
- [0210] a. 추가변 루프에 대한 canonical 구조 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano et al., *ibi* d)가 보존된다는 것은 매우 중요하다. 결과적으로, 인간화된 BAT-1 가변영역에서 이러한 canonical 구조의 부분인 모든 생쥐 FR 잔기를 보존하는 것은 중요하다.
- [0211] b. mBAT-1 항체 가변영역의 서열은 비일반적 또는 드문 잔기를 확인하기 위하여 다른 생쥐 항체로부터의 유사한 서열과 비교되었고 그것은 항원 결합에 중요한 역할을 지적할 수 있다. 이것은 다음으로 BAT-1 가변영역 유전자의 모형을 사용하여 조사되었다.
- [0212] c. 모형의 직접적인 분석이 인간화된 FR에 존재하지 않는 어떠한 다른 생쥐 FR 잔기가 어떠한 방법으로 항체 결합을 풍부하게 할 수 있는지에 대해 시도 또는 예상하기 위하여 또한 만들어진다.
- [0213] d. 수용체 서열이 속하는 인간 가변영역 서브그룹의 보존 서열과 카파 경쇄 및 중쇄 가변영역에 대한 개별 인간 수용체 서열의 비교가 또한 만들어졌다. 인간 공여체 서열에 어떠한 특이적 아미노산의 확인은 이러한 것이

역으로 항체 결합에 영향을 줄 수 있기 때문에 중요하다.

[0214] e. 선택된 인간 경쇄 및 중쇄 가변영역이 두 개의 다른 인간 항체로부터 유래될 수 있으므로 (인간 V_H 수용체 서열의 선택에 대하여 실시예 4 참고), 양 공여체 및 수용체 카과 경쇄 가변영역의 도메인간 채워진 잔기의 신중한 분석이 수행되어야만 한다. 이것은 이 영역에서 어떠한 잘못된 채움은 인간화된 BAT-1 항체의 CDR 루프 구조의 입체구조에 관계 없이 항체 결합에 중요한 영향을 가질 수 있기 때문이다.

[0215] f. 이러한 설계 프로세스에 따라서, 무린 BAT-1 V_K FR의 수 많은 아미노산이 인간화된 BAT-1 항체의 제 2 버전 ($BATR_{KB}$)에 보존을 위하여 확인되었다 (표 5). 표 5는 BAT-1 항체 카과 경쇄 가변영역의 제 1 ($BATR_{KA}$) 및 제 2 ($BATR_{KB}$) 모양이 고쳐진 인간 버전의 설계를 이끄는 아미노산 서열의 배치를 제공한다. 공여체 생쥐 BAT-1 V_K 영역 및 수용체 인간 TEL9 V_K 영역의 FR 사이의 21 아미노산 차이가 있다. 그러나, 인간 FR에 존재하는 아미노산을 원 생쥐 FR에 존재하는 아미노산으로 변화하는데 필요한 것으로 간주되는 곳인 인간화된 FR에 단지 5 잔기가 있다.

[0216] Chothia 및 동료들에 의하여 정의된 (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651, 1985) V_K/V_H 에 위치한 V_K 영역 아미노산이 일반적이지 않거나 드문 잔기에 대하여 체크되었다. 이 분석으로부터, 어떠한 관련된 수준으로 부각된 유일한 잔기는 FR2에 위치 36의 Phe (Phe 36)이었다. 그러나, (TEL9에서 발견된 것과 같은) Tyr은 정상적으로 mBAT-1이 존재하는 이 위치에서 발견된다. 첨가하여, 위치 36은 Vernier 아미노산에 대한 인식된 위치이다 (Foote et al., ibid). Vernier 잔기는 CDR 루프 입체구조를 유지하는데 중요하게 된다고 생각된다. 더구나, Phe는 Kabat 생쥐 서브그룹 VI (21/153)에서 일반적으로 보여지지 않지만, Tyr은 생쥐 서브그룹 VI (131/153) 및 인간 서브그룹 I (66/74) 양자에서 매우 일반적으로 보여진다 (Kabat et al., ibid). 결과적으로, Tyr36Phe 변화는 2 이형 인간 수용체 가변영역 사이에서 BAT-1에서 발견되는 도메인간 채움을 모방 및 CDR 루프 입체구조를 유지하는데 적절한 것으로 생각된다.

표 5a

Kabat	#	FR 또는 CDR	생쥐 BAT V_K	생쥐 κ -VI	인간 κ -I	인간 수용체 TEL9	표면 또는 코어	BAT R_{KA}	BAT R_{KB}	코멘트
1	1	FR1	Q	Q	D	E	S	E	E	
2	2		I	I	I*	.	C	I	I	Chothia Canonical (L1); Martin Canonical (L1/L3); Vernier
3	3		V	V*	Q	.	S	V	V	Martin Canonical (L3);

[0217]

표 5b

4	4		L	L*	M	.	C	L	L	Chothia Canonical (L1/L3); Martin Canonical (L1/L3); Vernier
5	5		T	T	T*	.	C	T	T	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
7	7		S	S*	S*	.	c	S	S	
8	8		P	P*	P*	.	c	P	P	
9	9		A	A*	S*	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	
10	10		I	I*	S	S	C	<u>S</u>	<u>S</u>	
11	11		M	M	L	L	c	<u>L</u>	<u>L</u>	
12	12		S	S	S*	.	c	S	S	
13	13		A	A*	A	.	c	A	A	
14	14		S	S*	S	.	c	S	S	
15	15		P	P	V*	V	s	<u>V</u>	<u>V</u>	
16	16		G	G*	G*	.	c	G	G	
17	17		E	E	D	D	c	<u>D</u>	<u>D</u>	
18	18		K	K*	R	R	s	<u>R</u>	<u>R</u>	
19	19		V	V*	V	.	c	V	V	
20	20		T	T*	T*	.	c	T	T	
21	21		I	M	I*	.	c	I	I	
22	22		T	T*	T	.	C	T	T	
23	23	FR1	C	C*	C*	.	C	C	C	Martin Canonical (L1/L2)
24	24	CD RI	S	S	R	R	s	S	S	
25	25		A	A*	A	.	c	A	A	Chothia Canonical (L1); Martin Canonical (L1)
26	26		R	S*	S	S	s	R	R	
27	27		S	S*	Q	Q	s	S	S	
27A			-	-	S	-	s	-	-	
27B			-	-	L	-	c	-	-	
27C			-	-	V	-	s	-	-	
27D			-	-	x	-	c	-	-	
27E			-	-	x	-	s	-	-	
27F			-	-	-	-	s	-	-	
28			-	-	S	S	s	-	-	Martin Canonical (L3); BAT-1 VK에 아미노산은 없다
29	28		S	S*	I	I	s	S	S	Martin Canonical (L3)

[0218]

표 5c

30	29		V	V	S	S	c	V	V	Chothia Canonical (L1); Martin Canonical (L1)
31	30		S	S	N	N	c	S	S	Martin Canonical (L3)
32	31		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Martin Canonical (L3)
33	32		M	M	L*	L	c	M	M	Chothia Canonical (L1); Martin Canonical (L1/L3)
34	33	CD R1	H	H	A	N	c	H	H	채움 AA
35	34	FR2	W	W*	W*	.	C	W	W	Martin Canonical (L1); Vernier
36	35		F	Y	Y	Y	C	Y	F	채움 AA ; Vernier ; 생쥐 생식계열 =Tyr; (Δ1)
37	36		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	
38	37		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	채움 AA
39	38		K	K*	K	.	c	K	K	
40	39		P	S	P*	.	s	P	P	
41	40		G	G	G	.	s	G	G	
42	41		T	T	K	K	c	K	K	생쥐생식계열 = Ser
43	42		S	S*	A	A	c	A	A	
44	43		P	P*	P*	.	C	P	P	코어 채움 ; AA
45	44		K	K*	K	.	s	K	K	
46	45		L	R	L	.	C	L	L	Vernier; 채움 AA; 생쥐생식계열 = Pro
47	46		W	W	L*	L	C	L	W	Vernier ; (Δ2)
48	47		I	I*	I*	.	C	I	I	Chothia Canonical (L2); Vernier
49	48	FR2	Y	Y*	Y	.	C			Vernier
50	49	CD R2	R	D	A	A	c	R	R	
51	50		T	T	A	A	c	T	T	Chothia Canonical (L2)
52	51		S	S*	S	.	c	S	S	Chothia Canonical (L2)
53	52		N	K	S	T	s	N	N	
54	53		L	L*	L*	.	c	L	L	
55	54		A	A	E	Q	c	A	A	
56	55	CD R2	S	S*	S	.	s	S	S	

[0219]

표 5d

57	56	FR3	G	G*	G*	.	S	G	G	
58	57		V	V*	V	.	C	V	V	
59	58		P	P*	P*	.	C	P	P	
60	59		A	A	S*	S	S	S	S	
61	60		R	R*	R*	.	c	R	R	
62	61		F	F*	F*	.	C	F	F	
63	62		S	S*	S	.	C	S	S	
64	63		G	G*	G*	.	C	G	G	Chothia Canonical (L2); Vernier
65	64		S	S*	S	.	C	S	S	
66	65		G	G*	G*	.	C	G	G	Vernier
67	66		S	S*	S	.	S	S	S	
68	67		G	G*	G*	.	C	G	G	Vernier
69	68		T	T	T	.	C	T	T	Vernier
70	69		S	S*	D	D	S	D	D	
71	70		Y	Y	F	F	C	F	Y	Chothia Canonical (L1); Martin Canonical (L1); Vernier; (Δ3)
72	71		C	S*	T	T	c	T	T	생쥐생식계열 = Ser
73	72		L	L*	L	.	c	L	L	
74	73		T	T*	T	.	c	T	T	
75	74		I	I*	I	.	c	I	I	
76	75		S	S	S	N	c	N	N	
77	76		R	S	S	S	c	S	S	생쥐생식계열 = Ser
78	77		M	M	L*	L	c	L	L	
79	78		E	E*	Q	Q	c	Q	Q	
80	79		A	A*	P	P	s	P	P	
81	80		E	E*	E	.	s	E	E	
82	81		D	D*	D	.	c	D	D	
83	82		A	A	F	F	c	F	F	
84	83		A	A*	A*	.	c	A	A	
85	84		T	T	T	.	c	T	T	
86	85		Y	Y*	Y*	.	c	Y	Y	
87	86		Y	Y*	Y*	.	C	Y	Y	채움 AA
88	87	FR3	C	C*	C*	.	C	C	C	Martin Canonical (L3)
89	88	CD R3	Q	Q	Q	.	c	Q	Q	Martin Canonical (L3); 채움 AA
90	89		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Chothia Canonical (L3); Martin Canonical (L3)
91	90		R	W	Y	T	c	R	R	Martin Canonical (L3); 채움 AA

[0220]

표 5e

92	91		S	S	N	N	c	S	S	Martin Canonical (L3)
93	92		S	S	S	.	c	S	S	Martin Canonical (L3)
94	93		F	N	L	.	c	F	F	Martin Canonical (L3)
95	94		P	P	P	.	c	P	P	Chothia Canonical (L3); Martin Canonical (L3)
95A			-	P	E	-		-	-	
95B			-	M	-	-		-	-	
95C			-	P	-	-		-	-	
95D			-	-	-	-		-	-	
95E			-	-	-	-		-	-	
95F			-	-	E	-		-	-	
96	95		L	L	W	.	c	L	L	Martin Canonical (L3); 코어 채움 AA
97	96	CD R3	T	T*	T	.	c	T	T	Martin Canonical (L3)
98	97	FR4	F	F*	F*	.	C	F	F	Martin Canonical (L3); Vernier; 코어 채움 AA.
99	98		G	G*	G*	.	c	G	G	
100	99		S	A	Q	G	s	G	G	
101	100		G	G*	G*	.	c			
102	101		T	T*	T*	.	c			
103	102		K	K*	K	.	c	K	K	
104	103		L	L*	V	.	c	L	L	
105	104		E	E*	E	.	c	E	E	
106	105		I	L	I	.	c	I	I	
106 A			-	-	-	-		-	-	
107	106	FR4	K	K*	K	.	s	K	K	

[0221]

[0222]

두번째 변화가 또한 FR2에 위치 47에서 결정되었다. 인간 TEL9 카파 경쇄 가변영역에서 발견된 고도로 보존된 Leu이 생쥐 BAT-1 카파 경쇄 가변영역에 발견되는 것인 Trp으로 변화되었다. 위치 47은 다른 인식된 Vernier 잔기 위치이고, 또한 분자 모형에 따르면 N_H 접점 가까이 위치한다. 특별히, 그것은 H2에서 Ala55에 밀접하며, 그것과 상호작용 할 것이다. 그러므로, Trp이 인간 V_H 서열에서 이 코어 잔기 위치에 결코 보여지지 않을지라도, Leu47Trp 수식을 만들어서 BATR_{K_B}에 그것을 보존하는 것이 분명하다고 생각된다.

[0223]

BATR_{K_B} 내에 도입된 제 3 FR 변화는 또한 Vernier 잔기 위치 (Foote et al., ibid)로서 확인되는 잔기 위치 71에 위치되며, L1 루프 구조에 대한 중요한 canonical 잔기 위치의 하나가 되는 것으로 또한 인식된다. 이러한 canonical 잔기는 CDR 루프 구조의 보존에 중요한 것으로 Chothia 및 그의 동료들 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 ibid; Tramontane et al., ibid)에 의하여 정의되었다. 많은 canonical 아미노산은 CDR 내에 위치하지만, (71Tyr과 같은) 수는 또한 FR 내에 위치된다. 아미노산 변화가 보존적일지라도, Phe71Tyr 변화는 BAT-1 카파 경쇄의 성공적인 인간화에 중요한 것으로 간주된다.

[0224]

인간화된 V_H 영역의 다른 버전은

[0225]

BATR_{K_C}: Cys 및 Ser은 크기와 특징에 있어서 유사하고, 모형으로부터 FR3에 위치 72에 양 아미노산은 알맞게 묻혀 있으며, L1 루프로부터 밖으로 향한다. 그러나, Cys 아미노산의 경우에 있어서, 모형을 따르면 황 결-사슬은 노출되고, 반면에 Kabat 데이터베이스 (Kabat et al., ibid)를 따르면 이 위치에서 Cys의 존재는 유일한 경우이며, Ser은 이 위치 (421/1234)에서 일반적으로 보여진다. 결과적으로, BATR_{K_C}는 수용체 TEL9 항체의 V_K FR 잔기에 Tyr36Phe, Leu47Trp 및 Phe71Tyr (BATR_{K_B}에서와 같이)에서 변화에 더하여 Ser72Cys 수식을 함유한다.

[0226]

BATR_{K_D}: 뮤린 BAT-1 Fv로부터의 증거는 70Ser이 노출된 표면은 L1 루프와 상호작용할 수 있는 잔기이다. 인간

TEL9 카와 경쇄에 있어서, 이 위치의 아미노산은 Ser 보다 크고 양으로 하전된 Asp이다. Ser은 인간 V_K 영역의 이 위치에서 결코 보이지 않는다 (Asp는 이제까지 가장 일반적인 아미노산이다). L1 루프와 70Ser의 특징이 노출된 표면에 근접한 그것은 L1과 상호작용하거나 항원과 직접적으로 상호작용할 수 있다는 것을 제안한다. 결과적으로, BATR_{KC}과 동일한 BATR_{KD}에서 Asp70Ser 변화가 만들어지는 것으로 결정되었다.

[0227] 상기 제안된 모든 인간화된 BAT-1 항체 V_K 영역 변형체의 아미노산 서열의 설명은 도 5에 주어진다.

[0228] 잠정적인 N-연결된 당화 위치, 즉 Asn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa (Gavel et al., Protein Eng. 3:43, 1990)가 생쥐 및 수용체 인간 V_K 영역 양쪽 뿐만 아니라 그들의 인간화된 구조에 대하여 검사되었으나, 확인된 것은 없다.

[0229] 실시예 4

[0230] 인간화된 BAT-1 V_H 항체 변형체의 설계

[0231] 다시, 생쥐 BAT-1 항체의 인간화된 V_H 영역의 설계는 인간화된 BAT-1 V_H 영역의 기초로서 작용할 수 있는 수용체 인간 중쇄 가변영역의 선택이다. mBAT-1 V_H 영역이 3 인간 중쇄 가변영역 서브그룹의 보존 서열과 먼저 비교되었을 때, 인간 중쇄 서브그룹 I에 대한 보존 서열과 전체적으로 61.54 % 동일성 및 단지 FR 사이에 67.82 % 동일성을 가지는 가장 유사한 것으로 발견되었다. 유사성에 관하여 측정되었을 때, 이러한 값은 또한 전체적으로 70.09 % 및 단지 FR 내에서 77.01 %로 증가하였다.

표 6a

명칭	ID	유린 BAT VH 대 가장 동일성 있는 15 인간 VH			
		scsCccccscScsscccccccccCcccccCSCCs	ccccCCCccss		
잔기		1	2	3	4
1-43		12345678901234567890123456789012345AB67890123			
		v		-vvvv===H1==	
BAT	100	QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTNYGMN--WVKQAPG			
hsighv1295	65.0	.V.....S.....AS.....S..SSHAI.			.R....
R2C5H	60.3	.V.....S.....AS.....N..ST.AL.			.MRR...
030805	56.8	.V.....A.V....AS..V.....S.DI.			.R..T.
WIL2	57.7	.V.....A.V....AS..V..E..V...GHY.H			.R....
21/28	59.7	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H			.R....
UC	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H			.R....
030802	58.2	.V.....A.V....AS..V.....S.A.H			.R....
039734	57.7	.V.....A.V....AS..V..E.....GHY.H			.G....
030812	56.3	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H			.R....
030810	57.9	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H			.R....
4d275a	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A..			.G....
030811	56.0	.V.....A.V....AS..V.....S.Y.H			.R....
IF10	59.3	.V.....A.V....AS..V.....S.DI.			.R....
GD9	71.4	.V.....S.....AS..V.....S.A..			.R....
039232	59.3	.VH.....S.F....AS..V.....SSVI.			.R....
		cCCCCccccccsc	cscscscscscsCCCCCcSccccccccccsc		
잔기		5	6	7	8
44-82		456789012ABC345678901234567890123456789012ABC			
		vvv=====H2=====Kabat-	v v v v v		
BAT	100	KGLKWMGWINT-DSGESTYAEFFKGRFAFSLETSANTAYLQINN			
hsighv1295	65.0	Q..Q.....NT.SP...QG.T...V...D..VS.....TS.			
R2C5H	60.3	Q..Q.....L NT.NP...QD.T...V...D..V...F...SS.			
030805	56.8	Q..E.....M.P N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.			
WIL2	57.7	Q..E.....P N..GTN..K.Q..VTITRD..I...MELSR.			
21/28	59.7	QR.E.....A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.			
UC	57.7	Q..E.....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.			
030802	58.2	QR.E.....A GN.NTK.SQK.Q..VTITRD...S...MELSS.			
039734	57.7	Q..E.....P N..GTN..QK.Q..VTITRD..I...MELSR.			
030812	56.3	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.			
030810	57.9	Q..E...I..P SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.			
4d275a	71.4	Q..E..... NT.NP...QG.T...V...D..VS.....CS.			

[0232]

표 6b

030811	56.0	Q..E...I..P	SG.STS..QK.Q..VTMTRD..TS.V.MELSS.
IF10	59.3	Q..E...M.P	N..NTG..QK.Q..VTMTRN..IS...MELSS.
GD9	71.4	Q..E.....	NT_DP...QG.T...V...D..VS.....SS.
039232	59.3	Q..E.....	NT.NP...QG.T...V...D..VT.T.....S.
csscccccCCCCccssccccc cccc ccCsccccc			
장기		9	10
83-113		345678901234567890	ABCDEFGHIJK1234567890123
VV=====H3=====V			
BAT	100	NNEDTATYFCVRVGYDA-----	LDYWCQGTSTVTVSS
hsighv1295	65.0	TA...GM...AKESHSSALDL	-.....L.....
R2C5H	60.3	QA...V.Y.AKPKRGTYRRGYYP	M.V.....T.....
030805	56.8	RS...V.Y.A.G..VWGSYRYTA	AF.I.....M.....
WIL2	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGIDCY	FF.....L.....
21/28	59.7	RS...V.Y.A.G..YSGS	-N.....L.....
UC	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGIDCY	FF.....L.....
030802	58.2	RS...V.Y.A..KWEQPIDAP	F.....L.....
039734	57.7	RSD...V.Y.A.AS.CGIDCYF	F.....L.....
030812	56.3	RS...V.Y.A.D..YYDSNGYYSG	YF.....L.....
030810	57.9	RS...V.Y.A..QWLGLTGP	-.....L.....
4d275a	71.4	KA...V.Y.A.-----	-----
030811	56.0	RS...V.Y.A.D.IVVFPAAIPH	YF.....L.....
IF10	59.3	RS...V.Y.A.NNGSY	YF.....L.....
GD9	71.4	KA...V.Y.A.-----	-----
039232	59.3	KA...V.Y.A.ELRNDHYVWXNYRPLS------

생쥐 BAT-1 V_H 영역은 다음으로 공중이 이용가능한 인간 가변영역의 개별 서열의 모든 기록된 예와 비교되었다. 표 6 및 표 7은 이 분석을 통하여 확인된 생쥐 BAT-1 V_H 영역에 최고로 매치되는 15 개를 나타낸다. 전체적으로, 검색 알고리즘은 생쥐 BAT-1 V_H 영역과 가장 밀접하게 매치되는 것으로 항체 hsighv1295 (Fang et al., J. Exp. Med. 179:1445, 1994)로부터 인간 V_H 영역을 선택했다. 이 인간 V_H 영역은 전체적으로 BAT-1 V_H 영역과 69.23 % (표 7)의 동일성을 가지며, 단지 FR이 비교되었을 때 74.71 %로 그 값이 증가한다. 유사성에 대하여 측정되었을 때, 이러한 값은 전체적으로 75.21 %로 증가하고, 단지 FR 내에서는 79.31 %로 증가한다. 그러므로 이 인간 FR은 BAT-1 중쇄의 인간화된 버전의 기초가 된다.

표 7a

명칭	ID	전체	표면	코어	Kabat CDR	FR	FR 표면	FR 코어	FR 부근 CDR
BAT V _H	100	117	26	86	30	87	18	68	27
Hsighv1295	65.0	78	17	63	17	65	14	51	22
R2C5H	60.3	76	16	59	17	64	14	49	20
030805	56.8	71	16	56	14	59	13	47	19
WIL2	57.7	71	15	56	13	59	13	46	19
21/28	59.7	71	15	55	13	59	13	46	19

표 7b

UC	57.7	71	15	55	13	59	13	46	19
030802	58.2	71	15	55	13	59	13	46	19
039734	57.7	71	15	55	13	57	13	46	19
030812	56.3	71	15	55	13	58	13	46	18
030810	57.9	70	15	55	13	58	13	46	17
4d275a	71.4	70	15	54	13	58	13	46	18
030811	56.0	70	15	54	13	58	13	46	18
IF10	59.3	70	15	54	13	58	13	46	18
GD9	71.4	70	15	54	11	58	13	46	18
039232	59.3	70	15	54	13	58	13	46	18

명칭	Vernier	V _H	J	밀접한 인간 생식계열	H1 크기	H2 크기	H3 크기	H1 클래스	H2 클래스
BAT V _H	16	98	19		5	17	8	?	?
Hsighv1295	13	70	14	VI-4.1b+	동일	동일	11	1/10A	2/10A
R2C5H	13	70	14	VI-4.1b+	동일	동일	17	동일	동일
030805	11	66	14	DP-15-V18+					
WIL2	11	65	14	DP-8+	동일	동일	14	1/10A	동일
21/28	11	64	14	DP-25-VI3b+	동일	동일	10	1/10A	동일
UC	11	62	14	DP-8+	동일	동일	14	1/10A	동일
030802	11	62	14	DP-25-VI3b+					
039734	11	62	14	DP-8+					
030812	11	60	14	hvl1f10t					
030810	11	59	14	hvl1f10t					
4d275a	11	59	14	DP-21-4d275a+	동일	동일	0	동일	동일
030811	11	59	14	hvl1f10t					
IF10	11	59	14	DP-15-V18+	동일	동일	9	동일	동일
GD9	11	58	14	VI-4.1b+	동일	동일	0	동일	2/10A
039232	11	58	14	VI-4.1b+					

1ID-뮤린 BAT V_k 영역과 인간 V_k 서열의 백분율 동일성.
2뮤린 BAT V_k 영역 전체와 비교될 때 인간 V_k 영역의 전체에서 동일한 잔기의 모든 수.
3표면 (FR 표면)-표면 상의 동일 (FR) 잔기의 수.
4코어 (FR 코어)-Fv 도메인의 (FR) 코어 내의 동일한 잔기의 수.
5CDR/FR-CDR 또는 FR 내의 동일한 잔기의 수.
6FR 부근 CDR-CDR의 5 Å 내에서 FR 아미노산 중의 동일한 잔기의 수.
7Vernier-14 Vernier 아미노산 중의 동일한 잔기의 수 (Foote et al., *ibid*).
8VH (J 사슬)-VH (J 사슬) 유전자 내의 동일한 잔기의 수.
9L1 내지 L3 크기-각 CDR의 잔기의 수.
10L1 내지 L3 클래스-Martin & Thornton (Martin et al., *ibid*)에 따른 CDR의 canonical 클래스.

[0236]

[0237]

설계 프로세스에서의 다음 단계는 이러한 아미노산 잔기의 어떤 것이 항원에 결합하는 것을 역으로 풍부하게 하는지를 결정하기 위하여 인간 수용체 hsiglv1295 V_H 영역 FR의 아미노산 서열을 연구하는 것이다. 다시 한번, OML (실시예 5 참고)에 의하여 세워진 분자 모형은 이 설계 프로세스에 중요하며, 이것으로부터 뮤린 BAT-1 V_H 영역 FR 내의 수많은 아미노산이 인간화된 BAT-1 항체의 제 1 (BATH_A) 및 순차적인 버전에 보존을 위하여 확인되었다 (표 8). 공여체 생쥐 BAT-1 및 수용체 인간 hsiglv1295 V_H 영역의 FR 사이의 22 아미노산 차이가 있으며, 최대 9 뮤린 잔기가 인간화된 FR 내에 보존을 위하여 고려되었다.

[0238]

그러므로 생쥐 BAT-1 항체 V_H 영역의 CDR로 구성되는 BATH_A는 유전적으로 인간 hsiglv1295 항체 V_H 영역의 FR 내로 삽입되었다. 이것은 인간화된 BAT-1 항체의 V_H 영역의 CDR-이식된 버전이며, FR 아미노산 변화를 함유하지 않는다.

[0239]

BATH_B에서, 생쥐 BAT-1 서열의 FR1에 위치 28 및 30에서 아미노산 (즉, 각각 Thr 및 Thr)은 인간화된 BAT-1 중쇄 가변영역 내의 상응하는 인간 hsiglv1295 아미노산 (즉, 각각 Ser 및 Ser)을 대체했다. 이것은 그들이 H1 추가변영역 루프 입체구조에 대하여 중요한 어떠한 canonical 잔기를 나타내기 때문이었다 (Chothia et al., 1992 *ibid*). canonical 잔기는 추가변 루프의 정확한 방향 및 구조에 결정적인 것으로 고려되며, 일반적으로 항상 인간화된 가변영역에서 보존된다. 더구나, 잔기 위치 27 - 30은 H1 루프 그것 자체로 간주되고, 그래서 이 루프-조절하는 그들의 보존의 정확한 입체구조 및 방향에 더 중요하게 된다. 그러므로, 이러한 2 잔기 위치는 BATH_B에 인간 hsiglv1295 서열의 FR에 만들어진 변화의 합을 나타낸다.

[0240]

설계 프로세스에서의 다음 단계는 이러한 아미노산 잔기의 어떤 것이 항원에 결합하는 것을 역으로 풍부하게 하는지를 결정하기 위하여 인간 수용체 hsiglv1295 V_H 영역 FR의 아미노산 서열을 연구하는 것이다. 다시 한번,

OML (실시예 5 참고)에 의하여 세워진 분자 모형은 이 설계 프로세스에 중요하며, 이것으로부터 뮤린 BAT-1 V_H 영역 FR 내의 수많은 아미노산이 인간화된 BAT-1 항체의 제 1 (BATRH_A) 및 순차적인 버전에 보존을 위하여 확인되었다 (표 8). 공여체 생쥐 BAT-1 및 수용체 인간 hsighv1295 V_H 영역의 FR 사이의 22 아미노산 차이가 있으며, 최대 9 뮤린 잔기가 인간화된 FR 내에 보존을 위하여 고려되었다.

[0241] 그러므로 생쥐 BAT-1 항체 V_H 영역의 CDR로 구성되는 BATRH_A는 유전적으로 인간 hsighv1295 항체 V_H 영역의 FR 내로 삽입되었다. 이것은 인간화된 BAT-1 항체의 V_H 영역의 CDR-이식된 버전이며, FR 아미노산 변화를 함유하지 않는다.

[0242] BATRH_B에서, 생쥐 BAT-1 서열의 FR1에 위치 28 및 30에서 아미노산 (즉, 각각 Thr 및 Thr)은 인간화된 BAT-1 중쇄 가변영역 내의 상응하는 인간 hsighv1295 아미노산 (즉, 각각 Ser 및 Ser)을 대체했다. 이것은 그들이 H1 초가변영역 루프 입체구조에 대하여 중요한 어떠한 canonical 잔기를 나타내기 때문이었다 (Chothia et al., 1992 *ibid*). canonical 잔기는 초가변 루프의 정확한 방향 및 구조에 결정적인 것으로 고려되며, 일반적으로 항상 인간화된 가변영역에서 보존된다. 더구나, 잔기 위치 27 - 30은 H1 루프 그것 자체로 간주되고, 그래서 이 루프-조절하는 그들의 보존의 정확한 입체구조 및 방향에 더 중요하게 된다. 그러므로, 이러한 2 잔기 위치는 BATRH_B에 인간 hsighv1295 서열의 FR에 만들어진 변화의 합을 나타낸다.

표 8a

Kabat	#	FR or CDR	생쥐 BAT V _H	생쥐 Misc.	인간 I	인간 수용체 hsighv 1295	표면 또는 코어	BAT RH _A	BAT RH _B	BAT RH _C	코멘트
1	1	FR 1	Q	E	Q	.	s	Q	Q	Q	
2	2		I	V*	V	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	Martin Canonical (H1); Vernier
3	3		Q	Q	Q	.	s	Q	Q	Q	
4	4		L	L	L*	.	C	L	L	L	Martin Canonical (H1)
5	5		V	Q*	V	.	c	V	V	V	
6	6		Q	Q*	Q	.	c	Q	Q	Q	
7	7		S	S	S*	.	c	S	S	S	
8	8		G	G	G*	.	c	G	G	G	
9	9		P	A*	A	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
10	10		E	E	E	.	c	E	E	E	
11	11		L	L*	V	.	S	L	L	L	
12	12		K	V*	K	.	c	K	K	K	
13	13		K	K	K*	.	s	K	K	K	
14	14		P	P*	P*	.	s	P	P	P	
15	15		G	G	G*	.	c	G	G	G	
16	16		E	A	A	A	c	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
17	17		T	S*	S*	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
18	18		V	V*	V	.	c	V	V	V	
19	19		K	K*	K	.	s	K	K	K	
20	20		I	L	V	.	c	I	I	I	Martin Canonical (H1)
21	21		S	S	S	.	c	S	S	S	
22	22		C	C	C*	.	C	C	C	C	Martin Canonical (H1)
23	23		K	T	K	.	c	K	K	K	
24	24		A	A*	A	.	c	A	A	A	Chothia Canonical (H1); Martin Canonical (H1)

[0243]

표 8b

25	25		S	S	S*	.	c	S	S	S	Chothia Canonical (H1); Martin Canonical (H1)
26	26		G	G	G*	.	c	G	G	G	
27	27		Y	P*	Y	.	C	Y	Y	Y	Chothia Canonical (H1); Vernier
28	28		T	N	T	S	S	S	T	T	Vernier; (Δ1)
29	29		F	I*	F*	.	C	F	F	F	Chothia Canonical (H1); Martin Canonical (H1); Vernier
30	30	FR 1	T	K	T	S	C	S	T	T	Vernier; (Δ2)
31	31	CDR 1	N	D	S	S	s	N	N	N	
32	32		Y	T	Y	H	c	Y	Y	Y	Martin Canonical (H1)
33	33		G	Y*	A	A	c	G	G	G	Martin Canonical (H1/H2)
34	34		M	M	I	I	c	M	M	M	Chothia Canonical (H1) Martin Canonical (H1)
35	35		N	H	S	.	c	N	N	N	Martin Canonical (H1); 채움 AA.
35a			-	-	-	-	-	-	-	-	
35b		CDR 1	-	-	-	-	-	-	-	-	
36	36	FR 2	W	W	W*	.	C	W	W	W	Martin Canonical (H1)
37	37		V	V*	V	.	C	V	V	V	채움 AA.
38	38		K	K	R*	R	C	R	R	R	
39	39		Q	Q	Q*	.	c	Q	Q	Q	채움 AA.
40	40		A	R	A	.	c	A	A	A	
41	41		P	P	P	.	s	P	P	P	
42	42		G	E*	G*	.	s	G	G	G	
43	43		K	Q*	Q	Q	s	Q	Q	Q	
44	44		G	G*	G	.	c	G	G	G	
45	45		L	L	L*	.	C	L	L	L	Core packing AA.
46	46		K	E	E*	Q	C	Q	Q	Q	
47	47		W	W	W*	.	C	W	W	W	Martin Canonical (H2); Packing AA.
48	48		M	I*	M	.	C	M	M	M	Martin Canonical (H1)

[0244]

표 8c

49	49	FR 2	G	G*	G*	.	C	G	G	G	
50	50	CDR 2	W	R	W	.	c	W	W	W	Martin Canonical (H2)
51	51		I	I	I	.	c	I	I	I	Martin Canonical (H1/H2)
52	52		N	D*	N	.	c	N	N	N	Martin Canonical (H2)
52a	53		T	P*	P	.	c	T	T	T	Chothia Canonical (H2) Martin Canonical (H2)
52b			-	-	Y	-	-	-	-	-	Martin Canonical (H2)
52c			-	-	-	-	-	-	-	-	Martin Canonical (H2)
53	54		D	A	G	N	s	D	D	D	Martin Canonical (H2)
54	55		S	N	N	T	c	S	S	S	Martin Canonical (H2)
55	56		G	G	G	.	c	G	G	G	Chothia Canonical (H2); Martin Canonical (H2)
56	57		E	N	D	S	s	E	E	E	Martin Canonical (H2)
57	58		S	T	T	P	c	S	S	S	
58	59		T	K	N	.	c	T	T	T	Martin Canonical (H2)
59	60		Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Martin Canonical (H2)
60	61		A	D	A	.	c	A	A	A	
61	62		E	P*	Q	Q	s	E	E	E	
62	63		E	K*	K	G	s	E	E	E	
63	64		F	F*	F	.	c	F	F	F	
64	65		K	Q*	Q	T	s	K	K	K	
65	66	CDR 2	G	G	G	.	s	G	G	G	
66	67	FR 3	R	K	R	.	C	R	R	R	
67	68		F	A	V	.	C	F	F	F	
68	69		A	T*	T	V	C	V	V	V	
69	70		F	I	I	.	C	F	F	F	Martin Canonical (H1/H2)
70	71		S	T*	T	.	C	S	S	S	
71	72		L	A*	A	.	C	L	L	L	Chothia Canonical (H2); Martin Canonical (H2)
72	73		E	D	D	D	c	D	D	D	

[0245]

표 8d

73	74		T	T*	T	.	S	T	T	T	
74	75		S	S*	S*	.	s	S	S	S	
75	76		A	S*	T	V	c	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	
76	77		N	N*	S	S	c	<u>S</u>	<u>S</u>	N	(Δ3)
77	78		T	T*	T	.	c	T	T	T	
78	79		A	A*	A	.	c	A	A	A	Martin Canonical (H1/H2)
79	80		Y	Y*	Y	.	c	Y	Y	Y	
80	81		L	L	M	.	c	L	L	L	Martin Canonical (H1)
81	82		Q	Q*	E	.	c	Q	Q	Q	
82	83		I	L*	L	.	c	I	I	I	
82a	84		N	S*	S	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
82b	85		N	S*	S	S	s	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	
82c	86		L	L	L*	.	c	L	L	L	
83	87		N	T*	R	T	c	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
84	88		N	S*	S	A	s	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
85	89		E	E*	E	.	s	E	E	E	
86	90		D	D*	D*	.	c	D	D	D	
87	91		T	T*	T	.	c	T	T	T	
88	92		A	A	A	G	c	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	
89	93		T	V	V	M	c	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	
90	94		Y	Y	Y*	.	c	Y	Y	Y	Martin Canonical (H1)
91	95		F	Y*	Y	.	C	F	F	F	채움 AA.
92	96		C	C	C*	.	C	C	C	C	Martin Canonical (H1)
93	97		V	A	A*	A	C	<u>V</u>	<u>V</u>	A	채움 AA; (Δ4)
94	98	FR 3	R	R	R	K	C	<u>R</u>	<u>R</u>	K	Chothia Canonical (H1); Martin Canonical (H1); (Δ5)
95	99	CDR 3	V	G	A	E	c	<u>V</u>	<u>V</u>	V	채움 AA.
96	100		G	Y	P	S	c	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	
97	101		Y	L	G	H	s	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	
98	102		D	R	Y	S	s	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	
99	103		A	R	G	S	c	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
100			-	D	S	A		-	-	-	
100 a			-	-	G	L		-	-	-	
100 b			-	-	G	D		-	-	-	
100 c			-	-	G	-		-	-	-	
100 d			-	-	C	-		-	-	-	
100 e			-	-	Y	-		-	-	-	
100 f			-	-	R	-		-	-	-	
100 g			.	-	G	-		.	.	.	
100 h			.	-	D	-		.	.	.	
100 i			.	-	Y	-		.	.	.	
100 j			.	-	x	-		.	.	.	

[0246]

표 8e

100	k104		L	-	F	.	c	L	L	L	코어 채움 AA.
101	105		D	D	D	.	c	D	D	D	
102	106	CDR 3	Y	Y	Y	.	c	Y	Y	Y	Martin Canonical (H1)
103	107	FR 4	W	W	W*	.	C	W	W	W	코어 채움 AA.
104	108		G	G	G	.	c	G	G	G	
105	109		Q	Q	Q	.	s	Q	Q	Q	
106	110		G	G	G*	.	c	G	G	G	
107	111		T	T*	T	.	c	T	T	T	
108	112		S	S	L	L	c	L	L	L	
109	113		V	V	V*	.	c	V	V	V	
110	114		T	T	T	.	c	T	T	T	
111	115		V	V*	V*	.		V	V	V	
112	116		S	S	S*	.		S	S	S	
113	117	FR 4	S	S	S*	.		S	S	S	

[0247]

[0248]

인간화된 BAT-1 V_H 영역 (BATRH_C)의 제 3 버전은 BATRH_B에서 만들어진 모든 치환을 통합하였고, 추가하여, 인간 잔기에 상응하는 장소에서 인간 FR 내로 삽입된 3 류린 아미노산을 더 함유한다. 이러한 첫번째는 FR3에 위치 76에 위치한 Asn 아미노산이었다. BAT-1 Fv 영역의 분자 모형에 따라서, Asn 잔기는 CDR H1에 밀접하고, 루프 구조를 지탱할 수 있다. 추가적으로 생쥐 BAT-1 V_H 영역에서, Asn은 노출된 표면이며, 인간 hsinhv1295 FR에 Ser보다 크다. 결과적으로, Ser76Asn 치환이 FR에 대하여 만들어진다.

[0249]

더 나아간 변화가 V_H 영역의 FR3에서 위치 94의 아미노산에 만들어지며, 잔기 위치는 H3 루프 입체구조에 중요한 것으로 Chothia et al. (Chothia et al., 1992 ibid) 뿐만 아니라 Martin 및 Thornton (Martin et al., ibid)에 의하여 이전에 확인되어졌다. 더구나, 분자 모형은 Arg94는 루프 구조를 안정화하는 CDR H3에서 Asp101과 염다리를 형성할 수 있다는 것을 지적한다. 결과적으로, 생쥐에 있는 Arg은 이 잔기 위치에서 인간에 있는 Lys을 대체한다. 또한 마지막 수식이 인간 Ala가 류린 Val 아미노산으로 대체되는 장소인 FR3 내에 위치 93에서 만들어진다. 이 잔기는 Chothia (Chothia et al., 1985 ibid)에 의하여 정의된 바와 같이, V_K 및 V_H 영역의 정확한 채움에 중요한 채우는 잔기로 고려된다. 추가적으로, 이것은 Vernier 잔기 위치로 확인되며, 그러므로 CDR 루프 입체구조를 유지하고 분자 모형 분석에 의하여 확인되는 분류에 중요하다. 모든 데이터 및 분자 분석을 종합하면 BATRH_C의 인간화된 V_H 영역에 이러한 3 류린 잔기, 즉 Ser76Asn, Ala93Val 및 Lys94Arg을 보존하는 것이 적절하다고 제안된다.

[0250]

BAT-1 V_H 영역의 다음 두 인간화된 변형체의 구성은 이러한 처음 3 인간화된 버전, 즉 BATRH_A, BATRH_B 및 BATRH_C의 결합 친화성에 의존한다. 만약 3개 모두가 적절한 수준의 결합을 나타내는 것을 실패한다면, 다음으로 버전 BATRH_D 및 BATRH_E가 합성되고 시험될 수 있다.

[0251]

인간화된 BAT-1 V_H 영역 (BATRH_D)의 버전 D는 BATRH_C에서 만들어진 모든 치환이 통합되며, 추가적으로 FR1 내에 위치 2에 위치한 생쥐 아미노산을 하나 더 함유한다. 이 위치는 canonical (Martin et al, ibid) 및 Vernier (Foote et al., ibid) 잔기 위치로 정의된다. 추가적으로, BAT-1 가변영역의 모형으로부터, 류린 Ile 아미노산은 FR1 내의 Tyr27에 밀접하며, 그것은 그것 자신이 H1 루프 구조의 부분이다. 역으로, 생쥐 및 인간 FR 내의 이 위치에서 류린 Ile 및 인간 Val 아미노산은 특징에 있어서 유사하며, 단지 크기, 즉 Ile은 추가적인 메틸기를 가지는데 있어서 약간 다르다. 그러므로, 인간화 과정의 이 단계에서 단지 Val21Ile 변화를 만드는 것이 결정되었고, 버전 BATRH_D 내로 변이가 통합되었다.

[0252]

인간화된 BAT-1 중쇄 가변영역의 마지막 버전은 위치 38 (FR2), 46 (FR2) 및 68 (FR3)에서 추가적인 3 아미노산 변화와 함께 BATRH_D에서 만들어지는 모든 생쥐 FR 치환을 통합했다.

[0253]

모형은 V_H 영역의 코어에 깊이 묻혀진 Arg이 CDR H2 내에서 Phe63에 밀접하다는 것을 제안하기 때문에 Arg38Lys 수식이 만들어졌다. 그러나, 이것은 정확하게 확인된 canonical 또는 Venier 잔기 위치가 아니다. 추가적으로, Arg 및 Lys은 구조에 있어서 비교적 유사하고, Arg이 더 크지만, 어떠한 아미노산 변화의 중요성은 판단하기 어렵다. 결과적으로, 이것은 단지 추정적인 가능성으로 간주되며, 치환은 인간화된 BAT-1 항체의 결

합 친화성이 약하게 발견된다면 단지 만들어질 수 있다. 동일한 이유가 또한 Gln46Lys 수식의 선택을 뒤로 한다. 분자 모형에 따르면, Lys 아미노산은 반쯤 묻혀있지만, CDR H2 내에서 Glu62 및 Phe63과 밀접하다. Lys46 잔기를 가지는 더 큰 것이 직접적으로 항원과 상호작용 할 수 있는 작은 가능성이 있으며, 그러므로 그것은 BATRH_E에서 보존된다. 류린 68Ala 아미노산을 보존하는 경우는 CDR H2로, 특히 H2 루프 내에 잔기 Tyr59에 그것의 근접과 관련되고, 그러므로 그것의 기회는 루프 구조를 풍부하게 한다. Ala는 그것의 작은 크기에 기인하여 주요한 것 같지만, 인간 h5ighv1295 FR에서 발견되는 더 큰 Val은 H2 루프 구조에 역으로 영향을 줄 수 있고, 그래서 류린 Ala 잔기로 치환된다.

[0254] 상기에서 제안된 모든 인간화된 VH 영역 변형체의 아미노산 서열의 설명은 도 6에 주어진다.

[0255] 잠정적인 N-연결된 당화 위치, 즉 Asn-Xaa-(Ser/Thr)-Xaa (Gavel et al., *ibid*)가 생쥐 및 수용체 인간 V_H 영역 양쪽 뿐만 아니라 그들의 인간화된 구조에 대하여 검사되었으나, 확인된 것은 없다.

[0256] **실시예 5**

[0257] **류린 및 인간화된 BAT-1 Fv 도메인의 분자 모형화**

[0258] BAT-1 항체의 인간화된 가변영역의 설계를 보조하기 위하여, 류린 및 인간화된 단일클론 항체 양쪽의 가변영역의 분자 모형이 만들어졌다. 이러한 구조의 모형화는 상동성 및 *ab initio* 기술에 의하여 모형화의 확립된 방법을 사용하여 이루어졌다. 이것은 Oxford Molecular Limited (OML)에 의하여 공급되고 사용된 AbM 분자 모형화 포장을 사용하여 행하여졌다. 이용가능한 Brookhaven 데이터베이스로부터 항체 X-선 결정학 구조가 AbM을 모형화하기 위하여 사용되어지게 하기 위하여 포맷되었다.

[0259] BAT-1 가변영역의 FR은 유사한 구조적으로 해결된 면역글로불린 가변영역으로부터 FR 상에서 모형화되었다. 동일한 아미노산 결-사슬이 그들의 원래 방향성을 유지하는 동안, 미스매치된 결-사슬은 원BAT-1 Fv 영역 내로 치환된다. 409.5.3 V_H 영역의 FR이 BAT-1 V_H 영역을 모델화하기 위하여 사용되어지는 동안, FAB17-1A V_K 영역의 골격 원자는 BAT-1 V_K 영역의 모형화를 위하여 사용된다 (Brookhaven PDB 각각 1for 및 1iai을 코드한다). 이러한 양 서열은 류린 BAT-1 항체 및 그들의 인간화된 변형체의 가변영역에 대하여 잘 매치되는 것으로 나타난다. mBAT-1 및 인간화된 서열에 대한 동일성은 V_K 영역 서열에 대해 73 % 내지 92 % 범위이고, V_H 영역 서열에 대해 65 % 내지 79 % 사이이다. 모형화되는 서열과 약하게 매치되는 FR 구조의 사용은 CDR 루프 구조의 위치 및 방향에 중요하고 역으로 영향을 줄 수 있기 때문에, 알려진 구조를 가진 AbM의 시험은 FR 골격 상동성은 양질의 어떠한 모형에 중요한 인자이다.

[0260] L1 루프의 골격 구조에 대하여, 류린 BAT-1 V_K 영역 및 인간화된 BATR_{K_B} 서열 (도 5)의 루프 입체구조는 AbM에 의하여 사용된 canonical 클래스로부터 얻었다. 이러한 canonical 클래스는 Chothia 및 그의 동료들 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano et al., *ibid*)에 의하여 설명된 것에 기초하지만, 그들은 원 논문이 출간된 이래로 이용가능한 구조로 수식되어졌다. 알려진 루프 구조에 대한 AbM 예상의 수행의 시험은 이 방법으로 만들어진 CDR 루프는 대개 매우 정확하게 즉, 1 - 1.5 Å RMS 오차 내로 모형화되었다. V_K 영역 서열 BATR_{K_A}에 대하여, 위치 71 (FR3 내)에서 Tyr을 Phe로 치환은 류린 V_K 영역 및 인간화된 BATR_{K_B} V_K 영역에서 보여지는 caconical 클래스 (클래스 1)를 더 이상 고정하지 않는다는 것을 의미한다. 그러나, Tyr71은 L1 루프의 입체구조에서 중요한 역할을 하는데, 모델화된 구조의 분석은 그것은 잔기의 중요한 특징인 Tyr의 방향족 고리에 대한 L1 루프의 채움을 제안한다. 그러므로, Phe이 또한 이 기능을 수행할 수 있다고 믿는 이유가 있다. 추가적으로, 모형으로부터, Tyr71의 히드록시기와 어떠한 강한 상호작용은 보이지 않는다. 결과적으로, Tyr을 Phe로의 치환은 L1 루프의 실질적인 입체구조에 영향을 주지 않을 수 있는 가능성이 있다.

[0261] CDR L2, L3, H1 및 H2의 골격구조에 대하여, 모든 모형에 대한 입체구조는 수식 없이 AbM에 의하여 정의된 caconical 클래스로부터 얻었다.

[0262] BAT-1 V_H 영역 내 H3 루프는 8 잔기 길이이며, H3 루프 구조를 예상하기 위하여 2 방법이 사용된다. 골격구조에 대한 데이터베이스 검색은 양 방법에 대하여 사용되었지만, 추가적으로 모형내의 중심 5 잔기가 CONGEN 검색 (Brucoleri, *ibid*)을 사용하여 더욱 완전히 검색되었다. 이것은 계산하는데 오래 걸리지만, 데이터베이스 검색으로부터 확인되는 것과 매우 유사한 입체구조를 확실히 생산할 수 있다.

[0263] 명백한 입체 충돌에 대한 전체 모형의 조절 후에, 원하지 않는 원자 접촉을 방지하고 반 데르 발스 및 정전기적

상호작용을 최적화 하기 위한 에너지 최소화가 MACROMODEL을 사용하여 마지막으로 적용되었다.

[0264]

실시예 6

[0265]

인간화된 BAT-1 경쇄 변형체의 구성

[0266]

모든 실시예에서와 같이, 엄격한 PCR-클로닝 및 시퀀싱 프로토콜이 뒤따른다. 이것은 인간화된 버전 내로 착오가 도입되는 가능성을 최소화하기 위하여 행하여진다. 인간화된 BAT-1 카파 경쇄 가변영역 유전자 (즉, BATR_K_A, BATR_K_B, BATR_K_D)의 구성체는 근사적으로 425 bp 산물을 생산하였고 다음으로 pCR2.1[™]으로 서브클로닝되었다. PCR 반응은 표 9 및 10에서 설명된 프라이머들을 사용하여 수행되었다.

표 9a

프라이머 번호	SEQ ID NO	BAT-1 항체 카파 경쇄 가변영역 유전자 (5'→3')의 다양한 인간화된 버전의 구조에 사용된 올리고뉴클레오타이드
BATR _K .1	30	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACATGAGGGTCCCCGCTCAG C
BATR _K .2	31	TCCTGGGGCTCCTGCTGCTCT GGCTCCCAGGTGCCAAATG
BATR _K .3	32	TGAAATTGTGTTGACGCAGTC TCCATCCTCCCTGTCTGCA
BATR _K .4	33	TCTGTAGGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCAGTGCCAGGT
BATR _K .5	34	CAAGTGTAAGTTACATGCACT GGTATCAGCAGAAACCAGG

[0267]

표 9b

BATR _K .6	35	GAAAGCCCCTAAGCTCCTGAT CTATAGGACATCCAACCTG
BATR _K .7	36	GCTTCTGGGGTCCCATCTAGA TTCAGCGGCAGTGGATCTG
BATR _K .8	37	GGACAGATTTCACTCTCACCA TCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR _K .9	38	AGATTTTGCAACTTACTATTG CCAGCAAAGGAGTAGTTTC
BATR _K .10	39	CCACTCACGTTTCGGCGGAGGG ACCAAGCTGGAGATCAAACGT GAGTGGATCCGCG
BATR _K .11	40	GAGCAGCAGGAGCCCCAGGAG CTGAGCGGGGACCCTCATG
BATR _K .12	41	ACTGCGTCAACACAATTTTAC ATTGGCACCTGGGAGCCA
BATR _K .13	42	GTGACTCTGTCTCCTACAGAT GCAGACAGGGAGGATGGAG
BATR _K .14	43	GTGCATGTAACTTACACTTGACCTGGCACTGCAAGTGATG
BATR _K .15	44	TCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCA
BATR _K .16	45	CTAGATGGGACCCAGAAGCCAGGTTGGATGTCCTATAGA
BATR _K .17	46	GGTGAGAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAT
BATR _K .18	47	AATAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTGAT
BATR _K .19	48	CCTCCGCCGAACGTGAGTGGGAACTACTCCTTTGTGGC
BATR _K .20	49	CGCGGATCCACTCACGTTTGATCTCCAGCTTGGTC
BATR _K .5B	50	CAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAACCAGG
BATR _K .6B	51	GAAAGCCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG
BATR _K .8B	52	GGACAGATTACACTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA
BATR _K .15B	53	TCCAGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGCTGGAACCA
BATR _K .17B	54	GGTGAGAGTGTAATCTGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR _K .17D	55	GGTGAGACAGTAAGATGTCCCAGATCCACTGCCGCTGAAC
BATR _K .8D	56	GGACATCTTACTGTCTCACCATCAACAGCCTGCAGCCTGA

[0268]

표 10

인간화된 BAT-1 변형체 각 변형체2의 카파 경쇄의 구조에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머1 조합					
BATR_{κA}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5}
	BATR _{κ.6}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}
BATR_{κB}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5B}
	BATR _{κ.6B}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8B}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15B}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17B}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}
BATR_{κD}	BATR _{κ.1}	BATR _{κ.2}	BATR _{κ.3}	BATR _{κ.4}	BATR _{κ.5B}
	BATR _{κ.6B}	BATR _{κ.7}	BATR _{κ.8D}	BATR _{κ.9}	BATR _{κ.10}
	BATR _{κ.11}	BATR _{κ.12}	BATR _{κ.13}	BATR _{κ.14}	BATR _{κ.15B}
	BATR _{κ.16}	BATR _{κ.17D}	BATR _{κ.18}	BATR _{κ.19}	BATR _{κ.20}

1 올리고뉴클레오타이드 서열은 표 9에서 주어진다.

2 올리고뉴클레오타이드 프라이머 **BATR_{κ.1}** 및 **BATR_{κ.20}**은 또한 외부 증폭 프라이머로서 사용되었다.

[0269]

[0270]

추정적인 양성 형질전환체가 PCR-검색 검정을 사용하여 확인되었고, 제한 절단 및 다음으로 sd-DNA 시퀀싱되었다. 인간화된 V_κ 유전자 (도 7 - 9; SEQ ID NOS. 15, 16 및 18)는 다음으로 발현 벡터 내로 서브클로닝되었다.

[0271]

경쇄 pKN110 구조물은 앰피실린 및 네오마이신 저항 유전자를 포함한다.

[0272]

BAT-1의 인간화된 V_κ 유전자 변형체 (즉, BATR_{κA}, BATR_{κB}, BATR_{κD})는 HCMV 즉발 초기 프로모터 및 게놈 인간 카파 불변영역 사이에 삽입되고 다음의 발현 벡터를 각각 얻었다: pKN110-BATR_{κA}, pKN110-BATR_{κB} 및 pKN110-BATR_{κD} (대표적인 pKN110-BATR_{κD} 벡터에 대하여 도 10 참고).

[0273]

BAT-1 경쇄 발현 카세트는 생쥐 면역글로불린 신호 펩티드 서열, Kozak 서열 및 BAT-1의 인간화된 V_κ 유전자 변형체의 양 쪽에 첨가되는 인트론 신호 서열을 코딩하는 DNA 단편을 포함하는 발현 벡터 내로 삽입된다 (도 11). 이 카세트는 HCMV 즉발 초기 프로모터 및 게놈 인간 카파 불변영역 사이에 삽입된다. 또한 완전한 경쇄 발현 벡터는 BGH 폴리A 전사 종결자 및 Neo/G418 선택 마커를 포함한다. 모든 구성체는 제한 효소로 절단되고, 정확한 삽입의 존재를 확인하기 위하여 ds-DNA 시퀀싱된다.

[0274]

실시예 7

[0275]

인간화된 BAT-1 중쇄 변형체의 구성

[0276]

모양이 고쳐진 인간 BAT-1 중쇄 가변영역 유전자 (즉, BATRH_A, BATRH_B, BATRH_C)의 다양한 버전의 구성체는 근사적으로 450 bp 산물을 생산하였고 다음으로 pCR2.1TM으로 서브클로닝되었다. PCR 반응은 표 11 및 12에서 설명된 프라이머들을 사용하여 수행되었다.

[0277]

추정적인 양성 형질전환체가 PCR-검색으로 다시 확인되었고, 다음으로 sd-DNA 시퀀싱되었다. 인간화된 V_H 유전자 (SEQ ID NOS. 20 - 22)는 다음으로 발현 벡터 내로 서브클로닝되었다.

[0278]

중쇄 pG1D110 구성체는 선택가능 마커로서 앰피실린 저항 유전자 및 햄스터 dhfr를 포함한다. BAT-1의 인간화된 V_H 유전자 변형체는 HCMV 즉발 초기 프로모터 및 게놈 인간 IgG1 불변영역 사이에 삽입되고 다음의 발현 벡터를 얻었다: pG1D110-BATRH_A, pG1D110-BATRH_B, pG1D110-BATRH_C (대표적인 pG1D110.BAT-1.RHc 벡터에 대하여 도 15 참고).

[0279]

BAT-1 경쇄 발현 카세트는 생쥐 면역글로불린 신호 펩티드 서열, Kozak 서열 및 BAT-1의 인간화된 V_κ 유전자 변형체의 양 쪽에 첨가되는 인트론 신호 서열을 코딩하는 DNA 단편을 포함하는 발현 벡터 내로 삽입된다 (도 16). 이 카세트는 HCMV 즉발 초기 프로모터 및 게놈 인간 IgG1 불변영역 사이에 삽입된다. 또한 완전한 경쇄 발현 벡터는 BGH 폴리A 전사 종결자 및 dhfr 선택 마커를 포함한다.

[0280]

결과적인 발현 벡터는 정확한 삽입물의 존재를 확인하기 위하여 제한 효소로 절단된다.

표 11

프라이머 번호	SEQ ID NO	다양한 인간화된 BAT-1 항체 중쇄 가변영역 유전자 (5'→3')의 구조에 사용된 올리고뉴클레오타이드
BATRH.1	57	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GACTGGACCTGGAGGATCC
BATRH.2	58	TCTTCTTGGTGGCAGCAGCAA CAGGTGCCCACT
BATRH.3	59	CCCAGGTGCAGCTGGTGCAAT CTGGGTCTGAGCTTAAGAA
BATRH.4	60	GCCTGGGGCCTCAGTGAAGAT CTCCTGCAAGGCTTCTGGA
BATRB.5	61	TATAGCTTCAGTAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.6	62	CCCCTGGACAAGGGCTTCAGT GGATGGGATGGATAAACAC
BATRH.7	63	CGACAGTGGAGAGTCAACATA TGCTGAAGAGTTCAAGGGA
BATRH.8	64	CGGTTTGCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTGACACGGCAT
BATRH.9	65	ATCTGCAGATCACCAGCCTCA CGGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.10	66	GTATTTCTGTGCGAAAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.11	67	ACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGGTG AGTGGATCCGCG
BATRH.12	68	TGCTGCCACCAAGAAGAGGAT CCTTCCAGGTGGAGTCCATGG TGG
BATRH.13	69	TTGCACCAGCTGCACCTGGGA GTGGGCACCTGTTGC
BATRH.14	70	T CTTCACTGAGGCCCAAGGCT TCTTAAGCTCAGACCCAGA
BATRH.15	71	CCATAGTTACTGAAGCTATAT CCAGAAGCTTGCAAGGAGA
BATRH.16	72	CTGAAGCCCTTGTCCAGGGGC CTGTCGCACCCAGTTCATT
BATRH.17	73	ATGTTGACTCTCCACTGTCCG TGTTCATCCATCCCATCCA
BATRH.18	74	TCCAAGGAGAAGACAAACCGT CCCTTGAAGTCTTCAGCAT
BATRH.19	75	GAGGCTGGTGATCTGCAGATA TGCCGTGTGACAGAGGTG
BATRH.20	76	CGACTTTCGCACAGAAATACA TGCCAGTGTCTCAGCCGT
BATRH.21	77	TTCCCTGGCCCCAGTAGTCCA AAGCATCGTAGC
BATRH.22	78	CGCGGATCCACTCACCTGAGG AGACGGTGACCAGGG
BATRH.5B	79	TATACTTTTCAAACTATGGA ATGAACTGGGTGCGACAGG
BATRH.15B	80	CCATAGTTTGTGAAAGTATAT CCAGAAGCCTTGCAAGGAGA
BATRH.8C	81	CGGTTTGCTTCTCCTTGGAC ACCTCTGTCAACACGGCAT
BATRH.10C	82	GTATTTCTGTGTGAGAGTCGG CTACGATGCTTTGG
BATRH.20C	83	CGACTCTCACACAGAAATACATG CCAAGTGTCTCAGCCGT
BATRH.9C	84	ATCTGCAGATCACCAGCC TC AACGCTGAGGACACTGGCAT
BATRH.19C	85	GAGGCTGGTGATCTGCAGAT ATGCCGTGTGACAGAGGTG
BATRH.5C	86	TATACTTTTCAAACTATGG AATGAACTGGGTGAAGCAGG

표 12

인간화된 BAT-1 변형체	각 변형체2의 중쇄의 구조에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머1 조합				
BATRH_A	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			
BATRH_B	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5B
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15B
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			
BATRH_C	BATRH.1	BATRH.2	BATRH.3	BATRH.4	BATRH.5C
	BATRH.6	BATRH.7	BATRH.8C	BATRH.9	BATRH.10
	BATRH.11	BATRH.12	BATRH.13	BATRH.14	BATRH.15C
	BATRH.16	BATRH.17	BATRH.18	BATRH.19	BATRH.20
	BATRH.21	BATRH.22			

1올리고뉴클레오타이드 서열은 표 11에서 주어진다.

2올리고뉴클레오타이드 프라이머 BATRH.1 및 BATRH.20은 또한 외부 증폭 프라이머로서 사용되었다.

실시예 8

단일 발현 벡터 내의 BAT-1 RH_C/R_{KD} γ1 완전 항체의 구성

BAT-1 γ1 항체에 대한 가능한 발현 수준을 최대화하기 위하여, BAT-1 γ1 단일 벡터 구성체를 만들기 전에 pG1D110.BAT-1.RH_C 구성체 (실시예 7에서 설명, 도 15 참고)로부터 인트론을 제거하는 것이 결정되었다. 이 과정은 다음과 같이 수행되었다.

pG1D200은 다른 γ1 면역글로불린 중쇄 포유동물 발현 벡터이다 (AERES Biomedical; 도 17). 이 벡터는 pG1D110 벡터 (즉, 그것은 V_H:C_H 연결에서 71 bp 인트론을 가지지 않는다)의 V_H:C_H γ1 인트론 음성 버전이다.

- [0287] pG1D110.BAT-1.RHc 구성체를 하나의 구성체로 전환하기 위하여, BstEII 단편 (219 bp)이 pG1D200 벡터로부터 절단되고, 겔은 Qiagen gel extraction/purification kit를 사용하여 정제되었다. 이 단편은 인트론 음성 VH:CH 연결을 함유한다.
- [0288] pG1D110.BAT-1.RHc 구성체 (도 15)가 또한 BstEII로 제한 절단 되었고, 인트론 양성 VH:CH 연결을 함유하는 290 bp 단편을 방출하였다. 나머지 벡터 단편 (~ 7207 bp)는 Qiagen gel extraction/purification kit를 사용하여 정제되었다.
- [0289] pG1D200 벡터로부터 인트론 음성 BstEII 단편 (219 bp)은 다음으로 ~ 7207 bp BstEII 절단된 pG1D110.BAT-1.RHc 벡터로 연결되었다. 연결된 DNA 2 μ l가 제조자의 지시에 따라 DH5 α 세포 (Stratagene)로 형질전환되었다. 플라스미드 DNA가 10 콜로니로부터 준비되었고, 각 플라스미드 DNA는 DNA 서열 분석에 의하여 정확한 BstEII 단편의 존재가 분석되었다.
- [0290] 완전한 클론의 동정 후에, 새로운 인트론 음성 구성체 (pG1D210.BAT-1.RHc) 및 경쇄 구성체 pKN110.BAT.R_{KD} (도 10 참고)가 pG1KD210.BAT-1.RHc/R_{KD} 단일 발현 벡터 (SEQ ID NO. 93)를 구성하기 위하여 사용되었다.
- [0291] SEQ ID NO 93 내의 이 pG1KD210.BAT-1.RHc/R_{KD} 단일 발현 벡터의 구성요소는 다음과 같이 위치되었다:
- [0292] 1. 핵산 범위: 1 내지 2502-pBR322 (Amp-저항성 유전자 및 ColEI 오리진 + SV40 오리진 및 불완전 (crippled) SV40 초기 프로모터를 포함하는 pBR322 기초 서열)
- [0293] 2. 핵산 범위: 206 내지 1067-Amp (앰피실린 저항성 유전자)
- [0294] 3. 위치: 1824-ColEI
- [0295] 4. 핵산 범위: 2502 내지 3227-DHFR (디하이드로폴레이트 리덕타아제 유전자)
- [0296] 5. 핵산 범위: 3233 내지 4074-SV40 폴리A (SV40 폴리A 서열 등)
- [0297] 6. 핵산 범위: 4109 내지 5649-HCMVi (HCMVi 프로모터)
- [0298] 7. 핵산 범위: 5662 내지 6067-BAT rKd
- [0299] 모양이 고쳐진 BAT 카파 경쇄 가변영역
- [0300] 8. 핵산 범위: 6073 내지 6720-HuK (인간 카파 불변영역 (Km(3)) 유전자의 cDNA 사본)
- [0301] 9. 핵산 범위: 6726 내지 6943-spaC2 인공적인 spaC2 종결 서열
- [0302] 10. 핵산 범위: 6949 내지 8489-HCMVi (HCMVi 프로모터)
- [0303] 11. 12. 핵산 범위: 8502 내지 8923-BAT rHc
- [0304] 모양이 고쳐진 BAT 중쇄 가변영역
- [0305] 13. 핵산 범위: 8924 내지 10297-HG1 (60 bp 인트론에 의하여 선행되며, '아미에 (Amie)' 종결 서열에 의하여 뒤따라지는 인간 감마-1 불변영역)
- [0306] HCMVi 프로모터, BAT-1 카파 경쇄 가변영역 유전자, 및 카파 경쇄 불변영역 유전자를 함유하는 BAT-1 카파 경쇄 발현 카세트는 pKN110.BAT-1.R_{KD} 구조체로부터 제한 효소 절단 되고 (EcoRI/SpeI), 순차적으로 단일 EcoRI 및 SpeI 제한 부위를 통하여 pG1D210.BAT-1.RHc 구조체로 연결되었다. 이 연결은 BAT-1 인간화된 단일클론 항체 RHc/R_{KD} (도 18)의 중쇄 및 카파 경쇄 양자를 함유하는 단일 발현 벡터 pG1KD210.BAT-1.RHc/R_{KD}의 구성으로 결과된다. 연결된 DNA의 2 μ l는 제조자의 지시에 따라서 DH5 α 세포 (Stratagene) 내로 형질전환된다. 10 콜로니로부터 미니 프랩 DNA가 준비되었고 각 플라스미드 DNA는 제한 절단 분석에 의하여 정확한 단일 발현 구조체의 존재를 위하여 분석되었다. 정확한 단일 발현 구조체의 하나가 실시예 11에서 설명되는 바와 같이 COS 세포에서 BAT-1 감마-1 항체의 일시적인 발현을 위하여 선택되었다.

[0307] **실시예 9**

[0308] **단일 발현 벡터에서 BAT-1.RHc/R_{KD} 감마-1 (γ 1) 완전 항체 변형체의 구성**

[0309] BATRH_c 중쇄 가변영역은 Xho I 과 HindIII 단편으로서 결합된 (단일) 발현 벡터로 전달된다. BATR_{κ_D} 경쇄 가변영역은 Xba I 과 BamHI 단편으로서 결합된 (단일) 발현 벡터로 전달된다. 경쇄 유전자에서 내부 Xba I 부위는 아미노산 서열의 변화 없이 제거된다. 이 벡터에서 BAT-1.R_{κ_D}/BAT-1.RHc 중쇄 및 경쇄 가변영역의 서열이 확인되었다. 벡터는 게놈 인간 IgG1 및 카파 불변영역을 포함한다. 양 중쇄 및 경쇄 유전자는 HCMV 즉발 초기 프로모터의 통제하에 존재하였다. 벡터는 선택 마커로서 생쥐 dhfr 유전자를 포함한다 (도 19). 동일한 Kozak 서열, 신호 펩티드 서열 및 인트론이 2 벡터 발현 시스템을 위하여 첨가되었다 (실시에 6 및 7 참고).

[0310] **실시에 10**

[0311] **단일 벡터 내에 BAT-1 감마-4 (γ4) PG4KD110.BAT-1.RHc/R_{κ_D}의 구성**

[0312] BAT-1 γ4 단일 발현 벡터 구성체의 구성에 있어서 제 1 단계는 pG1D110.BAT-1.RHc 구성체 (도 14)로부터 BamHI 및 HindIII 제한 절단에 의하여 수식된 BAT-1.RHc 유전자의 클로닝 및 다시 BamHI 및 HindIII 제한 위치를 통하여 이 430 bp 단편을 감마-4 면역글로불린 중쇄 발현 벡터 pG4D110으로 연결하는 것이다.

[0313] 연결된 DNA의 2 μl가 제조자의 지시에 따라 DH5α 세포 (Stratagene)로 형질전환되었다. 플라스미드 DNA는 10 콜로니로부터 준비되었고, 각 플라스미드 DNA는 DNA 서열 분석에 의하여 정확한 BAT-1.RHc BamHI/HindIII 단편의 존재에 대하여 분석되었다.

[0314] 완전한 클론의 동정 후에, 새로운 감마-4 구조물 (pG4D110.BAT-1.RHc) 및 경쇄 구조물 pKN110.BAT-1.R_{κ_D} (도 10)은 다음의 방법으로 pG4KD110.BAT-1.RHc/R_{κ_D} 단일 발현 벡터를 구성하는데 사용되었다.

[0315] HCMV 프로모터, BAT-1 카파 경쇄 가변영역 유전자, 및 카파 경쇄 불변영역 유전자를 함유하는 BAT-1 카파 경쇄 발현 카세트는 pKN110.BAT-1.R_{κ_D} 구조체로부터 제한 효소 절단 되고 (EcoRI/SpeI), 순차적으로 단일 EcoRI 및 SpeI 제한 부위를 통하여 pG4D110.BAT-1.RHc 구조체로 연결되었다. 이 연결은 BAT-1 인간화된 단일클론 항체 RHc/R_{κ_D} 변형체의 중쇄 및 카파 경쇄 양자를 함유하는 단일 발현 벡터 pG4KD110.BAT-1.RHc/R_{κ_D}의 구성으로 결과된다. 연결된 DNA의 2 μl는 제조자의 지시에 따라서 DH5α 세포 (Stratagene) 내로 형질전환된다. 10 콜로니로부터 미니 프랩 DNA가 준비되었고 각 플라스미드 DNA는 제한 절단 분석에 의하여 정확한 단일 발현 벡터 구조체의 존재를 위하여 분석되었다. BamHI 및 HindIII로 절단된 정확한 단일 발현 구조체는 2864 bp 단편을 방출하고, HindIII 절단은 2840 bp 단편을 방출한다. 하스이 클론이 COS 세포에서 BAT-1 감마-4 항체의 일시적인 발현을 위하여 선택되었다.

[0316] **실시에 11**

[0317] **인간화된 BAT-1 경 및 중쇄 벡터의 동시-트랜스펙션 및 COS7 세포에서 인간화된 BAT-1 변형체의 일시적인 발현**

[0318] 인간화된 BAT-1 중 (pG1D110) 및 경 (pKN110; 실시에 7) 사슬 발현 벡터가 여러가지 조합으로 COS7 세포 내로 동시-트랜스펙션되고, 72 시간 인큐베이션된 후, 배지가 수집되고 세포 데브리를 제거하기 위하여 원심분리되었고, 여과되고 그리고 인간화된 단일클론 항체 생산을 위하여 ELISA에 의하여 분석되었다. COS7 세포 상등액에서 인간화된 단일클론 항체의 농도는 테스트된 모양이 고쳐진 인간 BAT-1 항체 구조물의 각 조합에 따라 다양하게 된다 (표 13). 예를 들어, 버전 BATRH_B/BATR_{κ_A}는 가장 높은 항체 수준을 발현 (4800 ng/ml)하는데 반하여 BATRH_B/BATR_{κ_D} 버전은 가장 낮은 발현이었다 (357 ng/ml).

[0319] **실시에 12**

[0320] **COS7 세포로부터 인간화된 BAT-1 변형체의 정제**

[0321] 동시-트랜스펙션 당 근사적으로 8 ml을 수득하는 일련의 트랜스펙션이 200 ml을 초과하는 COS7 상등액이 수집될 때까지 수행되었다. 이 부피의 상등액은 PM30 여과막 (이것은 30 kDa의 분자량 제한을 가진다)을 가진 교반된 초-여과 셀 (stirred ultra-filtration cell)을 통하여 상등액을 통과시킴으로서 10 ml로 감소된다.

[0322] The Immunopure[®](A) IgG purification kit는 필수적으로 고정화된 단백질 A 세파로스 컬럼의 2 ml 컬럼을 포함한다. 항체는 5 ml의 용출 완충액으로 컬럼으로부터 용출되었고, 용출물은 1 ml 분획으로 수집되었다. 다음으로 각 분획의 인간화된 BAT-1 항체의 농도는 ELISA 방법을 사용하여 검정되었다. 표 13은 수집된 단백질 A 정제된 항체 구조물의 최종 농도를 설명한다. 평균적으로 정제 단계는 근사적으로 150 배로 항체 농도를 증가

시킨다.

표 13

항체 사슬		COS7 세포 상등액에서 키메라 및 hBAT-1 항체 농도 (일시적 발현 실험)	
중	카파 경	생 상등액 ($\mu\text{g/ml}$)	단백질 A 정제 후 ($\mu\text{g/ml}$)
BATCH	BATR κ	0.358	50
BATRH _A	BATR κ_A	2.350	110
BATRH _B	BATR κ_A	4.800	211
BATRH _B	BATR κ_B	0.757	149
BATRH _C	BATR κ_B	1.250	137
BATRH _B	BATR κ_D	0.357	112
BATRH _C	BATR κ_D	0.718	122

실시예 13

COS7 세포에서 생산된 인간화된 BAT-1 변형체에 결합하는 Daudi 세포의 분석

Daudi 세포 ELISA를 사용하여, 다른 버전의 단백질 A 정제된 인간화된 BAT-1 항체는 다양한 정도로 Daudi 세포에 결합한다는 것이 명백하게 되었다. 도 20 - 23은 이러한 결합 시험의 전형적인 예를 나타내었다. 제조항체에 의한 Daudi 세포 결합의 시그모이드 투여량-반응 곡선이 또한 생성되고, 이러한 결합 곡선의 언덕 경사가 계산되었다. 키메라 항체 투여량-반응 곡선에 관련되는 언덕 경사 데이터와 투여량 반응-곡선의 위치의 조합은 테스트된 여러가지 인간화된 BAT-1 항체 구조물 중에 결합하는 Daudi 세포에 관하여 정량적인 단계를 제안한다 (표 14). 이 단계의 정점에는 명백하게 구조물 BATRH_C/BATR κ_D 가 있으며, 이것은 그것의 키메라 BAT-1 항체 대조군 (즉, 0.8248 ± 0.1210)과 매우 유사한 언덕 경사 (즉, 0.8818 ± 0.1107)를 나타내며, 키메라 대조군의 투여량-반응 곡선과 밀접한 궤적을 나타낸다. 이용가능한 결합 데이터로부터 계산된 바와 같이, 구조물 BATRH_C/BATR κ_B 가 동일한 키메라 BAT-1 항체 대조군 (즉, 0.8248 ± 0.1210)보다 더 가파른 언덕 경사 (즉, 0.6408 ± 0.1622)를 나타내더라도, 통계적을 중요한 차이는 없다. 추가적으로, 도 22로부터 이 구조물에 대한 투여량-반응 곡선은 BATRH_C/BATR κ_D 구조물 만큼 우수하지 않으며, 그러므로 결합 단계에서 두번째로 위치된다.

역으로, 구조물 BATRH_A/BATR κ_A 는 명백하게 테스트된 모든 인간화된 BAT-1 항체 구조물의 가장 약한 결합 특성을 가지며 (표 14), 결합 단계에서 6 번째에 위치된다. 이 버전에 대한 계산된 언덕 경사 (즉, 1.2730 ± 0.2688)가 매우 유사한 인간화된 구조물 BATRH_B/BATR κ_A (즉, 1.7710 ± 0.6461)보다 명백하게 우수하더라도, 이 차이 또한 통계적으로 중요성이 없다. 추가적으로, 도 21로부터 CDR-이식된 BATRH_A/BATR κ_A BAT-1 항체는 인간화된 구조물 BATRH_B/BATR κ_A (결합 단계에서 5번째에 위치) 보다 더 낮은 수준에서 그것의 최대 결합 반응에 도달한다는 것이 명백하다.

구조물 BATRH_B/BATR κ_B (도 20; 4번째 위치) 및 BATRH_B/BATR κ_D (도 23; 3번째 위치)은 이러한 두 세트의 극한 사에서 중간 수준을 나타낸다. 다시 이러한 우치는 주로 이용가능한 결합 데이터 및 이전의 실험의 주관적인 해석에 기초한다.

표 14

COS 세포에서 일시적 발현 후에 수거된 단백질 A 정제된 인간화된 대 키메라 BAT-1 항체 구조물의 관련된 결합 친화도				
실험번호	중쇄	카파경쇄	연덕 경사 ± SEM ^a	연덕 경사 분석 으로부터 결합 단계
1	BATRH	BATRκ	0.5422 ± 0.2911	-
	BATRH _A	BATRκ _A	1.273 ± 0.2688	6
	BATRH _B	BATRκ _A	1.771 ± 0.6461	5
2	BATRH	BATRκ	0.8057 ± 0.0849	-
	BATRH _B	BATRκ _D	0.6555 ± 0.1252	3
3	BATRH	BATRκ	0.8248 ± 0.1210	-
	BATRH _C	BATRκ _B	0.6408 ± 0.1622	2
	BATRH _C	BATRκ _D	0.8818 ± 0.1107	1
4	BATRH	BATRκ	0.7090 ± 0.2768	-
	BATRH _B	BATRκ _B	0.7796 ± 0.3420	4

^a3 회 Daudi 세포 ELISA의 표준 오차 평균은 시그모이드 투여량-반응 곡선 상에서 ELISA 데이터를 고정화 후에 계산되었다.

[0329]

[0330]

실시예 14

[0331]

COS 세포의 동시-트랜스펙션 또는 단일 트랜스펙션에 의한 BAT-1 Rκ_D/RH_C 변형체의 일시적 발현

[0332]

Kettleborough의 방법 (Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 23:206, 1993)이 COS7 세포 내로 포유동물 발현 구조물을 트랜스펙션하는데 행하여졌다. 간단하게, DNA (카파 경쇄 발현 구조물 pKN110.BAT-1.Rκ_D 및 중쇄 발현 구조물 pG1D210.BAT-1.RH_C의 각 10 μg, 또는 단일 벡터 구조물 pG1KD210.BAT-1.RH_C/Rκ_D의 13 μg)가 PBS에 10⁷ 세포/ml의 0.7 ml 알리퀴트로 첨가되고, Bio-Rad Gene Pulser apparatus를 사용하여 1900 V에서, 25 μF 전기용량으로 펄스되었다. 실온에서 10 분 동안 회복 후에, 일렉트로포레이션된 세포는 10 % FCS를 함유하는 8 ml의 DMEM을 함유하는 페트리-디쉬로 전달되고, 5 % CO₂ 하에서 37 °C, 72 시간 동안 인큐베이션되었다. 72 시간 인큐베이션 후에, 배지는 수거되고, 세포 debris를 제거하기 위하여 원심분리되고, 항체 생산에 대하여 포획 ELISA에 의하여 분석되었다. 경쇄 발현 벡터 및 중쇄 발현 벡터로 동시-트랜스펙션 및 경쇄 및 중쇄 양자를 발현하는 단일-벡터로 트랜스펙션은 3 사본으로 수행되었다. 결과는 표 15에 나타난다. 결과는 단일 벡터로부터의 발현 수준은 동시-트랜스펙션에 대하여 관찰된 발현 수준 보다 6 배 더 높다는 것을 나타낸다.

표 15

트랜스펙션 no.	트랜스펙션된 구조물	BAT-1 감마-1 항체에 대한 일시적 COS 세포 발현 수준 (μg/ml)*
1	단일 벡터	55.451
2	"	49.009
3	"	66.018
1	경쇄 및 중쇄 벡터	9.06
2	"	10.232
3	"	9.536

*pG1D110 및 pKN110 벡터를 사용하여 동시-트랜스펙션으로부터 인간화된 RH_C/Rκ_D BAT-1 변형체의 트랜스펙션 수준은 0.718 μg/ml이었다.

[0333]

[0334]

실시예 15

[0335]

CHODhfr-포유동물세포의 단일 벡터 pG4KD210.BAT-1.RH_C/Rκ_D로의 안정한 트랜스펙션 및 안정한 세포주의 생산

[0336]

CHODhfr-세포를 10 % 태아 클론 II 및 50 μg/ml 젠타마이신이 보충된, 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드가 함유된 α-MEM으로 구성된 비선택 배지에서 증식시켰다. PBS 중의 10⁷ 세포/ml의 0.7ml 알리퀴트를 Bio-Rad Gene Pulser를 사용하여 13 μg의 pG4KD210.BAT-1.RH_C/Rκ_D로 1900 V, 25 μF 전기용량으로 트랜스펙션시켰다. 세포를 10 분 동안 회복하도록 실온에서 둔 후, 8 ml의 비선택 배지가 담긴 10 cm 페트리디쉬로 옮긴 후, 48 시간 동안 37 °C에서 5 % CO₂ 에서 인큐베이션시켰다.

[0337]

이 트랜스펙션시킨 2 일 후, 세포를 트립신처리하고 약한 원심분리로 모은 후 150 ml의 미리 데운 선택 배지 (리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드가 함유되지 않고, 10 % 투석된 FBS 및 50 μg/ml 젠타마이신이 보

충된, 10 nM, 50 nM, 100 nM 또는 500 nM 중 어느 하나의 메토티렉세이트를 함유한 α -MEM)에 재현탁한 후, 15 개의 10 cm 페트리디쉬에 분주하였다. 그 후, 이들을 20 내지 30 일 동안 37 °C에서 5 % CO₂ 에서 인큐베이션시켰는데, 선택배지는 포커스가 명백하게 가시적일 때까지 3 - 4 일 마다 1 회씩 갈아주었다. 처음 트랜스펙션시킨 2 주 후, 10 nM 플레이트에서 포커스가 발달하기 시작하였다. 8 일 후에 50 nM 플레이트에서 하나의 포커스가 발달하였다. 50 nM 플레이트 및 100 nM 또는 500 nM 플레이트에서는 35 일 경과 후에는 다른 포커스가 발달하지 않았다.

[0338] 포커스를 "골라내기 위해서", 우선 1 mm²의 와트만 1MM 여과지를 0.05 % 트립신, 0.02 % EDTA 용액에 침지하였다. 인큐베이션 디쉬에서 선택배지를 조심스럽게 제거하였고, 그 다음 5 ml의 PBS 로 조심스럽게 세척하였다. 그 다음, PBS를 제거하였고, 무균 겹자를 사용하여 미리 침지된 여과지를 각각의 세포 포커스에 조심스럽게 놓았다. 1 ml 의 적절한 선택배지를 함유하는 24 웰 조직 인큐베이션 플레이트의 각각의 웰에 옮기기 전에, 여과지를 15 초 동안 포커스상에 놓아 두었다.

[0339] 총 31 γ -1 포커스를 골라 내었는데, 30 개는 10 nM MTX 플레이트로부터였고, 하나는 50 nM 플레이트로부터였다. 이들 세포를 거의 융합에 이를 때까지 선택배지에서 인큐베이션되도록 허용하였고 각각의 웰로부터의 배지를 항체 생산에 대하여 시험하였다. 그 다음, 인간 항체를 생산하는 이들 클론을 확장 및 특이적 생산 검정을 위하여 선택하였다. 특이적 생산 검정에 대한 결과는 표 16에 나타낸다.

표 16

클론	RH _C /R _{KD} BAT-1 γ 1 총 항체 변이체에 대한 특이적 CHO 세포 생산 수준 (ng/10 ⁶ 세포/일)		
	검정 번호 1	검정 번호 2	검정 번호 3
γ 1 B9	3284.7	2921.5	1227.1
γ 1 B10	297	1288	268.3
γ 1 B13	12443	5425.2	7731.53
γ 1 B18	6.5	10.4	4.9
γ 1 B19	199.7	26.9	43
γ 1 B15	5987.6	1657.1	3015.43
γ 1 D6	2539.2	1605.5	2072.40

[0341] 가장 특이적인 생산 수준을 나타낸 3 개의 세포주 (B9, B13, 및 B15)를 더 검정하였고 정확한 배가시간에 대해 모니터링하였다(표 17 참조).

표 17

세포주	최고의 γ 1 CHO 세포주의 생산 수준(μ g/10 ⁶ 세포/일)	최고의 γ 1 CHO 세포주의 배가시간 (시간)
B9	3.5	22.5
B13	7.7	31.5
B15	3	21

[0343] 특이적 생산성 수준 및 배가시간에 기초하여, B15 세포주를 사용하여 BAT-1 γ 1 항체 500 μ g를 생산하기로 결정하였다.

[0344] 실시예 16

[0345] 단일- 및 동시-트랜스펙션에 의한 COS 세포에서의 BAT-1 γ 4 RH_C/R_{KD} 변형체의 일시적 발현

[0346] Kettleborough 등의 방법을 따라 포유동물 발현 구조체를 COS 세포 내로 트랜스펙션 시켰다. 요약하면, DNA (카파 경쇄 발현 구조체 pKN110.BAT-1.R_{KD} 및 중쇄 발현 구조체 pG4D110.BAT-1.RH_C 각각 10 μ g 또는 슈퍼벡터 구조체 pG4D110.BAT-1.RH_C/R_{KD} 13 μ g)를 PBS 중의 10⁷ 세포/ml의 0.7 ml 알리퀴트에 첨가하였고, Bio-Rad Gene Pulser를 사용하여 1900 V, 25 μ F 전기용량으로 펄스하여 트랜스펙션시켰다. 세포를 10 분 동안 실온에서 회복시킨 후, 일렉트로포레이션된 세포를 10 % FCS를 함유하는 DMEM 8 ml가 담긴 페트리디쉬로 옮긴 후, 72 시간

동안 37 °C에서 5 % CO₂ 에서 인큐베이션시켰다. 72 시간 인큐베이션 후, 배지를 수집하였고, 약하게 원심분리하여 세포 debris를 제거하고, 항체 생산에 대하여 포착 ELISA에 의하여 분석하였다.

[0347] 동시-트랜스펙션 및 단일 트랜스펙션 둘 다 3 사본으로 수행하였다. 결과를 표 18에서 나타낸다. 결과는, 이 단일 발현 벡터로부터의 발현 수준은 동시-트랜스펙션에 대하여 관찰되는 발현 수준보다 약 4 배 가량 높은 것으로 나타난다.

표 18

[0348]

트랜스펙션 번호	트랜스펙션된 구조체	COS 세포의 BAT-1 γ4 항체에 대한 일시적 발현 수준(ng/ml)
1	단일 벡터	519.3
2	단일 벡터	522
3	단일 벡터	567.2
1	경쇄 및 중쇄 벡터	65.6
2	경쇄 및 중쇄 벡터	152.3
3	경쇄 및 중쇄 벡터	129.9

[0349]

실시예 17

[0350]

CHOdHfr-포유동물세포의 단일 벡터 pG4KD210.BAT-1.RH_c/R_{KD}로의 안정한 트랜스펙션 및 안정한 세포주의 생산

[0351]

CHOdHfr-세포를 10 % 태아 클론 II 및 50 μg/ml 젠타마이신이 보충된, 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드가 함유된 α-MEM으로 구성된 비선택 배지에서 증식시켰다. PBS 중의 10⁷ 세포/ml의 0.7 ml 알리쿼트를 13 μg의 pG4KD210.BAT-1.RH_c/R_{KD}로 Bio-Rad Gene Pulser를 사용하여 1900 V, 25 μF 전기용량으로 트랜스펙션시켰다. 세포를 10 분 동안 회복하도록 실온에서 둔 후, 8 ml의 비선택 배지가 담긴 10 cm 페트리디쉬로 옮긴 후, 48 시간 동안 37 °C에서 5 % CO₂ 에서 인큐베이션시켰다. 이 인큐베이션시킨 2 일 후, 세포를 트립신처리하고 약한 원심분리로 모은 후 150 ml의 미리 데운 선택 배지 (리보뉴클레오시드 및 데옥시리보뉴클레오시드가 함유되지 않고, 10 % 투석된 FBS 및 50 μg/ml 젠타마이신이 보충된, 10 nM, 50 nM, 100 nM 또는 500 nM 중 어느 하나의 메토트렉세이트를 함유한 α-MEM)에 재현탁한 후, 15 개의 10 cm 페트리디쉬에 분주하였다. 그후, 이들을 20 내지 30 일 동안 37 °C에서 5 % CO₂ 에서 인큐베이션시켰는데, 선택배지는 포커스가 명백하게 가시적일 때까지 3 - 4 일 마다 1 회씩 갈아주었다.

[0352]

2 주 후, 10 nM 플레이트에서 포커스가 발현하기 시작하였다. 50 nM 플레이트 및 100 nM 또는 500 nM 플레이트에서는 35 일 경과 후에는 포커스가 발달하지 않았다. 포커스는 이전에 (실시예 15에서) 기재된 바와 같이 집어 내었고, 인간 항체를 생산하는 이렇게 선택된 클론은 그 후 확장 및 특이적 생산 검정을 위하여 선택하였다. 특이적 생산 검정의 결과를 표 19에 나타낸다.

표 19

[0353]

클론	BAT-1 γ4 총 항체에 대한 CHO 세포 생산 수준(ng/10 ⁶ 세포/일)		
	검정 번호 1	검정 번호 2	검정 번호 3
γ4 A9	4.8	6.08	5.7
γ4 A13	48.5	14.8	68.8
γ4 A12	60.7	77.0	52.7
γ4 C4	66.0	141.7	104.4
γ4 C8	41.7	52.4	77.6
γ4 C9	30.7	30.6	32.2
γ4 F2	40.7	17.9	29.30

[0354]

실시예 18

[0355]

BATHc 중쇄 및 BAT_{KD} 경쇄 증폭 벡터로 NSO 세포의 동시-트랜스펙션 및 항체 생산 세포주의 선택

[0356]

BATRHc 중쇄 카세트 (도 16) 및 BATR_{KD} 경쇄 카세트 (도 11)를 함유하는 발현 벡터를 혼합하여 일렉트로포레이

선에 의해서 NSO 숙주 세포주에 트랜스펙션하였다.

- [0357] 트랜스펙션된 세포를 10 % 태아 소혈청 (FBS)과 1 mg/ml G418 (젠타마이신) 배지로 보충된 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM)중의 10 96-웰 플레이트에 분배하였다. 10 내지 14 일 후 트랜스펙션된 세포 콜로니가 발달하였을 때, 웰로부터의 조정 배지의 샘플을 인간화된 BAT-1 항체에 대하여 분석하였다. 최고의 생산성 웰의 세포를 골라 내어서 G418을 포함하는 배지에서 확장시켰다.
- [0358] 일주일 후에 백업으로서 그리고 선택을 위해 더욱 트랜스펙션된 세포 클론을 제공하기 위해서 트랜스펙션을 반복하였다. 10 일 후에, 트랜스펙션된 세포의 가시적인 콜로니가 발달하였고 웰로부터의 조정배지를 항체 생산에 대하여 검색하였다. ELISA 플레이트를 양 항-사람 κ 항체로 코팅하였다. 웰로부터 배지의 25 μ l 샘플을 ELISA 플레이트에 옮겼고 PBS 트윈 (PBST)중의 100 μ l에 희석하였다. 2 차 항체는 HRP-접합된 양 항-사람 IgG(γ 사슬 특이적)였고, o-페닐렌 디아민 (OPD)으로 색상을 전개시켰다. 양성웰을 현미경적으로 검사하였고 최고 생산성 웰의 세포를 24 웰 플레이트중의 10 % FBS 및 1 ml/ml G418로 보충된 1.5 ml 의 DMEM 에 집어넣었다. 2개의 트랜스펙션으로부터 총 15 개의 높은 생산성 클로니를 골라 내었다 (표 20). 2 개의 독립적인 세포주는 약 40 μ g/ml 또는 그 이상의 항체 생산 수준을 나타냈다.
- [0359] 중쇄 벡터에서 *dhfr* 유전자를 사용한 증폭을 위해, 초기의 2 개의 높은 생산성 세포주는 0.02 μ M 메토포렉세이트 첨가된 배지 (10 % FCS 및 1 mg/ml G418을 함유한 DMEM)에 옮겨졌다.

[0360] **실시예 19**

[0361] **BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 유전자를 함유하는 단일 증폭 벡터로 NSO 숙주세포주의 트랜스펙션 및 항체 생산 세포주의 선택**

[0362] 실시예 9에서 설명된 결합된 (단일) 항체 발현 벡터가 일렉트로포레이션에 의하여 NSO 숙주세포주로 트랜스펙션되었다.

[0363] 트랜스펙션된 세포는 10 % FBS를 가진 DMEM에 10 개의 96-well plate로 분배되었다. 2 일 후, 0.11 μ M 메토포렉세이트 (Methokexate)를 가진 배지가 동등한 양으로 첨가되었다. 배지의 절반은 동일한 부피의 0.1 μ M MTX-함유 배지로 매 2 일 마다 트랜스펙션 후 8 일 까지 교환되었다. 트랜스펙션은 1 주 후 백업으로 및 선택을 위한 더 잘 트랜스펙션된 세포 클론을 제공하기 위하여 반복되었다. 14 - 21 일 후, 트랜스펙션된 세포의 가시적인 콜로니가 발달하고, 웰로부터 조절된 배지가 상기 실시예에서 설명된 바와 같이 항체 생산에 대하여 검색되었다. 양성 웰이 현미경으로 검사되고, 최고 생산 웰로부터의 세포가 24-well plate에 10 % FBS 및 0.1 μ M 메토포렉세이트가 공급된 1.5 ml의 DMEM으로 접종되었다. 총 13 개의 높은 생산 콜로니가 2 트랜스펙션으로부터 선별되고, 액체 질소에서 동결되어 보관되었다 (표 20). 6 독립적인 세포주는 40 μ g/ml 이상의 항체 생산 수준을 제공하였다. 다른 선택에 기인하여, 단일 벡터를 함유하는 세포주는 2 다른 벡터 상에 항체 유전자를 함유하는 것들 보다 더 느리게 발달한다.

표 20

2 벡터시스템		단일 벡터시스템	
세포주	생산 수준 (μ g/ml)	세포주	생산 수준 (μ g/ml)
31E1	43	1B7	48
33E5	15	3E3	45
33B10	40	3H5	35
34F1	8	8H7	26
35C12	12.5	9D7	41
36G4	4	24B7	26
37H5	20	26A6	24
38E8	15	26D6	33
39A3	38	26E3	43
42G7	12	27B2	23
44F4	7	27C4	45
45C2	10	23E10	45
45H12	13	29E3	22
46A10	7		
49H2	15		

- [0364]
- [0365] NSO 숙주세포주를 BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 유전자를 함유하는 단일 증폭 벡터로 트랜스펙션 후 인간화된 BAT 생산 세포의 대표적인 예 및 항체 생산 세포주, 즉, 클로닝된 세포주 1B7은 accession number ATCC# (PTA-5189)하에

서 2003년 5월 9일에 Budapest Treaty Deposit Form을 사용하여 ATCC Cell Bank에 기탁되었다.

[0366]

실시예 20

[0367]

인간화 BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 변형에 의한 생쥐 BAT-1의 억제

[0368]

인간화 BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 변형이 원 생쥐 BAT-1와 동일한 에피토프를 인식할 수 있다는 것을 확인하기 위해서, BAT-1-결합 에피토프를 발현하는 Daudi 세포에 대한 결합의 경쟁 분석을 수행하였다.

[0369]

Daudi 세포는 대조군으로서(0 - 80 μ g/ml) 증가하는 양의 인간화 BAT-1 또는 생쥐 BAT-1로 배양하였다. 미결합 항체는 버리고 비오틴화 생쥐-BAT-1(20 μ g/ml)를 세포에 첨가하고 스타프타비딘-FITC으로 염색하였다. 도 24는 증가하는 농도의 인간화 및 원 생쥐 mAb 모두의 존재하에서 생쥐 BAT-1의 증가된 결합을 도시하며, 예상된 것과 동일한 에피토프의 인식을 지지한다. 두 항체 모두는 대략 10 μ g/ml의 IC₅₀과 함께, 유사한 용량 의존성을 나타내고, 항원 결합의 유사한 친화도를 암시한다.

[0370]

실시예 21

[0371]

생쥐 종양 모델에서 인간화 BAT-1의 생체내 영향

[0372]

실시예 20에서 나타난 바와 같이, 인간화 BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 mAb의 형성을 초래하는 CDR 이식은 BAT-1 항원의 인식을 유지하였다. 이 결합이 생쥐 BAT-1의 특징적인 생물학적 효과를 전달할 수 있는지 여부를 검사하기 위해서, 인간화 BAT-1의 효능을 생체내에서 연구하였다. 이는 생쥐와 인간 mAb 사이에 동형 차이의 관점에서 특히 중요하다.

[0373]

C57BL 생쥐는 B16 멜라닌종 세포로 접종하여 폐 메타스테시스를 유도하였다. 증가하는 양(1, 10 및 20 μ g)의 인간화 mAb을 종양-접종 후 12 일에 주사하였고 10 μ g 생쥐-BAT-1의 최적 용량에 비교하였다. 종양 접종 후 24 일에 측정된 폐 중량은 도 25에 도시되고 종양의 확립에 대응한다. 미처리 생쥐와 동형-매칭된 부적절한 인간 IgG1로 처리된 생쥐 모두, 0.9 그램의 평균 폐 중량을 가졌다. 인간화 BAT-1는 1 μ g/생쥐의 낮은 용량에서 일어나는 가장 높은 억제와 함께 메타스테시스 성장의 용량 의존적 억제를 나타냈다. 이는 종양 질량에서 67 %의 증가를 초래하였고 최적 용량의 생쥐 BAT-1에 의해 달성된 것(62 %)과 유사하였다. 중요한것은, 이러한 최대 효과가 10 배 더 낮은 용량의 인간화 mAb에 의해 달성되었고, 원 생쥐 BAT-1 mAb에 비교하여 이 항체의 더 높은 치료 효능을 암시한다.

[0374]

실시예 22

[0375]

hBAT-1에 의한 SCID 생쥐에서 인간 멜라닌종(SK-28)의 억제

[0376]

생쥐-BAT-1 mAb는 인간 말초 혈액 림프구(hPBL)의 존재하에서 인간 종양 메타스테시스의 형성을 억제하는 것으로 나타났다. 인간 암의 억제에서의 인간화 BAT-1.RHc/R_{KD} γ 1 mAb의 효능을 평가하기 위해서, 인간 기원의 종양과 림프구 모두를 조합하는 모델에서 인간화 항체를 연구하였다. 심각한 조합 면역-결핍 생쥐 (SCID)를 hPBL로 융합하여 면역 능력을 회복하였다. 생쥐는 인간 멜라닌종 세포 (SK-28)로 시험감염시키고, 종양 접종 후 11 일째에 단일 i.v. 투여량으로 투여된, 증가하는 농도의 인간화 항체로 처리하였다. 도 26은 23일째에 측정될때, 관찰된 메타스테시스의 수와 상관되는 폐 중량을 도시한다. 인간화 항체의 농도 모두는 hPBL의 존재하에서 종양 억제를 유발하였다. 상기한 생쥐 종양 모델에서 관찰된 바와 같이, 인간화 항체는 생쥐 BAT-1에 비해, 생체내에서 보다 효과적으로 종양 성장을 억제할 수 있었다. 1 μ g의 이러한 인간화 항체의 단일 투여량은 10 μ g의 생쥐 BAT-1 항체 (30 %)보다 더 높은 효능을 나타내면서 종양 성장을 68 %까지 억제하였다.

[0377]

실시예 23

[0378]

누드 생쥐에서 hBAT-1 단일클론 항체에 의한 인간 직장결장암 간 메타스테시스의 면역요법

[0379]

LIM6 및 HM7는 그들의 높은 미신 합성 및 전이 가능성에 대해 선택된 인간 CRC 세포주 LS 174T의 두개의 서브클론이다. 종양 세포는 마취된 누드 생쥐의 노출된 비장안으로 주입되었다. 1 분 후, 비장을 제거하고 절제를 폐쇄하였다. 낮은 용량의 생쥐 및 인간화 BAT-1 항체를 12 일 후에 투여하였고 종양 접종 후 35 일째에 희생시켰다. 간을 측정하고, 전이 결절의 수를 세고, 간 조직을 조직화 및 면역조직화학 연구를 위해 가공하였다.

[0380]

BAT-1, 생쥐 및 인간화 항체로 처리하면 생쥐 모델에서 간 메타스테시스 성립의 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다. 생쥐 BAT-1 항체 처리는 LIM-6 이종이식 발전을 예방하였다. BAT-1 처리된 생쥐와 대조군으로부터 평

균 중량의 이중이식은 각각 0.14 ± 0.17 gr 및 0.98 ± 1.12 gr 이었다 ($P = 0.004$). 누드 생쥐에 주사된 HM7 세포는 생쥐 BAT-1 및 인간화 BAT-1의 단일 투여에 의해 예방된, 간에서 많은 수의 거대한 전이 병소를 초래하였다 (도 27). 전이 결절의 수에서 주된 감소(40 % 이상), 즉, 대조군 생쥐에서 134.5 ± 34 로부터 생쥐 BAT-1, 인간화 BAT-1로 처리된 생쥐에서 각각 8.36 ± 3 및 4.88 ± 2 에 이르기까지의 감소가 관찰되었다. BAT-1으로 처리는 중앙 가장자리에서 림프구의 축적을 예방하였다. 전이 결절 주변에 림프구 침윤의 역할은 암의 결과에 관련될 수 있고 BAT-1 치료법을 위한 메카니즘을 제시할 수 있다.

[0381] **실시예 24**

[0382] **CD4 및 CD8와의 hBAT의 동시-국소화**

[0383] 생쥐 BAT-1는 CD4+ 와 CD8+ 서브셋을 인식하는, 인간 림프구를 결합하는 것으로 나타났다. 인간화 BATRHc/BATR κ_D γ 1 mAb (hBAT)의 결합 특이성을 확립하기 위해서, 아래에 기술한 바와 같이, 정상 제공자의 혈액으로부터 인간 말초 혈액 림프구를 분리하고, 공지된 림프구 마커로 hBAT의 동시-국소화를 분석하였다.

[0384] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 피콜에 의해 분리시키고 조직 배양 플레이트에서 배양하여 부착 세포를 제거하였다. 분리된 PBL을 림프구위에 크기와 입도에 의해, 그리고 살아있는 세포에 프로피듐 요오드 (PI) 배제에 의해 게이팅하였다. 결합은 4 °C에서 1 시간 동안 수행되었고, 게이팅된 림프구에서 flow cytometry에 의해 결정되었다.

[0385] 검사된 모든 샘플에서 적어도 20 %의 PBL은 hBAT에 대한 결합을 나타내었다. 도 28은 CD4+ 세포(25 %) 및 CD8+ 세포(15 %) 모두를 포함하는, 분리된 PBL의 50 %가 hBAT에 대해 양성인 선택된 제공자의 림프구에 대한 결합의 예를 도시한다. 이들 하위집단 내에서, CD8+ 세포는 물론 CD4+ 세포의 다수는 hBAT mAb을 결합 (각각 58 % 및 71 %)하였다.

[0386] **실시예 25**

[0387] **hBAT의 B 림프구에 대한 결합**

[0388] 인간화 BATRHc/BATR κ_D γ 1 mAb (hBAT)을 Daudi 세포, 인간 B 림프구 세포주의 막에 대해 사육하였다. 정상 제공자로부터 PBL은 위에서 기술한 바와 같이 피콜에 의해 분리되었고, 이어서 조직 배양 플레이트에 부착되었다. 비-부착 세포는 CD19 및 CD20을 포함하는 B-세포 마커로 hBAT의 동시 국소화에 대해 검사하였다. 결합은 4 °C에서 1 시간 동안 수행되었고, 게이팅된 림프구위에서 흐름세포측정에 의해 결정되었다. 도 29는 대표적인 정상 제공자의 세포에 대한 결합의 평가를 도시한다.

[0389] 샘플에서 림프구의 25 - 29 %는 인간화 BAT mAb에 대해 양성이었다. 이들 세포는 두가지 독립적 마커에 의해 증명된 바와 같이, B 세포의 다수 (70 - 75 %)를 포함하였다. CD20+의 70 %는 인간화 BAT mAb에 대해 양성이고 (R1과 PI 음성 위에 게이팅됨; 도 29A) CD19+의 75 %는 인간화 BAT mAb에 대해 양성이었다 (R1과 PI 음성 위에 게이팅됨). 결과는 세포 표면 위에 BAT-결합 부분이 말초 B 세포에 일반적일 수 있다는 것을 암시한다.

[0390] **실시예 26**

[0391] **세포의 활성화시 CD4+ T 세포에 대한 hBAT의 결합이 증가한다**

[0392] 생쥐 BAT 항체의 결합은 림프구 활성화 이전에 상호관련이 있었다. 이러한 결합 활성화는 인간 mAb에 대해 더욱 연구되었고 활성화에 놓인, 인간 CD4+ T 세포에 대한 인간 BAT mAb의 결합 수준을 검사하였다. 세포는 음성 선택에 의해 정상 제공자로부터 분리되었고 항-CD3 및 항-CD28 (5μ l/ml)에 결합된 비즈로 자극되었다. 이러한 처리는 T-세포 수용체와 동시-자극 분자를 통해 다클론성 활성을 발휘하기 위해 선택되었다.

[0393] 세포는 활성화 후 0, 2 및 5 일째에서 인간화 BATRHc/BATR κ_D γ 1 mAb (hBAT) 및 항-CD4 (4 °C, 1시간)의 결합에 대해 검사하였다(도 30A, B 및 D). PI 염색에 대해 음성인 세포에서 흐름세포측정에 의해 분석을 수행하였다. 사분역은 동형 제어에 의해 결정되었다.

[0394] 인간화 BATRHc/BATR κ_D γ 1 mAb의 CD4+ 세포에 대한 결합은 활성화후에 극적으로 증가하였다(도 30). 비활성화 세포가 0 일(도 30A) 및 5 일에서(도 30C) hBAT에 대해 17 - 20 % 양성 결합을 나타내는 반면, 52 % 및 77 %의 CD4+ 세포는 각각 활성화의 2일 (도 30B)과 5일 (도 30D)에 hBAT를 결합하였다. 다중 샘플로 유사한 결과가 얻어졌고 또한 CD8+ 세포에 대해서 증명될 수 있었다. 이것은 TCR 활성화 시에 T 세포에 대한 hBAT 결합이 증가

된다는 것을 증명한다.

[0395] 이러한 활성의 용량 의존성은 CD69와의 hBAT의 동시-국소화에 의해 증명되었다. T 세포 활성화는 다양한 분자의 세포-표면 발현이 특징이고, 그것의 일부는 활성화 과정에 수반되는 것으로 나타났다. hBAT는 초기 및 후기 활성화 분자 모두를 포함하는 다른 마커와 함께 그것의 동시-발현에 대해 연구되었다. 초기 활성화 마커인 CD69는 활성화시 T 세포에서 상향 조절된다. 활성화 후 4일째에, 세포는 hBAT 및 항-CD69(4 °C, 1시간)이 결합에 대해 검사하였다. PI 염색에 대해 음성인 세포에서 흐름세포측정에 의해 분석을 수행하였다. 사분역은 동형 제어에 의해 결정되었다.

[0396] 정상 제공자로부터 CD4+ T 세포의 용량-의존 활성화는 도 31에서 증명된다. 강한 활성화시(항-CD3 및 항-CD28에 결합된 5 µl/ml의 비즈; 도. 31B), hBAT (93%)에 결합할 수 있는 대부분의 세포는 활성화 세포였고 CD69 발현에 의해 동정되었다. 활성화의 증가된 시간은 또한 활성화중 한 날에 시작하는 hBAT에 대한 결합의 증가를 초래하였다. 활성화의 시간 의존성이 또한 증명되었고 활성화중 한 날에 시작하는 hBAT 결합의 증가를 초래하였다. 흥미롭게도, CD4+ 과 CD8+ 세포 모두에 대한 hBAT 결합은 CD69 감소 (5 일) 후에도 높게 남아있었고, 이는 다중 단계의 림프구 활성화와 결합의 상관성을 암시한다. CD69+ 세포에 대한 hBAT 결합은 hBAT 결합 단백질의 발현이 초기 활성화와 상호관련있다는 것을 암시한다.

[0397] **실시예 27**

[0398] **CD25 및 CD40-리간드를 발현하는 활성화 T 세포에 대한 hBAT의 결합**

[0399] IL2에 대해 높은 친화력 수용체인 CD25은 T-세포 팽창에 필수적이고 전형적으로 활성화 세포의 표면위에서 증가된다. 연대순으로 그것은 CD69의 외양을 따르고 그것의 발현은 CD69의 하향-조절 후에 몇 일 연장된다.

[0400] CD4+ T 세포는 음성 선택에 의해 정상 제공자로부터 분리되었고 몇일동안 항-CD3 및 항-CD28 (5 µl/ml)에 결합된 비즈로 자극되었다. 세포는 대조군에 관하여(0일, 도 32A와 활성화 없는 5일, 도 32C) 활성화의 0일(도 32A), 1일(도 32B), 및 5일(도 32D)에 hBAT 및 항-CD25 (4 °C, 1 hr)의 결합에 대해 검사되었다. PI 염색에 대해 음성인 세포에서 흐름세포측정에 의해 분석을 수행하였다. 사분역은 동형 제어에 의해 결정되었다.

[0401] CD4+ 와 CD8+ T 세포 모두는 자극 1일에 시작하는, 항-CD3 및 항-CD28 자극시 CD25 발현에서 시간 의존성 증가를 나타내었다. hBAT는 이들 활성화 세포에서 CD25와 함께 동시-국소화하였다(도 32).

[0402] CD25 발현은 활성화 후 1일째에 55 %의 세포 (도 32B)에서 5일째에 93%로 증가되었다 (도 32D). 두가지 시점에서 hBAT 결합 세포의 다수는 CD25+ (85 % 와 98 % 각각)이었다.

[0403] 활성화 마커와의 상관성은 후기 활성화 마커 CD40-리간드로 더욱 확장되었다(도 33). hBAT 결합은 시간 의존적 방식으로 CD4+ (도 33) 및 CD8+ T 세포에서 CD40-리간드의 발현과 양성로 상관되었다. 결과는 다른 활성화 단계와 상관되는 방식으로 T 세포의 활성화가 hBAT 결합 단백질의 발현을 유도한다는 것을 결국 암시한다.

[0404] **실시예 28**

[0405] **hBAT는 활성화 CD4+ 세포의 생존을 증가시킨다**

[0406] 활성화 T 세포가 hBAT에 의해 더욱 자극될 수 있는지 여부를 검사하기 위해서, 인간 CD4+ 세포를 음성 선택에 의해 정상 제공자로부터 분리하였고 항-CD3/CD28 비즈의 차선 농도로 활성화시켰다(도 34). hBAT (0.5 µg/ml)는 활성화후 2 일째에 첨가되었고 그것의 효과는 생존가능 세포의 수를 결정함으로써 평가되었다. 결과는 hBAT가 두개의 개별적인 제공자로부터 분리된 생존가능 CD4+ 세포의 수의 상당한 증가를 유발하였다는 것을 나타낸다 (도 34A 및 B). 대조군 비자극 세포는 분리의 8일 내에 죽은 반면, 활성화 세포는 림프구의 전형적인 방식으로 팽창하여, 세포 증식을 시작하고 다음에 세포 죽음에 의해 좌우된 단계를 이끄는 안정한 세포 수의 단계가 온다. hBAT의 첨가는 CD4+ 세포의 팽창을 강화하였고 mAb의 존재하에서 세포에 대해 세포수를 1.5 배 증가시켰다.

[0407] 여기서의 결과와 함께 생체내 BAT 항체의 효능이 종양의 존재하에서 증가된다는 사실은 증가된 효능이 활성화 BAT 표적 세포의 존재에 의존할 수 있다는 것을 암시한다. 비록 종양 성장의 억제에 효력이 없지만, 종양 항원에 대해 지시된 림프구가 암 환자에서 관찰되었고 BAT 활성화에 대해 표적 세포로서 작용할 수 있다. 따라서, 결과의 관점에서 hBAT는 세포 증식을 자극함으로써 및/또는 세포사를 억제함으로써 CD4+ 세포를 활성화한다는 것이 암시될 수 있다.

[0408] **실시예 29**

[0409]

Daudi 및 Jurkat 세포주에 대해 hBAT의 결합

[0410]

생쥐 BAT-1는 Daudi B-세포주의 막에 대해서 사육되었고 인간 T 세포를 결합하는 것으로 나타났다. 인간화 항체의 특이성을 확인하기 위해서, hBAT는 마이엘로이드 기원의 2개의 인간 세포주-Daudi 세포-인간 B 림프종 세포주 및 Jurkat 세포-인간 T 백혈병 세포주-에 대한 그것의 결합에 대해 검사하였다. FITC에 결합된 hBAT는 150 ug/ml의 농도에서(1 시간 동안 4 °C) Daudi 및 Jurkat 세포로 배양되었다. 결합은 흐름 세포측정에 의해 결정되었다.

[0411]

두개의 세포주, Daudi (도 35A)와 Jurkat (도 35B)는 인간화 항체를 결합하였다. 더욱이, 두개의 세포주의 배양에서 세포의 대부분은 항체를 결합할 수 있었다. 동형 매칭된 인간-IgG1은 음성 대조군으로서 역할을 하였고 (도 35; 동형 대조군) 판독 역치를 성립하였다. 두개의 세포주 모두는 유사한 강도의 항체 염색을 나타냈고 이는 그들이 유사한 수의 hBAT 결합 분자를 발현한다는 것을 암시한다.

[0412]

실시예 30

[0413]

암 환자의 PBL에 대한 hBAT의 결합

[0414]

hBAT가 정상 제공자로부터 인간 T 세포를 결합할 수 있다는 관찰 후에, 본 발명자들은 암 환자로부터 수집한 림프구를 결합하는 그것의 능력을 비교하였다. PBL는 전립선 암 환자의 혈액으로부터 피콜에 의해 분리되었고 이어서 조직 배양 플레이트에 부착시켰다. 비부착 세포는 hBAT 및 림프구 마커의 결합에 대해 조사하였다. 결합은 4°C에서 1시간동안 수행하였고, 게이팅된 림프구에서 흐름 세포측정에 의해 결정되었다. 동형 대조군은 사분역을 결정하는데 사용되었다. 이들 환자는 림프구의 존재와 표현형에 종종 영향을 주는 치료법을 이전에 겪었다. 이들 세포에 대한 hBAT 결합은 그것의 활성화에 대해 필요조건이고 도 36에서 도시한 바와 같이, 정상 제공자의 림프구에 대한 결합과 닮아있다. 비록 전체 림프구 수는 낮았지만, hBAT는 39%의 CD4+ 세포, 60%의 CD8+ 세포 및 68%의 B 세포를 포함하는, 본 발명자들이 조사한 큰 비율의 림프구 하위집단을 여전히 결합할 수 있었다.

[0415]

실시예 31

[0416]

인간, 영장류 및 생쥐 조직과 hBAT의 교차 반응성

[0417]

이 연구의 목적은 어떤 범위의 정상 인간 조직과 hBAT-1 단일클론 항체의 교차 반응성을 검사하는 것이었다. 이 연구는 인간 조직의 범위에 대해 단일클론 항체의 면역조직 화학 테스트를 수반하였다. 사이노몰로거스 원숭이와 CD-1 생쥐로부터 조직에서 시험관내 교차 반응성의 비교를 또한 착수하였다.

[0418]

(i)조직 공급원

[0419]

이 연구에서 사용된 조직은 항체 결합에 영향을 주는 제공자 특이성 인자들의 가능성을 최소화하기 위해 각각 3개의 비관련 제공자로부터 얻어졌다. 인간 조직은 윤리적인 공급원에 의해 제공되었다. 이 연구에 사용된 영장류 및 생쥐 조직은 윤리적 공급원에 의해, 각 종들의 2가지 동물로부터 얻어졌다. 생쥐 및 영장류는 잠복기 독물학 연구에서 평가될 수 있는 잠재적인 테스트 시스템이다. 선택된 조직은 FDA Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (Office of Biologics Research and Review, Center for Biologics Evaluation and Research FDA, 1997) 및 Rules Governing Medicinal Products in the European Community Vol. 3a (Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies Dec. 1994, 3AB4a)에서 명시된 것들이었다. 이 연구에 사용된 모든 조직은 액화 질소에서 신속하게 동결시키고 필요할때까지 -70°C 이하에서 저장하였다. 냉동미세 절단기 섹션은 5 μm 내지 8 μm의 명목 두께에서 제조되었다. 양성 대조군은 Jurkat E6 세포였다. 신선한 혈액의 샘플을 3명의 제공자로부터 수집하고 사용하는날 바른표본을 제조하였다.

[0420]

(ii) FITC 결합

[0421]

연구가 시작되기 전에 인간화 단일클론 hBAT-1 항체를 Custom Antibody Services Division of Serotec Ltd (ISO 9001, Certification)에 의해 FITC에 결합시켰다. 결합된 항체의 최종 농도는 1.99 mg/ml였다.

[0422]

냉동 섹션과의 항체-조직 결합을 위한 정량 농도 및 항체-조직 결합의 적당한 성능에 적절한 다른 조건을 결정하기 위해 방법론의 초기 확인을 대조군 조직에서 수행하였다(Jurkat E6 세포주). 슬라이드를 현미경으로 검사하고 항체 특이성에 대해 주관적으로 점수를 매겼다(표 21). 이들 데이터에 근거하여, 연구를 통해 사용된 hBAT-1의 농도는 1: 100, 1: 250 및 1: 500였다.

표 21

hBAT-1 희석	¹ 특이성	신호 강도	배경
1:25	3	+++	3
1:50	3	+++	2
1:100	3	+++	1
1:250	3	+++	0
1:500	2	++	0
1:1000	1	+	0
1:2000	0	0	0
1:4000	0	0	0
1:8000	0	0	0
음성	0	0	0

[0423]

[0424]

¹키: 3은 강한 양성-염색을 나타내고, 2는 양성 염색을 나타내고, 1은 약한 양성 염색을 나타내며, 0은 염색/신호가 없음을 나타낸다. +++는 강한 시각 신호를 나타내고, ++는 우수한 시각 신호를 나타내며, +는 약한 시각 신호를 나타낸다.

[0425]

(iii) 대조군

[0426]

항체가 완충액으로 치환된 음성 대조군 반응을 각각의 조직에 대해 수행하였다. 각각의 검출 반응은 항체의 3개의 소정의 희석에서 반응된, 양성 대조군 세포, Jurkat E6를 포함하였다. 이는 반응의 일관성을 모니터링하도록 하였다. 항 액틴 항체로 배양된 티로이드의 섹션은 검출 시스템을 위한 대조군으로서 각각의 검정 시행에 포함되었다.

[0427]

(iv) 교차-반응성 평가

[0428]

각각의 조직의 섹션을 Haematoxylin 및 Eosin (H & E)으로 염색하여 그들의 동일성 및 연구를 위한 적절성을 확인하였다. 섹션은 또한 평활근 액틴(SMA ; 표 22) 또는 토끼 항 인간 트랜스페린 제어 세라로 배양하였고, 이는 조직이 면역조직화학에 대해 적합하다는 것을 나타내었다. 조직의 각각의 3개의 섹션을 제조하였고 확인 단계 동안에 결정된 것처럼 1 : 100, 1 : 250 및 1 : 500의 농도에서 FITC로 결합된 항체로 배양하였다. 완충액에서 세척하고 정상 세럼으로 차단한 후에, 섹션은 알칼리성 포스페이트 검출을 위해 적절한 2차 및 3차 항체로 배양하였고, 결합 부위를 결정하기 위해 현미경 검사 전에 하에마톡실린으로 대조 염색하였다.

[0429]

알칼리성 포스페이트 검출과 함께 FITC-결합 염색법은 하기 단계를 포함하였다:

[0430]

1. 냉동미세절단기 섹션을 공기 건조

[0431]

2. 실온에서 10분, 아세톤중에 담금으로써 고정시킴

[0432]

3. 공기 건조

[0433]

4. 완충액 세척

[0434]

5. 정상 세럼, 1: 5, 적어도 20분

[0435]

6. 완충액 세척

[0436]

7. 1: 100, 1: 250 및 1: 500에서 FITC 결합 항체를 1022292 테스트: 밤새 2-8℃에서.

[0437]

8. 완충액 세척

[0438]

9. 단일클론 항 FITC 항체, 1:50, 30분.

[0439]

10. 완충액 세척

[0440]

11. 알칼리성 포스페이트 결합된 항체, 1: 200, 2 시간.

[0441]

12. 완충액 세척.

[0442]

13. 벡터 레드 및 레바미솔, 20분

[0443]

14. 완충액 세척.

[0444]

15. 대조염색 및 마운트.

[0445] 내생 알칼리성 포스페이트는 색소원안에 혼입된 레바미솔(Levamisole)을 사용함으로써 최소화되었다. 내생 알칼리성 포스페이트 활성이 억제될 수 없는 조직(인간 결장, 돌창자, 태반, 및 내피, 생쥐 결장 및 이자, 영장류 위, 돌창자 및 전립샘)에서, 2시간동안 1:200에서 홍당무과산화효소 결합된 항체를 사용하였고, 이어서 20분 동안 디아미노벤지덴(DAB) 시약을 사용하였다.

[0446] (v) 결과

[0447] H & E로 염색된 각각의 조직의 샘플을 조직의 질, 정상 조직학 특성의 존재 및 보존의 적절성에 대해 검사하였다. 테스트한 모든 샘플은 본 연구의 목적에 적합한 것으로 간주되었다. 양성 염색법은 hBAT-1에 대한 Jurkat E6 세포주 및 평활근 액틴 처리된 티로이드 섹션에서 달성되었다. 대조군이 예상된 결과를 가져올때, 테스트는 유효한 것으로 간주되었다.

[0448] hBAT-1 및 인간 조직에 대한 각각의 교차 반응성 결과가 표 22에 나와있다. 양성 염색은 1:100의 희석에서 혈관 인간 내피에서 검출되었고 아마도 림프구에 대한 hBAT-1 결합의 결과였다. 양성 염색은 인간화 단일항체 hBAT-1 항체의 예상되는 조직 결합을 나타낸다. 염색 없는 즉, hBAT-1와의 교차 반응성은 비장 섹션, 혈액 바른표본 또는 다른 인간 조직(인간 내피-혈관 제외)에서 관찰되었다. 생쥐 및 영장류 조직중 어떤것도 hBAT-1와의 교차 반응성의 증거를 나타내지 않았다.

표 22a

조직	SMA	hBAT-1 항체			
		1:100	1:250	1:500	1:100
부신	+	-	-	-	-
방광	+	-	-	-	-
혈구	N/A	-	-	-	-
혈관	+	+	-	-	-

[0449]

표 22b

(내피)					
골수	N/A	-	-	-	-
유방	+	-	-	-	-
소뇌	+	-	-	-	-
대뇌 겉질	+	-	-	-	-
결장	+	-	-	-	-
눈 (망막)	+	-	-	-	-
자궁관	+	-	-	-	-
심장	+	-	-	-	-
돌창자(GI 관)	+	-	-	-	-
신장	+	-	-	-	-
간	+	-	-	-	-
폐	+	-	-	-	-
림프절	+	-	-	-	-
난소	+	-	-	-	-
체장	+	-	-	-	-
부갑상샘	+	-	-	-	-
이하선	+	-	-	-	-
뇌하수체	+	-	-	-	-
태반	+	-	-	-	-
전립샘	+	-	-	-	-
피부	+	-	-	-	-
척수	+	-	-	-	-
비장	+	-	-	-	-
위	+	-	-	-	-
가로무늬근	+	-	-	-	-
고환	+	-	-	-	-
가슴샘	+	-	-	-	-
갑상선	+	-	-	-	-
편도	+	-	-	-	-
수요관	+	-	-	-	-
자궁목	+	-	-	-	-
자궁 - 자궁내막	+	-	-	-	-

¹N/A - 적절하지 않은 결과

[0450]

[0451] 앞서 기술한 특정 구체에는 다른 사람들이 기존의 지식을 적용함으로써, 부적당한 실험없이 일반적인 개념으로

부터 벗어나지 않고 그러한 특정 구체예를 다양한 응용을 위해 쉽게 변형 및/또는 개조할 수 있고 따라서 그러한 개조 및 변형은 개시된 구체예의 등가물의 의미와 범위내에서 이해되도록 의도한다는 본 발명의 일반적인 성질을 충분히 드러낼 것이다. 여기서 채택된 어법 또는 용어는 설명의 목적이 아닌 제한의 목적이 아님을 이해해야 한다. 개시된 다양한 기능을 수행하기 위한 수단, 재료 및 단계는 본 발명에서 벗어나지 않고 다양한 대체 형태를 취할 수 있다. 따라서 상기 명세서 및/또는 하기 청구항에서 발견될 수 있듯이 "~위한 수단"이라는 표현, 또는 어떠한 방법 단계 언어, 다음에 이어지는 기능적인 언급은 상기 명세서에서 기술된 구체예 또는 구체예들과 정확하게 등가하든지 않든지간에, 어떠한 구조적, 물리적, 화학적 또는 전기적 요소 또는 구조, 또는 인용된 기능을 수행하는 현재 또는 미래에 존재할 수 있는 어떤 방법 단계든지 한정하고 커버하려는 의도이며, 즉, 동일한 기능을 수행하기 위한 다른 수단이나 단계가 사용될 수 있고: 그러한 표현은 그들의 가장 넓은 해석이 주어지도록 의도된다.

도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 뮤린 BAT-1 항체의 카파 경쇄 가변영역 (V_K)의 DNA 및 펩티드 서열을 나타낸다.
- [0067] 도 2는 뮤린 BAT-1 V_K 영역에서 CDR의 canonical 클래스를 묘사한다. "Chothia canonical 클래스"는 Chothia와 그의 동료들에 의하여 정의된 것처럼 canonical 클래스가 사용되는 곳을 지시하고 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175, 1990), 반면에 "Martin canonical 클래스"는 Martin과 Thornton에 의하여 정의된 canonical 클래스가 사용되는 곳을 나타낸다 (Martin et al., J. Mol. Biol. 263:800, 1996). FR 잔기는 굵게 강조되었다.
- [0068] 도 3은 뮤린 BAT-1 항체의 중쇄 가변영역 (V_H)의 DNA 및 펩티드 서열을 나타낸다.
- [0069] 도 4는 뮤린 BAT-1 V_H 영역에서 CDR의 정규 클래스를 묘사한다. "Chothia canonical 클래스"는 Chothia와 그의 동료들에 의하여 정의된 것처럼 canonical 클래스가 사용되는 곳을 지시하고 (Chothia et al., 1987, 1989, 1992 *ibid*; Tramontano et al., *ibid*), 반면에 "Martin canonical 클래스"는 Martin과 Thornton에 의하여 정의된 canonical 클래스가 사용되는 곳을 나타낸다 (Martin et al., *ibid*). FR 잔기는 굵게 강조되었다.
- [0070] 도 5는 SEQ ID NOS. 15 - 18로 제안된 인간화된 BAT-1 V_K 영역의 다양한 변형 아미노산 서열을 보여준다. 점 [...]은 BAT-1 V_K 영역 잔기와 인간 TEL9 V_K 영역 서열이 매치되는 곳을 보여준다. 대시 [-]는 특이적 잔기 위치에 존재하는 아미노산이 없는 곳을 보여준다. TEL9 FR에서 아미노산 서열이 인간화된 BAT-1 V_K 영역으로 변환된 곳은 굵게 강조되었다. CDR은 명칭 [==L1==]의 사용에 의하여 설명되었다. 사용된 숫자는 Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1991)에 따른 것이다.
- [0071] 도 6은 SEQ ID NOS. 20 - 24로 제안된 인간화된 BAT-1 V_H 영역의 다양한 변형 아미노산 서열을 나타낸다. 점 [...]은 BAT-1 V_H 영역 잔기와 인간 hsighv1295 V_H 영역 서열이 매치되는 곳을 보여준다. 대시 [-]는 특이적 잔기 위치에 존재하는 아미노산이 없는 곳을 보여준다. hsighv1295 FR에서 아미노산 서열이 인간화된 BAT-1 V_H 영역으로 변환된 곳은 굵게 강조되었다. CDR은 명칭 [==H1==]의 사용에 의하여 설명되고, 반면에 [----]은 H1 구조적 루프의 부분을 나타낸다. 사용된 숫자는 Kabat (Kabat et al., *ibid*)에 따른 것이다.
- [0072] 도 7은 인간화된 BAT-1 항체의 모양이 고쳐진 인간 카파 경쇄 가변영역의 변형 A ($BATR_{K_A}$)의 DNA (SEQ ID NO. 87) 및 펩티드 (SEQ ID NO. 15) 서열을 보여준다.
- [0073] 도 8은 인간화된 BAT-1 항체의 모양이 고쳐진 인간 카파 경쇄 가변영역의 변형 B ($BATR_{K_B}$)의 DNA (SEQ ID NO. 88) 및 펩티드 (SEQ ID NO. 16)를 보여준다.
- [0074] 도 9는 인간화된 BAT-1 항체의 모양이 고쳐진 인간 카파 경쇄 가변영역의 변형 D ($BATR_{K_D}$)의 DNA (SEQ ID NO. 89) 및 펩티드 (SEQ ID NO. 18) 서열을 나타낸다.
- [0075] 도 10은 pKN110-BATR $_{K_D}$ 벡터 구성의 모식도이다.
- [0076] 도 11은 BAT-1 경쇄 발현 벡터 내에 삽입된 BAT-1 경쇄 카세트의 모식도이다.

- [0077] 삭제
- [0078] 삭제
- [0079] 삭제
- [0080] 도 15는 pG1D110.BAT-1.RHc 벡터 구성의 모식도이다.
- [0081] 도 16은 BAT-1 중쇄 발현 벡터 내에 삽입된 BAT-1 중쇄 카세트의 모식도이다.
- [0082] 도 17은 pG1D200 감마-1 면역글로불린 중쇄 포유동물 발현 벡터의 모식도이다.
- [0083] 도 18은 pG1KD210.BAT-1.RHC/RKD 단일 발현 벡터 (SEQ ID NO. 93)의 모식도이다.
- [0084] 도 19는 완전한 BAT-1 항체의 발현을 위한 단일 발현 벡터 내로 삽입된 BATR κ_D /BATRH $_C$ 중 및 경쇄 카세트의 모식도이다.
- [0085] 도 20은 BAT-1 키메라항체에 대한 인간화된 BATRH $_B$ /BATR κ_B 변형체의 Daudi 세포 ELIZA를 보여준다.
- [0086] 도 21은 BAT-1 키메라항체에 대한 인간화된 BATRH $_B$ /BATR κ_A 및 BATRH $_A$ /BATR κ_A 변형체의 Daudi 세포 ELISA를 보여준다.
- [0087] 도 22는 BAT-1 키메라항체에 대한 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_B 및 BATRH $_C$ /BATR κ_D 변형체의 Daudi 세포 ELIZA를 보여준다.
- [0088] 도 23은 BAT-1 키메라항체에 대한 인간화된 BATRH $_B$ /BATR κ_D 변형체의 Daudi 세포 ELISA를 보여준다.
- [0089] 도 24는 Daudi 세포에 유린 BAT-1 mAb 및 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb의 투여량 의존성 결합 곡선을 나타낸다.
- [0090] 도 25는 유린 B16 폐암에서 대조군 (비처리) 및 원 유린 BAT-1 mAb로 처리한 것에 대하여 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb (hBAT)의 투여량-의존적 항-전이 활성을 도해한다. 모든 처리는 암종 접종 후 14 일에 정맥 내 주사에 의하여 투여되었고, 폐는 처리 후 10 일에 검사되었다.
- [0091] 도 26은 인간 림프구로 이식된 SCID 생쥐에서 인간 멜라노마 (SK-28) 상의 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb의 저해 효과를 나타낸다. 암 증식에서 인간화된 BAT-1의 효과는 대조군 (비처리) 또는 유린 BAT-1 mAb (mBAT-1)과 비교된다.
- [0092] 도 27은 BALB/c 누드 생쥐에 이식된 유린 암종 모형 (HM 7)에서 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb의 항-전이 활성을 나타낸다.
- [0093] 도 28은 통과된 림프구에서 flow cytometry에 의하여 결정된 CD4 (A) 및 CD8 (B)을 가진 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb (hBAT)의 동시-위치를 보여준다.
- [0094] 도 29는 정상 공여체로부터 분리된 B 림프구의 세포성 마커 CD19 (A) 및 CD20 (B)에 인간화된 BATRH $_C$ /BATR κ_D γ 1 mAb의 결합을 나타낸다.
- [0095] 도 30은 비활성 (제 0 일, A; 제 5 일, C) 및 활성 (제 2 일, B; 제 5 일, D) CD4+ T 세포에 인간화된 BAT mAb의 결합을 보여준다.
- [0096] 도 31은 투여량-의존적 방식 (비활성, A; 0.25 μ l, B; 0.5 μ l, C)으로 anti-CD3 및 anti-CD28에 접합된 비드로 활성화된 CD69⁺ T 세포에 인간화된 BAT mAb의 결합을 보여준다.
- [0097] 도 32는 시간 의존적 방식 (제 0 일, A; 활성 제 2 일 및 제 5 일, 각각 B 및 D; 활성 제 5 일, C)으로 T 세포

의 CD25 마커를 가진 인간화된 BATRH_C/BATRK_D γ 1 mAb의 동시-위치를 나타낸다.

[0098] 도 33은 시간 의존적 방식 (제 0 일, A; 활성 제 1 일, 제 2 일 및 제 5 일, 각각 B, C 및 E; 비활성 제 5 일, D)으로 T 세포의 CD40-리간드 마커를 가진 인간화된 BATRH_C/BATRK_D γ 1 mAb의 동시-위치를 나타낸다.

[0099] 도 34는 두개로 나누어진 공여체 (A 및 B)로부터 분리된 살아있는 CD4+ 세포의 수에 있어서 hBAT 유도된 증가를 설명한다.

[0100] 도 35는 Daudi (A) 및 Jurkat (B) 세포주에 결합하는 hBAT를 나타낸다.

[0101] 도 36은 암 환자의 PBL에 결합하는 hBAT를 나타낸다.

도면

도면1

```

ATGGATTACAGGTCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCC
1 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 60
TACCTAAATGTCCACGTCTAATAGTCGAAGGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S

AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG
61 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 120
TCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGGTCCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCCCTCTTC
R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K

GTCACCATAACCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAG
121 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 180
CAGTGGTATTGGACGTACCGGTCCAGTTCACATTCATGTACGTGACCAAGGTCGTCTTC
V T I T C S A R S S V S Y M H W F Q Q K

CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGGACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
181 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 240
GGTCCGTGAAGAGGGTTTGAGACCTAAATATCCTGTAGGTTGGACCGAAGACCTCAGGGA
P G T S P K L W I Y R T S N L A S G V P

GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTGTCTCACAATCAGCCGAATGGAG
241 - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 300
CGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCTGAGAAATGACAGAGTGTTAGTCGGCTTACCTC
A R F S G S G S G T S Y C L T I S R M E

GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTCCCACTCACGTTTCGGC
301 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 360
CGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCGTTTCCTCATCAAAGGGTGAGTGCAAGCCG
A E D A A T Y Y C Q Q R S S F P L T F G

TCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
361 - - - + - - - - + - - 384
AGCCCCTGTTTCAACCTTTATTTT
S G T K L E I K

```

도면2

Chothia Canonical 클래스

L1 (10 아미노산)	= 클래스 1 *
주요 잔기	: 2(<u>I</u>); 25(<u>A</u>); 29(<u>VIL</u>); 33(<u>LM</u>); 71(<u>YF</u>)
L2 (7 아미노산)	= 클래스 1
주요 잔기	: 48(<u>IV</u>); 51(<u>AT</u>); 52(<u>ST</u>); 64(<u>G</u>)
L3 (9 아미노산)	= 클래스 1
주요 잔기	: 90(<u>QNH</u>); 95 (<u>P</u>)

Martin Canonical 클래스

L1 (10 아미노산)	=정의되지 않은 클래스 (클래스 1/10A*와 가장 유사하더라도)
주요 잔기	: 2(<u>I</u>); 4(<u>L</u>); 23(<u>C</u>); 25(<u>A</u>); 30(<u>V</u>); 33(<u>LM</u>); 35(<u>W</u>); 71(<u>Y</u>); 88(<u>C</u>); 90(<u>Q</u>); 93(<u>SYR</u>)
L2 (7 아미노산)	= 클래스 1/7A
주요 잔기	: 23(<u>C</u>)
L3 (9 아미노산)	= 정의되지 않은 클래스 (클래스 1/9A와 가장 유사하더라도)
주요 잔기	: 2(<u>ILV</u>); 3(<u>VQLE</u>); 4(<u>ML</u>); 28(<u>SNDTE</u>) ✱; 30(<u>DLYVISNPFHGT</u>); 31(<u>SNTKG</u>); 32(<u>FYNAHSR</u>); 33(<u>MLVIF</u>); 88(<u>C</u>); 89(<u>QSGFL</u>); 90(<u>QNH</u>); 91(<u>NFGSRDHTYV</u>); 92(<u>NYWTSRQHAD</u>); 93(<u>ENGHTSRAQHAD</u>); 94(<u>DYTVLHNIWPS</u>) ✧; 95(<u>P</u>); 96(<u>PLYRIWF</u>); 97(<u>T</u>); 98(<u>F</u>)

* 이 클래스는 단지 **Kabat** 생쥐 카파 서브그룹 VI에서 보여진다.

✱ L1 루프는 단지 10 아미노산 길이이므로, **BAT-1 VK** 영역의 이 위치에 잔기는 없다.

✧ 아미노산 **Phe(F)**은 **BAT-1 VK** 영역에 이 위치에서 발견된다.

도면3

```

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAAGCACAG
1  - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 60
TACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCATAGGTTCTGTGTC
M A W V W T L L F L M A A A Q S I Q A Q

ATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC
61  - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 120
TAGGTCAACCACGTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTCAAGTTCTAGAGG
I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

TGCAAGGCTTCTGGATATACTTTACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCA
121 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 180
ACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTTTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGT
C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P

GGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCGACAGTGGAGAGTCAACATATGCT
181 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 240
CCTTTCCCAAATTTACCTACCCGACCTATTTGTGGCTGTACCTCTCAGTTGTATACGA
G K G L K W M G W I N T D S G E S T Y A

GAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAACCTCTGCCAACACTGCCTATTTG
241 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 300
CTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTTGTGACGGATAAAC
E E F K G R F A F S L E T S A N T A Y L

CAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGTGAGAGTCGGCTAC
301 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 360
GTCTAGTTGTTGGAGTTGTTACTCCTGTGCCGATGTATAAAGACACACTCTCAGCCGATG
Q I N N L N N E D T A T Y F C V R V G Y

GATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
361 - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - 408
CTACGAAACCTGATGACCCAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGT
D A L D Y W G Q G T S V T V S S

```

도면4

Chothia Canonical 클래스

H1 (10 아미노산 *) = 클래스 1
 주요 잔기 : 24(TAVGS); 26(G);
 27(FYTG); 29(FLIV);
 34(MIVLT); 94(RTKHGL)

H2 (17 아미노산) = 클래스 2
 주요 잔기 : 52a(PTA); 55(GS); 71(ALT)

Martin Canonical 클래스

H1 (10 아미노산 *) = 클래스 1/10A
 주요 잔기 : 2(VIG); 4(LV); 20(LIMV);
 22(C); 24(TAVGS); 26(G);
 29(IFS); 32(HYFTNCED);
 33(YAWGTLV); 34(IVMW);
 35(HENQSYT); 36(W);
 48(IMLV); 51(LIVTSN);
 69(ILFMV); 78(ALVYF);
 80(LM); 90(YF); 92(C);
 94(RKGSN); 102(YHVSDG)

H2 (10 아미노산 ✕) = 정의되지 않은 클래스 (클래스 2/10A와 가장 유사하더라도)

주요 잔기 : 33(YWGATL); 47(WY);
 50(REWYGQVLNKA); 51(LI);
 52(DLNSY); 53(AGYSKTN)✕;
 54(NSTKDG); 56(YREDGVSA);
 58(KNTSDRGFY); 59(Y);
 69(IFLM); 71(VAL); 78(ALV)

* H1 루프는 실질적으로 CDR1의 5 아미노산 및 FR1의 N-말단 끝의 5 아미노산으로 구성된다.

✕ AbM은 단지 10 아미노산 길이로서 H2 루프를 정의한다.
 즉, CDR2에 대한 Kabat 정의 보다 7 아미노산이 짧다.

✕ 아미노산 Asp(D)는 BAT VH 영역에 이 위치에서 발견된다.

CDRs		Kabat 수	=====L1====							==L2==			===L3===			
			1	2	3	4	5	6	7							
생체	BATV _k		123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890													
인간	TEL9V _k		QIVLTQSPAIMSASPGKVTITCSARSSVSYMHWFOQKPGTSPKLIYRTSNLASGVPARFSGSGGTSY													
가변	SEQ ID NO.		E.....SSL...V.DR.....R.SQSISN.I.N.Y.....KA...L..AA.T.Q.....S.....D													
BATR _{kA}	15		EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARS-SVSYMHWYQQKPKAPKLLIYRTSNLASGVPSRFSGSGGTD													
BATR _{kB}	16		EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARS-SVSYMHWFOQKPKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGGTD													
BATR _{kC}	17		EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARS-SVSYMHWFOQKPKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGGTD													
BATR _{kD}	18		EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARS-SVSYMHWFOQKPKAPKLIYRTSNLASGVPSRFSGSGGTS													
CDRs		Kabat 수	=====L1====							==L2==			===L3===			
			8	9	10											
생체	BATV _k		12345678901234567890123456789012345678901234567													
인간	TEL9V _k		CLTISRMEAEADATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK													
가변	SEQ ID NO.		FT...NSLQP..F.....TN.....G.....													
BATR _{kA}	15		FTLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK													
BATR _{kB}	16		YTLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK													
BATR _{kC}	17		YCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK													
BATR _{kD}	18		YCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIK													

CDRs Kabat 수											-----H1=											=====H2=====											=====H3=====																			
		1	2	3	4	5	6	7																																												
생쥐	BATV _H	1234567890123																																																		

도면7

[illegible]

도면8

```

1  AAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTC 60
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGAACGGCGGTGGTACCTGTACTCCAGGGGCGAGTCGAGGACCCGAGGACGACGAG
       M D M R V P A Q L L G L L L L

61  TGGCTCCCAGGTGCCAAATGTGAATTTGTGTTGACGCACTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA 120
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   ACCGAGGGTCCACGGTTTACACTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTAGGAGGGACAGACGT
       W L P G A K C E I V L T Q S P S S L S A

121 TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCACTGCCAGGTCAAGTGTAAAGTTACATGCAC 180
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   AGACATCCTCTGTCTCAGTGGTAGTGAACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAATGTACGTG
       S V G D R V T I T C S A R S S V S Y M H

181 TGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCTGGATCTATAGGACATCCAACCTG 240
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   ACCAAGGTCGTCTTGGTCCCTTTCGGGGATTGAGACCTAGATATCCTGTAGGTTGGAC
       W F Q Q K P G K A P K L W I Y R T S N L

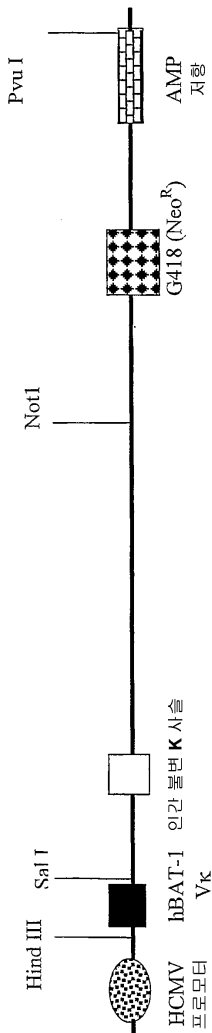
241 GCTTCTGGGGTCCCATCTAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACC 300
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   CGAAGACCCAGGGTAGATCTAAGTCGCCGTCACCTAGACCCCTGTCTAATGTGAGAGTGG
       A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T

301 ATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGCCAGCAAGGAGTAGTTTC 360
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   TAGTTGTCGGACGTCGGACTTCTAAAACGTTGAATGATAACGGTCGTTTCCTCATCAAAG
       I N S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R S S F

361 CCACTCACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTGGATCC 412
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   GGTGAGTGCAAGCCGCCTCCCTGGTTCGACCTCTAGTTTGCACTCACCTAGG
       P L T F G G G T K L E I K

```


도면11



도면12

삭제

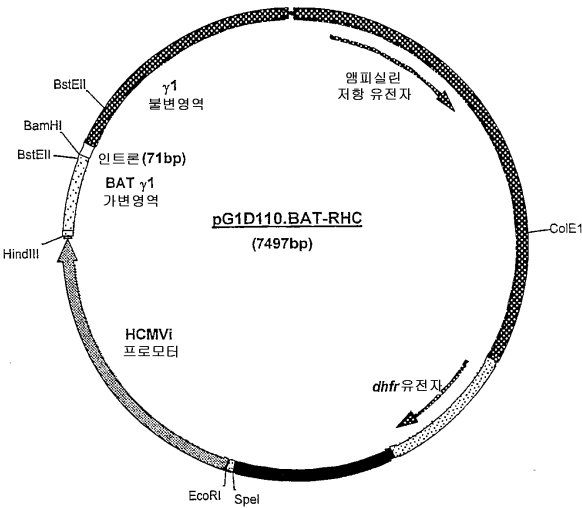
도면13

삭제

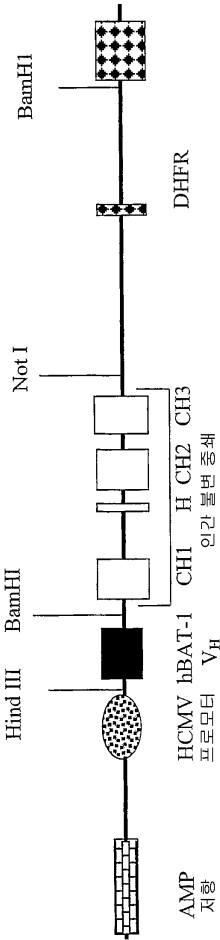
도면14

삭제

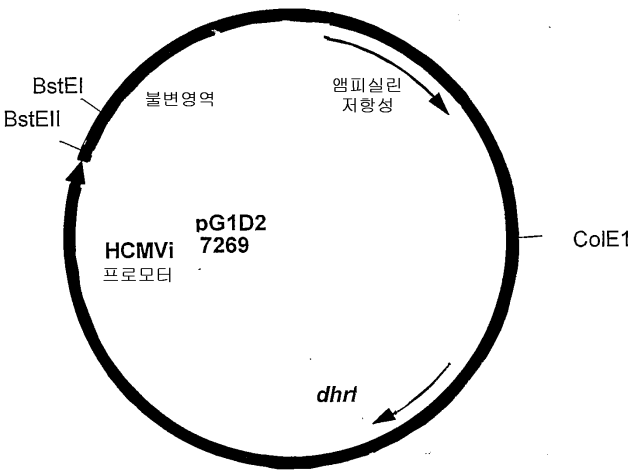
도면15



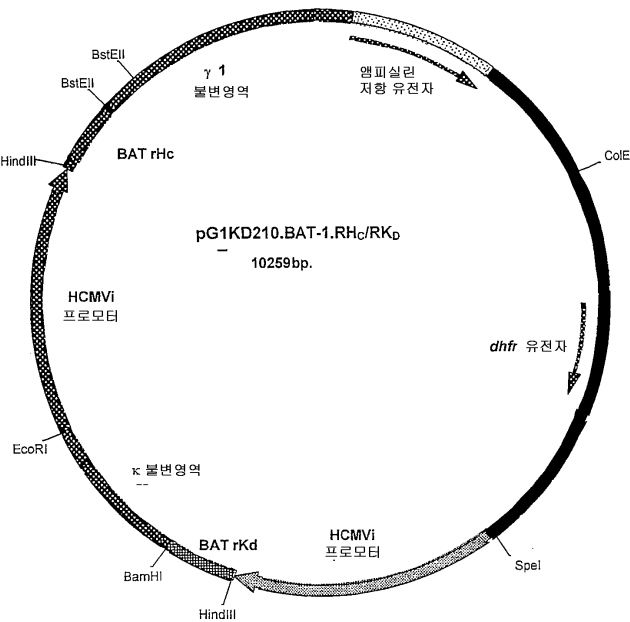
도면16



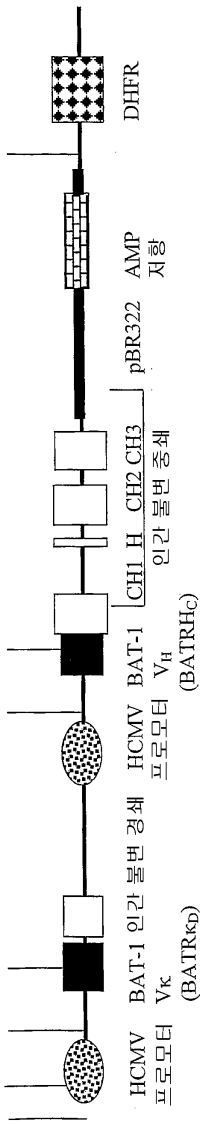
도면17



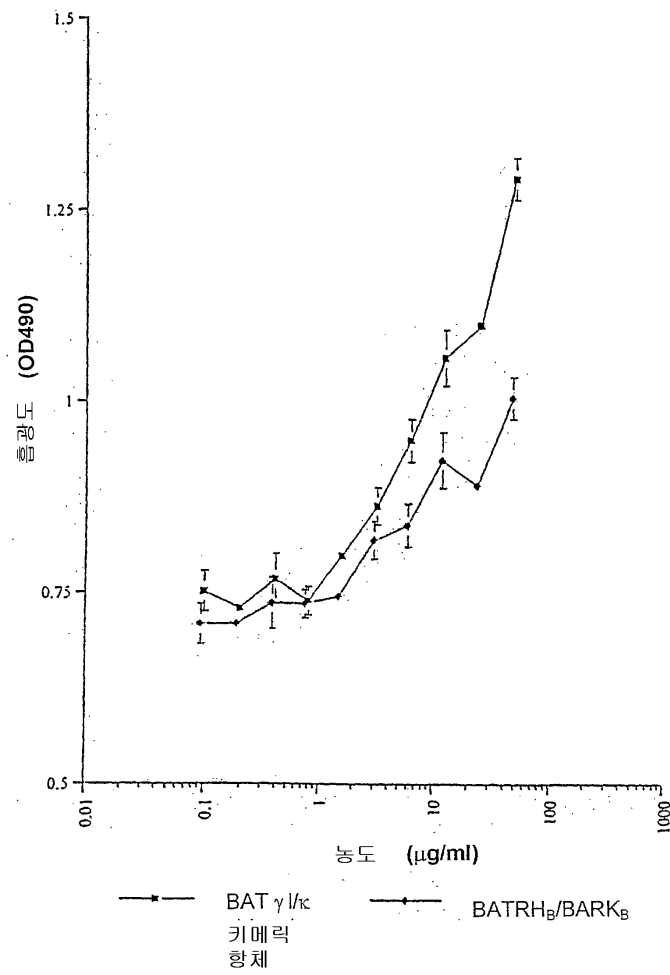
도면18



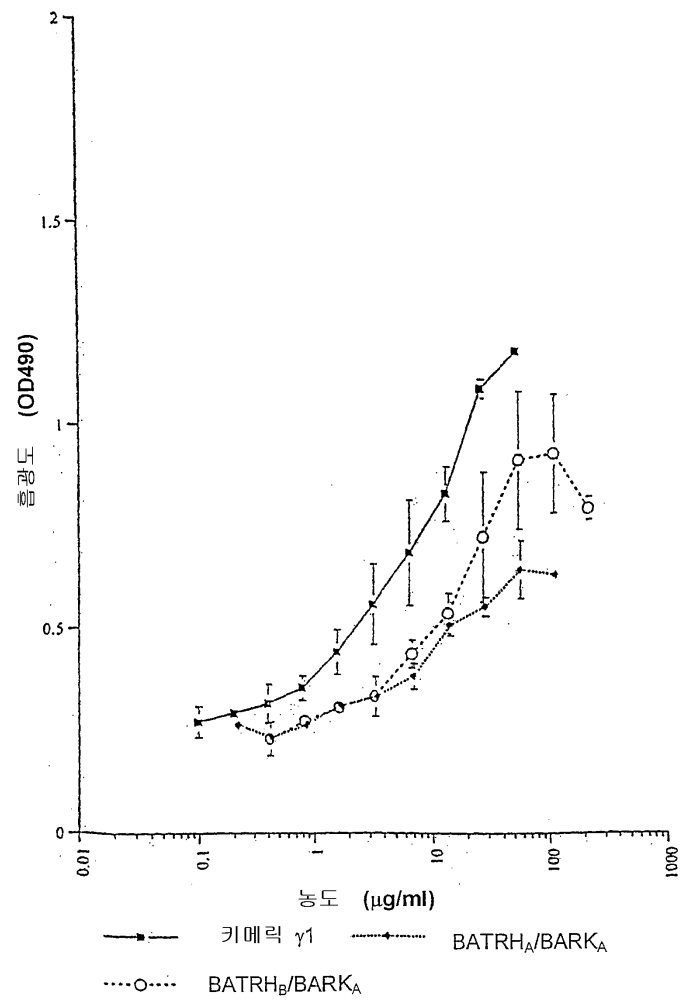
도면19



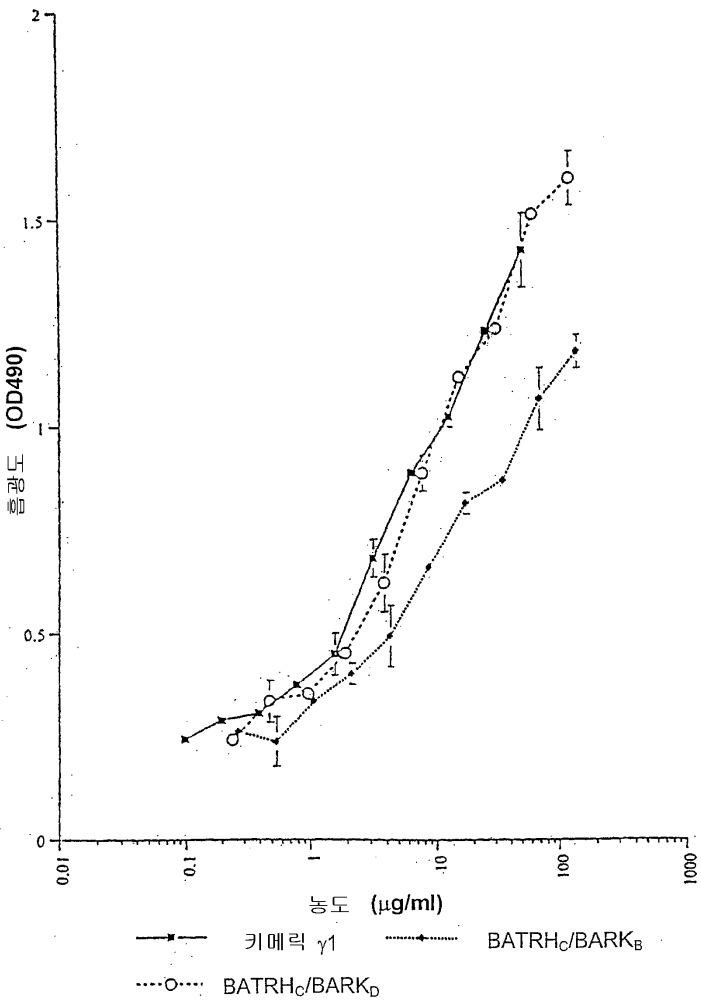
도면20



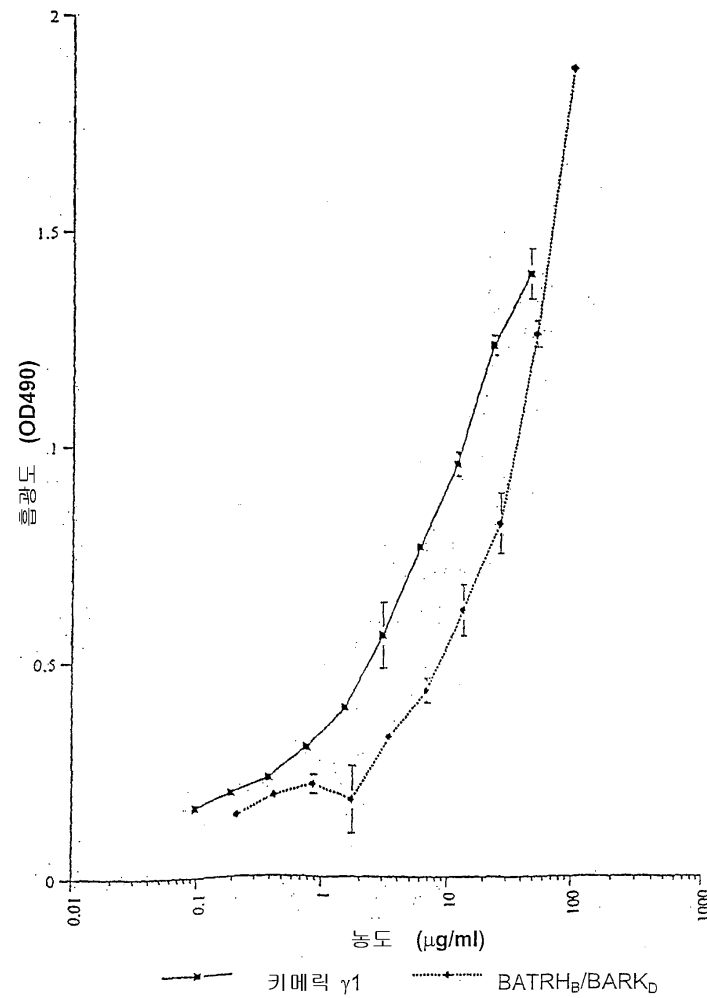
도면21



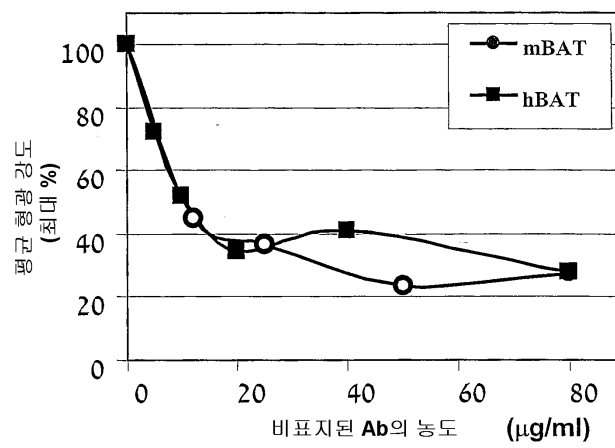
도면22



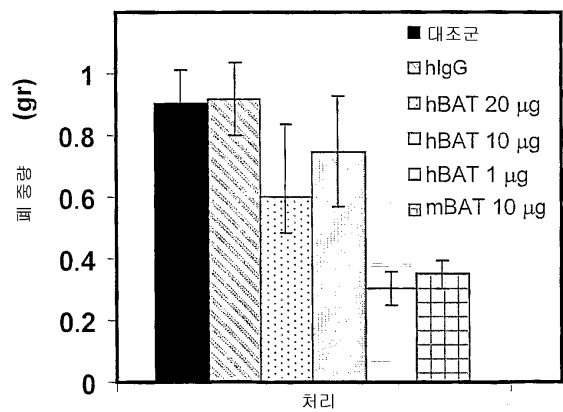
도면23



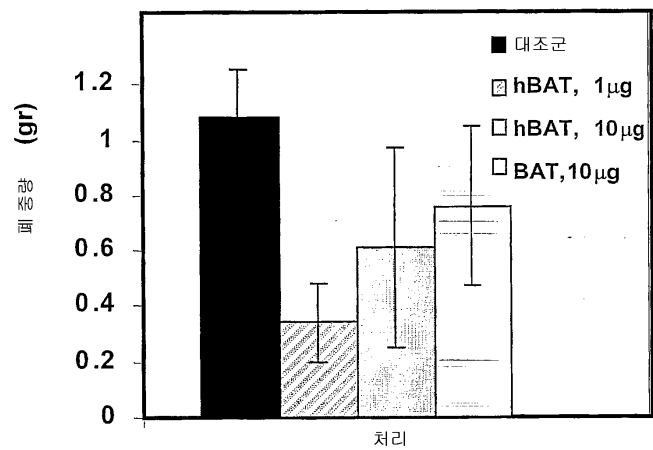
도면24



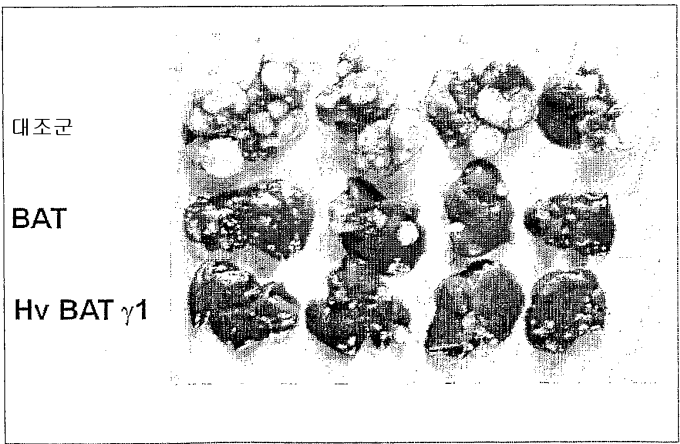
도면25



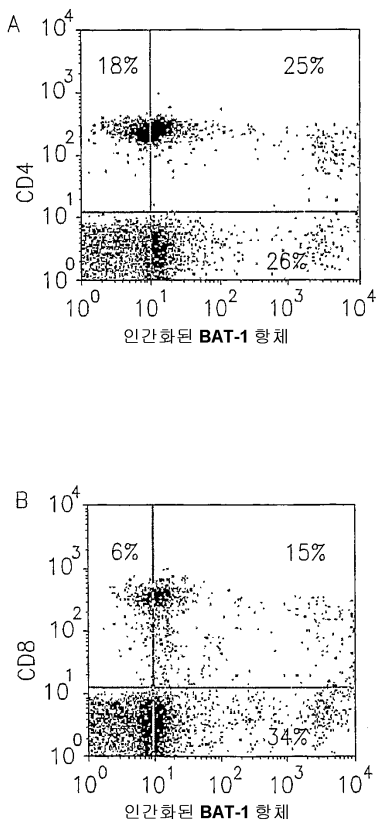
도면26



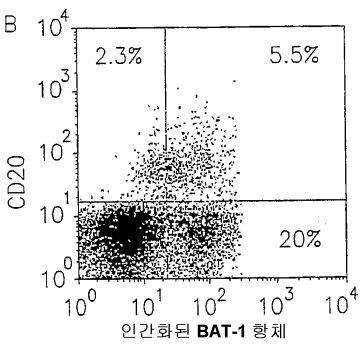
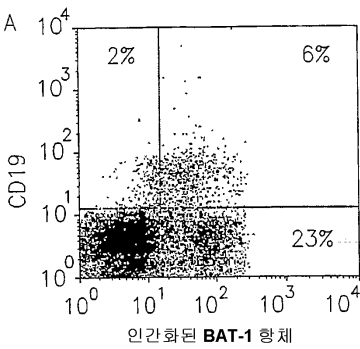
도면27



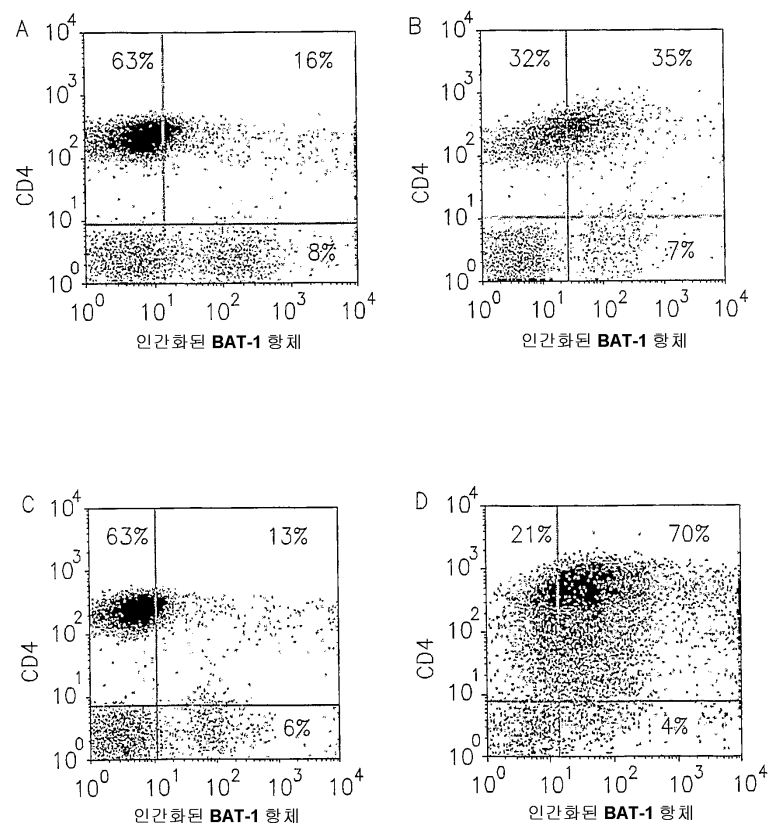
도면28



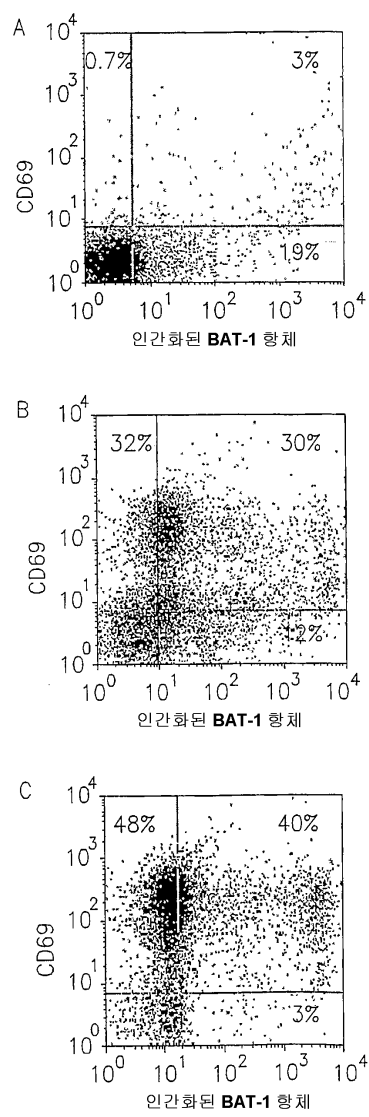
도면29



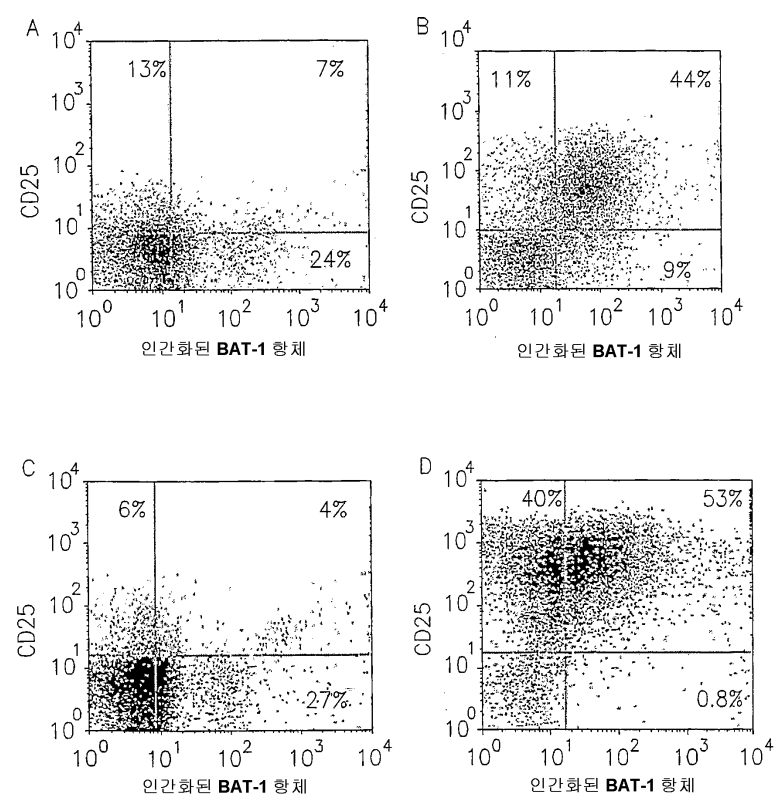
도면30



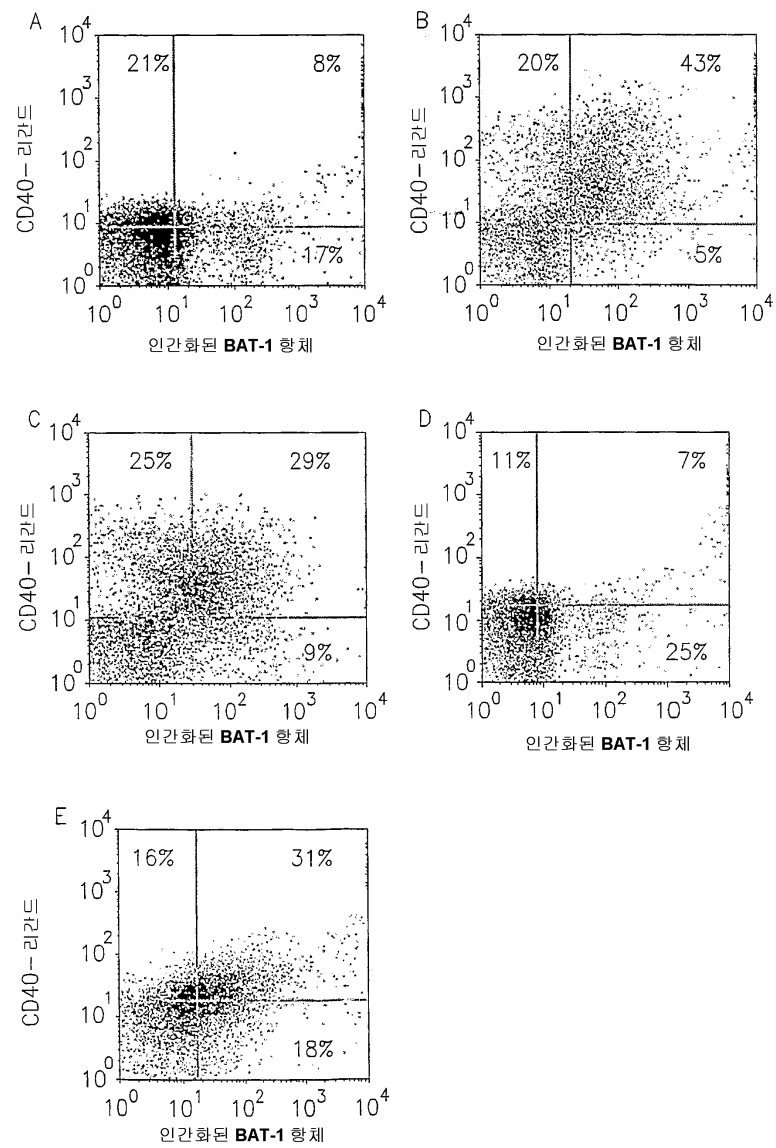
도면31



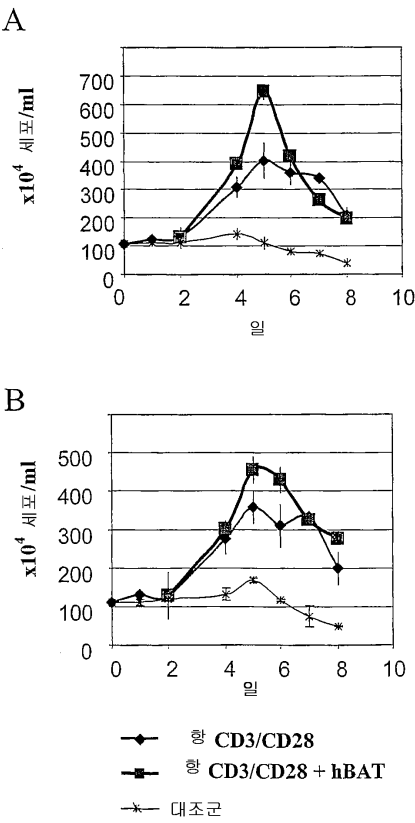
도면32



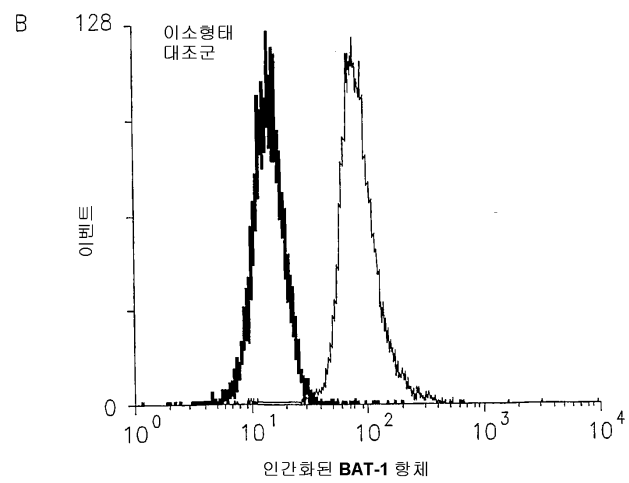
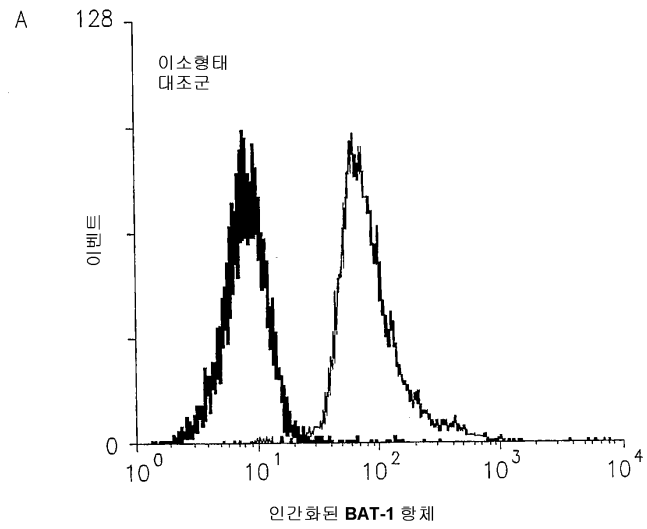
도면33



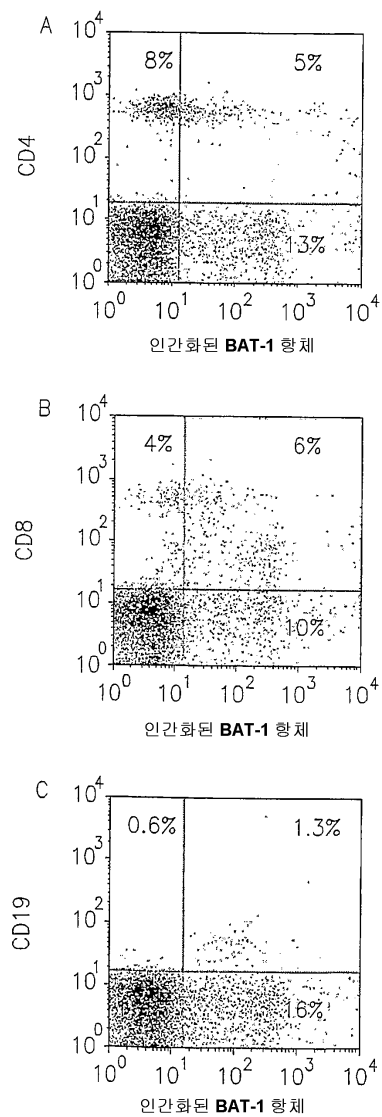
도면34



도면35



도면36



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CURETECH LTD.

MOR - RESEARCH APPLICATIONS LTD.

<120> HUMANIZED IMMUNOMODULATORY MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF NEOPLASTIC DISEASE OR IMMUNODEFICIENCY

<130> CT/004 PCT

<150> IL 149820

<151> 2002-05-23

<160> 93

<170> Patent In version 3.1

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 1

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
			20			

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = Phe or Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa = Trp or Leu

<400> 2

Trp	Xaa	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Xaa	Ile	Tyr
1			5					10					15	

<210> 3

<211> 32

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = Asp or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa = Tyr or Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa = Cys or Thr

<400> 3

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Xaa
1			5				10						15		

Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
		20					25						30		

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 4

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1			5				10		

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ile or Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa = Thr or ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa = Thr or Ser

<400> 5

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Phe Xaa
 20 25 30

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Arg or Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Gln or Lys

<400> 6

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Xaa Trp Met Gly

1 5 10

<210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Val or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa = Asn or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = Thr or Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = Val or Ala

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Arg or Lys

<400> 7

Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Xaa Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Ile Thr Ser Leu Xaa Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 8

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 9

Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 10

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 12

Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 13

Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 14

Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 15
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 15

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

50

55

60

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

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

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

<210> 17
<211> 106
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 17

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 19

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

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Ser Phe Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 20

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

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 21

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50

55

60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 117
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 22

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys

85

90

95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 23

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> synthetic peptide

<400> 24

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Asn Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 25
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 25
atggatttac aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60

agaggacaaa ttgttctcac ccagttctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcaccataa cctgcagttgc caggtaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaag 180

ccaggcactt ctcccaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc tggagtcctt 240

gctcgtttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag ccgaatggag 300

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttccact cacgttcggc 360

tcggggacaa agttggaaat aaaa 384

<210> 26
<211> 136
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 26

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Asn Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 27
<211> 408
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 27
atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60

atccagttgg tgcagtctgg acctgagttg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120

tgcaaggctt ctggatatac ttccacaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180

ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccgaca gtggagagtc aacatatgct 240

gaagagttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccaacac tgcctatttg 300

cagatcaaca acctcaacaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgtgag agtcggctac 360

gatgctttgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 408

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> synthetic peptide

<400> 28

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> synthetic peptide

<400> 29

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Ser His
20 25 30

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

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Ser Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Ser His Ser Ser Ala Leu Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 43
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 30
cccaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gtccccgctc agc 43

<210> 31
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 31
tcctggggct cctgctgctc tggctcccag gtgccaaatg 40

<210> 32
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 32

tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatctc cctgtctgca 40

<210> 33
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 33
 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt 40

<210> 34
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 34
 caagtgtgag ttacatgcac tggatcagc agaaaccagg 40

<210> 35
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 35
 gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg 40

<210> 36
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 36
 gcttctgggg tccatctag attcagcggc agtggatctg 40

<210> 37
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 37

ggacagattt cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40

<210> 38
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 38
 agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 40

<210> 39
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 39
 ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat ccgcg 55

<210> 40
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 40
 gagcagcagg agccccagga gctgagcggg gaccctcatg 40

<210> 41
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 41
 actgcgtcaa cacaatttca catttggcac ctgggagcca 40

<210> 42
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 42

gtgactctgt ctccacaga tgcagacagg gaggatggag 40

<210> 43
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 43
 gtgcatgtaa cttacacttg acctggcact gcaagtgatg 40

<210> 44
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 44
 tcaggagctt aggggcttct cctggtttct gctgatacca 40

<210> 45
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 45
 ctagatggga cccagaagc caggttgat gtcctataga 40

<210> 46
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 46
 ggtgagagtg aaatctgtcc cagatccact gccgctgaat 40

<210> 47
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 47

aatagtaagt tgcaaaatct tcaggctgca ggctgttgat 40

<210> 48
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 48
 cctccgccga acgtgagtgg gaaactactc ctttgctggc 40

<210> 49
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 49
 cgcggatcca ctcacgtttg atctccagct tggtc 35

<210> 50
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 50
 caagtgtgtaag ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg 40

<210> 51
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 51
 gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 40

<210> 52
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 52

ggacagatta cactctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40

<210> 53
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 53
 tccagagctt aggggctttc cctggtttct gctggaacca 40

<210> 54
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 54
 ggtgagagtg taatctgtcc cagatccact gccgctgaac 40

<210> 55
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 55
 ggtgagacag taagatgtcc cagatccact gccgctgaac 40

<210> 56
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 56
 ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga 40

<210> 57
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 57

cccaagcttg ccgccacat ggactggacc tggaggatcc 40

<210> 58
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 58
 tcttcttggt ggcagcagca acaggtgccc act 33

<210> 59
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 59
 cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa 40

<210> 60
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 60
 gcctggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga 40

<210> 61
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 61
 tatagcttca gtaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg 40

<210> 62
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 62

cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac 40

<210> 63
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 63
 cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga gttcaaggga 40

<210> 64
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 64
 cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc agcacggcat 40

<210> 65
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 65
 atctgcagat caccagcctc acggctgagg acactggcat 40

<210> 66
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 66
 gtatttctgt gcgaaagtcg gctacgatgc tttgg 35

<210> 67
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 67

actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcttcagg tgagtggatc cgcg 54

<210> 68
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 68
 tgctgccacc aagaagagga tccttcagg tggagtccat ggtgg 45

<210> 69
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 69
 ttgcaccagc tgcacctggg agtgggcacc tgttgc 36

<210> 70
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 70
 tcttactga ggccccaggc ttcttaagct cagaccaga 40

<210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 71
 ccatagttac tgaagctata tccagaagct tgcaggaga 39

<210> 72
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 72

ctgaagccct tgtccagggg cctgtcgac ccagttcatt 40

<210> 73
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 73
 atgttgactc tccactgtcg gtgtttatcc atcccatcca 40

<210> 74
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 74
 tccaaggaga agacaaaccg tcccttgaac tcttcagcat 40

<210> 75
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 75
 gaggtggtg atctgcagat atgccgtgct gacagagggtg 40

<210> 76
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 76
 cgactttcgc acagaaatac atgccagtgt cctcagccgt 40

<210> 77
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 77

tccctggcc ccagtagtcc aaagcatcgt agc 33

<210> 78
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 78
 cgcggatcca ctcacctgag gagacggtga ccaggg 36

<210> 79
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 79
 tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg 40

<210> 80
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 80
 ccatagtttg tgaaagtata tccagaagcc ttgcaggaga 40

<210> 81
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 81
 cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc aacacggcat 40

<210> 82
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 82

gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc tttag 35

<210> 83
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 83
cgactctcac acagaaatac atgccagtg cctcagccgt 40

<210> 84
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 84
atctgcagat caccagcctc aacgctgagg acactggcat 40

<210> 85
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 85
gaggctgggtg atctgcagat atgccgtgtt gacagagggtg 40

<210> 86
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 86
tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgaagcagg 40

<210> 87
<211> 412
<212> DNA
<213> synthetic polynucleotide

<400> 87

aagcttgccg ccacatgga catgagggtc cccgctcagc tctggggct cctgctgctc 60

tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca 120

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgaa ttacatgcac 180

tggtatcagc agaaaccagg gaaagcccct aagctcctga tctataggac atccaacctg 240

gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 360

ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc 412

<210> 88
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 88

aagcttgccg ccacatgga catgagggtc cccgctcagc tctggggct cctgctgctc 60

tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca 120

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgaa ttacatgcac 180

tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 240

gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacagatta cactctcacc 300

atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 360

ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc 412

<210> 89
 <211> 412
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 89

aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc tctggggct cctgctgctc 60

tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt ctccatcctc cctgtctgca 120

tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt caagtgtgaa ttacatgcac 180

tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga tctataggac atccaacctg 240

gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg ggacatctta ctgtctcacc 300

atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt gccagcaaag gagtagtttc 360

ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac gtgagtggat cc 412

<210> 90
 <211> 436
 <212> DNA
 <213> synthetic polynucleotide

<400> 90

aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttgggtggc agcagcaaca 60

ggtgcccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc 120

tcagtgaaga tctcctgcaa ggctttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg 180

gtgcgacagg cccttggaac agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga 240

gagtcaacat atgtcgaaga gttcaaggga cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc 300

aacacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aacttgcat gtatttctgt 360

gtgagagtcg gctacgatgc ttggactac tggggccagg gaacctggt caccgtctcc 420

tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 91
 <211> 436
 <212> DNA

<213> synthetic polynucleotide

<400> 91

aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttggtggc agcagcaaca	60
ggtgcccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc	120
tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg	180
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga	240
gagtcaacat atgctgaaga gtccaaggga cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc	300
agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt	360
gcgaaagtcg gctacgatgc ttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420
tcaggtgagt ggatcc	436

<210> 92

<211> 436

<212> DNA

<213> synthetic polynucleotide

<400> 92

aagcttgccg ccaccatgga ctggacctgg aggatcctct tcttggtggc agcagcaaca	60
ggtgcccact cccaggtgca gctggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc	120
tcagtgaaga tctcctgcaa ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg	180
gtgcgacagg cccctggaca agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga	240
gagtcaacat atgctgaaga gtccaaggga cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc	300
agcacggcat atctgcagat caccagcctc acggctgagg aactggcat gtatttctgt	360
gcgaaagtcg gctacgatgc ttggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420

tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 93
<211> 10259
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pG1KD210.BAT-1.RHC/RkD single expression vector

<400> 93
ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 60

ggttttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 120

atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 180

tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 240

cttttttgcg gcattttgcc ttccgtgttt tgcacacca gaaacgtgg tgaaagtaaa 300

agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 360

taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgtttttcca atgatgagca cttttaaaagt 420

tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggtg tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 480

catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 540

ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc 600

ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa 660

catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 720

aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 780

aactggcgaa ctacttactic tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 840

taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttcgggt ggctggttta ttgctgataa 900

atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 960

gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 1020

tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 1080

ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 1140

gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttcactg 1200

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gacccctttt ttctgcgcgt 1260

aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 1320

agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 1380

tgctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 1440

atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 1500

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 1560

gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatactaca 1620

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 1680

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 1740

tctttatagt cctgtcgggt ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 1800

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 1860

cttttctgg ccttttgctc acatgttctt tctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 1920

ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgtcgcgcgc agccgaacga ccgagcgag 1980

cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct 2040

gtgcgtatt tcacaccga tatgtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgata 2100

gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 2160

ccgccaacac ccgtcgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 2220

caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcacctgc atcacgaaa 2280

cgcgcgaggc agcatgcatc tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc 2340

catccgccc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt 2400

ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg 2460

aggctttttt ggaggcctag gcttttgcga aaagctagct tacagctcag ggctgcgatt 2520

tcgcgcaaaa cttgacggca atcctagcgt gaaggctggg aggattttat ccccgctgcc 2580

atcatggttc gaccattgaa ctgcatctc gccgtgtccc aaaatatggg gattggcaag 2640

aacggagacc taccctggcc tccgtcagg aacgagtca agtacttcca aagaatgacc 2700

acaacctctt cagtgggaagg taaacagaat ctggtgatta tgggtaggaa aacctggttc 2760

tccattcctg agaagaatcg acctttaag gacagaatta atatagttct cagtagagaa 2820

ctcaaagaac caccacgagg agctcatttt ctgccaaaa gtttggatga tgccttaaga 2880

cttattgaac aaccggaatt ggcaagtaa gtagacatgg tttggatagt cggaggcagt 2940

tctgtttacc aggaagccat gaatcaacca ggccacctca gactctttgt gacaaggatc 3000

atgcaggaat ttgaaagtga cacgtttttc ccagaaattg atttggggaa atataaactt 3060

ctcccagaat acccaggcgt cctctctgag gtccaggagg aaaaaggcat caagtataag 3120

tttgaagtct acgagaagaa agactaacag gaagatgctt tcaagtcttc tgctccctc 3180

ctaaagctat gcatttttat aagaccatgg gacttttgct ggcttttagat ctttgtgaag 3240

gaaccttact tctgtgggtg gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct 3300

aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt 3360

gtattttaga ttccaaccta tggaactgat gaatgggagc agtgggtggaa tgcctttaat 3420

gaggaaaacc tgttttgctc agaagaaatg ccatctagtg atgatgaggc tactgctgac 3480

tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct 3540

tcagaattgc taagtttttt gagtcatgct gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt 3600

gctattttaca ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat 3660

tctgtaacct ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactgtt ttttcttact 3720

ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc 3780

tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat 3840

cataatcagc cataccacat ttgtagaggt ttacttgcct ttaaaaaacc tcccacacct 3900

ccccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt ttattgcagc 3960

ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaaag catttttttc 4020

actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctactagtg 4080

gccggccccg gcgatcgctc gagatatcta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt 4140

tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcttggtg 4200

accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc 4260

aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg ccacttggc 4320

agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg 4380

gccccctgg cattatgcc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat 4440

ctacgtatta gtcatcgcta ttacatgggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg 4500

tggatagcgg ttigactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag 4560

tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact cgcgccatt 4620

gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt 4680

gaaccgtcag atgccttga gacgcatcc acgtgtttt gacctccata gaagacaccg 4740

ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgccaa 4800

gagtgcgta agtaccgct atagagtcta taggcccacc ccttggctt cttatgcatg 4860

ctatactgtt ttggcttgg ggtctataca ccccccttc ctcatgttat aggtgatggt 4920

atagcttagc ctatagggtg gggttattga ccattattga ccactccct attggtgacg 4980

atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctctt attggtata 5040

tgccaatata ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct 5100

catttattat ttacaaatc acatatacaa caccaccgtc cccagtgcc gcagtttta 5160

ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggtacg tgttccggac atgggtctt 5220

ctccgtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgtcc catgcctcca gcgactcatg 5280

gtcgtcggc agtccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc 5340

caccaccacc agtgtccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct 5400

cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga 5460

tgcaggcagc tgagttgtg tgttctgata agagtcagag gtaactccg ttgcggtgct 5520

gttaacggtg gagggcagtg tagtctgac agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag 5580

acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcacccg 5640

tccttgacac gcgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga catgagggtc cccgctcagc 5700

tcctggggct ccigtctctc tggctcccag gtgccaaatg tgaaattgtg ttgacgcagt 5760

ctccatcctc ccgtctcgca tctgtaggag acagagtcac catcacttgc agtgccaggt 5820

caagtgtgag ttacatgcac tggttccagc agaaaccagg gaaagcccct aagctctgga 5880

tctataggac atccaacctg gcttctgggg tcccatctag attcagcggc agtggatctg 5940

ggacatctta ctgtctcacc atcaacagcc tgcagcctga agattttgca acttactatt 6000

gccagcaaag gagtagtttc ccactcacgt tcggcggagg gaccaagctg gagatcaaac 6060

gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gttttctgtc tgtccctaac atgccctgtg 6120

attatgcgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaacacc atcctgtttg 6180

cttctttcct caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 6240

cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgt tgcctgtga ataacttcta tcccagagag 6300

gccaaagtac agtgggaagg ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc 6360

acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa 6420

gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 6480

cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgtagaggg agaagtgcgc ccacctgtc 6540

ctcagttcca gctgacccc ctccatcct ttggcctctg acccttttc cacaggggac 6600

ctacccctat tgcggtcctc cagctcatct ttacactcac cccctcctc ctcttggt 6660

ttaattatgc taatgttga ggagaatgaa taaataaagt gaatctttgc acctgtggtg 6720

gatctaataa aagatattta ttttcattag atatgtgtgt tggttttttg tgtgcagtgc 6780

ctctatctgg aggccaggta gggctggcct tgggggaggg ggaggccaga atgactcaa 6840

gagctacagg aaggcaggtc agagacccca ctggacaaac agtggctgga ctctgcacca 6900

taacacacaa tcaacagggg agtgagctgg aaatttgcta gcgaattcta ttaatagtaa 6960

tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 7020

glaaatggcc cgcttggctg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 7080

tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 7140

cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt 7200

gaggtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac 7260

tttccactt ggagctacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt 7320

tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatitcc aagtctccac 7380

cccatgacg tcaatgggag ttgtttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 7440

cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggcttat 7500

ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgcatcc acgtgtttt 7560

gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga 7620

acgcggattc cccgtgcca gagtgacgta agtaccgct atagagtcta taggcccacc 7680

cccttggctt cttatgcatg ctatactgtt ttggcttgg ggtctataca ccccgttc 7740

ctcatgttat aggtgatggt atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga 7800

ccactccct attggtgacg atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac 7860

aactctcttt attggtata tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt 7920

atttttacag gatggggtct catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc 7980
 cccagtgccc gcagttttta ttaaaccataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcggttacg 8040
 tgttcggac atgggctctt ctccggtagc ggcgagctt ctacatccga gccctgctcc 8100
 catgcctcca gcgactcatg gtcgctcggc agtccttgc tcctaacagt ggaggccaga 8160
 cttaggcaca gcacgatgcc caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg 8220
 tatgtgtctg aaaatgagct cggggagcgg gcttgaccg ctgacgcatt tggaagactt 8280
 aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag 8340
 gtaactccc ttgcggtgct gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt 8400
 gtgcccgcgc gcgccaccag acataatagc tgacagacta acagactgtt cttttccatg 8460
 ggtcttttct gcagtcaccg tccttgacac gcgtctcggg aagcttgccg ccaccatgga 8520
 ctggacctgg aggatcctct tcttggtggc agcagcaaca ggtgcccact cccaggtgca 8580
 gtgggtgcaa tctgggtctg agcttaagaa gcctggggcc tcagtgaaga tctcctgcaa 8640
 ggcttctgga tatactttca caaactatgg aatgaactgg gtgcgacagg cccctggaca 8700
 agggcttcag tggatgggat ggataaacac cgacagtgga gagtcaacat atgctgaaga 8760
 gttcaaggga cggtttgtct tctccttgga cacctctgtc aacacggcat atctgcagat 8820
 caccagcctc acggctgagg aacttgcat gtatttctgt gtgagagtcg gctacgatgc 8880
 ttggactac tggggccagg gaaccttggc caccgtctcg agcgctcca ccaagggcc 8940
 atcggtcttc cccctggcac cctctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg 9000
 ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgcct 9060

gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 9120

cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa 9180

tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 9240

tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt 9300

cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtgggt 9360

ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga 9420

ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgggtgggt 9480

cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 9540

ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc 9600

ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt 9660

cagcctgacc tgcttggtca aaggttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 9720

caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc 9780

cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 9840

ctcatgctcc gtgatgcatg aggccttgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct 9900

gtctccgggt aaatgagtcg gacggccggc aagccccgt ccccggtctc tcgcggtcgc 9960

acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac atacttccg ggcgcccagc atggaaataa 10020

agcaccggat ctaataaaag atatttattt tcattagata tgtgtgttgg ttttttgtgt 10080

gcagtgcctc tatctggagg ccaggtaggg ctggccttgg gggaggggga ggccagaatg 10140

actcaagag ctacaggaag gcaggtcaga gacccactg gacaaacagt ggctggactc 10200

tgcaccataa cacacaatca acaggggagt gagctggaaa tttgctagcg aattaattc 10259

