



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0007959
(43) 공개일자 2021년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7030319
(22) 출원일자(국제) 2019년04월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년10월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/026034
(87) 국제공개번호 WO 2019/204057
국제공개일자 2019년10월24일
(30) 우선권주장
62/654,068 2018년04월06일 미국(US)

(71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브록클린 애비뉴
450
(72) 발명자
프리맨, 고든, 제이.
미국 메사추세츠주 02445 브루클라인 월넛 스트리트
305
알루라난담, 안토니오, 알.
미국 메사추세츠주 01890 윈체스터 스카이라인 드
라이브 4
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

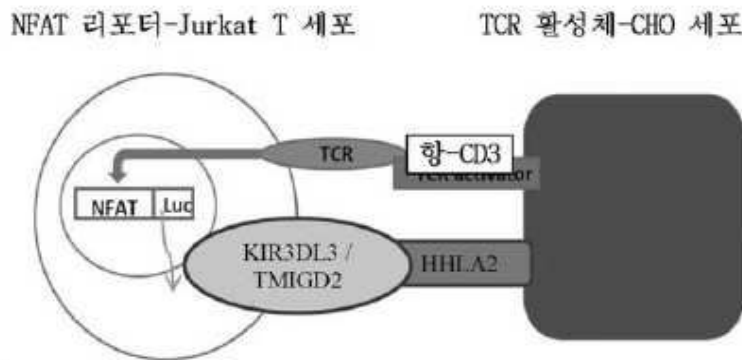
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 HHLA2 수용체로서의 KIR3DL3, 항-HHLA2 항체, 및 이들의 용도

(57) 요약

본 발명은 부분적으로 HHLA2에 특이적으로 결합하는 단일클론성 항체 및 이의 항원-결합 단편뿐만 아니라, 면역글로불린, 폴리펩타이드, 이의 핵산 및 진단, 예후 및 치료 목적을 위해 이러한 항체를 사용하는 방법의 발견을 기반으로 한다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

G01N 33/577 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 단일클론성 항체는,

- a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 중쇄 서열; 및/또는
- b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 단일클론성 항체는,

- a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 중쇄 CDR 서열; 및/또는
- b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 CDR 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 CDR 서열을 포함하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 단일클론성 항체는,

- a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 서열; 및/또는
- b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 단일클론성 항체는,

- a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR 서열; 및/또는
- b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 CDR 서열을 포함하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 키메라, 인간화, 합성, 쥐 또는 인간의 것인, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 검출할 수 있도록 표지된 것, 이펙터 도메인을 포함하는 것, Fc 도메인을 포함하는 것 및/또는 Fv, Fav, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ 및 다이아바디 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 수탁번호 _____

로 수탁된 하이브리도마 _____로부터 얻어질 수 있는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 a) TMIGD2에 대한 HHLA2의 결합, b) KIR3DL3에 대한 HHLA2의 결합 또는 c) TMIGD2에 대한 HHLA2의 결합 및 KIR3DL3에 대한 HHLA2의 결합을 저해하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 HHLA2에 특이적으로 결합하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

표 2에 나열된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된, 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄.

청구항 11

표 2에 나열된 폴리펩타이드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 상보체와, 또는 표 2에 나열된 폴리펩타이드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산에 대해 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 서열과, 엄격한 조건 하에서, 혼성화되는, 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제11항의 단리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 13

제11항의 단리된 핵산을 포함하거나, 제12항의 벡터를 포함하거나, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현하거나, 수탁 번호 _____로 수탁된, 숙주 세포.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 장치 또는 키트로서, 상기 장치 또는 키트는 선택적으로 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 검출하기 위한 표지, 또는 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 복합체를 포함하는, 장치 또는 키트.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법으로서, (i) 상기 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현에 적합한 조건 하에서 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법.

청구항 16

HHLA2 폴리펩타이드의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로서, 시료를 얻는 단계; 및 제1항 또는 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 시료에서 상기 폴리펩타이드를 검출하는 단계를 포함하는, HHLA2 폴리펩타이드의 존재 또는 수준을 검출하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 HHLA2 폴리펩타이드와 복합체를 형성하도록 하고 이 복합체를 효소결합면역흡착분석법(ELISA), 방사면역분석법(RIA), 면역화학법, 웨스턴 블롯 또는 세포 내 흐름 분석법의 형태에서 검출하는, HHLA2 폴리펩타이드의 존재 또는 수준을 검출하는 방법.

청구항 18

대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애의 진행을 모니터하는 방법으로서,

- a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 HHLA2의 수준을 제1 시점에 대상 시료에서 검출하는 단계;
- b) 이후의 시점에 a)단계를 반복하는 단계; 및
- c) 대상체의 장애의 진행을 모니터하기 위해 a)단계 및 b)단계에서 검출된 HHLA2의 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애의 진행을 모니터하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제1 시점 및 상기 이후의 시점 사이에 상기 대상체가 상기 장애를 개선하기 위한 치료를 받는, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애의 진행을 모니터하는 방법.

청구항 20

비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법으로서,

- a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 단계;
- b) 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 좋은 임상 결과를 갖는 대조군 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 단계; 및
- c) 상기 대상체의 시료 및 상기 대조군 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 비교하는 단계를 포함하되,

상기 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준이 상기 대조군 대상체의 시료 내 수준과 비교하여 유의적으로 더 높은 경우 상기 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는다고 나타내는, 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법.

청구항 21

대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애에 대한 치료의 효능을 평가하는 방법으로서,

- a) 대상체에 치료의 적어도 일부를 제공하기 전에 대상체로부터 수득한 제1시료 내 HHLA2의 수준을 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 결정하는 단계; 및
 - b) 상기 치료의 일부를 제공한 후 대상체로부터 수득한 제2시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 단계를 포함하되,
- 상기 제2시료 내 HHLA2의 수준이 상기 제1시료에 비교하여 유의적으로 더 낮은 경우 상기 치료가 대상체의 장애를 저해하는데 효과적이라고 나타내는, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애에 대한 치료의 효능을 평가하는 방법.

청구항 22

대상체의 비정상적인 HHLA2 발현에 연관된 장애를 저해하기 위한 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법으로서,

- a) 상기 대상체로부터 수득한 것이며 상기 시험 화합물에 노출된 제1시료 내 HHLA2의 수준을 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 결정하는 단계; 및
- b) 상기 대상체로부터 수득한 제2시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 단계를 포함하되,

상기 제2시료는 상기 시험 화합물에 노출되지 않은 것이고, HHLA2의 수준이 상기 제2시료에 비교하여 유의적으로 더 낮은 경우 상기 시험 화합물이 상기 대상체의 장애를 저해하는데 효과적이라고 나타내는, 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 제1시료 및 제2시료는 상기 대상체로부터 수득한 단일 시료의 일부 또는 상기 대상체로부터 수득한 혼합 시료의 일부인, 방법.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 암인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병, 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 신경교종, 교모세포종, 신경아세포종, 유방암, 췌장 관 암종, 흉선종, B-CLL, 백혈병, B 세포 림프종 및 HHLA2에 대한 수용체를 발현하는 면역 세포로 침윤된 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 26

제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시료는 상기 대상체로부터 수득한 세포, 혈청, 종양주변 조직 및/또는 종양내 조직을 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제20항에 있어서, 상기 유의적으로 더 높은 HHLA2의 수준은 상기 대조군 대상체의 시료 내 일반적인 HHLA2의 수준에 비교하여 상기 대상 시료 내 HHLA2의 수준 사이의 적어도 20%의 증가를 포함하는, 방법.

청구항 28

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유의적으로 더 낮은 HHLA2의 수준은 HHLA2의 수준의 적어도 20% 감소를 포함하는, 방법.

청구항 29

제18항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 인간인, 방법.

청구항 30

암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 세포독성 물질에 접합되는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포독성 물질은 화학치료제, 생물학적 제제, 독소 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 암 내 증식 세포의 수 및/또는 암의 종양 부피 또는 크기를 감소시키는, 방법.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 약학적으로 허용가능한 제형으로 투여하는, 방법.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에 암 치료를 위한 치료제 또는 요법을 처방하는 단계

를 더 포함하는, 방법.

청구항 36

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에 면역요법, 관문 차단제, 암 백신, 키메라 항원 수용체, 화학요법, 방사선, 표적 요법 및 수술로 이루어진 군으로부터 선택된 부가적인 요법을 처방하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 37

제30항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 암 세포 및/또는 종양 면역 침윤 세포가 HHLA2를 발현하는, 방법.

청구항 38

제30항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병, 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 신경교종, 교모세포종, 신경아세포종, 유방암, 췌장 관 암종, 흉선종, B-CLL, 백혈병, B 세포 림프종 및 HHLA2에 대한 수용체를 발현하는 면역 세포로 침윤된 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병(AML), 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암 및 자궁암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 40

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 암의 동물 모델인, 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 동물 모델은 마우스 모델이고, 선택적으로 상기 마우스 모델은 인간화 마우스 모델인, 방법.

청구항 42

제30항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 포유동물인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 포유동물은 인간화 마우스 또는 인간인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인, 방법.

청구항 45

HHLA2 및 이의 결합 저해제 수용체인 KIRDL3 사이의 상호작용을 저해하여 면역 반응을 조절하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 관문 차단 암 면역요법에 사용하기 위해 상기 HHLA2 및 KIRDL3 사이의 상호작용을 차단하는, 방법.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 항-HHLA2 항체를 사용하여 상기 HHLA2 및 KIRDL3 사이의 상호작용을 저해 또는 차단하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 항-HHLA2는 암 면역요법을 위한 T 세포 활성화의 관문 저해제인, 방법.

청구항 49

HHLA2 및 이의 결합 자극 수용체인 TMIGD2 사이의 상호작용을 차단 또는 유의적으로 저해하지 않고 HHLA2 및 이의 결합 저해제 수용체인 KIR3DL3 사이의 상호작용을 선택적으로 저해하여 면역 반응을 조절하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 권리의 진술

[0002] 본 발명은 미국국립보건원에서 지급한 허가 번호 P01 AI056299에 따른 정부의 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정한 권리를 갖는다.

배경 기술

[0003] CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD160, gp49B, PIR-B, KIR 패밀리 수용체, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3, GITR, 4-1BB, OX-40, BTLA, SIRP알파(CD47), CD48, 2B4(CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, 부티로필린(butyrophilin), 및 A2aR와 같은, 그리고 이 밖에 다른 많은 면역 관문이 수많은 입력 사이의 복합적 및 결합적 상호작용을 기반으로 면역 반응 진행을 음성적으로 조절한다. 면역 관문의 저해제는 일부 대상체에서 면역 반응을 조절할 수 있으나, 면역 관문의 발현 및 본래 결합 상대와의 상호작용은 대상체들 사이에 그리고 대상체의 조직들 내에서 다르다. 따라서, 간섭에 사용하기 위한 새로운 면역 관문을 밝히는 것이 당업계에서 매우 필요하다. HHLA2는 T-세포의 기능을 조절하는 새롭게 확인된 B7 패밀리 구성원이다. HHLA2는 TMIGD2에 대한 특이적 리간드로 확인되었고 HHLA2/TMIGD2 상호작용은 AKT-의존성 신호 전달 캐스케이드를 통해 인간 T-세포 성장 및 사이토카인 생산을 선택적으로 공동-자극한다(Zhu *et al.* (2013) *Nat. Comm.* 4:2043; Janakiram *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2359-2366). 공동저해 기능을 발휘하는 활성화 T 세포 상의 HHLA2에 대한 두 번째 비특성화 수용체가 몇몇 연구에서 제안되었다(Zhao *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:9879-9884; Xiao and Freeman *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203; Wang *et al.* (2014) *J. Immunol.* 192:126.11). HHLA2는 다양한 인간 암에서 발현되고, 이의 공동-저해 기능은 이 HHLA2를 암 면역요법의 후보물질로 만든다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은, 적어도 일부는, B7 유전자 패밀리 구성원인 HHLA2가 다양한 종양 및 항원 제시 세포에서 광범위하게 발현되고 T 세포에 대한 활성화 및 저해 리간드 모두로서 관계된다는 발견을 기반으로 한다. 미경험(naive) T 세포에서 발현되는 TMIGD2는 HHLA2에 대한 활성화 수용체이며, T 세포 항원 수용체(TCR) 결합 후 공동-자극 신호를 전달한다. TMIGD2는 반복된 TCR 자극 후 하향조절된다. HHLA2에 대한 추정상의 저해 수용체가 T 세포 활성화를 조절하기 위해 활성화 T 세포 상에서 상향조절되는 것이 가능하다. 본 발명은, 적어도 일부는, HHLA2가 T 및 NK 세포 상의 수용체인 KIR3DL3와 결합하고, HHLA2:KIR3DL3 상호작용의 결과 T 세포 활성화가 저해되는 발견을 기반으로 한다. HHLA2가 종양에서 고도로 발현되고 관문 리간드로 작용할 수 있다는 관찰을 기초로, 항-HHLA2 인간 단일클론성 항체(mAb)의 패닐이 후보 면역 관문 저해제로 도출되었다. 블로킹 및 비-블로킹 항-HHLA2 mAb는 TMIGD2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 백혈병 세포 또는 KIR3DL3 형질주입 300.19 마우스 전구-B 백혈병 세포에 결합하는 용해성 인간 HHLA2-mIgG2a를 평가하는 것을 통해 확인되었다. HHLA2가 TMIGD2 및 KIR3DL3에 결합하는 것을 차단하거나 KIR3DL3를 보다 선택적으로 차단하지만 TMIGD2에 대해서는 그렇지 않은 항-HHLA2 mAb는 T 세포 분석에서 관문 저해 항체가 되는 것으로 보였다.

[0005] 일 양상에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-대상체를 단편으로서, 여기서 단일클론성 항체는 a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 중쇄 서열; 및/또는 b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 경쇄 서열을 포함하는, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0006] 다른 양상에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서 단일클론성 항체는 a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 중쇄 CDR 서열; 및/또는 b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 CDR 서열에 적어도 약 95%의 동일성을 갖는

경쇄 CDR 서열을 포함하는, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

- [0007] 또 다른 양상에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서 단일클론성 항체는 a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 서열; 및/또는 b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 서열을 포함하는, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0008] 또 다른 양상에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 여기서 단일클론성 항체는 a) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 CDR 서열; 및/또는 b) 표 2에 나열된 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 CDR 서열을 포함하는, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0009] 또한 본 명세서에 기술된 본 발명의 임의의 양상에 적용할 수 있는 다수의 실시형태가 제공된다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, 키메라, 인간화, 합성, 쥐, 또는 인간의 것이다. 다른 실시형태에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, 검출할 수 있도록 표지된 것, 반응 도메인 (이펙터 도메인)을 포함하는 것, Fc 도메인을 포함하는 것, 및/또는 Fv, Fav, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, 및 다이아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 또 다른 실시형태에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, 수탁번호 _____로 수탁된 하이브리도마 _____로부터 얻을 수 있는 것이다. 또 다른 실시형태에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, a) TMIGD2에 대한 HHLA2의 결합, b) KIR3DL3에 대한 HHLA2의 결합, 또는 c) TMIGD2에 대한 HHLA2의 결합 및 KIR3DL3에 대한 HHLA2의 결합을 저해한다. T 세포 활성화 분석에서 HHLA2가 KIR3DL3에 결합하는 것을 차단하는 HHLA2 mAb는 관문 차단제가 되는 것으로 나타났다. 다른 실시형태에서, 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, HHLA2에 특이적으로 결합한다.
- [0010] 다른 양상에서, 표 2에 나열된 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄를 제공한다.
- [0011] 또 다른 양상에서, 표 2에 나열된 폴리펩타이드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 상보체와, 또는 표 2에 나열된 폴리펩타이드 서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산에 대해 적어도 약 95%의 상동성을 갖는 서열과, 엄격한 조건 하에서, 혼성화되는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0012] 또 다른 양상에서, 본 명세서에 기술된 단리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0013] 다른 양상에서, 본 명세서에 기술된 단리된 핵산을 포함하는, 본 명세서에 기술된 벡터를 포함하는, 본 명세서에 기술된 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 발현하는, 또는 수탁 번호 _____로 수탁된, 숙주 세포를 제공한다.
- [0014] 또 다른 양상에서, 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 장치 또는 키트로, 선택적으로 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 검출하기 위한 표지, 또는 상기 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 복합체를 포함하는, 장치 또는 키트를 제공한다.
- [0015] 또 다른 양상에서, 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 생산하는 방법으로서, (i) 상기 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이 발현되기에 적합한 조건 하에서 청구항 1 내지 9 중 어느 하나에 따른 적어도 하나의 단일클론성 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산으로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0016] 다른 양상에서, HHLA2 폴리펩타이드의 존재 또는 수준을 검출하는 방법으로, 시료를 수득하는 것 및 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 시료 내 상기 폴리펩타이드를 검출하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.
- [0017] 진술한 바와 같이, 특정 실시형태가 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 HHLA2 폴리펩타이드와 복합체를 형성하고 이 복합체는 효소결합면역흡착분석법(ELISA), 방사면역분석법(RIA), 면역화학법, 웨스턴블롯, 또는 세포 내 흐름 분석법의 형태로 검출된다.
- [0018] 다른 양상에서, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애의 진행을 모니터링하는 방법으로서, a) 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 HHLA2의 수준을 제1 시점에

대상 시료에서 검출하는 것; b) 이후의 시점에 a) 단계를 반복하는 것; 및 c) 대상체의 장애의 진행을 모니터하기 위해 a) 및 b) 단계에서 검출된 HHLA2의 수준을 비교하는 것을 포함하는, 방법을 제공한다.

[0019] 전술한 바와 같이, 특정 실시형태가 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 상기 제1 시점과 이후의 시점 사이에, 대상은 장애를 개선하기 위해 치료를 받는다.

[0020] 다른 양상에서, 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 방법으로서, a) 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 것; b) 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 좋은 임상 결과를 갖는 대조군 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 것; 및 c) 상기 대상체의 시료 및 상기 대조군 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준을 비교하는 것을 포함하고, 상기 대조군 대상체의 시료 내 수준과 비교하여 유의적으로 더 높은 상기 대상체의 시료 내 HHLA2의 수준은 상기 대상체가 불량한 임상 결과를 갖는다는 표시인, 방법을 제공한다.

[0021] 또 다른 양상에서, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현과 연관된 장애에 대한 치료의 효능을 평가하는 방법으로서, a) 대상체에 치료의 적어도 일부를 제공하기 전에 대상체로부터 수득한 제1시료 내 HHLA2의 수준을, 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 결정하는 것, 및 b) 치료의 일부를 제공한 후 대상체로부터 수득한 제2시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 것을 포함하고, 제1시료에 비교하여 유의적으로 더 낮은 제2시료 내 HHLA2의 수준은 치료가 대상체의 장애를 저해하기 위해 효과적이라는 표시인, 방법을 제공한다.

[0022] 또 다른 양상에서, 대상체의 비정상적인 HHLA2 발현에 연관된 장애를 저해하기 위한 시험 화합물의 효능을 평가하는 방법으로서, a) 대상체로부터 수득한 것이며 시험 화합물에 노출된 제1시료 내 HHLA2의 수준을, 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여 결정하는 것; 및 b) 대상체로부터 수득한 제2시료 내 HHLA2의 수준을 결정하는 것을 포함하고, 제2시료는 시험 화합물에 노출되지 않은 것이고, 제2시료에 비교하여 유의적으로 더 낮은 HHLA2의 수준은 시험 화합물이 대상체의 장애를 저해하기 위해 효과적이라는 표시인, 방법을 제공한다.

[0023] 전술한 바와 같이, 특정 실시형태가 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 상기 제1 및 제2시료는 대상체로부터 수득한 단일 시료의 일부 또는 대상체로부터 수득한 혼합 시료의 일부이다. 다른 실시형태에서, 장애는 암이다. 또 다른 실시형태에서, 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병, 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 신경교종, 교모세포종, 신경아세포종, 유방암, 췌장 관 암종, 흉선종, B-CLL, 백혈병, B 세포 림프종, 및 HHLA2에 대한 수용체를 발현하는 면역 세포로 침윤된 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 다른 실시형태에서, 시료는 대상체로부터 수득한 세포, 혈청, 종양 주변 조직, 및/또는 종양내 조직을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 유의적으로 더 높은 HHLA2의 수준은 대조군 대상체의 시료 내 HHLA2의 일반적인 수준에 비교하여 대상 시료 내 HHLA2의 수준 사이의 적어도 20%의 증가를 포함한다. 다른 실시형태에서, 유의적으로 더 낮은 HHLA2의 수준은 HHLA2의 수준의 적어도 20% 감소를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 대상은 인간이다.

[0024] 또 다른 양상에서, 본 명세서에 기술된, 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0025] 전술한 바와 같이, 특정 실시형태가 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 세포독성체에 접합된다 (conjugated). 다른 실시형태에서, 상기 세포독성체는 화학치료제, 생물학적 제제, 독소, 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 암 내 증식 세포의 수를 감소 및/또는 암의 종양 부피 또는 크기를 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 약학적으로 허용되는 제형으로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 또한 암을 치료하기 위해 치료제 또는 요법을 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법은 또한 면역요법, 관문 저해제, 암 백신, 키메라 항원 수용체, 화학요법, 방사선, 표적 요법, 및 수술로 이루어진 군으로부터 선택된 부가적인 요법을 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 대상체의 암 세포 및/또는 종양 면역 침윤 세포는 HHLA2를 발현한다. 또 다른 실시형태에서, 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병, 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 신경교종, 교모세포종, 신경아세포종, 유방암, 췌장 관 암종, 흉선종, B-CLL, 백혈병, B 세포 림프종, 및 HHLA2에 대한 수용체를 발현하는 면역 세포로 침윤된 암으로 이루어진 군으로

부터 선택된 것이다. 다른 실시형태에서, 암은 폐암, 신장암, 췌장암, 대장암, 급성 골수성 백혈병(AML), 두경부암, 간암, 난소암, 전립선암, 및 자궁암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 또 다른 실시형태에서, 대상은 암의 동물 모델이다. 또 다른 실시형태에서, 동물 모델은 마우스 모델이고, 선택적으로 마우스 모델은 인간화 마우스 모델이다. 다른 실시형태에서, 대상은 포유동물이다. 또 다른 실시형태에서, 포유동물은 인간화 마우스 또는 인간이다. 또 다른 실시형태에서, 포유동물은 인간이다.

[0026] 다른 양상에서, HHLA2 및 이의 결합 저해제 수용체인 KIRDL3 사이의 상호작용을 저해하여 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다.

[0027] 또 다른 양상에서, HHLA2 및 이의 결합 자극 수용체인 TMIGD2 사이의 상호작용을 차단하거나 유의적으로 저해하지 않으면서, HHLA2 및 이의 결합 저해제 수용체인 KIRDL3 사이의 상호작용을 선택적으로 저해하여 면역 반응을 조절하는 방법을 제공한다.

[0028] 전술한 바와 같이, 특정 실시형태가 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 적용될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 관문 저해제 암 면역요법을 사용하기 위해 HHLA2 및 KIRDL3 사이의 상호작용이 차단된다. 다른 실시형태에서, HHLA2 및 KIRDL3 사이의 상호작용은 항-HHLA2 항체를 사용하여 저해 또는 차단된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 항-HHLA2 항체는 암 면역요법을 위한 T 세포 활성화의 관문 저해제이다.

[0029] 막대 히스토그램, 곡선, 또는 범례와 연관된 다른 데이터를 나타내는 임의의 도면에서, 각 표시에 대해 왼쪽에서 오른쪽으로 표시된 상기 막대, 곡선, 또는 다른 데이터는 범례의 위에서 아래, 또는 왼쪽에서 오른쪽의 상자에 직접 대응된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a는 유세포 분석에 의한 HHLA2 형질주입된 300.19 마우스 전구-B 세포 백혈병 세포주 상의 항-HHLA2 mAb에 대한 결합 친화성 데이터를 보여준다.

도 1b는 유세포 분석에 의한 HHLA2 형질주입된 300.19 마우스 전구-B 세포 백혈병 세포주에 결합하는 TMIGD2-인간 IgG의 항-HHLA2 mAb 차단을 보여준다.

도 2는 항-HHLA2 mAb 8D2(IHC mAb)로 탐침 검사한 9종의 인간 종양 세포주 단백질의 웨스턴 블롯 데이터를 보여준다.

도 3은 정상 신장 대비 투명세포형 신세포암(ccRCC)에서 다른 관문 저해제와 비교한 HHLA2 mRNA 발현을 보여준다.

도 4는 TCGA 데이터베이스의 다양한 암에서 HHLA2 발현을 보여준다.

도 5a는 음성 대조군 세포(300.19), HHLA-2 형질주입된 300.19 세포(양성 대조군), OC1-Ly1 세포(음성 종양) 및 HDLM2(양성 호지킨 림프종 세포주) HHLA2 대조군 세포 상의 HHLA2 면역조직화학(IHC) 결과를 보여준다.

도 5b는 정상 신장의 HHLA2 발현을 보여준다.

도 5c는 마이크로어레이(TMA)로부터 ccRCC의 HHLA2 발현의 대표적인 이미지를 보여준다.

도 5d는 종양 마이크로어레이(TMA)로부터 다른 ccRCC의 HHLA2 발현 결핍의 대표적인 이미지를 보여준다.

도 6a는 이중으로한 ~ 300 원형질막 클론의 대표적인 세트의 스크리닝 결과와 KIR3DL3에 결합한 HHLA2를 보여주는 검증 스크린을 보여준다. 총 5682 세포 표면 수용체 막 클론을 스크린하였다.

도 6b는 KIR3DL3에 대한 HHLA2의 선택적인 결합을 보여준다.

도 6c는 관련된 바이오마커에 대한 유전자 ID 및 NCBI 수납 정보를 보여준다.

도 7은 Jurkat NFAT 수용체 유전자 분석의 개략도를 보여준다.

도 8은 CAR-T 세포 모델을 보여준다.

도 9는 종양에 의해 발현될 수 있는 저해성 B7 패밀리 구성원을 보여준다.

도 10은 T-세포 기능 조절을 위한 두 수용체(자극성 및 저해성 HHLA2 수용체)와의 HHLA2 상호작용에 대한 모델을 보여준다. T-세포 수용체(TCR) 신호전달과 함께, 미경험 T 세포 상의 TMIGD2는 APC 상의 HHLA2와 상호작용하고 AKT 인산화를 포함하는 경로를 통해 T-세포 증식 및 사이토카인 생산을 공동-자극한다. 반복적인 T-세포 활

성화로, 자극성 수용체 TMIGD2의 발현이 점차 소실되어 저해성 수용체 KIR3DL3의 발현이 우세해진다. APC 또는 종양 세포 상의 HHLA2는 제2의 수용체와 상호작용할 수 있고 공동-저해 기능을 발휘할 수 있다. 본 도면은 Xiao 및 Freeman 등의 문헌(Xiao and Freeman *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203)에서 채택되었다.

도 11은 비-소세포 폐암에서 HHLA2 + ve(즉, HHLA2 mAb를 사용한 면역조직화학(IHC) 염색을 기초로 HHLA2가 발현되는 폐암 조직) 환자의 계층화를 보여준다. PD-L1 양성 및 음성 비-소세포 폐암에서 HHLA2 발현율은 HHLA2 및 PD-L1 면역염색 연구를 기초로 계산하였다(Cheng *et al.* (2018) *Clin. Cancer Res.* 24:1954-1964).

도 12a 및 도 12b는 형질주입된 293T 세포 상에서 TMIGD2(도 12a) 또는 KIR3DL3(도 12b)의 발현을 보여준다. pEF-Puro 발현 벡터 내 TMIGD2 또는 KIR3DL3 cDNA를 일시적으로 293T 세포에 형질주입하고 48 내지 72 시간 후에 각각 (1) TMIGD2 mAb(R&D systems 카탈로그 #MAB83162; 클론 #953743)에 이어 염소-항-마우스 IgG F(ab)₂-PE(R&D Systems 카탈로그 F0102B) 또는 (2) KIR3DL3-PE 접합 mAb(R&D Systems 카탈로그# FAB8919R; 클론 #1136B)로 염색하고, 유세포분석으로 검출하였다.

도 12c 및 도 12d는 TMIGD2(도 12c) 또는 KIR3DL3(도 12d) 형질주입된 293T 세포에 결합한 HHLA2-Fc를 보여준다. 일시적으로 TMIGD2 또는 KIR3DL3로 형질주입된 293T 세포에 결합한 HHLA2-mIgG2a를 PE-표지 Fab₂ 염소 항-마우스 IgG2a 항체(인간 Ig와의 교차-반응을 위해 흡수됨, Southern Biotech 카탈로그 # 1082-09)를 사용하여 유세포분석으로 검출하였다.

도 13a 및 도 13b는 인간 및 필리핀원숭이(필리핀원숭이)의 HHLA2에 결합하는 HHLA2 mAb를 보여준다. 다른 농도의 HHLA2 mAb를 인간 또는 필리핀원숭이의 HHLA2-형질주입된 300.19 전구-B 세포와 4℃에서 30분 동안 항온처리하였다. 형질주입된 300.19 세포에 결합한 HHLA2 mAb는 PE-표지 염소 항-마우스 IgG(H+L)를 사용하여 유세포분석으로 검출하였다.

도 14는 TMIGD2/HHLA2 T 세포 공동-자극 분석의 개략도를 보여준다. TMIGD2 Jurkat T 세포 NFAT-루시페라제 리포터 유전자 세포를 항-CD3 scFV 또는 항-CD3 scFV + HHLA2로 형질주입된 CHO 세포로 자극하였다.

도 15는 CHO-항-CD3 scFV 세포에서 HHLA2의 발현을 보여준다. 항-CD3 scFV + HHLA2로 형질주입된 CHO 세포(클론 #28) 상의 HHLA2 발현은 PE-접합 6F10 HHLA2 mAb를 사용하여 유세포분석으로 검출하였다.

도 16은 Jurkat NFAT 리포터 세포에서 TMIGD2의 발현을 보여준다. TMIGD2-형질주입된 Jurkat NFAT 리포터 세포(클론 #62)에서 TMIGD2의 발현이 표시된다.

도 17은 TMIGD2-매개 T 세포 공동-자극의 HHLA2 mAb 차단을 보여준다. HHLA2-TCR-CHO 세포를 흰색 불투명한 바닥의 96-웰 플레이트 내 CHOK1 성장 배지에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 5% CO₂로 37℃에서 밤새 배양한 후 세포를 플레이트에 부착시켰다. 다음날, 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하고, 50μl Jurkat 세포 배지에 항 HHLA2 항체를 포함시켜 첨가하고, 50μl Jurkat 세포 배지에 4 내지 5×10^4 세포/웰로 TMIGD2 NFAT Jurkat 리포터 세포주를 첨가하기 전에 HHLA2-TCR-CHO 세포를 1시간 동안 배양하였다. 플레이트 웰을 섞고 약 3 내지 6 시간 동안 항온처리하였다. 루시페라제 신호를 전개하기 위해, 제조사에서 권장하는 프로토콜에 따라 100μl의 ONE-StepTM 루시페라제 분석 시스템(BPS Bioscience, 카탈로그 #60690)을 각 웰에 첨가하였다. 루미네선스는 루미노미터를 사용하여 판독하였다.

도 18은 KIR3DL3/HHLA2 관문 T 세포 분석의 개략도를 보여준다. KIR3DL3 Jurkat T 세포 IL-2 프로모터 루시페라제 리포터 유전자 세포를 항-CD3 scFV 또는 항-CD3 scFV + HHLA2로 형질주입된 CHO 세포로 자극하였다.

도 19는 Jurkat-IL-2 리포터 클론에서 KIR3DL3의 발현을 보여준다. KIR3DL3의 발현을 KIR3DL3-형질주입 Jurkat IL-2 리포터 세포 클론 1-6, 1-7 및 2-12에서 검출하였다.

도 20a 내지 도 20c는 KIR3DL3-매개 T 세포 저해의 HHLA2 mAb 관문 차단을 보여준다. HHLA2-TCR-CHO 세포를 흰색 불투명한 바닥의 96-웰 플레이트 내 CHOK1 성장 배지에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 5% CO₂로 37℃에서 밤새 배양한 후 세포를 플레이트에 부착시켰다. 다음날, 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하고, 50μl Jurkat 세포 배지에 항 HHLA2 항체를 포함시켜 첨가하고, 2μg/ml 항 CD28 항체(BPS Bioscience #100186)(웰당 100μl 분석 혼합액에 1μg/ml의 최종 농도)가 첨가된 50μl Jurkat 세포 배지에 4 내지 5×10^4 세포/웰로 KIR3DL3_IL2_Jurkat 리포터 세포주를 첨가하기 전에 HHLA2-TCR-CHO 세포를 1시간 동안 배양하였다. 플레이트 웰

을 섞고 약 5시간 동안 항온처리하였다. 루시퍼라제 신호를 전개하기 위해, 제조사에서 권장하는 프로토콜에 따라 100 μ l의 ONE-StepTM 루시퍼라제 분석 시스템(BPS Bioscience, 카탈로그 #60690)을 각 웰에 첨가하였다. 루미네이션은 루미노미터를 사용하여 판독하였다.

도 21a 내지 도 21c는 Jurkat KIR3DL3 저해 분석에서 HHLA2 mAb의 적정을 보여준다. Jurkat IL-2 루시퍼라제 클론 1-6, 1-7 및 2-12를 사용하여 Jurkat IL-2 리포터 루시퍼라제 분석에서 HHLA2 mAb 2C4 및 6F10의 상이한 농도를 평가하였다.

도 22는 KIR3DL3-선택적 HHLA2 mAb 2C4가 TMIGD2-매개 공동-자극을 차단하지 않는다는 것을 보여준다. Jurkat 모계 NFAT 리포터 세포에서 30 μ g/ml 농도로 HHLA2 mAb 2C4를 평가하였다. HHLA2-TCR-CHO 세포를 흰색 불투명한 바닥의 96-웰 플레이트 내 CHOK1 성장 배지에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 5% CO₂로 37°C에서 밤새 배양한 후 세포를 플레이트에 부착시켰다. 다음날, 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하고, 50 μ l Jurkat 세포 배지에 항 HHLA2 항체를 포함시켜 첨가하고, 50 μ l Jurkat 세포 배지에 4 내지 5×10^4 세포/웰로 Jurkat 모계 NFAT_Jurkat 리포터 세포주를 첨가하기 전에 HHLA2-TCR-CHO 세포를 1시간 동안 배양하였다. 플레이트 웰을 섞고 약 3 내지 6시간 동안 항온처리하였다. 루시퍼라제 신호를 전개하기 위해, 제조사에서 권장하는 프로토콜에 따라 100 μ l의 ONE-StepTM 루시퍼라제 분석 시스템(BPS Bioscience, 카탈로그 #60690)을 각 웰에 첨가하였다. 루미네이션은 루미노미터를 사용하여 판독하였다.

도 23a 내지 도 23c는 인간화 SRG-15 마우스 종양 모델(T 및 NK 세포 모두를 가짐)에서 HHLA2 mAb를 평가할 수 있는 방법을 보여준다. HHLA2 mAb를 HHLA2-발현 종양 세포를 품은 인간화 SRG-15 마우스에 투여하고, 종양 성장 저해를 평가한다. 도면은 Herndler-Brandstetter D 등의 문헌[Herndler-Brandstetter D *et al.* (2017) 114:E9626-E9634]에서 채택하였다.

도 24a 내지 도 24b는 필리핀원숭이 T 세포 모델에서 HHLA2 mAb를 평가할 수 있는 방법을 보여준다. 필리핀원숭이 HHLA2 mAb를 투여하고 KLH로 면역화하고, T 세포-의존성 항체 및 세포-매개 반응을 평가한다. NK 세포독성은 생체 외에서 평가한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은, 적어도 일부는, B7 유전자 패밀리를 구성원인 HHLA2가 다양한 종양 및 항원 제시 세포에서 광범위하게 발현되고 T 세포에 대한 활성화 및 저해 리간드 모두로서 관계된다는 발견을 기반으로 한다. 미경험 T 세포에서 발현되는 TMIGD2는 HHLA2에 대한 활성화 수용체이며 T 세포 항원 수용체(TCR) 결합 후 공동-자극 신호를 전달한다. TMIGD2는 반복된 TCR 자극 후 하향조절된다. HHLA2가 종양에서 고도로 발현되고 관문 리간드로 작용할 수 있다는 관찰을 기초로, 항-HHLA2 인간 단일클론성 항체(mAb)의 패널이 후보 면역 관문 저해제 치료제로 도출되었다. B7 패밀리를 구성원 B7-1 및 B7-2의 같은 리간드 결합 도메인들이 활성화 및 저해 수용체(예를 들어, CD28 및 CTLA-4) 모두에 결합하는 것을 고려하면, TMIGD2 결합을 차단하는 항-HHLA2 단일클론성 항체가 이들의 추정 저해 수용체에 대한 결합을 차단하기 위한 좋은 후보군이 될 수 있다고 생각된다. TMIGD2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 백혈병 세포에 결합하는 융해성 hHHLA2-mIgG2a를 평가하여, 차단 및 비-차단 항-HHLA2 mAb를 모두 확인하였다. 표 2에 나열된 항-HHLA2 mAb(예를 들어, 6F10, 4D1, 4E5 및 2G2)는 TMIGD2 결합을 차단했고 또한 각각 0.25, 0.44 및 0.21 μ g/ml(나노몰 범위)의 상대 EC50 결합 친화도로 HHLA2 형질주입 300.19 세포에 결합하였다. 표 2에 나열된 비-차단 항체(예를 들어, 1C8 및 6D10)는 각각 0.63 및 22.49 μ g/ml의 상대 결합 친화도로 HHLA2에 결합하였다. 이들 후보 치료제 항-HHLA2 항체의 가변 영역 중쇄 및 경쇄 유전자 서열들이 본 발명에 기술된다.

[0032] 항-HHLA2 mAb 1C8 및 6D10가 좋은 포르말린-고정 파라핀-포매 면역조직화학 또는 웨스턴 블롯 시약으로 확인되었다. TCGA 데이터베이스의 원발성 종양에서 HHLA2는 폐, 신장, 췌장 및 대장 암 및 AML에서 고도로 발현되는 것으로 나타났고 두경부, 간, 난소, 전립선 및 자궁 암에서 중간 수준으로 나타났다. 암에서 HHLA2 mRNA의 발현은 상응하는 정상 조직보다 높다.

[0033] 융해성 인간 HHLA2-mIgG2a로 3,500 초과와 상이한 원형질막 단백질을 포함하는 > 4500 전체-길이 클론의 인간 혈장 단백질 라이브러리가 발현된 세포 표면을 스크리닝하여 KIR3DL3(killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3)를 HHLA2에 대한 새로운 수용체로 확인하였다. KIR3DL3의 세포질 꼬리는 암 면역요법을 위한 관문 수용체 표적으로 작용할 수 있는 HHLA2에 대한 저해 수용체를 나타내는

서열 "VTYAQL"로 구성된 ITIM 모티프를 함유한다. 14 KIR 수용체(즉, KIR3DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, 및 KIR3DS1) 패널을 사용하여 다른 KIR 수용체에 대한 결합이 관찰되지 않았으므로, KIR3DL3에 결합하는 HHLA2의 선택성이 입증되었다.

[0034] HHLA2가 여러 유형의 종양에서 높은 수준으로 발현되기 때문에, 항-HHLA2 mAb 체크-포인트 저해제 치료제는 체크-포인트 저해제 치료에 반응하는 환자의 풀을 증가시킬 수 있다. 또한, PD-1 요법에 내성이 생긴 환자는 대안적인 면역 회피 전략으로 HHLA2를 발현할 수 있고 HHLA2 차단은 PD-1 면역요법에 대한 내성을 극복하는 방법을 제공할 수 있다.

[0035] 따라서, 본 발명은 HHLA2에 특이적으로 결합하는 단일클론성 항체, 및 이의 항원-결합 단편뿐만 아니라 면역글로불린, 폴리펩타이드, 이의 핵산, 및 진단, 예후, 및 치료 목적을 위해 이러한 항체를 사용하는 방법을 제공한다.

[0036] I. 정의

[0037] 단수 표현은 단수 표현의 문법적 대상 중 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본 명세서에 사용된다. 예를 들어, "하나의 요소"는 하나의 요소 또는 하나를 초과하는 요소를 의미한다.

[0038] 마커의 "변경된 양"이라는 용어는, 대조군 시료의 마커와 비교하여, 시료 내 증가 또는 감소된 마커의 카피수 및/또는 증가 또는 감소된 특정 마커 유전자 또는 유전자들의 핵산 수준을 지칭한다. 또한, 마커의 "변경된 양"이라는 용어는, 정상, 대조군 시료의 마커의 단백질 수준과 비교하여, 시료 내 증가 또는 감소된 마커의 단백질 수준을 포함한다.

[0039] 마커의 "변경된 활성"이라는 용어는, 정상, 대조군 시료의 마커의 활성과 비교하여, 질환 상태, 예를 들어, 생물학적 시료에서 증가 또는 감소된 마커의 활성을 지칭한다. 마커의 변경된 활성은 예를 들어, 마커의 변경된 발현, 마커의 변경된 단백질 수준, 마커의 변경된 구조, 또는, 예를 들어, 마커로서 같거나 다른 경로에 포함되는 다른 단백질과의 변경된 상호작용, 또는 전사 활성화제 또는 저해제와의 변경된 상호작용의 결과일 수 있다.

[0040] 마커의 "변경된 구조"라는 용어는, 정상 또는 야생형 유전자 또는 단백질과 비교하여, 마커 유전자 또는 마커 단백질의 돌연변이 또는 대립유전자 변이, 예를 들어 마커의 발현 또는 활성에 영향을 미치는 돌연변이의 존재에 관련된다. 예를 들어, 돌연변이는 치환, 결실, 또는 부가 돌연변이를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 돌연변이는 마커의 암호화 또는 비-암호화 영역 내에 존재할 수 있다.

[0041] "활성화 수용체"라는 용어는 항원에 결합하는, 항원과 복합체화되는(예를 들어, MHC 폴리펩타이드의 맥락에서), 또는 항체에 결합하는 면역 세포 수용체를 포함한다. 이러한 활성화 수용체는 T 세포 수용체(TCR), B 세포 수용체(BCR), 사이토카인 수용체, LPS 수용체, 보체 수용체, 및 Fc 수용체를 포함한다.

[0042] T 세포 수용체는 T 세포 상에 나타나고 CD3 폴리펩타이드와 연관된다. T 세포 수용체는 MHC 폴리펩타이드의 맥락에서 항원에 의해(뿐만 아니라 다클론성 T 세포 활성화 시약에 의해) 자극된다. TCR을 통한 T 세포 활성화는 수많은 변화, 예를 들어 단백질 인산화, 막 지질 변화, 이온 플럭스, 고리형 뉴클레오타이드 변화, RNA 전사 변화, 단백질 합성 변화, 및 세포 부피 변화를 초래한다.

[0043] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이라는 용어는 원하는 항원 특이성을 갖는 조작된 T 세포 수용체(TCR)에 관련된다. T 림프구는 주 조직적합성 복합체(MHC) I형 또는 II형 분자에 의해 제시된 짧은 펩타이드와 T 세포 수용체(TCR)의 상호작용을 통해 특정 항원을 인식한다. 초기 활성화 및 클론 확장을 위해, 미경험 T 세포는 부가적 공동-자극 신호를 제공하는 전문적 항원-제시 세포(APC)에 의존한다. 공동-자극의 부재 상에서 TCR의 활성화는 무반응 및 클론성 아네르기(아네르기)를 초래할 수 있다. 면역화를 우회하기 위해, 이식된 인식 특이성을 갖는 세포독성 이펙터 세포(이펙터 세포)의 유도를 위한 다른 접근법이 개발되었다. TCR-연관 CD3 복합체의 세포-표면 성분에 특이적인 천연 리간드 또는 항체로부터 파생된 결합 도메인으로 구성된 CAR이 구축되었다. 항원 결합 시, 이러한 키메라 항원 수용체는 이펙터 세포의 내인성 신호전달 경로에 연결되고 TCR 복합체에 의해 개시된 것과 유사한 활성화 신호를 생성한다. 키메라 항원 수용체에 관한 첫 보고 이후, 이 컨셉은 꾸준히 개선되었고 키메라 수용체의 분자 설계는 최적화되었으며 scFV, Fav, 및 본 명세서에 기술된 다른 단백질 결합 단편과 같은 많은 잘 알려진 결합 도메인을 일상적으로 사용한다.

[0044] 일반적으로, CAR은 본 발명에 따른 용도를 위해 고려된 "세포 요법"(예를 들어, T 세포 요법)의 한 유형이다. TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 HHLA2 천연 결합 상대와 HHLA2 사이의 상호작용 조절과 같은 HHLA2 경로의 조절

에 의해 면역 세포 활성을 조절하는 물질 및 방법의 대표적인 실시형태가 있지만, 면역 세포-기반 요법 및 방법 또한 포함된다. 예를 들어, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3의 녹아웃, 녹다운, 또는 증가된 발현을 갖도록 조작된 T 세포가 고려된다. 유사하게, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 HHLA2 리간드의 녹아웃, 녹다운, 또는 증가된 발현을 갖도록 조작된 면역 세포 또는 다른 세포 또한 고려된다.

[0045] B 세포 수용체는 B 세포 상에 제시된다. B 세포 항원 수용체는 막 Ig(mIg) 및 다른 막형단 폴리펩타이드(예를 들어, Igα 및 Igβ) 사이의 복합체이다. mIg의 신호 전달 기능은 올리고머 또는 멀티머 항원에 의한 수용체 폴리펩타이드의 교차연결에 의해 촉발된다. 또한 B 세포는 항-면역글로불린 항체에 의해 활성화될 수 있다. BCR 활성화 시, 티로신 인산화를 포함하는 B 세포의 수많은 변화가 발생한다.

[0046] Fc 수용체는 면역 반응에 관여하는 많은 세포에서 발견된다. Fc 수용체(FcR)는 면역글로불린 폴리펩타이드(Ig)의 Fc 부분에 대한 세포 표면 수용체이다. 지금까지 확인된 인간 FcR 중에는, IgG(FcγR로 표시), IgE(FcεR1), IgA(Fcα), 및 중합된 IgM/A(FcμαR)를 인식하는 것이 있다. FcR은 다음의 세포 유형에서 발견된다: FcεRI(비만세포), FcεRII(많은 백혈구), FcαR(호중구), 및 FcμαR(선상피, 간세포)(Hogg, N. (1988) *Immunol. Today* 9:185-86). 폭넓게 연구된 FcγR은 세포 면역 방어의 중심이며, 자가면역 질환의 발병에 관련된 염증의 매개체 및 가수분해 효소의 방출을 자극하는 역할을 한다(Unkeless, J. C. *et al.* (1988) *Annu. Rev. Immunol.* 6:251-81). 대식세포/단핵구, 다형핵 백혈구, 및 자연살해(NK) 세포 FcγRI가 IgG에 의해 매개되는 특이적 인식 요소를 부여하기 때문에, FcγR은 이펙터 세포 및 Ig를 분비하는 림프구 사이에 중요한 연결고리를 제공한다. 인간 백혈구는 IgG에 대한 적어도 3종의 상이한 수용체를 갖는다: hFcγRI(단핵구/대식세포 상에서 발견됨), hFcγRII(단핵구, 호중구, 호산구, 혈소판, 가능한 B 세포, 및 K562 세포주 상에서), 및 FcγRIII(NK 세포, 호중구, 호산구, 및 대식세포 상에서).

[0047] T 세포와 관련하여, T 세포로 공동자극 신호를 전달하는 것은 사이클로스포린 A(cyclosporin A)에 의해 저해되지 않는 신호전달 경로를 포함한다. 또한, 공동자극 신호는 T 세포에서 사이토카인 분비(예를 들어, IL-2 및/또는 IL-10)를 유도할 수 있고/있거나 항원에 대한 무반응 유도, 아네르기 유도, 또는 T 세포에서 세포사(삭제) 유도를 방지할 수 있다.

[0048] 폴리펩타이드, 예를 들어 HHLA2 및/또는 HHLA2 천연 결합 상대, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3과 관련하여 사용할 때 "활성"이라는 용어는 단백질의 구조에 내재된 활성을 포함한다. 예를 들어, HHLA2 리간드와 관련하여, "활성"이라는 용어는 면역 세포에서 저해 신호를 조절하여(예를 들어, 면역 세포 상의 천연 수용체와 결합하여) 면역 세포 저해를 조절하는 능력을 포함한다. 당업자는 HHLA2 리간드 폴리펩타이드의 활성화 형태가 저해 수용체에 결합할 때 면역 세포에서 저해 신호가 생성된다는 것을 인식할 것이다.

[0049] "저해 신호"라는 용어는 면역 세포 상의 폴리펩타이드에 대한 저해 수용체(예를 들어, HHLA2, KLRB1, CTLA4, PD-1 등)를 통해 전달되는 신호에 관련된다. 이러한 신호는 활성화 수용체를 통해(예를 들어, TCR, CD3, BCR, TMIGD2, 또는 Fc 폴리펩타이드를 통해) 신호를 길항하고 예를 들어, 제2메신저 생성 저해; 증식 저해; 면역 세포에서 이펙터 기능 저해, 예를 들어, 감소된 식세포작용, 감소된 항체 생산, 감소된 세포독성, 면역 세포의 매개체 생산 실패, (사이토카인(예를 들어, IL-2) 및/또는 알레르기 반응의 매개체); 또는 아네르기 발생을 초래할 수 있다.

[0050] 대상체에서 바이오마커의 양이 양을 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 편차 보다 큰 양만큼 정상 또는 대조군 수준 보다, 각각, 더 크거나 더 작은 경우, 및 바람직하게는 그 양의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 350%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 이상인 경우, 대상체에서 바이오마커의 양은 정상 양의 바이오마커 보다 "유의하게" 더 높거나 더 낮다. 대안적으로, 대상체에서 바이오마커의 양이 정상 및/또는 대조군의 바이오마커 양보다, 각각, 적어도 약 2, 및 바람직하게는 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185%, 190%, 195%, 2배, 3배, 4배, 5배, 또는 그 이상, 또는 사이의 임의의 범위, 예를 들어 5% 내지 100%, 더 높거나 더 낮은 경우, 대상체에서 바이오마커의 양은 정상 및/또는 대조군의 양보다 "유의하게" 더 높거나 더 낮은 것으로 간주될 수 있다. 이러한 유의한 조절 값은 본 명세서에 기술된 임의의 메트릭, 예를 들어 발현의 변경된 수준, 변경된 활성, 암 세포의 과증식성 성장에서의 변화, 암 세포의 사멸에서의 변화, 바이오마커 저해에서의 변화, 시험 물질 결합에서의 변화 등에 적용될 수 있다.

[0051] 대상체에서 마커의 양이 양을 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 편차 보다 큰 양만큼 정상 수준보다, 각각, 더 크거나 더 작은 경우, 및 바람직하게는 그 양의 적어도 2배, 및 보다 바람직하게는 3배, 4배, 5배, 10배 또는

그 이상, 대상체에서 마커의 "양", 예를 들어, 마커 또는 MCR의 발현 또는 카피수, 또는 마커의 단백질 수준은 마커의 정상 양 보다 "유의하게" 더 높거나 더 낮다. 대안적으로, 대상체에서 마커의 양이 마커의 정상 양보다, 각각, 적어도 약 2배, 및 바람직하게는 적어도 약 3배, 4배, 또는 5배, 더 높거나 더 낮은 경우, 대상체에서 마커의 양은 정상 양 보다 "유의하게" 더 높거나 더 낮은 것으로 간주될 수 있다.

[0052] 마커의 "발현의 변경된 수준"이라는 용어는 시험 시료, 예를 들어 암을 앓고 있는 대상체에서 유래된 시료에서의 마커의 발현 수준 또는 카피수에 관련되며, 이는 발현 또는 카피수를 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 편차 보다 더 크거나 더 작고, 바람직하게는 대조군 시료(예를 들어, 연관된 질환을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 시료)에서 마커 또는 염색체 영역의 발현 수준 또는 카피수, 바람직하게는 몇몇 대조군 시료에서의 마커 또는 염색체 영역의 평균 발현 수준 또는 카피수에 적어도 2배, 및 보다 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배 또는 그 이상이다. 발현의 변경된 수준은 발현 또는 카피수를 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 편차 보다 더 크거나 더 작고, 바람직하게는 대조군 시료(예를 들어, 연관된 질환을 갖지 않는 건강한 대상체로부터의 시료)에서의 마커의 발현 수준 또는 카피수, 바람직하게는 몇몇 대조군 시료에서의 마커의 평균 발현 수준 또는 카피수, 보다 적어도 2배, 및 보다 바람직하게는 3배, 4배, 5배 또는 10배 또는 그 이상이다.

[0053] "면역요법"이라는 용어는 예를 들어, 암 백신 및/또는 감염된 항원 제시 세포의 사용을 포함할 수 있는 표적화 요법의 형태에 관련된다. 예를 들어, 종양세포붕괴성(oncolytic) 바이러스는 암 세포를 감염시키고 용해할 수 있는 바이러스인 반면 살아있는 남은 정상 세포는 손상시키지 않아, 면역조절 요법에서 잠재적으로 유용하다. 종양세포붕괴성 바이러스의 복제는 종양 세포 파괴를 촉진하고 종양 부위에 용량 증폭을 일으킨다. 또한 이들은 항암 유전자의 벡터로 작용할 수 있어, 종양 부위에 특이적으로 전달될 수 있다. 면역요법은 암 항원 또는 질환 항원에 대한 전-형성된 항체의 투여(예를 들어, 종양 항원에 대한, 선택적으로 화학치료제 또는 독소에 연결된, 단일클론성 항체의 투여)에 의해 달성되는 숙주의 단기 보호를 위한 수동 면역을 포함할 수 있다. 또한 면역요법은 암 세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는데 초점을 맞출 수 있다. 대안적으로, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 삼중 나선 폴리뉴클레오타이드 등이 종양 또는 암의 시작, 진행, 및/또는 병리에 연결된 생물분자를 선택적으로 조절하기 위해 사용될 수 있다. 위에 기술된 바와 같이, HHLA2, TMIGD2, KIR3DL3 등과 같은 면역 관문 표적에 대한 면역요법이 유용하다.

[0054] 본 명세서에서 달리 명시되지 않은 한, "항체"라는 용어는 항체의 자연-발생 형태(예를 들어, IgG, IgA, IgM, IgE) 및 제조합 항체, 예를 들어 단일-사슬 항체, 키메라 및 인간화 항체 및 다중-특이적 항체뿐만 아니라, 전술한 모든 것의 단편 및 유도체로 적어도 하나의 항원 결합 부위를 갖는 단편 및 유도체를 광범위하게 포함한다. 항체 유도체는 항체에 접합된 단백질 또는 화학적 모이어티를 포함할 수 있다. "항체"는 이황화 결합에 의해 상호-연결된 적어도 둘의 중쇄(H) 및 둘의 경쇄(L), 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 당단백질에 관련된다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서 V_H 로 약기) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서 V_L 로 약기) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임 영역(FR)이라고 하는 보다 보존된 영역이 산재된 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초 가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각 V_H 및 V_L 은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되며, 아미노-말단에서 카복실-말단까지 다음의 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. "불활성화 항체"라는 용어는 보체 시스템을 유도하지 않는 항체에 관련된다.

[0055] 본 명세서에 사용된 "항체"라는 용어는 또한 항체의 "항원-결합 부분"(또는 간단히 "항체 부분")을 포함한다. 본 명세서에 사용된 "항원-결합 부분"이라는 용어는 항원(예를 들어, HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함되는 결합 단편의 예시는 (i) V_L , V_H , CL 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교로 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어지는 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 이루어지는 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 두 도메인인 V_L 및 V_H 가 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, 이들은 V_L 및 V_H 영역을 짝지어 1가 폴리펩타이드를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들 수 있는 합성 링커에 의해, 제조합 방법을 사용하여, 결합될 수 있다(단일사슬 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들어, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; 및 Osbourn *et al.* 1998, *Nature Biotechnology* 16: 778

참조). 이러한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포함되는 것으로 의도된다. 특이적 scFv의 임의의 VH 및 VL 서열은 온전한 IgG 폴리펩타이드 또는 다른 아이소타입을 암호화하는 발현 벡터를 생성하기 위해 인간 면역글로불린 불변 영역 cDNA 또는 게놈 서열에 연결될 수 있다. VH 및 VL은 또한 단백질 화학법 또는 제조합 DNA 기술을 사용한 Fab, Fv 또는 면역글로불린의 다른 단편의 생성에 사용될 수 있다. 다이아바디와 같은 단일 사슬 항체의 다른 형태 또한 포함된다. 다이아바디는 단일 폴리펩타이드 사슬에 VH 및 VL 도메인이 발현된 2가 이중 특이적 항체이지만, 같은 사슬 상 두 도메인 사이의 결합을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용하기 때문에 도메인이 다른 사슬의 상보적 도메인과 결합하게 만들고 두 항원 결합 부위를 생성한다 (예를 들어, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123 참조).

[0056] 추가로 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 항체 또는 항체 부분과 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비공유 결합으로 형성된 더 큰 면역부착 폴리펩타이드의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 폴리펩타이드의 예시는 4량체 scFv 폴리펩타이드를 만들기 위해 스트렙타비딘 코어 영역을 사용하는 것(Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101)과 2가 및 비오틴화 scFv 폴리펩타이드를 만들기 위해 시스테인 잔기, 마커 펩타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그를 사용하는 것(Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)을 포함한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 부분은 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해와 같은 통상적인 기술을 사용하여 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 더욱이, 항체, 항체 부분 및 면역부착 폴리펩타이드는 본 명세서에 기술된 바와 같은 표준 제조합 DNA 기술을 사용하여 얻을 수 있다.

[0057] 항체는 다클론성 또는 단일클론성; 이중, 동종이계, 또는 동계; 또는 이의 변형된 형태(예를 들어, 인간화, 키메라 등)일 수 있다. 항체는 또한 완전한 인간의 것일 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 항체는 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 특이적으로 또는 실질적으로 특이적으로 결합한다. 본 명세서에서 사용되는 "단일클론성 항체" 및 "단일클론성 항체 조성물"이라는 용어는 항원의 특정 에피토프와 면역반응할 수 있는 항원 결합 부위의 한 종만을 포함하는 항체 폴리펩타이드의 집단을 지칭하는 반면, "다클론성 항체" 및 "다클론성 항체 조성물"이라는 용어는 특정 항원과 상호작용할 수 있는 항원 결합 부위의 여러 종들을 포함하는 항체 폴리펩타이드의 집단을 지칭한다. 단일클론성 항체 조성물은 일반적으로 면역반응하는 특정 항원에 대해 단일 결합 친화성을 나타낸다.

[0058] "체액"이라는 용어는 신체로부터 배설되거나 분비되는 액체뿐만 아니라 일반적으로 그렇지 않은 액체(예를 들어, 양수, 수양액, 담즙, 혈액 및 혈장, 뇌척수액, 세루멘 및 귀지, 쿠파액 또는 사정전 액, 유미(chyle), 유미즙(chyme), 대변, 여성 사정액, 간질액, 세포내 액, 림프, 생리, 모유, 점액, 흉수, 고름, 침, 피지, 정액, 혈청, 땀, 관절액, 눈물, 소변, 질액, 유리체액, 구토물)를 지칭한다.

[0059] "암" 또는 "종양" 또는 "과증식성 장애"는 제어되지 않는 증식, 불멸, 전이성 잠재력, 급속한 성장 및 증식물, 및 특정 특징적인 형태적 특징과 같은 암-유발 세포의 전형적인 특징을 갖는 세포의 존재를 지칭한다. 암 세포는 종종 종양의 형태이지만, 이러한 세포는 동물 내에서 단독으로 존재할 수 있거나, 백혈병 세포와 같은 비-종양성 암 세포일 수 있다. 암은 B 세포 암, 예를 들어 다발성 골수종, 발텐스트롬 거대글로불린혈증, 중쇄 질환, 예를 들어 알파 사슬 질환, 감마 사슬 질환, 및 뮤 사슬 질환, 양성 단일클론성 글로불린혈증, 및 면역세포성 아밀로이드증, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 대장암, 전립선암, 췌장암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌 또는 중추신경계 암, 말초신경계 암, 식도암, 자궁경부암, 자궁 또는 자궁내막 암, 구강 또는 인두 암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장 또는 맹장 암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액학 조직 암 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 포함된 방법에 적용할 수 있는 암 유형의 다른 비-제한적 예시는 인간 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활액종, 중피종, 유원종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결합암, 대장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암종, 기저세포암, 샘암종, 땀샘암종, 피지샘암종, 유두모양암종, 유두선암, 낭종암, 수질암종, 기관지원성암종, 신장세포암종, 담도암종, 간암, 융모막암종, 정상피종, 태생성 암종, 빌름스 종양, 자궁경부암, 골암, 뇌종양, 고환암, 폐암종, 폐소세포암종, 방광암종, 상피암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과선종, 혈관모세포종, 청각신경종, 희돌기교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 망막모세포종; 백혈병, 예를 들어, 급성 림프구성 백혈병 및 급성 골수세포성 백혈병(골수모구성, 전골수세포성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병); 만성 백혈병(만성 골수성(과립구성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병); 및 진성다혈구증, 림프종(호지킨 질환 및 비-호지킨 질환), 다발성 골수종, 발텐스트롬 거대글로불린혈증, 및 중쇄 질환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암은 본질적으로 상피성이고 방광암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 부인과암, 신장암, 후두암, 폐암, 구강암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 전립선

암, 또는 피부암을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시형태에서, 상피암은 비-소-세포 폐암, 비유두형 신장세포 암종, 자궁경부 암종, 난소 암종(예를 들어, 장액성 난소 암종), 또는 유방 암종이다. 상피암은 장액성, 자궁내막모양, 점액성, 투명 세포, 브레너, 또는 비분류를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 다양한 다른 방식으로 특징지을 수 있다.

[0060] "CDR"이라는 용어는 3개가 경쇄 가변 영역의 결합 특성을 구성하고(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3) 3개가 중쇄 가변 영역의 결합 특성을 구성하는(CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3) 상보성 결정 영역(CDR)을 지칭한다. CDR은 항체 분자의 기능적 활성화에 기여하며 스캐폴딩 또는 프레임워크 영역을 포함하는 아미노산 서열로 구분된다. 정확한 정의의 CDR 경계 및 길이는 상이한 분류 및 번호 지정 시스템에 따라 다르다. 따라서 CDR은 Kabat, Chothia, 관계 또는 임의의 다른 경계 정의로 지칭될 수 있다. 서로 다른 경계에도 불구하고, 이들 시스템 각각은 가변 서열 내에 소위 "초가변 영역"을 구성하는 것에서 어느 정도의 중첩을 갖는다. 이들 시스템에 따른 CDR의 정의는 인접 프레임워크 영역에 관하여 길이 및 경계 구역이 다를 수 있다. Kabat, Chothia, 및/또는 MacCallum 등의 문헌 참조(Kabat *et al.*, in "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th 판, U.S. Department of Health and Human Services, 1992; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196, 901; 및 MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. (1996) 262, 732, 이들 각각은 그 전체가 참조로 포함된다).

[0061] 본 명세서에서 사용된 "분류"라는 용어는 시료를 질병 상태와 "연관시키는" 또는 "범주화하는" 것을 포함한다. 특정 사례에서, "분류"는 통계적 증거, 경험적 증거, 또는 이들 모두를 기초로 한다. 특정 실시형태에서, 분류의 방법 및 시스템은 알려진 질환 상태를 갖는 시료의 소위 훈련 세트를 사용한다. 일단 확립되면, 훈련 데이터 세트는 시료의 미지의 질환 상태를 분류하기 위해 미지의 시료의 특징을 비교하는 기준, 모델, 또는 주형 역할을 한다. 특정 사례에서, 시료의 분류는 시료의 질환 상태를 진단하는 것과 유사하다. 특정 다른 사례에서, 시료의 분류는 다른 질환 상태로부터 시료의 질환 상태를 구별하는 것과 유사하다.

[0062] 본 명세서에서 사용된 "암호화 영역"이라는 용어는 아미노산 잔기로 번역되는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 영역을 지칭하는 반면, "비암호화 영역"이라는 용어는 아미노산 잔기로 번역되지 않는 뉴클레오타이드 서열의 영역(예를 들어, 5' 및 3' 비번역 영역)을 지칭한다.

[0063] "상보체" 또는 "상보적인"은 두 핵산 가닥의 영역들 사이 또는 같은 핵산 가닥의 두 영역 사이의 서열 상보성의 광범위한 개념을 의미한다. 제1핵산 영역의 아데닌 잔기는 제2핵산 영역의 잔기가 티민 또는 우라실인 경우 제1 영역에 역평행한 이 잔기와 특이적인 수소 결합("염기 페어링")을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 제1핵산 가닥의 시토신 잔기는 제2핵산 가닥의 잔기가 구아닌인 경우 제1가닥에 역평행한 이 잔기와 염기 페어링할 수 있는 것으로 알려져 있다. 핵산의 제1 영역 및 핵산의 제2 영역이 역평행 방식으로 배열될 때, 제1 영역의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기가 제2 영역의 잔기와 염기 페어링할 수 있는 경우, 핵산의 제1 영역은 같거나 다른 핵산의 제2 영역에 상보적이다. 일 실시형태에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고 제2 영역은 제2 부분을 포함하며, 이에 의해, 제1 및 제2 부분이 역평행 방식으로 배열될 때, 제1 부분의 적어도 약 50%, 및 바람직하게는 적어도 약 75%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 뉴클레오타이드 잔기가 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기 페어링할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기가 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기 페어링할 수 있다.

[0064] 본 명세서에 사용된 "복합 항체"는 둘 이상의 비관련 가변 영역으로부터의 생식세포계열 또는 비-생식세포계열 면역글로불린 서열을 포함하는 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 추가로, "복합 인간 항체"라는 용어는 인간 생식세포계열 또는 비-생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 불변 영역 및 둘 이상의 비관련 인간 가변 영역으로부터의 인간 생식세포계열 또는 비-생식세포계열 서열을 포함하는 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 복합 인간 항체는 인체 내 항원성이 낮기 때문에 본 발명에 따른 치료제의 유효 성분으로서 유용하다.

[0065] "대조군"이라는 용어는 시험 시료 내 발현 산물과의 비교를 제공하기에 적합한 임의의 참조 표준을 지칭한다. 일 실시형태에서, 대조군은 발현 산물의 수준이 검출되고 시험 시료로부터의 발현 산물의 수준에 비교되는 "대조군 시료"를 수득하는 것을 포함한다. 이러한 대조군 시료는 결과가 알려진 대조군 암 환자의 시료(보관된 시료 또는 이전 시료 측정치일 수 있음); 정상 환자 또는 암 환자와 같은 대상체로부터 분리된 정상 조직 또는 세포, 정상 대상 또는 암 환자와 같은 대상체로부터 분리된 배양된 1차 세포/조직, 암 환자의 동일 기관 또는 신체 위치에서 얻은 인접 정상 세포/조직, 정상 대상체로부터 분리된 조직 또는 세포, 또는 기탁기관에서 얻은 1차 세포/조직을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 시료를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에서, 대조군은 하우스키핑 유전자, 정상 조직으로부터의 발현 산물 수준 범위(또는 다른 이전에 분석된 대조군 시료), 이전에 결정된 환자군의 시험 시료 내 발현 산물 수준 범위, 또는 특정 결과(예를 들어, 1년, 2년, 3

년, 4년 등의 기간 동안의 생존)를 갖거나 특정 치료(예를 들어, 표준 치료 암 요법)를 받는 환자의 세트를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 공급원으로부터의 참조 표준 발현 산물 수준을 포함할 수 있다. 이러한 대조군 시료 및 참조 표준 발현 산물 수준은 본 발명의 방법에서 대조군으로서 조합하여 사용될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 일 실시형태에서, 대조군은 정상 또는 비-암성 세포/조직 시료를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에서, 대조군은 암 환자의 세트와 같은 환자의 세트에 대한, 또는 특정 치료를 받는 암 환자의 세트에 대한, 또는 하나의 결과 대 다른 결과를 갖는 환자의 세트에 대한 발현 수준을 포함할 수 있다. 전자의 경우, 각 환자의 특이적 발현 산물 수준이 발현의 백분위 수준으로 부여되거나, 또는 참조 표준 발현 수준의 평균 보다 높거나 낮은 것으로 표현될 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에서, 대조군은 정상 세포, 병용 화학요법으로 치료받은 환자의 세포, 및 양성 암을 갖는 환자의 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 대조군은 또한 측정된 값, 예를 들어 동일 집단의 하우스키핑 유전자의 발현 수준과 비교된 집단의 특정 유전자의 발현 평균 수준을 포함할 수 있다. 이러한 집단은 정상 대상, 어떠한 치료도 받지 않은 암 환자(즉, 치료 경험 없음), 표준 치료 요법을 받고 있는 암 환자, 또는 양성 암을 갖는 환자를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에서, 대조군은 시험 시료 내 두 유전자의 발현 산물 수준의 비율을 결정하고 이들을 참조 표준 내 같은 두 유전자의 임의의 적합한 비율과 비교하는 것; 시험 시료 내 둘 이상의 유전자의 발현 산물 수준을 결정하고 임의의 적합한 대조군 내 발현 산물 수준의 차이를 결정하는 것; 및 시험 시료 내 둘 이상의 유전자의 발현 산물 수준을 결정하고, 이들의 발현을 시험 시료 내 하우스키핑 유전자의 발현으로 정규화하고, 임의의 적합한 대조군과 비교하는 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 발현 산물 수준의 비율 변환을 포함한다. 특히 바람직한 실시형태에서, 대조군은 시험 시료와 동일한 계통 및/또는 유형인 대조군 시료를 포함한다. 다른 실시형태에서, 대조군은 모든 암 환자와 같은 환자 시료의 세트 내에서 또는 이 세트에 기초한 백분위로 그룹화된 발현 산물 수준을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 예를 들어 특정 백분위수에 비해 높거나 낮은 발현 산물 수준이 결과를 예측하기 위한 기초로 사용되는 대조군 발현 산물 수준이 확립된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 대조군 발현 산물 수준은 결과가 알려진 암 대조군 환자의 발현 산물 수준을 사용하여 확립되고, 시험 시료의 발현 산물 수준은 결과를 예측하기 위한 기준으로서의 대조군 발현 산물 수준과 비교된다. 아래 데이터에 의해 입증된 바와 같이, 본 발명의 방법은 시험 시료 내 발현 산물 수준을 대조군에 비교할 때 특정 컷-포인트의 사용으로 제한되지 않는다.

[0066] 본 명세서에서 사용된 "Fc 영역"이라는 용어는 천연-서열 Fc 영역 및 변이형 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 Cys226 위치의 아미노산 잔기에서부터, 또는 Pro230에서부터, 이의 카복시-말단까지의 범위로 정의된다. 본 발명의 항체에 사용하기 위해 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2(IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 "Fc 수용체" 또는 "FcR"는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 말한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)와 결합하고 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하는 것으로, 대립유전자 변이체 및 대안적으로 이들 수용체의 스포라이싱된 형태를 포함하고, Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB("저해 수용체")를 포함하고, 주로 이의 세포질 도메인이 다른 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)을 함유한다. 저해 수용체 Fc γ RIIB는 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 저해 모티프(ITIM)을 함유한다(문헌[M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); 및 de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)]에서 검토되었다. 미래에 확인될 것을 포함하는 다른 FcR은 본 명세서의 "FcR"이라는 용어에 포함된다.

[0068] 분자가 기질로부터 해리되는 분자의 실질적인 단편 없이 액체(예를 들어, 표준 식염수 구연산염, pH 7.4)로 행 구어질 수 있는 것과 같은 기질과 공유 또는 비-공유적으로 연관되는 경우 분자는 기질에 "고정" 또는 "첨부"된다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변-도메인 잔기이다.

[0070] "기능-보전적 변이체"는 단백질 또는 효소에 주어진 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 전체적인 구조 및 기능을 변경하지 않으면서 변경된 것들로, 아미노산을 유사한 특성을 갖는 것으로 대체하는 것(예를 들어, 극성, 수소 결합 포텐셜, 산성, 염기성, 소수성, 방향족 등)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 보존된 것으로 나타낸

것들 이외의 아미노산은 단백질에서 다를 수 있으므로, 유사한 기능의 임의의 두 단백질 사이의 단백질 또는 아미노산 서열 유사성 퍼센트는 다를 수 있고, 예를 들어, 유사성을 MEGALIGN 알고리즘을 기반으로 하는 클러스터 방법에 의한 것과 같은 정렬 방식에 따라 결정되는 것으로 70 내지 99%일 수 있다. "기능-보전적 변이체"는 또한 BLAST 또는 FASTA 알고리즘에 의해 결정된 것으로 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 보다 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 동일성을 갖고, 비교되는 천연 또는 모계 단백질과 같거나 본질적으로 유사한 특성 또는 기능을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 "이중 항체"라는 용어는 이러한 항체를 생산하는 트랜스제닉 비-인간 유기체와 관련하여 정의된다. 이 용어는 상기 트랜스제닉 비-인간 동물로 구성되지 않는 유기체, 일반적으로 상기 트랜스제닉 비-인간 동물 이외의 종으로부터, 발견되는 것에 상응하는 아미노산 서열 또는 암호화 핵산 서열을 갖는 항체를 지칭한다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 "상동"은 같은 핵산 가닥의 두 영역 사이 또는 다른 두 핵산 가닥의 영역들 사이의 핵산 서열 유사성을 지칭한다. 두 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 같은 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유되면, 이때 상기 영역들은 그 위치에서 상동적이다. 제1 영역과 제2 영역 각각의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 같은 잔기에 의해 점유되는 경우, 제1 영역은 제2 영역과 상동적이다. 두 영역 사이의 상동성은 같은 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유되는 두 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 비율로 표현된다. 예를 들어, 5'-ATTGCC-3'의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 영역과 5'-TATGGC-3'의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 영역은 50% 상동성을 공유한다. 바람직하게는, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고 제2 영역은 제2 부분을 포함하며, 각 부분들의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 적어도 약 50%, 및 바람직하게는 적어도 약 75%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%가 같은 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다. 보다 바람직하게는, 각 부분들의 모든 뉴클레오타이드 잔기 위치가 같은 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다.

[0073] 본 명세서에서 사용된 "숙주 세포"라는 용어는 본 발명의 핵산, 예를 들어 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. "숙주 세포"라는 용어와 "재조합 숙주 세포"라는 용어는 본 명세서에서 호환 가능하게 사용된다. 이 용어들은 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭하는 것으로 이해해야 한다. 특정 변형은 돌연변이 또는 환경적인 영향에 의해 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 실제로 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용된 용어의 범위 내에 포함된다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 "인간화 항체"라는 용어는 인간 세포에 의해 만들어질 항체에 더 유사하게 변경된 가변 및 불변 영역을 갖는 비-인간 세포에 의해 만들어진 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열에서 발견되는 아미노산을 포함하도록 비-인간 항체 아미노산 서열을 변경하여, 인간화 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열(예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 위치-특이적 돌연변이 유발 또는 생체 내 체세포 돌연변이), 예를 들어 CDR에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "인간화 항체"라는 용어는 또한 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식된 항체를 포함한다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 인간화 마우스는 기능하는 인간 유전자(예를 들어, HHLA2, TMIGD2, 및/또는 KIR3DL3), 세포, 조직, 및/또는 기관을 운반하는 마우스이다. 인간화 마우스는 일반적으로 인간의 치료제를 위한 생물학적 및 의학적 연구에서 작은 동물 모델로 사용된다. 누드 마우스 및 중증 합병 면역부전증(SCID) 마우스가 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다. NCG 마우스, NOG 마우스 및 NSG 마우스가 다른 모델들에 비해 보다 효과적으로 인간 세포 및 조직을 이식하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 인간화 마우스 모델은 건강 및 병리적 시나리오에서 인간 면역 시스템을 모델화하기 위해 사용될 수 있고, 인간 생리와 관련된 생체 내 환경에서 치료제 후보의 평가를 가능하게 할 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 사용된 "초가변 영역," "HVR," 또는 "HV,"는 서열에서 초가변적이고/이거나 구조적으로 정의된 루프를 형성하는 항체-가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR을 포함한다; VH에 3개(H1, H2, H3), 및 VL에 3개(L1, L2, L3). 천연 항체에서, H3 및 L3가 6개의 HVR 중 가장 다양성을 나타내며, 특히 H3는 항체에 우수한 특이성을 부여하는데에 독특한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, Xu *et al.* (2000) *Immunity* 13, 37-45; Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248, 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)) 참조. 실제로, 중쇄 만으로 이루어지는 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄가 없음에도 기능적이고 안정적이다(예를 들어, Hamers-Casterman *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448 (1993) 및 Sheriff *et al.* (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 733-736 참조).

- [0077] 본 명세서에서 사용된 "면역 세포"라는 용어는 면역 반응에서 역할을 하는 세포를 지칭한다. 면역 세포는 조혈 기원이며, B 세포 및 T 세포와 같은 림프구; 자연 살해 세포; 단핵구, 대식세포, 호산구, 비만세포, 호염구, 및 과립구와 같은 골수 세포를 포함한다.
- [0078] 본 명세서에서 사용된 "면역 장애"라는 용어는 암, 만성 염증성 질환 및 장애(예를 들어, 크론병, 염증성 장 질환, 반응성 관절염, 및 라임병 포함), 인슐린-의존성 당뇨병, 장기 특이적 자가면역(예를 들어, 다발성 경화증, 하시모토 갑상선염, 자가면역 포도막염, 및 그레이브병 포함), 접촉성 피부염, 건선, 이식 거부, 이식 편대 숙주 질환, 사르코이드증, 아포티성 상태(예를 들어, 알레르기성 비염 및 음식 알레르기와 같은 위장 알레르기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 천식 및 알레르기 포함), 호산구 증가증, 결막염, 사구체 신염, 전신성 홍반성 루푸스, 경피증, 기생충성(예를 들어, 리슈만편모충증 포함)과 같은 특정 병원체 민감성 및 특정 바이러스 감염(예를 들어, HIV 및 결핵균 및 나종나와 같은 박테리아성 감염 포함) 및 말라리아를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 면역 질환, 상태, 및 소인을 포함한다.
- [0079] 본 명세서에서 사용된 "면역 반응"이라는 용어는 T 세포 매개 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 예시적으로 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들어 사이토카인 생산, 및 세포 독성을 포함한다. 추가로, 용어 면역 반응은 T 세포 활성화에 의해 간접적으로 영향받는 면역 반응, 예를 들어 항체 생산(체액 반응) 및 사이토카인 반응성 세포, 예를 들어 대식세포의 활성화를 포함한다.
- [0080] 용어 "면역치료제"는 대상체의 종양 또는 암에 대한 면역 반응을 생성하는 숙주 면역 시스템을 자극할 수 있는 임의의 분자, 펩타이드, 항체 또는 다른 물질을 포함할 수 있다. 다양한 면역치료제가 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법에 유용하다.
- [0081] 용어 "면역 관문"는 항-종양 면역 반응을 하향-조절하거나 저해하는 면역 반응을 미세 조정하는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 세포 표면 상 분자군을 지칭한다. 면역 관문 단백질은 당업계에서 잘 알려져 있으며 CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, ICOS, HVEM, PD-L2, CD160, gp49B, PIR-B, KIR 패밀리의 수용체, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3, GITR, 4-1BB, OX-40, BTLA, SIRPalpha(CD47), CD48, 2B4(CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, 부티로필린(butyrophilin), 및 A2aR(예를 들어, WO 2012/177624 참조)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이 용어는 또한 생물학적 활성 단백질 단편뿐만 아니라, 면역 관문 단백질 전장 및 이의 생물학적 활성 단백질 단편을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이 용어는 또한 본 명세서에서 제공된 상동성 설명에 따른 임의의 단편을 포함한다.
- [0082] 면역 관문 및 이들의 서열은 당업계에서 잘 알려져 있으며 대표적인 실시형태를 아래에 설명한다. 예를 들어, 용어 "PD-1"은 공지된 리간드로서 PD-L1 및 PD-L2를 갖는 공동저해 수용체로서 기능하는 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리의 구성원을 지칭한다. PD-1은 TCR-유도 활성화 T 세포 사멸 과정에서 상향조절되는 유전자를 선별하기 위한 감산 클로닝 기반 접근법을 사용하여 이전에 확인되었다. PD-1은 PD-L1에 결합하는 능력을 기준으로 하는 분자들 중 CD28/CTLA-4 패밀리의 구성원이다. CTLA-4와 같이, PD-1은 항-CD3에 반응하여 T-세포 표면 상에 빠르게 유도된다(Agata *et al.* 25 (1996) *Int. Immunol.* 8:765). 그러나, CTLA-4와 달리, PD-1은 B-세포의 표면 상에도(항-IgM에 반응하여) 유도된다. PD-1은 또한 흉선세포와 골수세포의 하위집단에서도 발현된다(Agata *et al.* (1996) *supra*; Nishimura *et al.* (1996) *Int. Immunol.* 8:773).
- [0083] 본 명세서에서 사용된 "저해"라는 용어 및 이의 문법적으로 같은 용어는 특정 작용, 기능, 또는 상호작용을 감소, 제한, 및/또는 차단하는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 이 용어는 양에 대한 주어진 산출량 또는 파라미터(예를 들어, 배경 염색, HHLA2 신호전달, HHLA2 면역저해 기능 등)의 수준을 상응하는 대조군의 양 보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이하로 감소시키는 것을 의미한다. 주어진 산출량 또는 파라미터의 감소된 수준은 이 산출량 또는 파라미터의 완전한 부재를 의미할 수 있지만, 이것이 반드시 필요한 것은 아니다. 본 발명은 이 산출량 또는 파라미터를 완전히 제거하는 방법을 요하지 않으며, 이에 제한되지 않는다. 주어진 산출량 또는 파라미터는 본 명세서 및 실시예에서 논의된 바와 같은, 면역조직화학적, 분자 생물학적, 세포 생물학적, 임상적, 및 생화학적 분석을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 반대 용어 "촉진", "증가", 및 이의 문법적으로 같은 용어는 저해 또는 감소에 대해 설명한 것과 반대로 주어진 산출량 또는 파라미터의 수준을 증가시키는 것을 의미한다.
- [0084] 본 명세서에서 사용된 용어 "상호작용"은, 두 분자 사이의 상호작용을 지칭할 때, 분자와 다른 하나의 물리적인 접촉(예를 들어, 결합)을 의미한다(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2의 결합 또는 HHLA2와 KIR3DL3의 결합). 일반적으로, 이러한 상호작용은 상기 분자들 중 하나 또는 둘 모두의 활성(생물학적 효과를 생산하는)을 초래한다. 이

활성은 이 분자들 중 하나 또는 둘 모두의 직접적인 활성일 수 있다(예를 들어, 신호 전달). 대안적으로, 이 상호작용에서 하나 또는 두 분자는 이의 리간드 결합이 차단될 수 있고, 그러므로 리간드 결합 활성에 관하여 불활성으로 유지될 수 있다(예를 들어, 이의 리간드에 결합하고 면역 반응을 유발 또는 저해함). 이러한 상호작용을 저해하는 것은 이 상호작용에 적용된 하나 이상의 분자들의 활성 방해로 초래한다. 이러한 상호작용을 강화하는 것은 상기 물리적인 접촉의 가능성을 연장 또는 증가시키는 것이고, 상기 활성의 가능성을 연장 또는 증가시키는 것이다.

[0085] 용어 "신보조요법"(neoadjuvant therapy)은 주요 치료 전에 주어지는 치료를 지칭한다. 신보조요법의 예시로 화학요법, 방사능요법, 및 호르몬요법이 포함될 수 있다.

[0086] 본 명세서에서 사용된 용어 "단리된 항체"는 다른 항원 특이성을 갖는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, HHLA2에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 HHLA2에 결합하지 않는 항체들이 실질적으로 없다). 그러나, HHLA2에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 서로 다른 종들로부터의 다른 B7 패밀리에 대해 각각 교차 반응성을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항체는 적어도 두 종, 예를 들어 인간과 다른 동물, 예를 들어 쥐와 동물, 또는 다른 포유동물 또는 비-포유동물 중에 대한 특이적 결합 친화성을 유지한다. 그러나, 일부 실시형태에서, 항체는 인간 HHLA2에 대해 더 높거나 실제의 특이적 친화력 및 선택성을 유지한다. 또한, 단리된 항체는 일반적으로 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없다. 본 발명의 일 실시형태에서, 인간 HHLA2에 대한 서로 다른 특이성을 갖는 "단리된" 단일클론성 항체들의 조합은 잘-정의된 조성물로 조합된다.

[0087] 본 명세서에서 사용된, "단리된 단백질"은 세포로부터 단리되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산되었을 때, 다른 단백질, 세포 물질, 분리 배지, 및 배양 배지가 실질적으로 없는 단백질, 또는 화학적으로 합성되었을 때, 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 단백질을 지칭한다. "단리된" 또는 "정제된" 단백질 또는 이의 생물학적 활성 부분은 세포 물질 또는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질이 유리되는 세포 또는 조직 공급원 유래의 다른 오염 단백질이 없거나, 화학적으로 합성된 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없다. "세포 물질이 실질적으로 없다"는 용어는 단리된 또는 재조합으로 생산된 세포의 성분으로부터 분리된 단백질로 표적 폴리펩타이드(예를 들어, 면역글로불린) 또는 이의 단편의 체제를 포함한다. 일 실시형태에서, 용어 "세포 물질이 실질적으로 없다"는 비-표적 단백질(본 명세서에서는 "오염 단백질"이라고도 지칭함)을 약 30%(건조 중량) 미만으로 갖는, 보다 바람직하게는 비-표적 단백질을 약 20% 미만으로 갖는, 보다 바람직하게는 비-표적 단백질을 약 10% 미만으로 갖는, 가장 바람직하게는 비-표적 단백질을 약 5% 미만으로 갖는, 표적 단백질 또는 이의 단편의 체제를 포함한다. 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어 이의 생물학적 활성 단편이 재조합으로 생산될 때, 바람직하게는 배양 배지 또한 실질적으로 없고, 즉, 배양 배지는 단백질 조제용 물질의 부피의 약 20% 미만이고, 보다 바람직하게는 약 10% 미만이고, 가장 바람직하게는 약 5% 미만이다.

[0088] 본 명세서에서 사용된, 용어 "아이소타입"(isotype)은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화되는 항체 부류(예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

[0089] 본 명세서에서 사용된, 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 개시된 발명의 항체의 결합 친화성은 표준 항체-항원 분석법, 예를 들어 경쟁 분석법, 포화 분석법, 또는 ELISA 또는 RIA와 같은 표준 면역분석법으로 측정 또는 결정할 수 있다.

[0090] 본 명세서에서 사용된, "키트"는 적어도 하나의 시약, 예를 들어 본 발명의 마커의 발현을 특이적으로 검출하거나 조절하기 위한 탐침을 포함하는 임의의 제품(예를 들어, 패키지 또는 용기)이다. 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위해 구성 단위로 홍보, 배포, 또는 판매될 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용된, 용어 "단일클론성 항체"는 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내는 항체를 지칭한다. 따라서, 용어 "인간 단일클론성 항체"는 단일 결합 특이성을 나타내고 인간 생식세포계열 또는 비-생식세포계열 면역글로불린 서열에서 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 일 실시형태에서, 인간 단일클론성 항체는 인간 중쇄 전이유전자 및 경쇄 전이유전자를 포함하는 게놈을 갖는 유전자 이식 비-인간 동물, 예를 들어 유전자 이식 마우스로부터 얻어진 B 세포와 불멸화 세포의 융합을 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0092] "마커"는 정상 또는 건강한 조직 또는 세포의 발현 수준으로부터 변화된 발현 수준이 질환 상태, 예를 들어 암과 연관되는 유전자이다. "마커 핵산"은 본 발명의 마커에 의해 암호화되거나 이에 상응하는 핵산(예를 들어,

mRNA, cDNA)이다. 이러한 마커 핵산은 서열목록에 기재된 임의의 핵산 서열의 전체 또는 부분 서열 또는 이 서열의 상보물을 포함하는 DNA(예를 들어, cDNA)를 포함한다. 마커 핵산은 또한 서열목록에 기재된 임의의 핵산 서열의 전체 또는 부분 서열 또는 이 서열의 상보물을 포함하는, 여기서 모든 티미딘 잔기는 우라실 잔기로 치환된, RNA를 포함한다. "마커 단백질"은 본 발명의 마커에 의해 암호화되거나 이에 상응하는 단백질이다. 마커 단백질은 서열목록에 기재된 임의의 서열의 전체 또는 부분 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전체 HHLA2가 마커로 사용된다. 다른 실시형태에서, HHLA2의 단편이 마커로 사용된다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 호환 가능하게 사용된다.

[0093] 본 명세서에서 사용된, 용어 "조절"은 상향-조절 및 하향-조절, 예를 들어 반응을 높이는 것 또는 저해하는 것을 포함한다.

[0094] 마커의 발현의 "정상" 수준은 비정상적 마커 수준에 관련된 질환 또는 장애를 앓지 않는 대상, 예를 들어 인간 환자의 세포에서 마커의 발현 수준이다. 마커의 "과-발현" 또는 "유의적으로 높은 발현 수준"은 발현을 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 오차보다 더 큰 시험 시료의 발현 수준을 의미하며, 바람직하게는 대조군 시료(예를 들어, 마커 연관 질환을 갖지 않는 건강한 대상체의 시료)의 마커 발현 수준, 바람직하게는 여러 대조군 시료의 평균 마커 발현 수준의 적어도 두배, 보다 바람직하게는 세배, 네배, 다섯배, 또는 열배이다. 마커의 "유의적으로 낮은 발현 수준"은 대조군 시료(예를 들어, 마커 연관 질환을 갖지 않는 건강한 대상체의 시료)의 마커 발현 수준, 바람직하게는 여러 대조군 시료의 평균 마커 발현 수준 보다 적어도 두배, 보다 바람직하게는 세배, 네배, 다섯배 또는 열배 낮은 시험 시료의 발현 수준을 의미한다.

[0095] 이러한 "유의성" 수준은 또한 본 명세서에 기술된 임의의 다른 측정된 파라미터, 예를 들어 발현, 저해, 세포독성, 세포성장 등에 적용될 수 있다.

[0096] 용어 "미리-결정된" 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는, 단지 예시로, 특정 치료를 위해 선택될 수 있는 대상을 평가하기 위해, HHLA2 경로의 하나 이상의 조절제, 예를 들어 HHLA2 및 하나 이상의 천연 결합 상대의 조절제, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3,와 같은 치료제 단독 또는 하나 이상의 면역치료와의 조합에 대한 반응을 평가하기 위해, 및/또는 질환 상태를 평가하기 위해 사용되는 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치일 수 있다. 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 암을 갖는 또는 갖지 않는 환자의 집단에서 결정될 수 있다. 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 모든 환자에 동등하게 적용할 수 있는 단일 숫자일 수 있고, 또는 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 환자의 특정 소집단에 따라 다양할 수 있다. 대상체의 연령, 체중, 키, 및 다른 요인들은 개인의 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치에 영향을 미칠 수 있다. 더욱이, 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성은 각 대상체에 대해 개별적으로 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 결정된 및/또는 비교된 양은 절대 측정을 기반으로 한다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 결정된 및/또는 비교된 양은 상대적인 측정, 예를 들어 비율(예를 들어, 세포 비율 또는 하우스키핑 또는 다른 일반적으로 일정한 바이오마커의 발현에 대해 정규화한 혈청 바이오마커)을 기반으로 한다. 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 임의의 적합한 표준일 수 있다. 예를 들어, 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 환자 선택이 평가되는 같거나 다른 인간으로부터 얻어질 수 있다. 일 실시형태에서, 미리-결정된 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 같은 환자의 이전 평가로부터 얻어질 수 있다. 이러한 방식에서, 환자 선택의 경과를 시간에 걸쳐 모니터링할 수 있다. 추가로, 대조군은 대상체가 인간인 경우, 다른 인간 또는 여러 인간, 예를 들어 선택된 인간 군의 평가로부터 얻어질 수 있다. 이러한 방식에서, 선택이 평가되는 인간의 선택 정도는 적합한 다른 인간, 예를 들어 관심 인간과 유사한 입장에 처한 다른 인간, 예를 들어 유사하거나 같은 상태를 겪는 사람들 및/또는 같은 인종군과 비교될 수 있다.

[0097] 용어 "예측"은 HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 하나 이상의 천연 결합 상대, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3, 사이의 상호작용의 조절제 단독 또는 면역요법, 예를 들어 면역 관문 저해 요법과의 조합)과 같은 면역조절 요법에 대한 암의 반응 가능성을 결정하기 위한, 바이오마커 핵산 및/또는 단백질 상태, 예를 들어 요법 이전, 중 또는 이후 종양의 과다- 또는 하-활성, 발생, 발현, 성장, 경감, 재발 또는 저해의 사용을 포함한다. 이러한 바이오마커의 예측적인 사용은 예를 들어 (1) 증가 또는 감소된 카피 수(예를 들어, FISH, FISH + SKY, 단일-분자 시퀀싱, 예를 들어 적어도 J. Biotechnol., 86:289-301에 기술된 바와 같은 단일-분자 시퀀싱, 또는 qPCR에 의한), 바이오마커 핵산의 과발현 또는 하발현(예를 들어, ISH, 노던 블롯, 또는 qPCR에 의한), 증가 또는 감소된 바이오마커 단백질(예를 들어, IHC에 의한) 및/또는 바이오마커 표적, 또는 분석된 인간 암 유형 또는 암 시료의 증가 또는 감소된, 예를 들어 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 또는 그 이상 증가 또는 감소된 활성; (2) 암을 앓는 대상, 예를 들어 인간으로부터의 생물학적 시료, 예를 들어 조직, 전혈, 혈청, 혈장, 구강 스크레이프, 타액, 뇌척

수액, 소변, 대변, 또는 골수 시료 내 이의 완전히 또는 상대적으로 조절된 존재 또는 부재; (3) 암(예를 들어, 특정 면역조절 요법(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2 및 하나 이상의 천연 결합 상대, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3, 사이의 상호작용 조절제 단독 또는 면역요법과의 조합))에 반응하는 것 또는 이들에 저항을 일으키는 것)을 갖는 환자의 임상 하위 집단에서 이의 완전히 또는 상대적으로 조절된 존재 또는 부재에 의해 확인될 수 있다.

[0098] 용어 "예방", "예방적 치료" 및 유사 용어는 질환, 장애 또는 상태를 갖지는 않지만 이의 발생 위험이 있거나 이의 발생을 허용하는 대상체의 질환, 장애 또는 상태의 발생 가능성을 감소시키는 것을 의미한다.

[0099] 용어 "예후"는 암의 가능한 진행 및 결과 또는 질환으로부터의 회복 가능성의 예측을 포함한다. 일부 실시형태에서, 통계학적 알고리즘의 사용은 개인의 암 예후를 제공한다. 예를 들어, 예후는 수술, 암의 임상적 하위유형의 발생(예를 들어, 폐암, 흑색종, 및 신장세포 암종과 같은 고형 종양), 하나 이상의 임상적 요인의 발생, 장암의 발생, 또는 질환으로부터의 회복일 수 있다.

[0100] 용어 "요법에 대한 반응"(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 하나 이상의 천연 결합 상대, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3, 사이의 상호작용의 조절제 단독 또는 면역요법, 예를 들어 면역 관문 저해 요법,과의 조합))은 요법(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 하나 이상의 천연 결합 상대, 예를 들어 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3, 사이의 상호작용의 조절제 단독 또는 면역요법, 예를 들어 면역 관문 저해 요법,과의 조합))에 대한 임의의 반응, 및 암의 경우, 바람직하게는 신보조제 또는 보조제 화학요법의 개시 이후 암 세포 수, 종양 질량, 및/또는 부피의 변화에 관한 것이다. 과증식성 장애 반응은 예를 들어 효능을 위해 또는 신보조제 또는 보조제 상황에서 평가할 수 있으며, 여기서 전신성 간섭 이후 종양의 크기는 CT, PET, 유방촬영, 초음파 또는 촉진(palpation)으로 측정하여 초기 크기 및 용적에 비교할 수 있다. 반응은 또한 생검 또는 수술적 절제 이후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 검사로 평가할 수 있다. 반응은 종양 부피의 백분율 변화와 같은 정량적인 방식 또는 "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상적 완전 완화"(cCR), "임상적 부분 완화"(cPR), "임상적 안정적 질환"(cSD), "임상적 진행성 질환"(cPD) 또는 다른 정성적 기준과 같은 정성적인 방식으로 기록될 수 있다. 과증식성 장애 반응의 평가는 신보조제 또는 보조제 요법의 시작 이후 초기에, 예를 들어 몇 시간, 며칠, 몇 주 이후 또는 바람직하게는 몇 달 이후에 수행할 수 있다. 반응 평가의 전형적인 종말점은 신보조제 화학요법의 종료 또는 잔여 종양 세포 및/또는 종양 부위의 수술적인 제거 시기이다. 이는 전형적으로 신보조제 요법의 개시 이후 3개월이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 치료법의 임상적 효능은 임상적 이익률(CBR)을 측정하여 결정할 수 있다. 임상적 이익률은 요법의 종료 시점에서 적어도 6개월 경과한 시점에 완전 완화(CR) 환자의 백분율, 부분 완화(PR) 환자수 및 안정적 질환(SD)을 갖는 환자수의 합을 결정하여 측정할 수 있다. 이 공식은 6개월에 걸친 $CBR=CR+PR+SD$ 이다. 일부 실시형태에서, 특정 암 치료 요법에 대한 CBR은 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 그 이상이다. 암 요법에 대한 반응을 평가하기 위한 추가 기준은 다음 모두를 포함하는 "생존"에 관련이 있다: 사망까지의 생존, 전체 생존으로도 알려짐(여기서 상기 사망은 원인과 무관하거나 종양과 관련된 것일 수 있음); "재발없는 생존"(여기서 용어 재발은 국소 및 원발성 재발 모두 포함됨); 전이없는 생존; 무질환 생존(여기서 용어 질환은 암 및 이와 연관된 질환을 포함함). 상기 생존의 기간은 정의된 시작 시점(예를 들어, 진단 또는 치료 시작 시간) 및 종료 시점(예를 들어, 죽음, 재발 또는 전이)을 참조하여 계산할 수 있다. 추가로, 치료 효능을 위한 기준은 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 시기 내의 전이 확률, 및 종양 재발 확률을 포함하도록 확장할 수 있다. 예를 들어, 적절한 역치(역치)를 결정하기 위해, 특정 암 치료 요법이 대상 집단에 실시될 수 있고 결과는 임의의 면역조절 요법의 실시 전에 결정된 바이오마커 측정치와 상호관련된 것일 수 있다. 결과 측정치는 신보조제 설정에서 주어진 요법에 대한 병리학적 반응일 수 있다. 대안적으로, 전체 생존 및 질환없는 생존과 같은 결과 정도는 바이오마커 측정 값이 알려진 면역조절 요법을 따르는 대상체에 대한 시간 동안 모니터링될 수 있다. 특정 실시형태에서, 투여량은 암 치료제에 대해 당업계에서 알려진 표준 투여량이다. 대상체의 모니터링 시간은 다양할 수 있다. 예를 들어, 대상은 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60개월 동안 모니터링될 수 있다.

[0101] 용어 "저항"(혹은 내성)(resistance)은 면역조절 요법에 대한 암 시료 또는 포유동물의 후천적 또는 자연적 저항(즉, 치료에 대해 비응답성으로 되거나 감소된 또는 제한된 반응을 갖는 것), 예를 들어 치료에 대해 5% 이상, 예를 들어 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 또는 그 이상, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배 또는 그 이상 감소된 반응을 갖는 것을 의미한다. 반응 감소는 저항성이 획득되기 전 같은 암 시료 또는 포유동물과의 비교, 또는 치료에 대해 저항이 없는 것으로 알려진 다른 암 시료 또는 포유동물과의 비교를 통해 측정할 수 있다. 화학요법에 대한 전형적인 후천성

저항은 "다제 내성"이라고 부른다. 다제 내성은 P-당단백질 또는 다른 메커니즘에 의해 매개될 수 있고, 또는 포유동물이 다제-내성 미생물 또는 미생물들의 조합에 감염되었을 때 발생할 수 있다. 치료에 대한 저항을 결정하는 것은 당업계에서 일상적이며, 예를 들어 본 명세서에서 "감작"으로 기술된 바와 같이 세포 증식 분석 및 세포 사멸 분석을 통해 측정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "역저항성"(reverses resistance)은 주요 암 요법(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 요법) 단독으로는 비처리 종양의 부피와 비교하여 통계적으로 유의적인 종양 부피 감소를 나타내지 못하는 상황에서 주요 암 요법(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 요법)과 조합하여 제2의 제제를 사용하는 것이 비처리 종양의 부피와 비교할 때 통계적으로 유의한 수준(예를 들어, $p < 0.05$)으로 종양의 부피를 유의적으로 감소시킬 수 있는 것을 의미한다. 이것은 일반적으로 비처리 종양이 대수 성장할 때 종양 부피 측정에 적용된다.

[0102] 용어 "반응" 또는 "반응성"은 요법에 대한 반응을 지칭한다. 예를 들어, 항-암 반응은 종양 크기의 감소 또는 종양 성장의 저해를 포함한다. 이 용어는 또한, 예를 들어 재발까지의 시간 증가, 즉 첫 번째 사건으로 두 번째 원발성 암에 대한 첫 번째 재발 검열 또는 재발의 증거가 없는 죽음까지의 기간, 또는 전체 생존 증가, 즉 치료에서부터 임의의 원인으로 인한 사망까지의 기간이 반영된 것과 같은, 개선된 예후를 지칭할 수 있다. 반응하는 것 또는 반응을 갖는다는 것은 자극에 노출되었을 때 달성되는 유익한 종말점이 있다는 것을 의미한다. 대안적으로, 자극에 노출되었을 때 음성적 또는 유해한 증상이 최소화, 완화 또는 약화된다. 종양 또는 대상체가 유리한 반응을 나타낼 가능성을 평가하는 것은 종양 또는 대상체가 유리한 반응을 나타내지 않을(즉, 반응 결핍을 나타내거나 비-반응성으로 될) 가능성을 평가하는 것과 동일하다고 인식될 것이다.

[0103] 용어 "내성"(tolerance) 또는 "무반응성"은 자극, 예를 들어 활성화 수용체 또는 사이토카인을 통한 자극에 대한 면역 세포와 같은 세포의 굴절성을 포함한다. 무반응성은 예를 들어 면역억제제에의 노출 또는 높은 투여량의 항원에의 노출 때문에 발생할 수 있다. 몇몇 독립적인 방법이 내성을 유도할 수 있다. 하나의 메커니즘은 "아네르기"로 지칭되며, 이펙터 기능을 갖는 세포로 분화되지 않고 무반응성 세포로 생체 내에 지속되는 상태로 정의된다. 이러한 굴절성은 일반적으로 항원-특이적이고 내성 항원 노출이 중단된 이후에도 지속된다. 예를 들어, T 세포의 아네르기는 사이토카인 생산, 예를 들어 IL-2가 부족한 특징이 있다. T 세포 아네르기는 T 세포가 항원에 노출되고 두 번째 신호(공동자극 신호)가 없는 상태에서 첫 번째 신호(T 세포 수용체 또는 CD-3 매개 신호)를 받을 때 발생한다. 이러한 조건 하에서, 세포가 같은 항원에 재노출되면(공동자극성 폴리펩타이드의 존재 내에서 재노출이 발생하더라도) 사이토카인 생산을 실패하게 되고, 이에 따라, 증식을 실패하게 된다. 하지만, 아네르기성 T 세포는 사이토카인(예를 들어, IL-2)과 함께 배양되면 증식할 수 있다. 예를 들어, T 세포 아네르기는 ELISA 또는 지표 세포주를 사용한 증식 분석으로 측정되는 T 림프구에 의한 IL-2 생산 부족을 통해 관찰될 수도 있다. 대안적으로, 리포터 유전자 작제물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 아네르기성 T 세포는 5' IL-2 유전자 인핸서(enhancer)의 제어 하에서 이중기원의 프로모터에 의해 또는 인핸서 내에서 발견될 수 있는 AP1 서열의 멀티머(multimer)에 의해 유도되는 IL-2 유전자 전사를 개시하지 못한다(Kang *et al.* (1992) *Science* 257:1134). 또 다른 메커니즘은 "탈진"(exhaustion)으로 지칭된다. T 세포 탈진은 많은 만성적 감염 및 암의 과정에서 발생하는 T 세포의 기능장애 상태이다. 이는 빈약한 이펙터 기능, 저해 수용체들의 지속적인 발현 및 기능성 이펙터 또는 메모리 T 세포와 구별되는 전사 상태로 정의된다.

[0104] 본 명세서에서 사용된, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있으나, 바람직하게는 이중-가닥 DNA이다. 본 명세서에서 사용된, HHLA2에 결합하는 항체 또는 항체 부분(예를 들어, V_H , V_L , CDR3)(예를 들어, mAbs 2G2, 4D1, 8A12, 8D2, 1C8, 2C4, 6D10, 4E5, 및 6F10 및 다클론 항체)을 암호화하는 핵산과 관련한 용어 "단리된 핵산 분자"는, 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 HHLA2와 다른 항원에 결합하는 항체 또는 항체 부분을 암호화하는 다른 뉴클레오타이드 서열로부터 자유로운 핵산 분자를 지칭하는 것을 의미하며, 이때 다른 서열은 인간 게놈 DNA 내 핵산 옆에 자연적으로 있을 수 있다.

[0105] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서가 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 이 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동 가능하게 연결되었다는 것은 연결된 DNA 서열이 연속적이며, 두 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 곳에, 인접하고 리딩 프레임 내에 있다는 것을 의미한다. 스위치 서열의 경우, 작동 가능하게 연결되었다는 것은 그 서열이 스위치 재조합에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0106] 마커의 "과-발현" 또는 "유의적으로 높은 수준의 발현"은 발현을 평가하기 위해 사용된 분석의 표준 오차 보다 더 크고, 바람직하게는 대조군 시료(예를 들어, 마커 관련 질환을 갖지 않는 건강한 대상체의 시료)의 마커 발

현 활성 또는 수준, 및 바람직하게는 여러 대조군 시료의 평균 마커 발현 수준 보다 적어도 두배, 및 보다 바람직하게는 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 또는 그 이상 더 높은 시험 시료의 발현 수준을 지칭한다. 마커의 "유의적으로 낮은 수준의 발현"은 대조군 시료(예를 들어, 마커 관련 질환을 갖지 않는 건강한 대상체의 시료)의 마커 발현 수준 및 바람직하게는 여러 대조군 시료의 평균 마커 발현 수준 보다 적어도 두배, 및 보다 바람직하게는 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 또는 그 이상 더 낮은 시험 시료의 발현 수준을 지칭한다.

[0107] 본 발명에 기술된 항체는 방사면역분석법, 웨스턴블롯 분석법, 면역형광 분석법, 효소 면역분석법, 면역침전 분석법, 화학발광 분석법, 면역조직화학적 분석법, 도트 블롯 분석법, 또는 슬롯 블롯 분석법을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 잘 알려진 면역분석 형태 중 임의의 하나에서 사용될 수 있다. 인시츄 근접 결합 분석법(PLA), 형광 편광 면역분석법(FPIA), 형광 면역분석법(FIA), 효소 면역분석법(EIA), 혼탁 저해 면역분석법(NIA), 효소 결합면역흡착분석법(ELISA), 및 방사면역분석법(RIA), ELISA, 등의 단독 또는 NMR, MALDI-TOF, LC-MS/MS와 조합 또는 대안적 적용,과 같은 위에서 언급한 다양한 면역분석법 및 기술의 다른 변형을 수행하는데 사용되는 일반적인 기술은 당업자에게 공지되어 있다.

[0108] 시약은 예를 들어 저해제의 최적 투여량을 모니터하기 위한 임상 시험 절차의 일부로, 세포 또는 조직, 예를 들어 백혈구 또는 림프구, 내 단백질 수준을 모니터하기 위해 사용될 수도 있다. 검출은 항체와 검출가능 물질의 결합(예를 들어, 물리적인 연결)을 통해 촉진할 수 있다. 검출가능 물질의 예시로 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질, 및 방사성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예시로는 겨자무과산화수소, 알칼라인 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제가 포함되고; 적합한 보결분자단 복합체의 예시로는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예시로는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 다이클로로트라이아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리드린이 포함되고; 발광 물질의 예시로는 루미놀이 포함되고; 생물발광 물질의 예시로는 루시페라제, 루시페린, 및 에쿼린이 포함되고, 적합한 방사성 물질의 예시로는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 또는 ^3H 이 포함된다.

[0109] 이러한 시약은 임의의 수의 생물학적 시료와 함께 사용될 수 있다. 생물학적 시료는 핵산 및/또는 단백질을 포함하는 체액 시료, 세포 시료, 또는 조직 시료를 포함하는 환자의 다양한 공급원으로부터 수집된 것일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 대상 및/또는 대조군 시료는 세포, 세포주, 조직 슬라이드, 파라핀 포매된 조직, 생검, 전혈, 유두 흡입물, 혈청, 혈장, 구강 스크레이프, 타액, 뇌척수액, 소변, 대변, 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다. 일 실시형태에서, 시료는 혈청, 혈장, 또는 소변이다. 다른 실시형태에서, 시료는 혈청이다.

[0110] 시료는 장시간에 걸쳐 반복적으로 개인으로부터 수집될 수 있다(예를 들어, 일, 주, 월, 연, 2년 등의 순서로 한번 이상). 시간에 걸쳐 개인으로부터 다수의 시료를 얻는 것은 초기 검출 결과를 확인하기 위해 및/또는 예를 들어, 질환의 진행, 약물 치료 등의 결과로 생물학적 양상의 변화를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상 시료는 본 발명에 따라 매달, 2달 마다, 또는 1달, 2달, 또는 3달 간격의 조합으로 취하고 모니터할 수 있다. 추가로, 시간에 걸쳐 얻은 대상체의 바이오마커 양 및/또는 활성 측정치는 서로 뿐만 아니라 모니터 기간 동안 일반 대조군과 편리하게 비교될 수 있고, 이에 따라 장기 모니터링을 위한 내부, 또는 개인적 대조군으로서 대상 자신의 값을 제공한다.

[0111] 시료는 살아있는 세포/조직, 신선한 냉동 세포, 신선한 조직, 생검, 고정된 세포/조직, 파라핀과 같은 매체에 포매된 세포/조직, 조직 슬라이드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0112] 시료 준비 및 분리에는 수집된 시료의 유형 및/또는 바이오마커 측정 분석에 따른 임의의 절차가 포함될 수 있다. 이러한 절차는, 단지 예시로, 농축, 희석, pH 적정, 고농도 폴리펩타이드의 제거(예를 들어, 알부민, 감마글로불린, 및 트랜스페린 등), 보존제 및 캘리브란트의 첨가, 프로테아제 저해제의 첨가, 변성제의 첨가, 시료의 염분제거, 시료 단백질의 농축, 지질의 추출 및 정제를 포함한다.

[0113] 시료 준비는 다른 단백질(예를 들어, 수송 단백질)과의 비-공유 복합체에 결합된 분자를 분리하는 것일 수도 있다. 이 과정은 특이적 수송 단백질(예를 들어, 알부민)에 결합된 분자를 분리하는 것, 또는 단백질 변성, 예를 들어 산을 사용하는 변성을 통해 모든 수송 단백질로부터 결합된 분자를 방출하고 수송 단백질을 제거하는 것과 같은 더 일반적인 과정을 사용하는 것일 수 있다.

[0114] 시료로부터 불필요한 단백질(예를 들어, 고농도인, 정보가 없는, 또는 검출할 수 없는 단백질)을 제거하는 것은

고친화성 시약, 고분자량 필터, 초원심분리 및/또는 전기투석을 사용하여 달성할 수 있다. 고친화성 시약은 항체 또는 고농도 단백질에 선택적으로 결합하는 다른 시약(예를 들어, 압타머)을 포함한다. 시료 준비는 이온 교환 크로마토그래피, 금속 이온 친화 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 흡착 크로마토그래피, 등전위 포커싱 및 연관 기술들을 포함할 수도 있다. 분자량 필터는 크기와 분자량을 기초로 분자를 분리하는 막을 포함한다. 이러한 필터는 역삼투, 나노여과, 한외여과 및 마이크로여과를 추가로 사용할 수 있다.

[0115] 참조 폴리펩타이드에 관하여 사용될 때, 용어 "폴리펩타이드 단편" 또는 "단편"은 참조 폴리펩타이드 자체와 비교하여 아미노산 잔기가 결실된 폴리펩타이드를 지칭하지만, 여기서 잔여 아미노산 서열은 일반적으로 참조 폴리펩타이드의 상응하는 위치와 동일하다. 이러한 결실은 참조 폴리펩타이드의 아미노-말단에, 내부적으로, 또는 카복시-말단에, 또는 대안적으로 모두에 발생할 수 있다. 단편은 전형적으로 적어도 5, 6, 8 또는 10개의 아미노산 길이, 적어도 14개의 아미노산 길이, 적어도 20, 30, 40 또는 50개의 아미노산 길이, 적어도 75개의 아미노산 길이, 또는 적어도 100, 150, 200, 300, 500개 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 이들은 예를 들어 전장 폴리펩타이드의 길이 보다 짧은 길이인 한도 내에서 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 720, 740, 760, 780, 800, 820, 840, 860, 880, 900, 920, 940, 960, 980, 1000, 1020, 1040, 1060, 1080, 1100, 1120, 1140, 1160, 1180, 1200, 1220, 1240, 1260, 1280, 1300, 1320, 1340 또는 더 길고 및/또는 이 길이를 포함하는 것일 수 있다. 대안적으로, 이들은 전장 폴리펩타이드의 길이 보다 짧은 한도 내에서 상기 범위 보다 길지 않거나 및/또는 상기 범위가 제외된 것일 수 있다.

[0116] 용어 "탐침"은 특이적으로 의도된 표적 분자, 예를 들어 뉴클레오타이드 전사체 또는 마커에 의해 암호화되거나 마커에 상응하는 단백질에 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 탐침은 당업자에 의해 합성되거나, 또는 적절한 생물학적 체제로부터 유래될 수 있다. 표적 분자 검출 목적을 위해, 탐침은 본 명세서에 기술된 바와 같이 표지되도록 특이적으로 디자인될 수 있다. 탐침으로 사용될 수 있는 분자의 예시로 RNA, DNA, 단백질, 항체, 및 유기 분자가 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.

[0117] 본 명세서에서 사용된, 용어 "재배열"은 V 세그먼트가 본질적으로 각각 완전한 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 형태에서 D-J 또는 J 세그먼트에 바로 인접하게 위치하는 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 좌의 배치를 지칭한다. 재배열된 면역글로불린 유전자 좌는 생식세포계열 DNA와 비교를 통해 확인할 수 있다; 재배열된 좌는 적어도 하나의 재조합 헤파타머/노나머 상동 요소를 가질 것이다.

[0118] 본 명세서에서 사용된, 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 "숙주 세포"로 단순화)는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하는 것을 의미한다. 상기 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 특정 변형이 다음의 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손은, 실제로는, 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다.

[0119] 본 명세서에서 사용된, 용어 "재조합 인간 항체"는 (a) 인간 면역글로불린 유전자의 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조메인 동물(예를 들어, 마우스) 또는 이로부터 제조된 하이브리도마(아래에 추가로 기술됨)로부터 단리된 항체, (b) 항체 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같은 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포계열 및/또는 비-생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시형태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열의 트랜스제닉 동물이 사용되는 경우, 생체 내 신체의 돌연변이유발)의 영향을 받을 수 있고 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이 서열과 관련되지만 생체 내 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0120] 활성화 면역 세포와 관련하여 사용된 용어 "공동자극"은 증식 또는 이펙터 기능을 포함하는 제2, 비-활성화 수용체 매개 신호("공동자극 신호")를 제공하는 공동자극 폴리펩타이드의 능력을 포함한다. 예를 들어, 공동자극 신호는 사이토카인 분비, 예를 들어 T 세포-수용체-매개 신호를 받은 T 세포에서의 사이토카인 분비를 유발할

수 있다. 세포-수용체 매개 신호, 예를 들어 활성화 수용체를 통한 세포-수용체 매개 신호를 받은 면역 세포는 본 명세서에서 "활성화된 면역 세포"로 지칭된다.

[0121] 용어 "공동자극 수용체"는 면역 세포에 공동자극 신호를 전달하는 수용체, 예를 들어 CD28을 포함한다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "저해 수용체"는 면역 세포에 음성적인 신호를 전달하는 수용체(예를 들어, CTLA4, KIR3DL3 또는 PD-1)를 포함한다. 면역 세포에 공동자극 수용체(예를 들어, CD28)가 존재하지 않더라도 저해 수용체에 의해 변환된 저해 신호가 발생할 수 있고, 이에 따라, 저해 신호는 단순히 공동자극 폴리펩타이드의 결합을 위한 저해 수용체와 공동자극 수용체 사이의 경쟁의 기능은 아니다(Fallarino *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 188:205). 면역 세포로의 저해 신호 전달은 면역 세포 내 비반응성 또는 아네르기 또는 프로그램화 세포 사멸을 초래할 수 있다. 바람직하게는 저해 신호의 전달은 세포자연사(세포자연사)와 연관되지 않은 메커니즘을 통해 작동한다. 본 명세서에 사용된 용어 "세포자연사"는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 특징지어질 수 있는 프로그램화 세포 사멸을 포함한다. 세포자연사적 세포 사멸은 예를 들어 세포 분절화의 정점에 이르는 세포 수축, 막 수포형성 및 크로마틴 응축으로 특징지어질 수 있다. 또한 세포자연사를 겪는 세포는 뉴클레오솜 간 DNA 절단의 특징적인 패턴을 나타낸다. 수용체에 결합하는 폴리펩타이드의 형태에 따라, 예를 들어 하나 이상의 친연 결합 상대에 결합하기 위한 HHLA2 및/또는 KIR3DL3의 활성화 형태와의 경쟁을 통해, 신호가 전달(예를 들어, HHLA2 및/또는 KIR3DL3 폴리펩타이드의 다가 형태에 의해)되거나 신호가 저해(예를 들어, HHLA2 및/또는 KIR3DL3의 가용성, 1가 형태에 의해)될 수 있다. 하지만, 가용성 폴리펩타이드가 자극할 수 있다는 사례가 있다. 조절제의 효과는 본 명세서에 기술된 일반적인 스크리닝 분석법을 사용하여 쉽게 입증될 수 있다.

[0122] 세포적 바이오마커 발현과 관련된 용어 "높은", "낮은", "중간의" 및 "음성적"은 하나 이상의 참조 세포에 의한 바이오마커의 세포 발현에 상대적으로 발현된 바이오마커의 양을 지칭한다. 바이오마커의 발현은 하나 이상의 바이오마커 게놈 핵산, 리보핵산 및/또는 폴리펩타이드의 세포적 수준, 활성, 구조 등의 분석을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 본 명세서에 기술된 임의의 방법에 따라 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 이 용어는 각각 가장 높은, 중간의 또는 가장 낮은 수준에서 바이오마커를 발현하는 세포 집단의 정의된 백분율을 지칭한다. 이러한 백분율은 바이오마커를 높게 발현하거나 약하게 발현하는 세포 집단의 상위 0.1%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% 또는 그 이상, 또는 사이의, 포함하는, 임의의 범위로 정의될 수 있다. 바이오마커를 검출가능하게 발현하지 않는 세포는 바이오마커 발현이 "음성"이므로, 용어 "낮은"은 바이오마커를 검출가능하게 발현하지 않는 세포를 제외한다. 용어 "중간"은 바이오마커를 발현하지만 "높은" 수준으로 발현하는 집단 보다 낮은 수준으로 발현하는 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 또한 이 용어는 정성적 또는 통계적 플롯 영역에 의해 확인된 바이오마커 발현의 세포 집단을 지칭, 또는 대안적으로 지칭할 수 있다. 예를 들어, 유세포분석을 사용하여 분류한 세포 집단은 이 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 평균 형광 강도를 기반으로 하는 등의 방법과 같은 검출가능한 모이더티 분석을 기반으로 하는 명확한 플롯을 확인하는 것에 의해 바이오마커 발현 수준을 기준으로 구별될 수 있다. 이러한 플롯 영역은 관심대상 바이오마커에 대한 이 분야에서 잘 알려진 방법을 기초로 하는 수치, 모양, 중첩 등에 따라 다듬어질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이 용어는 또한 부가적인 바이오마커 발현의 존재 또는 부재에 따라 결정될 수 있다.

[0123] 상기 기술된 바와 같은, 용어 "반응"은 일반적으로 예를 들어 임상적인 개입의 진행 상의 효과, 효능 또는 결과를 결정하는 것과 관련된다. 일부 실시형태에서, 반응은 임상적인 개입(예를 들어, 2G2, 4D1, 8A12, 8D2, 1C8, 2C4, 6D10, 4E5 또는 6F10와 같은 항-HHLA2 단일클론성 항체 및 다클론성 항체의 투여)의 개시 이후 종양의 질량 및/또는 부피의 변화와 직접적으로 관련된다. 예를 들어, 과증식성 장애 반응은 시작 크기 및 용적에 비교한 전신성 개입 이후 종양의 크기를 CT, PET, 유방조영상, 초음파 또는 촉진(palpation)으로 측정하여 평가할 수 있다. 또한 반응은 생검 또는 수술적 절제 이후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 시험으로 평가할 수 있다. 반응은 종양 부피의 백분율 변화와 같은 정량적인 방식 또는 "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상적 완전 완화"(cCR), "임상적 부분 완화"(cPR), "임상적 안정적 질환"(cSD), "임상적 진행성 질환"(cPD) 또는 다른 정성적 기준과 같은 정성적인 방식으로 기록될 수 있다. 평가는 임상적인 개입의 개시 이후, 예를 들어 몇 시간, 며칠, 몇 주 또는 바람직하게는 몇달 후, 초기에 수행될 수 있다. 반응 평가는 전형적으로 임상적 개입의 종결 시기 또는 잔여 종양 세포 및/또는 종양 자리의 수술적인 제거 시기에 종료한다.

[0124] 본 명세서에 사용된, 용어 "특이적 결합"은 미리 결정된 항원에 결합하는 항체와 관련된다. 전형적으로, 항체는 피분석물로 인간 HHLA2를 사용하고 리간드로 항체를 사용하여 BIACORE® 분석 장치에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술로 결정하였을 때 약 10^{-7} M 미만, 예를 들어 약 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만 또는 더 낮은 친화도를 갖고 결합하며, 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 다른 비-특이적 항원(예를 들어,

BSA, 카세인)에 대한 결합 친화도 보다 적어도 1.1-, 1.2-, 1.3-, 1.4-, 1.5-, 1.6-, 1.7-, 1.8-, 1.9-, 2.0-, 2.5-, 3.0-, 3.5-, 4.0-, 4.5-, 5.0-, 6.0-, 7.0-, 8.0-, 9.0- 또는 10.0-배 또는 그 이상의 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다. 문구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 본 명세서에서 호환 가능하게 사용된다.

[0125] 본 명세서에 사용된, "대상"은 임의의 건강한 동물, 포유동물 또는 인간, 또는 비정상적인 마커 수준과 관련된 질환 또는 장애를 앓는 임의의 동물, 포유동물 또는 인간을 지칭한다. 용어 "대상"은 "환자"와 호환된다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 비-인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 파충류 등과 같은 포유동물 및 비-포유동물을 포함한다.

[0126] "화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는"이라는 말은 단백질의 합성과 관련된 화학적 전구체 또는 다른 화합물로부터 분리된 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 체제를 포함한다. 일 실시형태에서, "화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는"이라는 말은 약 30%(건조중량 기준) 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 보다 바람직하게는 약 20% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 보다 바람직하게는 약 10% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 및 가장 바람직하게는 약 5% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 체제를 포함한다.

[0127] 본 명세서에 사용된, 용어 "생존"은 다음 모두를 포함한다: 사망까지의 생존, 전체 생존으로도 알려짐(여기서 상기 사망은 원인과 무관하거나 종양과 관련된 것일 수 있음); "재발-없는 생존"(여기서 용어 재발은 국소 및 원발성 재발을 모두 포함함); 전이없는 생존; 질환없는 생존(여기서 용어 질환은 암 및 이와 연관된 질환을 포함함). 상기 생존의 기간은 정의된 출발점(예를 들어, 진단 시점 또는 치료 시작) 및 종결점(예를 들어, 죽음, 재발 또는 전이)을 참조로 계산될 수 있다. 추가로, 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 시간 내의 전이 확률 및 종양 재발 확률을 포함하도록 치료 효능의 기준을 확장할 수 있다.

[0128] "전사된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 전사체"는 본 발명의 마커의 전사 및 임의의 경우 RNA 전사체의 일반적인 전사-후 과정(예를 들어, 스플라이싱), 및 RNA 전사체의 역전사에 의해 만들어진 완성형 mRNA의 전부 또는 일부에 상보적이거나 이에 상동적인 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA, hnRNA, cDNA, 또는 RNA 또는 cDNA의 아날로그)이다.

[0129] 본 명세서에 사용된, 용어 "T 세포"는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 또한 용어 T 세포는 T 헬퍼 1형 T 세포 및 T 헬퍼 2형 T 세포를 모두 포함한다. 용어 "항원 제시 세포"는 전문적인 항원 제시 세포(예를 들어, B 림프구, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포)뿐만 아니라 다른 항원 제시 세포(예를 들어, 케라티노사이트, 내피 세포, 별아교세포, 섬유아세포, 올리고덴드로사이트)를 포함한다.

[0130] Tconv 또는 Teff로도 알려진 전통적인 T 세포는 하나 이상의 T 세포 수용체 발현 능력으로 인해 면역 반응을 증가시키는 이펙터 기능(예를 들어, 사이토카인 분비, 세포독성, 항-자가-인식 등)을 갖는다. Tconv 또는 Teff는 일반적으로 Treg가 아니고 예를 들어 미경험 T 세포, 활성화 T 세포, 기억 T 세포, 휴지 Tcon, 또는 Th1 또는 Th2 혈통으로 분화된 Tcon을 포함하는 임의의 T 세포 집단으로 정의된다. 일부 실시형태에서, Teff는 비-Treg T 세포의 하위집단이다. 일부 실시형태에서, Teff는 CD4+ 헬퍼 T 림프구(예를 들어, Th0, Th1, Tfh 또는 Th17) 및 CD8+ 세포독성 T 림프구와 같은 CD4+ Teff 또는 CD8+ Teff이다. 본 명세서에 추가로 기술된 바와 같이, 세포독성 T 세포는 CD8+ T 림프구이다. "미경험 Tcon"은 골수에서 분화되고 흉선에서 양성 및 음성 중앙 선별 과정을 성공적으로 겪었지만, 아직 항원 노출에 의해 활성화되지 않은 CD4⁺ T 세포이다. 미경험 Tcon은 일반적으로 L-셀렉틴(CD62L)의 표면 발현, CD25, CD44 또는 CD69와 같은 활성화 마커의 부재 및 CD45RO와 같은 기억 마커의 부재로 특징지어진다. 따라서 미경험 Tcon은 정지되고 분화하지 않고, 항상성 생존을 위해 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15)를 필요로 하는 것으로 여겨진다(적어도 WO 2010/101870 참조). 이러한 세포의 존재 및 활성화는 면역 반응을 억제하는 맥락에서 바람직하지 않다. Treg와 달리, Tcon은 아네르기성이 아니고 항원-기반 T 세포 수용체 활성화에 반응하여 증식할 수 있다(Lechler *et al.* (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 356:625-637). 중앙에서, 소모된 세포는 아네르기의 특징을 나타낼 수 있다.

[0131] 본 명세서에 V 세그먼트와 관련하여 사용된 용어 "재배열되지 않은" 또는 "생식세포계열 배열"은 V 세그먼트가 D 또는 J 세그먼트에 바로 인접하도록 재조합되지 않은 배치를 지칭한다.

[0132] 본 명세서에 사용된 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산을 지칭한다. 벡터의 일 유형은 부

가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 게놈 내에 추가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 도입된 숙주 세포에서 자율 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포에 도입되면 숙주 세포의 게놈 내에 통합되고, 이에 따라 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 본 명세서에서 이러한 벡터를 "재조합 발현 벡터" 또는 단순화하여 "발현 벡터"로 지칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태인 플라스미드로 호환 가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결여 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 발현 벡터의 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0133] 핵산의 경우, 용어 "실질적인 상동성"은 두 핵산, 또는 최적으로 정렬 및 비교할 때, 이들의 지정된 서열들이, 적당한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실을 포함하여, 적어도 약 80%의 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 또는 그 이상의 뉴클레오타이드, 및 보다 바람직하게는 적어도 약 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 뉴클레오타이드에서 동일하다는 것을 나타낸다. 대안적으로, 선택적인 혼성화 조건 하에서 단편이 가닥의 상보체에 혼성화되는 경우에 실질적인 상동성이 존재한다.

[0134] 두 서열들 사이의 백분율 동일성은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 갭(gap)의 수와 각 갭의 길이를 고려한 서열이 공유되는 동일한 위치의 수의 함수(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 #×100)이다. 서열을 비교하고 두 서열 사이의 백분율 동일성을 결정하는 것은 아래의 비-제한적 실시예에 기술된 바와 같이 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다.

[0135] 두 뉴클레오타이드 서열 사이의 백분율 동일성은 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 웨이트 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 웨이트를 사용한 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램(GCG사의 웹사이트에서 이용할 수 있음)을 사용하여 결정할 수 있다. 또한 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 백분율 동일성은 PAM120 웨이트 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티를 사용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된 E. Meyers 및 W. Miller(CABIOS, 4:11 17 (1989))의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다. 추가로, 두 아미노산 서열 사이의 백분율 동일성은 Blosom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 웨이트와 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 웨이트를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램에 통합된 Needleman 및 Wunsch(J. Mol. Biol. (48):444 453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.

[0136] 본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 공용 데이터베이스에서 예를 들어 관련 서열을 확인하기 위한 검색을 수행하는데 "질의 서열"(query sequence)로도 사용될 수 있다. 이러한 검색은 문헌[Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. 본 발명의 핵산 분자에 상동적인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, score=100, wordlength=12로 BLAST 뉴클레오타이드 검색을 수행할 수 있다. 본 발명의 단백질 분자에 상동적인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, score=50, wordlength=3으로 BLAST 단백질 검색을 수행할 수 있다. 비교 목적으로 갭 정렬을 얻기 위해, 문헌[Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389 3402]에 기술된 바와 같은 갭 BLAST를 사용할 수 있다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 매개 변수를 사용할 수 있다(NCBI 웹사이트에서 이용할 수 있음).

[0137] 핵산은 온전한 세포, 세포 용해물 또는 부분적으로 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태 내에 존재할 수 있다. 알칼라인/SDS 처리, CsCl 밴드화, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 이 분야에 잘 알려진 다른 표준 기술(F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) 참조)로 다른 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제된 경우, 핵산은 "단리된" 또는 "실질적으로 순수하게 된" 것이다.

[0138] 용어 "대상체를 위한 적절한 치료 요법을 결정하는 것"은 본 발명에 따른 분석 결과에 기초하여 또는 본질적으로 기초하여 또는 적어도 부분적으로 기초하여 대상체를 위한 치료 요법(즉, 대상체의 암을 예방 및/또는 치료하기 위해 사용되는 단일 요법 또는 다른 요법과의 조합)의 시작, 변경 및/또는 종료를 결정하는 것을 의미하는 것으로 간주된다. 일 실시예는 면역조절 요법을 제공하기 위해 암에 대한 표적 요법을 제공할지를 결정하는 것이다(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3과 같은 하나 이상의 천연

결합 상대 사이의 상호작용 조절제)). 다른 실시예는 재발 위험을 줄이기 위한 목적으로 수술 이후 보조요법을 시작하는 것이고, 다른 실시예는 특정 화학요법의 투여량을 변경하는 것이다. 결정은 본 발명에 따른 분석의 결과에 더해, 처리된 대상체의 개인적인 특성을 기반으로 할 수 있다. 대부분의 경우, 실제로 대상체에 적합한 치료 요법을 결정하는 것은 의사가 수행한다.

[0139] II. 단일클론성 항체, 면역글로불린 및 폴리펩타이드

[0140] 본 발명은 부분적으로 HHLA2에 대한 단리된 단일클론성 항체 또는 이의 단편(예를 들어, 본 명세서에 나열된 단일클론성 항체 및 다클론성 항체)에 관한 것이다. 이러한 분자는 부분적으로 면역조직화학법(IHC), 웨스턴 블롯, 세포간 흐름, ELISA 등과 같은 진단적 분석에서 HHLA2 단백질을 인식하는 능력을 나타내는 것으로 특징짓는다. 이러한 분자는 부분적으로 T-세포 상에 발현된 수용체(예를 들어, TMIGD2 및 KIR3DL3)와 같은 수용체에 결합하는 HHLA2를 저해하는 능력을 나타내는 것으로 특징짓는다.

[0141] 인간 내인성 레트로바이러스-H 긴 말단 반복-관련 단백질 2, HERV-H LTR-관련 2, B7y, B7H7, B7-H5, B7-H7로도 알려진 용어 "HHLA2"는 B7 패밀리의 구성원을 지칭한다. HHLA2 단백질은 정상 인간 조직에서는 발현이 제한적이지만 암에서는 폭넓게 발현된다. HHLA2 단백질은 세 개의 Ig-유사 도메인(IgV-IgC-IgV)을 갖는 단백질 구성원인 반면, B7 패밀리의 다른 구성원은 일반적으로 두 개의 Ig 도메인(IgV-IgC) 만을 갖는다. 정상 인간 조직에서 HHLA2 단백질은 신장, 내장, 담낭 및 유방의 상피와 태반 영양막 세포에 발현된다. 면역 시스템에서, HHLA2 단백질은 인간 단핵구/대식세포에 구성적으로 발현된다. HHLA2가 T-세포 증식 및 사이토카인 생산을 저해하고 T-세포 생산 및 사이토카인 생산을 증가시키는 것을 비롯하여, HHLA2는 인간 T-세포 기능을 조절한다. HHLA2는 대장, 신장, 폐, 췌장, 난소 및 전립선의 넓은 범위의 인간 암에서 높은 수준으로 발현된다. 또한 HHLA2는 갑상선, 흑색종, 간, 방광, 결장, 신장, 유방 및 식도의 인간 암에서 발현된다.

[0142] HHLA2의 구조 및 기능은 상기 기술된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Xiao *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203, Janakiram *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2359-2366, Mager *et al.* (1999) *Genomics* 21:2359-2366, Flajnik *et al.* (2012) *Immunogenet.* 64:571-590, Zhao *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:9879-9884 및 Zhu *et al.* (2013) *Nat. Commun.* 4:2043] 참조).

[0143] 용어 "HHLA2"는 이의 단편, 변이체(예를 들어, 대립유전자 변이체) 및 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 대표적인 인간 HHLA2 cDNA 및 인간 HHLA2 단백질 서열이 이 분야에 잘 알려져 있고 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 공개적으로 입수할 수 있다. 인간 HHLA2 변이체는 변이체 1(NM_007072.3 및 NP_009003.1, 가장 긴 전사체를 나타내고 가장 긴 동형체 a를 암호화함), 변이체 2(NM_001282556.1 및 NP_001269485.1, 대체 프로모터의 사용을 나타내며 변이체 1과 비교하여 5' UTR에서 차이가 있음), 변이체 3(NM_001282557.1 및 NP_001269486.1, 대체 프로모터의 사용을 나타내며 변이체 1과 비교하여 5' UTR에서 차이가 있음), 변이체 4(NM_001282558.1 및 NP_001269487.1, 동형체 b를 암호화하고, 대체 프로모터의 사용을 나타내며, 변이체 1과 비교하여 5' UTR에서 차이가 있고 3' 코딩 영역 내 대체 인-프레임 엑손이 결손되어, 동형체 a보다 짧은 동형체를 생성함), 및 변이체 5(NM_001282559.1 및 NP_001269488.1, 동형체 c를 암호화하고, 대체 프로모터의 사용을 나타내며, 변이체 2와 비교하여 여러 차이를 가져, 5' UTR이 독특하고 변이체 1과 비교하여 대체 시작 코돈에서 번역이 개시되고, 독특한 N-말단 및 동형체 a 보다 짧은 동형체를 생성함)를 포함한다. 인간 이외의 생물체에서 HHLA2 오솔로그(ortholog)의 핵산 및 폴리펩타이드 서열은 잘 알려져 있으며 예를 들어 개구리 HHLA2(NM_001128644.1 및 NP_001122116.1)를 포함한다. HHLA2 오솔로그의 대표적인 서열은 다음 표 1과 같다.

[0144] HHLA2 단백질 검출에 적합한 항-HHLA2 항체는 이 분야에 잘 알려져 있으며 예를 들어 Cat #: ab107119 및 ab214327(abcam), 항체 PA5-24146 및 PA5-6313(ThermoFisher Scientific), 항체 MAB80841, AF8084, FAB80841R, FAB80841T 및 MAB8084(R&D systems), 항체 AP52042PU-N(Origene), 항체 NBP2-49187, MAB80842, H00011148-B01P 및 NBP2-32420(Novus Biologicals), 항체 GTX51981(GeneTex), 항체 HPA055478(Atlas Antibodies), 항체 LS-C321945, LS-C308228, LS-C246742, LS-C246743, LS-C246744, LS-C236210 및 LS-C249186(LifeSpan Biosciences) 등이 포함된다. 또한, HHLA2의 발현을 감소시키기 위한 여러 siRNA, shRNA, CRISPR 작제물은 Origene Technologies의 shRNA 제품 # TL312462, TF312462, TR312462, TG312462 및 TL312462V, siRNA 제품 # SR323358, abm의 siRNA 제품 # i009616, i009616a, i009616b, i009616c, i009616d, iV009616, iV009616a, iV009616b, iV009616c, iV009616d, iAAV00961600, iAAV00961601, iAAV00961602, iAAV00961603, iAAV00961604, iAAV00961605, iAAV00961606, iAAV00961607, iAAV00961608 및 iAAV00961609, CRISPR 제품 # K0950321, K0950301, K0950302, K0950303, K0950304, K0950305, K0950306, K0950307, K0950308 및 K0950311, Santa Cruz Biotechnology의 siRNA 제품 # sc-78498, shRNA 제품 # sc-78498-V 및 sc-78498-SH,

CRISPR 제품 # sc-411576, sc-411576-HDR, sc-411576-NIC 및 c-411576-NIC-2 등과 같이 상기 참조된 회사의 상품 리스트에서 찾을 수 있다. 이 용어는 또한 HHLA2 분자와 관련하여 본 명세서에 기술된 특징의 임의의 조합을 지칭하는 것으로 사용될 수 있음을 유의해야 한다. 예를 들어, 서열 구성, 백분율 동일성, 서열 길이, 도메인 구조, 기능적 활성 등의 임의의 조합이 본 발명의 HHLA2 분자를 설명하기 위해 사용될 수 있다.

[0145] 용어 "HHLA2 경로"는 HHLA2 및 TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대와 HHLA2의 상호작용을 포함한다.

[0146] 용어 "TMIGD2"는 CD28, CTLA-4, ICOS 및 PD-1과 약 10%의 아미노산 동일성을 갖는 막 단백질로, 막전위 및 면역글로불린 도메인 함유 2(transmembrane and immunoglobulin domain containing 2), CD28H, IGPR1 및 IGPR-1을 지칭한다. TMIGD2는 하나의 세포의 IgV-유사 도메인, 막횡단 영역 및 두 개의 티로신 신호전달 모티프를 갖는 프롤린-풍부 세포질 도메인을 갖는다. TMIGD2 단백질은 모든 미경험 T 세포 및 대부분의 자연 살해(NK) 세포 상에 구성적으로 발현되지만, 조절 T 세포 또는 B 세포 상에는 발현되지 않는다. TMIGD2 발현은 T 세포의 반복적인 자극으로 서서히 손실된다. 이와 일치하여, TMIGD2는 기억 T 세포의 약 절반에서만 발현되고, TMIGD2-음성 T 세포는 말단 분화, 노화 표현형을 갖는다. 또한 TMIGD2는 내피 및 상피 세포에서 발현되고 세포 이동을 감소시키고 혈관신생 과정에서 모세관 형성을 촉진하는 기능을 하는 것으로 나타났다.

[0147] TMIGD2의 구조 및 기능은 상기 기술된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Xiao *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203, Janakiram *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2359-2366, Zhu *et al.* (2013) *Nat. Commun.* 4:2043 및 Rahimi (2012) *Cell* 23:1646-1656] 참조).

[0148] 용어 "TMIGD2"는 이의 단편, 변이체(예를 들어, 대립유전자 변이체) 및 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 대표적인 인간 TMIGD2 cDNA 및 인간 TMIGD2 단백질 서열은 이 분야에 잘 알려져 있고 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 공개적으로 입수할 수 있다. 인간 TMIGD2 동형체는 동형체 1(NM_144615.2 및 NP_653216.2), 동형체 2(NM_001169126.1 및 NP_001162597.1; 동형체 1과 비교하여 3' 코딩 영역의 대체 인-프레임 스플라이스 사이트를 사용하여, 동형체 1과 비교하여 짧은 동형체를 생성함) 및 동형체 3(NM_001308232.1 및 NP_001295161.1, 동형체 1과 비교하여 5' 코딩 영역에 대체 인-프레임 엑손이 결손되어, 동형체 1과 비교하여 짧은 동형체를 생성함)를 포함한다. 인간 이외 다른 생물의 TMIGD2 오솔로그 핵산 및 폴리펩타이드 서열은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 침팬지 TMIGD2(XM_009434393.2 및 XP_009432668.2, 및 XM_001138228.4 및 XP_001138228.3) 및 소 TMIGD2(XM_005208980.3 및 XP_005209037.1, XM_005208979.3 및 XP_005209036.1, 및 XM_002688933.5 및 XP_002688979.1)를 포함한다. TMIGD2 오솔로그의 대표적인 서열을 아래 표 1에 나타내었다.

[0149] TMIGD2 단백질 검출에 적합한 항-TMIGD2 항체는 이 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 항체 Cat # MAB8316, MAB83162, FAB8316R, FAB83162R, FAB83162G, FAB83162N, FAB83162S, FAB83162T, FAB83162U 및 FAB83162V (R&D systems), 항체 TA326695(Origene), 항체 PA5-52787 및 PA5-38055(ThermoFisher Scientific), 항체 MAB83161 및 NBP1-81164(Novus Biologicals) 등을 포함한다. 또한, TMIGD2의 발현을 감소시키기 위한 여러 siRNA, shRNA, CRISPR 작제물은 Origene Technologies의 shRNA 제품 # TF317829, TG317829, TL317829, TR317829 및 TL317829V, siRNA 제품 # SR314913 및 CRISPR 제품 # KN204938, KN204938LP, KN204938RB 및 KN204938BN, Abm의 siRNA 제품 # i024914, i024914a, i024914b, i024914c, i024914d, iV024914, iV024914a, iV024914b, iV024914c, iV024914d, iAAV02491400, iAAV02491401, iAAV02491402, iAAV02491403, iAAV02491404, iAAV02491405, iAAV02491406, iAAV02491407, iAAV02491408 및 iAAV02491409 및 CRISPR 제품 # K2409321, K2409301, K2409302, K2409303, K2409304, K2409305, K2409306, K2409307, K2409308 및 K2409311, Santa Cruz Biotechnology의 siRNA 제품 # sc-97757, shRNA 제품 # sc-97757-SH 및 sc-97757-V 및 CRISPR 제품 # sc-414261, sc-414261-HDR, sc-414261-NIC 및 sc-414261-NIC-2, Vigene Biosciences의 shRNA 제품 # SH888208 및 SH874720 등과 같이 상기 참조된 회사의 상품 리스트에서 찾을 수 있다. 또한, TMIGD2의 발현을 증가시키기 위한 여러 CRISPR 작제물은 Abm의 CRISPR 제품 # K2409378, K2409377, K2409376, K2409375, K2409374, K2409373, K2409372 및 K2409371, Santa Cruz Biotechnology의 CRISPR 제품 # sc-414261-ACT, sc-414261-ACT-2, sc-414261-LAC 및 sc-414261-LAC-2 등과 같이 상기 참조된 회사의 상품 리스트에서 찾을 수 있다. 이 용어는 또한 TMIGD2 분자와 관련하여 본 명세서에 기술된 특징의 임의의 조합을 지칭하는 것으로 사용될 수 있음을 유의해야 한다. 예를 들어, 서열 구성, 백분율 동일성, 서열 길이, 도메인 구조, 기능적 활성 등의 임의의 조합이 본 발명의 TMIGD2 분자를 설명하기 위해 사용될 수 있다.

[0150] TMIGD2와 HHLA2 사이의 상호작용뿐만 아니라 이들의 기능은 상기 기술된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Xiao *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203 및 Janakiram *et al.* (2015) *Clin. Cancer*

Res. 21:2359-2366 참조).

- [0151] 용어 "KIR3DL3"는 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체 3DL3(Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL3), CD158Z, KIR3DL7, KIR44, KIRC1, KIR2DS2, 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체(killer cell immunoglobulin like receptor), 3개의 Ig 도메인 및 긴 세포질 꼬리 3(three Ig domains and long cytoplasmic tail 3)로도 알려져 있고, 자연 살해 세포 및 T 세포의 하위집단에 의해 발현되는 막횡단 당단백질 패밀리의 구성원을 지칭한다. 살해 세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR) 유전자들은 다형이며 고도로 상동적이고 1 Mb 백혈구 수용체 복합체(LRC) 내의 염색체 19q13.4 상의 클러스터에서 발견된다. 몇몇 "프레임워크" 유전자가 모든 일배체형(KIR3DL3, KIR3DP1, KIR3DL4, KIR3DL2)에서 발견되기는 하지만, KIR 유전자 클러스터의 유전자 내용은 일배체형에 따라 다르다. KIR 단백질은 세포의 면역글로불린 도메인의 수(2D 또는 3D) 및 긴 세포질 도메인(L)을 갖는지 아니면 짧은 세포질 도메인(S)을 갖는지에 따라 분류된다. 긴 세포질 도메인을 갖는 KIR 단백질은 면역 티로신-기반 저해 모티프(ITIM)를 통한 리간드 결합 시 저해 신호를 전달하는 반면, 짧은 세포질 도메인을 갖는 KIR 단백질은 ITIM 모티프가 결손되고 대신 활성화 신호를 전달하는 TYRO 단백질 티로신 키나아제 결합 단백질과 관련된다. 몇몇 KIR 단백질의 리간드는 HLA 클래스 I 분자의 하위집단이고; 따라서, KIR 단백질은 면역 반응 조절에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 이 유전자는 모든 일배체형에 존재하는 "프레임워크" 좌위 중 하나이다. KIR3DL3 단백질은 N-말단 신호 서열, 3개의 Ig 도메인, 양전하 잔기가 결핍된 막횡단 영역 및 면역수용체 티로신-기반 저해 모티프(ITIM)를 함유하는 긴 세포질 꼬리를 갖는다. KIR3DL3은 다른 KIR에서 발견되는 줄기 영역(stalk region)이 없다.
- [0152] KIR3DL3의 구조 및 기능은 상기 기술된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Hsu *et al.* (2002) *Immunol Rev.* 190:40-52, Trompeter *et al.* (2005) *J. Immunol.* 174:4135-4143, Trundley *et al.* (2006) *Immunogenet.* 57:904-916 및 Jones *et al.* (2006) *Immunogenet.* 58:614-627] 참조).
- [0153] 용어 "KIR3DL3"은 이의 단편, 변이체(예를 들어, 대립유전자 변이체) 및 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 대표적인 인간 KIR3DL3 cDNA 및 인간 KIR3DL3 단백질 서열이 이 분야에 잘 알려져 있고 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)에서 공개적으로 입수할 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 인간 KIR3DL3 동형체가 알려져 있다: 인간 KIR3DL3(NM_153443.4)은 전사체(NP_703144.3)에 의해 암호화될 수 있다. 인간 이외의 생물체에서 KIR3DL3 오솔로그의 핵산 및 폴리펩타이드 서열은 잘 알려져 있으며 예를 들어 침팬지 KIR3DL3(XM_003316679.3 및 XP_003316727.3), 붉은털원숭이 KIR3DL3(NM_001104552.2 및 NP_001098022.1), 마우스 KIR3DL3(NM_001310690.1 및 NP_001297619.1, NM_177749.4 및 NP_808417.2, NM_177748.2 및 NP_808416.1) 및 래트 KIR3DL3(NM_181479.2 및 NP_852144.1)를 포함한다. 대표적인 KIR3DL3 오솔로그 서열을 아래 표 1에 나타내었다.
- [0154] KIR3DL3 단백질 검출에 적합한 항-KIR3DL3 항체는 이 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 항체 Cat #: FAB8919R, MAB8919, FAB8919G, FAB8919N, FAB8919S, FAB8919T, FAB8919U 및 FAB8919V(R&D systems), 항체 AP52374PU-N(Origene), 항체 PA5-26178(ThermoFisher Scientific), 항체 OAAB05761, OAAF08125, OAA04122, OACA09134, OACA09135, OACD04988 및 OASG01190(Aviva Systems Biology) 등을 포함한다. 또한, KIR3DL3의 발현을 감소시키기 위한 여러 siRNA, shRNA, CRISPR 작제물은 Origene Technologies의 shRNA 제품 # TF303684, TR303684, TG303684, TL303684, TL303684V, siRNA 제품 # SR314516 및 CRISPR 제품 # KN224383, KN224383BN, KN224383RB 및 KN224383LP, Abm의 siRNA 제품 # i011627, i011627a, i011627b, i011627c, i011627d, iV011627, iV011627a, iV011627b, iV011627c, iV011627d, iAAV01162700, iAAV01162701, iAAV01162702, iAAV01162703, iAAV01162704, iAAV01162705, iAAV01162706, iAAV01162707, iAAV01162708 및 iAAV01162709 및 CRISPR 제품 # K1151421, K1151401, K1151402, K1151403, K1151404, K1151405, K1151406, K1151407, K1151408 및 K1151411, Santa Cruz Biotechnology의 siRNA 제품 # sc-60892, shRNA 제품 # sc-60892-SH 및 sc-60892-V 및 CRISPR 제품 # sc-406227, sc-406227-KO-2, sc-406227-HDR-2, sc-406227-NIC 및 sc-406227-NIC-2 등과 같이 상기 참조된 회사의 상품 리스트에서 찾을 수 있다. 이 용어는 또한 KIR3DL3 분자와 관련하여 본 명세서에 기술된 특징의 임의의 조합을 지칭하는 것으로 사용될 수 있음을 유의해야 한다. 예를 들어, 서열 구성, 백분율 동일성, 서열 길이, 도메인 구조, 기능적 활성 등의 임의의 조합이 본 발명의 KIR3DL3 분자를 설명하기 위해 사용될 수 있다.
- [0155] 용어 "말초 혈액 세포 아형"은 호산구, 호중구, T 세포, 단핵구, NK 세포, 과립구 및 B 세포를 포함하지만 이로 제한되지는 않는 일반적으로 말초 혈액에서 발견되는 세포 유형을 지칭한다.
- [0156] 용어 "재조합 인간 항체"는 (a) 인간 면역글로불린 유전자의 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조형 동물 또는 이로 부터 제조된 하이브리도마(아래에 추가로 설명함)로부터 단리된 항체, (b) 항체 발현을 위해 형질전환된 숙주

세포로부터, 예를 들어 트랜스팩토마로부터 단리된 항체, (c) 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같이 재조합 수단으로 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포계열 및/또는 비-생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시형태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열의 트랜스제닉 동물이 사용되는 경우, 생체 내 신체의 돌연변이유발)이 적용될 수 있고 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이 서열과 관련되지만 생체 내 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0157] 적어도 하나의 바이오마커의 존재 또는 수준을 검출하거나 결정하기 위해 사용되는 용어 "시료"는 일반적으로 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 대변, 눈물 및 임의의 다른 체액(예를 들어, "체액"의 정의에 따라 위에서 설명한 것으로), 또는 소장, 결장 시료 또는 수술 절제 조직과 같은 조직 시료(예를 들어, 생검)이다. 특정 예시에서, 본 발명의 방법은 시료에서 적어도 하나의 마커의 존재 또는 수준을 검출 또는 결정하기 전에 개체로부터 시료를 얻는 것을 더 포함한다.

[0158] 본 명세서에 사용된 "RNA 간섭 물질"은 RNA 간섭(RNAi)을 통해 표적 바이오마커에 간섭하거나 발현을 저해하는 임의의 물질로 정의된다. 이러한 RNA 간섭 물질은 본 발명의 표적 바이오마커 유전자에 상동적인 RNA 분자 또는 이의 단편을 포함하는 핵산 분자, 짧은 간섭 RNA(siRNA) 및 RNA 간섭(RNAi)을 통해 표적 바이오마커 핵산에 간섭하거나 발현을 저해하는 소분자를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다.

[0159] "RNA 간섭"(RNAi)은 표적 바이오마커 핵산과 동일하거나 매우 유사한 서열의 RNA의 발현 또는 도입으로 표적화 유전자로부터 전사된 메신저 RNA(mRNA)의 서열 특이적 분해 또는 서열 특이적 전사후 유전자 침묵(PTGS)을 초래하는 진화적으로 보존된 과정으로(Coburn, G. and Cullen, B. (2002) *J. of Virology* 76(18):9225 참조), 이로 인해 표적 바이오마커 핵산의 발현이 저해된다. 일 실시형태에서, 이 RNA는 이중 가닥 RNA(dsRNA)이다. 이 과정은 식물, 무척추동물 및 포유류 세포에서 설명되었다. 본래, RNAi는 긴 dsRNA를 siRNA라 부르는 이중 가닥 단편으로 자르는 것을 촉진하는 dsRNA-특이적 엔도뉴클레아제 다이서(endonuclease Dicer)에 의해 개시된다. siRNA는 표적 mRNA를 인식하고 자르는 단백질 복합체에 통합된다. 또한 RNAi는 표적 바이오마커 핵산의 발현을 저해 또는 침묵시키기 위한 핵산 분자, 예를 들어 합성 siRNA, shRNA 또는 다른 RNA 간섭 물질의 도입에 의해 개시될 수 있다. 본 명세서에 사용된, "표적 바이오마커 핵산 발현의 저해" 또는 "마커 유전자 발현의 저해"는 표적 바이오마커 핵산 또는 표적 바이오마커 핵산에 의해 암호화되는 단백질의 발현 또는 활성 또는 수준의 임의의 감소를 포함한다. 이 감소는 RNA 간섭 물질에 의해 표적화되지 않은 표적 바이오마커 핵산의 발현 또는 이 표적 바이오마커 핵산에 의해 암호화되는 단백질의 활성 또는 수준과 비교하여 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 또는 그 이상일 수 있다.

[0160] RNAi에 더해, HHLA2 경로 구성성분, 예를 들어 HHLA2, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 관심대상 바이오마커의 구성적 또는 유도적 녹아웃(knockout) 또는 돌연변이와 같이 관심대상 바이오마커의 카피수 또는 유전자 서열을 조절하기 위해 게놈 편집을 사용할 수 있다. 예를 들어, 게놈 핵산의 정밀한 편집을 위해(예를 들어, 비-기능적 또는 삭제(null) 돌연변이를 생성하기 위해) CRISPR-Cas 시스템을 사용할 수 있다. 이러한 실시형태에서, CRISPR 가이드 RNA 및/또는 Cas 효소가 발현될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA 만이 함유된 벡터를 Cas9 효소의 트랜스제닉 동물 또는 세포에 투여할 수 있다. 유사한 전략이 사용될 수 있다(예를 들어, 디자이너 징크 핑거, 전사 활성화자-유사 이펙터(TALE) 또는 호밍 메가뉴클레아제). 이러한 시스템은 이 분야에 잘 알려져 있(예를 들어, 미국 특허 제8,697,359호; 문헌[Sander and Joung (2014) *Nat. Biotech.* 32:347-355; Hale *et al.* (2009) *Cell* 139:945-956; Karginov and Hannon (2010) *Mol. Cell* 37:7; U.S. Pat. Publ. 2014/0087426 and 2012/0178169; Boch *et al.* (2011) *Nat. Biotech.* 29:135-136; Boch *et al.* (2009) *Science* 326:1509-1512; Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501; Weber *et al.* (2011) *PLoS One* 6:e19722; Li *et al.* (2011) *Nucl. Acids Res.* 39:6315-6325; Zhang *et al.* (2011) *Nat. Biotech.* 29:149-153; Miller *et al.* (2011) *Nat. Biotech.* 29:143-148; Lin *et al.* (2014) *Nucl. Acids Res.* 42:e47] 참조). 이러한 유전적 전략에서 이 분야에 잘 알려진 방법에 따라 구성적 발현 시스템 또는 유도적 발현 시스템을 사용할 수 있다.

[0161] "피위-상호작용 RNA"(piRNA)는 작은 논코딩 RNA 분자의 가장 큰 분류이다. piRNA는 피위 단백질과의 상호작용을 통해 RNA-단백질 복합체를 형성한다. 이 piRNA 복합체는 생식계 세포, 특히 정자형성의 레트로트랜스포존(retrotransposon) 및 다른 유전적 요소의 후성적 및 전사후 유전자 침묵 모두와 연관이 있다. 이들은 크기(21-

24 nt가 아닌 26-31 nt), 서열 보전의 결손 및 증가된 복잡성에서 마이크로RNA(miRNA)와 구별된다. 하지만, piRNA는 다른 작은 RNA와 마찬가지로 유전자 침묵, 특히 트랜스포존의 침묵과 연관되는 것으로 생각된다. 대부분의 piRNA는 트랜스포존 서열에 안티센스이고, 이는 트랜스포존이 piRNA 표적임을 시사한다. 포유동물의 배아의 발달에서 트랜스포존의 piRNA 활성이 가장 중요하며, *C. elegans* 및 인간에서 정자 형성을 위해 piRNA가 필요하다. piRNA는 RNA-유도 침묵 복합체(RISC)의 형성을 통해 RNA를 침묵시키는 역할을 한다.

[0162] "애타머"는 특이 표적 분자에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드 분자이다. "핵산 애타머"는 소분자, 단백질, 핵산뿐만 아니라 세포, 조직 및 생물체와 같은 다양한 분자 표적에 결합하도록 반복적인 시험관 내 선발 또는 SELEX(지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 진화)를 통해 제작된 핵산종이다. "펩타이드 애타머"는 특이 표적 분자에 결합하도록 선별 또는 제작된 인공 단백질이다. 이 단백질은 단백질 스캐폴드에 의해 표시되는 가변 서열의 하나 이상의 펩타이드 루프로 이루어진다. 이들은 일반적으로 조합 라이브러리로부터 단리된 것이고 종종 이후에 직접적인 돌연변이 또는 가변 영역 돌연변이유발 및 선발 과정을 통해 개선된다. 펩타이드 애타머의 진화인 "아피머 단백질"(Affimer protein)은 특이 표적 단백질에 대한 높은 친화성 결합 표면을 제공하는 펩타이드 루프를 나타내도록 제작된 작고 매우 안정적인 단백질이다. 이는 시스타틴(cystatin)의 시스테인 단백질분해효소 저해제 패밀리로부터 유래된 12 내지 14kDa의 낮은 분자량의 단백질이다. 애타머는 일반적으로 사용되는 생물분자인 항체에 필적하는 분자 인식 특성을 제공하기 때문에 생물공학 및 치료 응용에 유용하다. 차별적인 인식에 더해, 애타머는 완전히 시험관 내에서 제작될 수 있고, 화학적 합성으로 쉽게 생산할 수 있고, 바람직한 저장 특성을 보유하고, 치료적 응용에서 면역원성을 거의 또는 전혀 유발하지 않기 때문에 항체를 뛰어넘는 이점을 제공한다.

[0163] 본 명세서에서 "작은 간섭 RNA"로도 지칭하는 "짧은 간섭 RNA"(siRNA)는 예를 들어 RNAi에 의한 표적 바이오마커 핵산의 발현을 저해하는 작용을 하는 물질로 정의된다. siRNA는 화학적으로 합성하거나, 시험관 내 전사로 생산하거나, 숙주 세포 내에서 생산할 수 있다. 일 실시형태에서, siRNA는 약 15 내지 약 40의 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게는 약 15 내지 약 28의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 19 내지 약 25의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 약 19, 20, 21 또는 22의 뉴클레오타이드 길이의 이중 가닥 RNA(dsRNA) 분자이고, 각 가닥에 약 0, 1, 2, 3, 4 또는 5의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 3' 및/또는 5' 오버행(overhang)을 포함할 수 있다. 이 오버행의 길이는 두 가닥 사이에 독립적, 즉 한 가닥의 오버행 길이는 다른 가닥의 오버행 길이에 의존하지 않는다. 바람직하게는 siRNA는 표적 메신저 RNA(mRNA)의 분해 또는 특이적 전사후 유전자 침묵(PTGS)을 통해 RNA 간섭을 촉진할 수 있다.

[0164] 다른 실시형태에서, siRNA는 작은 헤어핀(또는 스템루프로 불림) RNA(shRNA)이다. 일 실시형태에서, 이 shRNA는 짧은(예를 들어, 19 내지 25 뉴클레오타이드) 안티센스 가닥, 이어서 5 내지 9 뉴클레오타이드 루프 및 유사한 센스 가닥으로 이루어진다. 대안적으로, 센스 가닥이 뉴클레오타이드 루프에 앞서고 안티센스 가닥이 뒤따를 수 있다. 이 shRNA는 플라스미드, 레트로바이러스 및 렌티바이러스에 포함될 수 있고 예를 들어 pol III U6 프로모터 또는 다른 프로모터(예를 들어, 문헌[Stewart, *et al.* (2003) *RNA* Apr;9(4):493-501] 참조, 본 명세서에 참조로 포함됨)로부터 발현될 수 있다.

[0165] 암에서 과발현되는 바이오마커 유전자의 발현을 저해하여 대상체의 암을 치료, 예방 또는 저해하기 위해 RNA 간섭 물질, 예를 들어 siRNA 분자를 암을 갖거나 암을 갖을 위험이 있는 환자에 투여할 수 있다.

[0166] 용어 "소분자"(small molecule)는 이 분야의 용어이며 약 1000의 분자량 미만 또는 약 500의 분자량 미만인 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 소분자는 펩타이드 결합 만을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 소분자는 올리고머가 아니다. 예시적으로 활성을 스크리닝할 수 있는 소분자 화합물은 펩타이드, 펩티도미메틱, 핵산, 탄수화물, 작은 유기 분자(예를 들어, 폴리케티드)(Cane *et al.* 1998. *Science* 282:63) 및 천연 추출물 라이브러리를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 다른 실시형태에서, 이 화합물은 작은 유기 비-펩타이드 화합물이다. 추가 실시형태에서, 소분자는 생합성물질이 아니다.

[0167] 생물학적 활성 물질에 적용되는 용어 "선택적 조절제" 또는 "선택적 조절"은 표적과의 직접 또는 간접적 상호작용을 통해 비-표적 세포 집단, 신호전달 활성 등과 비교하여 세포 집단, 신호전달 활성 등과 같은 표적을 조절하는 물질의 능력을 지칭한다. 예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용, HHLA2와 다른 결합 상대 사이의 상호작용 및/또는 관심대상 세포 집단 상의 이러한 상호작용을 선택적으로 저해하는 물질은 HHLA2 경로 조절제 요법에 대해 활성을 가질 수 있다(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용 조절제로 상호작용이 적어도 하나의 다른 결합 상대에 대한 물질의 활성 보다 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 2×(배) 또는 그 이상인 조절제(예를 들어, 적어도 약 3×, 4×, 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 15×, 20×, 25×, 30×, 35×, 40×, 45×, 50×, 55×, 60×, 65×, 70×, 75×, 80×, 85×, 90×, 95×, 100×, 105×, 110×, 120×, 125×, 150×, 200×, 250×, 300×, 350×, 400×, 450×, 500×, 600×, 700×, 800×, 900×, 1000×, 1500×, 2000×, 2500×, 3000×, 3500×, 4000×, 4500×, 5000×, 5500×, 6000×, 6500×, 7000×, 7500×, 8000×, 8500×, 9000×, 9500×, 10000× 또는 그 이상, 또는 사이의 임의의 범위, 포함)). 이러한 지표는 일반적으로 상호작용/활성을 절반으로 줄이는데 필요한 물질의 상대적인 양의 측면에서 표현된다.

[0168] 보다 일반적으로, 용어 "선택적"은 우선적인 작용 또는 기능을 지칭한다. 용어 "선택적"은 다른 표적에 상대적으로 관심대상 특정 표적에 우선적인 효과의 측면에서 정량화될 수 있다. 예를 들어, 측정된 변수(예를 들어, Treg/Breg 대 다른 세포, 예를 들어 Tcon과 같은 다른 면역 세포의 조절)는 관심대상 표적 대 의도하지 않거나 원치않는 표적에서 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 55배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 그 이상 또는 포함되는 사이의 임의의 범위(예를 들어, 50% 내지 16배)로 다를 수 있다. 같은 배수 분석으로 주어진 조직, 세포 집단, 측정 변수, 측정 효과 등, 예를 들어 Treg:Tcon 비율, Breg:Tcon 비율, 과증식성 세포 성장률 또는 부피, Treg/Breg 증식률 또는 수 등에서 효과의 크기를 확인할 수 있다.

[0169] 대조적으로, 용어 "특이적"은 독점적인 작용 또는 기능을 지칭한다. 예를 들어, HHLA2-TMIGD2 및 HHLA2-KIR3DL3 상호작용의 특이적 조절은 HHLA2와 다른 리간드의 조절이 아닌 HHLA2-TMIGD2 및 HHLA2-KIR3DL3 상호작용 각각의 독점적인 조절을 지칭한다. 다른 예시에서, 미리 결정된 항원에 대한 항체의 특이적 결합은 다른 항원과의 결합 없이 관심대상 항원과 결합하는 항체의 능력을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 피분석물로 관심대상 항원을 사용하고 리간드로 항체를 사용하여 BIACORE® 분석 기기에서 표면 플라스몬 공명(SPR) 기술로 결정할 때 대략 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 이 보다 낮은 값 미만과 같은 대략 1×10^{-7} M 미만의 친화도(K_D)를 갖고 결합하고, 미리 결정된 항원 또는 가깝게 연관된 항원 이외의 비-특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합 친화도에 비해 적어도 1.1-, 1.2-, 1.3-, 1.4-, 1.5-, 1.6-, 1.7-, 1.8-, 1.9-, 2.0-, 2.5-, 3.0-, 3.5-, 4.0-, 4.5-, 5.0-, 6.0-, 7.0-, 8.0-, 9.0- 또는 10.0-배 또는 그 이상의 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다. 추가로, K_D 는 K_A 의 반대이다. 문구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 함께 본 명세서에서 호환 가능하게 사용된다.

[0170] 용어 "민감화"(sensitize)는 요법(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용 조절제) 단독 또는 면역 관문 저해 요법과 같은 면역요법과의 조합)으로 보다 효과적인 치료를 허용하는 방식으로 암 세포 또는 종양 세포와 같은 세포를 변화시키는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 정상 세포는 요법(예를 들어, HHLA2 경로 조절제 요법(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용 조절제) 단독 또는 면역 관문 저해 요법과 같은 면역요법과의 조합)에 의해 과도하게 손상될 정도로 영향을 받지 않는다. 요법적 치료에 따라 증가된 민감도 또는 감소된 민감도는 특히 세포 증식 분석법(Tanigawa N, Kern D H, Kikasa Y, Morton D L, Cancer Res 1982; 42: 2159-2164), 세포 사멸 분석법(Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, Cancer Res 1984; 94: 161-173; Weisenthal L M, Lippman M E, Cancer Treat Rep 1985; 69: 615-632; Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentyman P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432; Weisenthal L M, Contrib Gynecol Obstet 1994; 19: 82-90)을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 아래 본 명세서에 기술된 치료 및 방법에 대해 이 분야에 알려진 방법에 따라 측정한다. 또한 민감도 또는 저항성은 일정 기간, 예를 들어 인간의 경우 6달 및 마우스의 경우 4 내지 6주 동안 종양 크기 감소를 측정하는 방법으로 동물에서 측정할 수 있다. 치료 민감도의 증가 또는 저항성의 감소가 조성물 또는 방법의 부재 하에서의 치료 민감도 또는 저항성과 비교하여 5% 또는 그 이상, 예를 들어 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 또는 그 이상, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배 또는 그 이상 까지인 경우, 조성물 또는 방법은 요법적 치료에 대한 반응을 민감화하는 것이다. 요법적 치료에 대한 민감도 또는 저항성을 결정하는 것은 이 분야에서 그리고 당업자의 기술 내에서 통상적인 것이다. 면역조절의 효능을 강화하기 위한 본 명세서에 기술된 임의의 방법은 과증식성 또는 암성 세포(예를 들어, 저항성 세

포)를 요법에 대해 민감화하기 위한 방법에 동일하게 적용할 수 있다.

- [0171] 용어 "시너지 효과"는 항암제 단독의 독립적 효과의 합 보다 클 수 있는 둘 이상의 HHLA2 경로 조절제들, HHLA2 경로 조절제와 면역요법, HHLA2 경로 조절제 단독 또는 면역 관문 저해 요법과 같은 면역요법과의 조합 등과 같은 둘 이상의 치료 물질의 연합된 효과를 지칭한다.
- [0172] 용어 "대상체"는 임의의 건강한 동물, 포유동물 또는 인간, 또는 관심대상 상태(예를 들어, 암)를 앓는 임의의 동물, 포유동물 또는 인간을 지칭한다. 용어 "대상체"는 "환자"와 호환 가능하게 사용된다.
- [0173] 용어 "생존"은 다음의 모두를 포함한다: 사망까지의 생존, 전체 생존이라고도 함(여기서 사망은 원인과 무관하거나 종양과 관련이 있을 수 있음); "재발-없는 생존"(여기서 용어 재발은 국소 및 원발성 재발을 모두 포함함); 전이없는 생존; 질환없는 생존(여기서 용어 질환은 암 및 이와 관련된 질환을 포함함). 상기 생존의 기간은 정의된 출발점(예를 들어, 진단 시점 또는 치료 시작) 및 종결점(예를 들어, 죽음, 재발 또는 전이)을 참조로 계산할 수 있다. 추가로, 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 시간 내의 전이 확률 및 종양 재발 확률을 포함하도록 치료 효능의 기준을 확장할 수 있다.
- [0174] 용어 "치료 효과"는 약리학적 활성 물질에 의해 야기되는 동물, 특히 포유동물, 특히 인간의 국소 또는 전신성 효과를 지칭한다. 그러므로 이 용어는 동물 또는 인간의 질환 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방에 또는 바람직한 신체적 또는 정신적 발달 및 상태의 향상에 사용하기 위해 의도된 임의의 물질을 의미한다. 문구 "치료적 유효량"은 임의의 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비율로 원하는 일부 국소적 또는 전신성 효과를 생성하는 이러한 물질의 양을 의미한다. 특정 실시형태에서, 화합물의 치료적 유효량은 치료 지수, 용해성 등에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 본 발명의 방법으로 개발된 특정 화합물은 이러한 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비율을 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.
- [0175] 본 명세서에 사용된 용어 "치료적 유효량" 및 "유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비율로 동물의 세포의 적어도 하위집단에 일부 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 효과적인 화합물, 재료 또는 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물의 양을 의미한다. 대상 화합물의 독성 및 치료 효능은 예를 들어 LD₅₀ 및 ED₅₀를 결정하기 위한 세포 배양 또는 실험 동물의 표준 약학적 절차를 통해 결정할 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 조성물이 바람직하다. 일부 실시형태에서, LD₅₀(치사량)은 측정할 수 있고 예를 들어 물질을 투여하지 않은 경우에 비해 물질에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 이상 감소될 수 있다. 유사하게, ED₅₀(즉, 증상의 최대-절반 저해를 달성하는 농도)도 측정될 수 있고 예를 들어 물질을 투여하지 않은 경우에 비해 물질에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 이상 증가될 수 있다. 또한, 유사하게, IC₅₀(즉, 암세포에서 최대-절반 세포독성 또는 세포증식저해성 효과를 달성하는 농도)도 측정할 수 있고 예를 들어 물질을 투여하지 않은 경우에 비해 물질에 대해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 또는 그 이상 증가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분석에서 암 세포 성장은 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%로도 저해될 수 있다. 암세포 사멸은 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%로도 촉진될 수 있다. 다른 실시형태에서, 암세포의 수 및/또는 고형 악성도가 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%로도 달성될 수 있다.
- [0176] 용어 "화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는"은 단백질의 합성과 관련된 화학적 전구체 또는 다른 화합물로부터 분리된 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용어 "화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는"은 약 30%(건조중량 기준) 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 보다 바람직하게는 약 20% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 보다 바람직하게는 약 10% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 및 가장 바람직하게는 약 5% 미만의 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화합물을 갖는, 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 제제를 포함한다.
- [0177] "전사된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 전사체"는 본 발명의 마커의 전사 및 임의의 경우 RNA 전사체의 일반적인 전사-후 과정(예를 들어, 스플라이싱), 및 RNA 전사체의 역전사에 의해 만들어진 완성형 mRNA의

전부 또는 일부에 상보적이거나 이에 상동적인 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA, hnRNA, cDNA, 완성형 miRNA, 전구-miRNA, 1차-miRNA, miRNA*, 항-miRNA 또는 miRNA 결합 위치, 또는 이들의 변이체 또는 이러한 RNA 또는 cDNA의 아날로그)이다.

[0178] 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산을 지칭한다. 벡터의 일 유형은 부가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 게놈 내에 부가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 도입된 숙주 세포에서 자율 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포에 도입되면 숙주 세포의 게놈 내에 통합되고, 이에 따라 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 본 명세서에서 이러한 벡터를 "재조합 발현 벡터" 또는 단순화하여 "발현 벡터"로 지칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 벡터의 가장 일반적으로 사용되는 형태인 플라스미드로 호환 가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결여 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 발현 벡터의 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다.

[0179] 유전적 암호에 의해 정의되는 것으로(아래 참조), 특정 단백질의 아미노산 서열 및 이 단백질을 암호화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 사이의 알려진 명확한 관련성이 있다. 마찬가지로, 유전적 암호에 의해 정의되는 것으로, 특정 핵산의 뉴클레오타이드 서열 및 핵산에 의해 암호화되는 아미노산 서열 사이의 알려진 명확한 관련성이 있다.

[0180] 유전적 암호

[0181] 알라닌 (Ala, A) GCA, GCC, GCG, GCT

[0182] 아르기닌 (Arg, R) AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT

[0183] 아스파라긴 (Asn, N) AAC, AAT

[0184] 아스파르트산 (Asp, D) GAC, GAT

[0185] 시스테인 (Cys, C) TGC, TGT

[0186] 글루탐산 (Glu, E) GAA, GAG

[0187] 글루타민 (Gln, Q) CAA, CAG

[0188] 글리신 (Gly, G) GGA, GGC, GGG, GGT

[0189] 히스티딘 (His, H) CAC, CAT

[0190] 아이소류신 (Ile, I) ATA, ATC, ATT

[0191] 류신 (Leu, L) CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG

[0192] 라이신 (Lys, K) AAA, AAG

[0193] 메티오닌 (Met, M) ATG

[0194] 페닐알라닌 (Phe, F) TTC, TTT

[0195] 프롤린 (Pro, P) CCA, CCC, CCG, CCT

[0196] 세린 (Ser, S) AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT

[0197] 트레오닌 (Thr, T) ACA, ACC, ACG, ACT

[0198] 트립토판 (Trp, W) TGG

[0199] 타이로신 (Tyr, Y) TAC, TAT

[0200] 발린 (Val, V) GTA, GTC, GTG, GTT

[0201] 종결 신호 (end) TAA, TAG, TGA

- [0202] 유전적 암호의 중요하고 잘 알려진 특징은 중복성으로, 단백질을 만들기 위한 대부분의 아미노산에 대해, 하나 이상의 코딩 뉴클레오타이드 트리플렛이 적용될 수 있다(상기 참조). 따라서, 다수의 서로 다른 뉴클레오타이드 서열이 주어진 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드 서열들은 모든 생물체에서 같은 아미노산 서열을 생성하기 때문에 기능적으로 동등한 것으로 간주된다(비록 특정 생물체는 다른 것보다 효율적으로 일부 서열을 번역할 수 있지만). 또한, 때때로, 퓨린 또는 피리미딘의 메틸화 변이체가 주어진 뉴클레오타이드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트라이뉴클레오타이드 코돈과 상응하는 아미노산 사이의 암호화 관계에 영향을 미치지 않는다.
- [0203] 앞서 말한 관점에서, 바이오마커 핵산(또는 이의 임의의 부분)을 암호화하는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오타이드 서열은 DNA 또는 RNA를 아미노산 서열로 번역하기 위한 유전적 암호를 사용하여 폴리펩타이드 아미노산 서열을 유도하는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩타이드 아미노산 서열을 위해, 이 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 유전적 암호로부터 추론할 수 있다(그 중복성으로 인해 임의의 주어진 아미노산 서열을 위한 다수의 핵산 서열이 생성될 것임). 따라서, 본 명세서에서 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 설명 및/또는 개시는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시 또한 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 마찬가지로, 본 명세서에서 폴리펩타이드 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시는 이 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 모든 가능한 뉴클레오타이드 서열의 설명 및/또는 개시 또한 포함하는 것으로 간주되어야 한다.
- [0204] 마지막으로, 본 발명에 유용한 핵산 및 폴리펩타이드 분자에 대한 핵산 및 아미노산 서열은 이 분야에 잘 알려져 있으며 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)와 같은 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에서 쉽게 이용할 수 있다. 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 데이터베이스로부터 유래된 예시적인 핵산 및 아미노산 서열이 아래 표 1에 제공된다.

표 1

서열번호 1 인간 HHLA2 변이체 1 cDNA 서열 (NM_007072.3, 위치 415-1659 의 CDS 영역)

```

1 agttctcttc aagtcagtga atcgactttt ttgaattagt ttctcagttc attttgtttt
61 cccatattca agttgggaac acttcatttt ccccaattca agttgggaac acttccttgg
121 tatttctctg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctcttcca gctactcagg
181 agggctgaggc agggagaatcg cttgaaccgg ggaggcggag gttacagtga gcccttttct
241 agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa
301 ggaggaggag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatggg atgtggaata
361 tactaaagcc tagaacgcac ctctctgca tgaactaat gtctctgaca agacatgaag
421 gcacagacag cactgttttt ctctctcatt ctataacat ctctgagtgg atctcaagge
481 atattctctt tgcttttctt catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga
541 ctgtatgaag atataattct ccttttttca tttagagggg gatecgaagt cgtaatcac
601 tggaggtatc aagatagcta taagggtcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa
661 agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tcccttttct ataagagat tcaaaatggg
721 aatgcgtcgc tatttttcag aagagttaag cttctggacg aaggaaftta cacttctat
781 gtggaacacg caattcaagt gattacaaac aaagtgggta taaaggtggg agtttttctc
841 acaccctgta tgaagtatga aaagaggaa acaaacagct tcttaafatg cagcgtgtta
901 agtgttttate ctgctccaat tatcacgtgg aaaaaggaca acacacatat ctctgaaaac
961 aacatggaag aaacagggtc ttggattctt ttttctatta acagcccaat gaattattca
1021 ggaatcaaat catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgcctgaagc aacatggaca
1081 gggcgtcgtga cgatgaaaga tggccttcat aaaaatgcaa gtgaacacgt ttcactctca
1141 tgtcaacctg taaatgatta tttttcacca aaccaagact tcaaatgtac ttggctccag
1201 atgaaaagtg ggactttctc tgtctggct tactatctga gctctcaca aaatacaatt
1261 atcaatgaat ccgatttctc atggaaacaa gagctgataa accagagtga cttctctatg
1321 aatttgatgg atcttaatat ttacagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat
1381 gaataatact tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc
1441 cataacaaag gcttatggat ttgggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt
1501 tggagcgtaa aatgttgcag agcccagcta gaagccaggga ggagcagaca cctctgctat
1561 ggagcccaac aagaagaatg ttgtgtccct cctggtgagc gctgtccag tgcaccgat
1621 aatggcgaag aaaatgtgcc ttttctagga aaagtatagg aatgagaga agactgtgac
1681 aactcatgac ctgcatectt aataccagt gaattcatct cccctttctt caccacaatt
1741 ccaggcaatg gcctgtcgga gcagacaatt ctaccactgc aaagagtgtt aaccttttcc
1801 tggatcaca ttatttttcc aagacatact tttaagaca tcattcactg acccactacc
1861 tgcattgagt ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc
1921 tcaattcat tt acatttctgt tacagtcagc ccaggagggt acagtgaag ctccactaag
1981 aatctggaag aatgcatca ctagggttg attccaatc tgatcaactg ataatgggtg
2041 agagagcagg taagagccaa agtcacetta gtggaagggt taaaaaccag agcctggaaa
2101 ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtgtt atafgaacgg ttgtatcagg
2161 gtaaccaact cgatttggga tgaattctag ggcaaccaag actaagacag tatctttaag
2221 attgctaggg aaaagggecc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc
2281 cctgtgattt gcacgtatgc atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag
2341 taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttctgccc ccaccctaac
2401 tgatcaatgt actttgtaat ctccccccac ctttaagaagg tactttgtaa tcttccccac
2461 ccttaagaag gttctttgta attctcccca ccttgagaa tgtacttgt gagatccacc
2521 ctgcccacaa aacattgtct ttaacttca cgcctaacc aaaaactata agaactaatg
2581 ataatccate acccttgcgt gaactctctt tggactcag cccactgca cccaggtgaa
2641 ataacacgt ttattgtctc cacaacaaaa aaaaaaaaa

```

[0205]

서열번호 2 인간 HHLA2 변이체 1 아미노산 서열 (NP_009003.1)

```

1 MKAQALSF LILITLSGS QGIFPLAFFI YYPINEQIVI GRLEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGDH LESQDPRIYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDGIYIT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSSNSYEC TIENSLKQT WTRGWTMDGD LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNLMDNLNS DSGEYLCNLS SDEYLLTIH TVHVPSQET ASHNGGLWIL VPSAILAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQRCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGRV

```

[0206]

서열번호 3 인간 HHLA2 변이체 2 cDNA 서열 (NM_001282556.1, 위치 224-1468 의 CDS 영역)

```

1 aaatcaaacg tacettggac ttactetct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttactagac ggtatgaatt tetaagtaag cacatataga
121 actggatgcc ctgtggtag atctcaagcc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggattttgg ggaagagcat gaataatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc
241 actgtctttc ttctcattc tcataacate tctgagtga tctcaaggca tatccctttt
301 ggcttttttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga
361 tataattctc cctttctcat ttgagagggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca
421 agatagctat aaggttcaca gttactacaa aggcagtgac catttgaaa gccaaagatcc
481 cagatatgca aacaggacat cctttttcta taatgagatt caaaatggga atgcgtcgtc
541 atttttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaattttac acctgctatg taggaacagc
601 aattcaagtg attacaaca aagtgggtgt aaagtgagg gttttttct caccctgat
661 gaagtatgaa aagaggaaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa ggtttttatc
721 tcttccaatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaa acatggaaga
781 aacagggtct ttggattctt ttctatttaa cagccactg aatattacag gatcaaatc
841 acttatgaa tgtacaattg aaatttact gctgaagcaa acatggacag ggcgtggac
901 gatgaaagat ggccttctaa aaatgcaaa gaaacagtt tcaactcat gtcaacctgt
961 aaatgattat ttttaccaca accaagactt caaagttaet tgggtccaga tgaagagtg
1021 gaactttctc gtctggctt actatctgag ctctccaca aatacaatta tcaatgaatc
1081 ccgatttcca tggacaacag agctgataaa ccagagtgac ttctctatga atttgatgga
1141 tcttaactct tcagacagtg gggaaatatt atgcaatatt tcttcggatg aatatacttt
1201 aattaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaagg
1261 ctatggatt ttgggtccct ctgcgatttt ggcagctttt ctgctgattt ggagcgtaaa
1321 atgttcgaga gccacagtag aagccagtag gacgacagc cctgctgatg gagccaaca
1381 agaaagatgt tgttccctc ctggtagcgc ctgtccaggt gcacccgata atggcgaaga
1441 aaatgtgcct ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc
1501 tgcattccta atatccagtg acttcatctc cctttttct accacaatc caggcaatgg
1561 cctgtggag cagacaatc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat
1621 ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattcaactga cccactacct gcattgagta
1681 taaatgctcg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta
1741 catttctgtt acagtacgcc caggaggtta cagtgcgtc tccactaaga atctggaaga
1801 aatgcatcac taggggttga ttcctaactc gatcaactga taatgggtga gagagcaggt
1861 aagagccaaa gtcaccttag tggaaagggt aaaaaccaga gccctggaac caagatgatt
1921 gatttgacaa ggtattttag tctagtitta tatgaacggt tgtatcaggg taaccaacte
1981 gatttgggat gaattctagg gcaccaagaa ctaagacagt atctttaaga ttgctaggga
2041 aaaggccct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atgcatecc ctgtgatttg
2101 cactatata tccagatggc ctaaaagtaac tgaagatcca caaaagaagt aaaaatagcc
2161 ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttctctccc caccctaact gateaatgta
2221 ctgttgaate tccccacc ttaagaagggt actttgtaat ctccccacc cttaagaagg
2281 ttctttgtaa ttctccacc ccttgagaat gtaactttgt agateccacc tgcaccacaa
2341 acattgtctt taacttccac gccfaaccac aaacctataa gaactaatga taatccatca
2401 ccttctctg actctctttt cggaactcagc ccaactgcac ccaggtgaaa taaacagctt
2461 tattgtctac acaaaaaaaa aaaaaaaa

```

[0207]

서열번호 4 인간 HHLA2 변이체 2 아미노산 서열 (NP_001269485.1)

```

1 MKAQTALSF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GLRDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDGEIYT
121 CVVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNLMNLNS DSGEYLCNIS SDEYTLTTH TVHVEPSQET ASHNGLWIL VPSAIIAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

```

[0208]

서열번호 5 인간 HHLA2 변이체 3 cDNA 서열 (NM_001282557.1, 위치 155-1399 의 CDS 영역)

```

1 agtttactct acatcatagc agagaaaatg gacaaaacac agctgttttg caftgaggag
61 aatactaacc ctgcacagat tgtgatgggt atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac
121 etectctgca tgactaatat gtcttgcaca agacatgaag gcacagacag caetgtcttt
181 ctctctcaat ctcataacat ctctgagtggt atctcaagge atattcectt tggctttctt
241 caftttatgtt cctatgaatg acaaatcgtt cattggaaga ctfgatgaag atataattct
301 cectttctca tttagagagg gatccgaagt cgtatatac tggagagtac aagatageta
361 taagggtcac agttactaca aaggcagtg ccatftgga agcccaagatc ccagatatgc
421 aaacaggaca tcecttttct ataatagat tcaaatggg aatgcgtcgc tatttttcag
481 aagagtaage cttctggacg aaggaattta cacttctat gtggaacac caattcaagt
541 gattacaaac aaagtgggta taaaggagg agttttctc acaccctga tgaagtatga
601 aaagaggagc acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtgtttatc ctctccaat
661 tatcaegtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaac aacatggaag aaacagggtc
721 tttagattct tttttatata acagccactt gaattattca ggaatcaatt catcttatga
781 atgtacaatt gaaaattcac tctgaagca aacatggaca gggcgtgga cgaatgaaaga
841 tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttactctca tgtcaacctg taaatgatta
901 tttttacca aaccaagact tcaaaagtta ttggtccaga atgaaaagt ggaactttct
961 ttgcttggtc tactatctga gctctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc
1021 atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg aatttgatgg atcttaattc
1081 ttacagacgt ggggaatatt taigcaatat ttcttcggat gaatatactt tacttaccat
1141 ccacacagtg catgtagaac cgaagcaaga aacagcttcc catacaaaag gcttatggat
1201 ttttggtccc tctgcatgtt tggcagcttt tctgtctgatt tggagcgtaa aatgttgacg
1261 agccagagta gaagccagga ggaagcagaca cctgtctgat ggaagccaac aagaagatg
1321 ttgtgtccct cctggtgagc gctgtccag tgcacccgat aatggcgaag aaaatgtgcc
1381 tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcactctt
1441 aatafccaat gaattcatct cccctttctt caccacaatt ccagccaatg gctgttcgga
1501 gcagacaatt ctaccatgce aaagagttgt aaccatttct tggatcacat ttatttttct
1561 aagacatact tttaagaca tcatctactg acccactacc tgcattgagt ataatgect
1621 ggaatgtaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcaftcattt acatttctgt
1681 tacagtccag ccaggagggtt acagtgaact ctcactaag aatctggaag aaatgcatca
1741 etagggttg attcccaate tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa
1801 agtcacttta gtggaaagggt taaaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca
1861 aggtattttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttggga
1921 tgaattctag ggcaccaaaag actaagacag tatctttaag attgtagggt aaaagggecc
1981 tatgtgtcag gctctgagc ccaagccaag catcgatcc cctgtatttt gcacgtatac
2041 atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaatagc ettaactgat
2101 gacattccac catttgtatt tgttctgccc caccctaac tgatcaatgt actttgtaat
2161 ctececeacc cttaagaagg tactttgtaa tctceccac ccttaagaag gttctttgta
2221 attctcecca cctttgagaa tgtactttgt gagatccacc ctgcccacaa aacattgctc
2281 ttaacttccac cgcctaacce aaaactata agaactaatg ataatecate acccttctgt
2341 gactctcttt tgggactcag cccacttcca cccagggtgaa ataaacagct ttattgtctca
2401 cacaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

[0209]

서열번호 6 인간 HHLA2 변이체 3 아미노산 서열 (NP_001269486.1)

```

1 MKAQALSF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYKGS DH LESQDPRIYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKYTW SRMKSGTFSV LAYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNLMDLNL DSGEYLCNIS SDEYLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAALF
361 LIWSVKCRA QLEARRSRHP ADGAQQRCC VPPGERCPA PNNGEENVPL SGKV

```

[0210]

서열번호 7 인간 HHLA2 변이체 4 cDNA 서열 (NM_001282558.1, 위치 302-1495 의 CDS 영역)

```

1 aaatcaaacg taccttggac ttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
121 actggatgcc ctgtgtgtac atctcaagge tgatttgaag gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gafggatg
241 tggatataac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga
301 catgaaggca cagacagcac tgtcttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc
361 tcaagccata ttccctttgg ctttcttcat ttatgttctc atgaatgaac aaatcgctat
421 tggagagact gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtctg
481 aatacactgg aagtatcaag atagctataa gggtcacagt tactacaaag gcagtgaaca
541 ttggaaagc caagatccca gatfatgcaa caggacatcc cttttctata atgagattca
601 aaatgggaat gcctgcctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac
661 ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaacaaaa gtggtgctaa aggtgggagt
721 ttttctaca cccgtgatga agfatgaaaa gaggaacaca aacagcttct taatatgcag
781 cgtgttaagt gtttactctc gtccaattat cagctggaaa atggacaaca cactctctc
841 tgaaaacaac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gccactgaa
901 tattacagga tcaaatctat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc tgaagcaaac
961 atggaacagg cgctggacga tgaagatgg ccttcataaa atgcaaatgt aacactttc
1021 actctcatgt caacctgtaa atgattatit ttacccaaac caagacttca aagttacttg
1081 gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa
1141 tacaattatc aatgaatccc gatctctcat gaacaaaagc ctgataaacc agagtgaactt
1201 ctctatgaat ttgatggate ttaattcttc agacagtggg gaattatttt gcaattatitc
1261 ttccggatgaa tatactttac ttaccatcca cacagtgcac gtgaaccga gcccaagaaac
1321 agcttcccat aacaaaggct tatgattttt gggtgccctct gcgatttttg cagcttttct
1381 gctgatttgg agcgtaaaaa gttgcagaga aagatgttgt gtccctctgt gtgagcctg
1441 tcccagtcca cccgataatg ccgaagaaaa tgtgcccttt tcaggaaaaa tataggaaat
1501 gagagaagac tgtgacaact catgaactgc atccttaata tccagtgaat tcatctcccc
1561 tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtcggagcag acaattctac cactgcaaac
1621 agttgtaacc attttctggc atcacattta ttttcaaga catacttttc aagacatcat
1681 tcaatgaacc actaactgca ttgagtataa atgectggat gtttaaggatt ccaatttaac
1741 ttgaaaaaga actgtctcat tcatttacat ttctgttaca gtacgccag gaggttacag
1801 tgactctctc actaagaate tggagaagaa gcatcactag gggttgatc ccaatctgat
1861 caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaaggttaaa
1921 aaccagagcc tggaaaccaa gatgatgat ttgacaaagt attttagctc agttttatat
1981 gaacggttgt atcagggtaa ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta
2041 agacagtatc ttttaagatt ctagggaaaa ggcccctatg tctcaggcct ctgagcccaa
2101 gccaaagcat gcatccctgt tgatttgca gtafacatcc agatggccta aagtaactga
2161 agatccacaa aagaagtaaa aatagcetta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt
2221 cctgcccac ctaactgat caatgtact tgaatctcc cccaccetta agaaggctact
2281 ttgtaattct cccaccctt aagaaggctc ttgttaattc tcccaccct tgagaatgta
2341 etttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaa ttgctcttaa cttcaccgcc taacccaaaa
2401 cctataagaa ctaatgataa tccatcaccc ttgctgact ctttttctgg actcagccca
2461 cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tctcacaca aaaaaaaaaa aaaaa

```

[0211]

서열번호 8 인간 HHLA2 변이체 4 아미노산 서열 (NP_001269487.1)

```

1 MKAQALSFF LILITSLSGS QGIFLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYVKGSDH LESQDPRIYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDDEGIYT
121 CVVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQI WTGRWTRMDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNMDLNLNLS DSGEYLCNIS SDEYLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAALF
361 LIWSVKCCRE RCCVPPGERC PSAPDNGEEN VPLSGKV

```

[0212]

서열번호 9 인간 HHLA2 변이체 5 cDNA 서열 (NM_001282559.1, 위치 232-1284 의 CDS 영역)

```

1 aaatcaaacg taccttggac ttactctet gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tactttagct ttactagac ggtatgaatt tctaatgaag cacatataga
121 actggtatgcc ctgttggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaacctcg cacagattgt gatggtagat
241 tggatataac taagccttag aacgcacct cctctgatga ctaatatgtt ctgcacaaga
301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataactctc tgagtggatc
361 tcaagaagag taagccttct ggacgaaggc atttacacct gctatgtagg aacagcaatt
421 caagtgaatt caaacaaagt ggtgctaaag gtgggagttt ttctcacacc cgtgatgaag
481 tatgaagaaga ggaacacaaa cagctttctt atatgcagcg tgttaagtgt ttatcctcgt
541 ccaattatca cgtggaaaaa ggacaacaca cctatctctg aaaacaacat ggaagaagaa
601 gggctcttgg attcttttct tattaacagc ccactgaata ttacaggatc aaattctatc
661 tatgaatgta caattgaaaa ttacttctgt aagcaaacat ggacaggcgc ctggacgatg
721 aagaatggcc ttcatataat gcaaaagtga cagctttcac tctcatgta acctgttaat
781 gatatttttt caccacaaac agacttcaaa gttaacttgg ccagaatgaa aagtgggaact
841 ttctctgtcc tggttaacta tetgagctcc tcacaaaata caattatcaa tgaatccaga
901 ttctcatgga acaaaagagc gataaaaccg agtgaacttc ctatgaattt gatggatctt
961 aatctttcag acagtgggga atatttatgc aatatttctt cggatgaata tactttactt
1021 accatccaca cagtgcattg agaaccgagc caagaacagc ctcccataa caaaggctta
1081 tggattttgg tgccctctgc gattttggca ccttttctgc tgatttggag cgtaaaaagt
1141 tgcagagccc agctagaagc caggagagagc agacacctcg ctgatggagc ccaacaagaa
1201 agatgttgtg tccctctggg tgagcgtgtt ccagtgcaac ccgataatgg cgaagaataat
1261 gtgcctcttt caggaaaaat ataggaaatg agagaagact gtgacaactc atgaacctgca
1321 tcttataatc ccagtgaatt catctccctt ttcttaccac caattccagg caatggcctg
1381 tggagcagca caattctacc actgcaagaa gtgttaacca tttctggta tcacatttat
1441 ttttcaagac atacttttca agacatcatt cactgaccca ctacctgcat tgaagtataa
1501 tgcctggatg ttaaggattc caatttaact ttgaaaagaa ctgtctcatt catttacatt
1561 tctgttacag tcagccaggg aggtttacagt gagctcteca ctaagaatct ggaagaaatg
1621 catcactagg ggttgatccc caatctgac aactgataat gggtagagga gccagtaaga
1681 gccaaagtca ctttagtgga aaggttataa accagagcct ggaacacaa atgattgatt
1741 tgacaaggta ttttagtcta gttttatatg aacggttgta tcagggtaac caactcgatt
1801 tgggatgaat cttagggcac caaagactaa gacagtatct ttaagattgc tagggaaaaa
1861 ggccctatgt gtcagccctc tgagcccaag ccaagcatcg catccctgt gatttgcacg
1921 tatacatcca gatggcctaa agtaactgaa gatecacaaa agaagtaaaa atagccttaa
1981 ctgatgacat tccaccattg tgatttgttc ctgcccacac ctaactgate aatgtacttt
2041 gtaactctcc ccaccttaa gaaggtaact tgaatcttc ccacctta agaaggctct
2101 ttgtaatctc cccacctt gagaatgtac ttgtgagat ccacctgcc cacaaaaatc
2161 tgctettaac ttacccgctt aacccaaaa ctataagaac taatgataat ccatcacctt
2221 tctgtgactc tctttcgga ctcagccac ctgacccagc gtgaaataaa cagctttatt
2281 gctcacacaa aaaaaaaaaa aaaa

```

[0213]

서열번호 10 인간 HHLA2 변이체 5 아미노산 서열 (NP_001269488.1)

```

1 MVMNLIKPR THLLCMNMF CTRHEGTDST VFLPHSHNIS EWISRRVSLI DEGIYTCYVG
61 TAIQVITNKV VLKGVFLTP VMKYEKRTN SFLICSVLSV YPRPIITWKM DNTPISENNM
121 EETGSLDSFS INSPNITGS NSSYECTIEN SLLKQITWTR WTMKDGLHKM QSEHVSLSQ
181 PVNDYFSPNQ DFKVTWSRMK SGTFSVLAYI LSSSQNTIIN ESRFSWNKEL INQSDFSMNL
241 MDLNLSDSGE YLCNISSDEY TLLTHTVHV EPSQETASHN KGLWILVPSA ILAFLLIWS
301 VKCCRAQLEA RRSRHPADGA QERCCVPPG ERCPSAPDNG EENVPLSGKV

```

[0214]

서열번호 11 인간 TMIGD2 동형체 1 cDNA 서열 (NM_144615.2, 위치 47-895 의 CDS 영역)

```

1 ggaagtctgt caactggagg ggggagaggg gggtagagg ccaggaatgg ggtccccggg
61 catggtgctg ggccctctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt
121 gcagcagggg ccgaacttgc tgcaggtgag gcaggcgagt caggcgacce tggctcgcca
181 ggtggaccag gccacagcct gggaaagggt ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat
241 cctgtgtcaa cgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgag ggccccaggg
301 acgctctccc tggcaggcac ccagccatct caccctcgag ctggaccctg tgaagctcaa
361 ccacagcggg gctacgtgtg gctgggcggc cgttagagatt cctgagttgg aggaagctga
421 gggaacata acaaggctct ttgtggacce agatgacccc acacagaaca gaaaccggat
481 gcgaagcttc ccaggattcc tcttctgtct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtgctgct
541 gatcgtgtgg ggtgectggt tctggggcgg ccgcagctgc cagcaaaagg actcaggtaa
601 cagccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaagaa
661 gagtgaaggac tgcctggag aggggaaggc ccagaggggc cagagcattt attcaactc
721 ctctccgcaa ccggccccc gccagccgca cctggcgta agacctgccc ccagccgag
781 acctgcccc agccccagge ccggccccc cgttctatg gtcagggtct cctctagacc
841 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gtccccaaa gtggggaggg agtgagagat
901 cccagagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggaatcgaggc
961 cagacacggg ggtcagccc tgaatccca gcagtttggg aagccgagge ggggtggaaca
1021 cttagagta ggggttttag accagcctgg ctgaaactg ggaaggcggag gttagcagtga
1081 gccagattg ccgactgca ctcagcctg ggcgacagag tgagactcgg tctcaaaaaa
1141 aacaaaaage agggagattg ggagcctgta agccccatcc tgagacccc tctcatttc
1201 tgaatgatg gatctgctc ccaatttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa
1261 aagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```

[0215]

서열번호 12 인간 TMIGD2 동형체 1 아미노산 서열 (NP_653216.2)

1 MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT
61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSQAY VCWAAVEIPE
121 LEEAEGNITR LFDVDDPTQ NRNRISFPG FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSQOQ
181 RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR GAPKKSEDCS GEGKDQGRQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP
241 CPSPRPSPSP RFGHPVSMVR VSPRPSPSTQQ PRPKGFPAVG EE

[0216]

서열번호 13 인간 TMIGD2 동형체 2 cDNA 서열 (NM_001169126.1, 위치 47-883 의 CDS 영역)

1 gggaagtctgt caactgggag ggggagaggg ggggtgatggg ccaggaaatgg ggteccccggg
61 catgggtcttg ggctctctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcttgagcgt
121 gcagcaggggg cccaacttgc tgcagggtgag gcaggggcagt caggcgaccc tgggttgcca
181 ggtgggaccag gccacagcct ggggaacggct ecgtgttaag tggacaaagg atggggccat
241 cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctcgc ggccccaggg
301 acggctctcc tggcaggcae ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa
361 ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggagcctga
421 gggaacacata acaaggtctt ttgtggacce agatgacccc acacagaaca gaaaccggat
481 cgcaagette ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc
541 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggcgc ccgcagctgc cagcaaaagg actcaggaaa
601 tgcattctac agcaacgtcc tataccggcc ccggggggcc ccaaaagaaga gtgaggactg
661 ctctggagag ggggaaggacc agaggggcca gacatttat tcaacctcct tcccgaacc
721 ggccccccgc cagccgaccc tggcgtcaag accctgcccc agcccagagac cctgccccag
781 cccagggccc ggccaccgcc tctctatggt cagggtctct cctagaccaa gcccaccca
841 gcagccgagg ccaaaaagggt tccccaaagt gggagaggag tgagagatcc caggagacct
901 caacagagacc caaccatag gtacacacaa aaaagggggg atcgagacca gacacgttgg
961 ctcaagcctg taatccagc agtttgggaa gccgagcgg gtggaaacct tgaggtcagc
1021 ggtttgagac cagcctggtt tgaacctggg aggcggaggt tgcagtgagc cgagattgcg
1081 ccactgcact ccagcctggg cgacagagtg agactccgtc tcaaaaaaa caaaaagcag
1141 ggggattggg agcctgtcag ccccatcctg agaccctgc ctcatttctg taatgatgga
1201 tctcgtccc acitfcccc aagaacctaa taaagccttg tgaagaaaaa gcaaaaaaaa
1261 aaaaaaaaaa

[0217]

서열번호 14 인간 TMIGD2 동형체 2 아미노산 서열 (NP_001162597.1)

1 MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT
61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSQAY VCWAAVEIPE
121 LEEAEGNITR LFDVDDPTQ NRNRISFPG FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSQOQ
181 RDSGNSPGNA VLYRPRGAPK KSEDCSGEGK DQGRQSYST SFPQAPRQP HLASRPSPSP
241 RCPSPRPSPGH PVMVRVSPR PSPSTQPRPK GFPAVGE

[0218]

서열번호 15 인간 TMIGD2 동형체 3 cDNA 서열 (NM_001308232.1, 위치 47-535 의 CDS 영역)

1 gggaagtctgt caactgggag ggggagaggg ggggtgatggg ccaggaaatgg ggteccccggg
61 catgggtcttg ggctctctgg tgcagatctg ggatgacccc acacagaaca gaaaccggat
121 cgaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc
181 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggcgc ccgcagctgc cagcaaaagg actcaggtaa
241 cagccagga aatgattct acagcaact cctataccgg cccggggggg ccccaagaa
301 gaggtaggac tgetctggag aggggaaggga ccagaggggc cagagcattt attcaactc
361 ctteccgcaa ccggccccc ccagccgca cctggcgtea agaccctgce ccagcccgag
421 accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcctagacc
481 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat
541 cccagagagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgagge
601 cagacacgggt ggctcacgce tgaatccca gcagtttggg aagccgaggc ggggtggaaca
661 cttagaggtca ggggttttag accagcctgg ctgaaacctg ggaagcggag gttgcagtg
721 gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactcc tctcaaaaaa
781 aacaaaaagc aggagagatt ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg tctcatttc
841 tgtaatgatg gatctcctc ccaatttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa
901 aagcaaaaaa aaaaaaaa

[0219]

서열번호 16 인간 TMIGD2 동형체 3 아미노산 서열 (NP_001295161.1)

1 MGSPGMVLGL LVQIWDDPTQ NRNRISFPG FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSQOQ
61 RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR GAPKKSEDCS GEGKDQGRQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP
121 CPSPRPSPSP RFGHPVSMVR VSPRPSPSTQQ PRPKGFPAVG EE

[0220]

서열번호 17 인간 KIR3DL3 cDNA 서열 (NM_153443.4, 위치 51-1283의 CDS 영역)

```

1  tgcgtctgaa  ctgagctggg  ggcgagcgc  ctgtctgcac  cggcagcacc  atgtcgtca
61  tgggtcgtcag  catggcgtgt  gttgggttct  tcttctggga  ggggcccctg  ccacatgtgg
121  gtgggtcagg  caagcccttc  ctctctgctt  ggcgccggc  tgggtgtct  gaagagcaac
181  atgtgactct  tcagtgtcgc  tctctgttgc  ggttttaatg  attcagtcgt  tccaaagaag
241  acgggagatgc  tgtccctgag  ctctacaaca  gaatatctcg  gaacagcttt  ctcatgggce
301  ctgtgacccc  agcacatgca  gggaccta  gatgttgcag  ttcacacca  cactccccca
361  ctgggtggtc  ggcacccegc  aacctgtgg  tgatcatggt  cacaggagtc  cacagaaaac
421  ctctccctct  ggcccaacca  ggtccctgg  tgaatcagg  agagacggtc  atcttgcatt
481  gttgttcaga  tgtcaggttt  gagcgtcttc  ttctgcacag  agaggggagc  actgaggagc
541  ccttgccct  cgttggacag  ctccacgatg  cgggttccca  ggtcaactat  tccatgggtc
601  ccatgacacc  tgccttgca  gggaccta  gatctttgg  ttctgtcact  cacttaacct
661  atgagtgttc  ggctccctgt  gacctctgg  acatcgtggt  cgtaggctta  tatgggaac
721  cttctctctc  agccagccgc  ggcaccacgg  ttcaggcagg  agagaatgtg  accttgcct
781  gcagctcccg  gagcttgttt  gacatttaac  atctatccag  ggaggcggag  gccggtgaac
841  ttaggctcac  tgcagtctgt  agggctcaatg  gaacattcca  ggccaacttc  cctctgggce
901  ctgtgaccca  cggagggaac  tacagatgct  tggctcttt  cgtgcccctg  cccatgctgt
961  ggtcagaccc  gagtgaccca  ctgccctgtt  ctgtcacagg  taactccaga  aacctgcacg
1021  ttctgattgg  gacctcagtg  gtcatctcc  cctttgctat  cctctcttc  ttctctcttc
1081  atcgtcgtgt  tgccaacaaa  aagaatgctg  ttgtaatgga  ccaagagcct  gcagggaaca
1141  gaacagtgaa  caggaggagc  tctgatgaac  aagacctcca  ggagtgagca  tacgacagct
1201  tgatcaactg  cgttttcaca  cagagaaaaa  tcactgcccc  ttctcagagg  cccaagacac
1261  ccccaacaga  taccagcgtg  taacacggaa  cttccaaatg  ctgagccag  atccaaagt
1321  gttctctgtc  cactagcacc  acagtacagg  ctgatggga  tctctaggg  agacaatgac
1381  cctgtctcaa  aaccgggttg  ccagctccca  tgtaccagca  gctggactct  gaagcgtgga
1441  gtctgcatct  tagggcatcg  ctctctctca  caccacgaat  ctgaacatgc  ctctctcttg
1501  cttcaaaatg  tctaaggtcc  ccactgctgt  ctggagagaa  aacacacttg  cttagccccc
1561  aattctccat  ttcaactgac  cctgcaccac  ctctccaccc  taactggctt  acttctctgt
1621  ctacttgagg  ctgcgatcac  actgaggaa  tcacaattcc  aaacatataa  gaggtctcct
1681  cttacacagg  cacttagata  cgtgctattc  cacttctct  cag

```

[0221]

서열번호 18 인간 KIR3DL3 아미노산 서열 (NP_703144.3)

```

1  MSLMVSMAC  VGFFLEGPW  PHYGGQDKPF  LSAWPGTVVS  EGQHVTLQCR  SRLGFNEFSL
61  SKEDGMPVPE  LYNRIFRNSF  LMGPVTPAHA  GTYRCCSSHP  HSPTGWSAPS  NPVVMVTVGV
121  HRKPSLLAHP  GPLVKSGETV  ILQWSDVRF  ERFLHREGI  TEDPLRLVGQ  LHDAGSQVNY
181  SMGMPMPALA  GTYRCFSGSV  HLPYELSAPS  DPLDIVVVL  YGKPSLSAQF  GPTVQAGENV
241  TLSCSRSLF  DIYHLSREAE  AGEHLRLTAVL  RVNGTFQANF  PLGPVTHGGN  YRCFGSFRAL
301  PHAWSDPSPD  LPVSVTGNRS  NLHLVIGTSV  VIIPFAILLF  FLLHRWCANK  KNAVMDQEP
361  AGNRTVNRED  SDEQDPQEV  YQLNHCVFT  QRKITRPSQR  PKTPTDTTSV

```

[0222]

[0223]

* 표 1에는 RNA 핵산 분자(예를 들어, 티민이 우리딘으로 치환된), 암호화 단백질의 오솔로그를 암호화하는 핵산 분자뿐만 아니라, 표 1에 열거된 임의의 서열번호의 핵산 서열 전장에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 DNA 또는 RNA 핵산 서열, 또는 이들의 일부분이 포함된다. 이러한 핵산 분자는 본 명세서에 추가로 기술된 바와 같이 전장 핵산의 기능을 가질 수 있다.

[0224]

* 표 1에는 단백질의 오솔로그뿐만 아니라, 표 1에 열거된 임의의 서열번호의 아미노산 서열 전장에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 분자, 또는 이들의 일부분이 포함된다. 이러한 폴리펩타이드는 본 명세서에 추가로 기술된 바와 같이 전장 폴리펩타이드의 기능을 가질 수 있다.

[0225]

* 표 1에는 다른 알려진 HHLA2, TMIGD2 및 KIR3DL3 핵산 서열 및 아미노산 서열이 포함된다.

[0226]

자극 수용체가 되는 것에 더해(즉, 면역 세포에 공동자극 신호를 전달하는 것), HHLA2 폴리펩타이드는 예를 들어 저해 수용체 또는 자극 수용체에 결합할 때, 면역 세포에 저해 신호를 전달하여 면역 세포 이펙터 기능을 저해할 수 있는 저해 수용체이거나, 면역 세포의 공동자극을 촉진할 수 있다. HHLA2는 하나 이상의 수용체, 예를 들어 T-세포 상의 TMIGD2, KIR3DL3 및/또는 다른 폴리펩타이드에 결합한다.

[0227]

용어 "HHLA2 활성화"는 예를 들어 T-세포 상 천연 HHLA2 리간드 결합에 의해, 활성화 면역 세포에서 저해 신호를 조절하는 HHLA2 폴리펩타이드의 능력을 포함한다. 면역 세포에서 저해 신호의 조절은 면역 세포의 증식 및/또는 사이토카인 분비의 조절을 야기한다. 따라서, 용어 "HHLA2 활성화"는 천연 리간드에 결합하는 HHLA2 폴리펩타이드의 능력, 면역 세포 공동자극 또는 저해 신호를 조절하는 능력 및 면역 반응을 조절하는 능력을 포함한다.

[0228]

일부 실시형태에서, 암과 같은 상태는 HHLA2 차단 단독에 반응한다. 다른 실시형태에서, 암과 같은 상태는 HHLA2 차단 단독에 반응하지만, HHLA2 차단과 다른 요법을 조합하여 치료할 때 유의적으로 또는 상승적으로 더 반응한다. HHLA2 차단 단독에 또는 조합에 반응하는 상태에는 흑색종(예를 들어, 진행성 또는 전이성 흑색종), 폐암(예를 들어, 비-소 세포 폐암 및 소 세포 폐암), 유방암(예를 들어, HER-2 음성 유방암, 에스트로겐-수용체 +/HER-2-유방암 및 삼중 음성 유방암), 췌장암(예를 들어, 췌장 선암종) 및 호지킨 림프종뿐만 아니라, 방광암,

위암, 두경부암, 신장암, 전립선암, 부인암(gynecologic cancer), 대장암, 난소암 및 혈액암이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0229] 바람직한 B7 폴리펩타이드는 면역 세포에 공동자극 또는 저해 신호를 제공하여 면역 세포 반응을 촉진 또는 저해할 수 있다. 예를 들어, 공동자극 수용체에 결합하는 B7 패밀리의 구성원은 T 세포 활성화 및 증식을 증가시키는 반면, 저해 수용체에 결합하는 B7 패밀리의 구성원은 공동자극을 감소시킨다. 또한, 같은 B7 패밀리의 구성원은 T 세포 공동자극을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 공동자극 수용체에 결합했을 때, HHLA2는 면역 세포의 공동자극을 유도할 수 있고, 저해 수용체에 결합했을 때, HHLA2는 면역 세포를 저해할 수 있다. 저해 수용체에 결합했을 때, HHLA2는 면역 세포에 저해 신호를 전달할 수 있다. 바람직한 B7 패밀리의 구성원은 HHLA2, B7-1, B7-2, B7h, PD-L1 또는 PD-L2 및 이들의 가용성 단편 또는 유도체를 포함한다. 일 실시형태에서, B7 패밀리의 구성원은 면역 세포 상 하나 이상의 수용체, 예를 들어 TMIGD2, KIR3DL3, CTLA4, CD28, ICOS, PD-1 및/또는 다른 수용체에 결합하고, 수용체에 따라, 면역 세포, 바람직하게는 T 세포에 저해 신호 또는 공동자극 신호를 전달하는 능력을 갖는다.
- [0230] 공동자극 신호의 조절은 면역 세포의 이펙터 기능 조절을 야기한다. 따라서, 용어 "HHLA2 리간드 활성화"는 천연 수용체(예를 들어, HHLA2)에 결합하는 HHLA2 리간드 폴리펩타이드의 능력, 면역 세포 공동자극 또는 저해 신호를 조절하는 능력 및 면역 반응을 조절하는 능력을 포함한다.
- [0231] 본 명세서에서 HHLA2 경로가 면역 기능의 음성적 조절자 또는 양성적 조절자이고, HHLA2와 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용을 조절하는 것으로 면역 기능을 조절할 수 있음을 증명하였다. TMIGD2에 결합하는 HHLA2는 면역 기능의 양성적 조절자가 될 수 있다. 저해 수용체에 결합하는 HHLA2는 면역 기능의 음성적 조절자이다. TMIGD2에 결합하는 HHLA2는 저해 수용체에 결합하는 HHLA2와 유사한 것으로 여겨진다. 따라서, TMIGD2에 대한 HHLA2 결합을 저해하는 것이 저해 수용체에 대한 HHLA2 결합을 저해하는 것으로 여겨진다. 그러므로, 본 명세서에 HHLA2 경로 조절제(예를 들어, HHLA2와 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용 조절제)로 기술된 본 발명의 물질은 HHLA2와 하나 이상의 천연 결합 상대 사이의 상호작용을 조절하고, 직접적이든 간접적이든, 면역 시스템을 상향조절 또는 하향조절하여, 면역 반응을 상향조절 또는 하향조절할 수 있다. 이러한 상호작용을 조절하는 물질은 직접적으로 또는 간접적으로 이를 수행할 수 있다.
- [0232] HHLA2와 TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 하나 이상의 HHLA2 천연 결합 상대 사이의 상호작용은 면역 신호 공동-자극 또는 공동-저해의 전달을 야기한다. 따라서, 일 실시형태에서, 이러한 상호작용을 직접적으로 차단하는 물질(예를 들어, 항-HHLA2, 항-TMIGD2 및/또는 항-KIR3DL3 차단 항체)은 저해 또는 자극 신호전달을 차단할 수 있고 면역 반응을 상향조절 또는 하향조절할 수 있다. 대안적으로, 이 상호작용을 간접적으로 차단하는 물질은 저해 신호전달을 차단할 수 있고 면역 반응을 상향조절할 수 있다. 면역 반응을 상향조절하기 위한 물질의 예시로 HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 차단하는 HHLA2 또는 KIR3DL3에 대한 항체; HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 차단하는 HHLA2 또는 KIR3DL3의 비-활성화 형태(예를 들어, 우성 음성 폴리펩타이드), 소분자 또는 펩타이드; HHLA2 또는 KIR3DL3에 결합하고, HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 저해하는 융합 단백질(예를 들어, 항체 또는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된 HHLA2 또는 KIR3DL3의 세포외 부분); HHLA2 및/또는 KIR3DL3의 전사 또는 번역을 차단하는 핵산 분자 및/또는 유전적 변형체; 천연 HHLA2 리간드의 비-활성화 형태 및 천연 KIR3DL3 리간드의 가용성 형태가 포함된다.
- [0233] 다른 예시적 실시형태에서, HHLA2 폴리펩타이드가 KIR3DL3 폴리펩타이드와 같은 하나 이상의 천연 결합 상대에 결합하는 것을 촉진하는 물질은 면역 세포에 저해 신호를 촉진한다. 이러한 상호작용을 조절하는 물질은 직접적으로 또는 간접적으로 이를 수행할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 직접적으로 향상시키는 물질(HHLA2 작용제 및/또는 KIR3DL3 작용제)은 저해 신호전달 및 면역 반응 하향조절을 촉진할 수 있다. 대안적으로, 다른 표적에 대한 KIR3DL3의 결합을 차단하는 물질은 HHLA2에 결합하는데 이용가능한 KIR3DL3의 유효농도를 증가시킨다. 예시적으로 면역 반응을 하향조절하는 물질은 HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 활성화 또는 촉진하는 HHLA2 또는 KIR3DL3에 대한 항체; HHLA2와 KIR3DL3 사이의 상호작용을 활성화 또는 촉진하는 소분자 또는 펩타이드; HHLA2와 KIR3DL3 이외의 다른 HHLA2 및 KIR3DL3의 천연 결합 상대에 결합하는 차단 항체를 포함한다. 이들의 관계는 또한 HHLA2 및 TMIGD2의 상호작용에도 적용된다.
- [0234] 본 발명의 방법에 유용한 부가적인 물질은 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는, 본 발명의 단백질 바이오마커에 결합할 수 있는 및/또는 본 발명의 단백질 바이오마커를 활성화 또는 저해할 수 있는, 항체, 소분자, 펩타이드, 펩티도미메틱스, 천연 리간드 및 이의 유도체; 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을

포함하는, 본 발명의 바이오마커의 발현 및/또는 활성을 하향조절할 수 있는, RNA 간섭, 안티센스, 핵산 압타머 등을 포함한다.

- [0235] HHLA2에 대해 직접적인 단리된 단일클론성 항체 또는 이의 단편이 제공된다. 일부 실시형태에서, 하이브리도마에 의해 생산된 mAb가 수탁번호 _____로, _____에, 부다페스트 조약의 조건에 따라 미국 군주 기탁 기관인 ATCC(American Type Culture Collection)에 기탁되어 있다.
- [0236] 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인이 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에 특히 중요한 역할을 한다는 것이 이 분야에 잘 알려져 있으므로, 상기와 같이 제조된 본 발명의 재조합 단일클론성 항체는 바람직하게는 본 발명의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄 CDR3를 포함한다(예를 들어, 표 2의 서열 또는 이의 일부분을 포함). 항체는 또한 본 발명의 가변 영역의 CDR2를 포함할 수 있다(예를 들어, 표 2의 서열 또는 이의 일부분을 포함). 항체는 또한 본 발명의 가변 영역의 CDR1을 포함할 수 있다(예를 들어, 표 2의 서열 또는 이의 일부분을 포함). 다른 실시형태에서, 항체는 CDR의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0237] 상기 기술된 조작된 항체의 CDR1, 2 및/또는 3 영역은 본 명세서에 기술된 본 발명의 가변 영역의 것과 같은 아미노산 서열(예를 들어, 표 2의 서열 또는 이의 일부분을 포함)을 포함할 수 있다. 하지만, 통상의 기술자라면 HHLA2에 효과적으로 결합하는 항체의 능력을 유지하면서 상기 CDR 서열로부터 일부 편차가 가능할 수 있음을 인식할 것이다(예를 들어, 보수적인 서열 변경). 따라서, 다른 실시형태에서, 조작된 항체는 본 발명의 하나 이상의 CDR(예를 들어, 표 2의 서열 또는 이의 일부분을 포함)에 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 동일한 하나 이상의 CDR로 이루어질 수 있다.
- [0238] 알려진 비-인간 또는 인간 항체(예컨대, 마우스, 비-설치류 항-인간 HHLA2 항체)의 구조적인 특성이 HHLA2의 결합과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적인 특성을 유지하는 구조적으로 연관된 인간 항-인간 HHLA2 항체(예를 들어, mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2)를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 다른 기능적인 특성은 경쟁적 ELISA 분석에서 본래의 알려진 비-인간 또는 인간 항체의 결합을 저해하는 것을 포함한다.
- [0239] 일부 실시형태에서, 표 2에 나타난 중쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 중쇄를 포함하는, 인간 HHLA2와 결합할 수 있는 단일클론성 항체(예를 들어, mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2)가 제공된다.
- [0240] 유사하게, 표 2에 나타난 경쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 경쇄를 포함하는, 인간 HHLA2와 결합할 수 있는 단일클론성 항체(예를 들어, mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2)가 제공된다.
- [0241] 표 2에 나타난 중쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 중쇄; 및 표 2에 나타난 경쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 경쇄를 포함하는, 인간 HHLA2와 결합할 수 있는 단일클론성 항체(예를 들어, mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2) 또한 제공된다.
- [0242] 당업자는 이러한 백분을 상동성이 주어진 CDR과 동등하고 주어진 CDR 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상 보수적인 아미노산 치환을 도입하는 것으로 달성될 수 있다.
- [0243] 본 발명의 단일클론성 항체는 표 2에 나타난 중쇄 가변 도메인 CDR로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 중쇄 및 표 2에 나타난 경쇄 가변 도메인 CDR로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0244] 이러한 단일클론성 항체는 본 명세서에 기술된 바와 같은, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 경쇄; 및/또는 본 명세서에 기술된 바와 같은, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 가변 도메인의 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 HHLA2와 결합할 수 있는 단일클론성 항체는 본 명세서에 기술된 바와 같은, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.
- [0245] 본 발명 단일클론성 항체의 중쇄 가변 도메인은 표 2에 제시된 vH 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질

수 있고/있거나 본 발명 단일클론성 항체의 경쇄 가변 도메인은 표 2에 제시된 v_k 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0246] 본 발명의 단일클론성 항체는 이 분야에 잘 알려진 임의의 기술로 생산 및 변형될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단일클론성 항체는 수탁번호 _____로 _____에 ATCC에 기탁된 하이브리도마로부터 얻을 수 있는 것과 같은 쥐 과동물 또는 비-설치류 항체일 수 있다. 유사하게, 이러한 단일클론성 항체는 키메라, 바람직하게는 마우스/인간 키메라 항체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 단일클론성 항체는 가변 도메인이 인간 엑셉터 프레임워크 영역, 및 존재하는 경우 임의로 인간 불변 도메인, 및 상기 정의된 바와 같은 마우스 또는 비-설치류 CDR과 같은 비-인간 공여 CDR을 포함하는 것과 같은 인간화 항체이다.

[0247] 본 발명은 또한 Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ 및 다이아바디(diabody); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만 이로 제한되지는 않는 상기 단일클론성 항체의 단편을 제공한다. 예를 들어, HHLA2, PD-L2, PD-L1, CTLA-4, KIR3DL3 등과 같은 많은 면역저해 분자는 이 분자의 발현을 효과적으로 투쟁짓기 위한 이중특이적 또는 다중특이적 방식에서 검출될 수 있다.

[0248] 본 발명 단일클론성 항체의 다른 단편도 고려된다. 예를 들어, 가변 도메인이 표 2에 나타난 적어도 하나의 CDR을 포함하는 개별 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄가 제공된다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 중쇄는 표 2에 나타난 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함한다. 다른 실시형태에서, 면역글로불린 경쇄는 본 명세서에 기술된(예를 들어, 표 2에 나타난) 경쇄 또는 중쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함한다.

[0249] 일부 실시형태에서, 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄는 본 명세서에 기술된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3 중 적어도 하나를 포함하는 가변 도메인을 포함한다. 이러한 면역글로불린 중쇄는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 이러한 면역글로불린 경쇄는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 중 적어도 하나를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0250] 다른 실시형태에서, 본 발명에 따른 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄는 표 2에 제시된 v_H 또는 v_k 가변 도메인 서열 각각을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0251] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 v_H 가변 도메인, v_k 가변 도메인, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0252] 본 발명의 항체, 면역글로불린 및 폴리펩타이드는 단리된(예를 들어, 정제된) 또는 막 또는 지질 소포(예를 들어, 리포솜)과 같은 벡터에 함유된 형태로 사용될 수 있다.

표 2

mAbs 8A12, 6D10, 6F10, 8D2, 2G2, 2C4, 4D1, 1C8 및 4E5 를 포함하는 항-HHLA2
단일클론화 항체의 리더 및 가변 영역의 식별 및 서열

8A12 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2554HC.1:M13 499.5.8A12.11.10.5
CDR 분석
GFTFNTNV...__IRTKTNNYAT__VGAMDY
FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2554HC.1#M13F)
> MHC2554HC.1#M13F

위치	8A12_vH	402 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	370..402			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	358..369			
	/표시=CDR3			
V_영역	235..357			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	211..234			
	/표시=CDR2			
V_영역	154..210			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	133..153			
	/표시=CDR1			
V_영역	58..132			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..57			
	/표시=LS			
CDS	1..402			
	/표시=8A12_vH			

8A12_vH
/번역="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNVMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKTNNY

[0253]

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2554HC.1W:M13F)

> MHC2554HC.1W:M13F. 499.5.8A12.11.10.5

기원

1 ATGCTGTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG
61 GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAACACC AATGTCATGA ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA
181 GGAAAGGGTT TGAATGGGT TGGTCGCATA AGAACTAAA CTAATAATTA TGCAACATAT
241 TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC
301 TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGAGCT
361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (서열번호 20)

신호 펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGCTGTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57 (서열번호 21)

/번역= "MLLGLKWIFFVVFYQGVHC" (서열번호 22)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT
CT 132 (서열번호 23)

/번역= "EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS" (서열번호 24)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGATTCAC CTTCAACACC AAT 153 (서열번호 25)

/번역= "GFTFNTN" (서열번호 26)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 GTCATGA ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGAATGGGT TGGTCGCATA 210 (서열번호 27)

/번역= "VMNVRQAPGKLEWVGRI" (서열번호 28)

CDR-H2 (염기쌍 211-234):

211 AGAACTAAA CTAATAATTA TGCA 234 (서열번호 29)

/번역= "RTKTNNYA" (서열번호 30)

프레임워크 3 (염기쌍 235-357):

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC
TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGA 357 (서열번호 31)

/번역= "TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG" (서열번호 32)

CDR-H3 (염기쌍 358-369):

[0254]

프레임워크 4 (염기쌍 370-402):

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402 (서열번호 35)

/번역= "WGQGTSTVTSS" (서열번호 36)

MHC2554HC.1 499.5.8A12.11.10.5

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 - 19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNLIKTEDTATYFCVG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSTVTSS	124 - 134	11

8A12 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2554LC.2:M13. 499.5.8A12.11.10.5

CDR 분석

ESVDNSGINF...__RAS.....__QSYKDPPT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2554LC.2W:M13F)

> MHC2554LC.2W:M13F

위치	8A12_vL	393 bp	DNA	전형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	364..393			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	337..363			
	/표시=CDR3			
V_영역	241..336			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	220..240			
	/표시=CDR2			
V_영역	175..219			
	/표시=FWR2			

[0255]

V_세그먼트 130..174
/표시=CDR1
V_영역 61..129
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..60
/표시=LS
CDS 1..393
/표시=8A12_vL

8A12_vL
/번역="METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINFIHWYQQKPGQSPKLLLYRASN
LKSGIPARFSGSGSRDFTLTINPVETGDVATYYCQSYKDPPTFGTGKLELK" (서열번호 37)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2554LC.2W;M13F)

> MHC2554LC.2W;M13F. 499.5.8A12.11.10.5

기원

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT AACTGTTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTATC GTGCATCAA CCTAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (서열번호 38)

신호펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCAGG TTCCACAGGT 60 (서열번호 39)
/번역= "METDTLLLWVLLWVPGSTG" (서열번호 40)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC GTCTCCTGC 129
(서열번호 41)
/번역= "DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC" (서열번호 42)

CDR-L1 (염기쌍 130-174):

130 A GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174 (서열번호 43)
/번역= "RASESVDNSGINFIH" (서열번호 44)

[0256]

프레임워크 2 (염기쌍 175-219):

175 TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTAT 219 (서열번호 45)

/번역= "WYQKPGQSPKLLLY" (서열번호 46)

CDR-L2 (염기쌍 220-240):

220 C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240 (서열번호 47)

/번역= "RASNLKS" (서열번호 48)

프레임워크 3 (염기쌍 241-336):

241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCT CACCATTAAT CCTGTGGAGA

CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336 (서열번호 49)

/번역= "GIPARFSGSGSRDFTLTINPVETGDVATYYC" (서열번호 50)

CDR-L3 (염기쌍 337-363):

337 CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363 (서열번호 51)

/번역= "QQSYKDPPT" (서열번호 52)

프레임워크 4 (염기쌍 364-393):

364 TTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG 393 (서열번호 53)

/번역= "FGTGTKLELK" (서열번호 54)

MHC2554LC.2. 499.5.8A12.11.10.5

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	METDTLLWVLLWVPGSTG	1 - 20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21 - 43	23
CDR-L1	RASESVNDSGINFH	44 - 58	15
LFR2	WYQKPGQSPKLLLY	59 - 73	15
CDR-L2	RASNLKS	74 - 80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRDFTLTINPVETGDVATYYC	81 - 112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113 - 121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122 - 131	10

6D10 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2555HC.1:M13. 499.5.6D10.11.11.7

[0257]

CDR 분석

GFTFNTNV...__IRTKTNNYAT__VGAMDY

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2555HC.1#;M13F)

> MHC2555HC.1#;M13F 499.5.6D10.11.11.7

위치	6D10_vH	402 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	370..402			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	358..369			
	/표시=CDR3			
V_영역	235..357			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	211..234			
	/표시=CDR2			
V_영역	154..210			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	133..153			
	/표시=CDR1			
V_영역	58..132			
	/표시=FWR1			
sig_웹타이드	1..57			
	/표시=LS			
CDS	1..402			
	/표시=6D10_vH			

6D10_vH

/번역="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNVMNWVRQAPGKLEWVARIRTKTNNY
ATYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYICVGM~~MDY~~WGQGTSTVSS" (서열번호 55)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2555HC.1#;M13F)

> MHC2555HC.1#;M13F. 499.5.6D10.11.11.7

기원

```

1 ATGCTGTGG GGTGAAGTG GATTTTCTT GTTGTITTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG
61 GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA
121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTCAATACC AATGTCATGA ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA
181 GGAAAGGGTT TGGAAATGGGT TGCTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT
241 TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTACC ATCTTCAGAG ATGATTACA AAGCATTCTC

```

[0258]

301 TATCTGCAAA TGAACAACIT GAAACTGAG GACACAGCCA TGTATTACTG TGTGGGAGCT
361 ATGGACTACT GGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (서열번호 56)

신호펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57 (서열번호 57)
/번역= “ MLLGLKWIFFVVFYQGVHC” (서열번호 58)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 GAG GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT
CT 132 (서열번호 59)
/번역= “EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS” (서열번호 60)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGATTCAC CTTCAATACC AAT 153 (서열번호 61)
/번역= “GFTFNTN” (서열번호 62)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 GTCATGA ACTGGGTC CGAGGCTCCA GGAAAGGGT TGGAAATGGT TGCTCGCATA 210 (서열번호 63)
/번역= “VMNWRQAPGKGLEWVARI” (서열번호 64)

CDR-H2 (염기쌍 211-234):

211 AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234 (서열번호 65)
/번역= “RIKTNNYA” (서열번호 66)

프레임워크 3 (염기쌍 235-357):

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTCACC ATCTTCAGAG ATGATTCACA AAGCATTCTC
TATCTGCAAA TGAACAACIT GAAACTGAG GACACAGCCA TGTATTACTG TGTGGGA 357 (서열번호 67)
/번역= “TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNCLKTEDTAMYVCVG” (서열번호 68)

CDR-H3 (염기쌍 358-369):

358 GCT ATGGACTAC 369 (서열번호 69)
/번역= “AMDY” (서열번호 70)

프레임워크 4 (염기쌍 370-402):

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402 (서열번호 71)
/번역= “WQGTSTVTVSS” (서열번호 72)

[0259]

MHC2555HC.1:M13. 499.5.6D10.11.11.7

리더	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 - 19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWRQAPGKGLEWVARI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSTVTSS	124 - 134	11

6D10 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2555LC.1:M13. 499.5.6D10.11.11.7

CDR 분석

ESVDNYGISF...__RAS.....__QSSKDPPT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2555LC.1#;M13F)

> MHC2555LC.1#;M13F. 499.5.6D10.11.11.7

위치 6D10_vL 393 bp DNA 선형

특징 위치/수직어

J_세그먼트 364..393

/표시=FWR4

V_세그먼트 337..363

/표시=CDR3

V_영역 241..336

/표시=FWR3

V_세그먼트 220..240

/표시=CDR2

V_영역 175..219

/표시=FWR2

V_세그먼트 130..174

/표시=CDR1

V_영역 61..129

/표시=FWR1

sig_캡타이드 1..60

/표시=LS

CDS 1..393

[0260]

6D10_vL
/번역=

METDTLLLVVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMHWYQKPGQPPKLLIYRASNLKSGIPA
RFSGSGSRDFTLTINPVETGADVATYYCQSSKDPPTFGTGTKLELK” (서열번호 73)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2555LC.1F;M13F)

> MHC2555LC.1F;M13F. 499.5.6D10.11.11.7

기원

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC
121 ATCTCCTGCA GAGCCAGCGA GAGTGTGAT AATTATGGCA TTAGTTTAT GCACTGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAATC CTCATCTATC GTGCATCAA CCTAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGTCAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA (서열번호 74)

신호 펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT 60 (서열번호 75)
/번역= “METDTLLLVVLLWVPGSTG” (서열번호 76)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC ATCTCCTGC 129
(서열번호 77)
/번역= “DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC” (서열번호 78)

CDR-L1 (염기쌍 130-174):

130 A GAGCCAGCGA GAGTGTGAT AATTATGGCA TTAGTTTAT GCAC 174 (서열번호 79)
/번역= “RASESDNYGISFMH” (서열번호 80)

프레임워크 2 (염기쌍 175-219):

175 TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAATC CTCATCTAT 219 (서열번호 81)
/번역= “WYQKPGQPPKLLIY” (서열번호 82)

CDR-L2 (염기쌍 220-240):

220 C GTGCATCAA CCTAAATCT 240 (서열번호 83)

[0261]

프레임워크 3 (염기쌍 241-336):

241 GGGATCCCTG CCAGGTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGT 336 (서열번호 85)
/번역= "GIPARFSGSGSRTDFILTINPVETGDVATYYC" (서열번호 86)

CDR-L3 (염기쌍 337-363):

337 CAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT ACG 363 (서열번호 87)
/번역= "QQSSKDPPT" (서열번호 88)

프레임워크 4 (염기쌍 364-393):

364 TTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA 393 (서열번호 89)
/번역= "FGTGKLELK" (서열번호 90)

영역	서열 단편	관기	길이
리더	METDTLLWVLLWVPGSTG	1 - 20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	21 - 43	23
CDR-L1	RASESVDNYGISFMH	44 - 58	15
LFR2	WYQQKPGQPPKLLIY	59 - 73	15
CDR-L2	RASNLKS	74 - 80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFILTINPVETGDVATYYC	81 - 112	32
CDR-L3	QQSSKDPPT	113 - 121	9
LFR4	FGTGKLELK	122 - 131	10

6F10 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2557HCO.1:M13. 499.5.6F10.A4.10
CDR 분석
GYTFTTYT...__INPSSGYT...__ARHPWDSY
FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2557HCO.1W:M13F)
> MHC2557HCO.1W:M13F. 499.5.6F10.A4.10

위치 6F10_vH 405 bp DNA 선형
특징 위치/수식어
J_세그먼트 373..405
/표시=FWR4
V_세그먼트 352..372

[0262]

/표시=CDR3
V_영역 229..351
/표시=FWR3
V_세그먼트 211..228
/표시=CDR2
V_영역 154..210
/표시=FWR2
V_세그먼트 133..153
/표시=CDR1
V_영역 58..132
/표시=FWR1
sig_웹타이드 1..57
/표시=LS
CDS 1..405
/표시=6F10_vH

6F10_vH

/번역="MERHWIFLFLSVTAGVHSQVHLQSSAAELARPGASVKMSCKASGYTFITTYTMHWVKRPGQGLEWIGHINPSSGYT
DYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARHPWDSYWGQGTTLTVSS" (서열번호 91)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2557HCO.1W:M13F)

> MHC2557HCO.1W:M13F. 499,5,6F10.A4,10

기원

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
61 GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACCTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GGACAGGGTC TGGATGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGATTACAAT
241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGTAC AGCCTACATG
301 CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG
361 GACTCGGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (서열번호 92)

신호웹타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC 57 (서열번호 93)

/번역= "MERHWIFLFLSVTAGVHS" (서열번호 94)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 CAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACCTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC TGCAAGGCTT
CT 132 (서열번호 95)

/번역= "QVHLQSSAAELARPGASVKMSCKAS" (서열번호 96)

[0263]

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153 (서열번호 97)

/번역= "GYTFTTY" (서열번호 98)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT

181 GGACAGGGTC TGGATGGAT TGGACACATT 210 (서열번호 99)

/번역= "TMHVKQRPQGQLEWIGHI" (서열번호 100)

CDR-H2 (염기쌍 211-228):

211 AATCCTAGCA GTGGATAT 228 (서열번호 101)

/번역= "NPSSGY" (서열번호 102)

프레임워크 3 (염기쌍 229-351):

229 AC TGATTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGTAC AGCCTACATG

CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG A 351 (서열번호 103)

/번역= "TDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR" (서열번호 104)

CDR-H3 (염기쌍 352-372):

352 CACCCCTGG GACTCGGACT AC 372 (서열번호 105)

/번역= "HPWDSY" (서열번호 106)

프레임워크 4 (염기쌍 373-405):

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405 (서열번호 107)

/번역= "WGQGTTLTVSS" (서열번호 108)

MHC2557HC0.1 499.5.6F10.A4.10

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MERHWIFLFLLSVTAGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVHLQSSAAELARPGASVKMSCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45 - 51	7
HFR2	TMHVKQRPQGQLEWIGHI	52 - 70	19
CDR-H2	NPSSGY	71 - 76	6
HFR3	TDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR	77 - 117	41
CDR-H3	HPWDSY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

6F10 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2557LC.1:M13.

CDR 분석

[0264]

ENIDSY.....AAT.....QHYYITPFT
 FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2557LC.1W:M13F)
 > MHC2557LC.1W:M13F, 499.5.6F10.A4.10

위치	6F10_vL	381 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	352..381			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	325..351			
	/표시=CDR3			
V_영역	229..324			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	208..228			
	/표시=CDR2			
V_영역	163..207			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	130..162			
	/표시=CDR1			
V_영역	61..129			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..60			
	/표시=LS			
CDS	1..381			
	/표시=6F10_vL			

6F10_vL
 /번역="MSVPTQLLGLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWYQQKQGRSPQLLVYAATNLADG
 VPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYCQHYYITPFTFGSGTKLEIA" (서열번호 109)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2557LC.1W:M13F)
 > MHC2557LC.1W:M13F, 499.5.6F10.A4.10
 기원

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGITG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT
 61 GACATCCAGA TGA CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT
 121 ATCATCATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
 181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA
 241 AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC AGATCAACCG CCTGCAGTCT
 301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTAC GTTCGGCTCG
 361 GGGACAAAAT TGGAAATAGC A (서열번호 110)

[0265]

신호펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT 60 (서열번호 111)

/번역= "MSVPTQLLGLLLWLT DARC" (서열번호 112)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
ATCACATGT 129 (서열번호 113)

/번역= "DIQMTQSPASLSASVGETVTITC" (서열번호 114)

CDR-L1 (염기쌍 130-162):

130 C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTAG CA 162 (서열번호 115)

/번역= "RASENIDSYLA" (서열번호 116)

프레임워크 2 (염기쌍 163-207):

163 TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGCTAT 207 (서열번호 117)

/번역= "WYQKQGRSPQLVY" (서열번호 118)

CDR-L2 (염기쌍 208-228):

208 GCT GCAACAACT TAGCAGAT 228 (서열번호 119)

/번역= "AATNLAD" (서열번호 120)

프레임워크 3 (염기쌍 229-324):

229 GG TGTGCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC AGATCAACCG CCTGCAGTCT
GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324 (서열번호 121)

/번역= "GVPSRFRSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC" (서열번호 122)

CDR-L3 (염기쌍 325-351):

325 CAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC G 351 (서열번호 123)

/번역= "QHYYITPFT" (서열번호 124)

프레임워크 4 (염기쌍 352-381):

352 TTCGGCTCG GGGACAAAAT TGGAATAGC A 381 (서열번호 125)

/번역= "FGSGTKLEIA" (서열번호 126)

MHC2557LC.1 499.5.6F10.A4.10

영역	서열 단편	관기	길이
리더	MSVPTQLLGLLLWLT DARC	1 - 20	20
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	21 - 43	23

[0266]

CDR-L1	RASENIDSYLA	44 - 54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55 - 69	15
CDR-L2	AATNLAD	70 - 76	7
LFR3	GVP ^S SRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC	77 - 108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109 - 117	9
LFR4	FGSGTKLEIA	118 - 127	10

8D2 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2558HC.1:M13. 499.8D2.6.8

CDR 분석

GFTFNTNV...__IRTKTNNYAT__VGAMDY

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2558HC.1#M13F)

> MHC2558HC.1#M13F. 499.8D2.6.8

위치	8D2_vH	402 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	370..402			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	358..369			
	/표시=CDR3			
V_영역	235..357			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	211..234			
	/표시=CDR2			
V_영역	154..210			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	133..153			
	/표시=CDR1			
V_영역	58..132			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..57			
	/표시=LS			
CDS	1..402			
	/표시=8D2_vH			

8D2_vH

/번역="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNVMNWVRQAPGKGLEWVGRIRTKTNNY
ATYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMN^NLKTEDATYFCVGAMDYWGQGTSTVSS" (서열번호 127)

[0267]

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2558HC.1F:M13F)
 > MHC2558HC.1F:M13F. 499.8D2.6.8
 기원

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG
 61 GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA
 121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCACACACC AATGTCATGA ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA
 181 GGAAAGGGTT TGGATGGGT TGGTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT
 241 TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC
 301 TATCTGCAAA TGAACAACCTT GAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGAGCT
 361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (서열번호 128)

신호 펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57 (서열번호 129)
 /번역= “MLLGLKWIFFVVFYQGVHC” (서열번호 130)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT
 CT 132 (서열번호 131)
 /번역= “EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS” (서열번호 132)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGATTAC CTTCACACACC AAT 153 (서열번호 133)
 /번역= “GFTFNIN” (서열번호 134)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 GTCATGA ACTGGGTCGG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGGATGGGT TGGTCGCATA 210 (서열번호
 135)
 /번역= “VMNWRQAPGKLEWVGRI” (서열번호 136)

CDR-H2 (염기쌍 211-234):

211 AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234 (서열번호 137)
 /번역= “RTKTNNYA” (서열번호 138)

프레임워크 3 (염기쌍 235-357):

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC
 TATCTGCAAA TGAACAACCTT GAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGA 357 (서열번호 139)
 /번역= “TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG” (서열번호 140)

CDR-H3 (염기쌍 358-369):

358 GCT ATGGACTAC 369 (서열번호 141)
 /번역= “AMDY” (서열번호 142)

[0268]

프레임워크 4 (염기쌍 370-402):

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402 (서열번호 143)

/번역= “WGQGTSTVTVSS” (서열번호 144)

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 - 19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSTVTVSS	124 - 134	11

8D2 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2558LC.2:M13. 499.8D2.6.8

CDR 분석

ESVDNSGINF...__RAS.....__QSYKDPPT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2558LC.2W:M13F)

> MHC2558LC.2W:M13F. 499.8D2.6.8

위치	8D2_vL	393 bp	DNA	선형
특징	위치/수치어			
J_세그먼트	364..393			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	337..363			
	/표시=CDR3			
V_영역	241..336			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	220..240			
	/표시=CDR2			
V_영역	175..219			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	130..174			
	/표시=CDR1			

[0269]

V_영역 61..129
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..60
/표시=LS
CDS 1..393
/표시=SD2_vL

SD2_vL
/번역="METDTLLLVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINFIHWYQQKPGQSPKLLLYRASN
LKSGIPARFSGSGSRITDFTLTINPVETGDVATYYCQQSYKDPPTFTGTGKLELK" (서열번호 145)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2558LC.2W:M13F)

> MHC2558LC.2W:M13F. 499.8D2.6.8

기원

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT AACTGGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTATC GTGCATCAA CCTAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCA TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (서열번호 146)

신호 펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT 60 (서열번호
147)

/번역= "METDTLLLVLLLWVPGSTG" (서열번호 148)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
GTCTCCTGC 129 (서열번호 149)

/번역= "DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC" (서열번호 150)

CDR-L1 (염기쌍 130-174):

130 A GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174 (서열번호 151)

/번역= "RASESVDNSGINFIH" (서열번호 152)

프레임워크 2 (염기쌍 175-219):

175 CTGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTAT 219 (서열번호 153)

/번역= "WYQQKPGQSPKLLLY" (서열번호 154)

CDR-L2 (염기쌍 220-240):

[0270]

220 C GTGCATCCAA CCTAAATCT 240 (서열번호 155)

/번역= "RASNLKS" (서열번호 156)

프레임워크 3 (염기쌍 241-336):

241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCT CACCATTAAT
CTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336 (서열번호 157)

/번역= "GIPARFSGSGSRTDFLTINPVETGDTVATYYC" (서열번호 158)

CDR-L3 (염기쌍 337-363):

337 CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363 (서열번호 159)

/번역= "QQSYKDPPT" (서열번호 160)

프레임워크 4 (염기쌍 364-393):

364 TTCGGTA CTGGGACCA GCTGGAGCTG AAG 393 (서열번호 161)

/번역= "FGTGKLELK" (서열번호 162)

MHC2558LC.2 499.8D2.6.8

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	METDTLLWVLLWVPGSTG	1 - 20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21 - 43	23
CDR-L1	RASEVDNSGINFIH	44 - 58	15
LFR2	WYQQKPGQSPKLLLY	59 - 73	15
CDR-L2	RASNLKS	74 - 80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFLTINPVETGDTVATYYC	81 - 112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113 - 121	9
LFR4	FGTGKLELK	122 - 131	10

2G2 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2561HC.1:M13. 499.5.2G2.13.3.10

CDR 분석

GLTFSSYA...__ISSGGSHT...__TRLGRAFDY

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2561HC.1F:M13F)

> MHC2561HC.1F:M13F. 499.5.2G2.13.3.10

위치 2G2_vH 405 bp DNA 선형

특징 위치/수식어

J_세그먼트 373..405

/표시=FWR4

V_세그먼트 352..372

[0271]

/표시=CDR3
V_영역 229..351
/표시=FWR3
V_세그먼트 211..228
/표시=CDR2
V_영역 154..210
/표시=FWR2
V_세그먼트 133..153
/표시=CDR1
V_영역 58..132
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..57
/표시=LS
CDS 1..405
/표시=2G2_vH

2G2_vH
/번역="MNFGLSLIFLVLVLKGVQCEVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGLTFSYAMSWVRQIPEKRLEWVATISSGGSHTYYPDSVKGRFIIISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYCTRLGRAFDYWGQGTTLTVSS" (서열번호 163)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2561HC.1F:M13F)

> MHC2561HC.1F:M13F. 499.5.2G2.13.3.10

기원

1 ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAA
61 GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC
121 TGTGCAGTCT CTGATTAACT TTTAGTAGT TATGCCATGT CTGGGTTCG CCAGACTCCG
181 GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT AGTAGTGGTG GTAGTCACAC CTACTATCCA
241 GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTACCTG
301 CAAATGAACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG ACTGGGACGG
361 GCCTTTGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (서열번호 164)

신호 펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGT 57 (서열번호 165)

/번역= "MNFGLSLIFLVLVLKGVQC" (서열번호 166)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 GAA GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGTCT
CT 132 (서열번호 167)

/번역= "EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVS" (서열번호 168)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

[0272]

133 GGATTAAC TTTAGTAGT TAT 153 (서열번호 169)

/번역= "GLTFSSY" (서열번호 170)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 GCCATGT CITGGGTTCC CCAGACTCCG GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT 210 (서열번호 171)

/번역= "AMSWVRQTPEKRLEWVATI" (서열번호 172)

CDR-H2 (염기쌍 211-228):

211 AGTAGTGGTG GTAGTCAC 228 (서열번호 173)

/번역= "SSGGSH" (서열번호 174)

프레임워크 3 (염기쌍 229-351):

229 AC CTACTATCCA GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTACCTG CAAATGAACA GTCTGAGTTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG A 351 (서열번호 175)

/번역= "TYYPDSVKGRFII SRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYCYTR" (서열번호 176)

CDR-H3 (염기쌍 352-372):

352 CTGGGACGG GCCTTTGACT AC 372 (서열번호 177)

/번역= "LGRAFDY" (서열번호 178)

프레임워크 4 (염기쌍 373-405):

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405 (서열번호 179)

/번역= "WGQGTTLTVSS" (서열번호 180)

MHC2561HC.1 499.5.2G2.13.3.10

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MNFGLSLIFLVVLKGVQC	1 - 19	19
HFR1	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVS	20 - 44	25
CDR-H1	GLTFSSY	45 - 51	7
HFR2	AMSWVRQTPEKRLEWVATI	52 - 70	19
CDR-H2	SSGGSH	71 - 76	6
HFR3	TYYPDSVKGRFII SRDNAKNTLYLQMNLSRSEDAMYCYTR	77 - 117	41
CDR-H3	LGRAFDY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

2G2 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2561LC.1:M13. 499.5.2G2.13.3.10

CDR 분석

[0273]

QDVSTA.....__WAS.....__QQDYSTPWT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2561LC.1#;M13F)

> MHC2561LC.1#;M13F, 499,5,2G2,13,3,10

위치	2G2_vL	381 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	352..381			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	325..351			
	/표시=CDR3			
V_영역	229..324			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	208..228			
	/표시=CDR2			
V_영역	163..207			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	130..162			
	/표시=CDR1			
V_영역	61..129			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..60			
	/표시=LS			
CDS	1..381			
	/표시=2G2_vL			

2G2_vL

/번역="MESQIQVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKVLIIWASTRHTG

VPDRFTGSGSGTDFLTLTISVQAEDLALYYCQQDYSTPWTFGGGTKLEIK" (서열번호 181)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2561LC.1#;M13F)

> MHC2561LC.1#;M13F, 499,5,2G2,13,3,10

기원

```

1 ATGGAGTCAC AGATTCAGGT CTTGTATTC GTGTTCTCT GGTGTCTGG TGTGACGGA
61 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC
121 ATCACCTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CCTGGTATCA ACAAAGCCA
181 GGGCAATCTC CTAAGTTCT GATTACTGG GCATCCACCC GGCACACTGG AGTCCCTGAT
241 CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT

```

[0274]

301 GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGTCAGCAA GATTATAGCA CTCCTGGGAC GTTCGGTGGA
361 GGCACCAAGC TGGAAATCAA A (서열번호 182)

신호 펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGGAGTCAC AGATTCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTGTCTGG TGTGACGGA 60 (서열번호 183)

/번역= "MESQIQVFVFLWLSGVDG" (서열번호 184)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC
ATCACCTGC 129 (서열번호 185)

/번역= "DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC" (서열번호 186)

CDR-L1 (염기쌍 130-162):

130 A AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CC 162 (서열번호 187)

/번역= "KASQDVSTAVA" (서열번호 188)

프레임워크 2 (염기쌍 163-207):

163 TGGTATCA ACAAAGCCA GGGCAATCTC CTAAAGTTCT GATTAC 207 (서열번호 189)
/번역= "WYQKPGQSPKVLIV" (서열번호 190)

CDR-L2 (염기쌍 208-228):

208 TGG GCATCCACCC GGCACACT 228 (서열번호 191)

/번역= "WASTRHT" (서열번호 192)

프레임워크 3 (염기쌍 229-324):

229 GG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT
GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGT 324 (서열번호 193)

/번역= "GVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLALYYC" (서열번호 194)

CDR-L3 (염기쌍 325-351):

325 CAGCAA GATTATAGCA CTCCTGGGAC G 351 (서열번호 195)

/번역= "QQDYSTIPWT" (서열번호 196)

프레임워크 4 (염기쌍 352-381):

352 TTCGGTGGA GGCACCAAGC TGGAAATCAA A 381 (서열번호 197)

/번역= "FGGGTKLEIK" (서열번호 198)

MHC2561LC.1 499.5.2G2.13.3.10

영역	서열 단편	칸기	길이
리더	MESQIQVFVFLWLSGVDG	1 - 20	20

[0275]

LFR1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	21 - 43	23
CDR-L1	KASQDVSTAVA	44 - 54	11
LFR2	WYQQKPGQSPKVLIIY	55 - 69	15
CDR-L2	WASTRHT	70 - 76	7
LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLALYYC	77 - 108	32
CDR-L3	QQDYSTPWT	109 - 117	9
LFR4	FGGGTKLEIK	118 - 127	10

2C4 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2562HC.1:M13. 499.5.2C4.E6.6.8.1

CDR 분석

GFSFTDYN...__IDPYYGRI...ATGAYTSGYSWFAY

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2562HC.1W:M13F)

> MHC2562HC.1W:M13F. 499.5.2C4.E6.6.8.1

위치 2C4_vH 420 bp DNA 선형

특징 위치/수식어

J_세그먼트 388..420
/표시=FWR4

V_세그먼트 352..387
/표시=CDR3

V_영역 229..351
/표시=FWR3

V_세그먼트 211..228
/표시=CDR2

V_영역 154..210
/표시=FWR2

V_세그먼트 133..153
/표시=CDR1

V_영역 58..132
/표시=FWR1

sig_웹타이드 1..57
/표시=LS

CDS 1..420
/표시=2C4_vH

2C4_vH

[0276]

/번역="MGWTWIFILILSVTTGVHSEVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKASGFSFTDYNMNVKQSSGKSLEWIGNIDPYYGRI
NYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCATGAYTSGYSWFAYWGQGLVTVSA" (서열번호 199)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2562HC.1F:M13F)

> MHC2562HC.1F:M13F, 499.5.2C4.E6.6.8.1

기원

1 ATGGGATGGA CCTGGATCTT TATTTTAATC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCTGAG
61 GTCCACCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG GCGTTTCAGT GAAGATATCC
121 TGCAAGGCTT CTGGTTTCTC ATTCAGTAC TACAACATGA ACTGGGTGAA ACAGAGCAGT
181 GAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGAAATATT GATCCTTACT ATGGACGTAT TAACTATAAC
241 CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACATTGAGT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG
301 CACCTCAAGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAC TGGGGCCTAC
361 ACCTCGGGCT ACTCCTGGTT TGCTTACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC TGTCTCTGCA (서열번호 200)

신호펩타이드(엽기쌍 1-57):

1 ATGGGATGGA CCTGGATCTT TATTTTAATC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCT 57 (서열번호 201)

/번역= "MGWTWIFILILSVTTGVHS" (서열번호 202)

프레임워크 1 (엽기쌍 58-132):

58 GAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG GCGTTTCAGT GAAGATATCC TGCAAGGCTT
CT 132 (서열번호 203)

/번역= "EVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKAS" (서열번호 204)

CDR-H1 (엽기쌍 133-153):

133 GGTTCCTC ATTCAGTAC TAC 153 (서열번호 205)

/번역= "GFSFTDY" (서열번호 206)

프레임워크 2 (엽기쌍 154-210):

154 AACATGA ACTGGGTGAA ACAGAGCAGT GAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGAAATATT 210 (서열번호 207)

/번역= "NMNVKQSSGKSLEWIGNI" (서열번호 208)

CDR-H2 (엽기쌍 211-228):

211 GATCCTTACT ATGGACGT 228 (서열번호 209)

/번역= "DPYYGR" (서열번호 210)

프레임워크 3 (엽기쌍 229-351):

229 AT TAACTATAAC CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACATTGAGT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG
CACCTCAAGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAC T 351 (서열번호 211)

/번역= "INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCAT" (서열번호 212)

CDR-H3 (엽기쌍 352-387):

352 GGGGCCTAC ACCTCGGGCT ACTCCTGGTT TGCTTAC 387 (서열번호 213)

/번역= "GAYTSGYSWFAY" (서열번호 214)

[0277]

프레임워크 4 (염기쌍 388-420):

388 TGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC TGTCTCTGCA 420 (서열번호 215)

/번역= "WGQGLTVTSA" (서열번호 216)

MHC2562HC.1 499.5.2C4.E6.6.8.1

영역	서열 단편	칸기	길이
리더	MGWTWIFILILSVTTGVHS	1 - 19	19
HFR1	EVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFSTDY	45 - 51	7
HFR2	NMNWVKQSSGKSLEWIGNI	52 - 70	19
CDR-H2	DPYYGR	71 - 76	6
HFR3	INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCAT	77 - 117	41
CDR-H3	GAYTSGYSWFAY	118 - 129	12
HFR4	WGQGLTVTSA	130 - 140	11

2C4 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2562LC.2:M13. 499.5.2C4.E6.6.8.1

CDR 분석

SSVSSSY.....RTS.....QQWSGYPFT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2562LC.2W:M13F)

> MHC2562LC.2W:M13F. 499.5.2C4.E6.6.8.1

위치	2C4_vL	390 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	361..390			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	334..360			
	/표시=CDR3			
V_영역	238..333			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	217..237			
	/표시=CDR2			
V_영역	172..216			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	136..171			

[0278]

/표시=CDR1
V_영역 67..135
/표시=FWR1
sig_캡타이드 1..66
/표시=LS
CDS 1..390
/표시=2C4_vL

2C4_vL
/번역="MGLQVQVISFLLISVTVIMSRGENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQRSGASPKPLIHRTSNL
ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISVVEAEDDATYYCQW^{SGYPFT}FGSGTKLEIK" (서열번호 217)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2562LC.2W:M13F)
> MHC2562LC.2W:M13F. 499.5.2C4.E6.6.8.1
기원
1 ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC
61 AGAGGAGAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGAGAAG
121 GTCACCATGA CCTGCAGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA CTGGTACCAG
181 CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCTTG ATTCATAGGA CATCCAACCT GGCTTCTGGT
241 GTCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC
301 GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGCCAGCAGT GGAGTGGTTA CCCATTCACG
361 TTCGGCTCGG GGACAAAGTT GGAATAAAA (서열번호 218)

신호캡타이드(염기쌍 1-66):
1 ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC
AGAGGA 66 (서열번호 219)
/번역= "MGLQVQVISFLLISVTVIMSRG" (서열번호 220)

프레임워크 1 (염기쌍 67-135):
67 GAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGAGAAG
GTCACCATGA CCTGC 135 (서열번호 221)
/번역= "ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTC" (서열번호 222)

CDR-L1 (염기쌍 136-171):
136 AGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA C 171 (서열번호 223)
/번역= "SASSSVSSSYLH" (서열번호 224)

프레임워크 2 (염기쌍 172-216):
172 TGGTACCAG CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCTTG ATTCAT 216 (서열번호 225)
/번역= "WYQQRSGASPKPLIH" (서열번호 226)

CDR-L2 (염기쌍 217-237):

[0279]

217 AGGA CATCCAACCT GGCTTCT 237 (서열번호 227)

/번역= "RTSNLAS" (서열번호 228)

프레임워크 3 (염기쌍 238-333):

238 GGT GTCCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC GTGGAGGCTG
AAGATGATGC AACTTATTAC TGC 333 (서열번호 229)

/번역= "GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEEDDATYYC" (서열번호 230)

CDR-L3 (염기쌍 334-360):

334 CAGCAGT GGAGTGGTGA CCCATTACG 360 (서열번호 231)

/번역= "QQWSGYPFT" (서열번호 232)

프레임워크 4 (염기쌍 361-390):

361 TTCGCTCGG GGACAAAGTT GGAAATAAAA 390 (서열번호 233)

/번역= "FGSGTKLEIK" (서열번호 234)

MHC2562LC.2 499.5.2C4.E6.6.8.1

영역	서열 단편	참기	길이
리더	MGLQVQVISFLLISVTIVMSRG	1 - 22	22
LFR1	ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMT	23 - 45	23
CDR-L1	SASSSVSSSYLH	46 - 57	12
LFR2	WYQQRSGASPKPLIH	58 - 72	15
CDR-L2	RTSNLAS	73 - 79	7
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEEDDATYYC	80 - 111	32
CDR-L3	QQWSGYPFT	112 - 120	9
LFR4	FGSGTKLEIK	121 - 130	10

4D1 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2563HC.1:M13. 499.5.4D1.5.16

CDR 분석

GYTFIDYA...ISTYYGDT...ARGNYDDWYFNV

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2563HC.1#M13F)

> MHC2563HC.1#M13F. 499.5.4D1.5.16

위치 4D1_vH 414 bp DNA 선형

특징 위치/수식어

J_세그먼트 382..414

/표시=FWR4

V_세그먼트 352..381

[0280]

/표시=CDR3
V_영역 229..351
/표시=FWR3
V_세그먼트 211..228
/표시=CDR2
V_영역 154..210
/표시=FWR2
V_세그먼트 133..153
/표시=CDR1
V_영역 58..132
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..57
/표시=LS
CDS 1..414
/표시=4D1_vH

4D1_vH

/번역="MDWSCIIFFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGSISTYYGDT
NYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGNYDDWYFNVWGAGTTTVSS" (서열번호 235)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2563HC.1F;M13F)

> MHC2563HC.1F;M13F. 499,5,4D1,5,16

기원

1 ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT GCACTCCCAG
61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT GAAGATTTC
121 TGCAAGGGTT CTGGCTACAC ATTCACTGAT TATGCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT
181 GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGAAGTATT AGTACTTACT ATGGTGATAC TAATTACAAC
241 CAGAAATTCA AGGGAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG AGGTAATTAC
361 GACGACTGGT ACTTCAATGT CTGGGGCGCA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA (서열번호 236)

신호 펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT GCACTCC 57 (서열번호 237)

/번역= "MDWSCIIFFLVATATGVHS" (서열번호 238)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT GAAGATTTC TGCAAGGGTT
CT 132 (서열번호 239)

/번역= "QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGS" (서열번호 240)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

[0281]

133 GGCTACAC ATCTACTGAT TAT 153 (서열번호 241)

/번역= "GYTFIDY" (서열번호 242)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 GCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGGAGTATT 210 (서열번호 243)

/번역= "AMHWVKQSHAKSLEWIGSI" (서열번호 244)

CDR-H2 (염기쌍 211-228):

211 AGTACTTACT ATGGTGAT 228 (서열번호 245)

/번역= "STYYGD" (서열번호 246)

프레임워크 3 (염기쌍 229-351):

229 AC TAATTACAAC CAGAAATTCAGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG
GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG A 351 (서열번호 247)

/번역= "TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR" (서열번호 248)

CDR-H3 (염기쌍 352-381):

352 GGTAAATAC GACGACTGGT ACTTCAATGT C 381 (서열번호 249)

/번역= "GNYDDWYFNV" (서열번호 250)

프레임워크 4 (염기쌍 382-414):

382 TGGGGCGCA GGGACACGG TCACCGTCTC CTCA 414 (서열번호 251)

/번역= "WGAGTTTVSS" (서열번호 252)

MHC2563HC.1 499.5.4D1.5.16

영역	서열 단편	칸기	길이
리더	MDWSCIIFFLVATATGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVQLQSGAELVRPGVSVKISCKGS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFIDY	45 - 51	7
HFR2	AMHWVKQSHAKSLEWIGSI	52 - 70	19
CDR-H2	STYYGD	71 - 76	6
HFR3	TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR	77 - 117	41
CDR-H3	GNYDDWYFNV	118 - 127	10
HFR4	WGAGTTTVSS	128 - 138	11

4D1 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2563LC.1:M13. 499.5.4D1.5.16

CDR 분석

[0282]

QDISGY.....STS.....LQYASSPYT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2563LC,1#;M13F)

> MHC2563LC,1#;M13F, 499.5,4D1.5,16

위치	4D1_vL	381 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	352..381			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	325..351			
	/표시=CDR3			
V_영역	229..324			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	208..228			
	/표시=CDR2			
V_영역	163..207			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	130..162			
	/표시=CDR1			
V_영역	61..129			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..60			
	/표시=LS			
CDS	1..381			
	/표시=4D1_vL			

4D1_vL

/번역="MRIPAHVFGFLLWFPGARCDIQMTQSPSSLASLGERVSLTCRASQDISGYLSWLQKQPDGTIKRLIYSTSTLDSG

VPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASSPYTFGGGAKLEIKR" (서열번호 253)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2563LC,1#;M13F)

> MHC2563LC,1#;M13F, 499.5,4D1.5,16

가원

```

1 ATGAGGATTC CTGCTCACGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTITCCAGG TGCCAGATGT
61 GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT
121 CTCACCTTGT GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTTACTTAA GCTGGCTTCA GCAGAAACCA
181 GATGGAAC TAACACGTCT GATTATAGC ACATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCTCAAAA
241 AGGTTTCAGT GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGTCT

```

[0283]

301 GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGTCTACAA TATGCTAGTT CTCCTGACAC GTTCGGAGGG
361 GGGGCAAGC TGGAAATAAA A (서열번호 254)

신호펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGAGGATTC CTGCTCAGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTTCACAGG TGCCAGATGT 60 (서열번호 255)

/번역= "MRIPAHVFGFLLWFPGARC" (서열번호 256)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT
CTCCTTGT 129 (서열번호 257)

/번역= "DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC" (서열번호 258)

CDR-L1 (염기쌍 130-162):

130 C GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTACTTAA GC 162 (서열번호 259)

/번역= "RASQDISGYLS" (서열번호 260)

프레임워크 2 (염기쌍 163-207):

163 TGGCTTCA GCAGAAACCA GATGGAACCT TTAACGCTCT GATTAT 207 (서열번호 261)

/번역= "WLQKPDGTIKRLIY" (서열번호 262)

CDR-L2 (염기쌍 208-228):

208 AGC ACATCCACTT TAGATTCT 228 (서열번호 263)

/번역= "STSLDS" (서열번호 264)

프레임워크 3 (염기쌍 229-324):

229 GG TGTCACAAA AGGTCAGTG GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGTCT
GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGT 324 (서열번호 265)

/번역= "GVPKRFGSGRSGDYSLTISSESEDFADYYC" (서열번호 266)

CDR-L3 (염기쌍 325-351):

325 CTACAA TATGCTAGTT CTCCTGACAC G 351 (서열번호 267)

/번역= "LQYASSPYT" (서열번호 268)

프레임워크 4 (염기쌍 352-381):

352 TTCGGAGGG GGGGCAAGC TGGAAATAAA A 381 (서열번호 269)

/번역= "FGGGAKLEIK" (서열번호 270)

MHC2563LC.1 499.5.4D1.5.16

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MRIPAHVFGFLLWFPGARC	1 - 20	20

[0284]

LFR1	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC	21 - 43	23
CDR-L1	RASQDISGYLS	44 - 54	11
LFR2	WLQKFPDGTIKRLIY	55 - 69	15
CDR-L2	STSTLDS	70 - 76	7
LFR3	GVPKRFSGSRSGDYSLTISSESEDFADYYC	77 - 108	32
CDR-L3	LQYASSPYT	109 - 117	9
LFR4	FGGGAKEIK	118 - 127	10

1C8 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2564HC.1:M13. 499.5.1C8.9.12.2

CDR 분석

GFNIKDTY...__IDPANGKT...__AWLLPYFDY

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2564HC.1W:M13F)

> MHC2564HC.1W:M13F. 499.5.1C8.9.12.2

위치	1C8_vH	408 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	376..408			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	352..375			
	/표시=CDR3			
V_영역	229..351			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	211..228			
	/표시=CDR2			
V_영역	154..210			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	133..153			
	/표시=CDR1			
V_영역	58..132			
	/표시=FWR1			
sig_캡타이드	1..57			
	/표시=LS			
CDS	1..408			
	/표시=1C8_vH			

[0285] 1C8_vH

/번역="MKCSWIIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIDKTYMHVVKRPEQGLEWIGRIDPANGKT
IFDPKFQVKATITADTSSNTIVYLHLSLTSSEDTAIYYCAWLLPYFDYWGQGTTLTVSS" (서열번호 271)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2564HC.1W:M13F)

> MHC2564HC.1W:M13F. 499.5.1C8.9.12.2

기원

1 ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCAGAG
61 GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC
121 TGTACAGCTT CTGGCTTCAA TATTAAAGAC ACCTATATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGAAGGATT GATCCTGCGA ATGGTAAAA TATTTTGTAC
241 CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT CCTCCAACAC AGTCTACCTG
301 CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT ACTGTGCTTG GTTACTTCCT
361 TACTACTTTG ACTACTGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCTCA (서열번호 272)

신호 펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCA 57 (서열번호 273)

/번역= "MKCSWIIFFLMAVVTGVNS" (서열번호 274)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 GAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGTACAGCTT
CT 132 (서열번호 275)

/번역= "EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTAS" (서열번호 276)

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGCTTCAA TATTAAAGAC ACC 153 (서열번호 277)

/번역= "GFNIKDT" (서열번호 278)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 TATATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGAAGGATT 210 (서열번호
279)

/번역= "YMHVVKRPEQGLEWIGRI" (서열번호 280)

CDR-H2 (염기쌍 211-228):

211 GATCCTGCGA ATGGTAAA 228 (서열번호 281)

/번역= "DPANGK" (서열번호 282)

프레임워크 3 (염기쌍 229-351):

229 AC TATTTTGTAC CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT CCTCCAACAC AGTCTACCTG
CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT ACTGTGCTTG G 351 (서열번호 283)

/번역= "TIFDPKFQVKATITADTSSNTIVYLHLSLTSSEDTAIYYCAW" (서열번호 284)

CDR-H3 (염기쌍 352-375):

352 TTACTTCCT TACTACTTTG ACTAC 375 (서열번호 285)

/번역= "TIDPVTV" (서열번호 286)

[0286]

프레임워크 4 (염기쌍 376-408):

376 TGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA 408 (서열번호 287)

/번역= "WGQGTTLTVSS" (서열번호 288)

MHC2564HC.1 499.5.1C8.9.12.2

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MKCSWIIFFLMVVTGVNS	1 - 19	19
HFR1	EVQLQSGAELVQPGASVKLSCTAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFNIKDT	45 - 51	7
HFR2	YMHVVKQRPEQGLEWIGRI	52 - 70	19
CDR-H2	DPANGK	71 - 76	6
HFR3	TIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIYYCAW	77 - 117	41
CDR-H3	LLPYVFDY	118 - 125	8
HFR4	WGQGTTLTVSS	126 - 136	11

1C8 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2564LCB.4;M13. 499.5.1C8.9.12.2

CDR 분석

SSISSSN.....GTS.....QKWSHYPLT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2564LCB.4#;M13F)

> MHC2564LCB.4#;M13F. 499.5.1C8.9.12.2

위치	1C8_vL	390 bp	DNA	선형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	361..390			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	334..360			
	/표시=CDR3			
V_영역	238..333			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	217..237			
	/표시=CDR2			
V_영역	172..216			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	136..171			

[0287]

/표시=CDR1
V_영역 67..135
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..66
/표시=LS
CDS 1..390
/표시=1C8_vL

1C8_vL
/번역="MDFHVQIFSFLISVTVMSSGEIVLTQSPAVMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSGTSPKLWIYGTSL
ASGVFVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQKWSHYPLTFGAGTKLELK" (서열번호 289)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2564LCB.4W;M13F)
> MHC2564LCB.4W;M13F. 499.5.1C8.9.12.2
기원
1 ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTACAGT CATGTTGTCC
61 AGTGGGAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG
121 GTCACCATCA CTGCAGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA CTGGTACCAG
181 CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTATGGCA CATCCAACCT GGCTTCTGGA
241 GTCCCTGTTC GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC AATCAGCAGC
301 ATGGAGGCTG AAGATGTGC CACTTATTAC TGTCAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCAG
361 TTCGGTGTG GGACCAAGCT GGAGCTGAAA (서열번호 290)

신호펩타이드(염기쌍 1-66):
1 ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTACAGT CATGTTGTCC
AGTGGG 66 (서열번호 291)

/번역= "MDFHVQIFSFLISVTVMSSG" (서열번호 292)

프레임워크 1 (염기쌍 67-135):
67 GAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG GTCACCATCA CTGC 135
(서열번호 293)
/번역= "EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC" (서열번호 294)

CDR-L1 (염기쌍 136-171):
136 AGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA C 171 (서열번호 295)
/번역= "SVSSSISSSNLH" (서열번호 296)

프레임워크 2 (염기쌍 172-216):
172 TGGTACCAG CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTAT 216 (서열번호 297)
/번역= "WYQQKSGTSPKLWIY" (서열번호 298)

CDR-L2 (염기쌍 217-237):

[0288]

217 GGCA CATCCAACCT GGCTTCT 237 (서열번호 299)

/번역= "GTSNLAS" (서열번호 300)

프레임워크 3 (염기쌍 238-333):

238 GGA GTCCTGTTC GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC AATCAGCAGC ATGGAGGCTG
AAGATGCTGC CACTTATTAC TGT 333 (서열번호 301)

/번역= "GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAATYYC" (서열번호 302)

CDR-L3 (염기쌍 334-360):

334 CAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCAG 360 (서열번호 303)

/번역= "QKWSHYPLT" (서열번호 304)

프레임워크 4 (염기쌍 361-390):

361 TTCGGTGCTG GGACCAAGCT GGAGTGAAA 390 (서열번호 305)

/번역= "FGAGTKLELK" (서열번호 306)

영역	서열 단편	칸기	길이
리더	MDFHVQIFSFMLISVTVMSSG	1 - 22	22
LFR1	EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC	23 - 45	23
CDR-L1	SVSSSISSSLNH	46 - 57	12
LFR2	WYQQKSGTSPKLIY	58 - 72	15
CDR-L2	GTSNLAS	73 - 79	7
LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAATYYC	80 - 111	32
CDR-L3	QKWSHYPLT	112 - 120	9
LFR4	FGAGTKLELK	121 - 130	10

4E5 중쇄 가변(vH) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2556HCN.1:M13, 499.5, 4E5, 20, 22

CDR분석

GYTFITYT...__INPSSGYT, __ARHPWDSNY

AminoAcidSequenceinFASTAformat (MHC2556HCN, 1F:M13F)

>MHC2556HCN, 1F:M13F

위치 4E5_vH 405 bp DNA 선형

특징 위치/수치어

J_세그먼트 373..405

/표시=FWR4

V_세그먼트 352..372

[0289]

/표시=CDR3
V_영역 229..351
/표시=FWR3
V_세그먼트 211..228
/표시=CDR2
V_영역 154..210
/표시=FWR2
V_세그먼트 133..153
/표시=CDR1
V_영역 58..132
/표시=FWR1
sig_펩타이드 1..57
/표시=LS
CDS 1..405
/표시=4E5_vH

4E5_vH

/번역="MERHWIFLFLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFITTYTMHWVKQRPFGGLEWIGHINPSSGYT
EYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHLQSSLTSEDSAVYYCARHPWDSNYWGQGTTLTVSS" (서열번호 307)

NucleotideSequenceinFASTAformat (MHC2556HCN.1#;M13F)

>MHC2556HCN.1#;M13F

기원

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACCTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGAGTACAAT
241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACACTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCCATATG
301 CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG
361 GACTCGAAT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (서열번호 308)

신호펩타이드(염기쌍 1-57):

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC 57 (서열번호 309)

/번역= "MERHWIFLFLSVTAGVHS" (서열번호 310)

프레임워크 1 (염기쌍 58-132):

58 CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACCTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC TGCAAGGCTT
CT 132 (서열번호 311)

/번역= "QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKAS" (서열번호 312)

[0290]

CDR-H1 (염기쌍 133-153):

133 GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153 (서열번호 313)

/번역= "GYTFTTY" (서열번호 314)

프레임워크 2 (염기쌍 154-210):

154 ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT 210 (서열번호 315)

/번역= "TMHWVKQRPQGLEWIGHI" (서열번호 316)

CDR-H2 (염기쌍 211-228):

211 AATCCTAGCA GTGGATAT 228 (서열번호 317)

/번역= "NPSSGY" (서열번호 318)

프레임워크 3 (염기쌍 229-351):

229 AC TGAGTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCCACATG
CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG A 351 (서열번호 319)

/번역= "TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHLSSLTSEDSAVYYCAR" (서열번호 320)

CDR-H3 (염기쌍 352-372):

352 CACCCCTGG GACTCGAAT AC 372 (서열번호 321)

/번역= "HPWDSNY" (서열번호 322)

프레임워크 4 (염기쌍 373-405):

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405 (서열번호 323)

/번역= "WGQGTTLTVSS" (서열번호 324)

MHC2556HCN.1 499.5.4E5.20.22

영역	서열 단편	칸기	길이
리더	MERHWIFLFLSVTAGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVQLQQSAELARPGASVKMSCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45 - 51	7
HFR2	TMHWVKQRPQGLEWIGHI	52 - 70	19
CDR-H2	NPSSGY	71 - 76	6
HFR3	TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHLSSLTSEDSAVYYCAR	77 - 117	41
CDR-H3	HPWDSNY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

[0291]

4E5 경쇄 가변(vL) DNA 및 아미노산 서열*

MHC2556LCN.2;M13. 499.5.4E5.20.22

CDR 분석

ENIDSY.....AAT.....QHYYITPFT

FASTA 형식의 아미노산 서열 (MHC2556LCN.2W:M13F)

> MHC2556LCN.2W:M13F

위치	4E5_vL	381 bp	DNA	전형
특징	위치/수식어			
J_세그먼트	352..381			
	/표시=FWR4			
V_세그먼트	325..351			
	/표시=CDR3			
V_영역	229..324			
	/표시=FWR3			
V_세그먼트	208..229			
	/표시=CDR2			
V_영역	163..207			
	/표시=FWR2			
V_세그먼트	130..162			
	/표시=CDR1			
V_영역	61..129			
	/표시=FWR1			
sig_펩타이드	1..60			
	/표시=LS			
CDS	1..381			
	/표시=4E5_vL			

4E5_vL

/번역="MSVPTQLGLLLWLTDAQCIDMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLA^{WYQQKGRSPQLLVYAATNLADG}

VPSRFGSGSGTQYSLKINSLQSE^{DVARYYCQHYYITPFTFGSGTKLEIK}" (서열번호 325)

FASTA 형식의 뉴클레오타이드 서열 (MHC2556LCN.2W:M13F)

> MHC2556LCN.2W:M13F

[0292]

기원

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT
61 GACATCCAGA TGA CTCTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
121 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA
241 AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA AGATCAACAG CCTGCAGTCT
301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTAC GTTCGGCTCG
361 GGGACAAAGT TGGAAATAAA A (서열번호 326)

신호펩타이드(염기쌍 1-60):

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT 60 (서열번호 327)

/번역= "MSVPTQLLGLLLWLTARC" (서열번호 328)

프레임워크 1 (염기쌍 61-129):

61 GACATCCAGA TGA CTCTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC ATCACATGT 129 (서열번호 329)

/번역= "DIQMTQSPASLSASVGETVTITC" (서열번호 330)

CDR-L1 (염기쌍 130-162):

130 C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTAG CA 162 (서열번호 331)

/번역= "RASENIDSYLA" (서열번호 332)

프레임워크 2 (염기쌍 163-207):

163 TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTAT 207 (서열번호 333)

/번역= "WYQQKQGRSPQLLVY" (서열번호 334)

CDR-L2 (염기쌍 208-228):

208 GCT GCAACAACT TAGCAGAT 228 (서열번호 335)

/번역= "AATNLAD" (서열번호 336)

프레임워크 3 (염기쌍 229-324):

229 GG TGTGCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA AGATCAACAG CCTGCAGTCT
GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324 (서열번호 337)

/번역= "GVPSRFRSGSGTQYSLKINSLSQSEDVARYYC" (서열번호 338)

CDR-L3 (염기쌍 325-351):

[0293]

325 CAACAT TATTATATTA CTCCATTAC G 351 (서열번호 339)

/번역= "QHYYITPFT" (서열번호 340)

프레임워크 4 (염기쌍 352-381):

352 TTCGGCTCG GGGACAAAGT TGGAAATAAA A 381 (서열번호 341)

/번역= "FGSGTKLEIK" (서열번호 342)

MHC2556LCN.2 499.5.4E5.20.22

영역	서열 단편	잔기	길이
리더	MSVPTQLGLLLWLTDC	1 - 20	20
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVITC	21 - 43	23
CDR-L1	RASENIDSYLA	44 - 54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55 - 69	15
CDR-L2	AATNLAD	70 - 76	7
LFR3	GVPSPRFGSGSGTQYSLKINSLSQSEDVARYYC	77 - 108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109 - 117	9
LFR4	FGSGTKLEIK	118 - 127	10

[0294]

[0295]

* Kabat에 따른 CDR 정의 및 단백질 서열 번호 지정. CDR 아미노산 서열은 CDR1, CDR2 및 CDR3의 순서로 밑줄로 표시.

표 3

항-HHLA2 mAb 결합 및 리간드 차단 특성의 요약

HHLA2 mAb (아 이소타입)	8A12 (IgG2a)	6D10 (IgG1)	6F10 (IgG1)	SD2 (IgG2a)	2G2 (IgG1)	2C4 (IgG1)	4D1 (IgG1)	1C8 (IgG2a)	4E5 (IgG1)
¹ 결합 EC50(ug/ml)	³ nd	22.49	0.25	³ nd	0.21	0.24	0.44	0.63	³ nd
² 기능	IHC, WB	비차단제	차단제	IHC, WB	약한 차단제	결합 중 강	차단제	비차단제	차단제

¹: 유세포 분석을 통한 HHLA2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 세포 백혈병 세포주에

대한 결합

²: 유세포 분석을 통한 TMIGD2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 세포 백혈병 세포주

에 대한 HHLA2-mIgG2a 결합의 차단

³: 결정되지 않음: 8A12-낮은 결합으로 인해 측정할 수 없음; 4E5-배양 상등액

[0296]

[0297]

III. 핵산, 벡터 및 재조합 숙주 세포

[0298]

본 발명의 추가 목적은 본 발명의 단일클론성 항체 이의 단편, 면역글로불린 및 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0299]

예를 들어, 특정 실시형태에서, 본 발명은, 부분적으로, mAb 8A12의 vH 도메인 또는 mAb 8A12의 vL 도메인을 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다. 다른 특정 실시형태에서, 본 발명은, 부분적으로, 다클론성 항체 1.2 및/또는 2.2로부터 단리된 적어도 하나의 효과적인 항-HHLA2 mAb의 vH 도메인 또는 vL 도메인을 암호화하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0300]

전형적으로, 상기 핵산은 플라스미드, 코스미드, 예피솜, 인공 염색체, 파지(phage) 또는 바이러스 벡터와 같은 임의의 적합한 벡터에 포함될 수 있는 DNA 또는 RNA 분자이다.

[0301]

용어 "벡터", "클로닝 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA 또는 RNA 서열(예를 들어, 외래 유전자)이 숙주 세포에 도입되어, 숙주를 형질전환하고 도입된 서열의 발현(예를 들어, 전사 및 번역)을 촉진할 수 있도록 하는 운송 수단

을 의미한다. 따라서, 본 발명의 추가 목적은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

- [0302] 이러한 벡터는 대상체에 투여 시 상기 폴리펩타이드의 발현을 일으키거나 관리하기 위한 프로모터, 인핸서, 종결자 등과 같은 조절 요소를 포함할 수 있다. 동물에 대한 발현 벡터에서 사용되는 프로모터 및 인핸서의 예시에 SV40(Mizukami T. et al. 1987)의 초기 프로모터 및 인핸서, 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(Kuwana Y et al. 1987)의 LTR 프로모터 및 인핸서, 면역글로불린 H 사슬의 프로모터(Mason J O et al. 1985) 및 인핸서(Gillies S D et al. 1983) 등이 포함된다.
- [0303] 동물 세포를 위한 임의의 발현 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예시에 pAGE107(Miyaji H et al. 1990), pAGE103(Mizukami T et al. 1987), pHSG274(Brady G et al. 1984), pKCR(O'Hare K et al. 1981), pSG1 벡터 d2-4-(Miyaji H et al. 1990) 등이 포함된다. 플라스미드의 다른 대표적인 예시에 복제 기원점을 포함하는 복제 플라스미드 또는 예를 들어 pUC, pcDNA, pBR 등과 같은 통합 플라스미드가 포함된다. 바이러스 벡터의 대표적인 예시에 아데노바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스 및 AAV 벡터가 포함된다. 이러한 재조합 바이러스는 패키징 세포의 형질주입 또는 보조 플라스미드 또는 바이러스의 일시적인 형질주입과 같은, 이 분야에 알려진 기술로 생산할 수 있다. 바이러스 패키징 세포의 전형적인 예시에 PA317 세포, PsiCRIP 세포, GPenV-양성 세포, 293 세포 등이 포함된다. 이러한 복제-결손 재조합 바이러스를 생산하기 위한 구체적인 프로토콜은 예를 들어 WO 95/14785, WO 96/22378, 미국 특허 제5,882,877호, 미국 특허 제6,013,516호, 미국 특허 제4,861,719호, 미국 특허 제5,278,056호 및 WO 94/19478에서 찾을 수 있다.
- [0304] 본 발명의 추가 목적은 본 발명에 따른 핵산 및/또는 벡터로 형질주입, 감염 또는 형질전환된 세포에 관한 것이다. 용어 "형질전환"은 "외래"(즉, 외인성 또는 세포외) 유전자, DNA 또는 RNA 서열을 숙주 세포로 도입하여 숙주 세포가 원하는 물질, 전형적으로 도입된 유전자 또는 서열에 의해 암호화된 단백질 또는 효소를 생산하는 도입된 유전자 또는 서열을 발현하도록 하는 것을 의미한다. 도입된 DNA 또는 RNA를 수용하고 발현하는 숙주 세포는 "형질전환"된 것이다.
- [0305] 본 발명의 핵산은 적합한 발현 시스템에서 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 생산하는데 사용될 수 있다. 용어 "발현 시스템"은 예를 들어 벡터에 의해 운반되고 숙주 세포에 도입되는 외래 유전자에 의해 암호화된 단백질의 발현을 위한 적합한 조건 하의 숙주 세포 및 적합한 벡터를 의미한다.
- [0306] 일반적인 발현 시스템은 대장균 숙주 세포 및 플라스미드 벡터, 곤충 숙주 세포 및 배큘로바이러스 벡터, 및 포유동물 숙주 세포 및 벡터를 포함한다. 숙주 세포의 다른 예시에 원핵 세포(박테리아와 같은) 및 진핵 세포(효모 세포, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포 등과 같은)가 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 특이적인 예시에 대장균, *Kluyveromyces* 또는 *Saccharomyces* 효모, 포유동물 세포주(예를 들어, 배로 세포, CHO 세포, 3T3 세포, COS 세포 등)뿐만 아니라 1차 또는 확인된 포유동물 세포 배양물(예를 들어, 림프아구, 섬유아세포, 배아 세포, 상피 세포, 신경 세포, 지방 세포 등으로부터 생산된)이 포함된다. 예시에는 마우스 SP2/0-Ag14 세포(ATCC CRL1581), 마우스 P3X63-Ag8.653 세포(ATCC CRL1580), 다이히드로엽산 환원효소(이하 "DHFR" 유전자라 함)가 결손된 CHO 세포(Urlaub G et al; 1980), 랫드 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 세포(ATCC CRL 1662, 이후 "YB2/0 세포"라 함) 등도 포함된다. 세포에서 발현될 때 키메라 또는 인간화 항체의 ADCC 활성이 증가하기 때문에 YB2/0 세포가 바람직하다.
- [0307] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 숙주 세포를 생산하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (i) 수용성(competent) 숙주 세포로 상기 기술된 바와 같은 재조합 핵산 또는 벡터를 시험관 내 또는 생체 외에서 도입하는 단계, (ii) 얻어진 재조합 숙주 세포를 시험관 내 또는 생체 외에서 배양하는 단계, 및 (iii) 선택적으로, 상기 항체 또는 폴리펩타이드를 발현 및/또는 분리하는 세포를 선별하는 단계로 이루어지는 단계들을 포함한다. 이러한 재조합 숙주 세포는 본 발명의 항체 및 폴리펩타이드의 생산을 위해 사용될 수 있다.
- [0308] 다른 양상에서, 본 발명은 선택적 혼성화 조건 하에서 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 이 실시형태의 폴리뉴클레오타이드는 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산을 단리, 검출 및/또는 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 기탁된 라이브러리의 부분적 또는 전체-길이 클론을 동정, 단리 또는 증폭하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 폴리뉴클레오타이드는 인간 또는 포유동물 핵산 라이브러리 cDNA에서 단리된, 또는 상보적인 게놈 또는 cDNA 서열이다. 바람직하게는, 이 cDNA 라이브러리는 적어도 80%의 전체-길이 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90%의 전체-길이 서열, 및 보다 바람직하게는 적어도 95%의 전체-길이 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 표현을 증가시키기 위해 정규화될 수 있다. 엄격한 정도가 낮거나 보통인 혼성화 조건은 전형적

으로, 그러나 배타적이지는 않게, 상보적 서열에 상대적으로 감소된 서열 동일성을 갖는 서열에 적용된다. 엄격도가 보통 및 높은 조건은 동일성이 큰 서열에 대해 선택적으로 적용될 수 있다. 엄격도가 낮은 조건은 약 70% 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적인 혼성화를 가능하게 하고 오솔로그 또는 파라로그(paralog)한 서열을 동정하기 위해 적용될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 항체의 적어도 일부분을 암호화할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 대한 선택적 혼성화를 위해 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, Ausubel; Colligan 참조, 각각 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨.

[0309] IV. 항체 생산 방법

[0310] 본 발명의 항체 및 이의 단편, 면역글로불린 및 폴리펩타이드는 임의의 화학적, 생물학적, 유전적 또는 효소적 기술 각각 또는 이들의 조합과 같은, 하지만 이로 제한되지는 않는, 이 분야에서 알려진 임의의 기술로 생산할 수 있다.

[0311] 원하는 서열의 아미노산 서열을 알고 있다면, 당업자는 표준 폴리펩타이드 생산 기술로 상기 항체 또는 폴리펩타이드를 쉽게 생산할 수 있다. 예를 들어, 잘 알려진 고체상 방법을 사용하여, 바람직하게는 상업적으로 이용 가능한 펩타이드 합성 장치(예를 들어, Applied Biosystems(캘리포니아주 포스터 시티 소재)의 장치)를 사용하고 제조사의 지침에 따라 합성할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 항체 및 다른 폴리펩타이드는 이 분야에서 잘 알려진 재조합 DNA 기술로 합성할 수 있다. 예를 들어, 이들 단편은 발현 벡터에 원하는 (폴리)펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 통합하고 이 벡터를 원하는 폴리펩타이드를 발현할 적합한 진핵 또는 원핵 숙주에 도입한 이후 DNA 발현 산물로 얻을 수 있고, 이들은 잘 알려진 기술을 사용하여 추후 분리할 수 있다.

[0312] 특히, 본 발명은 추가로 본 발명의 항체 또는 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 (i) 상기 항체 또는 폴리펩타이드의 발현을 가능하게 하는 적합한 조건 하에서 본 발명에 따른 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) 발현된 항체 또는 폴리펩타이드를 회수하는 단계로 이루어지는 단계들을 포함한다.

[0313] 본 발명의 항체 및 다른 폴리펩타이드는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 수산화인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 수산화 인회석 크로마토그래피 및 선택적 크로마토그래피와 같은 기존의 면역글로불린 정제 절차를 통해 배양 배지로부터 적절히 분리된다. 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC") 또한 정제를 위해 적용할 수 있다. 예를 들어, Colligan의 문헌[Current Protocols in Immunology] 또는 문헌[Current Protocols in Protein Science](John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)), 예를 들어, 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10 참조, 각각 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨.

[0314] 본 발명의 키메라 항체(예를 들어, 마우스-인간 키메라 또는 비-설치류-인간 키메라)는 전술한 바와 같은 VL 및 VH 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 얻고, 인간 항체 CH 및 인간 항체 CL을 암호화하는 유전자를 갖는 동물 세포 발현 벡터에 이를 삽입하여 인간 키메라 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포로 이 발현 벡터를 도입하여 암호화 서열을 발현하여 생산할 수 있다. 인간 키메라 항체의 CH 도메인은 IgG류 또는 이의 하위류, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4와 같은 인간 면역글로불린에 속하는 임의의 영역일 수 있다. 유사하게, 인간 키메라 항체의 CL은 카파(kappa)류 또는 람다(lambda)류와 같은 Ig에 속하는 임의의 영역일 수 있다. 인간 및 비-인간 부분을 모두 포함하고, 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제작할 수 있는 키메라 및 인간화 단일클론성 항체는 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 키메라 및 인간화 단일클론성 항체는 이 분야에 알려진 재조합 DNA 기술, 예를 들어 문헌[Robinson *et al.* 국제 특허 공개 PCT/US86/02269; Akira *et al.* 유럽 특허 출원 제184,187호; Taniguchi, M. 유럽 특허 출원 제171,496호; Morrison *et al.* 유럽 특허 출원 제173,494호; Neuberger *et al.* PCT 출원 WO 86/01533; Cabilly *et al.* 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly *et al.* 유럽 특허 출원 제125,023호; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:214; Winter 미국 특허 제5,225,539호; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-555; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 및 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060]에 기술된 방법을 사용하여 생산될 수 있다.

[0315] 추가로, 인간화 항체는 미국 특허 제5,565,332호에 개시된 바와 같은 표준 프로토콜에 따라 제작될 수 있다. 다른 실시형태에서, 항체 사슬 또는 특이적 결합 쌍 구성원은 이 분야에 알려진 기술, 예를 들어 미국 특허 제

5,565,332호, 제5,871,907호 또는 제5,733,743호에 기술된 바와 같은 기술을 사용한 특이적 결합 쌍 구성원의 폴리펩타이드 사슬과 복제가능한 유전적 디스플레이 패키지의 성분의 융합을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터와 단일 결합 쌍 구성원의 제2 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 핵산 분자를 함유하는 벡터 사이의 재조합으로 생산될 수 있다. 본 발명의 인간화 항체는, 전술한 바와 같은, CDR 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 얻고, (i) 인간 항체의 것과 동일한 중쇄 불변 영역 및 (ii) 인간 항체의 것과 동일한 경쇄 불변 영역을 암호화하는 유전자를 갖는 동물 세포를 위한 발현 벡터에 이를 삽입하여 인간화 항체 발현 벡터를 구축하고, 동물 세포에 이 발현 벡터를 도입하여 이 유전자를 발현하여 생산될 수 있다. 인간화 항체 발현 벡터는 항체 중쇄를 암호화하는 유전자와 항체 경쇄를 암호화하는 유전자가 별개의 벡터에 존재하는 유형 또는 두 유전자들이 같은 벡터에 존재하는 유형(텐덤 유형)일 수 있다.

[0316] 기존의 재조합 DNA 및 유전자 형질주입 기술을 기반으로 인간화 항체를 생산하는 방법이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[iechmann L. et al. 1988; Neuberger M S. et al. 1985] 참조). 항체는 예를 들어 CDR-그래프팅(EP 제239,400호; PCT 공개 W091/09967; 미국 특허 제5,225,539호; 제5,530,101호; 및 제5,585,089호), 베니어링(veneering) 또는 표면처리(EP 제592,106호; EP 제519,596호; 문헌[Padlan EA (1991); Studnicka G M et al. (1994); Roguska M A. et al. (1994)]), 및 사슬 서플링(미국 특허 제5,565,332호)을 포함하는 이 분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 인간화될 수 있다. 이러한 항체를 제조하기 위한 일반적인 재조합 DNA 기술 또한 알려져 있다(유럽 특허 출원 EP 제125023호 및 국제 특허 출원 WO 96/02576 참조).

[0317] 유사하게, 본 명세서에 기술된 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 표준 절차에 따라 만들어질 수 있다. 예를 들어, 트라이오마(trioma) 및 하이브리드 하이브리도마는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 분비할 수 있는 세포 주의 두 가지 예시이다. 하이브리드 하이브리도마 또는 트라이오마에 의해 생산된 이중특이적 또는 다중특이적 항체의 예시는 미국 특허 제4,474,893에 개시되어 있다. 이러한 항체는 화학적 수단(Staerz et al. (1985) *Nature* 314:628 및 Perez et al. (1985) *Nature* 316:354) 및 하이브리도마 기술(Staerz and Bevan (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1453 및 Staerz and Bevan (1986) *Immunol. Today* 7:241)에 의해 구축될 수도 있다. 대안적으로, 이러한 항체는 서로 다른 항체를 만드는 하이브리도마들 또는 다른 세포들의 융합을 통해 헤테로하이브리도마를 만들고, 원하는 항체를 생산하고 공동-조립하는 클론을 식별하는 것으로 생성될 수도 있다. 이들은 완전한 면역글로불린 사슬들 또는 Fab 및 Fv 서열과 같은 이의 일부부분들의 화학적 또는 유전적 접합으로 생성될 수도 있다. 항체 성분은 본 명세서에 기술된 하나 이상의 면역글로불린 바이오마커를 포함하는, 본 발명의 하나 이상의 바이오마커의 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 결합할 수 있다.

[0318] 추가로, 항체 단편을 생산하는 방법이 잘 알려져 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 단편은 인간 HHLA2에 특이적으로 작용하는 항체(mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2와 같은)를 파파인(papain)과 같은 단백질분해효소로 처리하는 것을 통해 얻어질 수 있다. 또한 Fab는 항체의 Fab를 암호화하는 DNA를 원핵생물의 발현 시스템 또는 진핵생물의 발현 시스템을 위한 벡터에 삽입하고, Fab를 발현하기 위해 이 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물(적절히)에 도입하는 것을 통해 생산될 수 있다.

[0319] 유사하게, 본 발명의 F(ab')₂ 단편은 HHLA2에 특이적으로 작용하는 항체를 단백질분해효소 펩신으로 처리하여 얻어질 수 있다. 또한, F(ab')₂ 단편은 티오에테르 결합 또는 이황화 결합을 통한 아래 기술된 Fab'의 결합으로 생산될 수 있다.

[0320] 본 발명의 Fab' 단편은 HHLA2에 특이적으로 작용하는 F(ab')₂를 환원제 다이티오프레이톨로 처리하여 얻어질 수 있다. 또한, Fab' 단편은 항체의 Fab' 단편을 암호화하는 DNA를 원핵생물을 위한 발현 벡터 또는 진핵생물을 위한 발현 벡터에 삽입하고, 이의 발현을 실행하기 위해 이 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물(적절히)에 도입하는 것으로 생산될 수 있다.

[0321] 추가로, 본 발명의 scFv는 전술한 바와 같은 VH 및 VL 도메인을 암호화하는 cDNA를 얻고, scFv를 암호화하는 DNA를 구축하고, 이 DNA를 원핵생물을 위한 발현 벡터 또는 진핵생물을 위한 발현 벡터에 삽입하고, scFv를 발현하기 위해 이 발현 벡터를 원핵생물 또는 진핵생물(적절히)에 도입하는 것으로 생산될 수 있다. 인간화 scFv 단편을 생성하기 위해, 공여 scFv 단편으로부터 상보성 결정 영역(CDR)을 선택하고, 이를 알려진 3차원 구조의 인간 scFv 단편 프레임워크로 그래프팅하는 것이 적용된 CDR 그래프팅으로 잘 알려진 기술이 사용될 수 있다(예를 들어, W098/45322; WO 87/02671; 미국 특허 제5,859,205호; 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제4,816,567호; EP0173494 참조).

[0322] V. 항체, 면역글로불린 및 폴리펩타이드의 변형

- [0323] 본 명세서에 기술된 항체의 아미노산 서열 변형이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하기 위해 이를 필요로 할 수 있다. 인간 항체의 VH 및 VL의 FR에 비-인간 동물 유래 항체의 VH 및 VL의 CDR 만을 단순 그래프팅하여 인간화 항체를 생산할 때, 항원 결합 활성이 본래의 비-인간 동물 유래 항체에 비해 감소하는 것이 알려져 있다. 비-인간 항체의 CDR 뿐만 아니라 FR의 VH 및 VL의 몇몇 아미노산 잔기가 항원 결합 활성과 직접 또는 간접적으로 관련이 있다고 생각된다. 따라서, 이들 아미노산 잔기를 인간 항체의 VH 및 VL의 FR 유래의 서로 다른 아미노산 잔기로 치환하는 것은 결합 활성을 감소시킬 것이고 이 아미노산을 본래의 비-인간 동물 유래 항체의 아미노산 잔기로 치환하여 이를 교정할 수 있다.
- [0324] 변형 및 변화는 본 발명의 항체의 구조에서, 이를 암호화하는 DNA 서열에서 이루어질 수 있으며, 이를 통해 여전히 원하는 특성을 갖는 항체 및 폴리펩타이드를 암호화하는 기능적인 분자를 얻을 수 있다. 예를 들어, 활성의 현저한 손실없이 특정 아미노산을 단백질 구조의 다른 아미노산으로 치환할 수 있다. 단백질의 상호작용 능력 및 특성이 단백질의 생물학적 기능적 활성을 정의하기 때문에, 특정 아미노산 치환은 단백질 서열 및 당연히 이의 DNA 암호화 서열에서 이루어질 수 있지만, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 얻을 수 있다. 따라서 생물학적 활성의 현저한 손실없이, 본 발명의 항체 서열 또는 이에 상응하는 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA 서열에서 다양한 변화가 이루어질 수 있음이 고려된다.
- [0325] 일 실시형태에서, 아미노산의 변화는 유전 암호의 보전을 기반으로 보전적인 치환을 암호화하도록 DNA 서열의 코돈을 변경하는 것으로 달성할 수 있다. 구체적으로, 유전 암호로 정의된 바와 같이(아래에 나타냄), 특정 단백질의 아미노산 서열과 이 단백질을 암호화할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 사이에 알려진 명확한 관련성이 있다. 마찬가지로, 유전 암호로 정의된 바와 같이(상기 유전 암호 목록 참조), 특정 핵산의 뉴클레오타이드 서열과 이 핵산에 의해 암호화되는 아미노산 서열 사이에 알려진 명확한 관련성이 있다.
- [0326] 상기 기술된 바와 같이, 유전 암호의 중요하고 잘 알려진 특성은 중복성이며, 따라서 단백질을 만들기 위해 사용되는 대부분의 아미노산에 대해, 하나 이상의 코딩 뉴클레오타이드 트리플렛이 적용될 수 있다(위에 설명됨). 이에, 다수의 서로 다른 뉴클레오타이드 서열이 주어진 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. (비록 특정 생물체는 일부 서열을 다른 생물체보다 효율적으로 번역할 수 있지만) 이러한 뉴클레오타이드 서열들은 모든 생물체에서 같은 아미노산 서열의 생산을 초래하므로, 기능적으로 동등한 것으로 간주된다. 또한, 때때로, 퓨린 또는 피리미딘의 메틸화 변이체가 주어진 뉴클레오타이드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 삼중뉴클레오타이드 코돈 및 이에 상응하는 아미노산 사이의 암호화 관계에 영향을 미치지 않는다.
- [0327] 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 변화를 만들 때, 아미노산의 하이드로패스 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질에 상호작용적 생물학적 기능을 부여하는데 있어서 하이드로패스 아미노산 지수가 중요하다는 것이 이 분야에서 일반적으로 이해된다. 아미노산의 상대적인 하이드로패스 특성이 단백질과 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등의 상호작용을 정의하는 단백질의 2차 구조에 기여하는 것으로 받아들여진다. 아이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루탐산(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르트산(<RTI 3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5)과 같이, 각각의 아미노산은 이들의 소수성 및 전하 특성에 따라 하이드로패스 지수가 지정된다.
- [0328] 특정 아미노산이 유사한 하이드로패스 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질이 생성될 수 있다는 것, 즉 여전히 생물학적 기능상 동등한 단백질을 얻을 수 있다는 것이 이 분야에 알려져 있다.
- [0329] 위에서 설명한 바와 같이, 아미노산 치환은 일반적으로 아미노산 측쇄 치환기의 상대적 유사성, 예를 들어 소수성, 친수성, 전하, 크기 등을 기반으로 한다. 다양한 전술한 특성을 고려한 치환의 예시가 당업자에게 잘 알려져 있으며 아르기닌과 라이신; 글루탐산과 아스파르트산; 세린과 트레오닌; 글루타민과 아스파라긴; 및 발린, 류신과 아이소류신이 포함된다.
- [0330] 예를 들어 안정성을 높이기 위해 항체의 본래 글리코실화 패턴을 변경하는 경우 본 발명 항체의 아미노산 변형의 다른 유형이 유용할 수 있다. "변경"은 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 제거하고/제거하거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 추가하는 것을 의미한다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결이다. "N-연결"은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착하는 것을 지칭한다. 트라이펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산 임)은 아스파라긴 측쇄에 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착하기 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩타이드

에 이들 트라이펩타이드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. 항체에 글리코실화 부위를 추가하는 것은 하나 이상의 상기 기술된 (N-연결 글리코실화 부위를 위한) 트라이펩타이드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경하는 것을 통해 쉽게 달성된다. 또 다른 유형의 공유결합 변형은 글리코시드를 항체에 화학적 또는 효소적으로 결합하는 것을 포함한다. 이러한 절차는 N- 또는 O-연결 글리코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서의 항체 생산을 필요로하지 않는다는 점에서 유리하다. 사용된 결합 방식에 따라, 당은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실기, (c) 시스테인의 것과 같은 유리 설프하이드릴기(sulfhydryl group), (d) 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프로린의 것과 같은 유리 히드록실기, (e) 페닐알라닌, 타이로신 또는 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기 또는 (f) 글루타민의 아마이드기에 부착될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 WO87/05330에 기술되어 있다.

[0331] 유사하게, 항체에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티를 제거하는 것은 화학적 또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화에는 항체를 트리플루오로메탄설폰산 화합물 또는 이에 동등한 화합물에 노출시키는 것이 필요하다. 이러한 처리는 연결당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래하지만, 항체는 그대로 남게 된다. 화학적 탈글리코실화는 문헌[Sojahn H. et al. (1987)] 및 문헌[Edge, A S. et al. (1981)]에 의해 설명된다. 항체 탄수화물 모이어티의 효소적인 절단은 문헌[Thotakura, N R. et al. (1987)]에 의해 설명된 바와 같은 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 달성할 수 있다.

[0332] 다른 변형으로 면역접합체를 형성하는 것이 포함될 수 있다. 예를 들어, 공유결합 변형의 일 유형에서, 항체 또는 단백질은 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 명시된 방식으로 다양한 비 단백질성 폴리머, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 공유적으로 연결된다.

[0333] 본 발명의 항체 또는 다른 단백질과 이중 물질의 접합은 N-석신이미딜 (2-피리딜다이티오) 프로피온산(SPDP), 석신이미딜 (N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복시산, 이미노티올란(IT), 이미도에스터의 이중기능성 유도체 (예컨대, 다이메틸 아디피미데이트 HCL), 활성화 에스터(예컨대, 다이석신이미딜 수베르산염), 알데하이드(글루타르알데하이드와 같은), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산다이아민), 비스-다이아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-다이아조늄벤조일)-에틸렌다이아민), 다이아아소사아네이트(예컨대, 툴루엔 2,6 다이아아소사아네이트) 및 비스-활성화 플루오린 화합물(1,5-다이플루오로-2,4-다이나이트로벤젠)을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 다양한 이중기능성 단백질 결합 물질을 사용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 탄소 표지된 1-아이소티오사아나토벤질 메틸다이에틸렌 트리아아민펜타아세트산(MX-DTPA)이 항체에 방사선뉴클레오타이드를 접합하기 위한 예시적인 킬레이팅 물질이다(WO 94/11026).

[0334] 또 다른 양상에서, 본 발명은 세포독소, 약물 및/또는 방사성동위원소와 같은 치료적 모이어티에 접합된 HHLA2에 특이적으로 결합하는 항체를 다룬다. 세포독소에 접합될 때, 항체 컨쥬게이트는 "면역독소"로 지칭된다. 세포독소 또는 세포독성 물질은 세포에 해로운(예를 들어, 세포를 죽이는) 임의의 물질을 포함한다. 예시로 탁솔(taxol), 사이토크라신 B(cytochalasin B), 그라미시딘 D(gramicidin D), 에티뎀 브로마이드, 에메틴(emetine), 미토마이신(mitomycin), 에토포사이드(etoposide), 테노포사이드(tenoposide), 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 콜히친(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 다이하이드록시 안트라신 다이온(dihydroxy anthracin dione), 미토산트론(mitoxantrone), 미트라마이신(mithramycin), 액티노마이신 D(actinomycin D), 1-데하이드로테스토스테론(1-dehydrotestosterone), 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 프로카인(procaine), 테트라카인(tetracaine), 리도카인(lidocaine), 프로프라놀롤(propranolol) 및 푸로마이신(puromycin) 및 이들의 유사체 또는 동족체가 포함된다. 치료적 물질은 대사길항제(예를 들어, 메토타렉세이트, 6-머캅토프린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진(5-fluorouracil decarbazine)), 알킬화 물질(예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란(melphalan), 카무스틴(carmustine)(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로포스파마이드, 부설판, 다이브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C(mitomycin C) 및 시스-다이클로로다이아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴, 안트라사이클린(예를 들어, 다우노루비신(이전 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(이전 액티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)) 및 항-유사분열 물질(예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 본 발명의 항체는 암과 같은 관련 장애의 치료를 위한 세포독성 방사성약물을 생성하기 위해 방사성동위원소, 예를 들어 방사성 아이오딘에 접합될 수 있다.

[0335] 접합된 항-HHLA2 항체는 임상 시험 절차의 일부로서 조직에서 폴리펩타이드 수준을 모니터링하기 위해, 예를 들어

주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위해 또는 면역요법에 반응할 가능성이 가장 높은 환자를 선별하기 위해 진단적으로 또는 예후적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, HHLA2에 결합하는 항체(mAb 8A12 및 다클론성 항체 1.2 및 2.2와 같은)가 인식된 세포 내 에피토프를 표적으로 삼도록 하고 접합된 분자로부터 방사된 신호를 분석하여 결합을 검출하기 위해 세포는 유세포 분석에서 투과될 수 있다. 항체를 검출가능한 물질에 결합(즉, 물리적으로 연결)하여 검출을 쉽게 할 수 있다. 검출가능한 물질의 예시에는 다양한 효소, 보결분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생물발광 물질 및 방사성 물질이 포함된다. 적합한 효소의 예시에는 거자무 과산화효소, 알칼라인 포스파타제, β -갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스터라제가 포함되고; 적합한 보결분자단 복합체의 예시에는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴이 포함되고; 적합한 형광 물질의 예시에는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 다이클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 댄실 클로라이드 또는 피코에리트린(PE)이 포함되고; 발광 물질의 예시에는 루미놀이 포함되고; 생물발광 물질의 예시에는 루시페라제, 루시페린 및 에쿠오린이 포함되고; 적합한 방사성 물질의 예시에는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 또는 ^3H 가 포함된다. 본 명세서에서 항체와 관련하여 사용된 용어 "표지"는 항체에 방사성 물질 또는 형광단(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 또는 피코에리트린(PE) 또는 인도사이아닌(Cy5))과 같은 검출가능한 물질을 결합(즉, 물리적으로 연결)하여 항체를 직접 표지하는 것뿐만 아니라 검출가능한 물질과의 반응성으로 항체를 간접 표지하는 것을 포함하는 것으로 의도된다.

[0336] 본 발명의 항체 컨쥬게이트는 주어진 생물학적 반응을 변경하기 위해 사용될 수 있다. 치료적 모이어티는 고전적인 화학적 치료제로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 이러한 단백질은 예를 들어 아브린(abrin), 리신 A(ricin A), 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소와 같은 효소적 활성 독소 또는 이의 활성 단편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론- γ 와 같은 단백질; 또는 예를 들어 림포카인(lymphokine), 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF") 또는 다른 사이토카인 또는 성장 인자와 같은 생물학적 반응 변경제를 포함할 수 있다.

[0337] 이러한 치료적 모이어티를 항체에 컨쥬게이트하는 기술은 예를 들어 문헌[Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody 담체s Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475 506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303 16 (Academic Press 1985)] 및 [Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119 58 (1982)]과 같이 잘 알려져 있다.

[0338] 일부 실시형태에서, 접합은 세포에 세포독성 물질 또는 성장 저해 물질의 방출을 쉽게 하는 "절단가능한 링커"를 사용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 산-불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광-불안정 링커, 다이메틸 링커 또는 다이설파이드-함유 링커(예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호 참조)가 사용될 수 있다. 대안적으로, 제조합 기술 또는 펩타이드 합성을 통해 항체와 세포독성 물질 또는 성장 저해 물질을 포함하는 융합 단백질을 만들 수 있다. DNA는 서로 인접한 컨쥬게이트의 두 부분을 암호화하는 영역 또는 컨쥬게이트의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩타이드를 암호화하는 영역에 의해 분리된 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0339] VI. 본 발명의 용도 및 방법

[0340] 본 명세서에 기술된 본 발명의 항-HHLA2 항체, 면역글로불린, 폴리펩타이드 및 핵산은 HHLA2 수준의 검출을 기반으로 하는 수많은 예측 의학 분석(예를 들어, 진단 분석, 예후 분석 및 임상 시험 모니터링)에 사용될 수 있으며, 일부 실시형태에서 단독으로 또는 독소 화합물 또는 다른 치료제에 접합된 경우 치료 목적(예를 들어, 치료적 및 예방적)으로 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "검출"은 대조군을 참조하거나 참조하지 않은 정성적 및/또는 정량적 검출(수준을 측정하는)을 포함한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 본 발명의 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 다음 중 하나 이상의 활성을 갖는다: 1) TMIGD2 및/또는 KIR3DL3와 같은 천연 결합 상대에 결합하고/결합하거나 이 결합 상대의 활성을 조절; 2) 공동-면역저해 신호전달과 같은 세포 내 또는 세포 간의 신호전달을 조절; 3) 림프구의 활성화 및/또는 증식을 조절; 4) 생물체, 예를 들어 마우스, 비-설치류 동물 또는 인간과 같은 포유동물의 면역 반응 조절; 및 5) 면역 세포 아네르기 조절.

- [0341] 따라서, 본 발명의 일 양상은 생물학적 시료(예를 들어, 혈액, 혈청, 세포 또는 조직)와 관련된 HHLA2 폴리펩타이드 수준을 결정하기 위한 진단적인 분석, 이에 따라 시료의 HHLA2 폴리펩타이드의 수준을 결정하는 것, 개체가 장애를 앓고 있는지를 결정하는 것 및/또는 이러한 HHLA2 수준으로 나타나는 이러한 장애의 상태를 결정하는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 HHLA2와 연관된 암 질환을 상연하는데 유용하다.
- [0342] 본 발명은 또한 개체가 이러한 장애 발생 위험이 있는지를 결정하기 위한 예후적(또는 예언적) 분석을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양상은 임상 시험에서 HHLA2의 발현 또는 활성 상 물질(예를 들어, 약물, 화합물)의 영향을 모니터링하는 것에 관한 것이다.
- [0343] 본 발명은 또한 HHLA2 신호를 전달하는 물질을 확인하기 위한 수단으로서의 HHLA2 검출을 제공한다. HHLA2 신호를 전달하는 물질은 면역 반응을 약화시킬 것이고 자가면역 질환 및 천식에 그리고 내성을 확립하는데 유용할 것이다.
- [0344] 본 명세서에 기술된 임의의 방법에서, HHLA2는 단독으로 또는 다른 면역 관문 및/또는 공동자극 분자와 같은 다른 분자의 발현과의 조합으로 검출될 수 있다. 여러 분자의 조합 검출(예를 들어, 순차적으로 또는 동시에)은 요법 개입의 시너지 효과 및/또는 개인화, 장애의 하위유형의 고해상도 진단에 관한 유용한 정보를 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, HHLA2는 하나 이상의 마커와 함께 조합하여 검출된다.
- [0345] 1. 진단 분석
- [0346] 본 발명은, 부분적으로, 생물학적 시료가 세포-제한 HHLA2를 발현하는지 및/또는 세포-제한 HHLA2의 수준이 조절되었는지(예를 들어, 상향조절 또는 하향조절)를 정확하게 분류하여, 이에 따라 암과 같은 관심대상 장애의 상태를 나타내기 위한 방법, 시스템 및 코드를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 통계학적인 알고리즘 및/또는 경험적 데이터(예를 들어, HHLA2의 존재, 부재 또는 수준)를 사용하여 HHLA2에 의해 매개되는 암 또는 이의 하위유형과 관련된 또는 이의 위험이 있는 시료(예를 들어, 대상체로부터의 시료)를 분류하는데 유용하다.
- [0347] HHLA2 또는 이의 단편의 수준을 검출하는, 이에 따라 시료가 HHLA2의 비정상적인(예를 들어, 상향조절 또는 하향조절) 발현 또는 이의 임상적인 하위유형에 의해 매개되는 질환 또는 장애와 연관되는지를 분류하는데 유용한 예시적인 방법은 시험 대상체로부터 생물학적 시료를 얻는 것 및 이 생물학적 시료를 생물학적 시료에서 HHLA2의 수준을 검출하는 것과 같은 HHLA2 검출이 가능한 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 사용되며, 여기서 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 일곱, 여덟, 아홉, 열 또는 그 이상의 이 항체 또는 항체 단편은 조합으로(예를 들어, 샌드위치 ELISA에서) 또는 순차적으로 사용될 수 있다. 특정 예시에서, 통계학적 알고리즘은 단일 학습 통계 분류 시스템이다. 예를 들어, 단일 학습 통계 분류 시스템은 예측 또는 확률 및 HHLA2의 존재 또는 수준을 기반으로 HHLA2 시료로 시료를 분류하기 위해 사용될 수 있다. 단일 학습 통계 분류 시스템을 사용하면 일반적으로 민감도, 특이도, 양성 예측 값, 음성 예측 값 및/또는 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 전체 정확도로 시료를 HHLA2 시료로 분류한다.
- [0348] 다른 적합한 통계학적 알고리즘이 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 학습 통계 분류 시스템은 복잡한 데이터 세트(예를 들어, 관심대상 마커 패널)에 적응하고 이러한 데이터 세트를 기반으로 결정을 내릴 수 있는 기계 학습 알고리즘 기술을 포함한다. 일부 실시형태에서, 분류 트리(예를 들어, 랜덤 포레스트)와 같은 단일 학습 통계 분류 시스템이 사용된다. 다른 실시형태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 학습 통계 분류 시스템의 조합이, 바람직하게는 탠덤으로 사용된다. 학습 통계 분류 시스템의 예시에 귀납적 학습(예를 들어, 랜덤 포레스트, 분류 및 회귀 트리(C&RT), 부스팅 트리(boosted trees) 등과 같은 결정/분류 트리), PAC 학습(Probably Approximately Correct learning), 연결주의자 학습(예를 들어, 신경망(neural network: NN), 인공 신경망(artificial neural network: ANN), 뉴로 퍼지 네트워크(NFN), 네트워크 구조, 다층 퍼셉트론과 같은 퍼셉트론, 다층 피드-포워드 네트워크, 신경망의 응용, 빌리프 네트워크의 베이지안 네트워크 등), 강화 학습(예를 들어, 미경험 학습, 적응 동적 학습 및 시간차 학습과 같은 알려진 환경 내 수동적 학습, 미지의 환경 내 수동적 학습, 미지의 환경 내 능동적 학습, 학습 행동-가치 함수, 강화 학습의 응용 등) 및 유전적 알고리즘 및 진화 프로그래밍을 사용하는 것이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 다른 학습 통계 분류 시스템에는 지원 벡터 머신(예를 들어, 커널 방법), 다변량 적응 회귀 스플라인(MARS), 리프버그-마크워트 알고리즘, 가우스-뉴턴 알고리즘, 가우시안의 혼합, 경사 하강 알고리즘 및 학습 벡터 양자화(LVQ)가 포함된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법은 추가로 HHLA2 시료 분류 결과를 임상의, 예를 들어 조직병리학자 또는 종양학자에게 보내

는 것을 포함한다.

[0349] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 추가로 개체가 HHLA2와 관련된 상태 또는 장애를 가질 확률 형태로의 진단을 제공한다. 예를 들어, 개체는 이 상태 또는 장애를 가질 약 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이상의 확률을 가질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법은 추가로 개체의 상태 또는 장애의 예후를 제공한다. 일부 예시에서, HHLA2 시료로 시료를 분류하는 방법은 추가로 얻어진 시료로부터의 개체의 증상(예를 들어, 임상적 요인)을 기반으로 한다. 증상 또는 증상의 군은 예를 들어 림프구수, 백혈구수, 적혈구 침강 속도, 설사, 복통, 경련, 발열, 빈혈, 체중 감소, 불안, 우울증 및 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, HHLA2와 관련된 상태 또는 장애를 갖는 것으로 개체를 진단한 후 이 상태 또는 조건에 관련된 하나 이상의 증상의 치료에 유용한 약물(예를 들어, 화학요법제)을 치료적 유효량으로 개체에 투여한다.

[0350] 일 실시형태에서, 상기 방법은 추가로 대조 생물학적 시료(예를 들어, HHLA2로 매개되는 상태 또는 장애를 갖지 않는 대상체로부터의 생물학적 시료), HHLA2로 매개되는 상태 또는 장애의 완화 기간 동안 또는 이 상태 또는 장애가 발생하기 전의 대상체로부터의 생물학적 시료 또는 HHLA2로 매개되는 상태 또는 장애의 발생을 치료하는 동안의 대상체로부터의 생물학적 시료를 얻는 것을 포함한다.

[0351] HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 존재 또는 부재를 검출하는 방법의 예시는 HHLA2 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 본 발명의 항체 또는 이의 단편이고, 바람직하게는 검출가능하게 표지된 항체이다. 항체는 다클론성일 수 있고, 보다 바람직하게는 단일클론성일 수 있다. 이들은 표지될 수 있다. 항체와 관련된 용어 "표지"는 탐침 또는 항체에 검출가능한 물질을 결합(즉, 물리적 연결)하여 탐침 또는 항체를 직접적으로 표지화하는 것뿐만 아니라 직접적으로 표지된 또 다른 시약과의 반응성으로 탐침 또는 항체를 간접적으로 표지화하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 간접적 표지화의 예시로 형광 표지된 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 검출하는 것이 포함된다. 용어 "생물학적 시료"는 혈청과 같은, 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 생물학적 유체뿐만 아니라 대상 안에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함하는 것으로 의도된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관 내뿐만 아니라 생체 내 생물학적 시료에서 HHLA2 또는 이의 단편을 검출하기 위해 사용될 수 있다. HHLA2 폴리펩타이드의 검출을 위한 시험관 내 기술에는 효소결합면역흡착분석법(ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전, 면역조직화학(IHC), 세포내 유세포분석 및 관련 기술, 및 면역형광법이 포함된다. 또한, HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 검출을 위한 생체 내 기술에는 표지된 항-HHLA2 항체를 대상체에 도입하는 것이 포함된다. 예를 들어, 이 항체는 방사성, 발광성, 형광성 또는 대상 내의 존재 및 위치를 표준 이미징 기술로 검출할 수 있는 다른 유사한 마커와 단독으로 또는 세포 유형 마커(예를 들어, CD8+ T 세포 마커)와 같은 다른 분자에 대한 이미징과 조합으로 표지될 수 있다.

[0352] 일 실시형태에서, 생물학적 시료는 시험 대상체로부터의 폴리펩타이드 분자를 함유한다. 바람직한 생물학적 시료는 대상체로부터 기존 수단에 의해 단리된 혈청, 종양 미세환경 시료, 종양 주위 시료 또는 종양 내 시료이다.

[0353] 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 추가로 대조 대상체로부터의 대조 생물학적 시료를 얻는 것, 생물학적 시료에서 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 존재가 검출되도록 대조 시료를 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 화합물 또는 물질과 접촉시키는 것 및 대조 시료 내 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 존재와 시험 시료 내 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 존재를 비교하는 것을 포함한다.

[0354] 또 다른 실시형태에서, 항체는 ELISA 또는 RIA에서 사용하기 위한 성분 또는 장치와 연관된 것일 수 있다. 비제한적 예시로 이들 분석에서 사용하기 위해 고체 표면에 고정된(예를 들어, 위에 기술된 바와 같은 빛 또는 방사선 방출 기반 검출가능한 표지에 연결 및/또는 접합된) 항체가 포함된다. 다른 실시형태에서, 항체는 "샌드위치" 또는 경쟁적 분석법, 면역조직화학법, 면역형광 현미경법 등과 같은 면역크로마토그래피 또는 면역화학 분석을 사용하여 HHLA2를 검출하기 위한 장치 또는 스트립과 연관된 것이다. 이러한 장치 또는 스트립의 추가적인 예시는 가정 시험 또는 신속한 현장 진료 시험을 위해 디자인된 것이다. 추가 예시로 단일 시료 내 여러 피분석물의 동시 분석을 위해 디자인된 것이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 비-표지 항체가 생물학적 시료 내 HHLA2 폴리펩타이드의 "포획"에 적용될 수 있고 검출을 위해 포획된(또는 고정된) HHLA2 폴리펩타이드를 본 발명의 항-HHLA2 항체의 표지 형태에 결합할 수 있다. 예를 들어 면역확산법, 면역전기영동법, 면역조직병리법, 면역조직화학법 및 조직병리법 기반 분석법을 포함하는 면역분석의 다른 표준 실시형태가 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0355] 2. 예후 분석

- [0356] 본 명세서에 기술된 진단 방법은 또한 HHLA2와 연관된 장애를 갖는 또는 이 장애의 발생 위험이 있는 대상체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된, 용어 "비정상적"은 정상 HHLA2 수준을 벗어난 HHLA2의 상향조절 또는 하향조절을 포함한다. 비정상적 발현 또는 활성은 증가 또는 감소한 발현 또는 활성뿐만 아니라 정상적인 발현 패턴 또는 세포 내 발현 패턴을 따르지 않는 발현 또는 활성을 포함한다. 예를 들어, 비정상적인 HHLA2 수준은 HHLA2 유전자 또는 조절 서열의 돌연변이 또는 염색체 HHLA2 유전자의 증폭에 따라 HHLA2가 상향조절 또는 하향조절되는 경우를 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에 사용된, 용어 "원치않는"은 면역 세포 활성화와 같은 생물학적 반응과 관련된 원치않는 현상을 포함한다. 예를 들어, 용어 원치않는은 대상체의 바람직하지 않은 HHLA2를 포함한다.
- [0357] 실시예에서 추가로 설명된 바와 같은 HHLA2와 관련된 많은 장애들이 당업자에게 알려져 있다. HHLA2는 악성 림프종, 바이러스-유발 암 및 많은 고형 종양을 포함하는 다양한 종양 유형에 의해 발현된다. HHLA2는 필요한 상태에 대한 강한 면역 반응을 저해하는 면역 관문 조절자를 활성화하기 때문에 일반적으로 불리한 예후 마커이다. 하지만, 면역저해는 자가면역 질환, 염증 질환 등과 같은 다수의 장애를 치료하는데 있어서 면역 반응을 하향조절하기 위해 필요하다.
- [0358] 전술한 진단 분석 또는 후술하는 분석과 같은 본 명세서에 기술된 분석은 HHLA2 활성화의 조절 오류와 관련된 장애를 갖거나 장애 발생 위험이 있는 대상체를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 대상체로부터 시험 시료를 얻고 HHLA2를 검출하여 비정상적 또는 원치않는 HHLA2 활성화와 관련된 장애를 확인하는 방법을 제공하며, 여기서 HHLA2 폴리펩타이드가 존재하는 경우 대상체가 비정상적 또는 원치않는 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 갖거나 이 장애 발생 위험이 있다고 진단한다. 본 명세서에 사용된, "시험 시료"는 관심대상 대상체로부터 수득한 생물학적 시료를 지칭한다. 예를 들어, 시험 시료는 생물학적 유체(예를 들어, 뇌척수액 또는 혈청), 세포 시료 또는 조직, 예를 들어 종양 미세환경의 조직병리학적 슬라이드, 종양 주변 부위 및/또는 종양 내 부위일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 시료는 성숙 막-결합 HHLA2 및/또는 HHLA2 단편을 발현하는 세포를 포함한다.
- [0359] 또한, 본 명세서에 기술된 예후 분석은 비정상적 또는 원치않는 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 치료하기 위한 물질(예를 들어, 작용제, 길항제, 펩티도미메틱, 폴리펩타이드, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 다른 약물 후보)이 대상체에 투여될 수 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 대상체가 하나의 물질로 또는 물질들의 조합으로 효과적으로 치료될 수 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 시험 시료를 얻고 HHLA2를 검출하여 비정상적 또는 원치않는 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 치료하기 위한 하나의 이상의 물질로 대상체를 효과적으로 치료할 수 있는지를 결정하기 위한 방법을 제공한다(예를 들어, 여기서 HHLA2 폴리펩타이드가 풍부한 경우 비정상적 또는 원치않는 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 치료하기 위한 물질을 대상체에 투여할 수 있다고 진단한다).
- [0360] 본 명세서에 기술된 방법은 예를 들어 적어도 하나의 본 명세서에 기술된 항체 시약을 포함하여, 예를 들어 HHLA2 관련 증상 또는 관련 질환 또는 병의 가족력을 나타내는 환자를 진단하기 위한 임상 환경에서, 편리하게 사용될 수 있는, 사전-포장된 진단 키트를 사용하여 하여 수행될 수 있다.
- [0361] 또한, HHLA2가 발현되는 임의의 세포 유형 또는 조직이 본 명세서에 기술된 예후 분석에 사용될 수 있다.
- [0362] 본 발명의 또 다른 양상은 비정상적인 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 갖는 개체로부터의 생물학적 시료 내 HHLA2를 분석하고 정보를 대조군(예를 들어, 장애를 갖지 않는 개체; 대조군은 또한 "건강한" 또는 "정상의" 개체 또는 주어진 시간 경과 연구에서 초기 시점을 지칭할 수 있다), 바람직하게는 유사한 연령 및 인종의 대조군의 정보와 비교하여 연관 및/또는 계층을 분석하기 위한 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법의 사용을 포함한다. 환자 및 대조군을 적절하게 선택하는 것은 성공적인 연관 및/또는 계층 연구에 중요하다. 따라서, 잘-특성화된 표현형을 갖는 개체 풀이 매우 바람직하다. 질환 진단, 질환 소인 스크리닝, 질환 예후, 약물 반응성 결정(약물유전체학), 약물 독성 스크리닝 등의 기준이 본 명세서에 기술된다.
- [0363] 유전적인 연관 및/또는 계층 연구를 위해 다른 연구 디자인이 사용될 수 있다(Modern Epidemiology, Lippincott Williams & Wilkins (1998), 609-622). 환자의 반응에 영향을 미치지 않는 관찰 연구가 가장 빈번하게 실시된다. 관찰 연구의 첫째 유형은 질환이 의심되는 원인이 있는 사람의 시료와 의심되는 원인이 없는 사람의 시료를 확인하고, 두 시료의 질환 발생 빈도를 비교하는 것이다. 이러한 시료 채취된 모집단을 코호트라 부르고, 이러한 연구는 전향 연구이다. 관찰 연구의 다른 유형은 사례-대조 또는 후향적 연구이다. 전형적인 사례-대조 연구에서, 시료는 질환의 특정 징후와 같은 관심대상 표현형을 갖는 개체(사례군)로부터 또는 결론을 도출해야 하는 모집단(표적 모집단)의 표현형을 갖지 않는 개체(대조군)로부터 수집된다. 이후 질환의 가능한 원인을 후향적으로

로 조사한다. 사례-대조 연구의 시료 수집 시간 및 비용이 전향 연구의 것에 비해 상당히 적기 때문에, 사례-대조 연구가 유전적 관련 연구, 적어도 탐사 및 발견 단계의 연구 디자인으로 더 일반적으로 사용된다.

[0364] 관련된 표현형 및/또는 유전형 정보를 얻은 후, 개체의 대립유전자 또는 유전형의 존재와 표현형적 특성 사이에 임의의 유의적인 상호관련이 있는지를 결정하기 위해 통계적 분석을 수행한다. 바람직하게는, 유전적 연관성을 위한 통계적 시험을 수행하기 전에 데이터 점검 및 클리닝을 먼저 실시한다. 시료의 역학적 및 임상적 데이터는 이 분야에 잘 알려진 표와 그래프와 함께 기술적 통계로 요약될 수 있다. 데이터 검증은 바람직하게는 데이터 완성, 불일치 항목 및 이상점을 확인하기 위해 수행한다. 그 다음 이산 및 연속 변수에 대한 사례군 및 대조군 사이의 유의적인 차이를 확인하기 위해 각각 카이-제곱 검정 및 t-검정(정규 분포가 아닌 경우 윌콕슨 순위-합계 검정)을 사용할 수 있다.

[0365] 유전적 연관성 검정을 수행하는데 있어서 중요한 결정은 검정의 p-값이 그 수준에 도달할 때 유의적인 연관성이 결정될 수 있는 유의 수준을 결정하는 것이다. 후속 확증 시험에서 긍정적인 적중이 추적되는 탐색 분석에서, 조정되지 않은 p-값 < 0.2 (관용적 측면에서의 유의 수준)는 예를 들어 HHLA2 수준과 질환의 특정 표현형적 특성의 유의적인 연관성에 대한 가설을 만들기 위해 사용될 수 있다. 그 수준이 질환과의 연관성을 갖는 것으로 간주되기 위해 p-값 < 0.05 (이 분야에서 전통적으로 사용된 유의 수준)를 달성하는 것이 바람직하다. 같은 근원의 더 많은 시료 또는 다른 근원으로부터의 다른 시료의 확증 분석에서 적중이 추적될 때, 실험별 오류율을 0.05로 유지하면서 초과 적중 수를 피하기 위해 다중 검정에 대한 조정이 수행될 것이다. 다른 종류의 오류율을 제어하기 위해 다중 검정을 조정하는 다른 방법이 있지만, 실험별 또는 패밀리별 오류율을 제어하기 위해 일반적으로 사용되지만 다소 보수적인 방법은 본페로니 교정이다(Multiple comparisons and multiple tests, Westfall et al, SAS Institute (1999)). 거짓 발견 비율(FDR)을 제어하기 위한 순열 검정이 더 강력할 수 있다(Benjamini and Hochberg, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 57, 1289-1300, 1995, Resampling-based Multiple Testing, Westfall and Young, Wiley (1993)). 다중성을 제어하는 이러한 방법들은 실험별 오류율을 제어하는 것과 대조적으로 시험이 종속적이고 거짓 발견 비율을 제어하는 것이 충분할 때 선호된다.

[0366] 유전적 또는 비-유전적 개별 위험 요소가 질환의 소인으로 발견되면, 개체가 자신의 표현형 및/또는 유전형 및 다른 비-유전적 위험 요인에 따라 속할 카테고리(예를 들어, 질환 또는 비-질환)를 예측하기 위해 분류/예측 계획이 수립될 수 있다. 이산 특성을 위한 로지스틱 회귀 및 연속 특성을 위한 선형 회귀가 이러한 작업을 위한 표준 기술이다(Applied Regression Analysis, Draper and Smith, Wiley (1998)). 또한, 분류를 수립하기 위해 다른 기술들도 사용될 수 있다. 이러한 기술에는 다른 방법의 수행을 비교하기에 적합한 MART, CART, 신경망 및 관별 분석이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다(The Elements of Statistical Learning, Hastie, Tibshirani & Friedman, Springer (2002)).

[0367] 3. 임상 시험 중의 효과 모니터링

[0368] HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 대한 물질(예를 들어, 화합물, 약물 또는 소분자)의 영향(예를 들어, 세포 증식 및/또는 이동의 조절)을 모니터링하는 것은 기본 약물 스크리닝 뿐만 아니라 임상 시험에도 적용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 스크리닝 분석을 통해 HHLA2 유전자 발현 및 폴리펩타이드 수준을 감소시키거나 HHLA2 활성을 하향조절하는 것으로 결정된 물질의 유효성을 대상체의 임상 시험에서 감소된 HHLA2 유전자 발현 및 폴리펩타이드 수준 또는 하향조절된 HHLA2 활성을 나타내는지로 모니터링할 수 있거나, 대상체의 임상 시험에서 항-HHLA2 항체 또는 본 명세서에 기술된 단편으로 검출가능한 감소된 HHLA2 발현을 나타내는지로 모니터링할 수 있다. 이러한 임상 시험에서, HHLA2 유전자의 발현 또는 활성 및/또는 관심대상 장애의 증상 또는 마커를 특정 세포, 조직 또는 신체의 표현형의 "리드 아웃" 또는 마커로 사용할 수 있다. 유사하게, 본 명세서에 기술된 바와 같은 스크리닝 분석을 통해 HHLA2 유전자 발현 및 폴리펩타이드 수준을 증가시키거나 HHLA2 활성을 증가시키는 것으로 결정된 물질의 유효성을 대상체의 임상 시험에서 증가된 HHLA2 및 폴리펩타이드 수준, 또는 증가된 HHLA2 활성을 나타내는지로 모니터링할 수 있거나, 대상체의 임상 시험에서 항-HHLA2 항체 또는 본 명세서에 기술된 단편으로 검출가능한 증가된 HHLA2를 나타내는지로 모니터링할 수 있다. 이러한 임상 시험에서, HHLA2 유전자의 발현 또는 활성 및/또는 관심대상 장애의 증상 또는 마커를 예를 들어 자가 면역 장애에 대한 특정 세포, 조직 또는 신체의 표현형의 "리드 아웃" 또는 마커로 사용할 수 있다.

[0369] 예를 들어, 제한없이, HHLA2 활성을 조절(예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같은 스크리닝 분석에서 확인된)하는 물질(예를 들어, 화합물, 약물 또는 소분자)을 사용한 치료에 의해 세포 내에서 조절되는 유전자(HHLA2 포함)가 동정될 수 있다. 따라서, 예를 들어 임상 시험에서, 비정상적 HHLA2 활성과 연관된 장애에 대한 물질의 효과 연구에서, 세포를 단리하고 HHLA2 및/또는 비정상적 HHLA2 활성과 연관된 장애에 관련된 다른 유전자의 수

준을 위해 핵산 및/또는 단백질을 준비 및 분석할 수 있다. 유전자 발현 수준(예를 들어, 유전자 발현 패턴)은, 본 명세서에 기술된 방법들 중 하나로, 생산된 폴리펩타이드의 양을 측정하여, 또는 HHLA2 또는 다른 유전자의 수준을 측정하여 분석될 수 있다. 이 방법에서, 유전자 발현 패턴은 물질에 대한 세포의 생리적 반응을 나타내는 마커 역할을 할 수 있다. 따라서, 이 반응 상태는 물질로 개체를 치료하기 전 및 치료 과정의 다양한 시점에 결정될 수 있다.

[0370] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 (i) 물질을 투여하기 전에 대상체로부터 투여-전 시료를 얻는 단계; (ii) 투여-전 시료의 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 수준을 검출하는 단계; (iii) 대상체로부터 하나 이상의 투여-후 시료를 얻는 단계; (iv) 투여-후 시료의 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 수준을 검출하는 단계; (v) 투여-전 시료의 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 수준과 투여 후 시료 또는 시료들의 HHLA2 폴리펩타이드와 비교하는 단계; 및 (vi) 이에 따라 대상체에 대한 물질의 투여를 변경하는 단계를 포함하는 물질(예를 들어, 작용제, 길항제, 펩티도미메틱, 폴리펩타이드, 펩타이드, 핵산, 소분자 또는 본 명세서에 기술된 스크리닝 분석법으로 확인되는 다른 약물 후보)의 대상체에 대한 치료 유효성을 모니터링하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 검출된 것 보다 낮은 수준으로 HHLA2를 낮추기 위해, 즉 물질의 유효성을 높이기 위해, 물질의 투여를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 실시형태에 따라, 관찰가능한 표현형적 반응이 없는 경우에도 HHLA2는 물질의 유효성에 대한 지표로 사용될 수 있다. 유사하게, 면역조직화학법(IHC)과 같은 방법에 의한 HHLA2 분석은 하나 이상의 면역 관문을 저해하는 HHLA2 면역요법을 제공받을 환자를 선별하기 위해서도 사용될 수 있다. HHLA2 활성을 갖는 종양 환자는 본 명세서에 기술된 HHLA2 mAb 면역요법에 반응할 가능성이 더 높다. 이 면역요법은 초기에 면역 활성화를 초래할 것이고 활성화된 T 세포는 IFN-감마를 발현할 것이고 이는 결과적으로 HHLA2를 상향조절할 것이다. 일반적으로 이것은 HHLA2의 참여 및 면역 반응의 하향 조절을 초래하지만, HHLA2는 본 명세서에 기술된 항-HHLA2 mAb에 의해 차단될 수 있으므로, 종양과 같은 원하는 상태가 없어질 때까지 면역 반응은 계속된다. 대조적으로, HHLA2를 통해 능동적으로 신호를 전달하는 mAb는 면역 반응을 직접적으로 하향 조절한다.

[0371] 4. 치료 방법 및 용도

[0372] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체, 단편 또는 면역접합체(예를 들어, 항-HHLA2 항체 단독 또는 치료 모이어티와 접합된)는 비정상적 또는 원치 않는 HHLA2의 활성과 연관된 임의의 장애(예를 들어, 암)의 치료에 유용하다. 특정 실시형태에서, 치료는 인간과 같은 포유동물의 치료이다. 본 발명의 이러한 항체는 단독으로 또는 관심대상 장애의 치료에 적합한 임의의 물질 또는 요법과 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, HHLA2 및 다른 면역관문 또는 공동자극 분자를 포함하는 세포를 치료할 때 치료적 시너지가 나타나는 것으로 생각된다.

[0373] 치료적 단일클론성 항체가 항체에 의해 특이적으로 인식되는 항원을 세포 외부로 나타내는 세포를 고갈시킬 수 있다는 것이 잘 알려져 있다. 이 고갈은 적어도 3가지 메커니즘을 통해 매개될 수 있다: 항체 매개 세포독성(ADCC), 보체 의존적 용해 및 항체에 의해 표적화되는 항원에 의해 주어진 신호를 통한 종양 성장의 직접적인 항-종양 저해.

[0374] "보체 의존적 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 내 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적인 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합하는 항체에 보체 시스템의 첫째 성분이 결합하여 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석법, 예를 들어 문헌[Gazzano-Santoro et al. (1997)]에 기술된 분석법이 수행될 수 있다.

[0375] "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살파(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합한 분비된 항체가 이 세포독성 이펙터 세포를 항원을 갖는 표적 세포에 특이적으로 결합하도록 하고 이어 표적 세포를 죽이는 세포독성의 형태를 지칭한다. 관심대상 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 개시된 바와 같은 시험관 내 ADCC 분석법이 수행될 수 있다. 이 분야에 잘 알려진 바와 같이, Fc 부분은 Fc 수용체와의 원하는 상호작용 또는 이의 결핍을 초래하도록 조작될 수 있다.

[0376] 항체-매개 결합, 중화 및/또는 세포 내 표적의 조절을 위해, 특정 변형이 이루어져야 한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, sFv 및 Fab와 같은 특정 항체 형태가 항체-유사 분자의 세포 내 발현에 적합하다. 핵, ER, 세포질, 골지, 원형질막, 미토콘드리아, 특이적 경로에서 항원 또는 분자에 대응하는 곳을 포함하는 세포의 다른 구획 내 표적화 발현을 위한 이러한 적합한 항체-유사 분자를 만들고 사용하는 방법이 잘 알려져 있다(적어도 미국 특허 공개 제2008-0233110호 및 제2003-0104402호; 문헌[Marasco et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7889-7893; Chen et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:595-601; Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:5932-5936; Mhashilkar et al. (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Marasco et al. (1997)

Gene Therapy 4:11-15; Richardson *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:3137-3141; 및 Duan *et al.* (1994) *Human Gene Therapy* 5:1315-1324] 참조).

- [0377] 본 명세서에 사용된, 용어 "세포 내 면역글로불린 분자"는 자연-발생 분비되는 면역글로불린으로서 같지만 합성 후 세포의 내부에 남는 완전한 면역글로불린이다. "세포 내 면역글로불린 단편"은 세포 내 면역글로불린 분자의 단일-사슬 단편을 포함하는 임의의 단편을 지칭한다. 따라서, 세포 내 면역글로불린 분자 또는 이의 단편은 세포의 외부 표면 상에 분비 또는 발현되지 않는다. 단일-사슬 세포 내 면역글로불린 단편은 본 명세서에서 "단일-사슬 면역글로불린"을 지칭한다. 본 명세서에 사용된, 용어 "세포 내 면역글로불린 분자 또는 이의 단편"은 "세포 내 면역글로불린", "단일-사슬 세포 내 면역글로불린"(또는 이의 단편), "세포 내 면역글로불린 단편", "세포 내 항체"(또는 이의 단편) 및 "인트라바디"(또는 이의 단편)를 포함하는 것으로 이해된다. 이와 같이, 용어 "세포 내 면역글로불린", "세포 내 Ig", "세포 내 항체" 및 "인트라바디"는 본 명세서에서 호환 가능하게 사용될 수 있고 "세포 내 면역글로불린 분자 또는 이의 단편"의 일반적인 정의에 모두 포함된다. 본 발명의 세포 내 면역글로불린 분자 또는 이의 단편은, 일부 실시형태에서, 둘 이상의 서브유닛, 예를 들어 "제1의 세포 내 면역글로불린 서브유닛 폴리펩타이드" 및 "제2의 세포 내 면역글로불린 서브유닛 폴리펩타이드"를 포함할 수 있다. 하지만, 다른 실시형태에서, 세포 내 면역글로불린은 오직 하나의 폴리펩타이드 만을 포함하는 "단일-사슬 세포 내 면역글로불린"일 수 있다. 본 명세서에 사용된, "단일-사슬 세포 내 면역글로불린"은 원하는 활성, 예를 들어 항원에 대한 세포 내 결합 활성을 갖는 임의의 단일 단편으로 정의된다. 따라서, 단일-사슬 세포 내 면역글로불린은 항원에 결합하기 위해 함께 작용하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 모두 포함하는 것뿐만 아니라, 항원에 결합하는 단일 가변 영역, 예를 들어 본 명세서에 기술된 바와 같은 "낙타화" 중쇄 가변 영역 만을 갖는 단일-사슬 세포 내 면역글로불린을 포함한다. 세포 내 면역글로불린 또는 Ig 단편은 세포질 내, 세포막의 내부 표면 상, 또는 세포 하 구획(세포 소반 또는 세포 구획으로도 지칭됨) 내(예를 들어, 핵, 골지, 소포체, 엔도솜, 미토콘드리아 등)와 같은 실질적으로 세포 내 어느 곳에서든 발현될 수 있다. 추가 세포 소반은 본 명세서에 기술된 것 및 이 분야에 잘 알려진 것을 포함한다.
- [0378] 이러한 세포 내 면역글로불린은 표적화된 항원을 함유하는 수용 세포 또는 숙주 세포 내에 발현된다. 본 발명의 숙주 세포는 바람직하게는 진핵 세포 또는 세포주이고, 바람직하게는 식물, 동물, 척추동물, 포유동물, 설치류, 마우스, 영장류 또는 인간 세포 또는 세포주이다.
- [0379] 이론에 얽매이지 않고, 본 명세서에 기술된 면역글로불린 폴리펩타이드의 세포 내 발현은 HHLA2에 대한 세포 내 표적화 및 결합을 허용하여 저해 수용체에 결합하여 활성화될 때 신호전달을 전파하는 능력 및/또는 여러 HHLA2 분자의 국소 효능 농도를 증가시킬 때 신호전달을 조절하는 능력을 조절하여 이에 따른 신호전달하는 분자의 능력을 입체구조적으로 조절한다고 생각된다.
- [0380] 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체는 앞서 설명한 바와 같은 성장 저해 물질, 세포독성 물질 또는 프로드럭-활성화 효소와 같은 치료 모이어티와 결합될 수 있다. 본 발명의 항체는 원하는 HHLA2의 양보다 낮게 발현하거나 과발현하는 세포에 상기 성장 저해 물질, 세포독성 물질 또는 프로드럭을 표적화하는데 유용할 수 있다.
- [0381] 따라서, 본 발명의 목적은 본 발명의 항체, 단편 또는 면역결합체를 치료가 필요한 대상체에 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 비정상적 HHLA2 활성화와 연관된 장애를 치료하는 방법에 관련된다.
- [0382] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 면역 반응의 상향조절에 관한 진단적, 예후적 및 예방 적용에 더해, 치료적 적용에 유용하다. 면역 반응의 상향조절은 존재하는 면역 반응을 강화하거나 초기 면역 반응을 유도하는 형태일 수 있다. 예를 들어, 대상 조성물 및 방법을 사용하여 면역 반응을 강화하는 것은 암 및 미생물(예를 들어, 박테리아, 바이러스 또는 기생충) 감염에 대한 면역학적 방어를 개선하는 경우에 유용하다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 면역 반응 기능의 상향조절 또는 강화는 종양 면역성 유도에 유용하다.
- [0383] 또 다른 실시형태에서, 면역 반응은 기존 내성, 클론 결손 및/또는 고갈(예를 들어, T 세포 고갈)이 극복되도록, 본 명세서에 기술된 방법에 의해 자극될 수 있다. 예를 들어, 대상체가 유의적인 면역 반응을 나타낼 수 없는 항원에 대한 면역 반응, 예를 들어 종양 특이적 항원과 같은 자가 항원에 대한 면역 반응은 면역 반응을 상향조절하는 본 명세서에 기술된 적합한 물질을 투여하는 것으로 유도될 수 있다. 일 실시형태에서, 종양-특이적 항원과 같은 자가 항원이 공동투여될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역 반응은 신경학적 장애를 치료하기 위해 항원(예를 들어, 자가 항원)으로 자극될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 대상 물질은 능동면역화 과정에서 외래 항원에 대한 반응을 높이기 위한 보조제로 사용될 수 있다.

- [0384] 특정 예시에서, 면역 반응을 추가로 늘리기 위해, 면역 반응을 상향조절하는 다른 물질, 예를 들어 공동자극 수용체를 통해 신호를 전달하는 다른 B7 패밀리의 구성원의 형태를 추가로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 면역 반응을 상향조절하는 물질은 다양한 폴리펩타이드(예를 들어, 병원체로부터 유래된 폴리펩타이드)에 대한 백신에 예방적으로 사용될 수 있다. 병원체(예를 들어, 바이러스)에 대한 면역성은 적절한 보조제에서 면역 반응을 상향조절하는 물질과 함께 바이러스 단백질을 백신접종하여 유도될 수 있다.
- [0385] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 면역 작용을 상향조절하는 질환, 예를 들어 천식, 자가면역 질환(사구체신염, 관절염, 팽창 심근증-유사 질환, 궤양성 대장염, 쇼그렌 증후군, 크론병, 전신성 홍반성 낭창, 만성 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 건선, 알레르기성 접촉 피부염, 다발근염, 경피증, 결절성 동맥주위염, 류마티스성 열, 백납, 인슐린 의존성 당뇨병, 베체트병, 하시모토병, 애디슨병, 피부근염, 중증근무력증, 라이터 증후군, 그레이브스병, 악성 빈혈, 굿파스처 증후군, 불임병, 만성 활동 간염, 천포창, 자가면역 혈소판감소성 자반병, 및 자가면역 용혈성 빈혈, 활동성 만성 간염, 애디슨병, 항-인지질 증후군, 아토피성 알레르기, 자가면역 위축성 위염, 무염소증 자가면역, 셀리악병, 쿠싱 증후군, 피부근염, 원판성 루푸스, 홍반(erythematosis), 굿파스처 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 신장근저 위축, 특발성 혈소판감소증, 인슐린-의존성 당뇨병, 램버트-이튼 증후군, 루포이드 간염, 림프구감소증의 몇몇 경우, 혼합결합조직병, 유전 포창, 보통천포창, 악성빈혈, 수정체성 포도막염, 결절성 동맥주위염, 다선성 자가증후군, 일차성 담즙성 간경화증, 원발 경화성 담관염, 레이노병, 재발성 다발 연골염, 슈미트 증후군, 제한된 공피증(또는 크레스트 증후군), 교감성 안염, 전신성 홍반성 루푸스, 타카야수 동맥염, 관자동맥염, 갑상선중독증, B형 인슐린 저항성, 궤양성 대장염 및 베게너육아종증)을 저해하기 위한 진단적, 예후적 및 예방 적용(치료 및 질환의 시작 또는 진행을 지연하는 것과 같은)에 더해 치료적 적용에 유용하다.
- [0386] 유사하게, 본 발명의 항체 및 항원-결합 단편은 지속성 감염 질환(예를 들어, HPV, HBV, C형 간염 바이러스(HCV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1 및 HIV-2)와 같은 레트로바이러스, 엡스타인 바 바이러스(EBV), 거대세포 바이러스(CMV), HSV-1 및 HSV-2와 같은 헤르페스바이러스 및 인플루엔자 바이러스를 포함하는 바이러스성 감염성 질환)에 대한 진단적, 예후적 및 예방 적용(치료 및 질환의 시작 또는 진행을 지연하는 것과 같은)에 더해 치료적 적용에 유용하다. 본 명세서에 기술된 바와 같이 사용될 수 있는 병원체와 관련된 다른 항원은 말라리아, 바람직하게는 NANP 반복 기반 말라리아 펩타이드를 포함하는 다양한 기생충의 항원이다. 추가로, 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 브루지아(*Brugia*), 칸디다(*Candida*), 클라미디아(*Chlamydia*), 콕시디아(*Coccidia*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 디로필라리아(*Dirofilaria*), 고노코커스(*Gonococcus*), 히스토플라스마(*Histoplasma*), 리슈마니아(*Leishmania*), 마이코박테리움(*Mycobacterium*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 파라메시움(*Paramecium*), 페르투시스(*Pertussis*), 플라스모디움(*Plasmodium*), 뉴모코커스(*Pneumococcus*), 뉴모시스티스(*Pneumocystis*), 리케차(*Rickettsia*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 스테필로코커스(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 및 비브리오콜레라(*Vibrio cholerae*)와 같은 박테리아, 진균 및 다른 기생성 질환이 포함된다. 종의 예시로 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhea*), 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 헤모필러스 바기날리스(*Haemophilus vaginalis*), B군 스트렙토코커스 sp., 마이크로플라스마 호미니스(*Microplasma hominis*), 헤모필러스 듀크레이(*Hemophilus ducreyi*), 그레놀로마 인귀날(*Granuloma inguinale*), 림포파티아 베네레움(*Lymphopathia venereum*), 트레포네마 팔리디움(*Treponema pallidum*), 브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 브루셀라 카니스(*Brucella canis*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 캄필로박터 페투스 인테스티날리스(*Campylobacter fetus intestinalis*), 랩토스피라 포모나(*Leptospira pomona*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 브루셀라 오비스(*Brucella ovis*), 클라미디아 시타시(*Chlamydia psittaci*), 트리코모나스 포에투스(*Trichomonas foetus*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 이스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 액티노바실러스 에퀴(*Actinobacillus equuli*), 살모넬라 아보투스 오비스(*Salmonella abortus ovis*), 살모넬라 아보투스 에퀴(*Salmonella abortus equi*), 슈도모나스 애틀루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 코리네박테리움 에퀴(*Corynebacterium equi*), 코리네박테리움 피오제네스(*Corynebacterium pyogenes*), 액티노바실러스 세미니스(*Actinobacillus seminis*), 마이코플라스마 보비제니탈리움(*Mycoplasma bovis genitalium*), 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 암시디아 라모사(*Absidia ramosa*), 트리파노소마 이퀴페르둠(*Trypanosoma equiperdum*), 바베시아 카발리(*Babesia caballi*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*); 또는 예를 들어 파라코크시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*)와 같은 진균; 또는 다른 병원체, 예를 들어 플라스모디움 팔시파

름(*Plasmodium falciparum*)이 포함된다. 또한 미국 국립 알레르기 전염병 연구소(NIAID) 우선 병원체도 포함된다. 이들은 바리올라 마요르(*variola major*)(두창), 바실러스 안트라키스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*)(흑사병), 클로스트리듐 보툴리눔 독소(*Clostridium botulinum toxin*)(보툴리누스중독증), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*)(야토병), 필로바이러스(filovirus)(에볼라 출혈 열, 마버그 출혈 열), 아레나바이러스(라싸(Lassa)(라싸 열), 후닌(Junin)(아르헨티나 출혈 열) 및 관련 바이러스)와 같은 카테고리 A 물질; 코시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*)(Q 열), 부르셀라(*Brucella*) 종(브루셀라병), 버크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*)(마비저), 알파바이러스(베네수엘라 뇌척수염(Venezuelan encephalomyelitis), 동부 및 서부 말뇌염(eastern & western equine encephalomyelitis)), 피마자(*Ricinus communis*)의 리신 독소, 클로스트리듐 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*)의 엡실론 독소와 같은 카테고리 B 물질; 스태필로코커스 엔테로톡신 B(*Staphylococcus enterotoxin B*), 살모넬라 종, 쉬겔라 다이센테리에(*Shigella dysenteriae*), 이스케리치아 콜라이 균주 0157:H7(*Escherichia coli* strain 0157:H7), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 크립토스포리듐 파르븀(*Cryptosporidium parvum*); 니파 바이러스, 한타바이러스, 진드기매개 출혈 열 바이러스, 진드기매개 뇌염 바이러스, 황열 및 다제-내성 튜버클로시스와 같은 카테고리 C 물질; 쉬스토소마(*Schistosoma*) 및 타이니아(*Taenia*)와 같은 연충류; 리슈마니아(예를 들어, L. 멕시코(*L. mexicana*)) 및 플라스모듐(*Plasmodium*)과 같은 원생동물을 포함한다.

[0387] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 면역학적 내성, 장기 이식 거부, 이식-대-숙주 질환(GVHD), 알레르기성 질환 및 HHLA2에 의해 매개되는 면역 반응의 감쇠로 인한 질환에 관한 진단적, 예후적 및 예방 적용에 더해, 치료적 적용에 유용하다.

[0388] 본 발명의 맥락에서, 본 명세서에 사용된, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 이러한 용어가 적용되는 장애 또는 상태의 진행, 또는 이러한 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상을 반전, 경감, 저해하거나, 이러한 장애 또는 상태, 또는 증상을 예방하는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "암 치료"는 암 세포의 성장 및/또는 증식을 저해하는 것을 의미한다. 바람직하게는 이러한 치료는 또한 종양 성장의 퇴행(즉, 측정가능한 종양의 크기 감소)을 유도한다. 가장 바람직하게는, 이러한 치료는 종양의 완전한 퇴행을 유도한다.

[0389] 일부 실시형태에서, 용어 "환자" 또는 "이를 필요로 하는 환자"는 HHLA2의 비정상적 활성화와 관련된 암의 영향을 받거나 영향을 받을 가능성이 있는 인간 또는 비-인간 포유동물에 대한 것으로 의도된다.

[0390] 본 발명의 폴리펩타이드의 "치료적 유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험 비율로 암과 같은 관심대상 장애를 치료하기 위한 항체의 충분한 양을 의미한다. 하지만, 본 발명의 항체 및 조성물의 총 일일 사용량은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 의사의 참색에 의해 결정될 것임을 이해할 것이다. 임의의 특정 환자에 대한 특이적 치료적 유효량 수준은 치료할 장애 및 이 장애의 중증도; 사용된 특이적 항체의 활성; 사용된 특이적 조성물, 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 환자 식이; 투여 시간, 투여 경로 및 사용된 특이적 항체의 배출 비율; 치료 기간; 사용된 특이적 폴리펩타이드와 함께 조합으로 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의료 분야에 잘 알려진 유사 요인을 포함하는 다양한 요인에 의존적일 것이다. 예를 들어, 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 것보다 낮은 수준으로 화합물의 투여를 시작하고 원하는 효과를 달성할 때까지 투여량을 점차 높이는 것이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0391] 본 발명의 하나 이상의 항체를 포함하는 치료 제형은 보관을 위해 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 부가적인 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16판, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합하여, 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 제조된다. 항체 조성물은 좋은 의료 행위와 일치하는 방식으로 제형화, 적량화 및 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려할 요인은 치료할 특정 장애, 치료할 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 물질의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정 및 의료 행위자에 알려진 다른 요인을 포함한다.

[0392] 치료적 투여량은 적어도 약 0.01 μ g/kg 체중, 적어도 약 0.05 μ g/kg 체중; 적어도 약 0.1 μ g/kg 체중, 적어도 약 0.5 μ g/kg 체중, 적어도 약 1 μ g/kg 체중, 적어도 약 2.5 μ g/kg 체중, 적어도 약 5 μ g/kg 체중 및 약 100 μ g/kg 체중 이하일 수 있다. 이러한 지침이 활성 물질의 분자량에 따라, 예를 들어 항체 단편의 사용 또는 항체 컨쥬게이트의 사용에서, 조정될 것임을 당업자는 이해할 것이다. 투여량은 또한 국소 투여, 예를 들어 비강내, 흡입 등, 또는 전신 투여, 예를 들어 i.m., i.p., i.v. 등에 따라 다양할 수 있다.

[0393] 그럴 필요는 없지만 조성물은 선택적으로 활성을 강화하거나 그렇지 않다면 치료 효과를 증가시키는 하나 이상의 물질과 제형화된다. 이들은 일반적으로 이전에 사용된 것과 같은 투여량 및 투여 경로로 또는 이전에 사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

- [0394] 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비-독성이고, 인산염, 구연산염 및 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메치오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(옥타데실다이메틸벤질 염화 암모늄; 염화 헥사메토늄; 염화 벤잘코늄, 염화 벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔과 같은); 저 분자량 (약 10개의 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 고분자; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 당당류, 이당류 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트 물질; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 카운터-이온 형성-염; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)와 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 생체 내 투여에 사용되는 제형은 반드시 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과로 쉽게 달성할 수 있다.
- [0395] 활성 성분은 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전에서, 예를 들어 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐과 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 대한, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합으로, 제조된 마이크로캡슐에 포획될 수 있다. 이러한 기술들은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16판, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술되어 있다.
- [0396] 본 명세서에 기술된 조성물은 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내를 포함하는 임의의 적합한 방법으로 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하 투여가 포함된다. 추가로, 조성물은 특히 항체의 투여량을 감소시킨 펄스 주입으로 적절하게 투여될 수 있다.
- [0397] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 항체의 적절한 투여량은 상기 정의한 바와 같은 치료될 질환의 유형, 질환의 심각성 및 경과, 예방 목적으로 항체가 투여되는지의 여부, 이전 요법, 항체에 대한 환자의 임상 이력 및 반응, 및 의사의 재량에 의존할 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에 적절히 투여된다.
- [0398] 본 발명의 치료 물질은 단독으로 사용될 수 있거나 예를 들어 화학치료 물질, 호르몬, 항혈관형성제, 방사성표지, 화합물과 함께, 또는 수술, 냉동요법 및/또는 방사능요법과 함께 조합 요법으로 투여될 수 있다. 전술한 치료 방법은 기존 요법의 다른 형태(예를 들어, 당업자에게 잘 알려진 암에 대한 표준 치료)와 함께 결합으로, 또는 전- 또는 후-기존 요법과 함께 연속적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 물질은 치료적 유효량의 화학치료 물질과 함께 투여될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 물질은 화학치료 물질의 활성 및 효능을 높이기 위해 화학요법과 함께 투여된다. 의사용 탁상 편람(Physicians' Desk Reference: PDR)은 다양한 암의 치료에 사용되었던 화학치료 물질의 투여량을 개시한다. 전술한 치료적으로 유효한 화학치료 약물의 투여 요법 및 투여량은 치료될 특정 암, 질환의 정도 및 당업자에게 익숙한 다른 요인에 따라 달라질 것이며, 의사에 의해 결정될 수 있다.
- [0399] 암 백신은 또한 표적화 요법, 예를 들어 면역요법과 조합으로 투여될 수 있다. 용어 "표적화 요법"은 선택된 생물분자와 선택적으로 상호작용하여 암을 치료하는 물질의 투여를 지칭한다. 예를 들어, 면역 관문 저해제의 저해에 관한 표적화 요법은 본 발명의 방법과 조합에서 유용하다. 용어 "면역 관문 저해제"는 항-종양 면역 반응을 하향-조절하거나 저해함으로써 면역 반응을 미세 조정하는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 세포 표면 상 분자군을 의미한다. 면역 관문 단백질은 이 분야에 잘 알려져 있으며, CTLA-4, PD-1, VISTA, B7-H2, B7-H3, PD-L1, B7-H4, B7-H6, 2B4, ICOS, HVEM, PD-L2, CD160, gp49B, PIR-B, KIR 패밀리를 수용체, TIM-1, TIM-3, TIM-4, LAG-3, BTLA, SIRP알파(CD47), CD48, 2B4(CD244), B7.1, B7.2, ILT-2, ILT-4, TIGIT, HHLA2, TMIDG2, KIR3DL3 및 A2aR(예를 들어, WO 2012/177624 참조)을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 하나 이상의 면역 관문 저해제의 저해는 저해 신호전달을 차단하거나 중화하여 암을 더 효과적으로 치료하기 위해 면역 반응을 상향조절할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 백신은 PD1, PD-L1 및/또는 CD47 저해제와 같은 하나 이상의 면역 관문의 저해제와 함께 조합으로 투여된다.
- [0400] 면역요법은 예를 들어 추가적인 암 백신 및/또는 감작된 항원 제시 세포의 사용을 포함할 수 있는 표적화 요법의 한 형태이다. 예를 들어, 종양세포붕괴성 바이러스는 암세포를 감염 및 용해할 수 있지만 정상 세포에는 무해하여 암 요법에 잠재적으로 유용한 바이러스이다. 종양세포붕괴성 바이러스의 복제는 종양 세포 파괴를 촉진하고 종양 부위에 용량 증폭을 생성한다. 이들은 또한 항암 유전자를 위한 벡터로 작용하여, 항암 유전자를 종양 부위에 특이적으로 전달할 수 있다. 면역요법은 암 항원 또는 질환 항원에 대한 전-형성 항체의 투여로 달성되는 숙주의 단기간 보호를 위한 수동 면역을 포함할 수 있다(예를 들어, 선택적으로 화학치료 물질 또는 독소

에 연결된, 종양 항원에 대한 단일클론성 항체의 투여). 예를 들어, 항-VEGF 및 mTOR 저해제가 신장세포 암종의 치료에 효과적이라는 것이 알려져 있다. 면역요법은 또한 암 세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는 것에 초점을 맞출 수 있다. 대안적으로, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 3중 나선 폴리뉴클레오타이드 등이 종양 또는 암의 개시, 진행 및/또는 병리와 연관된 생물분자를 선택적으로 조절하기 위해 사용될 수 있다.

[0401] 용어 "비표적화 요법"은 선택된 생물분자와 선택적으로 상호작용하지 않고 암을 치료하는 물질의 투여를 지칭한다. 비표적화 요법의 대표적인 예시로 화학요법, 유전자 요법 및 방사선 요법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.

[0402] 일 실시형태에서, 화학요법이 사용된다. 화학요법은 화학치료 물질의 투여를 포함한다. 이러한 화학치료 물질은 다음 화합물 군 사이에서 선택된 것일 수 있지만 이로 제한되지는 않는다: 백금 화합물, 세포독성 항생제, 항대사제, 항-유사분열 물질, 알킬화 물질, 알제닌 화합물, DNA 토포아이스머라제 저해제, 타산, 뉴클레오사이드 유사체, 식물 알칼로이드 및 독소; 및 이들의 합성 유도체. 예시 화합물로 알킬화 물질: 시스플라틴, 트레오설판(treosulfan) 및 트로포스파마이드; 식물 알칼로이드: 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀; DNA 토포아이스머라제 저해제: 테니포사이드, 크리스나톨(crisnatol) 및 미토마이신; 항-염산: 메토틱세이트, 마이코페놀산 및 하이드록시우레아; 피리미딘 유사체: 5-플루오로우라실, 독시플루리딘 및 시토신 아라비노사이드; 퓨린 유사체: 머캅토피린(mercaptopurine) 및 티오구아닌; DNA 항대사제: 2'-데옥시-5-플루오로-우리딘, 아피디콜린 글리신산염(aphidicolin glycinate) 및 피라조롤이미다졸; 및 항유사분열 물질: 할리콘드린(halichondrin), 콜히친(colchicine) 및 리족신(rhizoxin)이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 하나 이상의 화학치료 물질(예를 들어, FLAG, CHOP)을 포함하는 조성물 또한 사용될 수 있다. FLAG는 플루다라빈, 시토신 아라비노사이드(Ara-C) 및 G-CSF를 포함한다. CHOP는 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴(vincristine), 독소루비신(doxorubicin) 및 프레드니손(prednisone)을 포함한다. 화학치료 물질의 전술한 예시는 예시적이며 제한하는 의도는 아니다.

[0403] 또 다른 실시형태에서, 방사선 요법이 사용된다. 방사선 요법에 사용되는 방사선은 이온화 방사선일 수 있다. 방사선 요법은 또한 감마선, X-선 또는 양성자 빔일 수 있다. 방사선 요법의 예시로 외부-빔 방사선 요법, 방사성동위원소(I-125, 팔라듐, 이리듐)의 간질작상, 스트론튬-89와 같은 방사성동위원소, 흉부 방사선 요법, 복강 내 P-32 방사선 요법 및/또는 전체 복부 및 골반 방사선 요법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 방사선 요법의 일반적인 개요에 대해서는 문헌[Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphia]을 참조할 수 있다. 방사선 요법은 방사선이 원격 근원으로부터 유도되는 외부 빔 방사선 또는 원격요법으로 적용될 수 있다. 방사선 치료는 또한 방사능의 근원이 암 세포 또는 종양 덩어리에 근접한 체내에 위치하는 내부 요법 또는 근접요법으로 적용될 수 있다. 또한 헤마토포르핀 및 이의 유도체, 베르토포르핀(BPD-MA), 프탈로사이아닌, 광감작제 Pc4, 데메톡시-하이포크렐린; 및 2BA-2-DMHA와 같은 광감작제의 투여를 포함하는 광역학적 요법의 사용도 포함된다.

[0404] 또 다른 실시형태에서, 호르몬 요법이 사용된다. 호르몬 요법 치료는 예를 들어 호르몬 작용제, 호르몬 길항제(예를 들어, 플루타미드, 비칼루타미드, 타목시펜, 랄록시펜, 류프로라이드 아세트산염(LUPRON), LH-RH 길항제), 호르몬 생합성 및 처리의 저해제 및 스테로이드(예를 들어, 텍사메타손, 레티노이드, 텔토이드, 베타메타손, 코르티솔, 코르티손, 프레드니손, 데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 미네랄로코르티코이드, 에스트로겐, 테스토스테론, 프로게스틴), 비타민 A 유도체(예를 들어, 올-트랜스 레티노인산(ATRA)); 비타민 D3 유사체; 항제스타젠(예를 들어, 미페프리스톤, 오나프리스톤), 또는 항안드로겐(예를 들어, 시프로테론 아세트산염)을 포함할 수 있다.

[0405] 5. 분석 및 스크리닝 방법

[0406] 본 발명의 또 다른 양상은 비-세포 기반 분석 및 이중이식 동물 모델 분석을 포함하는 스크리닝 분석에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 분석은 인간 또는 동물 모델 분석에서와 같이, HHLA2 신호전달을 감소시켜 면역 반응을 증가시키는 물질 및/또는 HHLA2 신호전달을 증가시켜 면역 반응을 감소시키는 물질을 확인하기 위해 HHLA2 신호전달을 조절하는 물질을 확인하기 위한 방법을 제공한다.

[0407] 일 실시형태에서, 본 발명은 HHLA2, TMIGD2 및 KIR3DL3와 같은 본 명세서에(예를 들어, 표, 도면, 실시예 또는 명세서에) 기술된 적어도 하나의 바이오마커에 결합하거나 이 바이오마커의 생물학적 활성을 조절하는 물질의 스크리닝 시험을 위한 분석에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 이러한 물질을 확인하기 위한 방법은 본 명세서에 기술된 적어도 하나의 바이오마커를 조절하는, 예를 들어 저해하는 물질의 능력을 결정하는 것이 필요하다.

- [0408] 일 실시형태에서, 분석은 본 명세서에 기술된 적어도 하나의 바이오마커와 시험 물질을 접촉시키는 것, 및 기질의 직접적 결합을 측정하는 것 또는 아래 기술된 간접적 파라미터를 측정하는 것과 같이 바이오마커의 효소 활성을 조절하는(예를 들어, 저해하는) 시험 물질의 능력을 결정하는 것을 포함하는 무세포 또는 세포-기반 분석이다.
- [0409] 예를 들어, 직접적 결합 분석에서, 바이오마커 단백질(또는 이의 개별적 표적 폴리펩타이드 또는 분자)은 방사성동위원소 또는 효소적 표지와 연결될 수 있고 이에 따라 복합체 내 표지 단백질 또는 분자를 검출하는 것을 통해 결합을 결정할 수 있다. 예를 들어, 표적은 ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C 또는 ^3H 로, 직접적 또는 간접적으로, 표지될 수 있고, 방사성동위원소는 방사능방출의 직접적 카운팅 또는 신티레이션 카운팅으로 검출할 수 있다. 대안적으로, 표적은 예를 들어 거자무 페록시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 루시페라제로, 효소적으로 표지될 수 있고, 효소적 표지는 산물에 대한 적절한 기질의 전환을 결정하는 방법을 통해 검출할 수 있다. 바이오마커와 기질 사이의 상호작용을 결정하는 것은 표준 결합 또는 효소 분석법을 사용하여 달성될 수 있다. 상기 기술된 분석법의 하나 이상의 실시형태에서, 단백질 또는 분자의 하나 또는 둘의 비복합체 형태로부터 복합체의 분리를 촉진하고 분석의 자동화를 도모하기 위해 폴리펩타이드 또는 분자를 고정하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0410] 시험 물질의 표적 결합은 반응물질을 함유하기에 적합한 임의의 용기에서 수행할 수 있다. 이러한 용기의 비-제한적 예시로 미세적정 플레이트, 시험관 및 마이크로-원심분리 튜브가 포함된다. 본 명세서에 기술된 항체의 고정된 형태는 또한 막, 셀룰로스, 나이트로셀룰로스 또는 유리 섬유; 아가로스 또는 폴리아크릴아마이드 또는 라텍스로 만들어진 것과 같은 비드; 또는 폴리스티렌으로 만들어진 것과 같은 접시, 플레이트 또는 웰의 표면과 같은, 다공성, 미세다공성(약 1미크론 미만의 평균 공극 직경을 갖는) 또는 거대다공성(약 10미크론 초과)의 평균 공극 직경을 갖는) 물질과 같은 고체상에 결합된 항체를 포함할 수 있다.
- [0411] 대안적인 실시형태에서, 바이오마커와 기질 사이 또는 바이오마커와 이의 천연 결합 상대 사이의 상호작용을 조절하는 물질의 능력을 결정하는 것은 신호전달 경로(예를 들어, 피드백 루프) 내 이의 위치의 다운스트림 또는 업스트림 역할을 하는 폴리펩타이드 또는 다른 산물의 활성을 조절하는 시험 물질의 능력을 결정하여 수행할 수 있다. 이러한 피드백 루프는 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Chen and Guillemin (2009) *Int. J. Tryptophan Res.* 2:1-19 참조).
- [0412] HHLA2 상태는 본 명세서에 기술된 항-HHLA2 항체를 사용하여 측정할 수 있다. HHLA2 발현 감소는 물질이 HHLA2 활성/신호전달을 저해한다는 것을 나타내며 HHLA2 활성/신호전달을 저해하고 면역 반응을 증가시키는데 유용한 물질임을 나타낸다. TMIGD2, KIR3DL3 및/또는 저해 수용체에 대한 HHLA2 결합의 감소는 물질이 HHLA2 활성/신호전달을 저해한다는 것을 나타내며 HHLA2 활성/신호전달을 저해하고 면역 반응을 증가시키는데 유용한 물질임을 나타낸다. 반대로, HHLA2 발현 증가는 물질이 HHLA2 활성/신호전달을 촉진한다는 것을 나타내며 HHLA2 활성/신호전달을 촉진하고 면역 반응을 감소시키는데 유용한 물질임을 나타낸다. TMIGD2, KIR3DL3 및/또는 저해 수용체에 대한 HHLA2 결합의 증가는 물질이 HHLA2 활성/신호전달을 촉진한다는 것을 나타내며 HHLA2 활성/신호전달을 촉진하고 면역 반응을 감소시키는데 유용한 물질임을 나타낸다.
- [0413] 본 발명은 또한 전술한 스크리닝 분석을 통해 확인된 신규 물질에 관한 것이다. 따라서, 적절한 동물 모델에서와 같이, 본 명세서에 기술된 바와 같은 확인된 물질을 사용하는 것 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 바와 같이 확인된 물질은 이러한 물질의 치료 효능, 독성 또는 부작용을 결정하기 위해 동물 모델에 사용될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 기술된 바와 같은 확인된 항체는 이러한 물질의 작용 메커니즘을 결정하기 위해 동물 모델에 사용될 수 있다.
- [0414] 본 발명의 일 양상은 비-세포 기반 분석 및 이중이식 동물 모델 분석을 포함하는 스크리닝 분석에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 분석은, 예를 들어 이중이식 동물 모델 분석을 사용하여 인간에서, 암이 항-HHLA2 항체 요법에 반응할 가능성이 있는지, 및/또는 물질이 항-HHLA2 항체 요법에 반응할 가능성이 없는 암 세포의 성장을 저해하거나 이 암 세포를 죽일 수 있는지를 확인하기 위한 방법을 제공한다.
- [0415] 6. 예방적 방법
- [0416] 일 양상에서, 본 발명은 대상체에서 원치않는 면역 반응 또는 바람직한 것보다 적은 면역 반응과 관련된 질환 또는 상태를 예방하는 방법을 제공한다. 청구된 물질 또는 방법을 사용한 치료 혜택을 받을 질환에 대한 위험이 있는 대상체를 예를 들어 이 분야에 알려진 임의의 진단 또는 예측적 분석법 또는 이들의 조합으로 확인할 수 있다. 예방적 물질의 투여는 원치않는 면역 반응 또는 바람직한 것보다 적은 면역 반응과 관련된 증상의 발현의 이전에 발생할 수 있다. 치료에 사용되는 적절한 물질(예를 들어, 항체, 펩타이드, 융합 단백질 또는 소분자)은

임상 징후에 따라 결정할 수 있고 예를 들어 본 명세서에 기술된 스크리닝 분석법을 사용하여 확인할 수 있다.

[0417] VII. 약제학적 조성물

[0418] HHLA2와 하나 이상의 천연 결합 상대(예컨대, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3) 사이의 상호작용을 조절하는(예를 들어, 저해 또는 촉진하는) 물질, 예를 들어 차단 항체, 펩타이드, 융합 단백질 또는 소분자는 대상체에 투여하기에 적합한 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 전형적으로 항체, 펩타이드, 융합 단백질 또는 소분자와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학적 투여에 적합한 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 약학적 활성화 기질을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 이 분야에 잘 알려져 있다. 임의의 기존 매질 또는 물질이 활성 화합물과 맞지 않는 경우를 제외하고, 조성물에서 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0419] 본 발명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 예시로 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국소), 경점막 및 직장 투여가 포함된다. 비경구, 피내 또는 피하 적용을 위해 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음의 성분을 포함할 수 있다: 주사를 위한 물과 같은 멸균 희석제, 염 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항박테리아제; 아스코르브산 또는 아황산수소 나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌다이아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세트산염, 시트르산염 또는 인산염과 같은 완충액 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 강장조절제. pH는 염산 또는 수산화 나트륨과 같은 산 또는 염기로 조절할 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만든 앰플, 일회용 주사기 또는 다용량 바이알에 담을 수 있다.

[0420] 주사 용도에 적합한 약제학적 조성물은 멸균 주사 용액의 즉석 제조 또는 분산을 위한 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수, 크레모퍼(Cremophor) EL™(BASF, 파시페니, 뉴저지) 또는 인산완충생리식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우, 조성물은 무균이어야 하고 주사가 쉬울 정도로 유동적이어야 한다. 제조 및 보관 조건에서 안정해야 하고 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산인 경우 필요한 입자 크기 유지, 및 계면활성제의 사용을 통해 유지될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등으로 달성할 수 있다. 많은 경우, 조성물에 등장제, 예를 들어 당류, 만니톨과 같은 폴리알코올, 솔비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시켜 달성할 수 있다.

[0421] 멸균 주사 용액은 필요한 경우 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 이의 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입시키고 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산물은 활성 화합물을 기본 분산 매체와 상기 열거된 것들에서 필요한 성분을 함유하는 멸균 매개체에 혼입시켜 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분과 원하는 임의의 부가 성분의 분말을 미리 멸균-여과한 이의 용액으로부터 진공 건조 및 동결-건조로 수득하는 것이다.

[0422] 경구용 조성물은 일반적으로 비활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 담거나 타블렛에 압축시킬 수 있다. 경구 요법 투여 목적을 위해, 활성 화합물을 부형제와 함께 혼입시키고 타블렛, 트로키 또는 캡슐의 형태로 사용할 수 있다. 경구용 조성물은 또한 구강세척의 용도를 위해 유동성 담체를 사용하여 제조할 수 있고, 여기서 유동성 담체 내 화합물은 경구적으로 적용되고 행구고 뱉어지거나 삼켜질 수 있다. 약학적으로 적합한 결합제 및/또는 보조 물질이 조성물의 일부로 포함될 수 있다. 타블렛, 알약, 캡슐, 트로키 등은 임의의 다음 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 미세결정 셀룰로스, 검 트라가칸스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 전분 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로티스와 같은 윤활제; 콜로이드성 이산화 규소와 같은 유동화제; 수크로스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 페퍼민트, 메틸살리실산염 또는 오렌지 착향료와 같은 향미제.

[0423] 흡입 투여를 위해, 화합물은 적합한 압축가스, 예를 들어 이산화탄소를 함유하는 압력 용기 또는 디스펜서에서 에어로졸 스프레이 또는 네블라이저 형태로 전달된다.

[0424] 진신 투여는 또한 경점막 또는 경피적 수단에 의한 것일 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과될 장벽

에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 이 분야에 알려져 있고, 예를 들어, 경점막 투여를 위한 세제, 담즙염 및 푸시딘산 유도체가 포함된다. 경점막 투여는 코분무기 또는 좌약을 사용하여 수행할 수 있다. 경피 투여를 위해, 활성 화합물을 이 분야에 일반적으로 알려진 바와 같은 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제형화한다.

[0425] 화합물은 직장 전달을 위해 좌약(예를 들어, 코코아 버터 및 기타 글리세리드와 같은 기존 좌약 베이스와 함께) 또는 자연 관장제로 제형화될 수 있다.

[0426] 일 실시형태에서, 조절제는 이식 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형과 같이, 신체로부터의 빠른 소거에서 화합물을 보호할 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세트산염, 폴리안하이드리드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오쏘에스터 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 고분자가 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백해야 한다. 또한 상기 재료들은 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals 주식회사로부터 상업적으로 얻을 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 단일클론성 항체와 함께 감염된 세포에 표적화된 리포솜을 포함)은 약학적으로 허용가능한 담체로도 사용될 수 있다. 이들은 당업자에게 알려진 방법, 예를 들어 미국 특허 제4,522,811호에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0427] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 경구 또는 비경구 조성물을 투여량 단위의 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 명세서에서 사용된 투여량 단위는 투여될 대상체를 위한 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭한다; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 함유함. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 사항은 활성 화합물의 독특한 특성, 달성하고자 하는 특정 치료 효과, 및 개체의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 배합하는 분야의 고유 제형에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0428] 이러한 화합물의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물에서 예를 들어 LD50(집단의 50% 치사 투여량) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 투여량)을 결정하기 위한 표준 약학적 절차에 따라 결정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 투여량 비율은 치료 지수이고 이는 비율 LD50/ED50으로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 갖는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 감염되지 않은 세포의 잠재적 손상을 최소화하기 위해 감염된 조직 부위로 화합물을 표적화하여 부작용을 줄이는 전달 시스템의 설계에 주의를 기울여야 한다.

[0429] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에 사용하기 위해 투여량의 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 적은 독성을 갖거나 독성없이 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 적용된 투약 형태 및 활용된 투여 경로에 따른 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 임의의 화합물에 대해, 치료적 유효량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 추정될 수 있다. 세포 배양에서 결정된 것과 같은 IC50(즉, 증상의 절반-최대 저해를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 일회량이 동물 모델에 처방될 수 있다. 이러한 정보는 인간에 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하기 위해 사용될 수 있다. 혈장의 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

[0430] 상기 기술된 조절제는 상기 물질을 암호화하는 발현가능한 핵산의 형태로 투여될 수 있다. 이러한 핵산 및 이를 함유하는 조성물 또한 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 분자를 벡터에 삽입하여 유전자 요법 벡터로 사용할 수 있다. 유전자 요법 벡터는 예를 들어 정맥내 주사, 국소 투여(미국 특허 제5,328,470호 참조) 또는 정위 주사(예를 들어, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057 참조)로 대상체에 전달할 수 있다. 유전자 요법 벡터의 약학적 제제는 허용가능한 희석제 내 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있거나, 유전자 전달 매개체가 끼워진 서방출 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 벡터가 재조합 세포로부터 온전히 생산될 수 있는 경우, 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 약학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

[0431] 약제학적 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서 내에 포함될 수 있다.

[0432] VIII. 물질의 투여

[0433] 본 발명의 면역 조절 물질은 면역 세포 매개 면역 반응을 증가 또는 억제하기 위해 생체 내 약학적 투여에 적합하고 생물학적으로 적합한 형태로 대상체에 투여된다. "생체 내 투여에 적합하고 생물학적으로 적합한 형태"는 임의의 독성 효과가 단백질의 치료 효과보다 중요한 투여되는 단백질의 형태를 의미한다. 용어 "대상"은 면역 반응을 유도할 수 있는 살아있는 생물, 예를 들어 포유동물을 포함하는 것으로 의도된다. 대상체의 예시로

인간, 개, 고양이, 마우스, 래트 및 이들의 트랜스제닉 종이 포함된다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 물질의 투여는 물질 단독을 치료적 활성량으로 포함하는 임의의 약학적 형태 또는 약학적으로 허용가능한 담체와 조합으로 될 수 있다.

- [0434] 본 발명의 치료 조성물의 치료적 활성량의 투여는 원하는 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간에 대해 효과적인 양으로 정의된다. 예를 들어, 물질의 치료적 활성량은 질환의 상태, 개체의 연령, 성별 및 무게, 및 개체에서 원하는 반응을 유도하는 펩타이드의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 투약 요법은 최적 치료적 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 여러 분할 투여량을 매일 투여하거나 투여량을 치료 상황의 긴급성에 따라 비례적으로 감소시킬 수 있다.
- [0435] 본 발명의 물질 또는 본 명세서에 기술된 물질은 주사(피하, 정맥내 등), 경구 투여, 흡입, 경피 적용 또는 직장 투여와 같은 편리한 방식으로 투여될 수 있다. 투여 경로에 따라, 화합물을 불활성화할 수 있는 효소, 산 및 기타 천연 상태의 작용으로부터 화합물을 보호하는 재료로 활성 화합물을 코팅할 수 있다. 예를 들어, 비경구적 투여와 다르게 물질을 투여하기 위해, 물질의 불활성화를 막는 재료와 함께 물질을 코팅하거나, 이 재료와 함께 공동투여하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0436] 물질은 적절한 담체, 희석제 또는 보조제에 존재하는 상태로 개체에 투여될 수 있거나, 효소 저해제와 함께 또는 리포솜과 같은 적절한 담체에 존재하는 상태로 공동투여될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 희석제는 염수 및 수성 완충 용액을 포함한다. 보조제는 가장 넓은 의미로 사용되며 인터페론과 같은 임의의 면역 자극 화합물을 포함한다. 본 명세서에서 고려되는 보조제는 레조르시놀, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르 및 n-헥사데실 폴리 에틸렌 에테르와 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 효소 저해제는 췌장 트립신 저해제, 다이이소프로필플 루오로포스페이트(DEEP) 및 트라시롤을 포함한다. 수중-유중-수 에멀전뿐만 아니라 기존 리포솜을 포함한다 (Sterna *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).
- [0437] 물질은 또한 비경구적으로 또는 복강내로 투여될 수 있다. 분산물은 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 내에, 및 오일 내에 분산시켜 제조할 수 있다. 통상의 보관 및 사용 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 차단하는 방부제를 함유할 수 있다.
- [0438] 주사 용도에 적합한 물질의 약제학적 조성물은 멸균 주사 용액 또는 분산물의 즉석 제조를 위해 멸균 수성 용액 (수용성인 경우) 또는 분산물 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에서 조성물은 바람직하게는 무균이고 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동성이 있어야 한다. 바람직하게는 제조 및 보관 조건에서 안정하고 박테리아 및 곰팡 이와 같은 미생물의 오염 작용으로부터 보호될 것이다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리 세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매 체일 수 있다. 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산물인 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용으로 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등으로 달성할 수 있다. 많은 경우, 조성물에 등장제, 예 를 들어 당류, 만니톨과 같은 폴리알코올, 솔비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물의 장기간 흡수는 조성물에 흡수지연제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시켜 달성할 수 있 다.
- [0439] 멸균 주사 용액은 필요한 경우 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 이의 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 본 발명의 물질(예를 들어, 항체, 펩타이드, 융합 단백질 또는 소분자)을 혼입시키고 여과 멸균하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산물은 활성 화합물을 기본 분산 매체와 상기 열거된 것들에서 필요한 성분을 함유하는 멸 균 매개체에 혼입시켜 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 물질 과 원하는 임의의 부가 성분의 분말을 미리 멸균-여과한 이의 용액으로부터 진공 건조 및 동결-건조로 수득하는 것이다
- [0440] 상기 설명한 바와 같이, 물질이 적절하게 보호될 때, 단백질은 예를 들어, 비활성 희석제 또는 융합가능한 식용 담체와 함께 경구적으로 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용된 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매체, 코팅제, 항생제 및 항진균제, 등장성 및 흡수성 지연제 등을 포함한다. 약학적 활성화 물질을 위한 이러한 매질 및 물질의 사용은 이 분야에 잘 알려져 있다. 임의의 기존 매질 또는 물질이 활성 화 합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 약제학적 조성물에서 이들의 사용이 고려된다. 보충적 활성 화합물 또 한 조성물에 포함될 수 있다.
- [0441] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 비경구적 조성물을 투여량 단위 형태로 제형화하는 것이 특히 유리하

다. 본 명세서에 사용된 "투여량 단위 형태"는 치료할 포유동물 대상체를 위한 단위의 투여량으로써 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭한다; 각 단위는 필요한 약학적 담체와 관련하여 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 함유함. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 사항은 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성하고자 하는 특정 치료 효과, 및 (b) 개체의 민감도 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 배합하는 분야의 고유 제한에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존한다.

[0442] 일 실시형태에서, 본 발명의 물질은 항체이다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 항체의 치료적 유효량(즉, 유효적 투여량)은 약 0.001 내지 30mg/kg 체중, 바람직하게는 약 0.01 내지 25mg/kg 체중, 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 20mg/kg 체중, 및 보다 바람직하게는 약 1 내지 10mg/kg, 2 내지 9mg/kg, 3 내지 8mg/kg, 4 내지 7mg/kg 또는 5 내지 6mg/kg 체중의 범위이다. 당업자는 질환 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 일반적인 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 필요한 투여량에 영향을 미칠 수 있음을 인식할 것이다. 또한, 항체의 치료적 유효량으로 대상체를 치료하는 것은 단일 치료를 포함할 수 있거나, 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 예시에서, 대상은 약 0.1 내지 20mg/kg 체중 사이 범위에서, 약 1 내지 10주 사이, 바람직하게는 2 내지 8주 사이, 보다 바람직하게는 약 3 내지 7주 사이, 보다 바람직하게는 약 4, 5 또는 6주 동안의 주당 1회 항체로 치료된다. 또한 치료에 사용되는 항체의 유효 투여량은 특정 치료 과정에 걸쳐 증가하거나 감소할 수 있다고 인식될 것이다. 진단 분석 결과로 인해 투여량이 변화할 수 있다.

[0443] 위에서 설명한 바와 같이, 일부 실시형태에서, 투여 물질은 세포-기반이다. 세포-기반 물질은 대상 숙주에 대한 면역적합성 관계를 가지며 임의의 이러한 관계가 본 발명에 따른 사용을 위해 고려된다. 예를 들어, 입양 T 세포와 같은 세포는 동계유전적일 수 있다. 용어 "동계유전적"은, 특히 항원 또는 면역학적 반응에 관해, 유전적으로 동일한 같은 종으로부터 유래한 상태, 같은 종에서 기원된 상태, 또는 같은 종의 구성원이 되는 상태를 지칭할 수 있다. 이는 일치하는 MHC 유형을 갖는 같은 쌍을 포함한다. 따라서, "동계유전적 이식"은 세포를 공여자로부터 공여자와 유전적으로 동일하거나 일치하는 유해한 면역원성 반응(예를 들어, 본 명세서에 기술된 면역학적 스크린 결과의 해석에 반하는 것)없이 이식이 가능하도록 충분히 면역학적으로 적합한 수용자에게 전이시키는 것을 지칭한다.

[0444] 세포를 같은 대상체로부터 얻어 같은 대상체에 이식한 경우 동계유전적 이식은 "자가"일 수 있다. "자가 이식"은 대상 자신의 세포 또는 기관의 수집 및 재주입 또는 이식을 지칭한다. 자가 세포의 배타적 또는 보충적 사용은 세포를 숙주에 되돌리는 투여의 많은 유해한 효과, 특히 이식 편대 숙주 반응을 배제하거나 감소시킬 수 있다.

[0445] 같은 종의 다른 구성원이지만 유해한 면역원성 반응을 피하는 충분히 일치된 주 조직적합성 복합체(MHC) 항원을 갖는 구성원으로부터 세포를 얻어 이식하는 경우 동계유전적 이식은 "일치된 동종이계적"일 수 있다. MHC 불일치의 정도를 결정하는 것은 이 분야에 알려지고 사용되는 표준 시험에 따라 달성할 수 있다. 예를 들어, 이식 생물학에서 중요한 것으로 확인된 인간의 적어도 6개의 주요 MHC 유전자 카테고리가 있다. HLA-A, HLA-B, HLA-C는 HLA 클래스 I 단백질을 암호화하는 반면 HLA-DR, HLA-DQ 및 HLA-DP는 HLA 클래스 II 단백질을 암호화한다. 다수의 HLA 대립유전자 또는 변이체가 인간 개체군에서 발견되고 개체 사이의 이들 군의 차이점이 이식된 세포에 대한 면역 반응의 강도와 관련이 있는 것과 같이, 이들 각 군 내의 유전자는 고도로 다형성이다. MHC 일치 정도를 결정하는 표준 방법은 HLA-B 및 HLA-DR, 또는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-DR 군 내의 대립유전자를 검사하는 것이다. 따라서, 시험은 2 또는 3의 HLA 군 내에 각각 적어도 4, 심지어는 5 또는 6의 MHC 항원으로 이루어질 수 있다. 혈청학적 MHC 검사에서, 항체와 반응하는 특정 MHC 항원의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 각 HLA 항원 유형에 대한 항체를 하나의 대상(예를 들어, 공여자)의 세포와 반응시킨다. 이것은 다른 대상(예를 들어, 수용자)의 반응성 프로파일과 비교된다. MHC 항원과 항체의 반응은 전형적으로 항체를 세포와 세포 용해를 유도하기 위해 첨가하는 보충물과 항온처리하는 방법(즉, 림프구독성 시험)으로 결정된다. 이 반응을 시험하고 반응에서 용해된 세포의 양에 따라 등급화한다(예를 들어, 문헌[Mickelson and Petersdorf (1999) *Hematopoietic Cell Transplantation*, Thomas, E. D. et al. eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, Mass.] 참조). 다른 세포-기반 분석은 표지된 항체를 사용한 유세포분석 또는 효소 연결 면역분석(ELISA)를 포함한다. MHC 유형을 결정하기 위한 분자적 방법이 잘 알려져 있으며 일반적으로 HLA 단백질을 암호화하는 특이적 유전자 서열을 검출하기 위한 합성 탐침 및/또는 프라이머를 사용한다. 특정 HLA 유형과 관련된 제한효소 단편 길이 다형성을 검출하기 위한 혼성화 탐침으로 합성 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있다(Vaughn (2002) *Method. Mol. Biol. MHC Protocol*. 210:45-60). 대안적으로, HLA 서열을 증폭하기 위해(예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 또는 절찰 연쇄 반응으로) 프라이머가 사용될 수 있고, 이의 산물을 직접적인 DNA 시퀀싱, 제한효소 단편 다형성

분석(RFLP) 또는 일련의 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프라이머(SSOP)와 혼성화되는 것으로 추가 시험할 수 있다(Petersdorf *et al.* (1998) *Blood* 92:3515-3520; Morishima *et al.* (2002) *Blood* 99:4200-4206; 및 Middleton and Williams (2002) *Method. Mol. Biol. MHC Protocol.* 210:67-112).

[0446] 이식되는 세포와 대상체의 세포의 정의된 좌위(전형적으로 근친교배에 의한 단일 좌위와 같이)가 다른 경우, 동계유전적 이식은 "유사유전적"일 수 있다. 용어 "유사유전적"은 같은 종으로부터 유래하는 것, 같은 종에서 기원되는 것, 또는 같은 종의 구성원이 되는 것을 지칭하며, 여기서 구성원은 작은 유전적 영역, 전형적으로 단일 유전적 좌위(즉, 단일 유전자)를 제외하고 유전적으로 동일하다. "유사유전적 이식"은 세포 또는 기관을 공여자로부터 단일 유전적 좌위를 제외하고 공여자와 유전적으로 동일한 수용자에 전이시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, CD45는 여러 대립유전적 형태에 존재하며 CD45.1 또는 CD45.2 대립유전자 버전이 발현되는지가 다른 유사유전적 마우스주가 존재한다.

[0447] 반대로, "불일치 동종이계적"은 전형적으로 유해한 면역원성 반응을 배제하기에 충분한 정의된 MHC 항원 수의 혈청학적 또는 분자적 분석과 같은 이 분야에 사용되는 표준 분석법으로 결정되는 것으로서 동일하지 않은 주조직적합성 복합체(MHC) 항원(즉, 단백질)을 갖는 같은 종으로부터 유래되는 것, 같은 종에서 기원되는 것, 또는 같은 종의 구성원이 되는 것을 지칭한다. "부분적 불일치"는 구성원들 사이, 전형적으로 공여자와 수용자의 사이에 시험된 MHC 항원의 부분적 일치 지칭한다. 예를 들어, "절반 불일치"는 시험된 MHC 항원의 50%가 두 구성원 사이에 다른 MHC 항원 유형을 보이는 것을 지칭한다. "전체" 또는 "완전" 불일치는 시험된 모든 MHC 항원이 두 구성원 사이에서 다른 것을 지칭한다.

[0448] 유사하게, 대조적으로, "이종"은 다른 종으로부터 유래되는 것, 다른 종에서 기원되는 것, 또는 다른 종의 구성원이 되는 것, 예를 들어, 인간과 설치류, 인간과 돼지, 인간과 침팬지 등을 지칭한다. "이종 이식"은 세포 또는 기관을 공여자로부터 공여자와 다른 종의 수용자에 전이시키는 것을 지칭한다.

[0449] 추가로, 세포는 단일 근원 또는 복수의 근원으로부터(예를 들어, 단일 대상 또는 복수의 대상체로부터) 얻을 수 있다. 복수는 적어도 둘(예를 들어, 하나를 초과)을 지칭한다. 또 다른 실시형태에서, 비-인간 포유동물은 마우스이다. 관심대상 세포 유형이 얻어지는 동물은 성체, 신생체(예를 들어, 48시간령 미만), 미성숙체 또는 자궁내 개체일 수 있다. 관심대상 세포 유형은 원발 암세포, 암 줄기세포, 확립된 암 세포주, 불멸화 원발 암세포 등일 수 있다. 특정 실시형태에서, 숙주 대상체의 면역 체계는 이식되는 암세포에 면역학적으로 적합하도록 조작되거나 선택될 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 인간 암세포에 적합하도록 하기 위해 대상체를 "인간화"할 수 있다. 용어 "면역-시스템 인간화"는 숙주 동물로부터 거부당하지 않고 생존하여, 인간 조혈 및 숙주 동물의 후천적 및 선천적 면역성이 재구성되도록 하는, 인간 HSC 계통 세포 및 인간 후천성 및 선천성 면역 세포를 포함하는 마우스와 같은 동물을 지칭한다. 후천성 면역 세포는 T 세포 및 B 세포를 포함한다. 선천성 면역 세포는 대식세포, 과립구(호염구, 호산구, 호중구), DC, NK 세포 및 비만세포를 포함한다. 대표적인, 비제한적 예시로 SCID-hu, Hu-PBL-SCID, Hu-SRC-SCID, NSG(NOD-SCID IL2r-감마(널(null))) 결핍 선천적 면역 체계, B 세포, T 세포 및 사이토카인 신호전달), NOG(NOD-SCID IL2r-감마(절단됨(truncated))), BRG(BALB/c-Rag2(널)IL2r-감마(널)), 및 H2DRG(Stock-H2d-Rag2(널)IL2r-감마(널)) 마우스(예를 들어, 문헌[Shultz *et al.* (2007) *Nat. Rev. Immunol.* 7:118; Pearson *et al.* (2008) *Curr. Protocol. Immunol.* 15:21; Brehm *et al.* (2010) *Clin. Immunol.* 135:84-98; McCune *et al.* (1988) *Science* 241:1632-1639], 미국 특허 제7,960,175호, 및 미국 공개 특허 제2006/0161996호 참조)뿐만 아니라, Rag1(B 및 T 세포 결핍), Rag2(B 및 T 세포 결핍), TCR 알파(T 세포 결핍), perforin(세포 독성 기능 결핍 cD8+ T 세포), FoxP3(기능성 CD4+ T 조절 세포 결핍), IL2rg, 또는 Prf1과 같은 면역-관련 유전자 관련 널 돌연변이뿐만 아니라, 인간 면역 세포의 효과적인 생착을 가능하게 하고/하거나 마우스와 같은 면역저하 동물의 구획-특이적 모델을 제공하는 HHLA2, KIR3DL3, TMIGD2, PD-1, PD-L1, Tim3, 및/또는 2B4의 돌연변이 또는 녹아웃(예를 들어, PCT 공개 WO2013/062134 참조)이 포함된다. 추가로, NSG-CD34+(NOD-SCID IL2r-감마(널) CD34+) 인간화 마우스가 마우스와 같은 동물 모델에서 인간 유전자 및 종양 활성을 연구하는데 유용하다.

[0450] 본 명세서에 사용된, 생물학적 재료 근원으로부터 "얻은"은 공여자로부터 생물학적 재료의 근원을 수집하거나 분할하는 임의의 기존 방법을 의미한다. 예를 들어, 생물학적 재료는 고형 종양, 말초 혈액 또는 제대혈 시료와 같은 혈액 시료, 또는 골수 또는 양수와 같은 다른 체액으로부터 얻을 수 있다. 이러한 시료를 얻는 방법은 기술자에게 잘 알려져 있다. 본 발명에서, 시료는 신선한 것(즉, 얼리지 않고 공여자로부터 얻은 것)일 수 있다. 또한, 시료는 추가로 확장 전에 관련없거나 원치않는 성분이 제거되도록 처리된 것일 수 있다. 시료는 또한 보관된 스톱에서 얻을 수 있다. 예를 들어, 세포주 또는 말초 혈액 또는 제대혈과 같은 체액의 경우, 시료를 이러한 세포주 또는 체액의 극저온 또는 다르게 보관된 은행으로부터 회수할 수 있다. 이러한 시료는 임의의 적합한

공여자로부터 얻을 수 있다.

- [0451] 얻어진 세포 집단은 바로 사용하거나 나중에 사용하기 위해 냉동할 수 있다. 냉동 보존을 위한 다양한 배지 및 프로토콜이 이 분야에 알려져 있다. 일반적으로, 동결 배지는 약 5 내지 10%의 DMSO, 10 내지 90%의 혈청 알부민 및 50 내지 90%의 배양 배지를 포함한다. 세포를 냉동하는데 유용한 다른 첨가물로, 예시이며 제한하는 것은 아닌, 트레할로스와 같은 이당류(Scheinon *et al.* (2004) *Bone Marrow Transplant.* 34:531-536), 또는 헤타스타치(즉, 하이드록시에틸 전분)와 같은 혈장증량제가 포함된다. 일부 실시형태에서, 인산염 완충 식염수와 같은 등장 완충 용액이 사용될 수 있다. 예시적인 냉동보존 조성물은 4% HSA, 7.5% 다이메틸 술폭시드(DMSO) 및 2% 헤타스타치를 함유하는 세포-배양 배지를 갖는다. 냉동보존을 위한 다른 조성물 및 방법이 이 분야에 잘 알려져 있고 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Broxmeyer *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:645-650] 참조). 세포는 약 -135℃의 최종 온도에서 보관된다.
- [0452] 세포는 0.1×10^6 , 0.2×10^6 , 0.3×10^6 , 0.4×10^6 , 0.5×10^6 , 0.6×10^6 , 0.7×10^6 , 0.8×10^6 , 0.9×10^6 , 1.0×10^6 , 5.0×10^6 , 1.0×10^7 , 5.0×10^7 , 1.0×10^8 , 5.0×10^8 , 또는 그 이상, 또는 사이의 임의의 범위 또는 사이의 임의의 값, 세포/대상 체중 킬로그램으로 투여될 수 있다. 이식되는 세포의 수는 주어진 시간 내 원하는 생착 수준을 기반으로 조정될 수 있다. 일반적으로, 1×10^5 내지 약 1×10^9 세포/체중kg, 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 세포/체중kg 또는 약 1×10^7 세포/체중kg, 또는 필요에 따라 그 이상의 세포를 이식할 수 있다. 일부 실시형태에서, 평균 크기 마우스에 대해 적어도 약 0.1×10^6 , 0.5×10^6 , 1.0×10^6 , 2.0×10^6 , 3.0×10^6 , 4.0×10^6 또는 5.0×10^6 총 세포의 이식이 효과적이다.
- [0453] 세포는 본 명세서에 기술된 바와 같은 예를 들어 주입과 같은 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있다. 세포는 또한 다른 항암제 처리 전에, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0454] 투여는 이 분야에 일반적으로 알려진 방법을 사용하여 달성할 수 있다. 세포를 포함하는 물질은 직접 주사 또는 이 분야에서 사용되는 임의의 다른 방법, 예를 들어 혈관내, 뇌내, 비경구, 복강내, 정맥내, 경막외, 척추내, 흉골내, 관절내, 활액내, 초내, 동맥내, 심장내 또는 근육내 투여를 포함하지만 이로 제한되지는 않는 방법으로 원하는 위치에 도입될 수 있다. 예를 들어, 관심대상 대상체에 이식된 세포를 다양한 경로로 생착할 수 있다. 이러한 경로는 정맥내 투여, 피하 투여, 특정 조직에 투여(예를 들어, 초점 이식), 대퇴골수강에 주사, 비장에 주사, 태아간의 신장 캡슐 하 투여 등을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 암 백신은 종양내로 또는 피하로 대상체에 주사된다. 세포는 1회 주입 또는 원하는 효과를 생성하기에 충분한 정의된 시간에 걸쳐 연속 주입을 통해 투여될 수 있다. 이식, 생착 평가 및 이식된 세포의 마커 표현형 분석을 위한 예시적인 방법들이 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Pearson *et al.* (2008) *Curr. Protoc. Immunol.* 81:15.21.1-15.21.21; Ito *et al.* (2002) *Blood* 100:3175-3182; Traggiai *et al.* (2004) *Science* 304:104-107; Ishikawa *et al.* *Blood* (2005) 106:1565-1573; Shultz *et al.* (2005) *J. Immunol.* 174:6477-6489; 및 Holyoake *et al.* (1999) *Exp. Hematol.* 27:1418-1427] 참조).
- [0455] 세포-기반 요법 및 줄기세포의 입양 세포 전달, 암 백신 및 세포-기반 요법 등과 같이, 둘 또는 그 이상의 세포 유형을 조합 및 투여할 수 있다. 예를 들어, 입양 세포-기반 면역요법은 본 발명의 세포-기반 요법과 조합될 수 있다. 잘 알려진 입양 세포-기반 면역요법 양식으로 방사선 조사된 자가 또는 동종 종양 세포, 종양 용해물 또는 세포자멸사성 종양 세포, 항원-제시 세포-기반 면역요법, 수지상 세포-기반 면역요법, 입양 T 세포 전달, 입양 CAR T 세포 요법, 자가 면역 강화 요법(AIET), 암 백신 및/또는 항원 제시 세포가 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 이러한 세포-기반 면역요법은 면역 반응을 추가로 조절하는 하나 이상의 유전자 산물을 발현시키기 위해, 예를 들어 GM-CSF와 같은 사이토카인 발현 및/또는 종양-관련 항원(TAA), 예를 들어 Mage-1, gp-100 등의 항원을 발현시키기 위해 추가로 변경될 수 있다. 다른 세포 유형에 대한 본 명세서에 기술된 암 백신 내 암 세포의 비율은 1:1일 수 있지만, 원하는 임의의 양으로 조절될 수 있다(예를 들어, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1, 5:1, 5.5:1, 6:1, 6.5:1, 7:1, 7.5:1, 8:1, 8.5:1, 9:1, 9.5:1, 10:1, 또는 그 이상).
- [0456] 이식된 세포의 생착은 종양 부피, 사이토카인 수준, 투여 시간, 이식 후 하나 이상의 시점에 대상체로부터 얻은 관심대상 세포의 유세포분석 등과 같지만 이로 제한되지는 않는, 임의의 다양한 방법으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일을 기다리는 시간-기반 분석은 종양 수확 시간을 특징지을 수 있다. 임의의 이러한 메트릭스는 항

암 면역요법에 대한 반응 상의 변수의 효과를 결정하기 위한 잘 알려진 파라미터에 따라 조정될 수 있는 변수이다. 추가로, 이식되는 세포는 사이토카인, 세포외 매트릭스, 세포 배양 지지체 등과 같은 다른 물질과 공동-이식될 수 있다.

[0457] 다음 실시예를 통해 본 발명을 추가로 설명하나, 본 발명이 이 실시예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개특허출원의 내용뿐만 아니라, 도면은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0458] IX. 대상체

[0459] 일 실시형태에서, HHLA2 항체 요법의 효능에 대한 예측 가능성이 결정된 대상은 포유동물(예를 들어, 마우스, 인간화 마우스, 래트, 영장류, 인간이 아닌 포유동물, 가축, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말 등)이고, 바람직하게는 인간이다. 다른 실시형태에서, 대상은 암의 동물 모델이다. 예를 들어, 동물 모델은 인간 유래 암의 동소적 이종이식 동물 모델일 수 있다.

[0460] 본 발명 방법의 다른 실시형태에서, 대상은 화학요법, 방사선 요법, 표적화 요법 및/또는 항-면역 관문 요법과 같은 치료를 받지 않은 대상체가다. 또 다른 실시형태에서, 대상은 화학요법, 방사선 요법, 표적화 요법 및/또는 항-면역 관문 요법과 같은 치료를 받은 대상체가다.

[0461] 특정 실시형태에서, 대상은 암 또는 전-암성 조직 제거 수술을 받은 대상체가다. 다른 실시형태에서, 암성 조직은 제거되지 않고, 예를 들어 암성 조직은 생명에 필수적인 조직 내 또는 수술 절차가 환자에 상당한 해칠 끼칠 위험이 있는 영역과 같은 신체의 수술 불가 영역에 위치할 수 있다.

[0462] 본 발명의 방법은 본 명세서에 기술된 바와 같은 대상체의 많은 다른 암의 HHLA2 저해제 요법에 대한 반응을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0463] X. 시료 수집, 준비 및 분리

[0464] 일부 실시형태에서, 대상체로부터의 시료 내 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)를 미리 결정된 대조군(표준) 시료와 비교한다. 대상체로부터의 시료는 전형적으로 암세포 또는 조직과 같은 질환 조직으로부터의 것이다. 대조군 시료는 같은 대상체로부터의 것 또는 다른 대상체로부터의 것일 수 있다. 대조군 시료는 전형적으로 정상의, 비-질환 시료이다. 하지만, 질환의 단계 결정 또는 치료 효능 평가를 위한 경우와 같은, 일부 실시형태에서, 대조군 시료는 질환 조직으로부터의 것일 수 있다. 대조군 시료는 다수의 다른 대상체로부터의 시료의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터의 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)를 미리 결정된 수준과 비교할 수 있다. 이 미리 결정된 수준은 전형적으로 정상 시료로부터 얻는다. 본 명세서에 기술된, "미리 결정된" 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)은, 단지 예시로, 치료를 위해 선택될 수 있는 대상체를 평가하기 위해(예를 들어, 게놈 돌연변이 수 및/또는 DNA 복구 유전자의 비-기능적 단백질을 유발하는 게놈 돌연변이 수 기반), 항-HHLA2 항체 요법에 대한 반응을 평가하기 위해, 및/또는 추가적인 항암 요법과 병행하는 항-HHLA2 항체 요법에 대한 반응을 평가하기 위해 사용되는 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)일 수 있다. 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)는 암이 있거나 없는 환자의 집단에서 결정될 수 있다. 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)는, 모든 환자에 동등하게 적용가능한, 단수일 수 있거나, 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)는 환자의 특정 하위 집단에 따라 달라질 수 있다. 대상체의 연령, 체중, 키 및 다른 요인이 개체의 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)에 영향을 미칠 수 있다. 추가로, 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성은 각 대상체에 대해 개별적으로 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 결정 및/또는 비교되는 양은 절대 측정치를 기반으로 한다.

[0465] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법에서 결정 및/또는 비교되는 양은 비율(예를 들어, 치료 전 대 치료 후의 바이오마커 카피 수, 수준, 및/또는 활성, 스파이크 또는 인공 대조군에 상대적인 이러한 바이오마커의 측정치, 하우스키핑 유전자의 발현에 상대적인 이러한 바이오마커의 측정치 등)과 같은 상대적인 측정치를 기반으로 한다. 예를 들어, 상대적인 분석은 처리-전 바이오마커 측정치를 처리-후 바이오마커 측정치와 비교한 비율을 기반으로 할 수 있다. 처리-전 바이오마커 측정치는 항암 요법의 개시 전 임의의 시간에 만들어진 것일 수 있다. 처리-후 바이오마커 측정치는 항암 요법의 개시 이후 임의의 시간에 만들어진 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 처리-후 바이오마커 측정치는 항암 요법의 개시 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20주 또는 그 이상 후(지속적인 모니터링을 위해 무기한으로 더 길어질 수 있음)에 만들어진 것이다. 치료는 하나 이상의 항-HHLA2 항체 단독 또는 다른 항암제, 예를 들어 면역 관문 저해제와의 조합을 포

함하는 치료 요법과 같은 항암 요법을 포함할 수 있다.

- [0466] 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)은 임의의 적합한 표준일 수 있다. 예를 들어, 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)은 환자 선택을 위해 평가되는 같은 또는 다른 사람으로부터 얻을 수 있다. 일 실시형태에서, 미리 결정된 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)은 같은 환자의 이전 평가로부터 얻을 수 있다. 이러한 방식에서, 환자 선택의 진행은 시간에 걸쳐 모니터링될 수 있다. 추가로, 대상체가 인간인 경우, 대조군은 다른 사람 또는 여러 사람, 예를 들어 선택된 인간 군의 평가로부터 얻을 수 있다. 이러한 방식에서, 선택을 위해 평가되는 사람의 선택 범위는 적합한 다른 사람, 예를 들어 유사하거나 같은 상태를 겪고 있는 사람 및/또는 같은 인종 군의 사람과 같은 관심대상 사람과 유사한 상태에 있는 다른 사람과 비교될 수 있다.
- [0467] 본 발명의 일부 실시형태에서 미리 결정된 수준에서 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치(들)의 변화는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 또는 5.0배 또는 그 이상, 또는 이들을 포함하는, 이들 사이의 임의의 범위이다. 처리-전 바이오마커 측정치를 처리-후 바이오마커 측정치와 비교한 비율을 기반으로 하는 것과 같이, 측정치가 상대적인 변화를 기반으로 하는 경우 이러한 것으로 값은 동등하게 적용된다.
- [0468] 생물학적 시료는 핵산 및/또는 단백질을 포함하는 체액 시료, 세포 시료 또는 조직 시료를 포함하여 환자의 다양한 근원으로부터 수집될 수 있다. "체액"은 신체로부터 배설되거나 분비되는 액뿐만 아니라 일반적으로 그렇지 않은 액(예를 들어, 양수, 수양액, 담즙, 혈액 및 혈장, 뇌척수액, 귀지 및 이구, 쿠파액 또는 사정전 액, 유미, 유미즙, 대변, 여성 사출액, 간질액, 세포내액, 림프, 생리, 모유, 점액, 흉막액, 고름, 타액, 피지, 정액, 혈청, 땀, 활액, 눈물, 소변, 질윤활액, 유리체액, 구토물)을 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 대상 및/또는 대조군 시료는 세포, 세포주, 조직학적 슬라이드, 파라핀 포매된 조직, 생검, 전혈, 유두 흡입물, 혈청, 혈장, 구강 스크레이프, 타액, 뇌척수액, 소변, 대변 및 골수로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 시료는 혈청, 혈장 또는 소변이다. 다른 실시형태에서, 시료는 혈청이다.
- [0469] 시료는 장시간에 걸쳐(예를 들어, 일, 주, 월, 매년, 격년 등의 순서로 한번 이상) 반복적으로 개체로부터 수집될 수 있다. 시간에 걸쳐 개체로부터 다수의 시료를 얻는 것은 조기 검출로부터 결과를 확인하기 위해 및/또는 예를 들어 질환의 진행, 약물 치료 등의 결과로 인한 생물학적 패턴의 변화를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상 시료는 본 발명에 따라 매달, 매 2달, 또는 1, 2 또는 3달 간격의 조합으로 취하고 모니터링될 수 있다. 추가로, 시간에 걸쳐 얻어진 대상체의 바이오마커의 양 및/또는 활성 측정치는 모니터링 기간 동안 서로뿐만 아니라 정상 대조군의 것과 편리하게 비교될 수 있으며, 이에 따라 장기 모니터링을 위한 내부적, 또는 개인적, 대조군으로서 대상 자신의 값을 제공한다.
- [0470] 수집된 시료의 유형 및/또는 바이오마커 측정치의 분석에 따라, 시료 준비 및 분리에는 임의의 절차가 포함될 수 있다. 이러한 절차에는, 단지 예시적으로, 농축, 희석, pH 조정, 고농도 폴리펩타이드의 제거(예를 들어, 알부민, 감마 글로불린 및 트랜스페린 등), 보존제 및 교정제의 첨가, 단백질분해효소 저해제의 첨가, 변성제의 첨가, 시료의 탈염, 및 시료 단백질의 농축, 지질의 추출 및 정제가 포함된다.
- [0471] 시료 준비는 또한 다른 단백질(예를 들어, 담체 단백질)에 비-공유 복합으로 결합하는 분자를 분리할 수 있다. 이 과정은 특정 담체 단백질(예를 들어, 알부민)에 결합한 분자를 분리하거나, 단백질 변성, 예를 들어 산을 사용하고 담체 단백질을 제거하는 것을 통해 모든 담체 단백질로부터 결합 분자를 방출하는 것과 같은 보다 일반적인 과정을 사용할 수 있다.
- [0472] 시료로부터 원치않는 단백질(예를 들어, 고농도, 정보가 없는, 또는 검출할 수 없는 단백질)을 제거하는 것은 고 친화성 시약, 고분자량 필터, 초원심분리 및/또는 전기투석을 사용하여 달성될 수 있다. 고 친화성 시약에는 고농도 단백질에 선택적으로 결합하는 항체 또는 다른 시약(예를 들어, 압타머)이 포함된다. 시료 준비에는 또한 이온 교환 크로마토그래피, 금속 이온 친화 크로마토그래피, 겔 여과, 소수성 크로마토그래피, 크로마토포커싱, 흡착 크로마토그래피, 등전점 포커싱 및 관련 기술이 포함될 수 있다. 분자량 필터에는 크기 및 분자량을 기반으로 분자를 나누는 막이 포함된다. 이러한 필터는 역삼투, 나노여과, 한외여과 및 마이크로여과를 추가로 사용할 수 있다.
- [0473] 초원심분리는 시료에서 원치않는 폴리펩타이드를 제거하는 방법이다. 초원심분리는 입자의 침강을 광학 시스템으로 모니터링하면서 약 15,000 내지 60,000rpm으로 시료를 원심분리하는 것이다. 전기투석은 잠재적 구배의 영향 하에서 이온이 반투막을 통해 하나의 용액에서 다른 용액으로 전이되는 방법에서 전기막 또는 반투막을 사용

하는 방법이다. 전기투석에 사용되는 막은 양전하 또는 음전하를 갖는 이온을 선택적으로 운반하는 능력, 반대 전하의 이온을 거부하는 능력, 또는 종이 크기 및 전하를 기반으로 반투막을 통해 이동하는 것을 가능하게 하는 능력을 가질 수 있으므로, 이는 전기투석을 전해질의 농축, 제거 또는 분리에 유용하도록 만든다.

[0474] 본 발명에서 분리 및 정제는 모세관 전기영동(예를 들어, 모세관 또는 칩 상에서) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 모세관, 컬럼 또는 칩 상에서)와 같은 이 분야에 알려진 임의의 방법을 포함할 수 있다. 전기영동은 전기장의 영향 하에서 이온 분자를 분리하는데 사용될 수 있는 방법이다. 전기영동은 겔, 모세관 또는 칩 상의 마이크로채널에서 수행될 수 있다. 전기영동에 사용되는 겔의 예시로 전분, 아크릴아마이드, 폴리에틸렌 옥사이드, 아가로스 또는 이들의 조합이 포함된다. 겔은 가교, 세제 또는 변성제의 첨가, 효소, 항체(친화성 전기영동) 또는 기질(자이모그래피)의 고정화 및 pH 구배의 적용으로 변경될 수 있다. 전기영동에 사용되는 모세관의 예시에는 전기분무와 조화시킨 모세관이 포함된다.

[0475] 모세관 전기영동(CE)은 복잡한 친수성 분자와 고하전된 용질을 분리하는데 바람직하다. CE 기술은 또한 미세유체칩 상에서도 구현될 수 있다. 사용하는 모세관 및 완충액의 유형에 따라, CE는 모세관 띠 전기영동(CZE), 모세관 등전 집중(CIEF), 모세관 등속전기영동(cITP) 및 모세관 전기크로마토그래피(CEC)와 같은 분리 기술로 나뉘어질 수 있다. 전기분무 이온화에 CE 기술을 결합한 실시형태는 휘발성 용액, 예를 들어 휘발성 산 및/또는 염기와 알코올 또는 아세트나이트릴과 같은 유기물을 함유하는 수성 혼합물의 사용을 포함한다.

[0476] 모세관 등속전기영동(cITP)은 분석물이 일정한 속도로 모세관을 통해 이동하지만 그럼에도 불구하고 각각의 이동성에 의해 분리되는 기술이다. 무용액 CE(FSCE)로도 알려진, 모세관 띠 전기영동(CZE)은 분자의 전하에 따라 결정되는 종들의 전기영동 이동성 및 종종 직접적으로 분자의 크기에 비례하는 이동 과정의 분자 조우 마찰 저항의 차이를 기반으로 한다. 모세관 등전 집중(CIEF)은 약-이온화 가능한 양쪽성 분자가 pH 구배 전기영동에 의해 분리될 수 있도록 한다. CEC는 전통적인 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 CE의 하이브리드 기술이다.

[0477] 본 발명에 사용되는 분리 및 정제 기술들은 이 분야에 알려진 임의의 크로마토그래피 방법을 포함한다. 크로마토그래피는 특정 분석물의 차별적인 흡착 및 용리 또는 이동상 및 고정상 사이의 분석물의 분할을 기반으로 할 수 있다. 크로마토그래피의 다른 예시에는 액체 크로마토그래피(LC), 가스 크로마토그래피(GC), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 등이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.

[0478] XI. 바이오마커 폴리펩타이드

[0479] 본 발명의 다른 양상은 바이오마커 단백질 및 이의 생물학적 활성 부분의 사용에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 마커에 상응하는 천연 폴리펩타이드는 세포 또는 조직 근원으로부터 표준 단백질 정제 기술을 사용한 적합한 정제 계획에 따라 단리될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩타이드는 재조합 DNA 기술로 생산된다. 재조합 발현에 대한적으로, 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩타이드는 표준 펩타이드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다.

[0480] 바이오마커 폴리펩타이드의 생물학적 활성 부분은 전장 단백질 보다 적은 아미노산을 포함하지만, 본 명세서에 기술된 바이오마커 단백질 아미노산 서열과 충분히 동일하거나 이로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하며, 전장 단백질에 상응하는 적어도 하나의 활성을 나타내는 폴리펩타이드를 포함한다. 전형적으로, 생물학적 활성 부분은 상응하는 단백질의 적어도 하나의 활성을 갖는 도메인 또는 모티프를 포함한다. 본 발명의 단백질의 생물학적 활성 부분은 예를 들어, 10, 25, 50, 100 또는 그 이상의 아미노산 길이의 폴리펩타이드일 수 있다. 또한, 단백질의 다른 영역이 제거된, 다른 생물학적 활성 부분이 재조합 기술로 제조될 수 있고, 본 발명의 폴리펩타이드의 천연 형태의 기능적 활성 중 하나 이상에 대해 평가될 수 있다.

[0481] 바람직한 폴리펩타이드는 본 명세서에 기술된 핵산 분자에 의해 암호화되는 바이오마커 단백질의 아미노산 서열을 갖는다. 다른 유용한 단백질은 이 서열 중 하나에 실질적으로(예를 들어, 적어도 약 40%, 바람직하게는 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일하며 자연적 대립유전자 변이 또는 돌연변이유발에 따라 아미노산 서열이 다르더라도 상응하는 천연-발생 단백질의 기능적 활성을 보유한다.

[0482] 두 아미노산 서열 또는 두 핵산의 백분율 동일성을 결정하기 위해, 서열을 최적 비교를 위해 정렬한다(예를 들어, 둘째 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 첫째 아미노산 또는 핵산 서열에 갭이 도입될 수 있음). 이후 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 첫째 서열의 위치를 상응하는 둘째 서열의 위치와 같은 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 차지하는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 사이의 백분율 동일성은 서열을 공유하는 동일한 위치의 수의 합

수이다(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 #/위치의 총 # (예를 들어, 겹치는 위치) x100). 일 실시형태에서 두 서열은 같은 길이이다.

[0483] 두 서열 사이의 백분율 동일성을 결정하는 것은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다. 두 서열을 비교하기 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 바람직하지만 비-제한적 예시는 문헌[Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268]의 알고리즘, 문헌[Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877]에서와 같이 변형된 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 통합된다. BLAST 뉴클레오타이드 탐색은 본 발명의 핵산 분자에 상동적인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 점수(score) = 100, 단어길이(wordlength) = 12로 수행할 수 있다. BLAST 단백질 탐색은 본 발명의 단백질 분자에 상동적인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어길이 = 3으로 수행할 수 있다. 비교 목적의 겹쳐 정렬을 얻으려면, 문헌[Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]에 기술된 겹쳐 BLAST를 이용할 수 있다. 대안적으로, PSI-Blast를 분자 사이의 관계를 검출하는 반복 탐색 수행을 위해 사용할 수 있다. BLAST, 겹쳐 BLAST 및 PSI-Blast 프로그램을 사용할 때, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 기본 파라미터가 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참조. 서열의 비교에 유용한 수학적 알고리즘의 바람직하지만 비-제한적인 예시는 문헌[Myers and Miller, (1988) *Comput Appl Biosci.* 4:11-7]의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 부분인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 포함한다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 사용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 12의 겹쳐 길이 패널티 및 4의 겹쳐 패널티를 사용할 수 있다. 국소 서열 유사성 및 정렬의 영역을 확인하기 위한 또 다른 유용한 알고리즘은 문헌[Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448]에 기술된 FASTA 알고리즘이다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 비교하기 위해 FASTA 알고리즘을 사용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표를 예를 들어 2의 *k*-튜플 값과 함께 사용할 수 있다.

[0484] 두 서열 사이의 백분율 동일성은, 겹쳐 허용하거나 허용하지 않고, 상기 기술된 것들과 유사한 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 백분율 동일성 계산에서, 정확하게 일치하는 것 만이 계산된다.

[0485] 본 발명은 또한 바이오마커 단백질에 상응하는 키메라 또는 융합 단백질을 제공한다. 본 명세서에 사용된, "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 이중 폴리펩타이드(즉, 마커에 상응하는 폴리펩타이드와 다른 폴리펩타이드)에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩타이드의 전부 또는 일부(바람직하게는 생물학적 활성 부분)를 포함한다. 융합 단백질에서, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 본 발명의 폴리펩타이드와 이중 폴리펩타이드가 서로 인-프레임 융합됨을 나타내기 위한 것이다. 이중 폴리펩타이드는 본 발명의 폴리펩타이드의 아미노-말단 또는 카복시-말단에 융합될 수 있다.

[0486] 유용한 융합 단백질의 하나로 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩타이드가 GST 서열의 카복시 말단에 융합된 GST 융합 단백질이 있다. 이러한 융합 단백질은 본 발명의 재조합 폴리펩타이드의 정제를 촉진할 수 있다.

[0487] 다른 실시형태에서, 융합 단백질은 이중 신호 서열, 면역글로불린 융합 단백질, 독소 또는 다른 유용한 단백질 서열을 포함한다. 본 발명의 키메라 및 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다. 다른 실시형태에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 기존 기술로 합성할 수 있다. 대안적으로, 후속으로 키메라 유전자 서열을 생성하기 위한 어닐링 및 재-증폭을 할 수 있는 두 연속 유전자 단편 사이에 상보적인 오버행을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[Ausubel *et al.*, 상기 참조] 참조). 또한, 이미 융합 모이어티(예를 들어 GST 폴리펩타이드)를 암호화하는 많은 발현 벡터가 상업적으로 이용가능하다. 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 이러한 융합 모이어티가 본 발명의 폴리펩타이드에 인-프레임 연결되도록 이러한 발현 벡터에 클론화할 수 있다.

[0488] 신호 서열은 분비 단백질 또는 다른 관심대상 단백질의 분비 및 단리를 촉진하기 위해 사용할 수 있다. 신호 서열은 전형적으로 하나 이상의 절단 발생에서 분비되는 동안 일반적으로 성숙 단백질로부터 절단되는 소수성 아미노산 코어로 특징지어진다. 이러한 신호 펩타이드는 분비 경로를 통해 통과될 때 성숙 단백질로부터 신호 서열이 절단되도록 하는 작용 부위를 함유한다. 따라서, 본 발명은 신호 서열을 갖는 기술된 폴리펩타이드뿐만 아니라 신호 서열이 단백질분해적으로 절단된 폴리펩타이드(즉, 절단 산물)에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 신호 서열을 암호화하는 핵산 서열은 보통은 분비되지 않거나 단리하기 어려운 단백질과 같은 관심대상 단백질의 발현 벡터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 발현 벡터로 형질전환된 진핵 숙주로부터 단백질이 분비되도록 하며, 이후 또는 동시에 잘리게 된다. 이후 단백질은 당업계에서 인정된 방법으로 세포 외 배지로부터 쉽게 정제할 수 있다. 대안적으로, GST 도메인과 같은 정제를 촉진하는 서열을 사용하여 신호 서열

을 관심대상 단백질에 연결할 수 있다.

[0489] 본 발명은 또한 본 명세서에 기술된 바이오마커 폴리펩타이드의 변이체에 관한 것이다. 이러한 변이체는 작용제(모방제) 또는 길항제로 기능할 수 있는 변환된 아미노산 서열을 갖는다. 변이체는 돌연변이유발, 예를 들어 불연속 점 돌연변이 또는 결절로 생성할 수 있다. 작용제는 천연 발생 단백질 형태의 생물학적 활성과 실질적으로 동일하거나 일부의 활성을 보유한다. 단백질 길항제는 예를 들어 관심대상 단백질을 포함하는 세포 신호전달 캐스케이드의 다운스트림 또는 업스트림 구성원에 경쟁적 결합하여 자연 발생 단백질 형태의 하나 이상의 활성을 저해할 수 있다. 따라서, 특이적 생물학적 효과를 제한된 기능의 변이체 처리로 유도할 수 있다. 단백질의 천연 발생 형태의 생물학적 활성의 일부를 갖는 변이체로 대상체를 치료하는 것은 단백질의 천연 발생 형태로 치료하는 것에 비해 대상체의 부작용을 더 적게 할 수 있다.

[0490] 작용제(모방제) 또는 길항제로 기능하는 바이오마커 단백질의 변이체는 작용제 또는 길항제 활성을 위한 본 발명 단백질의 돌연변이체, 예를 들어 결절 돌연변이체의 조합 라이브러리를 스크리닝하여 확인할 수 있다. 일 실시형태에서, 다양화된 변이체 라이브러리는 핵산 수준의 조합적 돌연변이유발로 생성하며, 다양화된 유전자 라이브러리에 의해 암호화된다. 다양화된 변이체 라이브러리는 예를 들어 잠재적 단백질 서열의 디제너레이트 세트(degenerate set)가(예를 들어, 과거 디스플레이를 위해) 개별 폴리펩타이드, 또는 대안적으로 더 큰 융합 단백질로서 발현될 수 있는 유전자 서열에 합성 올리고뉴클레오타이드 혼합물을 효소적으로 접합하는 것으로 생성할 수 있다. 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 본 발명의 폴리펩타이드의 잠재적인 변이체 라이브러리를 생산하기 위해 사용될 수 있는 다양한 방법이 있다. 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 이 분야에 알려져 있다(예를 들어, Narang, 1983, *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.*, 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.*, 1984, *Science* 198:1056; Ike *et al.*, 1983 *Nucleic Acid Res.* 11:477 참조).

[0491] 추가로, 본 발명의 마커에 상응하는 폴리펩타이드를 암호화하는 서열의 단편 라이브러리를 변이체의 스크리닝 및 후속 선별을 위한 폴리펩타이드의 다양화 집단을 생성하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, 암호화 서열 단편의 라이브러리는 관심대상 암호화 서열의 이중 가닥 PCR 단편을 분자 당 약 1회의 니킹(nicking)만이 발생하는 조건 하에서 뉴클레아제로 처리하고, 이중 가닥 DNA를 변성시키고, 다른 Nick 생성물로부터의 센스/안티센스 페어를 포함할 수 있는 이중 가닥 DNA의 형태로 DNA를 복원하고, S1 뉴클레아제 처리로 개질된 듀플렉스로부터 단일 가닥 부분을 제거하고, 생성된 단편 라이브러리를 발현 벡터에 결합하여 생성할 수 있다. 이 방법에 따라, 관심대상 단백질의 다양한 크기의 아미노 말단 및 내부 단편을 암호화하는 발현 라이브러리가 유도될 수 있다.

[0492] 점 돌연변이 또는 결절로 만들어진 조합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하고, 선택된 특성을 갖는 유전자 산물을 위해 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 여러 기술들이 이 분야에 알려져 있다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술로, 높은 처리량 분석이 가능하며, 가장 널리 사용되는 기술은 전형적으로 복제가 가능한 발현 벡터에 유전자 라이브러리를 클로닝하는 것, 생성된 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질전환하는 것, 및 원하는 활성의 검출이 산물이 검출된 유전자를 암호화하는 벡터의 단리를 쉽게하는 조건 하에서 조합 유전자를 발현하는 것을 포함한다. 라이브러리에서 기능적 돌연변이체의 빈도를 높이는 기술인, 순환 양상불 돌연변이유발(REM)이 본 발명 단백질의 변이체를 확인하기 위한 스크리닝 분석법과 함께 조합으로 사용될 수 있다(Arkin and Yourvan, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.*, 1993, *Protein Engineering* 6(3):327- 331).

[0493] 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는, 본 발명의 하나 이상의 바이오마커에 상응하는 단리된 폴리펩타이드 또는 이의 단편(또는 이러한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산)은, 이 분야에 잘 알려진 방법에 따른 다클론성 및 단일클론성 항체 제조 표준 기술을 사용하여, 면역원에 결합하는 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용할 수 있다. 항원성 펩타이드는 적어도 8개의 아미노산 잔기를 포함하고 각각의 전장 분자에 존재하는 에피토프를 포함하여 펩타이드에 대한 항체가 각각의 전장 분자와 특이적 면역 복합체를 형성하도록 한다. 바람직하게는, 항원성 펩타이드는 적어도 10개의 아미노산 잔기를 포함한다. 일 실시형태에서, 이러한 에피토프는 마우스 또는 인간과 같은 하나의 종으로부터의 주어진 폴리펩타이드 분자에 대해 특이적일 수 있다(즉, 종간에 보존되지 않은 폴리펩타이드 분자의 영역에 걸쳐 있는 항원성 펩타이드를 면역원으로 사용하고; 이러한 비 보존된 잔기는 본 명세서에 제공된 것과 같은 정렬을 사용하여 결정할 수 있다).

[0494] 일 실시형태에서, 항체는 실질적으로 특이적으로 HHLA2에 결합하고 예를 들어 이의 HHLA2 수용체(예를 들어, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3)와의 상호작용을 가로막아 이의 기능을 저해 또는 차단한다. 다른 실시형태에서, 항체는 실질적으로 특이적으로 하나 이상의 HHLA2 수용체에 결합하고 예를 들어 HHLA2 및 적어도 하나의 이의 수용

체와의 상호작용을 가로막아 이의 기능을 저해 또는 차단한다.

[0495] 예를 들어, 폴리펩타이드 면역원은 전형적으로 적합한 대상(예를 들어, 토끼, 염소, 마우스, 인간화 마우스 또는 다른 포유동물)을 면역원으로 면역화하여 항체를 제조하기 위해 사용된다. 적절한 면역원성 제제는 예를 들어 면역 반응을 생성하는 재조합 발현 또는 화학적으로 합성된 분자 또는 이의 단편을 함유할 수 있다. 제제는 프로인트의 완전 또는 불완전 보조제와 같은 보조제, 또는 유사 면역자극 물질을 더 포함할 수 있다. 면역원성 제제로 적합한 대상체를 면역화하는 것은 여기에 함유된 항원성 펩타이드에 반응하는 다클론성 항체를 유도한다.

[0496] 다클론성 항체는 위에서 설명한 바와 같이 폴리펩타이드 면역원으로 적합한 대상체를 면역화하여 제조할 수 있다. 면역화 대상체의 다클론성 항체 역가는 고정된 폴리펩타이드를 사용한 효소결합면역흡착분석법(ELISA)와 같은 표준 기술로 시간에 걸쳐 모니터링할 수 있다. 원하는 경우, 항원에 대한 항체를 포유동물로부터(예를 들어, 혈액으로부터) 단리할 수 있고 IgG 분획을 얻기 위해 단백질 A 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 기술로 추가 정제할 수 있다. 면역화 이후 적절한 시간에, 예를 들어 항체 역가가 가장 높을 때, 항체-생산 세포를 대상체로부터 얻고 하이브리도마 기술(Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497에 최초로 기술됨)(또한 Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75 참조), 보다 최근의 인간 B 세포 하이브리도마 기술(Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), EBV-하이브리도마 기술(Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 또는 트라이오마 기술과 같은 표준 기술로 단일클론성 항체를 제조하기 위해 사용할 수 있다. 단일클론성 항체 하이브리도마를 생산하는 기술은 잘 알려져 있다(일반적으로 Kenneth, R. H. in *단일클론성 Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36 참조). 간단히 설명하면, 불멸화 세포주(전형적으로 골수종)를 위에서 설명한 바와 같이 면역원으로 면역화한 포유동물로부터의 림프구(전형적으로 비장세포)와 융합하고, 폴리펩타이드 항원에 결합하는, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 단일클론성 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하기 위해 생성된 하이브리도마 세포의 배양 상등액을 스크리닝한다. 일부 실시형태에서, 면역화는 관심대상 표적 항원의 네킨아웃 세포 또는 동물 숙주(예를 들어, 면역화 이전에 항원을 생산하지 않는)에서 실시한다.

[0497] 림프구와 불멸화 세포주의 융합에 사용되는 잘 알려진 많은 프로토콜 중 임의의 프로토콜이 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커에 대한 단일클론성 항체를 생성하기 위해 적용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al.* (1977) 상기 참조; Lerner (1981) 상기 참조; Kenneth (1980) 상기 참조] 참조). 또한, 당업자는 이러한 유용한 방법의 다양한 변형이 있음을 인식할 것이다. 전형적으로, 불멸화 세포주(예를 들어, 골수종 세포주)는 림프구와 같은 포유동물 종으로부터 유래하는 것이다. 예를 들어, 쥐와 하이브리도마는 본 발명의 면역원성 제제로 면역화한 마우스로부터의 림프구를 불멸화 마우스 세포주와 융합하여 만들 수 있다. 바람직한 불멸화 세포주는 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 함유하는 배양 배지("HAT 배지")에 민감한 마우스 골수종 세포주이다. 여러 골수종 세포주, 예를 들어 P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 또는 Sp2/O-Ag14 골수종 세포주 중 임의의 세포주가 표준 기술에 따른 융합 상대로 사용될 수 있다. 이들 골수종 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, 메릴랜드주 록빌 소재)에서 이용가능하다. 전형적으로, 폴리에틸렌 글리콜("PEG")을 사용하여 HAT-민감성 마우스 골수종 세포를 마우스 비장세포에 융합시킨다. 이후 융합되지 않고 비생산적으로 융합된 골수종 세포를 죽이는 HAT 배지를 사용하여 융합으로 생성되는 하이브리도마 세포를 선별한다(융합되지 않은 비장세포는 형질전환되지 않았기 때문에 몇일 후 죽음). 본 발명의 단일클론성 항체를 생산하는 하이브리도마 세포는 예를 들어 표준 ELISA 분석법을 사용하여 주어진 폴리펩타이드에 결합하는 항체를 위한 하이브리도마 배양 상등액 스크리닝으로 검출된다.

[0498] 단일클론성 항체-분비 하이브리도마를 제조하기 위한 대안으로, 폴리펩타이드에 결합하는 면역글로불린 라이브러리 구성원을 단리하기 위해 적절한 폴리펩타이드로 재조합 조합 면역글로불린 라이브러리(예를 들어, 항체 파지 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝하여 상기 기술된 폴리펩타이드 중 하나에 특이적인 단일클론성을 확인 및 단리할 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는 키트를 상업적으로 이용할 수 있다(예를 들어, Pharmacia의 *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; 및 Stratagene의 *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). 추가적으로, 특히 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는데 사용할 수 있는 방법 및 시약의 예시는 예를 들어 문헌[Ladner *et al.* 미국 특허

제5,223,409호; Kang *et al.* 국제 공개 특허 제WO 92/18619호; Dower *et al.* 국제 공개 특허 제WO 91/17271호; Winter *et al.* 국제 공개 특허 제WO 92/20791호; Markland *et al.* 국제 공개 특허 제WO 92/15679호; Breitling *et al.* 국제 공개 특허 제WO 93/01288호; McCafferty *et al.* 국제 공개 특허 제WO 92/01047호; Garrard *et al.* 국제 공개 특허 제WO 92/09690호; Ladner *et al.* 국제 공개 특허 제WO 90/02809호; Fuchs *et al.* (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; 및 McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554]에서 찾을 수 있다.

- [0499] 비-인간 또는 인간 항체(예를 들어 래트 항-마우스/항-인간 항체)의 구조적 특징은 하나 이상의 HHLA2, HHLA2 수용체, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3에 결합하는 것과 같은 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 특성을 보유하는 구조적으로 연관된 인간 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 다른 기능적 특성은 경쟁 ELISA 분석법에서 본래 알려진 비-인간 또는 인간 항체의 결합을 저해하는 것을 포함한다.
- [0500] 일부 실시형태에서, HHLA2, HHLA2 수용체, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3 중 하나 이상에 결합할 수 있고 저해/차단할 수 있는 단일클론성 항체로, 가변 도메인이 본 명세서에 나타난 또는 공개적으로 이용가능한 중쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄를 포함하는 항체가 제공된다.
- [0501] 유사하게, HHLA2, HHLA2 수용체, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3 중 하나 이상에 결합할 수 있고 저해/차단할 수 있는 단일클론성 항체로, 가변 도메인이 본 명세서에 나타난 또는 공개적으로 이용가능한 경쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또한 제공된다.
- [0502] HHLA2, HHLA2 수용체, TMIGD2 및/또는 KIR3DL3 중 하나 이상에 결합할 수 있고 저해/차단할 수 있는 단일클론성 항체로, 가변 도메인이 본 명세서에 나타난 또는 공개적으로 이용가능한 중쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄를 포함하고; 가변 도메인이 본 명세서에 나타난 또는 공개적으로 이용가능한 경쇄 가변 도메인 CDR의 군과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 동일한 서열을 갖는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체 또한 제공된다.
- [0503] 숙련된 기술자는 이러한 백분율 상동성이 주어진 CDR 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 보존된 아미노산 치환의 도입과 동등하고 이로 달성될 수 있다는 것에 주목할 것이다.
- [0504] 추가적으로, 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는, 본 발명의 바이오마커에 대한 완전한 인간 항체가 만들어질 수 있다. 완전한 인간 항체는, 예를 들어 문헌[Hogan, *et al.*, "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory]에 따라, 인간 면역글로불린 유전자 트랜스제닉 마우스에서 만들어질 수 있다. 간단히 설명하면, 트랜스제닉 마우스를 정제된 면역원으로 면역화한다. 비장 세포를 수집하고 하이브리도마를 생산하기 위해 골수종 세포에 융합한다. 면역원에 결합하는 항체를 생산하는 능력을 기반으로 하이브리도마를 선별한다. 완전한 인간 항체는 인간에서 면역원성을 감소시킬 것이다.
- [0505] 일 실시형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체이다. 이중특이적 항체는 단일 항체 폴리펩타이드 내에 2종의 다른 항원에 대한 결합 부위를 갖는다. 항원 결합은 동시 또는 순차적일 수 있다. 트라이오마 및 하이브리드 하이브리도마는 이중특이적 항체를 분비할 수 있는 세포주의 예시이다. 하이브리드 하이브리도마 또는 트라이오마에 의해 생산되는 이중특이적 항체의 예시가 미국 특허 제4,474,893호에 개시되어 있다. 이중특이적 항체는 화학적 방법(Staerz *et al.* (1985) *Nature* 314:628, 및 Perez *et al.* (1985) *Nature* 316:354)과 하이브리도마 기술(Staerz and Bevan (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1453, 및 Staerz and Bevan (1986) *Immunol. Today* 7:241)로 제작되었다. 이중특이적 항체는 미국 특허 제5,959,084호에도 기술되어 있다. 이중특이적 항체의 단편은 미국 특허 제5,798,229호에 기술되어 있다.
- [0506] 또한, 하이브리도마 또는 다른 항체를 만드는 다른 세포를 융합하여 헤테로하이브리도마를 만든 다음 두 항체 모두를 생산하고 공동-조립하는 클론을 식별함으로써 이중특이적 물질을 생성할 수 있다. 이들은 또한 완전한 면역글로불린 사슬 또는 Fab 및 Fv 서열과 같은 이의 부분의 화학적 또는 유전적 접합으로 생성할 수 있다. 항

체 성분은 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커의 폴리펩타이드 또는 이의 단편에 결합할 수 있다. 일 실시형태에서, 이중특이적 항체는 폴리펩타이드 또는 이의 단편 및 이의 천연 결합 상대 또는 이의 단편 모두에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0507] 본 발명의 다른 양상에서, 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커의 활성에 대항하기 위해 펩타이드 또는 펩타이드 모방체가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 각각의 전장 단백질에 대한 조절 물질로 기능하는 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커의 변이체는 길항제 활성에 대한 돌연변이체, 예를 들어 결절 돌연변이체의 조합 라이브러리 스크리닝으로 확인할 수 있다. 일 실시형태에서, 변이체의 다양화 라이브러리는 핵산 수준의 조합 돌연변이유발로 생성되고 다양화 유전자 라이브러리에 의해 암호화된다. 변이체의 다양화 라이브러리는 예를 들어 잠재적 폴리펩타이드 서열의 디제너레이트 세트가 폴리펩타이드 서열의 세트를 함유하는 개별 폴리펩타이드로 발현될 수 있는 유전자 서열에 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 효소적으로 결합하여 생산할 수 있다. 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 폴리펩타이드 변이체의 라이브러리를 생성하기 위해 사용할 수 있는 다양한 방법들이 있다. 자동화 DNA 합성기에서 디제너레이트 유전자 서열의 화학적 합성을 수행하고, 이후 합성 유전자를 적절한 발현 벡터에 결합할 수 있다. 유전자 디제너레이트 세트를 사용하면 잠재적 폴리펩타이드 서열의 원하는 세트를 암호화하는 모든 서열을, 하나의 혼합물로, 제공할 수 있다. 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477 참조).

[0508] 추가로, 주어진 폴리펩타이드의 변이체 스크리닝 및 후속 선별을 위한 폴리펩타이드 단편의 다양화 집단을 생성하기 위해 폴리펩타이드 암호화 서열의 단편 라이브러리가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 암호화 서열 단편의 라이브러리는 폴리펩타이드 당 약 한번만 니킹이 발생하는 조건 하에서 폴리펩타이드 암호화 서열의 이중 가닥 PCR 단편을 뉴클레아제로 처리하고, 이중 가닥 DNA를 변성시키고, 다른 Nick 산물로부터의 센스/안티센스 페어를 포함할 수 있는 이중 가닥 DNA 형태로 DNA를 복원하고, S1 뉴클레아제를 처리하여 개질된 듀플렉스로부터 단일 가닥 부분을 제거하고, 생성된 단편 라이브러리를 발현 벡터에 결합하여 생성할 수 있다. 이 방법에 따라, 폴리펩타이드의 다양한 크기의 N-말단, C-말단 및 내부 단편을 암호화하는 발현 라이브러리가 유도될 수 있다.

[0509] 점 돌연변이 또는 결절로 만들어진 조합 라이브러리의 유전자 산물을 스크리닝하고, 선택된 특성을 갖는 유전자 산물을 위해 cDNA 라이브러리를 스크리닝하기 위한 여러 기술들이 이 분야에 알려져 있다. 이러한 기술들은 폴리펩타이드의 조합 돌연변이유발로 생성되는 유전자 라이브러리의 신속한 스크리닝에 적합하다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하기 위한 기술로, 높은 처리량 분석이 가능하며, 가장 널리 사용되는 기술은 전형적으로 복제가능한 발현 벡터에 유전자 라이브러리를 클로닝하는 것, 생성된 벡터 라이브러리로 적절한 세포를 형질전환하는 것, 및 원하는 활성의 검출이 산물이 검출된 유전자를 암호화하는 벡터의 단리를 쉽게하는 조건 하에서 조합 유전자를 발현하는 것을 포함한다. 라이브러리에서 기능적 돌연변이체의 빈도를 높이는 기술인, 순환 양상 돌연변이유발(REM)이 관심대상 변이체를 확인하기 위한 스크리닝 분석법과 함께 조합으로 사용될 수 있다(Arkin and Youvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delagrave *et al.* (1993) *Protein Eng.* 6(3):327-331). 일 실시형태에서, 다양화 폴리펩타이드 라이브러리를 분석하기 위해 세포 기반 분석을 활용할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터 라이브러리를 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커를 통상적으로 합성하는 세포주에 형질주입할 수 있다. 이후 형질주입된 세포를 배양하여 전장 폴리펩타이드 및 특정 돌연변이가 폴리펩타이드가 생산되도록 하고 세포 상등액 내 전장 폴리펩타이드 활성 상 돌연변이의 발현 효과를 예를 들어 여러 기능적 분석법 중 임의의 방법으로 검출할 수 있다. 이후 저해 또는 대안적으로 전장 폴리펩타이드 활성의 상승을 기록한 세포로부터 플라스미드 DNA를 회수하고, 개별 클론을 추가로 특징지을 수 있다.

[0510] 보다 안정한 펩타이드를 생성하기 위해 폴리펩타이드 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산을 체계적으로 같은 유형의 D-아미노산으로 치환(예를 들어, L-라이신의 위치에 D-라이신)하는 방법을 사용할 수 있다. 추가로, 관심대상 폴리펩타이드 아미노산 서열 또는 실질적으로 동일한 서열 변이를 포함하는 한정된 펩타이드는 이 분야에 알려진 방법, 예를 들어, 펩타이드를 환형화하는 분자내 이황화 연결 형성이 가능하도록 내부 시스테인 잔기를 추가하여 생성할 수 있다(Rizo and Gierasch (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61:387, 본 명세서에 참조로 포함됨).

[0511] 본 명세서에 기술된 아미노산 서열은 당업자가 펩타이드 서열에 상응하는 폴리펩타이드 및 이의 서열 변이체를 생산할 수 있도록 할 것이다. 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 종종 더 큰 폴리펩타이드의 일부로서 펩타이드 서

열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하여 이러한 폴리펩타이드를 생산할 수 있다. 대안적으로, 이러한 펩타이드는 화학적인 방법으로 합성할 수 있다. 재조합 숙주에서의 이중 단백질 발현, 폴리펩타이드의 화학적 합성, 및 시험관 내 번역을 위한 방법들이 이 분야에 잘 알려져 있으며 문헌[Maniatis *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger and Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* 91:501; Chaiken I. M. (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11: 255; Kaiser *et al.* (1989) *Science* 243:187; Merrifield, B. (1986) *Science* 232:342; Kent, S. B. H. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:957; 및 Offord, R. E. (1980) *Semisynthetic Proteins*, Wiley Publishing] (이들 문헌은 본 명세서에 참조로 포함됨)에도 기술되어 있다.

[0512]

전형적으로 직접 화학적 합성으로 펩타이드를 생산할 수 있다. 펩타이드를 비펩타이드 모이어티가 N-말단 및/또는 C-말단에 공유 결합으로 부착된 변형 펩타이드로 생산할 수 있다. 특정 바람직한 실시형태에서, 카복시-말단 또는 아미노-말단 중 하나, 또는 모두가 화학적으로 변형된다. 가장 일반적인 말단 아미노 및 카복시 그룹의 변형은 각각 아세틸화 및 아마이드화이다. 아실화(예를 들어, 아세틸화) 또는 알킬화(예를 들어, 메틸화)와 같은 아미노-말단 변형 및 아마이드화와 같은 카복시-말단 변형뿐만 아니라, 환형화를 포함하는 다른 말단 변형이 본 발명의 다양한 실시형태에 포함될 수 있다. 특정 아미노-말단 및/또는 카복시-말단 변형 및/또는 코어 서열에 대한 펩타이드 확장은 안정성 향상, 잠재력 및/또는 효능 증가, 혈청 단백질분해효소에 대한 저항성, 원하는 약동학적 특성 등과 같은 유리한 물리적, 화학적, 생화학적 및 약리학적 특성을 제공할 수 있다. 본 명세서에 나타난 펩타이드는 예를 들어 환자의 공동자극을 변화시켜 질환을 치료하기 위해 치료적으로 사용될 수 있다.

[0513]

펩티도미메틱(Fauchere (1986) *Adv. Drug Res.* 15:29; Veber and Freidinger (1985) *TINS* p.392; 및 Evans *et al.* (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229, 이 문헌은 본 명세서에 참조로 포함됨)은 일반적으로 컴퓨터 분자 모델링의 도움으로 개발된다. 동등한 치료적 또는 예방적 효과를 위해 치료적으로 유용한 펩타이드에 구조적으로 유사한 펩타이드 미메틱을 사용할 수 있다. 일반적으로, 펩티도미메틱은 패러다임 폴리펩타이드(즉, 생물학적 또는 약리적 활성을 갖는 폴리펩타이드)에 구조적으로 유사하지만, 이 분야에 알려진, 추가로 다음의 참고문헌에 기술된 방법에 의해 -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-(시스 및 트랜스), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, 및 -CH₂SO- 로 이루어진 군으로부터 선택된 연결로 선택적으로 치환된 하나 이상의 펩타이드 연결을 갖는다: 문헌[Spatola, A. F. in "*Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*" Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (March 1983), Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications" (general review); Morley, J. S. (1980) *Trends Pharm. Sci.* pp. 463-468 (general review); Hudson, D. *et al.* (1979) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185 (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola, A. F. *et al.* (1986) *Life Sci.* 38:1243-1249 (-CH₂-S); Hann, M. M. (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 307-314 (-CH-CH-, 시스 및 트랜스); Almquist, R. G. *et al.* (1990) *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White, C. *et al.* (1982) *Tetrahedron Lett.* 23:2533 (-COCH₂-); Szelke, M. *et al.* *European Appln.* EP 45665 (1982) CA: 97:39405 (1982)(-CH(OH)CH₂-); Holladay, M. W. *et al.* (1983) *Tetrahedron Lett.* (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-); 및 Hruby, V. J. (1982) *Life Sci.* (1982) 31:189-199 (-CH₂-S-)]; 이들 각각 본 명세서에 참조로 포함됨. 특히 바람직한 비-펩타이드 연결은 -CH₂NH- 이다. 이러한 펩타이드 미메틱은 예를 들어 보다 경제적인 생산, 우수한 화학적 안정성, 향상된 약리적 특성(반감기, 흡수, 잠재력, 효능 등), 변화된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성), 감소된 항원성 등을 포함하는 폴리펩타이드 실시형태를 뛰어 넘는 상당한 이점을 가질 수 있다. 펩티도미메틱의 표지로는 일반적으로 정량적 구조-활성 데이터 및/또는 분자 모델링을 통해 예측되는 펩티도미메틱 상의 비-간섭 위치(들)에 직접적 또는 스페이서(예를 들어, 아마이드기)를 통해 하나 이상의 표지를 공유 부착하는 것이 포함된다. 이러한 비-간섭 위치는 일반적으로 펩티도미메틱이 치료 효과를 위해 결합하는 마크로폴리펩타이드(들)과 직접 접촉을 형성하지 않는 위치이다. 펩티도미메틱의 유도체화(예를 들어, 표지)는 펩티도미메틱의 원하는 생물학적 또는 약리적 활성을 실질적으로 방해해서는 안된다.

[0514]

예를 들어 본 명세서에 기술된 또는 표 1에 나열된 바이오마커와 이의 천연 결합 상대 사이의 상호작용을 조절(향상시키거나 저해)할 수 있는 소분자 또한 본 발명에 포함된다. 본 발명의 소분자는 공간적으로 지정가능한 병렬 고체상 또는 용액상 라이브러리; 디콘볼루션이 필요한 합성 라이브러리 방법; '원-비드 원-컴파운드' 라이브러리 방법; 및 친화 크로마토그래피 선별을 사용하는 합성 라이브러리 방법(Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)을 포함하는 이 분야에 알려진 조합 라이브러리 방법의 많은 접근법 중 임의의 방법을 사용하여 얻을 수 있다.

- [0515] 분자 라이브러리의 합성 방법의 예시는 이 분야에서, 예를 들어 문헌[DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; 및 Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233]에서 찾을 수 있다.
- [0516] 화합물의 라이브러리는 용액 내에(예를 들어, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), 또는 비드(Lam (1991) *Nature* 354:82-84), 칩(Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), 박테리아(Ladner USP 5,223,409), 포자(Ladner USP '409), 플라스미드(Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) 또는 파지(Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; 상기 Ladner의 문헌) 상에 존재할 수 있다. 화합물은 세포 기반 또는 비-세포 기반 분석법으로 스크리닝할 수 있다. 화합물은 풀(예를 들어, 각 시험 시료 내 다수의 화합물)로 또는 개별 화합물로 스크리닝할 수 있다.
- [0517] 또한 본 발명은 표 1에 나열된 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 바이오마커의 키메라 또는 융합 단백질에 관한 것이다. 본 명세서에 사용된, "키메라 단백질" 또는 "융합 단백질"은 각 바이오마커에 실질적으로 상동적이지 않은 단백질에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 다른 폴리펩타이드에 작동 가능하게 연결된, 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 융합 단백질은 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커 또는 이의 단편을 포함하는 본 발명의 하나 이상의 바이오마커의 적어도 하나의 생물학적 활성 부분을 포함한다. 융합 단백질에서, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 바이오마커 서열 및 비-바이오마커 서열이 융합과 독립적으로 발현될 때 나타나는 기능을 보존하는 방식으로 서로 인-프레임 융합됨을 나타내기 위한 것이다. "다른" 서열이 바이오마커 서열의 N-말단 또는 C-말단에 각각 융합될 수 있다.
- [0518] 이러한 융합 단백질은 제1 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 제2 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 재조합 발현으로 생산할 수 있다. 이 제2 펩타이드는 선택적으로 제1 펩타이드의 용해성, 친화성, 안정성 또는 원자가를 변경하는 모이어티, 예를 들어 면역글로불린 불변 영역에 해당할 수 있다. 다른 바람직한 실시형태에서, 제1 펩타이드는 생물학적 활성 분자의 일 부분(예를 들어, 폴리펩타이드의 세포외 부분 또는 리간드 결합 부분)으로 이루어진다. 제2 펩타이드는 면역글로불린 불변 영역, 예를 들어 인간 C γ 1 도메인 또는 C γ 4 도메인(예를 들어, 인간 IgC γ 1 또는 인간 IgC γ 4의 힌지, CH2 및 CH3 영역, 예를 들어 Capon *et al.* 미국 특허 제5,116,964호; 제5,580,756호; 제5,844,095호 등 참조, 이들 문헌은 본 명세서에 참조로 포함됨)을 포함할 수 있다. 이러한 불변 영역은 이펙터 기능(예를 들어, Fc 수용체 결합)을 매개하는 영역을 보유할 수 있거나 이펙터 기능이 감소되도록 변경될 수 있다. 생성된 융합 단백질은 독립적으로 발현된 제1 펩타이드에 비교하여 변경된 용해성, 결합 친화성, 안정성 및/또는 원자가(즉, 폴리펩타이드 당 이용가능한 결합 부위의 수)를 가질 수 있고, 단백질 정제 효율을 증가시킬 수 있다. 제조법 기술로 생산된 융합 단백질 및 펩타이드는 단백질 또는 펩타이드가 함유된 세포 및 배지의 혼합물로부터 분리 및 단리할 수 있다. 대안적으로, 단백질 또는 펩타이드가 세포질에 유지될 수 있도록 하고, 세포를 수집, 용해하고, 단백질을 단리할 수 있다. 세포 배양물은 전형적으로 숙주 세포, 배지 및 다른 부산물을 포함한다. 세포 배양을 위한 적합한 배지는 이 분야에 잘 알려져 있다. 단백질 및 펩타이드는 단백질 및 펩타이드를 정제하기 위한 이 분야에 알려진 기술을 사용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포, 또는 둘 모두로부터 단리할 수 있다. 숙주 세포를 형질주입하고 단백질 및 펩타이드를 정제하는 기술이 이 분야에 알려져 있다.
- [0519] 바람직하게, 본 발명의 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기술로 생산한다. 예를 들어, 서로 다른 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 DNA 단편들을 기존 기술, 예를 들어 절찰을 위해 블런트-말단 또는 스테거-말단을 사용하는 것, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소처리, 결합 말단을 적절히 채우는 것, 원치않는 결합을 피하기 위한 알칼라인 포스파타제 처리, 및 효소적 절찰에 따라 인-프레임으로 절찰한다. 다른 실시형태에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 기존 기술로 합성할 수 있다. 대안적으로, 후속으로 키메라 유전자 서열을 생성하기 위한 어닐링 및 재-증폭을 할 수 있는 두 연속 유전자 단편 사이에 상보적인 오버행을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 유전자 단편의 PCR 증폭을 수행할 수 있다(예를 들어, 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992] 참조).
- [0520] 특히 바람직한 Ig 융합 단백질은 면역글로불린 불변 영역(예를 들어, Fc 영역)에 결합된 표 1에 나열된 하나 이상의 바이오마커의 세포외 도메인 부분 또는 가변 영역-유사 도메인을 포함한다. 면역글로불린 불변 영역은 면역글로불린 구조 고유의 이펙터 활성이 감소 또는 제거된 유전적 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 관심대상

폴리펩타이드의 세포의 부분을 암호화하는 DNA를 위치 지정 돌연변이유발, 예를 들어 WO 97/28267에서 교시하는 바와 같은 돌연변이유발로 변형된 인간 IgG γ 1 및/또는 IgG γ 4의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 암호화하는 DNA에 결합할 수 있다.

[0521] 다른 실시형태에서, 융합 단백질은 N-말단에 이중 신호 서열을 함유한다. 특정 숙주 세포에서(예를 들어, 포유 동물 숙주 세포), 폴리펩타이드의 발현 및/또는 분비가 이중 신호 서열의 사용을 통해 증가될 수 있다.

[0522] 본 발명의 융합 단백질을 대상체에서 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용할 수 있다. 이러한 항체를 융합 단백질 각각에 대한 천연 폴리펩타이드를 정제하기 위해, 또는 하나 이상의 바이오마커 폴리펩타이드 또는 이의 단편과 이의 천연 결합 상대(들) 또는 이의 단편(들) 사이의 상호작용을 저해하는 폴리펩타이드를 확인하기 위한 스크리닝 분석에 사용할 수 있다.

[0523] 본 명세서에 기술된 조절 물질(예를 들어, 항체, 소분자, 펩타이드, 융합 단백질 또는 작은 핵산)은 약제학적 조성물에 포함될 수 있고 대상체에 생체 내로 투여될 수 있다. 조성물은 이러한 분자 또는 물질을 단독으로 또는 본 명세서에 기술된 물질들의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 본 명세서에 기술된 "단일 활성 물질"을 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에 따라 이 분야에 알려진 다른 약학적 활성 화합물("제2의 활성 물질")과 결합할 수 있다.

[0524] 표준 재조합 기술의 사용으로 인해 본 명세서에 기술된 바이오마커 핵산 및/또는 바이오마커 폴리펩타이드 분자의 생산 및 사용이 쉬워질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 기술은 바이오마커 폴리펩타이드 또는 이러한 폴리펩타이드의 일부분을 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터, 바람직하게는 발현 벡터를 사용한다. 본 명세서에 사용된, 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 일 유형은 부가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 계통 내에 부가적인 DNA 단편이 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 도입된 숙주 세포에서 자을 복제가 가능하다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주 세포에 도입되면 숙주 세포의 계통 내에 통합되고, 이에 따라 숙주 계통과 함께 복제된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 주로 플라스미드(벡터) 형태이다. 하지만, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는, 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은, 발현 벡터의 다른 형태를 포함하는 것을 의도한다.

[0525] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함한다. 이는 재조합 발현 벡터가, 발현에 사용되는 숙주 세포에 따라 선택되며 발현되는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 것을 의미한다. 재조합 발현 벡터에서, "작동 가능하게 연결된"은 관심대상 뉴클레오타이드 서열이 뉴클레오타이드 서열의 발현이 가능한 방식(예를 들어, 시험관 내 전사/번역 시스템에서 또는 숙주 세포 내에 벡터를 도입한 경우 숙주 세포에서)으로 조절 서열(들)에 연결된다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하도록 의도된다. 이러한 조절 서열은 예를 들어 문헌[Goeddel, *Methods in Enzymology: Gene Expression Technology* vol.185, Academic Press, San Diego, CA (1991)]에 기술되어 있다. 조절 서열에는 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 조직적인 발현을 지시하는 것 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시하는 것(예를 들어, 조직-특이적 조절 서열)이 포함된다. 형질전환할 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 이러한 요인에 따라 발현 벡터를 설계할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 숙주 세포에 도입되어 본 명세서에 기술된 바와 같은 핵산에 의해 암호화되는 융합 단백질을 또는 펩타이드를 포함하는 단백질을 또는 펩타이드를 생산할 수 있다.

[0526] 본 발명에서 사용하기 위한 재조합 발현 벡터는 원핵(예를 들어, 대장균) 또는 진핵 세포(예를 들어, 곤충 세포 {베로바이러스 발현 벡터를 사용하여}, 효모 세포 또는 포유동물 세포)에서 본 발명의 마커에 해당하는 폴리펩타이드를 발현하기 위해 설계될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 상기 Goeddel의 문헌에서 추가로 논의된다. 대안적으로, 재조합 발현 벡터는 시험관 내에서, 예를 들어 T7 프로모터 조절 서열 및 T7 중합효소를 사용하여 전사 및 번역될 수 있다.

[0527] 원핵생물에서의 단백질 발현은 융합 또는 비-융합 단백질의 발현을 지시하는 구성적 또는 유도가능한 프로모터를 함유하는 벡터를 사용하여 대장균에서 가장 자주 수행한다. 융합 벡터는 암호화 단백질에, 일반적으로 재조합 단백질의 아미노 말단에, 다수의 아미노산을 부가한다. 이러한 융합 벡터는 전형적으로 1) 재조합 단백질의 발현을 증가시키기 위해; 2) 재조합 단백질의 용해성을 높이기 위해; 및 3) 친화 정제에서 리간드로 작용하여 재조합 단백질의 정제를 돕기 위한 3가지 목적으로 사용된다. 종종, 융합 발현 벡터에서, 융합 단백질의 정제

이후에 재조합 단백질을 융합 모이어티로부터 분리할 수있도록 하기 위해 융합 모이어티와 재조합 단백질의 접합 부위에 단백질분해성 절단 부위를 도입한다. 이러한 효소, 및 이의 동종 인식 서열은 Factor Xa, 트롬빈 및 엔테로키나제를 포함한다. 전형적인 융합 발현 벡터는 표적 재조합 단백질에 각각 글루타치온 S-전달효소(GST), 말토스 E 결합 단백질 또는 단백질 A를 융합하는 pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988, *Gene* 67:31-40), pMAL(New England Biolabs, 매사추세츠주 베벌리 소재) 및 pRIT5(Pharmacia, 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 포함한다.

- [0528] 적합한 유도가능한 비-융합 대장균 발현 벡터의 예시로는 pTrc(Amann *et al.*, 1988, *Gene* 69:301-315) 및 pET 11d(Studier *et al.*, p. 60-89, In *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* vol.185, Academic Press, San Diego, CA, 1991)가 포함된다. pTrc 벡터로부터의 표적 바이오마커 핵산 발현은 하이브리드 trp-lac 융합 프로모터로부터의 숙주 RNA 중합효소 전사에 의존한다. pET 11d 벡터로부터의 표적 바이오마커 핵산 발현은 공동-발현되는 바이러스 RNA 중합효소(T7 gn1)로 매개되는 T7 gn10-lac 융합 프로모터로부터의 전사에 의존한다. 이 바이러스 중합효소는 lacUV 5 프로모터의 전사 조절 하에서 T7 gn1 유전자를 보유하는 내재 프로파지로부터 숙주 균주 BL21(DE3) 또는 HMS174(DE3)에 의해 제공된다.
- [0529] 대장균에서 재조합 단백질 발현을 최대화하는 하나의 전략은 재조합 단백질을 단백질분해적으로 자르는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 단백질을 발현하는 것이다((Gottesman, p. 119-128, In *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990). 다른 전략은 발현 벡터에 삽입되는 핵산의 핵산 서열을 변경하여 각 아미노산에 대한 개별 코돈이 대장균에서 우선적으로 사용되는 것이 되도록 하는 것이다(Wada *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). 본 발명의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기술로 달성할 수 있다.
- [0530] 다른 실시형태에서, 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 에스 세레비시아(*S. cerevisiae*)에서의 발현 벡터의 예시로 pYepSec1(Baldari *et al.*, 1987, *EMBO J.* 6:229-234), pMFa(Kurjan and Herskowitz, 1982, *Cell* 30:933-943), pJRY88(Schultz *et al.*, 1987, *Gene* 54:113-123), pYES2(Invitrogen Corporation, 캘리포니아주 샌디에고 소재) 및 pPicZ(Invitrogen Corp, 캘리포니아주 샌디에고 소재)가 포함된다.
- [0531] 대안적으로, 발현 벡터는 베컬로바이러스 발현 벡터이다. 배양된 곤충 세포(예를 들어, Sf 9 세포)에서 단백질을 발현하는데 이용가능한 베컬로바이러스 벡터로는 pAc 시리즈(Smith *et al.*, 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈(Lucklow and Summers, 1989, *Virology* 170:31-39)가 포함된다.
- [0532] 또 다른 실시형태에서, 포유동물 발현 벡터를 사용하여 본 발명의 핵산을 포유동물 세포에서 발현시킨다. 포유동물 발현 벡터의 예시로는 pCDM8(Seed, 1987, *Nature* 329:840) 및 pMT2PC(Kaufman *et al.*, 1987, *EMBO J.* 6:187-195)가 포함된다. 포유동물 세포에서 사용하는 경우, 발현 벡터의 조절 기능은 대개 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 일반적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 원숭이 바이러스 40에서 유래한다. 원핵 및 진핵 세포 모두를 위한 다른 적합한 발현 시스템에 대해서는 상기 Sambrook *et al.*의 문헌의 16장 및 17장을 참고할 수 있다.
- [0533] 다른 실시형태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 바람직하게는 특정 세포 유형에서 핵산의 발현을 지시할 수 있다(예를 들어, 핵산의 발현을 위해 조직-특이적 조절 요소를 사용함). 조직-특이적 조절 요소는 이 분야에 알려져 있다. 적합한 조직-특이적 프로모터의 비-제한적 예시로는 알부민 프로모터(간-특이적; Pinkert *et al.*, 1987, *Genes Dev.* 1:268-277), 림프구-특이적 프로모터(Calame and Eaton, 1988, *Adv. Immunol.* 43:235-275), 특히 T 세포 수용체 및 면역글로불린의 프로모터(Winoto and Baltimore, 1989, *EMBO J.* 8:729-733 및 Banerji *et al.*, 1983, *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore, 1983, *Cell* 33:741-748), 뉴런-특이적 프로모터(예를 들어, 뉴로필라멘트 프로모터; 문헌[Byrne and Ruddie, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477]), 췌장-특이적 프로모터(Edlund *et al.*, 1985, *Science* 230:912-916), 및 젓샘-특이적 프로모터(예를 들어, 유청 프로모터; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 제264,166호)가 포함된다. 발달적-조절 프로모터, 예를 들어 젓과 혹스(hox) 프로모터(Kessel and Gruss, 1990, *Science* 249:374-379) 및 α -페토프로틴 프로모터(Camper and Tilghman, 1989, *Genes Dev.* 3:537-546) 또한 포함된다.
- [0534] 본 발명은 또한 발현 벡터에 안티센스 방향으로 클론화된 DNA 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 즉, DNA 분자는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA에 대해 안티센스인 RNA 분자의 발현이 가능한 방식으로 조절 서열이 작동 가능하게 연결된다. 안티센스 방향으로 클론화되는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 조절 서열로 다양한 세포 유형에서 안티센스 RNA 분자의 연속적인 발현을 지시하는 것, 예를 들어 바이러스 프로모터 및/또는 인핸서를 선택하거나, 안티센스 RNA의 구성적, 조직-특이적 또는 세포 유형 특이적 발현을 지시하는 것

을 선택할 수 있다. 안티센스 발현 벡터는 고효율 조절 영역(이의 활성은 벡터를 도입하는 세포 유형에 따라 결정할 수 있음)의 조절 하에서 안티센스 핵산이 생산되도록 재조합 플라스미드, 파지미드(phagemid) 또는 약화된 바이러스의 형태로 존재할 수 있다. 안티센스 유전자를 사용한 유전자 발현의 조절에 대해서는 문헌[Weintraub *et al.*, 1986, *Trends in Genetics*, Vol. 1(1)]를 참고할 수 있다.

[0535] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포에 관한 것이다. 용어 "숙주 세포"와 "재조합 숙주 세포"를 본 명세서에서 호환 가능하게 사용한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손 또한 지칭하는 것으로 이해된다. 돌연변이 또는 환경적인 영향에 따라 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있으므로, 이러한 자손은 실제로는 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본 명세서에 사용된 용어의 범위 내에 포함된다.

[0536] 숙주 세포는 임의의 원핵(예를 들어, 대장균) 또는 진핵 세포(예를 들어, 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포)일 수 있다.

[0537] 기존의 형질전환 또는 형질주입 기술을 통해 벡터 DNA를 원핵 또는 진핵 세포에 도입할 수 있다. 본 명세서에 사용된, 용어 "형질전환" 및 "형질주입"은 인산 칼슘 또는 염화 칼슘 공동-침전, DEAE-텍스트란-매개 형질주입, 리포펙션 또는 일렉트로포레이션 포함하는 숙주 세포에 외래 핵산을 도입하는 이 분야에서 인정된 다양한 기술을 지칭하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질전환하거나 형질주입하는 적합한 방법은 Sambrook 등의 문헌(상기 참조) 및 다른 실험 매뉴얼에서 찾을 수 있다.

[0538] 포유동물 세포의 안정한 형질주입을 위해 사용되는 발현 벡터 및 형질주입 기술에 따라, 세포의 극히 일부만이 외래 DNA를 게놈에 통합할 수 있음이 알려져 있다. 이러한 통합체를 확인 및 선별하기 위해, 일반적으로 선별가능한 마커(예를 들어, 항생제에 대한 저항성)를 암호화하는 유전자를 관심대상 유전자와 함께 숙주 세포에 도입한다. 바람직한 선별 마커로는 G418, 하이그로마이신(hygromycin) 및 메토크세이트(methotrexate)와 같은 약물에 대한 저항성을 부여하는 것이 포함된다. 핵산 도입으로 안정하게 형질주입된 세포는 약물 선별을 통해 확인할 수 있다(예를 들어, 선별 마커 유전자를 갖는 세포는 생존하는 반면 다른 세포는 죽을 것임).

[0539] XII. 바이오마커 핵산 및 폴리펩타이드 분석

[0540] 1) 바이오마커 전사체 또는 폴리펩타이드 수준에서의 변화, 2) 바이오마커 유전자의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 부가, 4) 바이오마커 유전자의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, 5) 발현 조절 영역과 같은 바이오마커 유전자의 비정상적인 변형 등을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 본 발명에 유용한 유전적 또는 발현 변화를 확인하기 위해 본 명세서에 기술된 방법 및 당업자에게 알려진 기술에 따라 바이오마커 핵산 및/또는 바이오마커 폴리펩타이드를 분석할 수 있다.

[0541] a. 카피수 검출 방법

[0542] 바이오마커 핵산의 카피수를 평가하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 염색체적인 획득 또는 손실의 유무는 본 명세서에서 확인된 영역 또는 마커의 카피수 결정을 통해 간단하게 평가할 수 있다.

[0543] 일 실시형태에서, 게놈 마커를 함유하는 게놈 좌위에서 카피수 변화의 존재에 대해 생물학적 시료를 검사할 수 있다. 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 카피수로 항-HHLA2 항체 요법의 부족한 결과가 예측된다.

[0544] 바이오마커 좌위의 카피수를 평가하는 방법으로는 혼성화-기반 분석법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 혼성화-기반 분석으로는 서던 블롯과 같은 전통적인 "직접 탐침" 방법, 인시츄(*in situ*) 혼성화(예를 들어, FISH 및 FISH+SKY) 방법, 및 상대적 게놈 혼성화(CGH), 예를 들어 cDNA-기반 또는 올리고뉴클레오타이드-기반 CGH와 같은 "상대적 탐침" 방법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 이 방법들은 기질(예를 들어, 막 또는 유리) 결합 방법 또는 어레이-기반 접근법을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 다양한 형식으로 사용할 수 있다.

[0545] 일 실시형태에서, 시료 내 바이오마커 유전자 카피수 평가는 서던 블롯을 포함한다. 서던 블롯에서, 게놈 DNA(전형적으로 전기영동 겔 상에 단편화 및 분리된)는 표적 영역에 특이적인 탐침과 혼성화된다. 정상 게놈 DNA 분석의 대조군 탐침 신호(예를 들어, 같거나 관련된 세포, 조직, 기관 등의 비-중폭 부분)와 표적 영역에 대한 탐침 혼성화 신호의 강도 비교로 표적 핵산의 상대적인 카피수의 추정치를 얻을 수 있다. 대안적으로, 시료 내 암호화 핵산의 카피수를 평가하기 위해 노던 블롯을 사용할 수 있다. 노던 블롯에서, mRNA는 표적 영역에 특이적 탐침과 혼성화한다. 정상 RNA 분석의 대조군 탐침 신호와 표적 영역에 대한 탐침의 혼성화 신호의 강도 비교로 표적 핵산의 상대적인 카피수 추정치를 얻을 수 있다. 대안적으로, RNA 검출을 위한 이 분야에 잘 알려진 다

른 방법을 사용하여, 적절한 대조군에 대해 상대적으로 높거나 낮은 발현으로 표적 핵산의 상대적인 카피수 추정치를 얻을 수 있다.

[0546] 계놈 카피수를 결정하기 위한 대안적인 방법은 인시츄 혼성화(예를 들어, Angerer (1987) *Meth. Enzymol* 152: 649)이다. 일반적으로, 인시츄 혼성화는 다음의 단계를 포함한다: (1) 분석할 조직 또는 생물학적 구조물의 고정화; (2) 표적 DNA의 접근성을 높이고 비특이적 결합을 줄이기 위한 생물학적 구조물의 전-혼성화 처리; (3) 핵산 혼합물과 생물학적 구조물 또는 조직 내 핵산의 혼성화; (4) 혼성화에서 결합하지 않은 핵산 단편을 제거하기 위한 혼성화-후 세척 및 (5) 혼성화된 핵산 단편의 검출. 이들 각 단계에서 사용되는 시약 및 조건은 특정 응용에 따라 달라진다. 전형적인 인시츄 혼성화 분석에서, 세포를 고체 지지체, 전형적으로 유리 슬라이드에 고정한다. 핵산을 탐침으로 조사하는 경우, 전형적으로 세포를 열 또는 알칼리로 변성시킨다. 이후 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 특이적인 표지된 탐침의 어닐링(annealing)을 위해 적당한 온도에서 세포를 혼성화 용액과 접촉시킨다. 이후 전형적으로 적절한 신호 대 잡음 비율이 얻어질 때까지 미리 결정된 강도 또는 강도를 증가시켜 표적(예를 들어, 세포)을 세척한다. 전형적으로 탐침은 예를 들어 방사성 동위원소 또는 형광 리포터로 표지한다. 일 실시형태에서, 탐침은 엄격한 조건 하에서 표적 핵산(들)과 특이적으로 혼성화시키기에 충분히 길도록 한다. 탐침은 일반적으로 약 200 베이스 내지 약 1000 베이스의 길이 범위이다. 일부 적용에서, 반복 서열의 혼성화능을 차단하는 것이 필요하다. 따라서, 일부 실시형태에서, tRNA, 인간 계놈 DNA 또는 Cot-I DNA를 비-특이적 혼성화를 차단하기 위해 사용한다.

[0547] 계놈 카피수를 결정하기 위한 대안적인 방법은 상대적 계놈 혼성화이다. 일반적으로, 정상 참조 세포와 시험 세포(예를 들어, 종양 세포)로부터 계놈 DNA를 분리하고 필요한 경우 증폭한다. 두 핵산을 다르게 표지하고 참조 세포의 중기(metaphase) 염색체와 인시츄 혼성화한다. 참조 및 시험 DNA 모두에서 반복 서열을 제거하거나 일부 방법, 예를 들어 상기 혼성화 동안 상기 반복 서열에 대한 적절한 차단 핵산 및/또는 이 차단 핵산 서열을 포함하는 것으로 전-혼성화하여 반복 서열의 혼성화능을 줄인다. 이후 필요한 경우, 결합된, 표지된 DNA 서열을 가시화 형태로 만든다. 카피수가 증가 또는 감소한 시험 세포 내 염색체 영역은 두 DNA의 신호 비율이 변화한 영역을 검출하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 시험 세포에서 카피수가 감소한 영역은 계놈의 다른 영역과 비교하여 참조 보다 시험 DNA의 신호가 상대적으로 낮게 나타날 것이다. 시험 세포에서 카피수가 증가한 영역은 시험 DNA의 신호가 상대적으로 더 높게 나타낼 것이다. 염색체의 결실 또는 증가가 있는 곳에서, 두 표지 신호의 비율 차이가 검출될 것이고 비율은 카피수의 측정치를 제공할 것이다. CGH, 분석 CGH(aCGH)의 다른 실시형태에서, 고정화된 염색체 요소는 어레이 상의 고정 지지체 결합 표적 핵산의 모음으로 대체되며, 이 고정 지지체 결합 표적의 모음에 계놈을 넓은 또는 완전한 비율로 나타내는 것이 가능하다. 표적 핵산은 cDNA, 계놈 DNA, 올리고 뉴클레오타이드(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성을 검출하기 위해) 등을 포함할 수 있다. 어레이-기반 CGH는 단일-색 표지(대조군과 가능한 종양 시료를 두 가지의 서로 다른 염료로 표지하고 혼성화 전에 이들을 혼합하는 것과는 대조적으로, 어레이 상의 탐침의 경쟁적 혼성화에 따른 비율이 산출될 것임)로도 수행할 수 있다. 단일 색 CGH에서, 대조군을 하나의 어레이로 표지 및 혼성화하고 절대 신호를 읽으며, 가능한 종양 시료를 둘째 어레이(동일한 내용으로)로 표지 및 혼성화하고 절대 신호를 읽는다. 카피수 차이는 두 어레이의 절대 신호를 기반으로 계산한다. 고정화 염색체 또는 어레이를 준비하고 상대적인 계놈 혼성화를 수행하는 방법은 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,335,167호; 제6,197,501호; 제5,830,645호; 및 제5,665,549호 및 문헌[Albertson (1984) *EMBO J.* 3: 1227-1234; Pinkel (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9138-9142; 유럽 공개 특허 제430,402호; *Methods in Molecular Biology*, Vol. 33: *In situ Hybridization Protocols*, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994)] 등 참조). 다른 실시형태에서, 문헌[Pinkel, et al. (1998) *Nature Genetics* 20: 207-211] 또는 문헌[Kallioniemi (1992) *Proc. Natl Acad Sci USA* 89:5321-5325 (1992)]의 혼성화 프로토콜을 사용한다.

[0548] 또 다른 실시형태에서, 카피수를 측정하기 위해 증폭-기반 분석을 사용할 수 있다. 이러한 증폭-기반 분석에서, 핵산 서열은 증폭 반응(예를 들어, 중합효소연쇄반응(PCR))의 주형으로 작용한다. 양적인 증폭에서, 증폭 산물의 양은 본래 시료 내 주형의 양에 비례할 것이다. 적절한 대조군, 예를 들어 건강한 조직과의 비교로 카피수의 측정치를 얻을 수 있다.

[0549] "양적인" 증폭 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 양적인 PCR은 같은 프라이머를 사용하여 양을 알고 있는 대조군 서열을 동시에 공동-증폭하는 것을 포함한다. 이는 PCR 반응 대조에 사용할 수 있는 내부 표준을 제공한다. 양적인 PCR의 세부 프로토콜은 문헌[Innis, et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.]에서 제공한다. 양적인 PCR 분석법을 사용하여 미세부수체 좌위에서 DNA 카피수를 측정하는 것은 문헌[Ginzonger, et al. (2000) *Cancer Research* 60:5405-5409]에 기술되어

있다. 유전자의 알려진 핵산 서열은 당업자가 유전자의 임의의 부분을 증폭하기 위해 통상적으로 프라이머를 선택할 수 있도록 하기에 충분하다. 형광발생 양적 PCR 또한 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 형광발생 양적 PCR에서, 측량은 형광 신호, 예를 들어 TaqMan 및 SYBR 그린의 양을 기반으로 한다.

[0550] 다른 적합한 증폭 방법으로 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu and Wallace (1989) *Genomics* 4: 560, Landegren, *et al.* (1988) *Science* 241:1077, 및 Barringer *et al.* (1990) *Gene* 89: 117 참조), 전사 증폭(Kwoh, *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173), 자가-지속 서열 복제(Guatelli, *et al.* (1990) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 1874), 닷 PCR(dot PCR) 및 링커 어댑터 PCR 등이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.

[0551] 이형접합성 상실(LOH) 및 주요 카피 비율(MCP) 매핑(Wang, Z.C., *et al.* (2004) *Cancer Res* 64(1):64-71; Seymour, A. B., *et al.* (1994) *Cancer Res* 54, 2761-4; Hahn, S. A., *et al.* (1995) *Cancer Res* 55, 4670-5; Kimura, M., *et al.* (1996) *Genes Chromosomes Cancer* 17, 88-93; Li *et al.*, (2008) *MBC Bioinform.* 9, 204-219) 또한 증폭 또는 결실 영역을 확인하기 위해 사용할 수 있다.

[0552] b. 바이오마커 핵산 발현 검출 방법

[0553] 바이오마커 발현은 전사된 분자 또는 단백질의 발현을 검출하기 위한 다양한 잘 알려진 방법들 중 임의의 방법으로 평가할 수 있다. 이러한 방법의 비-제한적인 예시로는 분비되는 단백질, 세포-표면의 단백질, 세포질 단백질 또는 핵 단백질의 검출을 위한 면역학적 방법, 단백질 정제 방법, 단백질 기능 또는 활성 분석법, 핵산 혼성화 방법, 핵산 역전사 방법 및 핵산 증폭 방법이 포함된다.

[0554] 바람직한 실시형태에서, 특정 유전자의 활성은 유전자 전사체(예를 들어, mRNA)의 척도, 번역된 단백질 양의 척도, 또는 유전자 산물 활성의 척도로 특징짓는다. 마커 발현은 mRNA 수준, 단백질 수준 또는 단백질 활성, 표준 기술을 사용하여 측정할 수 있는 것 중 임의의 것의 검출을 포함하는 다양한 방법으로 모니터링할 수 있다. 검출은 유전자 발현 수준(예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 단백질 또는 효소 활성)의 정량화를 포함할 수 있거나, 대안적으로, 유전자 발현 수준의 정성적 평가, 특히 대조군 수준과의 비교 평가가 될 수 있다. 검출되는 수준의 유형은 문맥으로부터 명확할 것이다.

[0555] 다른 실시형태에서, 바이오마커 및 이의 단편 또는 유전적 변이체(예를 들어, 이의 조절 또는 프로모터 영역의 유전적 변이체)를 포함하는 기능적으로 유사한 이의 상동체의 발현 수준을 검출 또는 결정하는 것은 관심대상 마커에 대한 RNA 수준을 검출 또는 결정하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 시험할 대상체로부터 하나 이상의 세포를 얻고 이 세포로부터 RNA를 단리한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체로부터 유방 조직 세포의 시료를 얻는다.

[0556] 일 실시형태에서, 단일 세포에서 RNA를 얻는다. 예를 들어, 레이저 포착 현미해부(LCM)로 조직 시료에서 세포를 단리할 수 있다. 이 기술을 사용하면, 염색된 조직 절편을 포함하는 조직 절편에서 세포를 단리하여 원하는 세포가 단리되도록 할 수 있다(예를 들어, 문헌[Bonner *et al.* (1997) *Science* 278: 1481; Emmert-Buck *et al.* (1996) *Science* 274:998; Fend *et al.* (1999) *Am. J. Path.* 154: 61 및 Murakami *et al.* (2000) *Kidney Int.* 58:1346] 참조). 예를 들어, 상기 Murakami *et al.*의 문헌에 사전에 면역염색된 조직 절편으로부터 세포를 단리하는 방법이 기술되어 있다.

[0557] RNA를 추출할 수 있는 큰 세포 집단을 얻는 것과 같이 대상체로부터 세포를 얻고 시험관 내에서 배양하는 것 또한 가능하다. 비-형질전환 세포의 배양, 즉 1차 세포 배양을 확립하는 방법이 이 분야에 알려져 있다.

[0558] 개체의 조직 시료 또는 세포로부터 RNA를 단리하는 경우, 대상체로부터 조직 또는 세포가 제거된 이후 유전자 발현에서의 임의의 추가 변화를 차단하는 것이 중요하다. 발현 수준의 변화는 작은 변화, 예를 들어 열충격 또는 지질다당류(LPS) 또는 다른 시약에 의한 활성화에 따라 빠르게 변화하는 것으로 알려져 있다. 추가로, 조직 및 세포의 RNA는 빠르게 분해될 수 있다. 따라서, 바람직한 실시형태에서, 대상체로부터 얻은 조직 또는 세포를 가능한 빠르게 급속 냉동한다.

[0559] RNA는 다양한 방법, 예를 들어 구아니디움 티오시안산염 용해 후 CsCl 원심분리로 조직 시료로부터 추출할 수 있다(Chirgwin *et al.*, 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299). 단일 세포로부터는 문헌[Dulac, C. (1998) *Curr. Top. Dev. Biol.* 36, 245 및 Jena *et al.* (1996) *J. Immunol. Methods* 190:199]에 기술된 것과 같이, 단일 세포로부터 cDNA 라이브러리를 제작하는 방법에 기술된 방법으로 얻을 수 있다. RNA 분해를 방지하기 위해 주의를 기울여야 한다(예를 들어, RNasin을 포함시켜).

[0560] 이후 RNA 시료를 특정 종으로 농축할 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리(A)+ RNA를 RNA 시료로부터 단리한다. 일

반적으로, 이러한 정제는 mRNA 상 폴리-A 테일을 이용한다. 특히 위에서 언급된 바와 같이, mRNA에 대한 친화리간드로 제공하기 위해 폴리-T 올리뉴클레오타이드를 고정 지지체 상에 고정시킬 수 있다. 이 목적을 위한 키트, 예를 들어 MessageMaker kit(Life Technologies, 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)를 상업적으로 이용할 수 있다.

[0561] 바람직한 실시형태에서, RNA 집단을 마커 서열로 농축한다. 농축은 예를 들어 프라이머-특이적 cDNA 합성, 또는 cDNA 합성 기반 여러 회의 선형 증폭 및 주형-유도 시험관 내 전사로 수행할 수 있다(예를 들어, Wang *et al.* (1989) PNAS 86, 9717; 상기 Dulac *et al.*의 문헌, 및 상기 Jena *et al.*의 문헌 참조).

[0562] 특정 종 또는 서열로 농축하거나 그렇지 않은 RNA 집단을 추가로 증폭할 수 있다. 본 명세서에 정의된, "증폭 과정"은 RNA 내 분자를 강화, 증가 또는 증대시키는 것을 뜻한다. 예를 들어, RNA가 mRNA인 경우, mRNA를 증폭하기 위해 RT-PCR과 같은 증폭 과정을 이용하여, 신호를 검출하거나 검출을 강화할 수 있다. 이러한 증폭 과정은 특히 생물학적, 조직 또는 종양 시료의 크기 또는 부피가 작은 경우에 유익하다.

[0563] 다양한 증폭 및 검출 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, mRNA를 cDNA로 역전사하고 중합효소 연쇄 반응하는 것(RT-PCR); 또는 미국 특허 제5,322,770에 기술된 바와 같이 두 단계를 위해 단일 효소를 사용하는 것, 또는 문헌[R. L. Marshall, *et al.*, PCR Methods and Applications 4: 80-84 (1994)]에 기술된 바와 같이 mRNA를 cDNA로 역전사하고 대칭적 겹 리가제 연쇄 반응하는 것(RT-AGLCR)이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 실시간 PCR도 사용할 수 있다.

[0564] 여기서 이용할 수 있는 다른 알려진 증폭 방법에는 문헌[PNAS USA 87: 1874-1878 (1990)] 및 문헌[Nature 350 (No. 6313): 91-92 (1991)]에 기술된 "NASBA" 또는 "3SR"로 불리는 기술; 유럽 공개 특허 출원(EPA) 제4544610호에 기술된 Q-베타 증폭; 문헌[G. T. Walker *et al.*, Clin. Chem. 42: 9-13 (1996)] 및 유럽 특허 출원 제684315호에 기술된 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification); PCT 공개 제W09322461호에 기술된 표적 매개 증폭; PCR; 리가제 연쇄 반응(LCR)(예를 들어, 문헌[Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren *et al.*, Science 241, 1077 (1988)] 참조); 자가-유지 서열 복제(self-sustained sequence replication: SSR)(예를 들어, 문헌[Guatelli *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990)] 참조); 및 전사 증폭(예를 들어, 문헌[Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989)] 참조)이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.

[0565] 유전자 발현의 절대적 및 상대적 수준을 결정하기 위한 많은 기술들이 이 분야에 알려져 있고, 본 발명에서 사용하기에 적합한 일반적으로 사용되는 기술들에는 노던 분석, RNase 보호 분석(RPA), 마이크로어레이 및 정량적 PCR 및 차등 디스플레이 PCR과 같은 PCR-기반 기술들이 포함된다. 예를 들어, 노던 블롯은 변성 아가로스 겔 상에 RNA 제조물을 영동하는 것, 및 이를 활성화 셀룰로스, 나이트로셀룰로스 또는 유리 또는 나일론 막과 같은 적합한 지지체로 옮기는 것을 포함한다. 이후 방사성표지된 cDNA 또는 RNA를 제조물과 혼성화하고, 세척하고 오토라디오그래피로 분석한다.

[0566] 인시츄 혼성화 가시화도 이용할 수 있는데, 여기서 방사성 표지된 안티센스 RNA 탐침을 생검 시료의 얇은 절편과 혼성화하며, 세척하고, RNase로 절단하고, 오토라디오그래피를 위해 감광액에 노출시킨다. 시료의 조직학적 구성을 입증하기 위해 시료를 헤마톡실린으로 염색할 수 있고, 적합한 광 필터를 사용한 암 시야 이미징으로 현상된 에멀전을 볼 수 있다. 디콕시게닌과 같은 비-방사성 표지도 사용할 수 있다.

[0567] 대안적으로, mRNA 발현은 DNA 어레이, 칩 또는 마이크로어레이로 검출할 수 있다. 대상체에서 얻은 시험 시료의 표지된 핵산을 바이오마커 DNA를 포함하는 고체 표면에 혼성화할 수 있다. 바이오마커 전사체를 함유하는 시료로 양성 혼성화 신호를 얻는다. DNA 어레이를 준비하고 이를 사용하는 방법은 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,618,679호; 제6,379,897호; 제6,664,377호; 제6,451,536호; 제548,257호; U.S. 20030157485 및 문헌[Schena *et al.* (1995) *Science* 20, 467-470; Gerhold *et al.* (1999) *Trends In Biochem. Sci.* 24, 168-173; 및 Lennon *et al.* (2000) *Drug Discovery Today* 5, 59-65] 참조, 이들 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨). 유전자 발현 연속 분석(SAGE) 또한 수행할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 제20030215858호 참조).

[0568] mRNA 수준을 모니터링하기 위해, 예를 들어, mRNA를 시험할 생물학적 시료로부터 추출하고, 역전사하고, 형광-표지 cDNA 탐침을 생성한다. 이후 표지된 cDNA 탐침으로 마커 cDNA에 혼성화할 수 있는 마이크로어레이를 수행하여 탐침조사하고, 슬라이드를 스캔하고, 형광 강도를 측정한다. 이 강도는 혼성화 강도 및 발현 수준과 연관된다.

- [0569] 본 명세서에 기술된 방법에 사용할 수 있는 탐침의 유형으로 cDNA, 리보탐침, 합성 올리고뉴클레오타이드 및 게놈 탐침이 포함된다. 예를 들어 인시츄 혼성화를 위한 리보탐침, 노던 블롯을 위한 cDNA와 같이, 사용되는 탐침의 유형은 일반적으로 특정 상황에 따라 결정된다. 일 실시형태에서, 탐침은 RNA에 대해 독특한 뉴클레오타이드 영역으로 향한다. 탐침은 마커 mRNA 전사체를 차별적으로 인식하는데 필요한 만큼 짧을 수 있고, 예를 들어 15 베이스로 짧을 수 있지만, 적어도 17, 18, 19 또는 20 이상의 베이스의 탐침을 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 프라이머 및 탐침은 엄격한 조건 하에서 마커에 상응하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 DNA 단편에 특이적으로 혼성화한다. 본 명세서에 사용된, 용어 "엄격한 조건"은 적어도 95%의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있는 경우에만 발생하는 혼성화를 의미한다. 다른 실시형태에서, "엄격한 조건" 하에서의 혼성화는 적어도 97%의 서열 간 동일성이 있는 경우에 발생한다.
- [0570] 탐침의 표지 형식은 방사성동위원소, 예를 들어 ^{32}P 및 ^{35}S 를 사용하는 것과 같은 적절한 임의의 형식일 수 있다. 방사성동위원소 표지는 적합한 표지 베이스를 사용하여 화학적으로 또는 생물학적으로 탐침을 합성하는 방법으로 달성할 수 있다.
- [0571] 일 실시형태에서, 생물학적 시료는 시험 대상체의 폴리펩타이드 분자를 함유한다. 대안적으로, 생물학적 시료는 시험 대상체의 mRNA 분자 또는 게놈 DNA 분자를 함유할 수 있다.
- [0572] 다른 실시형태에서, 이 방법은 대조군 대상체에서 대조 생물 시료를 얻는 것, 대조 시료를 마커 폴리펩타이드, mRNA, 게놈 DNA 또는 이의 단편을 검출할 수 있는 화합물 또는 물질과 접촉시켜, 생물학적 시료 내 마커 폴리펩타이드, mRNA, 게놈 DNA 또는 이의 단편이 검출되도록 하는 것, 대조 시료 내 마커 폴리펩타이드, mRNA, 게놈 DNA 또는 이의 단편의 존재와 시험 시료 내 마커 폴리펩타이드, mRNA, 게놈 DNA 또는 이의 단편의 존재를 비교하는 것을 추가로 포함한다.
- [0573] c. 바이오마커 단백질 발현 검출 방법
- [0574] 바이오마커 단백질의 활성 또는 수준은 발현된 폴리펩타이드를 검출 또는 정량화하여 검출 및/또는 정량할 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 다수의 방법 중 임의의 방법으로 폴리펩타이드를 검출 및 정량할 수 있다. 바이오마커 핵산 및 기능적으로 유사한 이의 상동체(단편 또는 이의 유전적 변형(예를 들어, 이의 조절 또는 프로모터 영역의 변형)을 포함하는)를 암호화하는 폴리펩타이드의 비정상적인 발현 수준은 항-HHLA2 항체 요법에 대한 암의 반응 가능성과 관련이 있다. 폴리펩타이드를 검출하기 위한 이 분야에 알려진 임의의 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법으로는 면역확산법, 면역전기영동법, 방사성면역분석법(RIA), 효소-결합 면역흡착제 분석법(ELISA), 면역형광 분석법, 웨스턴 블롯, 바인더-리간드 분석법, 면역조직화학적 기술, 교차법, 상보적 분석법, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 하이퍼디퓨전 크로마토그래피 등(예를 들어, 문헌[Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991], 이는 참조로 포함됨)이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 바람직한 것은 항체를 에피토프 또는 에피토프들과 반응시키는 것 및 표지된 폴리펩타이드 또는 이의 유도체를 경쟁적으로 치환하는 것을 포함하는 바인더-리간드 면역분석 방법이다. 특정 실시형태에서, 표 2에 나열된 항체를 표 1에 나열된 바이오마커를 검출 및/또는 정량하는데 이용한다.
- [0575] 예를 들어, ELISA 및 RIA 방법을 수행하여 원하는 바이오마커 단백질 표준을 표지(^{125}I 또는 ^{35}S 와 같은 방사성동위원소 또는 겨자무과산화수소 또는 알칼라인 포스파타제와 같은 분석가능한 효소로)하고, 비표지 시료와 함께, 상응하는 항체와 접촉시킬 수 있으며, 여기서 2차 항체는 1차와 결합하는데 사용되며, 방사성 또는 고정된 효소를 분석(경쟁적 분석)한다. 대안적으로, 시료 내 바이오마커 단백질이 해당 고정 항체와 반응하도록 하고, 방사성동위원소- 또는 효소-표지 항-바이오마커 단백질 항체가 이 시스템과 반응하도록 하고, 방사성 또는 효소를 분석(ELISA-샌드위치 분석)한다. 다른 통상적인 방법도 적합하게 사용할 수 있다.
- [0576] 상기 기술은 본질적으로 "1단계" 또는 "2단계" 분석으로 수행할 수 있다. "1단계" 분석은 항원을 고정 항체와 접촉시키고, 세척없이, 혼합물을 표지된 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. "2단계" 분석은 혼합물과 표지 항체를 접촉시키기 전에 세척하는 것을 포함한다. 다른 통상적인 방법도 적합하게 사용할 수 있다.
- [0577] 일 실시형태에서, 바이오마커 단백질 수준을 측정하는 방법은 생물학적 표본을 바이오마커 단백질에 선택적으로 결합하는 항체 또는 이의 변이체(예를 들어, 단편)와 접촉시키는 단계, 및 상기 항체 또는 이의 변이체가 상기 시료에 결합하였는지를 검출하고 이에 따라 바이오마커 단백질의 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0578] 바이오마커 단백질 및/또는 항체의 효소적 및 방사성표지는 통상적인 방법으로 실행할 수 있다. 이러한 방법은,

글루타르알데하이드와 같이, 일반적으로 문제의 항원 또는 항체에 효소를, 효소의 활성화에 악영향을 미치지 않도록(효소가 여전히 기질과 상호작용할 수 있는 것을 의미) 특이적으로, 비록 모든 효소가 활성화될 필요는 없지만, 실행할 분석을 수행할 수 있을 정도의 충분한 활성을 제공하도록, 공유 연결하는 것을 포함할 것이다. 실제로, 효소를 결합하기 위한 일부 기술들은 비-특이적(포름알데하이드를 사용하는 것과 같이)이고, 활성 단백질의 일부만을 생성할 것이다.

[0579] 일반적으로 분석 시스템 중 하나의 성분을 지지체 상에 고정하여 시스템의 다른 성분이 이 성분과 접촉하도록 하고 힘들고 시간-소모적인 노동없이 쉽게 제거 제거되도록 하는 것이 바람직하다. 두번째 단계를 첫번째 단계로부터 멀리 고정되도록 하는 것이 가능하지만, 일반적으로 하나의 단계면 충분하다.

[0580] 지지체 상에 효소 자신을 고정하는 것이 가능하지만, 고체상 효소가 필요한 경우, 일반적으로 항체에 결합하고 항체를 이 분야에 잘 알려진 지지체, 모델 및 시스템에 붙이는 것으로 달성된다. 단순 폴리에틸렌이 적합한 지지체를 제공할 수 있다.

[0581] 표지에 사용가능한 효소는 특별히 제한하는 것은 아니지만, 예를 들어 산화효소 군의 구성원으로부터 선택할 수 있다. 이들은 기질과의 반응을 통해 과산화수소의 생산을 촉진하며, 글루코스 산화효소가 이의 우수한 안정성, 이용의 용이성 및 낮은 가격뿐만 아니라, 이의 기질(글루코스)을 쉽게 이용할 수 있다는 점 때문에 종종 사용된다. 산화효소의 활성화는 이 분야에 잘 알려진 조절된 조건 하에서 효소-표지 항체와 기질의 반응 이후 형성된 과산화수소의 농도를 측정하여 분석할 수 있다.

[0582] 본 명세서에 기초한 의사의 선호도에 따라 바이오마커 단백질을 검출하기 위해 다른 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술의 하나가 웨스턴 블롯(Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979))이며, 여기서 나이트로셀룰로스 필터와 같은 고정 지지체로 전이하기 전에 적절하게 처리된 시료를 SDS-PAGE 겔 상에 영동한다. 이후 항-바이오마커 단백질 항체(표지되지 않은)가 지지체와 접촉하도록 하고 표지된 단백질 A 또는 항-면역글로불린(¹²⁵I, 겨자무과산화수소 또는 알칼라인 포스파타제를 포함하는 적절한 표지)과 같은 2차 면역학적 시약으로 분석한다. 크로마토그래피 검출도 사용할 수 있다.

[0583] 예를 들어, 생검 시료에서 바이오마커 단백질의 발현을 검출하기 위해 면역조직화학법을 사용할 수 있다. 적합한 항체가 예를 들어 세포의 얇은 세포층과 접촉하도록 하고, 세척한 이후 2차 표지 항체와 접촉시킨다. 표지는 형광 마커, 과산화효소와 같은 효소, 아비딘 또는 방사표지로 수행할 수 있다. 분석은 현미경법을 사용하여 시각적으로 채점한다.

[0584] 인트라바디(intrabody)와 같은, 항-바이오마커 단백질 항체(예를 들어, 표 2에 나열된) 또한 이미지화 목적, 예를 들어 대상체의 세포 및 조직 내 바이오마커 단백질의 존재를 검출하기 위한 목적을 위해 사용할 수 있다. 적합한 표지로는 방사성동위원소, 아이오딘(¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹¹²In) 및 테크네튬(^{99m}Tc), 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 표지, 및 비오틴이 포함된다.

[0585] 생체 내 이미지화 목적을 위해, 항체를 신체 외부에서 검출할 수 없으므로, 검출을 가능하게 하기 위해 표지하거나 변형시켜야 한다. 이 목적을 위한 마커는 항체 결합에 실질적으로 간섭하지 않지만 외부 검출을 가능하게 하는 임의의 것일 수 있다. 적합한 마커로는 X-방사선촬영, NMR 또는 MRI로 검출되는 것이 포함될 수 있다. X-방사선촬영 기술을 위한, 적합한 마커로는 검출가능한 방사선을 방출하지만 대상체에 명백하게 해롭지 않은 임의의 방사성동위원소, 예를 들어 바륨 또는 세슘 같은 것이 포함된다. NMR 및 MRI에 적합한 마커로는 일반적으로 듀테륨과 같은 검출가능한 특징적인 스핀을 갖는 것들, 예를 들어 관련 하이브리도마 영양소의 적합한 표지로 항체에 포함될 수 있는 것이 포함된다.

[0586] 대상체의 크기 및 사용된 이미지화 시스템은 진단 이미지 생성에 필요한 이미지화 모이어티의 양을 결정할 것이다. 대상체가 인간이고, 방사성동위원소 모이어티를 사용하는 경우, 주사되는 방사능의 양은 일반적으로 약 5 내지 20 밀리퀴리 범위의 테크네튬-99일 것이다. 이후 표지된 항체 또는 항체 단편은 바람직하게는 바이오마커 단백질이 함유된 세포 위치에 축적될 것이다. 이후 알려진 기술을 사용하여 표지된 항체 또는 항체 단편을 검출할 수 있다.

[0587] 바이오마커 단백질을 검출하는데 사용할 수 있는 항체로는 검출할 바이오마커 단백질에 충분히 강하고 특이적으로 결합하는 천연적 또는 합성적, 전장 또는 이의 단편인, 단일클론성 또는 다클론성인 임의의 항체(예를 들어, 표 2에 나열된)가 포함된다. 항체는 최대 약 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M, 10⁻¹⁰M, 10⁻¹¹M, 10⁻¹²M의 K_d를 가질 수 있

다. 문구 "특이적 결합"은 예를 들어 제2의 동일하거나 유사한 에피토프, 항원 또는 항원성 결정요인의 제제로 치환될 수 있거나 이와 경쟁할 수 있는 방식으로 항체가 에피토프 또는 항원 또는 항원성 결정요인에 결합하는 것을 지칭한다. 항체는 관련 단백질과 같은 다른 단백질에 비해 바이오마커 단백질에 우선적으로 결합할 수 있다.

[0588] 항체는 상업적으로 이용할 수 있거나 이 분야에 알려진 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0589] 사용할 수 있는 항체 및 이의 유도체로는 다클론 또는 단일클론성 항체, 키메라, 인간, 인간화, 영장류화(CDR-이식), 베니어된 도는 단일-사슬 항체뿐만 아니라 항체의 기능적 단편, 즉 바이오마커 단백질 결합 단편이 포함된다. 예를 들어, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 바이오마커 단백질 또는 이의 단편에 결합할 수 있는 항체 단편을 사용할 수 있다. 이러한 단편은 효소적 절단 또는 재조합 기술로 생산할 수 있다. 예를 들어, 파파인 또는 펩신 절단으로 각각 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 생성할 수 있다. 필요한 기질 특이성을 갖는 다른 단백질분해효소도 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 생성하는데 사용할 수 있다. 항체는 또한 천연 중결 위치의 업스트림에 하나 이상의 중결 코돈을 도입한 항체 유전자를 사용하여 다양한 절단 형태로 생산할 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 중쇄 부분을 암호화하는 키메라 유전자가 중쇄의 CH, 도메인 및 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록 설계할 수 있다.

[0590] 합성 및 조작 항체는 예를 들어 문헌[Cabilly *et al.*, 미국 특허 제4,816,567호; Cabilly *et al.*, 유럽 특허 제0,125,023 B1호; Boss *et al.*, 미국 특허 제4,816,397호; Boss *et al.*, 유럽 특허 제0,120,694 B1호; Neuberger, M. S. *et al.*, WO 86/01533; Neuberger, M. S. *et al.*, 유럽 특허 제0,194,276 B1호; Winter, 미국 특허 제5,225,539호; Winter, 유럽 특허 제0,239,400 B1호; Queen *et al.*, 유럽 특허 제0451216 B1호; 및 Padlan, E. A. *et al.*, EP 0519596 A1]에 기술되어 있다. 또한 영장류화 항체에 관해서는 문헌[Newman, R. *et al.*, BioTechnology, 10: 1455-1460 (1992)]에 기술되어 있으며, 단일-사슬 항체에 관해서는 문헌[Ladner *et al.*, 미국 특허 제4,946,778호 및 Bird, R. E. *et al.*, Science, 242: 423-426 (1988)]에 기술되어 있다. 라이브러리, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리로 생산되는 항체도 사용할 수 있다.

[0591] 일부 실시형태에서, 항체 이외의 바이오마커 단백질에 특이적으로 결합하는 물질, 예를 들어 펩타이드를 사용한다. 바이오마커에 특이적으로 결합하는 펩타이드는 이 분야에 알려진 임의의 방법으로 확인할 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 바이오마커 단백질의 특이적 펩타이드 결합체를 스크리닝할 수 있다.

[0592] d. 바이오마커의 구조적 변경 검출 방법

[0593] 다음의 예시적인 방법은 예를 들어, 과발현, 과기능 등의 특징을 갖는 HHLA2, TMIGD2, KIR3DL3를 확인하기 위해, 바이오마커 핵산 및/또는 바이오마커 폴리펩타이드 분자에서 구조적 변경의 존재를 확인하는데 사용할 수 있다.

[0594] 특정 실시형태에서, 변경의 검출은 앵커 PCR 또는 RACE PCR과 같은 증합효소 연쇄 반응(PCR)(예를 들어, 미국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호 참조)에서, 또는 대안적으로, 결합 연쇄 반응(LCR)(예를 들어, 문헌[Landegran *et al.* (1988) Science 241:1077-1080; 및 Nakazawa *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364] 참조)에서 탐침/프라이머를 사용하는 것을 포함하며, 여기서 후자는 바이오마커 유전자와 같은 바이오마커 핵산에서 점 돌연변이를 검출하는데 특히 유용하다(문헌[Abravaya *et al.* (1995) Nucleic Acids Res. 23:675-682] 참조). 이 방법은 대상체에서 세포 시료를 수집하는 단계, 시료의 세포에서 핵산(예를 들어, 게놈, mRNA 또는 둘 모두)을 분리하는 단계, 조건 하에서 바이오마커 유전자에 특이적으로 혼성화되는 하나 이상의 프라이머와 핵산 시료를 접촉시켜 바이오마커 유전자(존재하는 경우)의 혼성화 및 증폭을 발생시키는 단계, 및 증폭 산물의 유무를 검출하는 단계, 또는 증폭 산물의 크기를 검출하고 길이를 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 돌연변이 검출에 사용되는 임의의 기술과의 결합에서 PCR 및/또는 LCR을 예비 증폭 단계로 사용하는 것이 바람직할 것으로 예상된다.

[0595] 대안적인 증폭 방법으로는 다음이 포함된다: 자가-지속 서열 복제(Guatelli, J. C. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), 전사 증폭 시스템(Kwoh, D. Y. *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-베타 복제효소(Lizardi, P. M. *et al.* (1988) Bio-Technology 6:1197), 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법, 이후 당업자에 잘 알려진 기술을 사용하여 증폭된 분자를 검출하는 방법. 이러한 검출 계획은 특히 핵산 분자가 매우 낮은 수로 존재하는 경우의 검출에 유용하다.

[0596] 대안적인 실시형태에서, 제한 효소 절단 패턴의 변화를 통해 시료 세포 바이오마커 핵산의 돌연변이를 확인할

수 있다. 예를 들어, 시료 및 대조군 DNA를 단리하고, 증폭하고(선택적으로), 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 소화시키고, 겔 전기영동으로 단편 길이 크기를 결정하고 비교한다. 시료 및 대조군 DNA 사이의 단편 길이 크기 차이는 시료 DNA의 돌연변이를 나타낸다. 또한, 서열 특이적 리보자임(예를 들어, 미국 특허 제5,498,531호)을 리보자임 절단 부위의 생성 또는 결실에 의한 특이적 돌연변이의 존재를 채점하기 위해 사용할 수 있다.

[0597] 다른 실시형태에서, 수백 또는 수천의 올리고뉴클레오타이드 탐침을 함유하는 고밀도 어레이로 시료 및 대조군 핵산, 예를 들어 DNA 또는 RNA를 혼성화하여 바이오마커 핵산 내 유전적 돌연변이를 확인할 수 있다(Cronin, M. T. *et al.* (1996) *Hum. Mutat.* 7:244-255; Kozal, M. J. *et al.* (1996) *Nat. Med.* 2:753-759). 예를 들어, 상기 Cronin *et al.*의 문헌(1996)에 기술된 바와 같이 광-생성 DNA 탐침을 함유하는 2차원 어레이에서 바이오마커 유전적 돌연변이를 확인할 수 있다. 간단히 설명하면, 연속되고 겹치는 탐침의 선형 어레이를 만들어 서열 간 염기 변화를 식별하도록 시료 및 대조군 내 DNA의 긴 스트레치에 걸쳐 스캔하기 위해 탐침의 첫번째 혼성화 어레이를 사용할 수 있다. 이 단계는 점 돌연변이의 확인을 가능하게 한다. 이 단계에 이어 검출된 모든 변이체 또는 돌연변이체에 상보적인 더 작고 특화된 탐침 어레이를 이용하여 특정 돌연변이의 특성화를 가능하게 하는 2차 혼성화 어레이가 뒤따른다. 각 돌연변이 어레이는 야생형 유전자에 상보적인 탐침 세트 및 돌연변이 유전자에 상보적인 탐침 세트의 병렬 탐침 세트로 이루어진다. 이러한 바이오마커 유전적 돌연변이는 예를 들어 생식 세포계열 및 체세포 돌연변이를 포함하는 다양한 상황에서 확인할 수 있다.

[0598] 또 다른 실시형태에서, 바이오마커 유전자를 직접 시퀀싱하고 시료 바이오마커의 서열을 해당 야생형(대조군) 서열과 비교하여 돌연변이를 검출하기 위해 이 분야에 알려진 다양한 시퀀싱 반응을 사용할 수 있다. 시퀀싱 반응의 예시로는 맥삼 및 길버트(Maxam and Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560 or Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463)에 의해 개발된 기술을 기반으로 하는 것이 포함된다. 질량분석법에 의한 시퀀싱(예를 들어, PCT 국제 공개 제WO 94/16101호; 문헌[Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; 및 Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159])을 포함하여 진단 어레이(Naeve (1995) *Biotechniques* 19:448-53)를 수행할 때 유용할 수 있는 다양한 자동 시퀀싱 방법 중 임의의 방법 또한 고려된다.

[0599] 바이오마커 유전자 내 돌연변이를 검출하는 다른 방법에는 RNA/RNA 또는 RNA/DNA 이중듀플렉스 내 미스매치를 검출하는데 사용하는 절단 물질로부터의 보호 방법이 포함된다(Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). 일반적으로, "미스매치 절단" 기술은 야생형 바이오마커 서열을 함유하는 RNA 또는 DNA를 조직 시료에서 얻은 잠재적인 돌연변이 RNA 또는 DNA와 혼성화(표지)하여 형성되는 이중듀플렉스를 제공하는 것에서 시작한다. 대조군과 시료 가닥 사이의 염기쌍 미스매치로 인해 존재하는 것과 같은 듀플렉스의 단일-가닥 영역을 자르는 물질로 이중-가닥 듀플렉스를 처리한다. 예를 들어, 미스매치 영역을 효소적으로 소화시키기 위해 RNA/DNA 듀플렉스를 RNase로 처리하고 DNA/DNA 혼성체를 SI 뉴클레아제로 처리할 수 있다. 다른 실시형태에서, DNA/DNA 또는 RNA/DNA 듀플렉스를 히드록실아민 또는 사산화 오스뮴으로 처리하고 미스매치 영역을 소화시키기 위해 피페리딘으로 처리할 수 있다. 미스매치 영역을 소화시킨 후, 돌연변이 위치를 결정하기 위해 결과물을 변성 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 크기 별로 분리한다. 예를 들어, 문헌[Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397 and Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295]을 참조할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 검출을 위해 대조군 DNA 또는 RNA를 표지할 수 있다.

[0600] 또 다른 실시형태에서, 미스매치 절단 반응은 세포 시료에서 얻은 바이오마커 cDNA의 점 돌연변이를 검출하고 매핑하기 위한 시스템에서 이중-가닥 DNA 내 미스매치 염기쌍을 인식하는 하나 이상의 단백질("DNA 미스매치 복구" 효소라고 부른다)을 사용한다. 예를 들어, 대장균의 mutY 효소는 G/A 미스매치에서 A를 자르고 HeLa 세포의 티미딘 DNA 글리코실라제는 G/T 미스매치에서 T를 자른다(Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). 예시적인 실시형태에 따라, 바이오마커 서열, 예를 들어 DNA 미스매치 복구 효소로 처리된 야생형 바이오마커, 및 절단 산물 기반 탐침은, 만약 있다면, 전기영동 프로토콜 등(예를 들어, 미국 특허 제5,459,039호)으로부터 검출할 수 있다.

[0601] 다른 실시형태에서, 바이오마커 유전자에서 돌연변이를 확인하기 위해 전기영동의 이동성 변화를 사용할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이 및 야생형 핵산 사이의 전기영동 이동성의 차이를 검출하기 위해 단일 가닥 구조 다형성(SSCP)를 사용할 수 있다(Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766; see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 및 Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). 시료 및 대조군 바이오마커 핵산의 단일-가닥 DNA 단편은 변성되고 재생될 수 있을 것이다. 단일-가닥 핵산의 2차 구조는 서열에 따라 바뀌며, 그 결과로 전기영동 이동성의 변화는 단일 염기 변화도 검출할 수 있다. DNA 단편은 표지되거나 표지된 탐침으로 검출할 수 있다. 분석 민감도는 2차 구조가 서열 변화에 더 민감한 RNA(DNA 보다는)를 사용하여 향상시

킬 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 이 방법은 전기영동 이동성의 변화를 기초로 이중 가닥 이중듀플렉스 분자를 분리하기 위해 이중듀플렉스 분석을 이용한다(Keen *et al.* (1991) *Trends Genet.* 7:5).

[0602] 또 다른 실시형태에서, 변성 구배 겔 전기영동(DGGE)을 사용하여 변성제 구배를 함유하는 폴리아크릴아마이드 겔 내 돌연변이 또는 야생형 단편의 움직임을 분석한다(Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). 분석 방법으로 DGGE를 사용하는 경우, DNA는 예를 들어 PCR로 약 40bp의 고-융점 GC-풍부 DNA의 GC 클램프를 추가하는 것을 통해 완전히 변성되지 않도록 변형될 것이다. 추가 실시형태에서, 대조군 및 시료 DNA의 이동성 차이를 확인하기 위해 변성 구배 대신 온도 구배를 사용한다(Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:12753).

[0603] 점 돌연변이를 검출하는 다른 기술의 예시에는 선택적 올리고뉴클레오타이드 혼성화, 선택적 증폭 또는 선택적 프라이머 연장이 포함되지만 이로 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 알려진 돌연변이를 중앙에 배치하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제조하고 이후 완전한 매치가 발견되는 경우에만 혼성화가 이루어지는 조건 하에서 표적 DNA와 혼성화할 수 있다(Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163; Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). 올리고뉴클레오타이드가 혼성화 막에 부착되고 표지된 표적 DNA와 혼성화될 때, 이러한 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오타이드는 PCR 증폭 표적 DNA 또는 다수의 다른 돌연변이와 혼성화된다.

[0604] 대안적으로, 선택적 PCR 증폭에 의존하는 대립유전자 특이적 증폭 기술을 본 발명과 결합하여 사용할 수 있다. 특이적 증폭용 프라이머로 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 분자의 중심(이에 따라 증폭은 차별적 혼성화에 의존함)(Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) 또는 하나의 프라이머의 적절한 조건 하에서 미스매치가 중합효소 연장을 차단하거나 감소시킬 수 있는 위치(Prossner (1993) *Tibtech* 11:238)의 3' 최말단에 관심대상 돌연변이를 가질 수 있다. 추가로, 절단-기반 검출을 위해 돌연변이의 영역 내 신규 제한 부위를 도입하는 것이 바람직할 수 있다(Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). 특정 실시형태에서, 증폭은 Taq 리가제를 사용하여 수행할 수 있을 것으로 예상된다(Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). 이러한 경우, 결합은 증폭 유무를 확인하여 특정 위치에 알려진 돌연변이의 존재를 검출할 수 있게 하는 5' 서열의 3' 말단에서 정확한 일치에 있는 경우에만 발생할 것이다.

[0605] 항-암 요법

[0606] 항-HHLA2 항체 요법의 효능은 본 명세서에 기술된 방법에 따라 바이오마커의 양 및/또는 대상체에서의 암과 관련된 활성에 따라 예상된다. 일 실시형태에서, 특히 대상체가 항-HHLA2 항체 요법에 대한 가능성이 있는 반응자로 처음 나타난 경우, 이러한 항-HHLA2 항체 요법 또는 요법들의 조합(예를 들어, 다른 면역 관문 저해제와 같은 하나 이상의 부가적 항-암 요법과의 조합에서의 하나 이상의 항-HHLA2 항체 요법)을 처리할 수 있다. 다른 실시형태에서, 대상체가 항-HHLA2 항체 요법 및 대안적인 치료 요법, 예를 들어 처리될 수 있는 표적화 및/또는 비표적화 항-암 요법에 대한 가능성이 있는 반응자가 아닌 것으로 나타나면 이러한 항-HHLA2 항체 요법을 피할 수 있다. 조합 요법 또한 고려되고 예를 들어 하나 이상의 화학치료제 및 방사선, 하나 이상의 화학치료제 및 면역요법, 또는 하나 이상의 화학치료제, 방사선 및 화학요법을 포함할 수 있고, 이들 각 조합은 항-면역 관문 요법과 병용될 수 있다. 추가로, 특정 표적을 조절하는 물질의 임의의 대표적인 실시형태가 당업자에 의해 본 명세서 및 아래에 기술된 임의의 다른 표적에 적용될 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 기술된 직접적 및 간접적 HHLA2 저해제를 단일특이적 항체, 이중특이적 항체, 비-활성화 형태, 소분자, 펩타이드, 간섭 핵산 등과 같은 다른 면역 관문 저해제 및/또는 HHLA2에 적용할 수 있음).

[0607] 용어 "표적 요법"은 선택된 생물분자와 선택적으로 상호작용하여 암을 치료하는 물질의 투여를 지칭한다. 일 예시로는 이 분야에 잘 알려진 면역 관문 저해제가 포함된다. 예를 들어, 치료적 단일클론성 차단 항체와 같은, 이 분야에 잘 알려져 있고 위에 기술된 항-CTLA-4 경로 물질을 CTLA-4 리간드(예를 들어, CD80 및 CD86)와 같은 CTLA-4 경로의 구성 요소의 원치않는 발현이 이루어지는 종양 미세환경 및 세포를 표적화하기 위해 사용할 수 있다.

[0608] 예를 들어, 용어 "CTLA-4 경로"는 CTLA-4 수용체 및 이의 리간드, 예를 들어 CD80 및 CD86를 지칭한다. "CTLA-4 경로 저해제"는 CTLA-4와 하나 또는 둘 모두의 이의 리간드 사이의 상호작용을 차단 또는 감소시켜 이 상호작용으로 생성되는 면역저해 신호전달을 차단하거나 감소시킨다. 항-면역 관문 저해제는 직접적 또는 간접적인 것일 수 있다. 직접적 항-면역 관문 저해제는 면역 관문과 이의 리간드의 적어도 하나 사이의 상호작용을 차단하거나 감소시킨다. 예를 들어, CTLA-4 저해제는 CTLA-4와 이의 리간드의 하나 또는 둘 모두와의 결합을 차단할 수 있다. 특히 CTLA-4의 천연 결합 상대(예를 들어, CD80 및 CD86)가 알려져 있기 때문에, 직접적 CTLA-4 조합 저해제는 이 분야에 잘 알려져 있다.

- [0609] 예를 들어, CTLA-4와 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대 사이의 상호작용을 직접적으로 차단하는 물질, 예를 들어 이중특이적 항체는 저해 신호전달을 막고 면역 반응을 상향조절할 수 있다(즉, CTLA-4 경로 저해제로서). 대안적으로, CTLA-4와 이의 리간드의 하나 또는 둘 모두 사이의 상호작용을 간접적으로 차단하는 물질은 저해 신호전달을 막고 면역 반응을 상향조절할 수 있다. 예를 들어, B7-1 또는 이의 가용성 형태는, CTLA-4 폴리펩타이드에 결합하여, CTLA-4에 대한 결합에 이용할 수 있는 PD-L1 폴리펩타이드의 유효 농도를 간접적으로 감소시킨다. 예시적인 물질에는 수용체와 리간드(들) 사이의 상호작용을 차단하는 것으로 CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대에 대한 단일특이적 또는 이중특이적 차단 항체; CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 비-활성화 형태(예를 들어, 우성 음성 또는 가용성 폴리펩타이드), CTLA-4와 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대 사이의 상호작용을 차단하는 소분자 또는 펩타이드; CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대에 결합하고 수용체와 리간드(들) 사이의 상호작용을 저해하는 융합 단백질(예를 들어, 항체 또는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된 CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 세포의 부분); 천연 CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 비-활성화 형태, 및 천연 CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 가용성 형태가 포함된다.
- [0610] 간접적 항-면역 관문 저해제는 면역 관문과 이의 리간드의 적어도 하나 사이의 상호작용으로 생성되는 면역저해 신호전달을 차단 또는 감소시킨다. 예를 들어, 저해제는 CTLA-4와 이의 리간드의 하나 또는 둘 모두 사이의 상호작용을 반드시 직접적으로 차단하지 않고도 CTLA-4와 이의 리간드의 하나 또는 둘 모두 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 예를 들어, 간접적 저해제에는 면역저해 신호전달을 차단 또는 감소시키는 신호에 필요한 CTLA-4 및 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 세포 내 부분에 결합하는 인트라라디가 포함된다. 유사하게, CTLA-4 및/또는 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 발현을 감소시키는 핵산은 상호작용을 위한 구성 요소의 이용성을 제거하여 CTLA-4와 이의 리간드의 하나 또는 둘 모두 사이의 상호작용을 간접적으로 저해할 수 있다. 이러한 핵산 분자는 CTLA-4 및/또는 하나 이상의 CTLA-4 리간드 및/또는 결합 상대의 전사 또는 번역을 차단할 수 있다.
- [0611] 유사하게, 항-HHLA2 항체, HHLA2 수용체(들)/공동-수용체(들)을 인식하는 항체, 항-HHLA2/항-면역 관문 이중특이적 항체 등과 같이 HHLA2와 HHLA2 수용체(들)/공동-수용체(들) 사이의 상호작용을 직접적으로 차단하는 물질은 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들) 신호전달 및 이의 다운스트림 면역 반응을 막을 수 있다. 대안적으로, HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들) 사이의 상호작용을 간접적으로 차단하는 물질은 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들) 신호전달 및 이의 다운스트림 면역 반응을 차단할 수 있다. 예를 들어, HHLA2의 세포 외 도메인과 같은 가용성 형태의 HHLA2는 세포 표면의 HHLA2에 대한 결합에 이용할 수 있는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)의 유효 농도를 간접적으로 줄인다. 물질의 예시에는 수용체와 리간드(들) 사이의 상호작용을 차단하는 것으로 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)에 대한 단일특이적 또는 이중특이적 차단 항체; HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)의 비-활성화 형태(예를 들어, 우성 음성 또는 가용성 폴리펩타이드), HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들) 사이의 상호작용을 차단하는 소분자 또는 펩타이드; HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)에 결합하고 수용체 및 리간드(들) 사이의 상호작용을 저해하는 융합 단백질(예를 들어, 항체 또는 면역글로불린의 Fc 부분에 융합된 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)의 세포외 부분); 천연 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)의 비-활성화 형태, 및 천연 HHLA2 및/또는 이의 수용체(들)/공동-수용체(들)의 가용성 형태가 포함된다.
- [0612] 면역 반응을 유도하거나 증폭하도록 설계된 면역요법은 "활성화 면역요법"으로 지칭된다. 면역 반응을 감소시키거나 억제하도록 설계된 면역요법은 "억제 면역요법"으로 지칭된다. 물질이 면역요법인지 그리고 주어진 유전적 변형이 면역 반응을 조절하는데 미치는 영향을 결정하기 위해 유전적으로 변형된 이식 암세포 상에서 면역 체계 효과를 갖는 것으로 생각되는 임의의 물질을 분석할 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역요법은 암세포-특이적이다. 일부 실시형태에서, 면역요법은 면역 체계 세포와 선택적으로 상호작용하지 않지만 면역 체계 기능을 조절하는 물질의 투여를 지칭하는 "비표적화"일 수 있다. 비표적화 요법의 대표적인 예시에는 화학요법, 유전자 요법 및 방사선 요법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.
- [0613] 면역요법은 암 항원 또는 질환 항원에 대해 미리 형성된 항체의 투여(예를 들어, 선택적으로 화학요법제 또는 독소에 연결된, 종양 항원에 대한 단일클론성 항체의 투여)로 달성되는 숙주의 단기간 보호를 위한 수동 면역을 포함할 수 있다. 면역요법은 또한 암세포주의 세포독성 림프구-인식 에피토프를 사용하는데 초점을 맞출 수 있다. 대안적으로, 종양 또는 암의 개시, 진행 및/또는 병리와 연관된 생물분자를 선택적으로 조절하기 위해 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 리보자임, RNA 간섭 분자, 삼중 나선 폴리뉴클레오타이드 등을 사용할 수 있다.

- [0614] 일 실시형태에서, 면역요법에는 입양 세포-기반 면역요법이 포함된다. 방사선처리된 자가 또는 동종이계 종양 세포, 종양 용해물 또는 자멸사성 종양 세포, 항원-제시 세포-기반 면역요법, 수지상 세포-기반 면역요법, 입양 T 세포 전이, 입양 CAR T 세포 요법, 자가 면역 강화 요법(AIET), 암 백신 및/또는 항원 제시 세포를 포함하지 만 이로 제한되지는 않는 잘 알려진 입양 세포-기반 면역요법 방식이 사용될 수 있다. 이러한 세포-기반 면역요법들은 면역 반응을 추가로 조절하기 위한 하나 이상의 유전자 산물을 발현하도록, 예를 들어 사이토카인 유사 GM-CSF 발현 및/또는 Mage-1, gp-100, 환자-특이적 신생항원 백신 등과 같은 종양-관련 항원(TAA) 항원을 발현 하도록 추가로 조절될 수 있다.
- [0615] 다른 실시형태에서, 면역요법에는 비-세포-기반 면역요법이 포함된다. 일 실시형태에서, 백신-강화 보조제와 함 께 또는 이 보조제 없이 항원을 포함하는 조성물을 사용한다. 이러한 조성물은 펩타이드 조성물, 종양세포붕괴 성 바이러스, 융합 단백질을 포함하는 재조합 항원 등과 같은 많은 잘 알려진 형태로 존재한다. 또 다른 실시형 태에서, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-17, IL-23 등과 같은 면역조절 인터루킨뿐만 아니라, 이의 조절제(예를 들어, 차단 항체 또는 더 강력하거나 오래 지속되는 형태)를 사용할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 인터페론, G-CSF, 이미퀴모드, TNF알파 등과 같은 면역조절 사이토카인뿐만 아니라, 이의 조절제(예를 들어, 차단 항체 또 는 더 강력하거나 오래 지속되는 형태)를 사용할 수 있다. 다른 실시형태에서, CCL3, CCL26 및 CXCL7 등과 같은 면역조절 케모카인뿐만 아니라, 이의 조절제(예를 들어, 차단 항체 또는 더 강력하거나 오래 지속되는 형태)를 사용할 수 있다. 다른 실시형태에서, STAT3 신호전달 조절제, NFκB 신호전달 조절제 및 면역 관문 조절제와 같은 면역조절 분자 표적 면역억제를 사용할 수 있다. 용어 "면역 관문" 및 "항-면역 관문 요법"은 위에 기술되 어 있다.
- [0616] 또 다른 실시형태에서, 면역세포분열저해 약물, 글루코코르티코이드, 세포분열저해제, 이뮤노필린 및 이의 조절 제(예를 들어, 라파마이신, 칼시뉴린 저해제, 타크로리무스, 사이클로스포린, 피메크롤리무스, 아베티무스, 구 스페리무스, 리다포로리무스, 에베로리무스, 템시로리무스, 조타롤리무스 등), 히드로코르티손(코르티솔), 코르 티손 아세테이트, 프리드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 텍사메타손, 베타메타손, 트리암시놀론, 베클 로메타손, 플루드로코르티손 아세테이트, 데옥시코르티코스테론 아세테이트(doca), 알도스테론, 비-글루코코르 티코이드 스테로이드, 피리미딘 합성 저해제, 레플루노마이드, 테리플루노마이드, 폴산 유사체, 메토틱세이트, 항-흉선세포 글로불린, 항-림프구 글로불린, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 펜톡시필린, 부프 로피온, 커큐민, 카테킨, 오피오이드, IMPDH 저해제, 마이코페놀산, 마이리오신, 팅골리모드, NF-κB 저해제, 말 록시펜, 드로트레코긴 알파, 데노수맵, NF-κB 신호전달 캐스케이드 저해제, 디설파람, 올메사르탄, 디티오카바 메이트, 프로테아좀 저해제, 보르테조미, MG132, Pro1, NPI-0052, 커큐민, 제니스테인, 레스베라트롤, 파르테놀 라이드, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 플라보피리돌, 비-스테로이드성 항-염증 약물(NSAID), 삼산화 비소, 다 이하이드록시메틸에폭시퀴노마인(DHMEQ), I3C(인돌-3-카비놀)/DIM(다이-인돌메탄)(I3C/DIM), Bay 11-7082, 루테올린, 세포 투과 펩타이드 SN-50, IKBa-수퍼 저해제 과발현, NFκB 디코이 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN) 또는 이의 임의의 유도체 또는 유사체와 같은 면역조절 약물을 사용할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 면역조 절 항체 또는 단백질을 사용한다. 예를 들어, CD40, Toll-유사 수용체(TLR), OX40, GITR, CD27 또는 4-1BB에 결합하는 항체, T-세포 이중특이적 항체, 항-IL-2 수용체 항체, 항-CD3 항체, OKT3(뮤로모넵), 오테릭시주맵, 테플리주맵, 비실리주맵, 항-CD4 항체, 클레놀릭시맵, 켈릭시맵, 자놀리주맵, 항-CD11 항체, 에팔리주맵, 항- CD18 항체, 에를리주맵, 로벨리주맵, 항-CD20 항체, 아푸투주맵, 오크렐리주맵, 오파투주맵, 파스콜리주맵, 리 톡시맵, 항-CD23 항체, 루밀릭시맵, 항-CD40 항체, 테넬릭시맵, 토랄리주맵, 항-CD40L 항체, 루폴리주맵, 항- CD62L 항체, 아셀리주맵, 항-CD80 항체, 갈릭시맵, 항-CD147 항체, 가빌리모맵, B-림프구 자극제(BLyS) 저해 항 체, 벨리주맵, CTLA4-Ig 융합 단백질, 아바타셉트, 벨라타셉트, 항-CTLA4 항체, 이필리주맵, 트레멜리주맵, 항- 에오타신 1 항체, 베르틸리주맵, 항-a4-인테그린 항체, 나탈리주맵, 항-IL-6R 항체, 토실리주맵, 항-LFA-1 항체, 오둘리모맵, 항-CD25 항체, 바실릭시맵, 다클리주맵, 이놀리모맵, 항-CD5 항체, 줄리모맵, 항-CD2 항체, 시플리주맵, 네렐리모맵, 파랄리모맵, 아틀리주맵, 아톨로리주맵, 세렐리주맵, 도를리모맵 아리톡스, 도를릭시 주맵, 폰톨리주맵, 간테네루맵, 고밀릭시맵, 레브릴리주맵, 마슬리모맵, 모롤리주맵, 펙셀리주맵, 레슬리주맵, 로벨리주맵, 탈리주맵, 텔리모맵, 아리톡스, 바팔릭시맵, 베팔리모맵, 아플리베르셉트, 알레파셉트, 릴로나셉트, IL-1 수용체 길항제, 아나킨라, 항-IL-5 항체, 메폴리주맵, IgE 저해제, 오말리주맵, 탈리주맵, IL12 저해제, IL23 저해제, 우스테키누맵 등을 사용한다.
- [0617] 비타민 A, 비타민 E, 비타민 C 등과 같이, 이 분야에 잘 알려진, 면역 반응을 강화하는 영양 보충제(예를 들어, 미국 특허 제4,981,844호 및 제5,230,902호 및 PCT 공개 제WO 2004/004483호 참조)를 본 명세서에 기술된 방법 에 사용할 수 있다.

- [0618] 유사하게, 면역 반응을 자극하여 혜택을 받을 수 있는 상태를 치료하기 위해 면역요법 이외의 물질 및 요법 또는 이들의 조합을 항-HHLA2 항체와 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 화학요법, 방사선, 후생적 변형제(예를 들어, 히스톤 디아세틸라제(HDAC) 변형제, 메틸화 변형제, 인산화 변형제 등), 표적 요법 등이 이 분야에 잘 알려져 있다.
- [0619] 용어 "비표적 요법"은 선택된 생물분자와 선택적으로 상호작용하지 않지만 암을 치료하는 물질의 투여를 지칭한다. 비표적 요법의 대표적인 예시로는 유전자 요법과 방사선 요법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다.
- [0620] 일 실시형태에서, 화학요법을 사용한다. 화학요법에는 화학치료제의 투여가 포함된다. 이러한 화학치료제는 다음의 화합물 군 중에서 선택된 것일 수 있지만 이로 제한되지는 않는다: 백금 화합물, 세포독성 항생제, 대사길 항제, 항-유사분열제, 알킬화제, 비소 화합물, DNA 토포아이소머라제 저해제, 타산, 뉴클레오사이드 유사체, 식물 알칼로이드 및 독소; 및 이들의 합성 유도체. 예시 화합물에는 알킬화제: 시스플라틴, 트레오셀판 및 트로포스파마이드; 식물 알칼로이드: 빈블라스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀; DNA 토포아이소머라제 저해제: 테니포사이드, 크리스나톨 및 마이토마이신; 항-염산염: 메토틱세이트, 마이코페놀산 및 하이드록시우레아; 피리미딘 유사체: 5-플루오로우라실, 독시플루리딘 및 시토신 아라비노사이드; 퓨린 유사체: 머캅토피린 및 티오구아닌; DNA 대사길항제: 2'-데옥시-5-플루오로우리딘, 아피디콜린 글리시네이트 및 피라졸로이미다졸; 및 항 유사분열제: 할리콘드린, 콜히친 및 리족신이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 하나 이상의 화학치료제(예를 들어, FLAG, CHOP)를 포함하는 조성물 또한 사용할 수 있다. FLAG에는 플루다라빈, 시토신 아라비노사이드(Ara-C) 및 G-CSF가 포함된다. CHOP에는 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 독소루비신 및 프레드니손이 포함된다. 다른 실시형태에서, PARP(예를 들어, PARP-1 및/또는 PARP-2) 저해제를 사용하며 이 저해제는 이 분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, 올라파립, ABT-888, BSI-201, BGP-15(N-Gene Research Laboratories, Inc.); INO-1001(Inotek Pharmaceuticals Inc.); PJ34(Soriano *et al.*, 2001; Pacher *et al.*, 2002b); 3-아미노벤즈아마이드(Trevigen); 4-아미노-1,8-나프탈이미드(Trevigen); 6(5H)-페난트리딘(Trevigen); 벤즈아마이드(미국 특허 공개 제36,397호); 및 NU1025(Bowman *et al.*)). 작용 기작은 일반적으로 PARP에 결합하고 이의 활성을 감소시키는 PARP 저해제의 능력과 연관된다. PARP는 베타-니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NAD+)를 니코틴아마이드 및 폴리-ADP-리보스(PAR)로 전환하는 것을 촉진시킨다. 폴리(ADP-리보스) 및 PAR 모두 전사, 세포 증식, 게놈 안정성 및 발암의 조절에 연관된다(Bouchard V. J. *et al.* Experimental Hematology, Volume 31, Number 6, June 2003, pp. 446-454(9); Herceg Z.; Wang Z.-Q. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 477, Number 1, 2 Jun. 2001, pp. 97-110(14)). 폴리(ADP-리보스) 중합효소 1(PARP1)은 DNA 단일-가닥 절단(SSB)의 복구에서 핵심 분자이다(de Murcia J. *et al.* 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:7303-7307; Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, de Murcia G (2006) Nat Rev Mol Cell Biol 7:517-528; Wang Z Q, *et al.* (1997) Genes Dev 11:2347-2358). PARP1 기능의 저해에 의한 SSB 복구의 억압은 상동성-지향 DSB 복구에 결합이 있는 암세포의 합성 치사성을 촉발할 수 있는 DNA 이중-가닥 절단(DSB)을 유도한다(Bryant H E, *et al.* (2005) Nature 434:913-917; Farmer H, *et al.* (2005) Nature 434:917-921). 전술한 화학치료제의 예시는 예시적인 것이며 제한하려고 의도된 것이 아니다.
- [0621] 다른 실시형태에서, 방사선 요법을 사용한다. 방사선 요법에 사용되는 방사선은 이온화 방사선일 수 있다. 방사선 요법은 또한 감마선, X-선 또는 양성자 빔일 수 있다. 방사선의 예시에는 외부-빔 방사선 요법, 방사성동위원소(I-125, 팔라듐, 이리듐)의 간질 이식, 스트론튬-89와 같은 방사성동위원소, 흉부 방사선 요법, 복강내 P-32 방사선 요법 및/또는 총 복부 및 골반 방사선 요법이 포함되지만 이로 제한되지는 않는다. 방사선 요법의 일반적인 개요에 대해서는 문헌[Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita *et al.*, eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphia]을 참조할 수 있다. 방사선 요법은 원격 근원에서 발생하는 외부 빔 방사선 또는 원격요법으로서 투여될 수 있다. 방사선 치료는 또한 내부 요법 또는 근접요법으로서 투여될 수 있는데, 여기서 방사성 근원은 암세포 또는 종양 덩어리에 근접한 신체 내부에 배치된다. 또한 헤마토포르핀 및 이의 유도체, 베르토포르핀(BPD-MA), 프탈로사이아닌, 감광제 Pc4, 데메톡시-하이포크렐린 A; 및 2BA-2-DMHA와 같은 감광제의 투여를 포함하는 광역학 요법의 사용도 포함된다.
- [0622] 다른 실시형태에서, 암의 세포 및/또는 조직을 물리적으로 제거하기 위해 외과적 개입이 발생할 수 있다.
- [0623] 또 다른 실시형태에서, 호르몬 요법을 사용한다. 호르몬 요법 치료는 예를 들어, 호르몬 작용제, 호르몬 길항제(예를 들어, 플루타마이드, 비칼루타마이드, 타목시펜, 랄록시펜, 류프로라이드 아세테이트(LUPRON), LH-RH 길항제), 호르몬 생합성 및 과정의 저해제 및 스테로이드(예를 들어, 텍사메타손, 레티노이드, 텔토이드, 베타메타손, 코르티솔, 코르티손, 프레드니손, 데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 미네랄로코르티코이드,

에스트로겐, 테스토스테론, 프로게스틴), 비타민 A 유도체(예를 들어, 올-트랜스 레티노인산(ATRA)); 비타민 D3 유사체; 항체스타젠(예를 들어, 미페프리스톤, 오나프리스톤), 또는 항안드로겐(예를 들어, 시프로테론 아세테이트)를 포함할 수 있다.

[0624]

또 다른 실시형태에서, 신체 조직이 고온(106°F까지)에 노출되는 방법인 발열요법을 사용할 수 있다. 열은 세포를 손상시키거나 생존에 필요한 기질을 빼앗아 종양 위축을 도울 수 있다. 발열 요법은 외부 및 내부 발열 장치를 사용한 국소적, 지역적 및 전신적 요법일 수 있다. 발열요법은 효과를 높이기 위해 거의 항상 다른 형태의 요법(예를 들어, 방사선 요법, 화학요법 및 생물학적 요법)과 함께 사용된다. 국소적 발열요법은 종양과 같은 매우 작은 지역에 열을 가하는 것을 지칭한다. 신체의 외부 장치로부터 종양을 겨냥 고-주파로 외부적으로 이 지역에 열을 가할 수 있다. 내부적 가열을 위해, 얇은 열선 또는 온수로 채워진 관; 이식된 마이크로파 안테나; 및 무선주파수 전극을 포함하는 여러 유형의 멸균 탐침 중 하나를 사용할 수 있다. 지역적 발열요법에서, 기관 또는 팔다리를 열처리할 수 있다. 고 에너지를 생성하는 자석 및 장치를 열처리할 영역에 걸쳐 위치시킨다. 관류라고 부르는, 다른 접근 방식에서, 환자의 혈액 일부를 옮기고, 열처리하고, 내부적으로 열처리할 영역으로 주입(관류)한다. 전신 열처리는 신체 전체에 퍼진 전이암을 치료하기 위해 사용한다. 이는 온수 담요, 뜨거운 왁스, 유도성 코일(전기 담요의 것과 같은) 또는 열챔버(큰 배양기와 유사한)를 사용하여 달성할 수 있다. 발열 요법은 방사선 부작용 또는 합병증을 크게 증가시키지 않는다. 하지만, 피부에 직접적으로 열을 가하면 치료받는 환자의 약 절반에서 불편함 또는 심각한 국소 통증도 발생할 수 있다. 이는 또한 일반적으로 빠르게 치유되는 물집을 유발할 수도 있다.

[0625]

또 다른 실시형태에서, 암의 일부 유형의 치료를 위해 광역학 요법(PDT, 광방사 요법, 광요법 또는 광화학요법으로도 불림)을 사용한다. 이는 유기체가 특정 유형의 빛에 노출되었을 때 감광 물질로 알려진 특정 화합물이 단-세포 유기체를 죽일 수 있다는 발견을 기초로 한다. PDT는 고정-주파수 레이저 광을 감광 물질과 함께 사용하여 암세포를 파괴한다. PDT에서, 감광 물질은 혈류에 주입되어 신체 전체의 세포에 흡수된다. 이 물질은 정상 세포에서 보다 암세포에 더 오랫동안 남아 있다. 치료된 암세포가 레이저 광에 노출되면, 감광 물질은 빛을 흡수하고 암세포를 파괴하는 활성형 산소를 생성한다. 광 노출 시간을 신중하게 맞추어 대부분의 감광 물질이 건 강한 세포를 떠나고 암세포에는 여전히 남아있을 때 광 노출이 발생하도록 해야 한다. PDT에 사용하는 레이저 광은 광섬유(매우 얇은 유리 가닥)를 통해 발생될 수 있다. 적합한 양의 빛을 전달하기 위해 광섬유를 암 근처에 위치시킨다. 폐암 치료를 위해 광섬유를 기관지경을 통해 폐로 향하게 하거나 식도암의 치료를 위해 광섬유를 내시경을 통해 식도로 향하게 할 수 있다. PDT의 장점은 건강한 조직에 대한 손상을 최소화한다는 것이다. 하지만, 현재 사용중인 레이저 광은 조직의 약 3센티미터 이상(1과 1/8인치보다는 조금 더)을 통과할 수 없으므로, PDT는 주로 피부 상 또는 피부 바로 아래 또는 내부 장기의 내벽 상의 종양을 치료하기 위해 사용한다. 광역학 요법은 치료 후 6주 또는 그 이상 동안 피부와 눈을 빛에 민감하게 만든다. 환자는 적어도 6주 동안은 직사 태양광 및 밝은 실내광을 피하도록 권고된다. 환자가 실외로 나가야만 하는 경우, 썬글래스를 포함하는 보호복을 착용할 필요가 있다. PDT의 다른 일시적인 부작용은 특정 부위의 치료와 관련이 있으며 기침, 삼키기 곤란함, 복통, 고통스러운 호흡 또는 숨가쁨이 포함될 수 있다. 1995년 12월에, 미국 식품 의약국(FDA)은 폐색을 일으키는 식도암 및 레이저 만으로 만족스럽게 치료할 수 없는 식도암의 증상을 경감하기 위한 용도로 포르피린 나트륨 또는 Photofrin®으로 불리는 감광 물질을 승인하였다. 1998년 1월에, FDA는 폐암에 대해 일반적인 치료가 적절하지 않은 환자의 초기 비-소세포 폐암의 치료를 위한 포르피린 나트륨을 승인하였다. 국립암연구소와 다른 기관들은 방광, 뇌, 후두 및 구강의 암을 포함하는 여러 유형의 암에서 광역학 요법의 사용을 평가하기 위한 임상 시험(조사 연구)을 지원하고 있다.

[0626]

또 다른 실시형태에서, 고-강도 빛으로 암세포를 파괴하기 위해 레이저 요법을 사용한다. 이 기술은 특히 다른 치료법으로 암을 치료할 수 없을 때, 종종 출혈 또는 폐색과 같은 암의 증상을 경감하기 위해 사용한다. 이는 또한 종양을 축소하거나 파괴하여 암을 치료하기 위해 사용한다. 용어 "레이저"는 방사선의 자극 방사에 의한 광 증폭을 나타낸다. 백열 전구에서 나오는 것과 같은 일반 빛은 많은 파장을 갖고 모든 방향으로 퍼진다. 반면 레이저 광은 특정 파장을 갖고 좁은 빔에 집중된다. 이러한 고-강도 빛의 유형은 많은 에너지를 함유한다. 레이저는 매우 강력하고 강철을 자르거나 다이아몬드의 모양을 만들기 위해 사용할 수 있다. 레이저는 또한 눈의 손상된 망막을 복구하거나 조직을 자르는 것(메스 대신에)과 같은 매우 정밀한 수술에도 사용할 수 있다. 여러 다른 종류의 레이저가 있음에도 불구하고, 오직 3종류만이 의료에서 널리 사용된다: 이산화탄소(CO₂) 레이저--이 레이저 유형은 더 깊은 층을 관통하지 않고 피부의 표면으로부터 얇은 층을 제거할 수 있다. 이 기술은 피부 속 깊이 퍼지지 않은 종양과 특정 전암 상태를 치료하는데 특히 유용하다. 전통적인 메스 수술의 대체로, CO₂ 레이저는 피부를 자를 수도 있다. 레이저는 이러한 방식으로 피부암을 제거하는데 사용된다. 네오다이뮴:이트륨-알

루미늄-석류석(Nd:YAG) 레이저--이 레이저의 빛은 다른 유형의 레이저의 빛 보다 조직 내 더 깊이 침투할 수 있고, 혈액을 빠르게 응고시킬 수 있다. 이는 광섬유를 통해 접근하기 힘든 신체 부분으로 이동할 수 있다. 이러한 레이저 유형은 때때로 후두암을 치료하는데 사용된다. 아르곤 레이저--이 레이저는 조직의 표면층 만을 통과할 수 있고 따라서 피부과 및 눈 수술에 유용하다. 또한 광역학 요법(PDT)으로 알려진 방법에서 종양을 치료하기 위해 감광성 염료와 함께 사용된다. 레이저는 메스 보다 더 정밀하다는 것을 포함하여 표준 수술 도구를 뛰어넘는 여러 장점이 있다. 피부 또는 다른 조직과의 접촉이 거의 없기 때문에, 절개 부위 근처 조직을 보호한다. 레이저로 생성되는 열은 수술 부위를 멸균하고, 따라서 감염의 위험을 줄인다. 레이저의 정확함이 더 작은 절개를 가능하게 하기 때문에 더 적은 작동 시간이 필요할 수 있다. 레이저 열이 혈관을 밀봉하고, 출혈, 붓기 또는 흉터가 적기 때문에 치유 시간이 종종 단축된다. 레이저 수술은 덜 복잡할 수 있다. 예를 들어, 광섬유로, 큰 절개를 만들지 않고 레이저 광을 신체의 부위에 적용할 수 있다. 외래 환자를 기준으로 더 많은 방법을 수행할 수 있다. 암 치료를 위해 두 가지 방식으로 레이저를 사용할 수 있다: 열로 종양을 축소하거나 파괴하는 방식, 또는 감광 물질로 알려진 화합물을 활성화하는 방식--이는 암세포를 파괴한다. PDT에서, 감광 물질은 암세포 내에 유지되고 빛에 의해 암세포를 죽이는 반응을 유발하도록 자극될 수 있다. CO₂ 및 Nd:YAG 레이저는 종양을 축소 또는 파괴하기 위해 사용한다. 이들은 의사가 방광과 같은 신체의 특정 부위 내부를 볼 수 있도록 하는 관인 내시경과 함께 사용한다. 일부 레이저 빛은 광섬유로 만든 유연한 내시경을 통해 전달될 수 있다. 이것은 의사가 수술을 제외하고는 도달할 수 없는 신체 부위를 보고 그 안에서 작업할 수 있도록 하며 이에 따라 레이저 빔의 매우 정확한 조진을 가능하게 한다. 또한 레이저를 저-출력 현미경과 함께 사용하여 의사에게 치료할 부위의 선명한 시야를 제공할 수 있다. 다른 장치와 함께 사용되는 레이저 시스템은 매우 가는 실의 너비보다 작은 직경 200미크론 정도의 절단 면적을 생성할 수 있다. 레이저는 많은 유형의 암 치료에 사용한다. 레이저 수술은 성문(성대), 자궁경부, 피부, 폐, 질, 외음부 및 음경 암의 특정 단계를 위한 표준 치료법이다. 암을 파괴하기 위해 이를 사용하는 것에 더해, 레이저 수술은 암의 원인이 되는 증상 완화를 돕기 위해서도 사용한다(완화 관리). 예를 들어, 레이저는 환자의 기관(trachea)을 막는 종양을 축소 또는 파괴하여 호흡을 더 쉽게 할 수 있도록 하기 위해 사용할 수 있다. 또한 때때로 결장 및 항문 암의 완화를 위해 사용한다. 레이저-유도 간질 열요법(LITT)은 레이저 요법에서 가장 최근에 개발된 것 중 하나이다. LITT는 발열요법으로 불리는 암 치료법과 같은 아이디어를 사용한다; 열이 세포를 손상시키거나 생존에 필요한 기질을 박탈하여 종양을 축소하는데 도움을 줄 수 있다. 이 치료법에서, 레이저는 신체 내 간질 부위(기관 사이의 부위)로 향한다. 이후 레이저광은 종양의 온도를 올려 암세포가 손상받거나 파괴되도록 한다.

[0627] 요법 치료의 기간 및/또는 투여량은 특정 치료제 또는 이의 조합에 따라 달라질 수 있다. 특정 암 치료제에 대한 적절한 치료 시간은 숙련된 기술자에 의해 인식될 것이다. 본 발명은 각 암 치료제에 대한 최적 치료 일정의 지속적인 평가를 고려하며, 여기서 본 발명의 방법으로 평가되는 대상 암의 표현형은 최적 치료 투여량 및 일정을 결정하는 요인이다.

[0628] 의도된 수용자에게 본 발명의 다양한 작제물을 전달하기 위해 폴리뉴클레오타이드를 포유동물, 인간 또는 비-인간 또는 이의 세포에 도입하는 임의의 방법을 본 발명의 실시예에 적합화할 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 형질주입으로, 즉 "네이키드" DNA 또는 콜로이드 분산 시스템과의 복합 전달로, DNA 작제물을 세포에 전달한다. 콜로이드 시스템에는 고분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드 및 수중유 에멀전, 마이셀(micelle), 혼합 마이셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템이 포함된다. 본 발명에서 바람직한 콜로이드 시스템은 지질-복합 또는 리포솜-형성 DNA이다. 이전 접근방식에서는, DNA의 제형화, 예를 들어 지질과의 제형화 전에, 원하는 DNA 작제물을 함유하는 이식유전자 함유 플라스미드를 먼저 발현을 위해 실험적으로 최적화할 수 있다(예를 들어, 5' 비번역 영역에 인트론을 포함시키는 것 및 불필요한 서열을 제거하는 것(Felgner, *et al.*, Ann NY Acad Sci 126-139, 1995)). DNA의 제형화, 예를 들어 다양한 지질 또는 리포솜 재료로 제형화하는 것은 알려진 방법 및 재료를 사용하여 달성할 수 있고 수용 포유동물에 전달될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Canonica *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29, 1994; Tsan *et al.*, Am J Physiol 268; Alton *et al.*, Nat Genet. 5:135-142, 1993 및 Carson *et al.*의 미국 특허 제5,679,647호]을 참조할 수 있다.

[0629] 리포솜 표적화는 해부학 및 기계적 요인을 기반으로 분류할 수 있다. 해부학적 분류는 선택성, 예를 들어 기관-특이적, 세포-특이적 및 세포기관-특이적 선택성 수준을 기반으로 한다. 기계적 표적화는 수동인지 능동인지를 기반으로 구분할 수 있다. 수동적 표적화는 골모세혈관을 함유하는 기관 내 세망내피계(RES)의 세포에 분포하는 리포솜의 자연적 경향을 활용한다. 반면, 능동적 표적화는 자연적으로 발생하는 국소화 부위 이외의 기관 및 세포에 대한 표적화를 달성하기 위해 단일클론성 항체와 같은 특이적 리간드, 당, 당지질 또는 단백질에 리포솜이 결합하거나, 리포솜의 조성 또는 크기를 바꾸는 리포솜의 변형을 수반한다.

- [0630] 표적화 전달 시스템의 표면은 다양한 방법으로 변경할 수 있다. 리포솜 표적화 전달 시스템의 경우, 표적 리간드를 리포솜 이중층과 안정한 결합으로 유지하기 위해 지질 그룹을 리포솜의 지질 이중층에 통합시킬 수 있다. 지질 사슬을 표적 리간드에 결합하기 위해 다양한 연결 그룹을 사용할 수 있다. 네이키드 DNA 또는 전달 매개체, 예를 들어, 리포솜과 결합된 DNA를 대상체의 여러 부위에 투여할 수 있다(아래 참조).
- [0631] 핵산은 임의의 원하는 벡터로 전달할 수 있다. 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 플라스미드 벡터를 포함하는 바이러스 또는 비-바이러스 벡터가 포함된다. 바이러스의 예시적 유형으로 HSV(단순 포진 바이러스), AAV(아데노 관련 바이러스), HIV(인간 면역결핍 바이러스), BIV(소 면역결핍 바이러스) 및 MLV(젖과 백혈병 바이러스)가 포함된다. 핵산은 바이러스 입자, 리포솜, 나노입자 및 고분자 복합체를 포함하는 충분히 효율적인 전달 수준을 제공하는 임의의 원하는 형식으로 투여될 수 있다.
- [0632] 관심대상 핵산 또는 관심대상 단백질을 암호화하는 핵산은 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 또는 이 분야에 알려진 다른 벡터에 존재할 수 있다. 이러한 벡터는 잘 알려져 있으며 특정 적용을 위해 임의로 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에서, 유전자 전달 매개체는 프로모터 및 디메틸라제 암호화 서열을 포함한다. 바람직한 프로모터는 티미딘 키나제 및 티미딜산 합성효소 프로모터와 같은, 조직-특이적 프로모터 및 세포 증식으로 활성화되는 프로모터이다. 다른 바람직한 프로모터로는 α - 및 β -인터페론 프로모터와 같은 바이러스 감염으로 활성화 가능한 프로모터 및 에스트로겐과 같은 호르몬으로 활성화 가능한 프로모터가 포함된다. 사용할 수 있는 다른 프로모터로는 폴로니 바이러스 LTR, CMV 프로모터 및 마우스 알부민 프로모터가 포함된다.
- [0633] 다른 실시형태에서, WO 90/11092 및 미국 특허 제5,580,859호에 기술된 바와 같이, 네이키드 폴리뉴클레오타이드 분자를 유전자 전달 매개체로 사용한다. 이러한 유전자 전달 매개체는 성장 인자 DNA 또는 RNA일 수 있고, 특정 실시형태에서는, 죽은 아데노바이러스에 연결될 수 있다(Curiel *et al.*, Hum. Gene. Ther. 3:147-154, 1992). 선택적으로 사용할 수 있는 다른 매개체로는 DNA-리간드(Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989), 지질-DNA 조합(Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989), 리포솜(Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7851-7855, 1987) 및 미세투사물(Williams *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2726-2730, 1991)이 포함된다.
- [0634] 유전자 전달 매개체는 선택적으로 바이러스 복제 기원 또는 패키징 신호와 같은 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 이러한 바이러스 서열은 아스트로바이러스, 코로나바이러스, 오르토믹소바이러스, 파포바이러스, 파라믹소바이러스, 파르보바이러스, 피코르나바이러스, 폭스바이러스, 레트로바이러스, 토가바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 바이러스로부터 선택될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 성장 인자 유전자 전달 매개체는 재조합 레트로바이러스 벡터이다. 재조합 레트로바이러스 및 이의 다양한 용도는 예를 들어 문헌[Mann *et al.*, Cell 33:153, 1983, Cane and Mulligan, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6349, 1984, Miller *et al.*, Human Gene Therapy 1:5-14, 1990], 미국 특허 제4,405,712호, 제4,861,719호 및 제4,980,289호 및 PCT 출원 WO 89/02,468, WO 89/05,349 및 WO 90/02,806을 포함하는 많은 참조문헌에 기술되어 있다. 예를 들어 EP 0,415,731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; 미국 특허 제5,219,740호; WO 9311230; WO 9310218; 문헌[Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993; Vile and Hart, Cancer Res. 53:962-967, 1993; Ram *et al.*, Cancer Res. 53:83-88, 1993; Takamiya *et al.*, J. Neurosci. Res. 33:493-503, 1992; Baba *et al.*, J. Neurosurg. 79:729-735, 1993(미국 특허 제4,777,127호, GB 2,200,651, EP 0,345,242 및 WO91/02805)]에 기술된 것들을 포함하는 많은 레트로바이러스 유전자 전달 매개체가 본 발명에 유용하다.
- [0635] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터 시스템은 헤르페스 바이러스로부터 유래되었다: 예를 들어, 단순 포진 바이러스(1997년 3월 20일에 발행된 Woo 등의 미국 특허 제5,631,236호 및 Neurovex의 WO 00/08191), 백시니아 바이러스(Ridgeway (1988) Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez R L, Denhardt D T, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth.; Baichwal and Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press; Coupar *et al.* (1988) Gene, 68:1-10) 및 여러 RNA 바이러스. 바람직한 바이러스로는 알파바이러스, 폭시바이러스, 아레나 바이러스, 백시니아 바이러스, 폴리오 바이러스 등이 포함된다. 이들은 다양한 포유동물 세포에 대한 여러 매력적인 기능을 제공한다(Friedmann (1989) Science, 244:1275-1281; Ridgeway, 1988, 상기 참조; Baichwal and Sugden, 1986, 상기 참조; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.* (1990) J.Virol., 64:642-650).

- [0636] 다른 실시형태에서, 이 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 게놈 내 표적 DNA를 조작할 수 있다. 예를 들어, 레트로바이러스 삽입, 인공 염색체 기술, 유전자 삽입, 조직 특이적 프로모터 무작위 삽입, 유전자 표적화, 전이 인자 및/또는 외래 DNA를 도입하거나 변형된 DNA/변형된 핵 DNA를 생산하기 위한 임의의 다른 방법으로 결실, 삽입 및/또는 돌연변이하여 게놈 내 표적 DNA를 조작할 수 있다. 다른 변형 기술로는 게놈에서 DNA 서열을 삭제하는 것 및/또는 핵 DNA 서열을 변경하는 것이 포함된다. 핵 DNA 서열은 예를 들어 위치-지향 돌연변이유발로 변경할 수 있다.
- [0637] 다른 실시형태에서, 재조합 바이오마커 폴리펩타이드 및 이의 단편을 대상체에 투여할 수 있다. 일부 실시형태에서, 강화된 생물학적 특성을 갖는 융합 단백질을 제작하고 투여할 수 있다. 추가로, 증가된 생물이용가능성 및 감소된 단백질 분해와 같은 더 강화된 원하는 생물학적 활성을 위해 바이오마커 폴리펩타이드 및 이의 단편을 이 분야에 잘 알려진 약학적 방법(예를 들어, 폐결화, 글리코실화, 올리고머화 등)에 따라 변경할 수 있다.
- [0638] 임상 효능
- [0639] 임상 효능은 이 분야에 알려진 임의의 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 항-HHLA2 항체 요법과 같은 요법에 대한 반응은 요법에 대한 암, 예를 들어 종양의 임의의 반응, 바람직하게는 신보조제 또는 보조제 화학요법의 개시 이후 종양 크기 및/또는 부피의 변화와 관계된다. 종양 반응은 전신성 개입 이후 종양의 크기를 CT, PET, 유방조영상, 초음파 또는 촉진으로 측정하여 초기 크기 및 치수와 비교할 수 있고 종양의 세포성을 조직학적으로 추산하고 치료 시작 전에 얻은 종양 생검의 세포성과 비교할 수 있는 신보조제 또는 보조제 상황에서 평가할 수 있다. 반응은 생검 또는 수술적 절제 이후 종양의 캘리퍼 측정 또는 병리학적 검사로도 평가할 수 있다. 반응은, 종양 부피 또는 세포성에서의 백분율 변화와 같은 정량적인 방식으로 또는 "병리학적 완전 반응"(pCR), "임상적 완전 완화"(cCR), "임상적 부분 완화"(cPR), "임상적 안정 질환"(cSD), "임상적 진행 질환"(cPD) 또는 다른 정량적 기준과 같은 정량적인 방식에서 잔여 암 부담(Symmans *et al.*, *J. Clin. Oncol.* (2007) 25:4414-4422) 또는 밀러-페인 스코어(Miller-Payne score)(Ogston *et al.*, (2003) *Breast* (Edinburgh, Scotland) 12:320-327)와 같은 반-정량적 채점을 사용하여 기록할 수 있다. 신보조제 또는 보조요법의 시작 이후 초기, 예를 들어 몇 시간, 며칠, 몇 주 또는 바람직하게는 몇 달 후에 종양 반응의 평가를 수행할 수 있다. 반응 평가의 전형적인 끝점은 신보조제 화학요법의 종료 시기 또는 잔여 종양 세포 및/또는 종양상(tumor bed)의 수술적 제거 시기이다.
- [0640] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 요법적 치료의 임상적 효능은 임상적 이익률(CBR)을 측정하여 결정할 수 있다. 임상적 이익률은 요법의 끝에서 적어도 6개월의 시점에 완전 완화(CR)에 속하는 환자의 백분율, 부분 완화(PR)에 속하는 환자의 수 및 안정 질환(SD)을 갖는 환자의 수의 합을 결정하여 측정한다. 이 공식은 6개월 동안의 $CBR = CR + PR + SD$ 이다. 일부 실시형태에서, 특정 항-면역 관문 치료 요법에 대한 CBR은 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 그 이상이다.
- [0641] 항-면역 관문 요법에 대한 반응을 평가하는 추가적인 기준은 다음의 모두를 포함하는 "생존"과 관련된다: 전반적인 생존으로도 알려진 사망까지의 생존(여기서 상기 사망은 원인 또는 관련 종양에 관계없는 것일 수 있음); "재발없는 생존"(여기서 용어 재발은 국소 및 원거리 재발을 모두 포함해야 함); 전이없는 생존; 질환없는 생존(여기서 용어 질환은 암 및 이와 관련된 질환을 포함해야 함). 상기 생존의 기간은 정의된 시작점(예를 들어, 진단 시간 또는 치료 시작) 및 끝점(예를 들어, 죽음, 재발 또는 전이)을 참조하여 계산할 수 있다. 추가로, 치료 효능의 기준은 화학요법에 대한 반응, 생존 확률, 주어진 시간 내의 전이 확률 및 종양 재발 확률을 포함하도록 확장할 수 있다.
- [0642] 예를 들어, 적절한 역치를 결정하기 위해, 대상 집단에 특정 항-암 치료 요법을 집행할 수 있으며 결과를 임의의 항-면역 관문 요법의 집행 전에 결정된 바이오마커 측정치와 관련시킬 수 있다. 결과 측정치는 신보조제 설정에서 주어진 요법에 대한 병리학적 반응일 수 있다. 대안적으로, 바이오마커 측정치가 알려진 항-면역 관문 요법을 따르는 대상체에 대해 일정 시간 동안 전체 생존 및 질환-없는 생존과 같은 결과 측정치를 모니터링할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-면역 관문 제제의 동일 투여량을 각 대상체에 투여한다. 관련된 실시형태에서, 투여된 투여량은 항-면역 관문 제제에 대해 이 분야에 알려진 표준 투여량이다. 대상체를 모니터링하는 시간은 다를 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 또는 60개월 동안 대상체를 모니터링할 수 있다. 실시예 부분에 기술된 것들과 같은 방법을 사용하여 항-면역 관문 요법의 결과에 상관되는 바이오마커 측정 역치를 결정할 수 있다.
- [0643] XIII. 키트

- [0644] 추가로, 본 발명은 또한 생물학적 시료에서 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 생물학적 시료에서 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 검출가능한 표지된 화합물 또는 물질; 시료에서 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 양을 결정하기 위한 수단; 및 시료의 HHLA2 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 양을 표준과 비교하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 화합물 또는 물질은 적절한 용기에 포장될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 본 명세서에 기술된 항체의 적어도 하나를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 항체를 함유하는 키트는 HHLA2 검출에 또는 치료적 또는 진단적 분석에 사용한다. 본 발명의 키트는 고체 지지체, 예를 들어 조직 배양 플레이트 또는 비드(예를 들어, 세파로스 비드)에 결합된 항체를 함유할 수 있다.
- [0645] 키트는 설계된 특정 적용에 용이하도록 추가 구성 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 시험관 내, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 HHLA2의 검출 및 정량화를 위한 항체를 함유하는 키트로 제공될 수 있다. 추가로, 키트에 함유될 수 있는 예시적인 물질로는 표지 검출 수단(예를 들어, 효소적 표지를 위한 효소 기질, 형광 표지를 검출하기 위한 필터 세트, 양 항-마우스-HRP와 같은 적절한 2차 표지 등) 및 대조군을 위해 필요한 시약(예를 들어, 대조군 생물학적 시료 또는 HHLA2 단백질 표준)이 포함된다. 키트는 개시된 발명의 방법에서 사용하기 위한 것으로 인식되는 완충제 및 다른 시약을 추가로 포함할 수 있다. 비-제한적 예시로는 담체 단백질 또는 세제와 같은 비-특이적 결합을 줄이는 물질이 포함된다. 본 발명의 키트는 또한 본 명세서에 제공된 기술된 발명의 방법에서 기술된 발명의 키트 또는 항체의 사용을 나타내거나 기술한 교육용 재료를 포함할 수 있다.
- [0646] 다음의 실시예를 통해 본 발명을 추가로 설명하며, 이 실시예는 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서를 통해 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용뿐만 아니라, 도면들은 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0647] **실시예**
- [0648] **실시예 1: 항-인간 HHLA2 단일클론성 항체 도출**
- [0649] 다수의 항-HHLA2 단일클론성 항체를 생성 및 분석하였다. 간단히 설명하면, 마우스 단일클론성 항체의 면역화 및 생성 전에 인간 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 생산하였다. 인간 HHLA2의 암호화 영역을 프라이머 5'-TGTTCGACACAAGACA-3'(ATG 시작의 5'에 위치한 센스 프라이머) 및 5'-GTAAGGATGCAGGTCATGAGT-3'(종결 코돈 3'에 위치한 안티-센스 프라이머)를 사용하여 PCR-증폭하고 TA 클로닝으로 pEF6 벡터에 도입하였다. HHLA2 세포의 도메인에 대한 cDNA를 마우스 IgG2a 힌지 및 Fc 도메인(Fc 수용체에 대한 결합을 줄이기 위한 돌연변이와 함께)에 융합하고 pEF6 벡터에 클로닝하여 HHLA2-mIgG2a를 만들었다. 작제물을 CHO 세포에 도입하고 단백질 G 컬럼 상의 친화 크로마토그래피로 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 정제하였다.
- [0650] 4 내지 6주령의 다섯 마리의 마우스(Balb/c; C57Bl/6; Swiss-Webster)를 찰스 리버 실험실(월링턴, 매사추세츠)에서 얻었다. 하버드 동물 상임위원회의 동물 관리 및 사용 위원회의 가이드라인에 따라 모든 동물을 획득 및 유지하였다.
- [0651] 처음 면역화를 위해, 50 마이크로그램의 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 Dulbecco's PBS(phosphate buffered saline; GIBCO, 그랜드 아일랜드, 뉴욕)에 현탁하고 동일 부피의 완전 프로인트 보조제(complete Freund's adjuvant)(Sigma Chemical Co., 세인트 루이스, 미주리주)로 유화하였다. 림프절이 발견될 수 있는 다섯 피하 부위(사타구니, 상완, 겨드랑이 및 표면 경부)와 복강내로 에멀션을 주사하여 마우스를 면역화하였다. 처음 면역화 14일 후, 동일 부피의 불완전 프로인트 보조제로 유화한 50 마이크로그램의 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 복강 내로 투여하여 마우스에 추가 면역화를 제공하였다. 14일 후, 마우스에 동일 부피의 불완전 프로인트 보조제로 유화한 50 마이크로그램의 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 복강 내로 추가 투여하였다. 42일 후, 마우스에 동일 부피의 불완전 프로인트 보조제로 유화한 50 마이크로그램의 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 복강 내로 추가 투여하였다. 0.1% 황산 도데실 나트륨의 존재 내에서 5분간 끓여 단백질을 변성하였다. 13일 후, 마우스에 동일 부피의 불완전 프로인트 보조제로 유화한 50 마이크로그램의 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질과 50 마이크로그램의 변성된 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 복강 내로 추가 투여하였다. 추가 투여 10 내지 12일 후 소량의 혈액을 수집하였다. HHLA2 cDNA로 형질주입한 300.19 세포 및 형질주입하지 않은 300.19 세포 상의 유세포 분석으로 HHLA2에 대한 혈청 활성을 적정하였다. 36일에, 50 마이크로그램의 변성된 재조합 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 복강 내 및 정맥 내로 최종 추가 투여하였다.
- [0652] 4일 후 역가가 가장 높은 5번 마우스를 융합을 위해 선택하였다. 수집한 비장 및 림프절을 세포 현탁물로 만들

고 DMEM으로 세척하였다. 비장/림프절 세포의 수를 세고 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 사슬을 분리하지 못하는 SP 2/0 골수종 세포(Kearney *et al.* (1979) *J. Immunol.* 123:1548-1550 및 Kilpatrick *et al.* (1997) *Hybridoma* 16:381-389)와 2:1의 비장:골수종 비율로 혼합하였다. 표준 절차(Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497)에 따라 8개의 96-웰 조직 배양 플레이트 HAT 선택 배지에서 폴리에틸렌 글리콜 1450으로 세포를 융합하였다.

[0653] 융합 10일 및 21일 사이, 하이브리도마 콜로니가 보이게 되었고 배양 상등액을 수집한 이후 HHLA2 cDNA로 형질주입한 300.19 세포 및 형질주입하지 않은 300.19 세포의 반응성 결핍 상 유세포 분석으로 HHLA2에 대해 스크리닝하였다.

[0654] **실시예 2: 항-HHLA2 항체**

[0655] 다수의 항-HHLA2 mAb를 시퀀싱하여 CDR 영역을 분석하였다. 간단히 설명하면, VH 및 VL에 대한 DNA를 증폭하기 위해 RACE(cDNA 말단의 급속 증폭)를 수행하였다(mRNA 변성, cDNA 합성, 5' RACE 반응 및 PCR 결과 분석). 양성 클론을 확인하기 위해, 아가로스 겔 상에서 증폭된 DNA 단편을 가시화하여 PCR 반응 시료를 분석하였다. 올바른 항체 가변 영역 DNA 단편은 500 내지 700 염기쌍 사이의 크기를 가져야 한다. PCR-양성 밴드를 TOPO 클론화하고 이후 PCR-증폭하고, 겔 전기영동하고, 아가로스 겔로부터 회수하고, 시퀀싱하였다. CDR 분석은 시퀀싱 데이터를 사용하여 수행하였다(CDR 영역은 VBASE2를 사용하여 정의하였음, vbase2.org/ 참조).

[0656] mAb 시퀀싱 결과가 표 2에 나열되어 있다. 항체의 경쇄는 카파 유형이다. 마우스 항체 8A12, 8D2 및 1C8는 IgG2a 아이소타입인 반면 2C4, 5H4, 6G8, 6D10, 2G2, 4D1, 4E5 및 6F10은 IgG1 아이소타입이다.

[0657] 시험관 내 결합 및 TMIGD2 차단에 대해 새롭게 확인된 항-HHLA2 항체를 특징지었다.

[0658] 특히, 각 항-HHLA2 항체에 대한 결합 친화성을 분석하였다. HHLA2 cDNA 및 푸로마이신 저항성을 암호화하는 벡터를 전기천공법(300볼트, 1600마이크로패럿)으로 마우스 300.19 세포에 공동-형질주입하고 5 μ g/ml 푸로마이신 함유 배지로 선별하였다. TMIGD2-인간 Fc 융합 단백질과 피코에리트린에 접합된 염소 항-인간 Fc 항체로 염색하여 HHLA2를 발현하는 세포를 확인하고 유세포 분석으로 단일 세포를 분류하였다. 상기 기술된 유세포 분석으로 개별 클론의 HHLA2 발현을 확정하였다. HHLA2-형질주입 300.19 세포를 항-HHLA2 mAb로 적정하였다(도 1a).

[0659] 도 1b는 유세포 분석을 사용한 TMIGD2 차단 평가 결과를 보여준다. 간단히 설명하면, 인간 HHLA2 세포로 형질주입된 300.19 세포에 결합하는 TMIGD2-인간 IgG의 항-HHLA2 mAb 차단에 대한 분석을 수행하였다. 예를 들어, 96 웰 둥근 바닥 플레이트의 웰당 인간 HHLA2로 안정적으로 형질주입된 20 μ l(300.19 세포의 25,000개에 해당)를 첨가하였다. 웰당 50 μ l의 항체가 있었다. 비희석, 1:10 희석 및 1:100 희석을 분석하였다. mAb 내 세포를 재현탁하기 위해 세포를 상하 파이펫팅하고 회전 플랫폼 상에서 4 $^{\circ}$ C로 30분간 항온처리하였다. FACS 완충액(PBS + 2% FBS, 0.02% 아지드) 내 2 μ g/ml의 인간 TMIGD2-인간 IgG1 융합 단백질(R&D Systems 카탈로그 # 8316-TR-050) 20 μ l를 각 웰에 첨가하였다. TMIGD2-hIgG가 없는 세포의 음성 대조군 웰 및 마우스 IgG 아이소타입 대조군을 갖는 TMIGD2의 양성 대조군을 항온처리하였다. 플레이트를 혼합하면서 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 항온처리하였다. FACS 완충액으로 세포를 두번 세척하고, 상등액을 제거하였다. 2.5 μ g/ml의 2차 항체(Fab₂ 염소 항-인간-IgG-PE, 마우스 Ig에 대해 교차-흡수됨; Southern Biotech 2043-09)를 웰당 50 μ l 첨가하였다. Ab 내에 세포를 재현탁하기 위해 3회 상하 파이펫팅하고 혼합하면서 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 항온처리하였다. FACS 완충액으로 세포를 2회 세척하고 상등액을 제거하였다. 세포를 PBS + 2% 포름알데하이드 80 μ l에 재현탁하고 FACS 장치로 결합을 분석하였다. FACS 완충액(PBS + 2% FBS, 0.02% 아지드)를 사용하였다.

[0660] 도 2는 항-HHLA2 단일클론성 항체 8D2를 사용하여 분석한 인간 종양 세포주의 웨스턴 블롯 결과를 보여준다. 간단히 설명하면, 제조업체의 지침(Thermo Scientific)에 따라 단백질 용해물을 RIPA 완충액으로 준비하였고, 용해물 제조 전에 완충액에 단백질분해효소 저해제 각테일(complete Ultra tablets, mini, EDTA-free, Roche)을 첨가하였다. 인간 HHLA2로 안정하게 형질주입된 300.19 세포와 지시된 인간 종양 세포주로부터 단백질 용해물을 만들었다. L428 및 HDLM2는 호지킨 림프종 세포주, OC1-Ly1는 B-세포 비-호지킨 림프종(확산 대세포) 세포주, Raji는 버킷 림프종 세포주, Jurkat E6은 T 세포 백혈병 세포주, THP-1는 급성 단구성 백혈병 세포주, MDA231 및 SKBR는 유방 종양 세포주, CAKI2는 인간 투명세포형 신세포암(ccRCC) 세포주이다. 80 μ g의 용해물을 4 내지 15% 구배 mini-Protean TGX 겔(BioRad)에 로드하고, 반-건조 방법으로 옮겼다. 막을 12% 무-지방 우유 및 1% 정상 염소 혈청 함유 TBST(Tween20 함유 Tris-buffered saline)로 상온에서 1시간 동안 차단하였다. 막을 TBST로 세척하고 1차 항체(TBST 내 최종 농도 1 μ g/ml의 항-HHLA2 mAb 499.5.8D2 및 1% BSA)와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 막을 TBST로 상온에서 3회 세척하고 TBST, 6% 무지방 우유 및 0.5% 정상 염소 혈청에서

30분 동안 2차 항체(1:4000, 거자무-접합 염소 항-마우스 IgG HRP 항체, Southern Biotech Catalog # 1030-05)와 함께 항온처리하였다. TBST로 3회 추가 세척 후, ECL 기질:인헨서의 1:1 비율을 막에 첨가하고 (SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution, Supersignal West Pico Luminol/Enhancer Solution, ThermoScientific) Hyblot CL 오토라디오그래피 필름(Denville Scientific) 상에 이미지화하였다.

[0661] 실시예 3: 정상 및 암 조직에서의 HHLA2 mRNA 발현

[0662] 도 3은 정상 신장 대 신장암에서 HHLA2 mRNA 발현을 다른 관문 저해제와 비교한 결과를 보여준다. TCGA 데이터베이스의 RNA 서열 데이터 정규화로 정상 신장 및 신장 종양에서 지시 B7 패밀리 면역 수용체 및 종양 침윤 백혈구의 발현을 평가하였다. PD-L1, PD-L2, B7-H3, VISTA 및 HHLA2에 대해 정상 조직에 비해 종양에서 증가한 수용체 발현이 관찰되었다. 정상 조직에 비해 종양에서 CD8+ 및 CD14+ 종양 침윤 세포의 수준이 증가한 것 또한 관찰되었다.

[0663] 유사하게, 도 4는 TCGA 데이터베이스의 다양한 암에서 HHLA2 발현 결과를 보여준다(도 4). 간단히 설명하면, TCGA의 데이터베이스(국립 암 연구소의 암 유전체학 센터 및 국립 인간 유전체 연구소에 의해 관리됨)를 사용하여 RNA서열 분석으로 다양한 암에서 HHLA2에 대한 발현 프로파일을 조사하였다. 도 4와 같이, HHLA2는 투명 세포 및 유두상 신장세포 암종, 폐선암종, 결장암 및 췌장암에서 높은 수준으로 발현(붉은 이탤릭체)되고 AML, 경부, 두경부, 간, 난소, 전립선, 고환암 및 폐 편평 세포 암종에서 중간 정도로 발현된다.

[0664] 도 5는 HHLA2-양성 및 음성 세포주 신장암 종양 어레이와 같은 면역조직화학법에 따른 HHLA2 발현의 결과를 보여준다. 면역조직화학법으로 신장암 종양 어레이 및 세포주의 HHLA2 발현을 검출하였다. 채수와 파라핀 포매한 조직 절편 및 세포주 절편을 pH 8의 EDTA 완충액(Life Technologies)에 넣고 압력솔(Biocare Medical)에서 125 °C에서 30초 동안 끓였다. 상온(RT)으로 식힌 후, 조직 절편을 페록시다제 블럭(Dual Endogenous Enzyme Block, Dako) 및 단백질 블럭(Serum Free Block, Dako)과 함께 상온에서 각각 5분 동안 연속적으로 항온처리하였다. 다음 절편을 배경 감소 성분(Dako)과 항체 희석제로 희석한 마우스 항-HHLA-2 항체(1/100, 클론 8D2)와 함께 상온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후 조직 절편을 EnVision® 항-마우스 거자무(HRP)-접합 항체(Dako)와 함께 상온에서 30분 동안 항온처리하였다. 3,3'-다이아미노벤지딘 기질(DAB+, Dako)을 적용하여 HRP 가시화를 수행하였다. 단백질 차단 및 1차 항체 항온처리 단계를 제외하고 각 단계 사이에서, 조직 절편을 세척 완충액(0.1mM Tris, pH7.4 + 0.05% Tween 20)으로 5분간 세척하였다. 핵은 헤마톡실린으로 대비염색하였다(도 5a 내지 도 5d).

[0665] 도 11은 HHLA2 및 PD-L1 면역염색 연구를 기초로 계산된 PD-L1 양성 및 음성 비-소 세포 폐암의 HHLA2 발현 백분율을 보여준다(Cheng *et al.* (2018) *Clin. Cancer Res.* 24:1954-1964). NSCLC 집단의 63%가 HHLA2로 표적화 가능성을 보여준다.

[0666] 실시예 4: HHLA2 수용체 식별

[0667] TMIGD2에 대한 특이적 리간드로 HHLA2를 식별하였으며 HHLA2/TMIGD2 상호작용은 AKT-의존적 신호전달 캐스케이드를 통해 인간 T-세포 성장 및 사이토카인 생산을 선택적으로 공동자극한다(Zhu *et al.* (2013) *Nat. Comm.* 4:2043; Janakiram *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2359-2366). 여러 연구에서 공동저해 기능을 발휘하는 활성화 T 세포 상 HHLA2에 대한 2차 수용체가 제안되었다(Zhao *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:9879-9884; Xiao and Freeman *et al.* (2015) *Clin. Cancer Res.* 21:2201-2203; Wang *et al.* (2014) *J. Immunol.* 192:126.11). 본 연구에서, HHLA2에 결합하는 TMIGD2가 확인되었고 새로운 HHLA2 수용체인 KIR3DL3가 확인되었다. 간단히 설명하면, 세포 마이크로어레이 기술(Retrogenix, Whaley Bridge, UK)을 사용하여 슬라이드에 각인한 HEK293 세포 상에 발현되는 3,500개 이상의 서로 다른 원형질막 단백질을 커버하는 4500개 초과 전장 클론의 라이브러리의 가용성 인간 HHLA2-mIg 융합 단백질에 대한 결합을 평가하였다.

[0668] 전체 스크린을 개시하기 전에 먼저 결합 분석 조건을 개발하였다. 양성 대조군 수용체 TMIGD2 또는 음성 대조군 EGFR 형질주입 세포 또는 형질주입하지 않은 세포로 각인된 슬라이드를 대상으로 AF647 표지 항-마우스 IgG 검출 항체를 2:1 물비로 HHLA2-mIgG2와 사전-복합체화한 것으로 검출하거나 연속적으로 첨가하여 검출하는 방법으로 2, 10 및 20µg/ml의 농도에서 가용성 HHLA2-mIgG2a에 대한 특이적 결합을 평가하였다.

[0669] 1차 스크리닝을 위해, 각각 전장 인간 원형질막 단백질을 암호화하는 4,500+ 발현 벡터를 각각 13 마이크로어레이 슬라이드("슬라이드-세트")에 걸쳐 이중으로 어레이하였다.

[0670] 발현 벡터(pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1)를 모든 슬라이드에 4중으로 스폿팅하였고, 모든 슬라이드에서 형질주입 효율의 최소 한계 달성 또는 초과를 확보하기 위해 사용하였다. 이 최소 한계(1.5의 배경을 뛰어넘는 pIRES-

EGFR-ZsGreen1 벡터로부터의 ZsGreen1 신호를 의미)는 이전에 정의되었다.

- [0671] 인간 HHLA2-mIgG2a 융합 단백질을 고정된 형질주입 HEK293 세포 슬라이드에 $20\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가하고, AF647 표지 항-마우스 IgG 검출 항체로 단백질을 검출하였다. 13 슬라이드 세트 각각에 대해 2개의 복제 슬라이드를 스크리닝하였다. ImageQuant 소프트웨어(GE)를 사용하여 형광 이미지를 분석 및 정량(형질주입 효율을 위해)하였다. 단백질 '히트'는 배경 수준과 비교하여 높은 신호를 보이는 중복 스팟으로 정의하였다. ImageQuant 소프트웨어 상에 격자화된 이미지를 사용하여 가시적 검사로 수행하였다.
- [0672] 중복 스팟의 강도에 따라 히트를 '강함, 중간, 약함 또는 매우 약함'으로 분류하였다. 이들의 정체를 이중-확인하기 위해 두 1차 스크린 중 하나 또는 둘 모두에서 확인된 히트를 암호화하는 모든 벡터를 시퀀싱하였다.
- [0673] 임의의 경우 재현될 수 있고 인간 HHLA2에 특이적인 히트(들)를 결정하기 위해, 1차 히트, 추가로 적절한 대조군 KIR 수용체를 암호화하는 모든 벡터를 새로운 슬라이드 상에서 어레이하였다. 1차 스크린에서 사용된 용량 및 항온처리 조건, 및 적절한 양성 및 음성 대조군을 사용하여 동일한 슬라이드를 각 시험 리간드로 스크리닝하였다(처리 당 $n=2$ 슬라이드).
- [0674] 가용성 HHLA2-mIgG2a를 사용하여 >4500 이상의 전장 세포 표면 수용체 클론을 스크리닝한 결과 KIR3DL3가 HHLA2 결합에 대한 히트로 확인되었다. 약 300의 원형질막 클론의 대표적인 세트를 이중으로 스크리닝한 결과는 도 6a와 같다. HHLA2-mIgG2a가 없는 상태에서 AF647 표지 항-마우스 IgG 검출 항체를 첨가한 경우 신호가 생성되지 않았다.
- [0675] 새롭게 어레이한 슬라이드의 확인용 스크리닝으로 HHLA2가 KIR3DL3에 결합하는 것으로 나타났다(도 6a). HHLA2-mIgG2a가 없는 상태에서 AF647 표지 항-마우스 IgG 검출 항체를 단독으로 첨가한 경우 신호가 생성되지 않았다. 슬라이드에 배열된 14 KIR 수용체 패널을 사용하여 KIR3DL3에 결합하는 HHLA2의 선택성을 평가하였다. KIR3DL3에 대한 HHLA2의 선택적인 결합이 증명되었다(표 4 및 도 6b 내지 도 6c).

표 4

KIR 수용체	KIR 3 DL3	KIR 2 DL1	KIR 2 DL2	KIR 2 DL3	KIR 2 DL4	KIR2 DL5A	KIR2 DL5B	KIR 2 DS1	KIR 2 DS2	KIR 2 DS3	KIR 2 DS5	KIR 3 DL1	KIR 3 DS1	KIR 3 DL2
HHLA2 결합	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0676]

실시예 5: 항-인간 HHLA2 mAb의 면역 관문 저해를 확인하기 위한 T 세포 활성화 분석

[0677]

A. 플라스미드 제작

[0678]

[0679] 힌지, 막횡단 및 세포질 도메인을 포함하는 마우스 CD8 α (등록 번호: NP_001074579.1)의 C-말단 도메인(113 내지 220 잔기)에 항-인간 CD3 mAb OKT3의 단일 사슬 가변 단편(scFv)(Kipriyanov *et al.* (1997) *PEDS* 10:445-453)을 융합하여 TCR 활성체인 막-고정 키메라 항체를 제작하였다. 이렇게 하여, T 세포 활성화제로 항-CD3 scFv를 CHO-K1 세포 표면에 고정하였다. TCR 활성체를 암호화하는 DNA 서열을 합성하고 pIRES-hyg3 벡터(Clontech)에 삽입하여 작제물 TCR α pIRESHyg3를 만들었다.

[0680]

인간 HHLA2(등록 번호:NP_009003.1) 및 TMIGD2 (등록 번호: NM_144615.2)의 DNA 서열을 개별적으로 pIRES-Hyg3 또는 pIRES-Neo3에 클로닝하여 각각 HHLA2_pIRESneo3 및 TMIGD2_pIRESHyg3를 만들었다. KIR3DL3(Genecopoeia의 등록 번호: BC143802.1)의 DNA 서열을 합성하고 puroEIF2 벡터에 삽입하였다.

[0681]

NFAT 리포터는 4 카피의 NFAT 반응 요소에 이은 최소 프로모터의 조절 하의 반딧불 루시페라제 유전자를 함유한다. IL2 리포터는 내생적 IL2 프로모터의 조절 하의 반딧불 루시페라제 유전자를 함유한다. 리포터를 암호화하는 DNA 서열을 pcDNA 3.1에 삽입하여 NFAT-Luc-pcDNA 및 IL2-Luc-pcDNA를 생성하였다.

[0682]

B. 세포주 및 세포 배양

[0683]

부모 Jurkat 세포(클론 E6-1)(ATCC # TIB-152) 및 CHO-K1(ATCC # CCL-61) 세포를 ATCC에서 얻었다. Jurkat 세포는 10% FBS(Life Technologies #26140-079) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Hyclone #SV30010.01)이 보충된 RPMI1640 배지(Life Technologies #A10491-01)를 사용하여 5% CO₂에서 37°C에서 배양하였다.

- [0684] TMIGD2-NFAT-Jurkat 안정화 세포주 배양에서는 TMIGD2 및 NFAT 리포터의 재조합 발현 유지를 확보하기 위해 1000 μ g/ml 제네티신(Geneticin)(Life Technologies #11811031) 및 200 μ g/ml 하이그로마이신(Invitrogen #10687010)을 보충하였다.
- [0685] KIR3DL3-IL2-Jurkat 안정화 세포주 배양에서는 KIR3DL3 및 IL-2 리포터의 재조합 발현 유지를 확보하기 위해 1000 μ g/ml 제네티신 및 250 μ g/ml 푸로마이신(InvivoGen #ant-pr-1)을 보충하였다.
- [0686] CHO 세포는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 F12-K(Hyclone #SH30526.01) 배지에서 유지시켰다. HHLA2-TCR-CHO 안정화 세포주 배양에서는 HHLA2 및 TCR 활성체의 재조합 발현 유지를 확보하기 위해 1000 μ g/ml 제네티신 및 500 μ g/ml 하이그로마이신을 보충하였다.
- [0687] C. Jurkat 리포터 및 CHO 안정화 세포주 생성
- [0688] *Jurkat* 클론: TMIGD2-NFAT-Jurkat 안정화 세포주를 만들기 위해, 전기천공법을 사용하여 *Jurkat* 세포(clone E6-1)를 NFAT_Luc_pcDNA 및 TMIGD2_pIRESHyg3으로 연속적 공동-형질주입하였다. 하이그로마이신 및 G418 이중 선별 및 제한 희석으로 안정화 클론을 생성하였다. 선택된 안정화 세포 클론은 하이그로마이신 및 G418으로 보충한 완전 세포 배양 배지로 유지시켰다. 세포는 RPMI + 10% FBS + 1% P/S + 1000 μ g/ml G418 + 200 μ g/ml 하이그로마이신에서 유지시켰다.
- [0689] KIR3DL3-IL2-Jurkat 안정화 세포주를 만들기 위해, 전기천공법을 사용하여 *Jurkat* 세포(clone E6-1)를 IL2_Luc_pcDNA 및 KIR3DL3_puro로 연속적 공동-형질주입하였다. 푸로마이신 및 G418 이중 선별 및 제한 희석으로 안정화 클론을 생성하였다. 선택된 안정화 세포 클론은 푸로마이신 및 G418으로 보충한 완전 세포 배양 배지로 유지시켰다. 세포는 RPMI + 10% FBS + 1% P/S + 1000 μ g/ml G418 + 250 μ g/ml 푸로마이신에서 유지시켰다.
- [0690] NFAT(*Jurkat*-루시퍼라제) 또는 IL-2 프로모터(*Jurkat*-IL-2) 만을 발현하는 부모 *Jurkat* 클론은 RPMI + 10% FBS + 1% P/S + 1000 μ g/ml G418(BPS Biosciences)에서 유지시켰다.
- [0691] *CHO* 세포 클론: HHLA2-TCR-CHO 안정화 세포주를 만들기 위해, Lipofectamine® 2000(Invitrogen)을 사용하여 CHO-K1 세포를 TCRA_pIRESHyg3 및 HHLA2 pIRESneo3으로 연속적 공동-형질주입하였다. 하이그로마이신 및 G418 이중 선별 및 제한 희석으로 안정화 클론을 생성하였다. 선택된 안정화 세포 클론은 하이그로마이신 및 G418으로 보충한 완전 세포 배양 배지로 유지시켰다. 세포는 F12-K + 10% FBS + 1% P/S + 1000 μ g/ml G418 + 500 μ g/ml 하이그로마이신에서 유지시켰다.
- [0692] 항-CD3 scFv를 발현하는 부모 CHO 클론은 F12-K + 10% FBS + 1% P/S + 500 μ g/ml 하이그로마이신(BPS Biosciences)에서 유지시켰다.
- [0693] D. Jurkat 리포터 유전자 분석
- [0694] *TMIGD2 NFAT Jurkat 리포터 유전자 공동-자극 분석 및 HHLA2 항체에 의한 저해*: HHLA2-TCR-CHO 세포를 흰색 불투명한 바닥의 96-웰 플레이트에서 CHOK1 성장 배지에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 5% CO₂에서 37°C에서 밤새 배양한 후 세포를 플레이트에 부착하였다. 다음 날, 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하고, 50 μ l의 *Jurkat* 세포 배지에 항-HHLA2 항체를 첨가하고 50 μ l의 *Jurkat* 세포 배지 내 4 내지 5×10^4 세포/웰의 TMIGD2-NFAT-Jurkat 리포터 세포주를 첨가하기 전에 HHLA2-TCR-CHO 세포를 1시간 동안 배양하였다. 플레이트 웰을 혼합하고 약 3 내지 6시간 동안 배양하였다. 루시퍼라제 신호를 전개하기 위해, 권장 프로토콜에 따라 100 μ l의 ONE-Step™ 루시퍼라제 분석 시스템(BPS Bioscience, Cat. #60690)을 각 웰에 첨가하였다. 루미네선스는 루미노미터를 사용하여 읽었다.
- [0695] *KIR3DL3 IL2 Jurkat 리포터 유전자 저해 분석 및 HHLA2 항체에 의한 반전*: HHLA2-TCR-CHO 세포를 흰색 불투명한 바닥의 96-웰 플레이트에서 CHOK1 성장 배지에 2×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 5% CO₂에서 37°C에서 밤새 배양한 후 세포를 플레이트에 부착하였다. 다음 날, 각 웰에서 배지를 조심스럽게 제거하고, 50 μ l의 *Jurkat* 세포 배지에 항-HHLA2 항체를 첨가하고 50 μ l의 *Jurkat* 세포 배지 + 2 μ g/ml 항 CD28 항체(BPS Bioscience #100186)(웰당 100 μ l 분석 혼합물 내 1 μ g/ml의 최종 농도) 내 4 내지 5×10^4 세포/웰의 KIR3DL3-IL2-Jurkat 리포터 세포주를 첨가하기 전에 HHLA2-TCR-CHO 세포를 1시간 동안 배양하였다. 플레이트 웰을 혼합하고 약 5시간 동안 배양하였다. 루시퍼라제 신호를 전개하기 위해, 권장 프로토콜에 따라 100 μ l의 ONE-Step™ 루시퍼라제 분석

시스템(BPS Bioscience, Cat. #60690)을 각 웰에 첨가하였다. 루미네선스는 루미노미터를 사용하여 읽었다.

[0696]

이 재료 및 방법을 사용하여, 도 14 및 아래 표 9에 나타난 바와같이 TMIGD2/HHLA2 T 세포 공동-자극 분석에서 HHLA2 mAb 또는 아이소타입 대조군 항체의 공동-자극 차단에 대해 평가하였다.

표 9

TMIGD2/HHLA2 T 세포 공동-자극 분석에서 HHLA2 mAb의 평가에 대한 연구 개요

응답 Jurkat NFAT 세포	CHO 세포 자극	예상 반응
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-부모 세포	없음
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv	활성화
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv/HHLA2	강화된 활성화
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv/HHLA2 + HHLA2 mAb	강화된 활성화의 반전

[0697]

항-CD3 scFv 및 HHLA2로 형질주입한 CHO 세포 상 HHLA2의 발현을 검출하였다(도 15). TMIGD2로 형질주입한 Jurkat NFAT 리포터 세포 상 TMIGD2의 발현도 검출하였다(도 16). 항-CD3 scFv 및 HHLA2를 발현하는 CHO 세포 및 TMIGD2를 발현하는 Jurkat NFAT 리포터 세포를 T 세포 공동-자극 분석에 사용하였다. HHLA2 mAb(6F10)는 HHLA2에 의해 유도된 활성화 강화를 역전시키는 반면 아이소타입 대조군 항체는 이러한 효과가 없는 것으로 나타났다(도 17).

[0699]

도 18 및 아래 표 10에 나타난 바와같이 KIR3DL3/HHLA2 T 세포 저해 분석에서 HHLA2 mAb 또는 아이소타입 대조군 항체의 관문 차단에 대해서도 평가하였다.

표 10

KIR3DL3/HHLA2 T 세포 체크포인트 분석의 연구 개요(Jurkat T 세포 IL-2 리포터 유전자 분석)

응답 Jurkat NFAT 세포	CHO 세포 자극	예상 반응
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-부모 세포	없음
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-항-CD3 Fv	활성화
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-항-CD3 Fv/HHLA2	억제
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-항-CD3 Fv/HHLA2 + HHLA2 mAb	억제의 반전

[0700]

KIR3DL3으로 형질주입한 Jurkat-IL-2 리포터 세포 상 KIR3DL3의 발현을 검출하였다(도 19a 및 도 19b). 항-CD3 scFv 및 HHLA2를 발현하는 CHO 세포 및 KIR3DL3을 발현하는 Jurkat-IL-2 리포터 세포를 T 세포 저해 분석에 사용하였다. HHLA2 mAb(클론 6F10 및 클론 2C4)는 HHLA2에 의한 저해를 역전시키는 반면 아이소타입 대조군 항체는 이러한 효과가 없는 것으로 나타났다(도 20a 내지 도 20c 및 도 21a 내지 도 21c). KIR3DL3 선택적 HHLA2 mAb 클론 2C4는 TMIGD2에 의해 매개되는 공동-자극을 차단하지 않았다(도 22).

[0702]

본 명세서에 개시된 데이터는 TMIGD2가 HHLA2에 대한 T 세포 공동-자극 수용체라는 것과 HHLA2 mAb가 TMIGD2 공동-자극을 차단한다는 것을 증명한다. 이들 데이터는 또한 KIR3DL3가 HHLA2에 대한 T 세포 저해 수용체라는 것과 HHLA2 mAb가 관문 차단물질이라는 것을 증명한다.

[0703]

HHLA2 mAb를 평가하기 위해 추가적인 분석을 사용할 수 있다. 예를 들어, 항-인간 HHLA2 mAb의 면역 관문 저해를 평가하기 위해 CD4 T 세포 및 동종이형 단핵구-유래 DC 또는 대식세포를 사용하는 것과 같은 동종이형-자극 T 세포 분석을 사용할 수 있다. 이러한 방법은 문헌[Wang *et al.* (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2:846 및 Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257]에 개시된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다.

[0704]

일부 실시형태에서, HHLA2를 수지상 세포 및 대식세포에서 발현시킨다. 수지상 세포 배양을 유도하는 방법은 예를 들어 문헌[Zhao *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:9879 및 Zhu *et al.* (2013) *Nat. Comm.* 4:2043]에서와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다.

- [0705] 일부 실시형태에서, 단핵구 정제 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC에서 분리된 단핵구를 배양하고 50ng/ml IL-4 및 100ng/ml GM-CSF(R&D Systems)와 함께 7일 동안 배양하여 단핵구-유래 미성숙 DC(iDC)를 생성한다. 단핵구-유래 활성화 DC는 단핵구 정제 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC에서 분리된 단핵구를 배양하고 1 µg/ml LPS 및 100ng/ml IFN-감마 또는 폴리 IC와 함께 7일 동안 배양하여 생성할 수 있다.
- [0706] 일부 실시형태에서, 단핵구 정제 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC에서 분리된 단핵구를 배양하여 대식세포를 생성하고 100ng/ml LPS + 100ng/ml IFN-g 또는 폴리 IC의 존재 내에서 3일 동안 배양한다.
- [0707] 수지상 세포 및 대식세포 배양물은 HHLA2, TMIGD2(CD28H) 및 PD-L1의 발현에 대해서 이들에 대한 항체를 사용한 유세포 분석에 의해 평가될 수 있다.
- [0708] T 세포 증식을 측정하기 위해 동종이형-자극 T 세포 활성화 분석을 사용할 수 있다. 간단히 설명하면, 일부 실시형태에서, 상기 기술된 바와 같이 유래된 CD4⁺ T 세포(1×10^5) 및 동종이형 DC(1×10^4) 또는 대식세포를 항-인간 HHLA-2, PD-1(니볼루맵) 및 아이소타입 대조군 항체와 함께 또는 항체 없이 10:1(T/DC) 비율로 6일 동안 공동-배양한다. 5일에 배양 상등액 내 IFN-감마 분비를 ELISA(BD biosciences 또는 R&D systems 키트)로 측정한다. 6일에서의 T 세포 증식을 유세포 분석을 사용하여 CFSE 회색으로 측정한다.
- [0709] 일부 실시형태에서, T 세포 활성화를 확인하기 위해 SEB-자극 PBMC 활성화 분석(예를 들어, Wang *et al.* (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2:846 참조)을 사용하는 것과 같이 IL-2 및 IFN-감마 수준을 사용할 수 있다. 예를 들어, 건강한 공여체의 PBMC(10^5 세포)를 1, 0.1 및 0.01 µg/ml 농도의 포도상구균 엔테로톡신 B(SEB; Toxin Technology)의 존재 내에서 포화 농도의 항-인간 HHLA-2, PD-1(니볼루맵) 및 아이소타입 대조군 항체와 함께 또는 항체 없이 3일 동안 공동-배양할 수 있다. 배양 상등액 내 IL-2 및 IFN-감마 수준을 ELISA 또는 다중 분석(BD Biosciences)으로 측정할 수 있다.
- [0710] 다른 실시형태에서, T 세포 활성화를 확인하기 위해 CMV 용해물-자극 PBMC 활성화 리콜 분석을 사용할 수 있다(예를 들어, Sinclair *et al.* (2004) *Viral Immunol.* 17:445 및 Wang *et al.* (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2:846 참조). 예를 들어, CMV-양성 공여체의 PBMC(2×10^5 세포)를 항-인간 HHLA-2, PD-1(니볼루맵) 및 아이소타입 대조군 항체와 함께 및 항체 없이 공동-배양하고 CMV-감염 세포(3 µg/ml, Advanced Biotechnologies)의 용해물로 4일 동안 자극할 수 있다. 배양 상등액 내 IFN-감마 분비를 ELISA(BD biosciences 또는 R&D systems 키트)로 측정할 수 있다. T 세포 증식은 유세포 분석을 사용한 CFSE 회색으로 측정할 수 있다.
- [0711] 일부 실시형태에서, T 세포 활성화를 확인하기 위해 종양-기반 혼합 림프구 반응(MLR) 분석을 사용할 수 있다(예를 들어, McWhirter *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1041 참조). 예를 들어, 단핵구 정제 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 PBMC에서 분리된 단핵구를 배양하고 500U/ml IL-4, 800U/ml GM-CSF 및 100 µg/ml의 IFN-감마와 함께 5일 동안 배양하여 수지상 세포(DC)를 생성할 수 있다. 혼합 림프구 배양은 48시간 동안 항-HHLA2 mAb 또는 아이소타입 대조군(10 µg/ml)의 존재 내에서 수지상 세포(2×10^5), 동종이형 CD3⁺ T 세포(1×10^6) 및 조사된 HHLA2 발현 종양 세포(2×10^5)를 배양하는 방법을 사용하여 24-웰 플레이트에 셋업할 수 있다. 상등액을 수집하고 다중 사이토카인 분석 키트를 사용하여 사이토카인 생성을 평가한다.
- [0712] 일부 실시형태에서, T 세포 활성화를 확인하기 위해 Jurkat T 세포 NFAT-Luc 리포터 유전자 분석을 사용할 수 있다(예를 들어, 문헌[the BPS bioscience website and Wang *et al.* (2017) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145:247] 참조). 예를 들어, NFAT-루시페라제 리포터 유전자 카세트(BPS bioscience) 및 KIR3DL 수용체(아래 분석 #1 참조) 또는 TMIGD2 수용체(아래 분석 #2 참조)로 형질주입한 Jurkat T 세포를 항-HHLA2 mAb의 존재 또는 부재 내에서 막형단 항-CD3 scFV(BPS bioscience) 및 HHLA2로 형질주입한 CHO 세포로 자극한다(도 7). 예시적인 Jurkat NFAT 리포터 유전자 분석 형태는 아래 표 5에 나열되어 있다. 5×10^4 CHO 세포를 96-웰 분석 플레이트에 접종하고 12 내지 14시간 동안 배양한다. 부착한 CHO 세포를 10 µg/ml의 항-HHLA2 mAb 또는 아이소타입 대조군과 함께 37°C에서 1시간 동안 전-배양한다. 1×10^5 Jurkat 세포를 CHO 세포와 함께 6시간 동안 공동-배양하고 루미네스스 기질을 첨가하고 루미노미터를 사용하여 루시페라제 유닛을 정량한다.

표 5

분석 #1: KIR3DL3 분석		
응답 Jurkat NFAT 세포	CHO 세포 자극	반응
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (등록 # BC143802.1)	CHO-부모 세포	활성화 없음
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (등록 # BC143802.1)	CHO-항-CD3 Fv(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	활성화
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (등록 # BC143802.1)	CHO-항-CD3 Fv/HLA2(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	억제
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (등록 # BC143802.1)	CHO-항-CD3 Fv/HLA2 + 항-HLA2 6F10 mAb(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	억제의 반전
분석 #2: TMIGD2 분석		
응답 Jurkat NFAT 세포	CHO 세포 자극	반응
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-부모 세포	활성화 없음
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	활성화
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv/HLA2(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	활성화 강화
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-항-CD3 Fv/HLA2 + 항-HLA2 6F10 mAb(PD-1 분석에 사용된 항-CD3 클론과 같음)	활성화 강화의 반전

[0713]

[0714] 실시예 6: HHLA2 mAb 활성의 생체 내 확인 및 동물 모델 개발

[0715] 추가로, 항체의 생체 내 특성결정 방법이 문헌[Wang *et al.* (2014) *Cancer Immunol. Res.* 2:846, Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257, Zhao *et al.* (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:9879, Zhu *et al.* (2013) *Nat. Comm.* 4:2043 및 Sinclair *et al.* (2004) *Viral Immunol.* 17:445]에 기술된 바와 같이 이 분야에 잘 알려져 있다. 설치류, 개 및 다른 기존 종양 모델 중에 HHLA2 경로가 없어 새로운 동물 종양 또는 약리학 모델이 필요하다.

[0716] 일부 실시형태에서, 키메라 항원 수용체-T 세포(CAR-T) 모델을 사용한다(도 8). 예를 들어, NSG 마우스에 탄산무수화효소 IX(CAIX), HHLA2 및 PD-L1을 발현하는 인간 신장암 세포주를 이식한다. 항-탄산무수화효소 IX(CAIX)-표적화 키메라 항원 수용체(항-CAIX CAR T 세포) 및 PD-1 및 KIR3DL 수용체를 발현하는 인간 T 세포(CAR-T)를 항-HHLA2 또는 KIR3DL mAb 단독 또는 항-PD-1/L-1 mAb와 조합으로 정맥 내로 주사한다. 종양 성장을 루시페린 IP 주사 후 생물루미네선스 이미징으로 정량한다(예를 들어, Suarez *et al.* (2016) *Oncotarget* 7:34341에 기술된 바와 같이).

[0717] 일부 실시형태에서, SCID 마우스의 CAR-T 세포 종양 모델을 개발한다. HeLa-CD19-HHLA2 종양을 갖는 SCID 마우스에 HHLA2 mab 및 CD19/KIR3DL3 CAR-T 세포를 투여하고, 종양 성장 저해를 평가한다. 6-주령의 암컷 SCID 마우스(Jackson Laboratories, 바하버, 메인주)가 유용하다. 2×10^6 HeLa-CD19 또는 HeLa-CD19 + HHLA2 세포를 함유하는 $100 \mu\text{l}$ 의 멸균 PBS를 0일에 각 마우스에 피하(SC) 주사한다. PBS 내 CAR-T 세포를 19일(5×10^6 세포) 및 33일(9×10^6 세포)에 종양 내로 주사하고, 매일 종양 성장이 이루어진다. 매주 3회 복강내(IP) 투여로 항체를 투여한다. 1주에 두 번 체중을 모니터한다. 캘리퍼로 매일 종양 크기를 측정하고 공식 $W^2L/2$ 를 사용하여 종양 부피(mm^3 단위)를 결정하는데, 여기서 W는 종양의 넓이이고 L은 종양의 길이이다. 연구 기간은 약 45일이고 팔당 10마리 마우스를 사용한다. 항체의 PK 프로파일을 기초로 HHLA2 mAb를 마우스에 투여한다.

[0718] 실험의 끝에, 종양을 절제하고, 말단 출혈을 일으키고 ELISA 및 FACS 분석을 위해 혈청을 보관한다. 종양을 수집하고, 무게를 측정하고 종양의 절반을 신선하게 동결하고 절반을 4% 파라포름알데하이드에 고정하고, 이후 H&E 염색 및 면역조직화학(IHC)을 위해 파라핀에 포매시킨다. 예시적인 CD19/KIR3DL3 CAR-T 세포 종양 모델 형태는 아래 표 12에 나열되어 있다.

표 12

생체 내 CD19/KIR3DL3 CAR-T 세포 종양 모델에서의 HHLA2 mAb 평가

종양	처리	예상 결과
HeLa/CD19/HHLA2	T 세포 처리하지 않음	종양 성장
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19	종양 성장 억제
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/ KIR3DL3 + 아이소타입 대조군	종양 성장
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3 + HHLA2 mAb	종양 성장 억제

[0719]

[0720]

일부 실시형태에서, 필리핀원숭이에서 T 세포 증식, 사이토카인 및/또는 T 세포-의존성 항체 반응(TDAR)을 확인하는 항원 프라임 및 부스트 분석을 사용하여 HHLA2 mAb가 생체 내 활성을 갖는다는 것을 확인한다. 일부 실시형태에서, 필리핀원숭이 KLH 항원 공격 T 세포 모델을 생성하고 사용한다(도 24a 및 도 24b). 예를 들어, 항-HHLA2 mAb를 정맥 내 투여한 필리핀원숭이를 2일째에 불완전 프로인트 보조제 내 KLH(0.1mg)로 면역화하고 14일 후 불완전 프로인트 보조제 내 낮은 투여량의 KLH로 부스트한다. 면역분석을 사용하여 면역화-전 및 -후 출혈의 항-KLH IgG 항체 생산 강화에 대해 평가한다. 1일에 필리핀원숭이를 HHLA2 mAb로 처리하고 HHLA2 mAb를 매주 2 내지 50 mg/kg으로 IV 주사한다. 항-HHLA2 mAb 투여-전 및 -후 필리핀원숭이에서 단리된 PBMC의 T 세포 의존성 항-KLH 항체 반응을 평가하고, Ki67 염색 및 유세포 분석으로 T 및 NK 세포 증식을 평가하고, 생체 내 CD107a FACS 염색 또는 K562 세포에 대한 생체 외 세포독성 분석으로 NK 세포독성을 평가한다. 일부 실시형태에서, 필리핀원숭이 SIV 모델을 개발하고 생체 내 HHLA2 mAb를 평가하기 위해 사용한다.

[0721]

일부 실시형태에서, 인간화 SRG-15 마우스 종양 모델을 사용하고 인간화 SRG-15(Flavell) 또는 NSG-15(Greiner) 마우스 내 인간 종양에서의 HHLA2 mAb의 효과를 시험한다(도 23a 내지 도 23c; Herndler-Brandstetter D *et al.* (2017) 114:E9626-E9634).

[0722]

실시예 7: HHLA2 mAb 세포 결합 및 수용체 차단 특성결정

[0723]

HHLA2 mAb 결합 및 차단 특성을 분석하였다. 예를 들어, HHLA2에 결합하는 HHLA2 mAb에 대한 EC50 및 TMIGD2 또는 KIR3DL3에 결합하는 HHLA2의 HHLA2 mAb 차단 IC50을 검출하였다. 유세포 분석으로 형질주입 293T 세포 상의 TMIGD2 및 KIR3DL3의 발현을 검출하였다(도 12a 및 도 12b). TMIGD2 및 KIR3DL3 형질주입 293T 세포에 결합하는 HHLA2-Fc를 확인하였다(도 12c 및 도 12d). HHLA2, TMIGD2 또는 KIR3DL3을 발현하는 안정적-형질주입 300.19 전구-B 세포도 생성하였다.

[0724]

이후 HHLA2 mAb 세포 결합 및 수용체 차단 실험을 수행하였다. 일 실험에서, 서로 다른 농도의 HHLA2 mAb를 HHLA2-형질주입 300.19 전구-B 세포와 함께 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 형질주입 300.19 세포에 결합하는 HHLA2 mAb를 PE-표지 염소 항-마우스 IgG(H+L)로 검출하였다. HHLA2 mAb 차단 실험을 위해, 서로 다른 농도의 HHLA2 mAb를 4µg/ml의 HHLA2-mIgG2a와 함께 1:1 비율로 30분 동안 전-항온처리하고 TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 293T 세포에 첨가하고 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 293T 세포에 결합하는 HHLA2-mIgG2a를 PE-표지 Fab2 염소 항-mIgG2a 항체로 검출하였다. Graph Pad Prism을 사용하여 EC50 및 IC50 분석을 수행하였다. 데이터는 표 6과 같다. HHLA2 mAb 클론 2C4는 원하는 완전한 KIR3DL3 차단 및 부분적 TMIGD2 차단 특성을 갖는 것으로 나타났다(표 6).

표 6

HLA2 mAb 세포 결합 및 수용체 차단 실험 #1

HLA2 mAb (아이스타입)	HLA2 결합 EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	TMIGD2 차단 IC50 ($\mu\text{g/ml}$)		KIR3DL3 차단 IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	
1C8 (IgG2a)	0.63	+	1.65	+	1.15
2C4 (IgG1)	0.24	+/-	28.2	+	0.52
2G2 (IgG1)	0.21	+	0.85	+	0.53
4D1 (IgG1)	0.44	+	0.56	+	0.68
8D10 (IgG1)	22.5	+/-	11.7	+/-	7.0
8F10 (IgG1)	0.25	+	0.55	+	0.9

¹HLA2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 세포주에 결합하는 HHLA2 mAb

²TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 293T 세포에 결합하는 HHLA2-mIgG2a의 HHLA2 mAb 차

단(일시적)

[0725]

[0726]

다른 실험에서, 서로 다른 농도의 HHLA2 mAb를 HHLA2-형질주입 300.19 전구-B 세포와 함께 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 형질주입 300.19 세포에 결합하는 HHLA2 mAb를 PE-표지 염소 항-마우스 IgG(H+L)로 검출하였다. HHLA2 mAb 차단 실험을 위해, 서로 다른 농도의 HHLA2 mAb를 4 $\mu\text{g/ml}$ 의 HHLA2-mIgG2a와 함께 1:1 비율로 30분 동안 전-항온처리하고 TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 300.19 전구-B 세포에 첨가하고 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 300.19 전구-B 세포에 결합하는 HHLA2-mIgG2a를 PE-표지 Fab2 염소 항-mIgG2a 항체로 검출하였다. Graph Pad Prism을 사용하여 EC50 및 IC50 분석을 수행하였다. 데이터는 표 7과 같다. HHLA2 mAb 클론 2C4는 원하는 완전한 KIR3DL3 차단 및 부분적 TMIGD2 차단 특성을 갖는 것으로 나타났다(표 7).

표 7

HLA2 mAb 세포 결합 및 수용체 차단 실험 #2

HLA2 mAb (아이스타입)	HLA2 결합 EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	TMIGD2 차단 IC50 ($\mu\text{g/ml}$)		KIR3DL3 차단 IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	
2C4 (IgG1)	0.29	+/-	7.3	+	0.97
5H4 (IgG1)	2.03	+/-	9.63	+	1.25
8F10 (IgG1)	0.22	+	0.92	+	0.74
8G8 (IgG1)	2.14	+/-	10.85	+	1.18

¹HLA2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 세포에 결합하는 HHLA2 mAb

²TMIGD2 또는 KIR3DL3 형질주입 300.19 전구-B 세포에 결합하는 HHLA2-mIgG2a의

HHLA2 mAb 차단

[0727]

[0728]

인간 및 필리핀원숭이 HHLA2에 대한 서로 다른 HHLA2의 결합 또한 시험하였고 EC50 결합 분석을 수행하였다(도 13a 및 도 13b). 서로 다른 농도의 HHLA2 mAb를 인간 또는 필리핀원숭이 HHLA2-형질주입 300.19 전구-B 세포와 함께 4°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 형질주입 300.19 세포에 결합하는 HHLA2 mAb를 PE-표지 염소 항-마우스 IgG(H+L)로 검출하였다. Graph Pad Prism을 사용하여 EC50 분석을 수행하였다. 데이터는 표 8과 같다.

표 8

인간 및 필리핀원숭이 hhlA2에 결합하는 HHLA2

HHLA2 mAb(아이소타입)	¹ 인간 HHLA2 결합 EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	필리핀원숭이 HHLA2 결합 EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
2C4 (IgG1)	0.29	0.47
5H4 (IgG1)	2.03	결합 없음
8F10 (IgG1)	0.22	0.40
8G8 (IgG1)	2.14	결합 없음

¹HHLA2 형질주입 300.19 마우스 전구-B 세포에 결합하는 HHLA2 mAb

²필리핀원숭이 형질주입 300.19 전구-B 세포에 결합하는 HHLA2 mAb

[0729]

[0730]

실시예 8: 시험관 내 HHLA2 mAb 활성 확인

[0731]

일부 실시형태에서, CD19 및 KIRDL3을 발현하는 CAR-T 세포(CAR-T/CD19/KIRDL3)의 HeLa-CD19 및 HHLA2 발현 표적 종양 세포에 대한 세포독성을 HHLA2 mAb의 존재 또는 부재 하에서 평가한다. CAR-T/CD19/KIRDL3를 생성한다. 항-CD19 scFv 및 KIR3DL3를 발현하는 렌티바이러스 플라스미드를 제작하고 GM-CSF의 분비성 신호 펩타이드, CD28의 힌지 영역, 막횡단 도메인 및 공동자극 도메인, 및 CD3 ζ 활성화 도메인을 함유하는 2차-생성 CAR 카세트에 서브클로닝한다. 천만개의 성장-정지 HEK293FT 세포를 T75 플라스크에 접종하고 밤새 배양한 다음 CalPhosTM 형질주입 키트(Takara, 캘리포니아주 마운틴뷰 소재)를 사용하여 pPACKH1 렌티벡터 패키징 믹스(System Biosciences, 캘리포니아주 팰로앨토 소재) 및 10 μl 의 각 항-CD19 scFv 및 KIR3DL3 함유 렌티바이러스 벡터로 형질주입한다. 하루 후, 배지를 새로운 배지로 교체하고, 48시간 후 렌티바이러스-함유 배지를 수집한다. 2100g로 30분 동안 원심분리하여 배지에서 세포 잔해를 제거한다. 112,000g로 100분 동안 원심분리하여 바이러스 입자를 수집하고, 분취하고 -80°C에 동결시킨다. Lenti-XTM qRT-PCR 키트를 사용한 정량적 RT-PCR로 바이러스 체제의 역가를 결정한다.

[0732]

10% FBS 및 300U/ml IL-2 함유 AIM V 배지에 1×10^6 세포/ml로 현탁하고, 같은 수(1:1 비율)의 CD3/CD28 Dynabeads(Thermo Fisher)와 혼합하고, 무-처리 24-웰 플레이트에서 배양(웰당 0.5ml)한 인간 말초 혈액 단핵 세포(승인된 IRB 프로토콜에 따라 다나 파버 암 연구소가 제공함)로부터 PBMC를 분리한다. 24 및 48시에, 렌티바이러스를 5의 감염다중도(MOI)로 1 μl 의 TransPlusTM 형질도입 인헨서(AiStem)와 함께 배양액에 첨가한다. 다음 2주에 걸친 T 세포 증식에 따라, 매 2 내지 3일마다 세포수를 세고 300U/ml IL-2와 함께 신선한 배지를 배양액에 첨가하여 세포 밀도를 1 내지 3×10^6 세포/ml로 유지하였다. 항-CD4, CD8 및 CD19 항체를 사용한 유세포 분석으로 CAR 발현을 평가한다. 따라서, 형질도입 전에, 항-CD3 항체와 항-CD28 항체 조합으로 공동자극하여 T 세포를 활성화한다. 외인성 IL-2의 존재를 통해 일반적으로 2주 안에 CAR-T 세포가 배양액 내에서 빠르게 확장된다. 이 CAR은 이하 CAR-T/CD19/KIRDL3이라고 한다.

[0733]

HHLA2 형질주입 HeLa-CD19 세포를 생성한다. Lipofectamine® 2000(Invitrogen)으로 HeLa-CD19 발현 세포에 HHLA2_pIRESneo3을 형질주입한다. G418 선별 및 제한 희석으로 안정화 클론을 생성하고 유세포 분석으로 HHLA2 발현을 평가한다.

[0734]

실시간 세포독성 분석(RTCA)에서 시험관 내 1차 T 세포의 KIR3DL3 저해를 수행한다. 부착 표적 세포(HeLa 또는 HeLa-CD19)를 96-웰 E-플레이트(Acea Biosciences, 캘리포니아주 샌디에고 소재)에 웰당 1×10^4 세포로 접종하고 임피던스-기반 실시간 세포 분석(RTCA) xCELLigence 시스템(Acea Biosciences)으로 밤새 배양을 모니터링한다. 다음 날, 배지를 제거하고 10% FBS $\pm 1 \times 10^5$ 이펙터 세포(CAR-T/CD19/KIRDL3 세포 또는 비-형질도입 T 세포) 함유 AIM V-A1buMAX® 배지로 교체한다(3반복). 다른 2 내지 3일 동안 RTCA 시스템으로 E-플레이트 내 세포를 모니터링하고, 시간에 걸쳐 임피던스 플로팅한다. (이펙터 세포가 없는 상태에서의 표적 세포의 임피던스 - 이펙터 세포가 있는 상태에서의 표적 세포의 임피던스) $\times 100$ / 이펙터 세포가 없는 상태에서의 표적 세포 임피던스로 세포용해를 계산한다.

[0735]

사이토카인 분비도 평가한다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 유도 분석을 수행한다. 예를 들어, 10% FBS 함유

AIM V-A1buMAX® 배지 200mL이 담긴 U자형-바닥 96-웰 플레이트에서 HeLa-CD19/HLA2 표적 세포를 이펙터 CAR-T/CD19/KIRDL3 세포 또는 비-형질도입 T 세포와 함께 1:1 비율(각각 1×10^4 세포)로 3반복 배양한다. 16시간 후, 배지의 상부 150mL을 V자형-바닥 96-웰 플레이트로 옮기고 300g로 5분 동안 원심분리하여 임의의 잔여 세포를 펠렛화한다. 상등액의 상부 120mL을 새로운 96-웰 플레이트에 옮기고 Thermo Fisher의 키트를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 ELISA로 인간 IFN- γ 및 IL-2 수준을 분석한다.

[0736] 예시적인 CAR-T 세포 세포독성 모델 시험관 내 형태는 아래 표 11에 나열되어 있다.

표 11

시험관 내 CAR-T 세포 세포독성 모델에서 HHLA2 mAb 평가

종양	처리	예상 결과
HeLa/CD19/HLA2	T 세포 처리하지 않음	활성화 없음
HeLa/CD19/HLA2	CAR-T/aCD19	T 세포 활성화
HeLa/CD19/HLA2	CAR-T/aCD19/ KIR3DL3 + 아이소타입 대조군	T 세포 활성화 억제
HeLa/CD19/HLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3 + HHLA2 mAb	T 세포 활성화 반전

[0737]

[0738] 일부 실시형태에서, NK 세포독성 분석의 KIR3DL3 저해를 수행한다. KIR3DL3 형질주입 NK92 세포를 생성한다. 예를 들어, NK92 세포에 KIR3DL3 puroEIF2 벡터를 형질주입하고 푸로마이신 저항성으로 선별하고 유세포 분석으로 KIR3DL3 발현을 검출한다.

[0739] HHLA2 형질주입 K562 표적 세포를 생성한다. 예를 들어, 표적 K562 세포에 HHLA2 pIRESneo3를 형질주입하고 네오마이신 저항성으로 선별하고 유세포 분석으로 HHLA2 발현을 검출한다.

[0740] HHLA2 mAb의 존재 또는 부재 하의 4시간 세포독성 분석에서 KIR3DL3를 형질주입한 NK92 세포의 K562 세포(+ 또는 - HHLA2)에 대한 NK 세포독성을 서로 다른 E/T 비율에서 평가한다. 예시적인 CAR-T 세포 세포독성 모델 시험관 내 형태는 아래 표 13에 나열되어 있다.

표 13

NK 세포독성 모델에서 HHLA2 mAb 평가

이펙터 NK 세포	표적 K562 세포	예상 반응
NK92/ KIRDL3	K562	세포독성
NK92/ KIRDL3	K562/HLA2 + 아이소타입 대조군	세포독성 억제
NK92/ KIRDL3	K562/HLA2+ HHLA2 mAb	세포독성

[0741]

[0742] 일부 실시형태에서, Jurkat T 세포 내 KIR3DL3 신호전달 경로를 연구한다.

[0743] 참조문헌 통합

[0744] 본 명세서에 언급된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은 마치 각 개별 공개, 특허 또는 특허 출원이 구체적 및 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시되는 것과 같이 그 전체가 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 상충되는 경우, 본 명세서의 임의의 정의를 포함하는 본 출원이 우선한다.

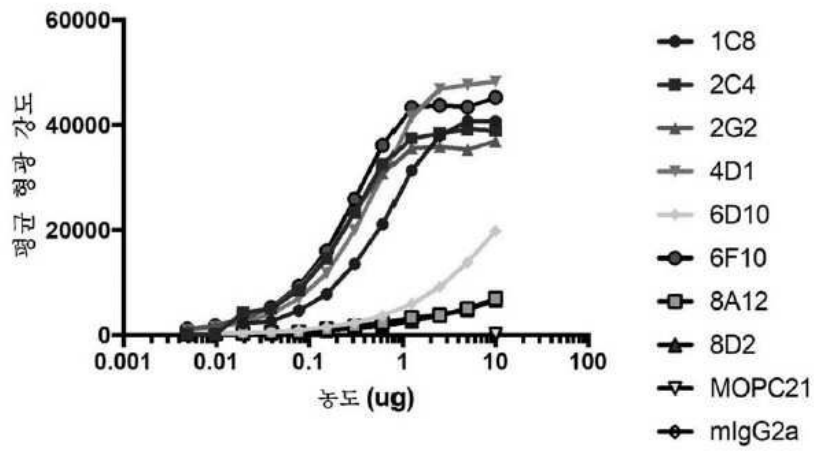
[0745] 또한 TIGR(The Institute for Genomic Research)에 의해 tigr.org 웹 상에 유지관리되는 것 및/또는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 의해 ncbi.nlm.nih.gov 웹 상에 유지관리되는 것과 같이, 공개 데이터베이스 등록과 관련된 등록 번호를 참조하는 임의의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열도 그 전체가 참조로 포함된다.

[0746] 등가물

[0747] 당업자는 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 실시형태에 대한 많은 등가물을 일상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위에 포함되도록 의도된다.

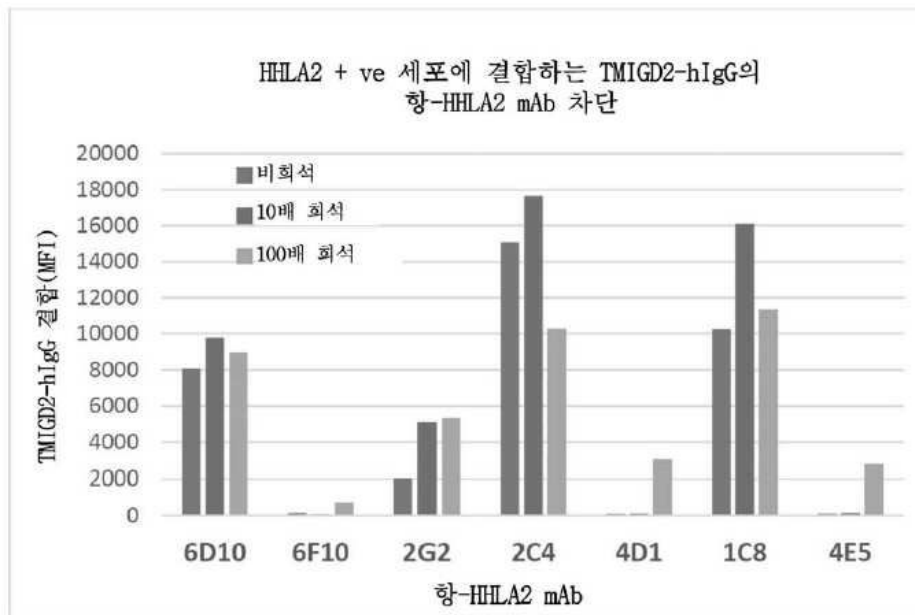
도면

도면1a

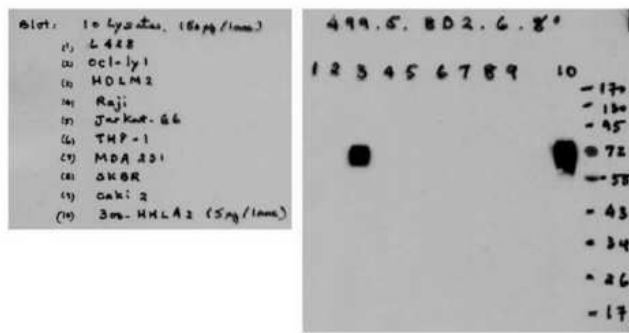


	1C8	2C4	2G2	4D1	6D10	6F10	8A12	8D2
EC-50	0.63	0.24	0.21	0.44	22.49	0.25		
기능	비차단제	증강제	약차단제	차단제	비차단제	차단제	IHC WB	IHC WB

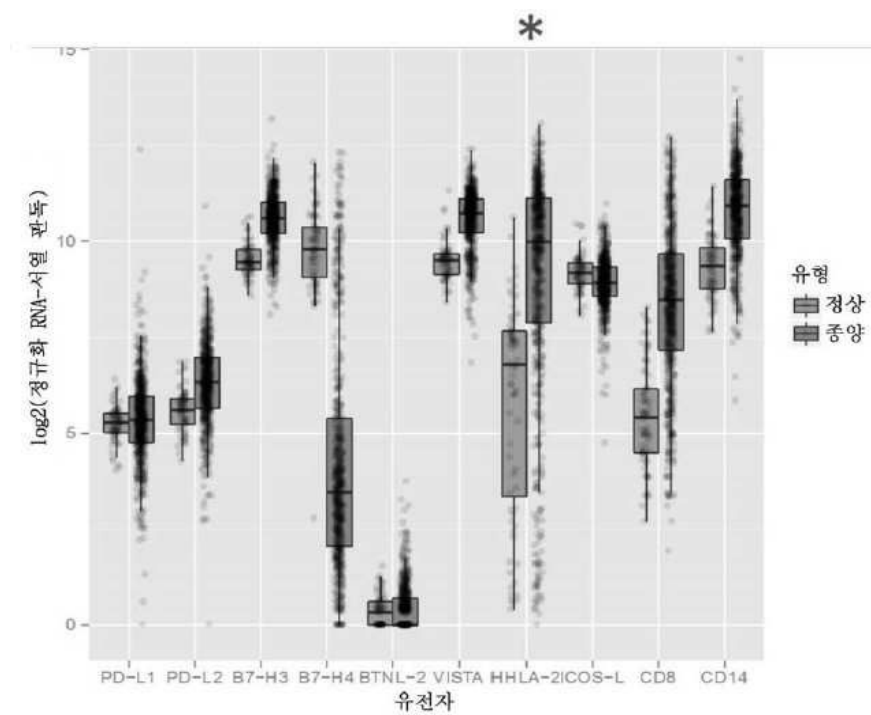
도면1b



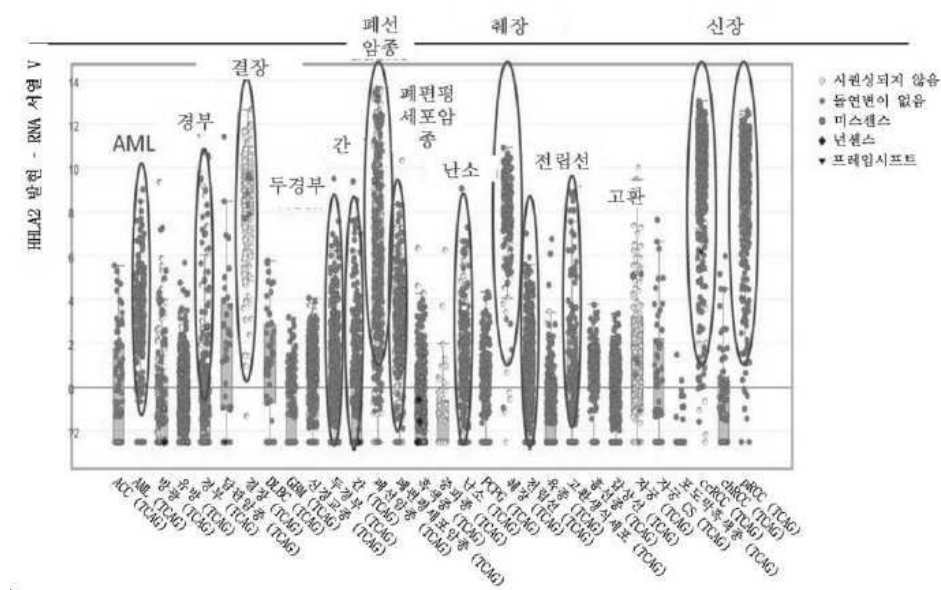
도면2



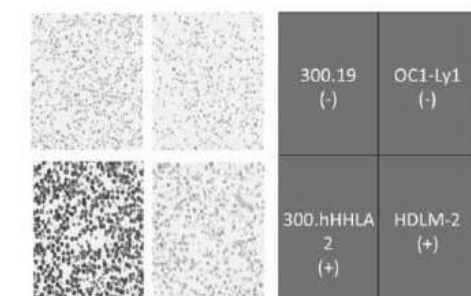
도면3



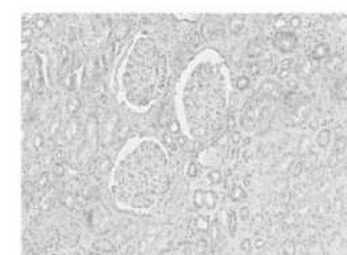
도면4



도면5a



도면5b



도면5c

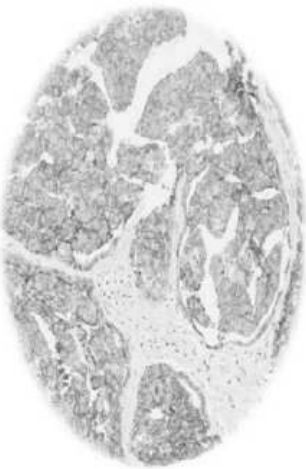


사례 1 Gordon Freeman / Tony Arulanandam
2016년 10월



사례 2

도면5d



사례 5



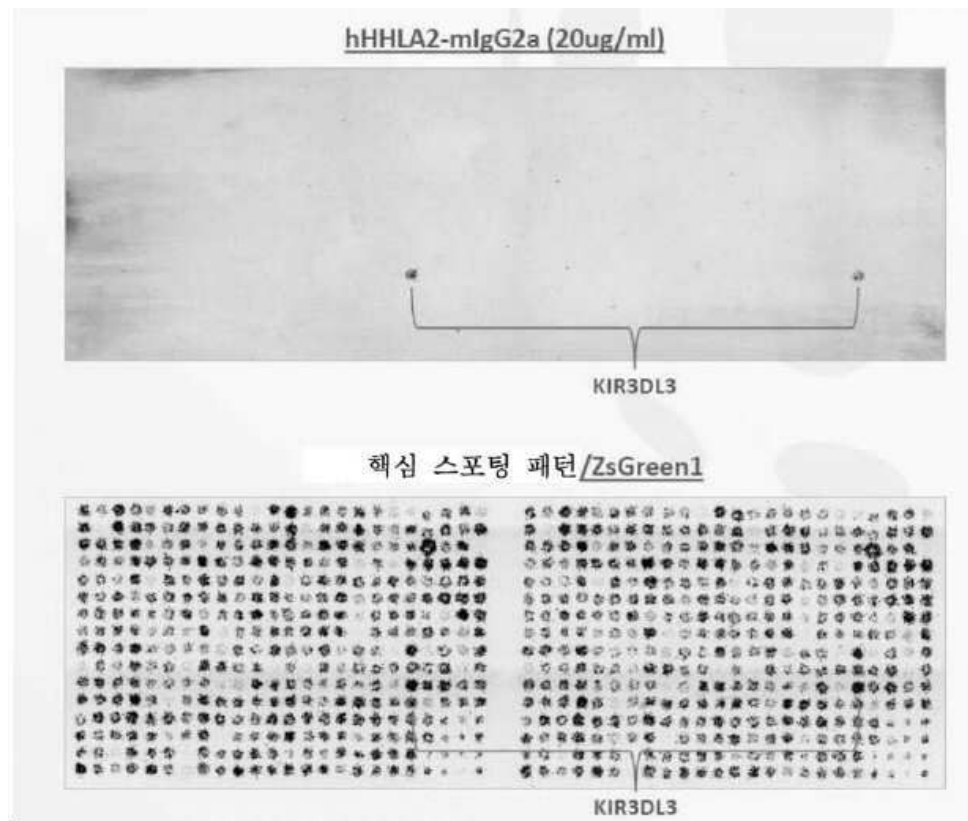
사례 6

확대:

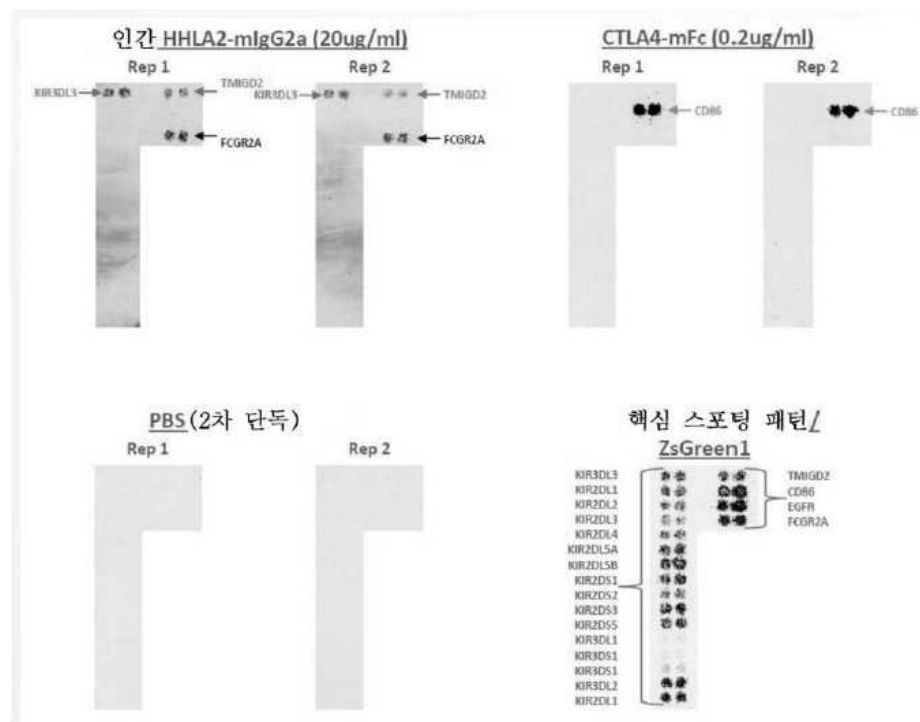


좋은 세포
표면 발현

도면6a



도면6b

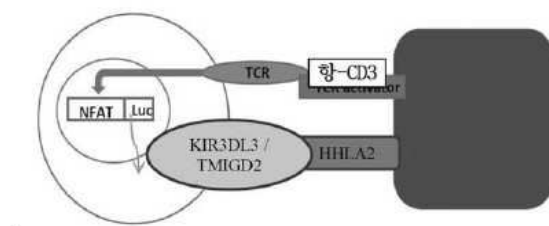


도면6c

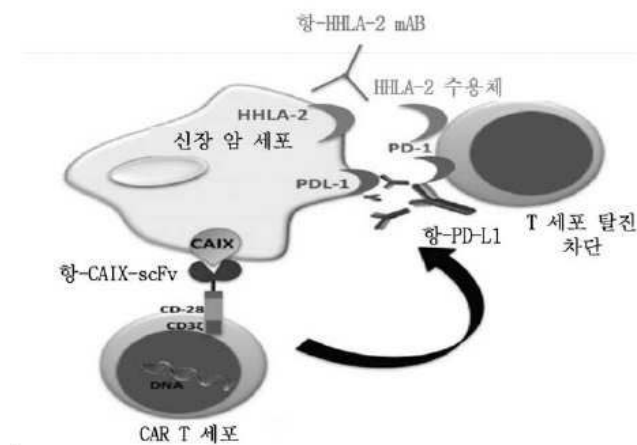
위치	유전자 ID	등록	위치	유전자 ID	등록
1	KIR3DL3	BC143802	17	TMIGD2	NM_1444615.1
2	KIR2DL1	BC069344	18	CD86	
3	KIR2DL2	NM_014219	19	EGFR	
4	KIR2DL3	BC032422	20	FCGR2A	
5	KIR2DL4	BC041611			
6	KIR2DL5A	NM_020535			
7	KIR2DL5B	NM_001018081			
8	KIR2DS1	NM_014512			
9	KIR2DS2	BC108917			
10	KIR2DS3	NM_012313			
11	KIR2DS5	NM_014513			
12	KIR3DL1	BC028206			
13	KIR3DS1	NM_001083539			
14	KIR3DS1	BC098107			
15	KIR3DL2	NM_006737			
16	KIR2DL1	NM_014218			

도면7

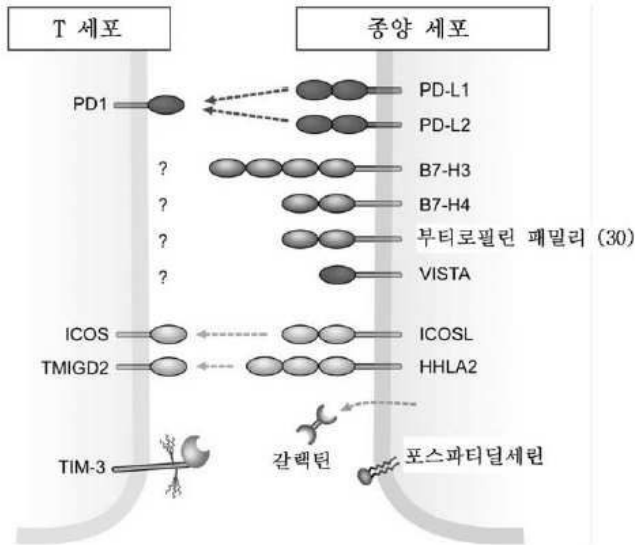
NFAT 리포터-Jurkat T 세포 TCR 활성제-CHO 세포



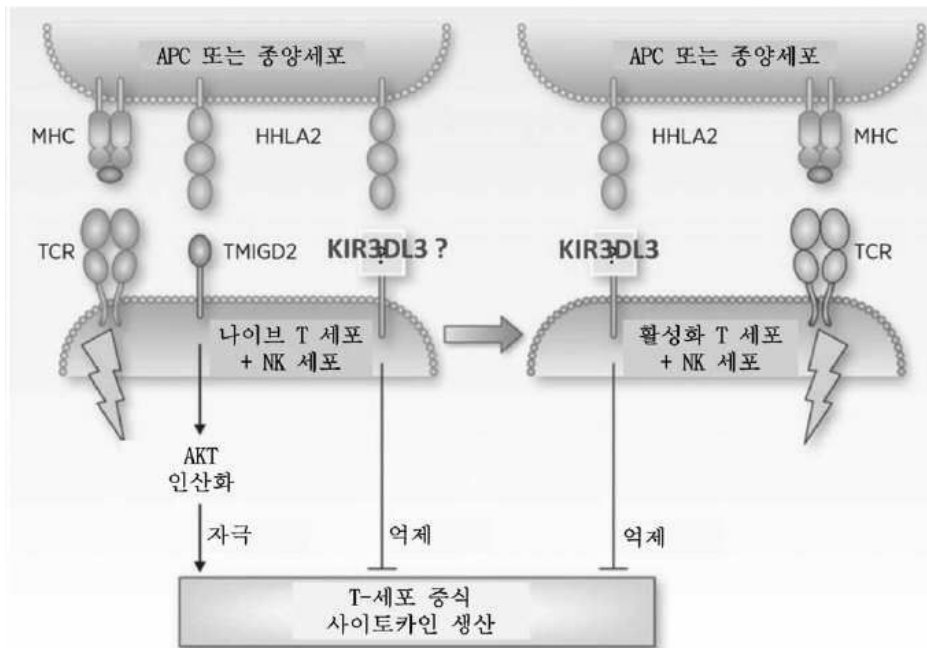
도면8



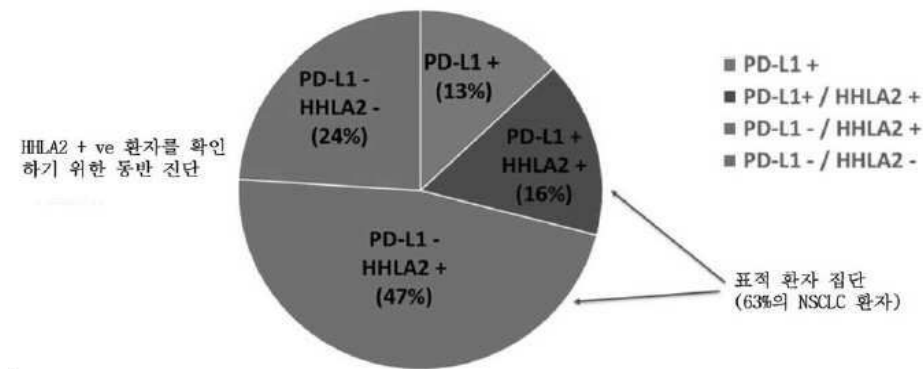
도면9



도면10

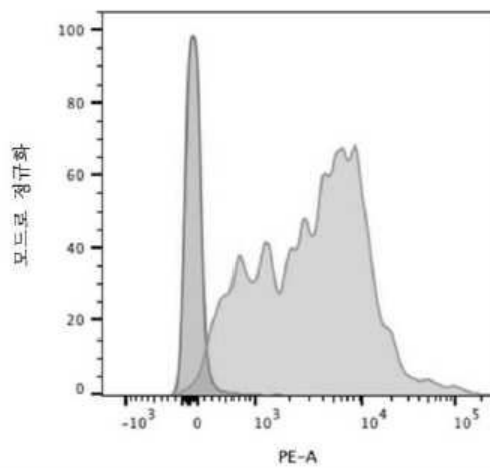


도면11



도면12a

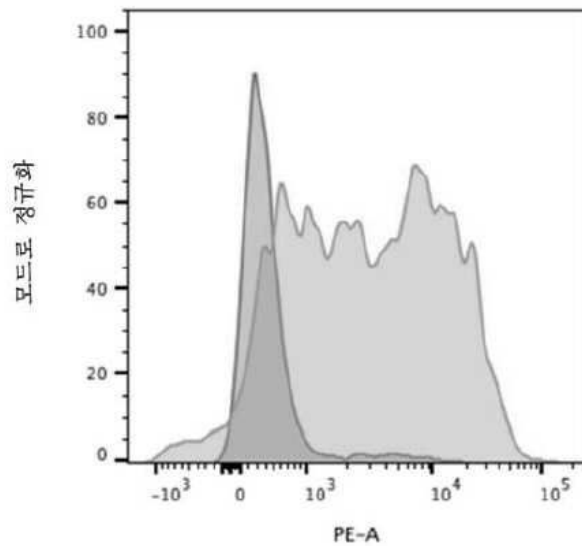
TMIGD2 형질주입 293T 세포 상의
TMIGD2 항체



시료명	하위세트명	카운트	평균:PE-A
293T 세포 분석 6-25-18 표본_001_R2_R02_005.fcs	293T 세포	1320	6923
293T 세포 분석 6-25-18 표본_001_D2_D02_011.fcs	293T 세포	2332	583

도면12b

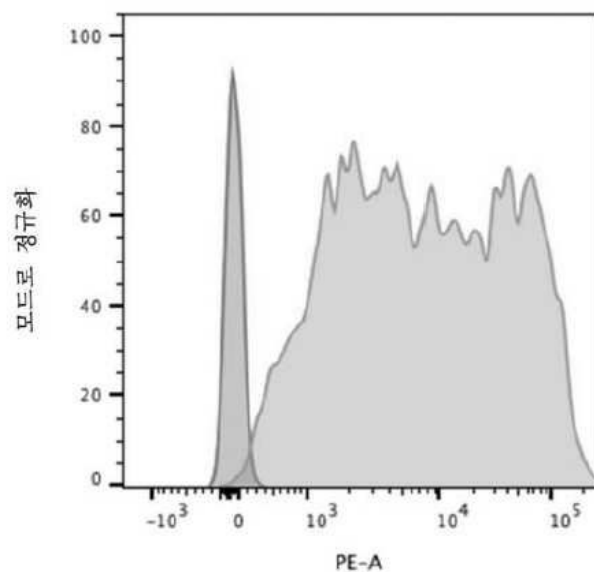
KIR3DL3 형질주입 293T 세포 상의 KIR3DL3 항체



시료명	하위세트명	카운트	평균:PE-A
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_C1_C01_003.fcs	293T 세포	1863	6885
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_D1_D01_004.fcs	293T 세포	2790	749

도면12c

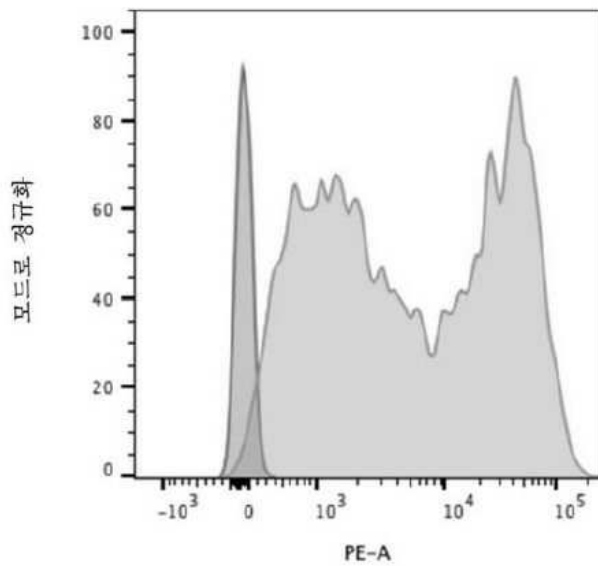
TMIGD2 형질주입



시료명	하위세트명	카운트	평균:PE-A
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_C3_C03_011.fcs	293T 세포	5477	23536
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_F3_F03_023.fcs	293T 세포	4405	58.4

도면12d

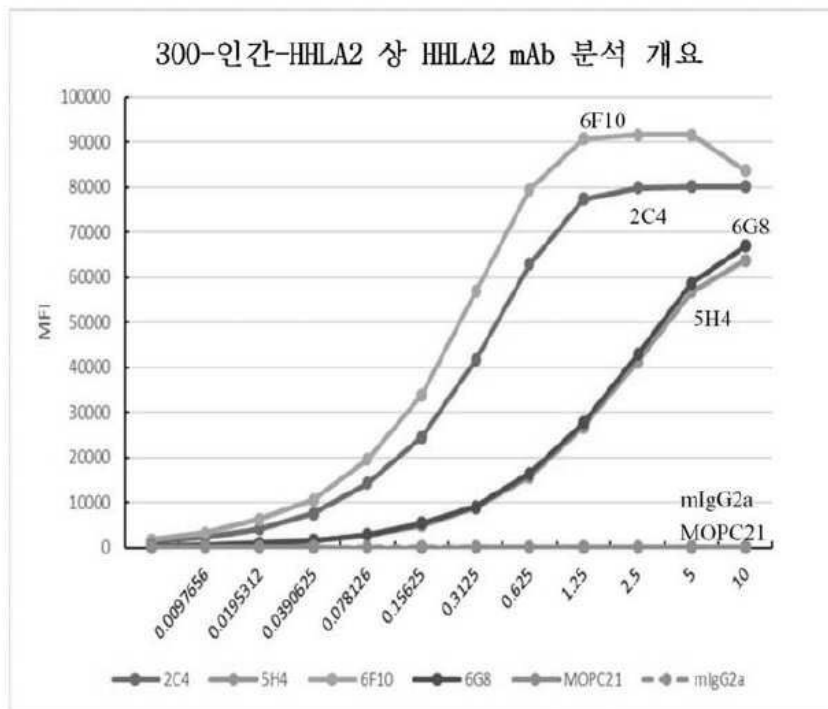
KIR3DL3 형질주입



시료명	하위세트명	카운트	평균:PE-A
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_C3_C03_011.fcs	293T 세포	4536	18525
293T 세포 분석 6-25-18_표본_001_F3_F03_023.fcs	293T 세포	4405	58.4

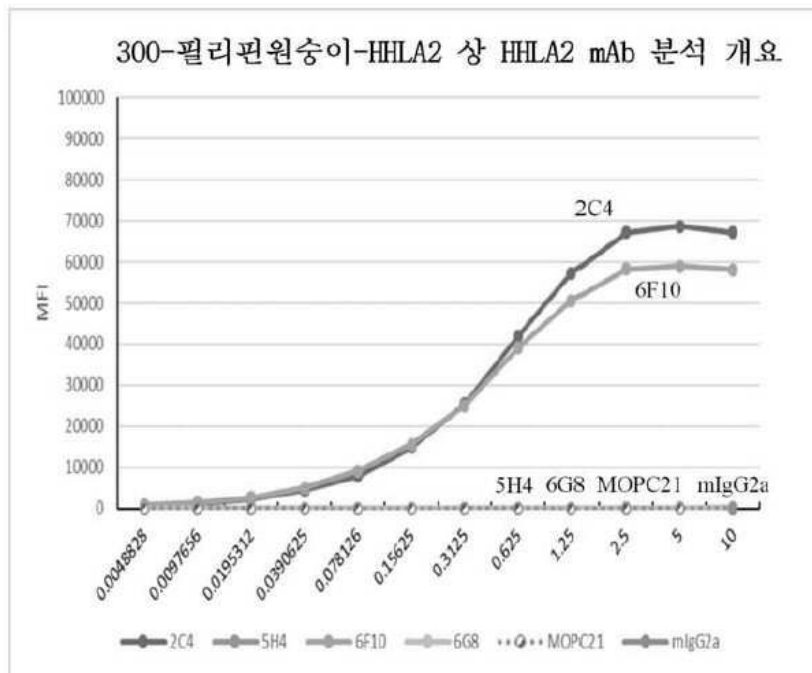
도면13a

인간 HHLA2 결합

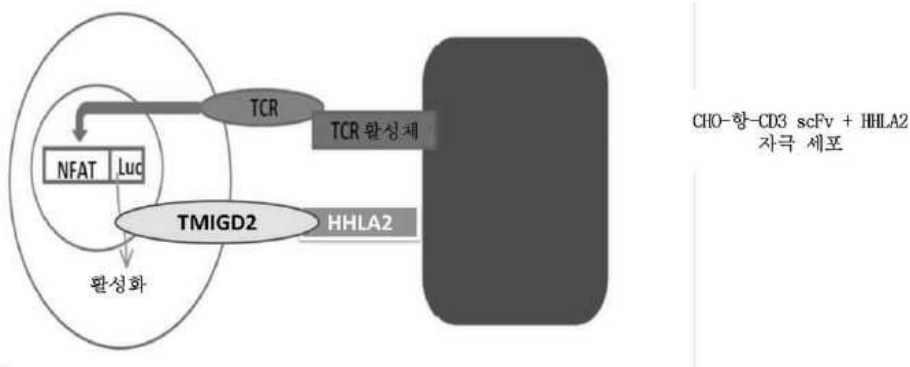


도면13b

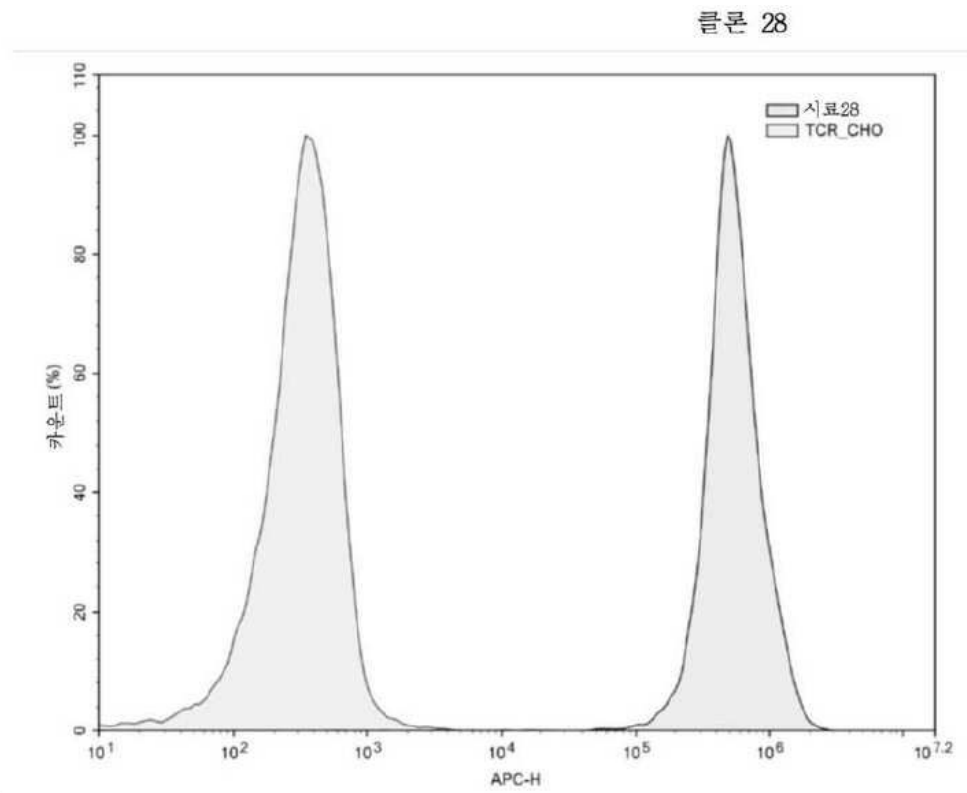
필리핀원숭이 HHLA2 결합



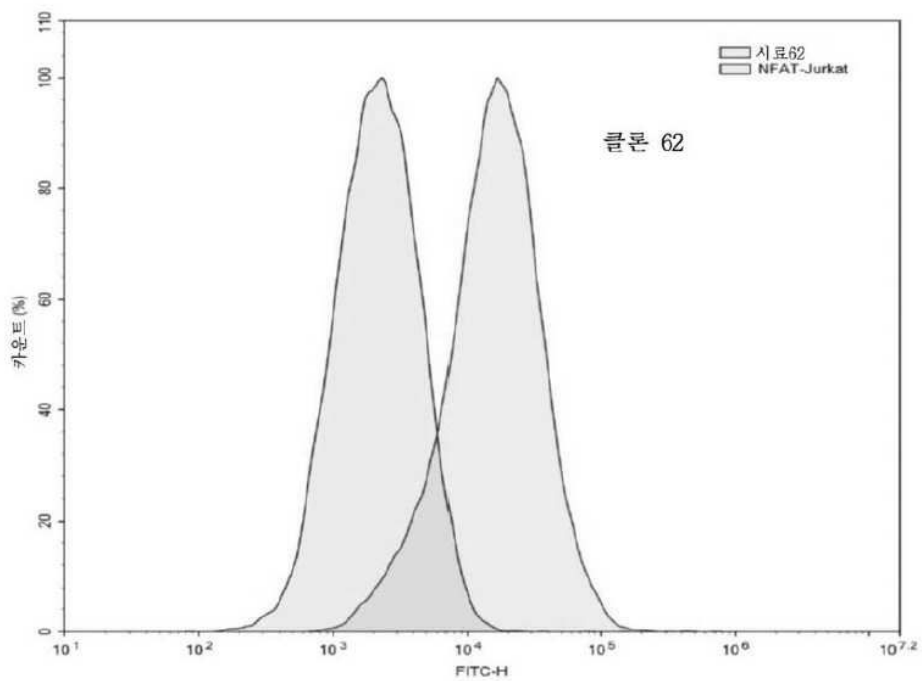
도면14



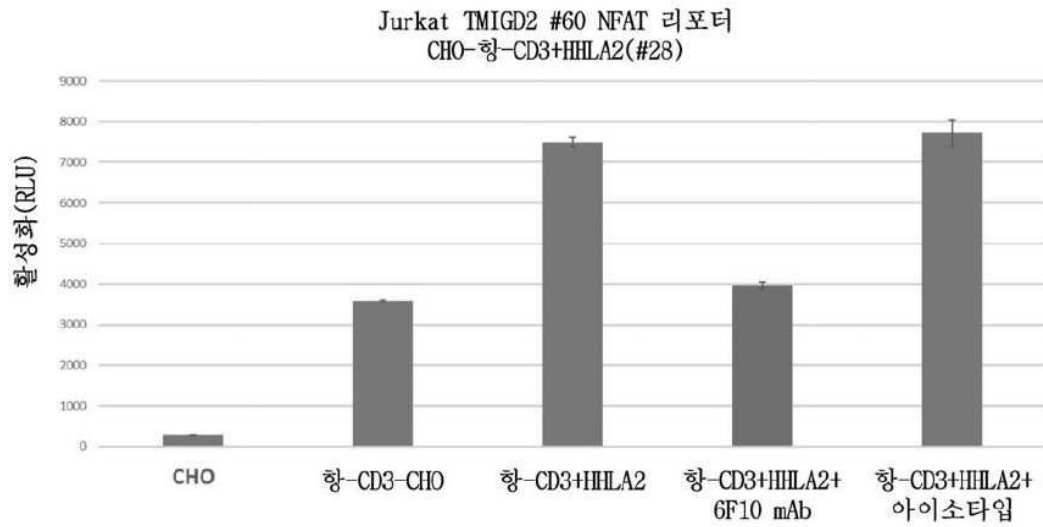
도면15



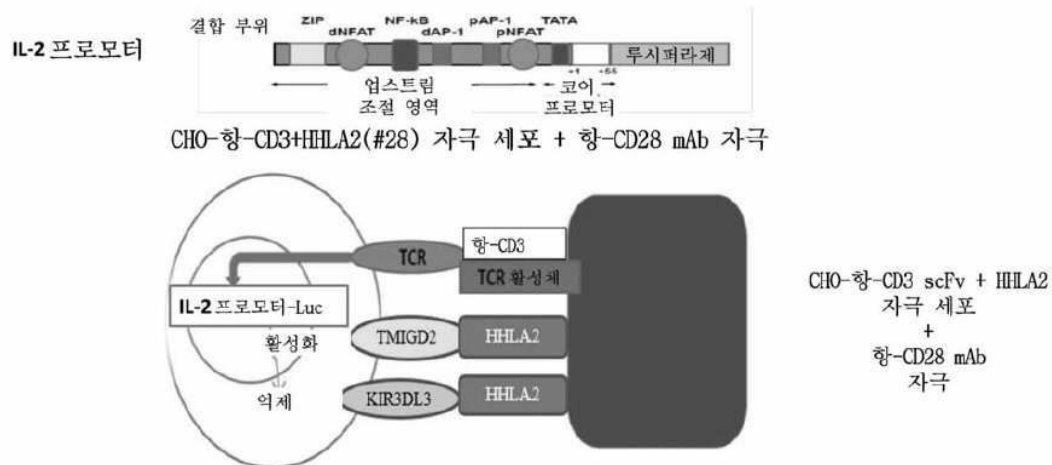
도면16



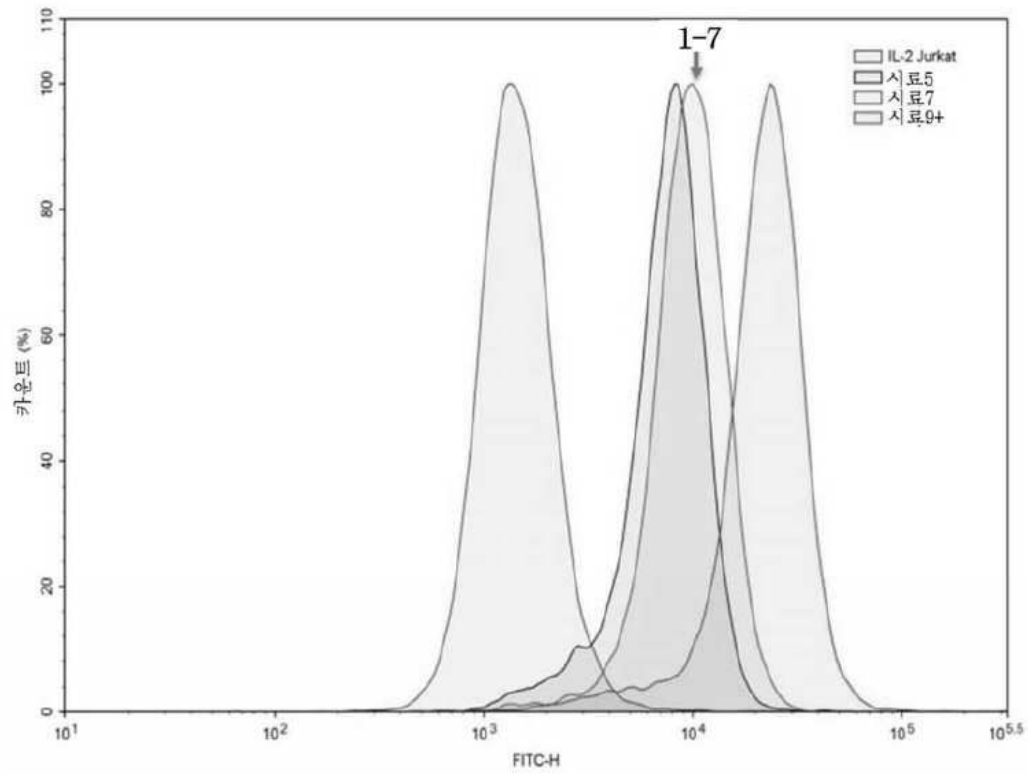
도면17



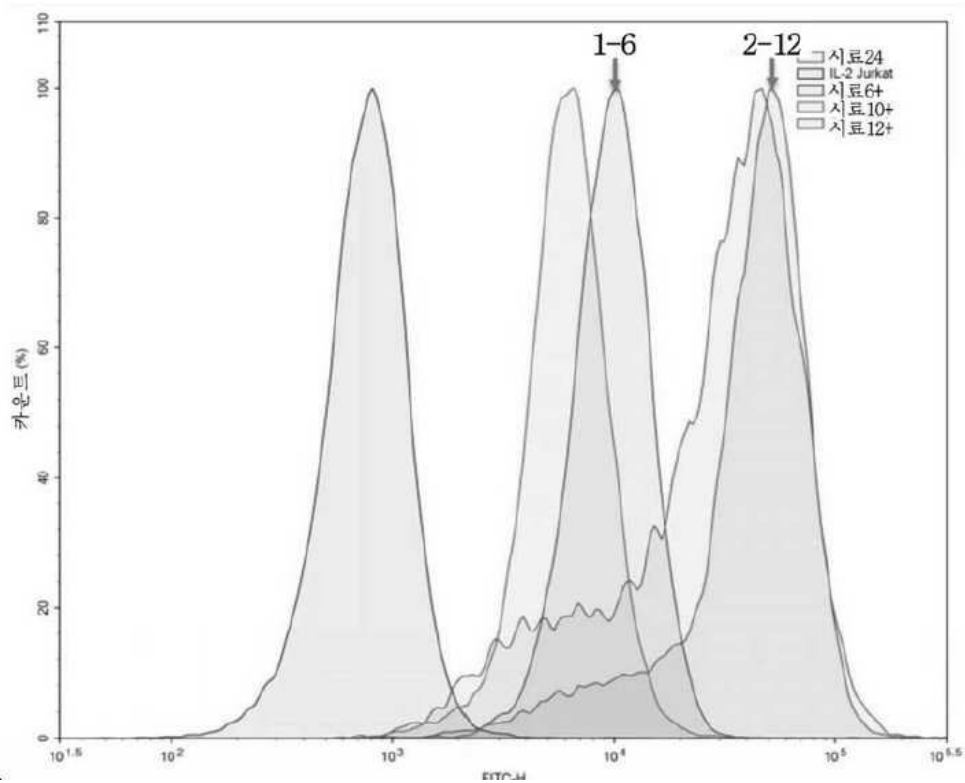
도면18



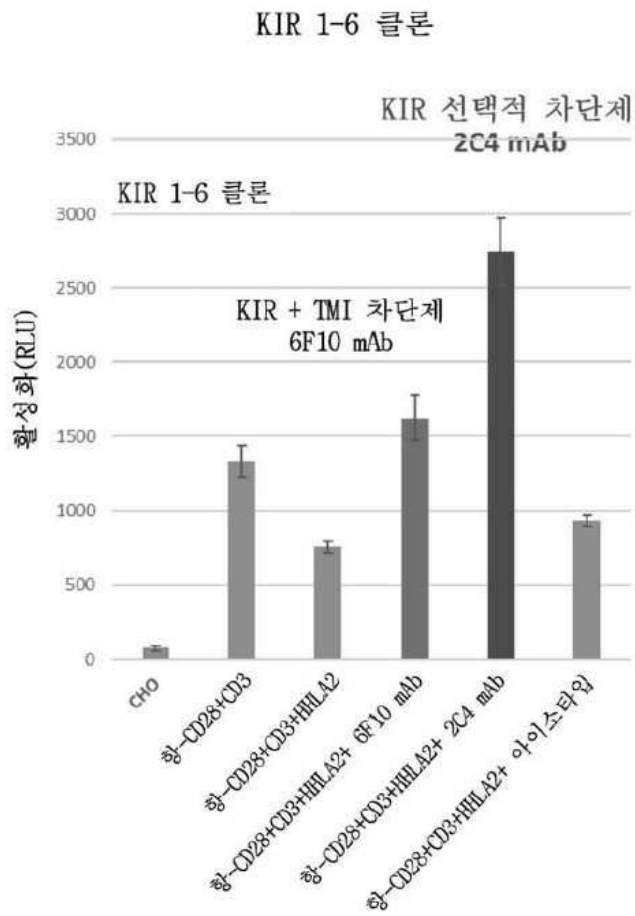
도면19a



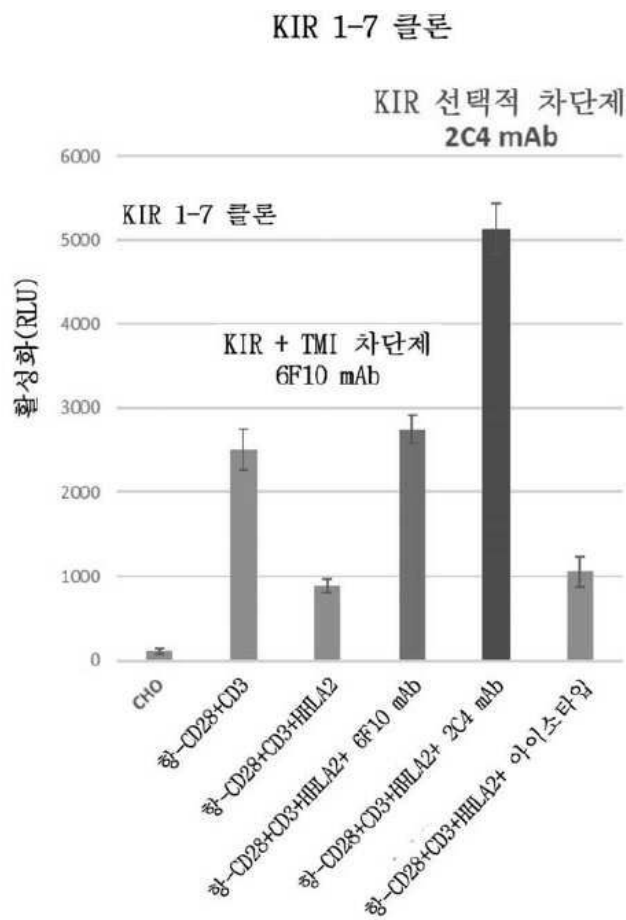
도면19b



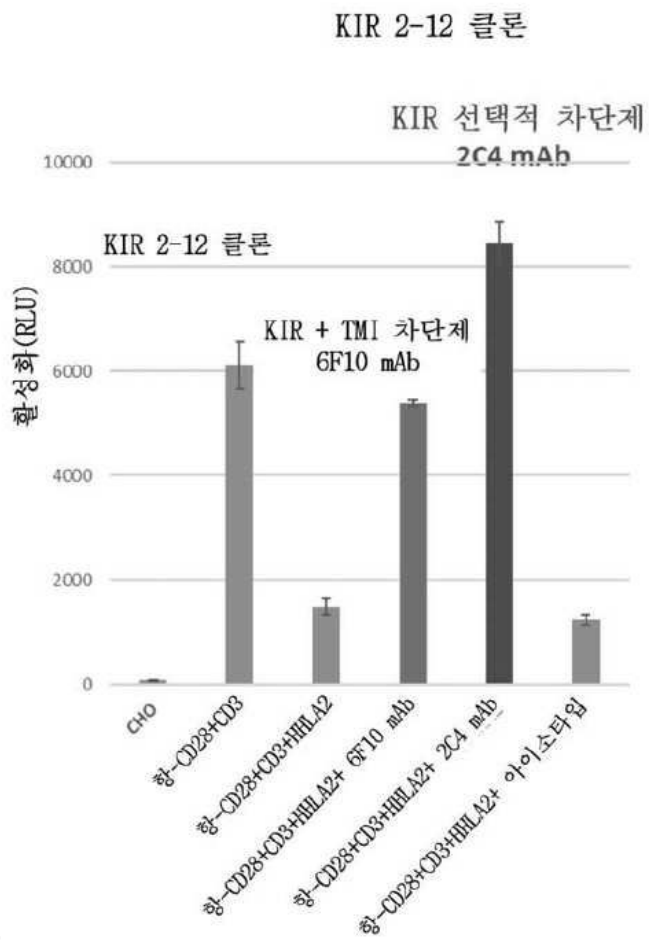
도면20a



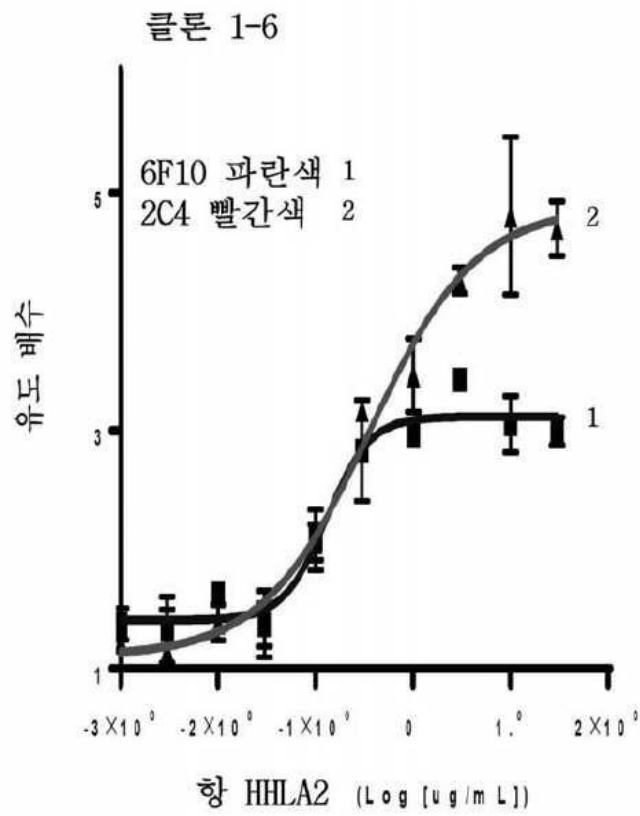
도면20b



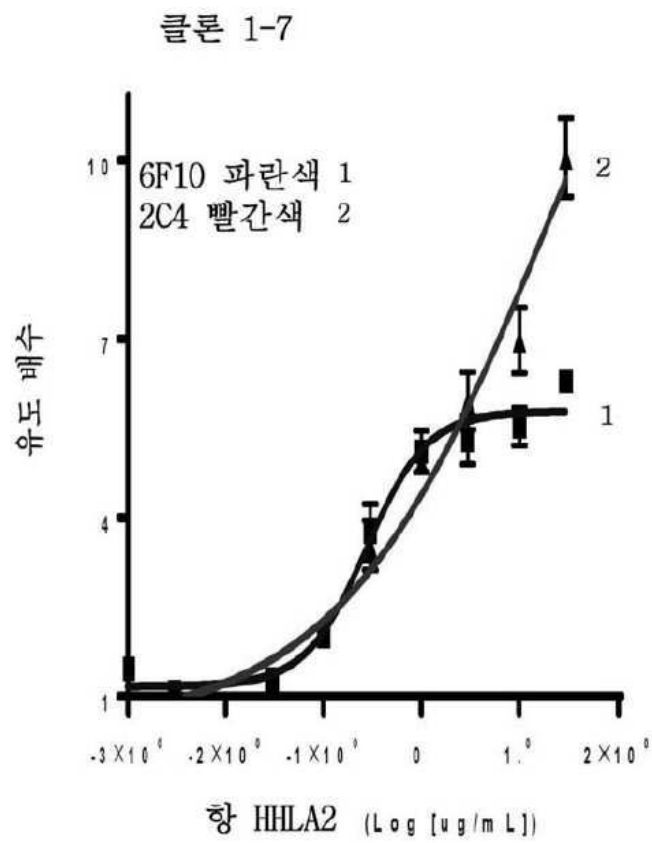
도면20c



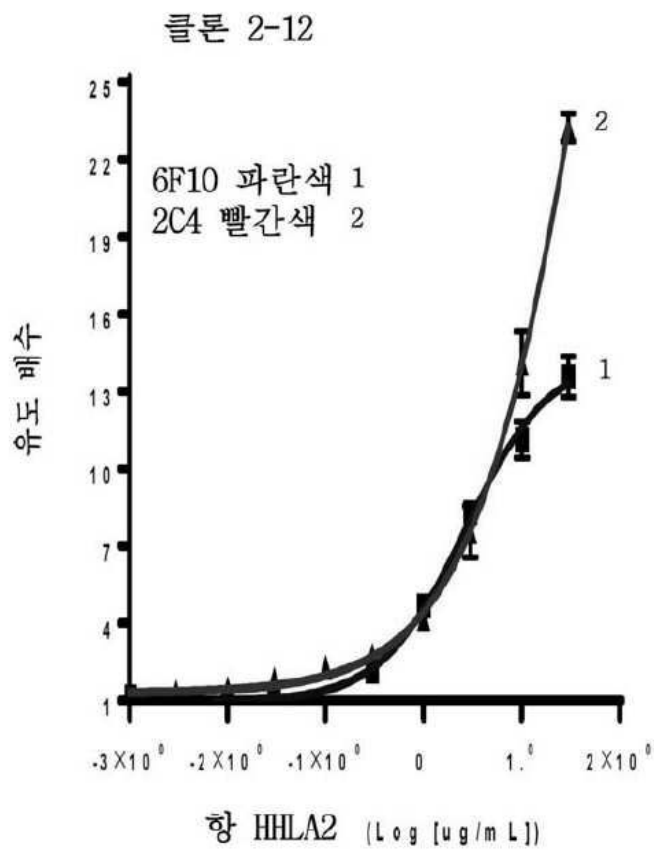
도면21a



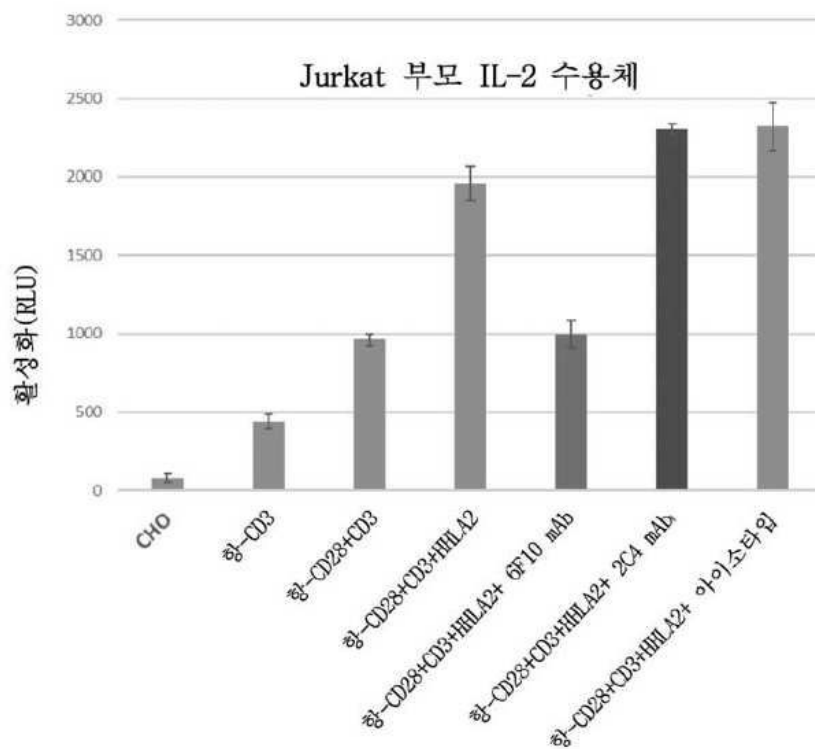
도면21b



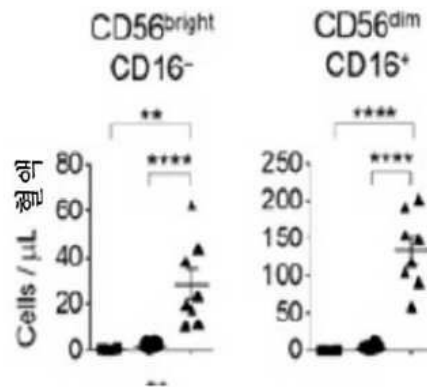
도면21c



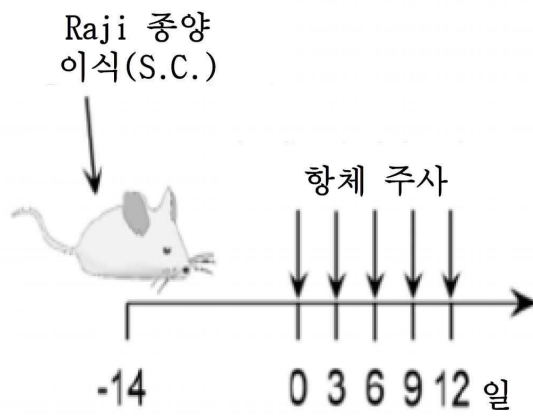
도면22



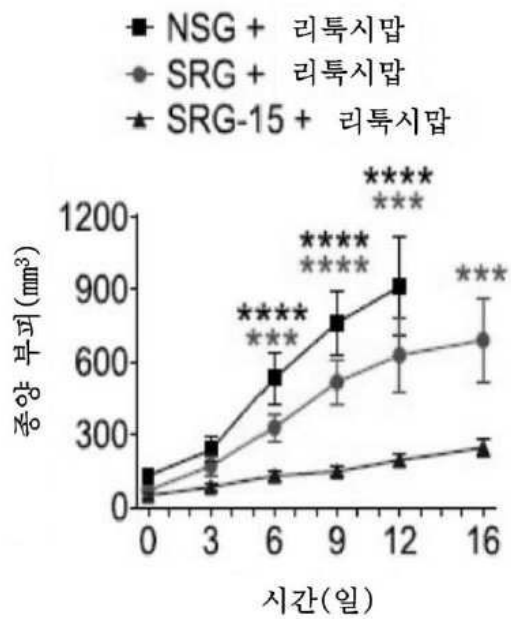
도면23a



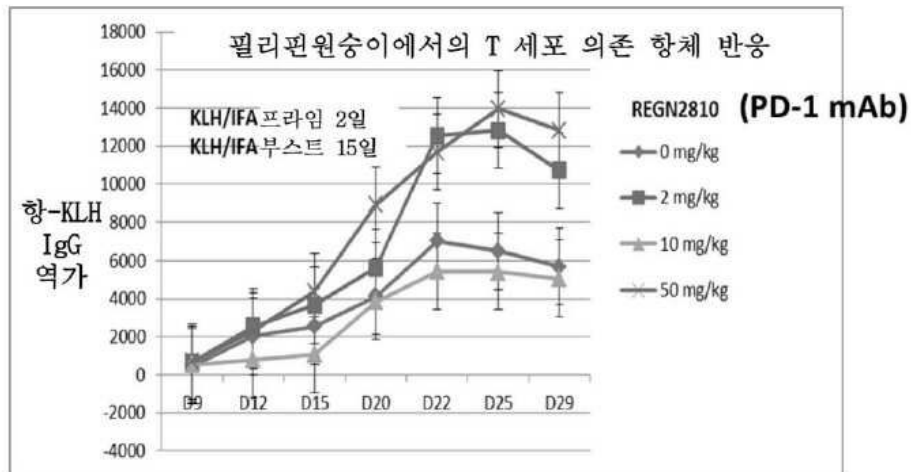
도면23b



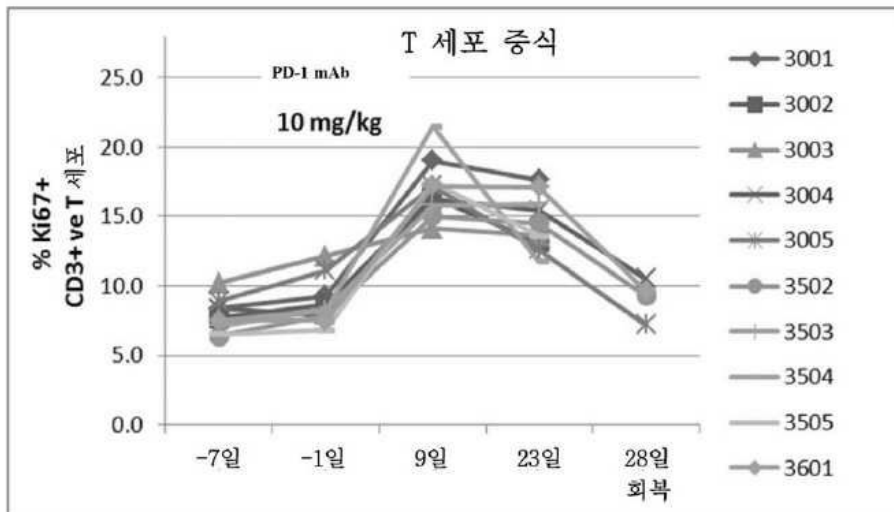
도면23c



도면24a



도면24b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> KIR3DL3 AS AN HHLA2 RECEPTOR, ANTI-HHLA2 ANTIBODIES, AND USES THEREOF

<130> WO2019/204057

<140> PCT/US2019/026034

<141> 2019-04-05

<150> US 62/654,068

<151> 2018-04-06

<160> 371

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2679

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

agttctcttc aagtcattga atcgactttt ttgaattagt tttcagtttc attttgtttt      60
ccctaattca agttgggaac acttcatttt cccaattca agttgggaac acttccttgg      120

tatttccttg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctccttcca gctactcagg      180
aggctgaggc aggagaatcg cttgaaccgc ggaggcggag gttacagtga gccttttctt      240
agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa      300
gggaggagag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatgggtg atgtggaata      360
tactaaagcc tagaacgcac ctctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag      420
gcacagacag cactgtcttt ctctctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc      480
atattccctt tggctttctt catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga      540

cttgatgaag atataattct cctttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac      600
tggaagtatc aagatagcta taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttgaa      660
agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tccttttctt ataatgagat tcaaaatggg      720
aatgcgtcgc tatttttcag aagagtaagc ctctctggacg aaggaattta cacctgctat      780
gtaggaacag caattcaagt gattacaaac aaagtgggtgc taaaggtggg agtttttctc      840
acaccctgta tgaagtatga aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta      900
agtgtttatc ctctgccaat tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac      960

aacatggaag aaacagggtc tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca      1020
ggatcaaatt catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca      1080
gggcgtctga cgatgaaaga tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca      1140
tgtcaacctg taaatgatta tttttacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga      1200
atgaaaagtg ggactttctc tgtcttggtt tactatctga gtcctcaca aaatacaatt      1260
atcaatgaat cccgattctc atggaacaaa gagctgataa accagagtga ctctctatg      1320
aatttgatgg atcttaattt ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat      1380

gaatatactt tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc      1440
cataacaaag gcttatggat tttggtgcc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt      1500

```

tggagcgtaa aatgttcag agcccagctga gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat 1560
 ggagcccaac aagaaagatg ttgtgtccct cctggtagc gctgtcccag tgcacccgat 1620
 aatggcgaag aaaatgtgcc tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac 1680
 aactcatgac ctgcatcctt aatatccagt gacttcatct cccctttctt caccacaatt 1740
 ccaggcaatg gcctgtcgga gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc 1800

tggtatcaca tttatttttc aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc 1860
 tgcatcagat ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc 1920
 tcattcatctt acatttctgt tacagtcagc ccaggagggtt acagtgcgt ctccactaag 1980
 aatctggaag aaatgcatca ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg 2040
 agagagcagg taagagccaa agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa 2100
 ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtctt atatgaacgg ttgtatcagg 2160
 gtaaccaact cgatttggga tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag 2220

attgctaggg aaaaggccc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc 2280
 cctgtgattt gcacgtatac atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag 2340
 taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttctgccc ccaccctaac 2400
 tgatcaatgt actttgtaat ctccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac 2460
 ccttaagaag gttctttgta attctcccca ccttgagaa tgtactttgt gagatccacc 2520
 ctgcccacaa aacattgctc ttaacttcac cgctaacc aaacctata agaactaatg 2580
 ataatccatc acccttcgct gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa 2640

ataaacagct ttattgctca cacaaaaaaa aaaaaaaaaa 2679

<210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val

20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile

35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys
 50 55 60
 Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His
 65 70 75 80
 Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr
 85 90 95
 Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser
 100 105 110

 Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
 115 120 125
 Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
 130 135 140
 Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
 145 150 155 160
 Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
 165 170 175

 Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
 180 185 190
 Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
 210 215 220
 Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
 225 230 235 240

 Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
 245 250 255
 Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
 260 265 270
 Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
 275 280 285
 Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu

290	295	300	
Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser			
305	310	315	320
Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro			
	325	330	335
Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro			
	340	345	350
Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys			
	355	360	365
Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala			
	370	375	380
Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala			
385	390	395	400
Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val			
	405	410	
<210> 3			
<211> 2488			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 3			
aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat			60
tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga			120
actggatgcc ctgttggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa			180
ttggatttgg ggaagagcat gactaatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc			240
actgtctttc ttctcattc tcataacatc tctgagtgga tctcaaggca taticccttt			300
ggctttcttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga			360
tataattctc ctttcttcatt ttgagagggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca			420
agatagctat aaggttcaca gttactacaa aggcagtgac catttggaag gccaagatcc			480
cagatatgca aacaggacat ccccttttcta taatgagatt caaaatggga atgcgtcgct			540
atctttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaatttac acctgctatg taggaacagc			600
aattcaagtg attacaaaca aagtgggtgct aaaggtggga gtttttctca caccctgat			660

gaagtatgaa aagaggaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa gtgtttatcc	720
tcgtccaatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaca acatggaaga	780
aacagggtct ttggattctt tttctattaa cagccactg aatattacag gatcaaattc	840
atcttatgaa tgiacaattg aaaattcact gctgaagcaa acatggacag ggcgctggac	900
gatgaaagat ggccttcata aaatgcaaag tgaacacgtt tcactctcat gtcaacctgt	960
aaatgattat tttcaccaa accaagactt caaagttact tggccagaa tgaagtggtg	1020
gactttctct gtcttggtt actatctgag ctctcaca aatacaatta tcaatgaatc	1080
ccgattctca tggaacaaag agctgataaa ccagagtac ttctctatga atttgatgga	1140
tcttaatctt tcagacagtg gggaatatit atgcaatatt tcttcggatg aatatacttt	1200
acttaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaagg	1260
cttatggatt ttggtgccct ctgcgatttt ggcagctttt ctgctgattt ggagcgtaaa	1320
atgttcgaga gccagctag aagccaggag gagcagacac cctgctgatg gagccaaca	1380
agaaagatgt tgtgtccctc ctggtgagcg ctgtcccagt gcacccgata atggcgaaga	1440
aaatgtgcct ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc	1500
tgcaccttta atatccagtg acttcatctc ccttttcttc accacaattc caggcaatgg	1560
cctgtcggag cagacaattc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat	1620
ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattactga cccactacct gcattgagta	1680
taaatgcctg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta	1740
catttctgtt acagtcagcc caggaggtta cagtgagctc tccactaaga atctggaaga	1800
aatgcatcac taggggttga ttcccaatct gatcaactga taatgggtga gagagcaggt	1860
aagagccaaa gtcaccttag tggaagggtt aaaaaccaga gcctggaaac caagatgatt	1920
gatttgacaa ggtatttttag tctagtttta tatgaacggt tgtatcaggg taaccaactc	1980
gatttgggat gaatcttagg gcaccaaaga ctaagacagt atctttaaga ttgctagggg	2040
aaagggccct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atgcacccc ctgtgatttg	2100
cacgtataca tccagatggc ctaaagtaac tgaagatcca caaagaagt aaaaatagcc	2160
ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttctgccc caccctaact gatcaatgta	2220
ctttgtaate tccccacc ttaagaaggt actttgtaat cttccccacc cttagaagg	2280
ttctttgtaa ttctccccac ctttgagaat gtactttgtg agatccacc tgcccacaaa	2340
acattgctct taacttcacc gcctaacca aaacctataa gaactaatga taatccatca	2400
cccttcgctg actctctttt cggactcagc ccacctgcac ccaggtgaaa taaacagctt	2460
tattgctcac acaaaaaaaaa aaaaaaaaa	2488

<210> 4

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val

20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile

35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys

50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His

65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr

85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser

100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln

115 120 125

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro

130 135 140

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser

145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn

165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser

180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr

195 200 205

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg

210 215 220

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser

225 230 235 240

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe

245 250 255

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala

260 265 270

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe

275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu

290 295 300

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser

305 310 315 320

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro

325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro

340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys

355 360 365

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val

405 410

<210> 5

<211> 2419

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agtttactct acatcatagc agagaaaatg gacaaaacac agctgttttg catgtaggag

60

aatactaacc ctgcacagat tgtgatgtg atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac	120
ctcctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag gcacagacag cactgtcttt	180
cttctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaagge atattccctt tggctttctt	240
catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga cttgatgaag atataattct	300
cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac tgggaagtatc aagatagcta	360
taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa agccaagatc ccagatatgc	420
aaacaggaca tcccttttct ataatgagat tcaaaatggg aatgcgtcgc tatttttcag	480
aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat gtaggaacag caattcaagt	540
gattacaaac aaagtgggtgc taaaggtggg agtttttctc acacccgtga tgaagtatga	600
aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtgtttatc ctctccaat	660
tatcacgtgg aaaaatggaca acacacctat ctctgaaaac aacatggaag aaacagggtc	720
tttgatttct ttttctatta acagccact gaataattaca ggatcaaatt catcttatga	780
atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca gggcgctgga cgatgaaaga	840
tggccttcat aaaaatgcaa gtgaacacgt ttcactctca tgtcaacctg taaatgatta	900
ttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga atgaaaagtg ggactttctc	960
tgctctggct tactatctga gctctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc	1020
atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg aatttgatgg atcttaattct	1080
ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat gaataactt tacttaccat	1140
ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc cataacaaag gcttatggat	1200
tttggtgccc tcigcgattt tggcagcttt tctgctgatt tggagcgtaa aatgttcag	1260
agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat ggagcccaac aagaaagatg	1320
ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat aatggcgaag aaaatgtgcc	1380
tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcatcctt	1440
aatatccagt gacttcatct cccctttctt caccacaatt ccaggcaatg gcctgtcgga	1500
gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc tggatcaca tttatttttc	1560
aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc tgcattgagt ataaatgcct	1620
ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcattcatctt acatttctgt	1680
tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag aatctggaag aaatgcatca	1740
ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa	1800

agtcacctta gtggaaaggt taaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca 1860

aggatatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttggga 1920

tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag attgctaggg aaaagggccc 1980

tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc cctgtgattt gcacgtatac 2040

atccagatgg cctaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaatagc cttactgat 2100

gacattccac cattgtgatt tgttcctgcc ccaccctaac tgatcaatgt actttgtaat 2160

ctccccacc cttagaagg tactttgtaa tcttccccac cttagaag gttctttgta 2220

atttccccca ccttgagaa tgtactttgt gagatccacc ctgccacaa aacattgctc 2280

ttaacttcac cgcctaacc aaaacctata agaactaatg ataatccatc acccttcgct 2340

gactctcttt tcggactcag cccacctgca ccaggtgaa ataacagct ttattgctca 2400

cacaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2419

<210> 6

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val

20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile

35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys

50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His

65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr

85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser

100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln

115	120	125
Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro		
130	135	140
Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser		
145	150	155
		160
Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn		
165	170	175
Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser		
180	185	190
Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr		
195	200	205
Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg		
210	215	220
Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser		
225	230	235
		240
Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe		
245	250	255
Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala		
260	265	270
Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe		
275	280	285
Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu		
290	295	300
Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser		
305	310	315
		320
Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro		
325	330	335
Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro		
340	345	350
Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys		
355	360	365

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
 370 375 380
 Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
 385 390 395 400
 Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
 405 410

<210> 7

<211> 2515

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat	60
tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga	120
actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa	180
ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaacctg cacagattgt gatgggatg	240
tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga	300
catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc	360
tcaaggcata ttccctttgg ctttcttcat ttatgttctt atgaatgaac aaatcgtcat	420
tggaagactt gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtcgt	480
aatacactgg aagtatcaag atagctataa gggtcacagt tactacaaag gcagtgacca	540
tttgaaagc caagatccca gatatgcaaa caggacatcc cttttctata atgagattca	600
aaatgggaat gcgtcgctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac	660
ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaacaaa gtggtgctaa aggtgggagt	720
ttttctcaca cccgtgatga agtatgaaaa gaggaacaca aacagcttct taatatgcag	780
cgtgttaagt gtttatctc gtccaattat cacgtggaaa atggacaaca cacctatctc	840
tgaaaacaac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gccactgaa	900
tattacagga tcaattcat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc tgaagcaaac	960
atggacaggg cgctggacga tgaaagatgg ccttcataaa atgcaaagtg aacacgtttc	1020
actctcatgt caacctgtaa atgattatit ttaccaaac caagacttca aagttacttg	1080
gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa	1140
tacaattatc aatgaatccc gattctcatg gaacaaagag ctgataaacc agagtgactt	1200

ctctatgaat ttgatggatc ttaatctttc agacagtggg gaatatattat gcaatatttc 1260
 ttcggatgaa tatactttac ttaccatcca cacagtgcac gtagaaccga gccaagaaac 1320
 agcttcccat aacaaaggct tatggatttt ggtgccctct gcgatttttg cagcttttct 1380
 gctgatttgg agcgtaaaat gttgcagaga aagatgttgt gtccttcctg gtgagcgctg 1440
 tcccagtga cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag tataggaaat 1500
 gagagaagac tgtgacaact catgacctgc atccttaata tccagtgaact tcattctccc 1560
 tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtcggagcag acaattctac cactgcaaag 1620

agttgtaacc attttctggt atcacattta tttttcaaga catacttttc aagacatcat 1680
 tcaactgacc actacctga ttgagtataa atgcctggat gttaaggatt ccaatttaac 1740
 tttgaaaaga actgtctcat tcatttacct tttctgtaca gtcagcccag gaggttacag 1800
 tgagctctcc actaagaatc tggaagaaat gcatcactag gggttgattc ccaatctgat 1860
 caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaaggttaaa 1920
 aaccagagcc tggaacacaa gatgattgat ttgacaaggt atttagtct agttttatat 1980
 gaacggttgt atcagggtta ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta 2040

agacagtatc ttttaagattg ctagggaaaa gggccctatg tgtcaggcct ctgagcccaa 2100
 gccaagcacc gcatccctg tgatttgac gtatacatcc agatggccta aagtaactga 2160
 agatccacaa aagaagtaaa aatagcctta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt 2220
 cctgccccac cctaactgat caatgtactt tgtaatctcc cccaccctta agaaggtact 2280
 ttgtaatctt cccaccctt aagaaggctt tttgtaattc tccccacct tgagaatgta 2340
 ctttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaca ttgctcttaa cttcacgcc taacccaaaa 2400
 cctataagaa ctaatgataa tccatcacc ttcgtgact ctcttttcgg actcagccca 2460

cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tgetcacaca aaaaaaaaaa aaaaa 2515

<210> 8

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val

20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile

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

 Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
 115 120 125
 Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
 130 135 140
 Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
 145 150 155 160
 Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
 165 170 175

 Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
 180 185 190
 Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
 210 215 220
 Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
 225 230 235 240

 Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
 245 250 255
 Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
 260 265 270
 Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
 275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu
290 295 300

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
305 310 315 320

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
355 360 365

Arg Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala Pro
370 375 380

Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
385 390 395

<210> 9

<211> 2304

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aaatcaaagc taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat 60
tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga 120
actggatgcc cttgtgttac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa 180

ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccttg cacagattgt gatggtgatg 240
tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga 300
catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc 360
tcaagaagag taagccttct ggacgaagga atttacacct gctatgtagg aacagcaatt 420
caagtgatta caaacaagt ggtgctaaag gtgggagttt ttctcacacc cgtgatgaag 480
tatgaaaaga ggaacacaaa cagcttctta atatgcagcg tgttaagtgt ttatcctcgt 540
ccaattatca cgtggaaaat ggacaacaca cctatctctg aaaacaacat ggaagaaaca 600

gggtcttttg attctttttc tattaacagc ccaactgaata ttacaggatc aaattcatct 660
tatgaatgta caattgaaaa ttactgctg aagcaaacat ggacagggcg ctggacgatg 720

aaagatggcc ttcataaaat gcaaagtga cactttcac tctcatgtca acctgtaaat 780
 gattatTTTT caccaaacca agacttcaaa gttacttggg ccagaatgaa aagtgggact 840
 ttctctgtcc tggttacta tctgagctcc tcacaaaata caattatcaa tgaatcccga 900
 ttctcatgga acaaagagct gataaaccag agtgacttct ctatgaattt gatggatctt 960
 aatctttcag acagtgggga atatttatgc aatatttctt cggatgaata tactttactt 1020

 accatccaca cagtgcattg agaaccgagc caagaaacag cttcccataa caaagctta 1080
 tggattttgg tgcctctgc gattttggca gcttttctgc tgatttgag cgtaaaatgt 1140
 tgcagagccc agctagaagc caggaggagc agacacctg ctgatggagc ccaacaagaa 1200
 agatgttgtg tccctcctgg tgagcgctgt cccagtgcac ccgataatgg cgaagaaaat 1260
 gtgcctcttt caggaagaat ataggaaatg agagaagact gtgacaactc atgacctgca 1320
 tccttaatat ccagtgactt catctccctt ttcttcacca caattccagg caatggcctg 1380
 tcggagcaga caattctacc actgcaaaga gttgtaacca tttctggta tcacatttat 1440

 tttcaagac atacttttca agacatcatt cactgacca ctacctgcat tgagtataaa 1500
 tgcctggatg ttaaggattc caatttaact ttgaaaagaa ctgtctcatt catttacatt 1560
 tctgttacag tcagcccagg aggttacagt gagctctcca ctaagaatct ggaagaaatg 1620
 catcactagg ggttgattcc caatctgac aactgataat gggtgagaga gcaggttaaga 1680
 gccaaagtca cttagtggga aaggttaaaa accagagcct ggaaaccaag atgattgatt 1740
 tgacaaggta ttttagtcta gttttatatg aacggttgta tcagggtaac caactcgatt 1800
 tgggatgaat cttagggcac caaagactaa gacagtatct ttaagattgc tagggaaaag 1860

 ggccctatgt gtcaggcctc tgagcccaag ccaagcatcg catcccctgt gatttgcacg 1920
 tatacatcca gatggcctaa agtaactgaa gatccacaaa agaagtaaaa atagccttaa 1980
 ctgatgacat tccaccattg tgatttggtc ctgccccacc ctaactgac aatgtacttt 2040
 gtaatctccc ccacccttaa gaaggtactt tgtaatcttc ccaccctta agaaggttct 2100
 ttgtaattct cccaccctt gagaatgtac ttgtgagat ccaccctgcc cacaaaacat 2160
 tgctcttaac ttcaccgctt aacccaaaac ctataagaac taatgataat ccatcaccct 2220
 tcgctgactc tcttttcgga ctgagccac ctgcaccag gtgaaataaa cagctttatt 2280

 gctcacacaa aaaaaaaaaa aaaa 2304
 <210> 10
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Val Met Trp Asn Ile Leu Lys Pro Arg Thr His Leu Leu Cys Met

1 5 10 15

Thr Asn Met Phe Cys Thr Arg His Glu Gly Thr Asp Ser Thr Val Phe

20 25 30

Leu Pro His Ser His Asn Ile Ser Glu Trp Ile Ser Arg Arg Val Ser

35 40 45

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln

50 55 60

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro

65 70 75 80

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser

85 90 95

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn

100 105 110

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser

115 120 125

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr

130 135 140

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg

145 150 155 160

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser

165 170 175

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe

180 185 190

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala

195 200 205

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe

210 215 220

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu

225 230 235 240

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
 245 250 255
 Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
 260 265 270
 Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
 275 280 285
 Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
 290 295 300

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
 325 330 335
 Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
 340 345 350

<210> 11

<211> 1282

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggatgatgg ccaggaatgg ggtccccggg 60

catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt 120

gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggcttgcca 180

ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat 240

cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggcgccaggg 300

acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa 360

ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga 420

gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat 480

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 540

gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa 600

cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa 660

gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc 720

cttccgcaa ccggccccc gccagccgca cctggcgta agaccctgcc ccagcccag 780

accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctccatagacc 840
aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat 900

cccaggagac ctcaacagga cccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc 960
cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc ggggtggaaca 1020
cttgaggta ggggtttgag accagcctgg ctggaacctg ggaggcggag gttgcagtga 1080
gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa 1140
aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agcccatcc tgagaccccg tctcatttc 1200
tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa 1260
aagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1282

<210> 12

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala
1 5 10 15
Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu
20 25 30
Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
35 40 45
Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
50 55 60
Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
65 70 75 80
Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
85 90 95
Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
100 105 110
Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
115 120 125
Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg

130 135 140
 Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
 145 150 155 160
 Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
 165 170 175
 Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ser Pro Gly Asn Ala Phe Tyr
 180 185 190
 Ser Asn Val Leu Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp
 195 200 205
 Cys Ser Gly Glu Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr
 210 215 220
 Ser Phe Pro Gln Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ser Pro Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val

245 250 255
 Ser Met Val Arg Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg
 260 265 270
 Pro Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly Glu Glu

275 280

<210> 13

<211> 1270

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg 60
 catggtgctg ggctctctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt 120
 gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggcttgcca 180

ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat 240
 cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggccccaggg 300
 acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg ttagcctcaa 360
 ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga 420
 gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat 480

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 540
gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggaaa 600

tgcattctac agcaacgtcc tataccggcc ccggggggcc ccaaagaaga gtgaggactg 660
ctctggagag gggaaggacc agaggggcca gagcatttat tcaacctcct tcccgaacc 720
ggccccccgc cagccgcacc tggcgtcaag accctgcccc agcccagagac cctgccccag 780
ccccaggccc ggccaccccg tctctatggt cagggtctct cctagaccaa gccccacca 840
gcagccgagg caaaagggt tcccaaagt gggagaggag tgagagatcc caggagacct 900
caacaggacc ccacccatag gtacacacaa aaaagggggg atcgaggcca gacacggtgg 960
ctcacgcctg taatcccagc agtttgggaa gccgaggcgg gtggaacact tgaggtcagg 1020

ggtttgagac cagcctggct tgaacctggg aggcggaggt tgcagtgagc cgagattgcg 1080
ccactgcact ccagcctggg cgacagagtg agactccgtc tcaaaaaaaaa caaaaagcag 1140
gaggattggg agcctgtcag ccccatcctg agaccccgtc ctcatctctg taatgatgga 1200
tctcgtccc actttcccc aagaacctaa taaaggcttg tgaagaaaaa gcaaaaaaaaa 1260
aaaaaaaaa 1270

<210> 14

<211> 278

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala

1	5	10	15
Leu	Gln	Glu	Ala
Ser	Ser	Leu	Ser
Val	Gln	Gln	Gly
Pro	Asn	Leu	Leu
20	25	30	
Gln	Val	Arg	Gln
Gly	Ser	Gln	Ala
Thr	Leu	Val	Cys
Gln	Val	Asp	Gln
35	40	45	
Ala	Thr	Ala	Trp
Glu	Arg	Leu	Arg
Val	Lys	Trp	Thr
Lys	Asp	Gly	Ala
50	55	60	
Ile	Leu	Cys	Gln
Pro	Tyr	Ile	Thr
Asn	Gly	Ser	Leu
Ser	Leu	Gly	Val
65	70	75	80
Cys	Gly	Pro	Gln
Gly	Arg	Leu	Ser
Trp	Gln	Ala	Pro
Ser	His	Leu	Thr
85	90	95	

Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys

100 105 110

Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile

115 120 125

Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg

130 135 140

Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser

145 150 155 160

Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu

195 200 205

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

210 215 220

Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro

225 230 235 240

Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg

245 250 255

Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe

260 265 270

Pro Lys Val Gly Glu Glu

275

<210> 15

<211> 918

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg 60

catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggatgacccc acacagaaca gaaaccggat 120

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 180

gatcgtgtgg gggtccttgt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa 240
cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa 300

gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc 360
cttcccgcaa ccggccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccag 420
acctgcccc agccccagge ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcttagacc 480
aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat 540
cccaggagac ctcaacagga cccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc 600
cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc ggttgaaca 660
cttgaggta ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga 720

gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa 780
aacaanaagc agaggattg ggagcctgtc agcccatcc tgagaccgcg tctctatttc 840
tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa 900
aagcaaaaaa aaaaaaaa 918

<210> 16

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Asp

1 5 10 15

Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu

20 25 30

Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp

35 40 45

Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu Gly Lys Asp Gln

85 90 95

Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln Pro Ala Pro Arg

100 105 110
 Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Cys Pro
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg Val Ser Pro Arg
 130 135 140
 Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly

145 150 155 160
 Glu Glu

<210> 17

<211> 1723

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tgctgctgaa ctgagctggg ggcgagccgc ctgtctgcac cggcagcacc atgtcgtca	60
tggctgctcag catggcgtgt gttgggttct tcttgctgga ggggccctgg ccacatgtgg	120
gtggtcagga caagcccttc ctctctgcct ggcccggcac tgtggtgtct gaaggacaac	180
atgtgactct tcagtgtcgc tctcgtcttg ggtttaatga attcagtctg tccaaagaag	240
acgggatgcc tgtccctgag ctctacaaca gaatatccg gaacagcttt ctcattgggcc	300
ctgtgacccc agcacatgca gggacctaca gatgttgagc ttcacacca cactccccc	360
ctgggtggtc ggcaccacgc aacctgtgg tgatcatggt cacaggagtc cacagaaaac	420
cttcctctct gggccacca ggtcccttgg tgaaatcagg agagacggtc atcctgcaat	480
gttggtcaga tgcaggttt gagcgcttcc ttctgcacag agaggggagc actgaggacc	540
ccttgccct cgttggacag ctccacgatg cgggttccca ggtcaactat tccatgggtc	600
ccatgacacc tggccttgca gggacctaca gatgctttgg ttctgtcact cacttacct	660
atgagttgtc ggctcccagt gacctctgg acatcgtggt cgtagggtcta tatgggaaac	720
cttctctctc agcccagccg gggccacgg ttcaggcagg agagaatgtg accttgcct	780
gcagctcccg gagcttgttt gacatttacc atctatccag ggaggcggag gccggtgaac	840
ttaggtcac tgcagtgtg agggtaaatg gaacattcca ggccaacttc cctctgggcc	900
ctgtgaccca cggaggggaa tacagatgct tcggctcttt ccgtgccctg ccccatgcgt	960
ggtcagaccc gagtgaccca ctgcccgttt ctgtcacagg taactccaga aacctgcacg	1020
ttctgattgg gacctcagtg gtcacatcc cctttgctat cctcctcttc tttctcttc	1080

atcgctggtg tgccaacaaa aagaatgctg ttgtaatgga ccaagagcct gcagggaaca 1140

gaacagtgaag caggaggagac tctgatgaac aagaccctca ggaggtgaca tacgcacagt 1200

tgaatcactg cgttttcaca cagagaaaaa tctctgccc ttctcagagg cccaagacac 1260

ccccaacaga taccagcgtg taacacggaa ctccaaatg ctgagcgcag atccaaagtt 1320

gtcttctgtc cactagcacc acagtccaggc ctgatggga tcttctaggg agacaatagc 1380

cctgtctcaa aaccgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggactct gaaggcgtga 1440

gtctgcatct tagggcatcg ctcttctca caccacgaat ctgaacatgc ctctctcttg 1500

cttacaatg tctaaggtcc ccaatgctg ctggagagaa aacacacttg cttagccac 1560

aatttccat ttcacttgac ccctgcccac ctctccaacc taactggctt acttctagt 1620

ctacttgagg ctgcgatcac actgaggaac tcacaattcc aaacatataa gaggtccct 1680

cttaacacgg cacttagata cgtgctattc caccttctc cag 1723

<210> 18

<211> 410

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ser Leu Met Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Phe Phe Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Arg Ser Arg Leu Gly Phe Asn Glu Phe Ser Leu Ser Lys Glu Asp

50 55 60

Gly Met Pro Val Pro Glu Leu Tyr Asn Arg Ile Phe Arg Asn Ser Phe

65 70 75 80

Leu Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Cys

85 90 95

Ser Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro

100 105 110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala

115	120	125	
His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys			
130	135	140	
Trp Ser Asp Val Arg Phe Glu Arg Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Ile			
145	150	155	160
Thr Glu Asp Pro Leu Arg Leu Val Gly Gln Leu His Asp Ala Gly Ser			
165	170	175	
Gln Val Asn Tyr Ser Met Gly Pro Met Thr Pro Ala Leu Ala Gly Thr			
180	185	190	
Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Val Thr His Leu Pro Tyr Glu Leu Ser Ala			
195	200	205	
Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Val Gly Leu Tyr Gly Lys Pro			
210	215	220	
Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val			
225	230	235	240
Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Leu Phe Asp Ile Tyr His Leu Ser			
245	250	255	
Arg Glu Ala Glu Ala Gly Glu Leu Arg Leu Thr Ala Val Leu Arg Val			
260	265	270	
Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asn Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr His Gly			
275	280	285	
Gly Asn Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro His Ala Trp			
290	295	300	
Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Pro Val Ser Val Thr Gly Asn Ser Arg			
305	310	315	320
Asn Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Pro Phe Ala			
325	330	335	
Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ala Asn Lys Lys Asn			
340	345	350	
Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Arg			
355	360	365	

Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu
370 375 380

Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg
385 390 395 400

Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser Val
405 410

<210> 19

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 19

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 20

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 20

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60

gtgcaacttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcaacacc aatgtcatga actgggtccg ccaggtcca 180

ggaaagggtt tggaatgggt tggtcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat 240

tatgccgatt cagtgaagg caggttcacc atctccagag atgattcaca aagtatgctc 300

tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca cgtattttctg tgtgggagct 360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 402

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 21

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgt 57

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 22

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 23

gaggtgcaac ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctct 75

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 25

ggattcacct tcaacaccaa t 21

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn

1 5

<210> 27

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 27

gtcatgaact ggtccgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgg tcgcata 57

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 29

agaactaaaa ctaataatta tgca 24

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30

Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala

1 5

<210> 31

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 31

acatattatg ccgattcagt gaaaggcagg ttcacatct ccagagatga ttcacaaagt 60

atgctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccacgta tttctgtgtg 120

gga 123

<210> 32

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 32

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

1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu

20 25 30

Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly

35 40

<210> 33

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 33

gctatggact ac

12

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 34

Ala Met Asp Tyr

1

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 35

tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tca

33

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 36

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 37

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 37

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Leu Lys

130

<210> 38

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 38

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgaccaate tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 120

gtctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattctggca taaatattat acactggtac 180

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctctctatc gtgcatcaa cctaaaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggtg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttataa ggatcctcct 360

acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aag 393

<210> 39

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 39

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 40

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 41

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 41

gacattgtgc tgaccaaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 60

gtctcctgc 69

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 42

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys

20

<210> 43

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 43

agagccagcg aaagtgttga taattctggc ataaatttta tacac 45

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 44

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

1 5 10 15

<210> 45

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 45

tggtaccagc agaaaccagg acagtcaccc aaactcctcc tctat

45

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 46

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 47

cgtgcatcca acctaaaatc t

21

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 48

Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser

1 5

<210> 49

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 49

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 60

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgt 96

<210> 50

<211>

32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 50

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 51

cagcaaagtt ataaggatcc tcctacg 27

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 52

Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 53

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 53

ttcgggtactg ggaccaagct ggagctgaag

30

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 54

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 55

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 55

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Asn Thr Asn Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr

65					70					75					80				
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Phe	Arg	Asp	Asp	Ser				
85					90					95									
Gln	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr				
100					105					110									
Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
115					120					125									
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser														

130

<210> 56

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 56

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcatttgtgag	60
gtgcagcttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca	120
tgtgcagcct ctggattcac cttcaatacc aatgtcatga actgggtccg ccagggtcca	180
ggaaagggtt tggaatgggt tgctcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat	240
tatgccgatt cagtgaaga caggttcacc atcttcagag atgattcaca aagcattctc	300
tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca tgtattactg tgtgggagct	360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 402

<210> 57

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 57

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaagggtgt gcattgt 57

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 58

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 59

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 59

gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctct 75

<210> 60

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 61

ggattcacct tcaataccaa t

21

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn

1 5

<210> 63

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 63

gtcatgaact gggctccgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgc tcgcata

57

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 64

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10 15

Ala Arg Ile

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 65

agaactaaaa ctaataatta tgca

24

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 66

Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala

1 5

<210> 67

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 67

acatattatg ccgattcagt gaaagacagg ttcacatct tcagagatga ttcacaaagc 60

attctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccatgta ttactgtgtg 120

gga 123

<210> 68

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 68

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

1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu

20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Gly

35 40

<210> 69

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 69

gctatggact ac

12

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 70

Ala Met Asp Tyr

1

<210> 71

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 71

tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tca

33

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 72

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 73

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 73

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser

35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser

65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln Gln Ser Ser Lys Asp Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Leu Lys

130

<210> 74

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 74

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt	60
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc	120
atctcctgca gagccagcga gagtgttgat aattatggca ttagttttat gcactggtac	180
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctaaaatct	240
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag attcaccct caccattaat	300
cctgtggaga ctggtgatgt tgctacctat tactgtcagc aaagtagtaa ggatcctcct	360
acgttcggta ctgggaccaa gctagagctg aaa	393

<210> 75

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 75

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt	60

<210> 76

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 76

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1	5	10	15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 77

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 77

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gaggccacc 60

atctcctgc 69

<210> 78

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 78

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys

20

<210> 79

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 79

agagccagcg agagtgtga taattatggc attagtttta tgcac 45

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 80

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 81

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 81

tggtaccagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctat 45

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 82

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 83

cgtgcatcca acctaaaatc t 21

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 84

Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser

1 5

<210> 85

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 85

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 60

cctgtggaga ctggtgatgt tgctacctat tactgt 96

<210> 86

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 86

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 87

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 87

cagcaaagta gtaaggatcc tctacg 27

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 88

Gln Gln Ser Ser Lys Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 89

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 89

ttcggtactg ggaccaagct agagctgaaa 30

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 90

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 91

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 91

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

Thr Thr Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 92

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 92

atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag	60
gtccacctgc agcagctcgc agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac ctttactacc tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct	180
ggacagggtc tggaatggat tggacacatt aatcctagca gtggatatac tgattacaat	240
cagaaattca aggacaagac cacattgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg	300
caactgaaca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acaccctgg	360
gactcggact actggggcca aggcaccact ctacagttct cctca	405

<210> 93

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 93

atggaaaggc actggatctt tctcttctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcc 57

<210> 94

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 94

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 95

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 95

caggtccacc tgcagcagtc tgcagctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttct 75

<210> 96

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 96

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 97

ggctacacct ttactaccta c

21

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 98

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 99

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 99

acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga cagggtctgg aatggattgg acacatt

57

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 100

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly His Ile

<210> 101

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 101

aatcctagca gtggatat

18

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 102

Asn Pro Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 103

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 103

actgattaca atcagaaatt caaggacaag accacattga ctgcagacaa atcctccagt

60

acagcctaca tgcaactgaa cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca 120

aga 123

<210> 104

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 104

Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp

1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu

20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

35 40

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 105

caccctggg actcggacta c 21

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 106

His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr

1 5

<210> 107

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 107

tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca

33

<210> 108

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 108

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 109

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asp Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro

50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

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

115	120	125
<210> 110		
<211> 381		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic		
polynucleotide		

```
<400> 110
atgagtgtgc ccactcagct cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt      60
gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc      120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatgtac agttatttag catgggatca gcagaaacag      180
ggaagatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca      240

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctcc agatcaaccg cctgcagtct      300
gaagatgttg cgagatatta ctgtcaacat tattatatta ctccattcac gttcggctcg      360
gggacaaaat tggaatatgc a                                     381
```

<210> 111

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

```
<400> 111
atgagtgtgc ccactcagct cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt      60
<210> 112
<211> 20
<212> PRT
```

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 112

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 113

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 113

gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgt 69

<210> 114

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 114

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 115

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 115

cgagcaagtg agaatttga cagttattta gca 33

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 116

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 117

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 117

tggtatcagc agaaacaggg aagatctcct cagctcctgg tctat 45

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 118

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

1 5 10 15

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 119

gctgcaacaa acttagcaga t

21

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 120

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 121

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 121

ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct ccagatcaac

60

cgctgcagt ctgaagatgt tgcgagatat tactgt

96

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 122

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser

1 5 10 15

Leu Gln Ile Asn Arg Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 123

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 123

caacattatt atattactcc attcacg

27

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 124

Gln His Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 125

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 125

ttcggctcgg ggacaaaatt ggaaatagca

30

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 126

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ala

1 5 10

<210> 127

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 127

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly

1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Asn Thr Asn Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser

130

<210> 128

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 128

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag	60
gtgcaacttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca	120
tgtgcagcct ctggattcac cttcaacacc aatgtcatga actgggtccg ccaggctcca	180
ggaaagggtt tggaatgggt tggtcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat	240
tatgccgatt cagtgaagg caggttcacc atctccagag atgattcaca aagtatgctc	300
tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca cgtatttctg tgtgggagct	360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca	402

<210> 129

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 129

atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgt	57

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 130

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly

1	5	10	15

Val His Cys

<210> 131

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 131

gaggtgcaac ttgttgagac tggaggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60
tcatgtgcag cctct 75

<210> 132

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 133

ggattcacct tcaacaccaa t 21

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 134

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn

1 5

<210> 135

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 135

gtcatgaact gggtcgcgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgg tcgcata 57

<210> 136

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 136

Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 137

agaactaaaa ctaataatta tgca 24

<210> 138

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 138

Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala

1 5

<210> 139

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 139

acatattatg ccgattcagt gaaaggcagg ttcaccatct ccagagatga ttcacaaagt 60

atgctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccacgta tttctgtgtg 120

gga 123

<210> 140

<211> 41

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 140

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

1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu

20 25 30

Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly

35 40

<210> 141

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 141

gctatggact ac 12

<210> 142

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 142

Ala Met Asp Tyr

1

<210> 143

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 143

tggggtaag gaacctcagt caccgtctcc tca

33

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 144

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 145

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 145

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser

65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys

130

<210> 146

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 146

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 120
 gtctcctgca gagccagcga aagtgtgat aattctggca taaattttat acactggtac 180
 cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctctctatc gtgcatcaa cctaaaaatc 240
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag attcaccct caccattaat 300

ccgtgggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttataa ggatcctcct 360
 acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aag 393

<210> 147

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 147

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

<210> 148

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 148

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 149

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 149

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 60

gtctcctgc 69

<210> 150

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 150

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys

20

<210> 151

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 151

agagccagcg aaagtgttga taattctggc ataaatttta tacac 45

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 152

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

1 5 10 15

<210> 153

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 153

ctggtaccag cagaaaccag gacagtcacc caaactcctc ctctat 46

<210

> 154

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 154

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 155

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 155

cgtgcatcca acctaaaatc t

21

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 156

Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser

1 5

<210> 157

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 157

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat

60

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgt

96

<210

> 158

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 158

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 159

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 159

cagcaaagtt ataaggatcc tcctacg

27

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 160

Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr

1 5

<210> 161

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 161

ttcggtactg ggaccaagct ggagctgaag

30

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 162

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1 5 10

<210> 163

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 163

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Leu Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

115	120	125
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
130	135	

<210> 164

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 164

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtg ccagtgtgaa	60
gtgatgctgg tggagtcagg gggaggctta gtgaagcctg gaggatccct gaaactctcc	120
tgtgcagtct ctggattaac ttttagtagt tatgcatgt cttgggttcg ccagactccg	180
gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagtcacac ctactatcca	240
gacagtgtga aggggcgatt catcatttct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg	300
caaatgaaca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtacaag actgggacgg	360
gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca	405

<210> 165

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 165

atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttggtt taaaagggtg ccagtgt	57

<210> 166

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 166

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 167

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 167

gaagtgatgc tgggtggagtc aggggggaggc ttagtgaagc ctggaggatc cctgaaactc 60

tcctgtgcag tctct 75

<210> 168

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 168

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser

20 25

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 169

ggattaactt ttagtagtta t 21

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 170

Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 171

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 171

gccatgtctt gggttcgcca gactccggag aagaggctgg agtgggtcgc aaccatt 57

<210> 172

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 172

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

1 5 10 15

Ala Thr Ile

<210> 173

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 173

agtagtggtg gtagtcac

18

<210> 174

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 174

Ser Ser Gly Gly Ser His

1 5

<210> 175

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 175

acctactatc cagacagtgt gaaggggcga ttcattcatc ctagagacaa tgccaagaac 60

accctgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg tctgaggaca cggccatgta ttactgtaca 120

aga 123

<210> 176

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 176

Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp

1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu

20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr Arg

35	40
<210> 177	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 177	
ctgggacggg cctttgacta c	21
<210> 178	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
peptide	
<400> 178	
Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr	
1 5	
<210> 179	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
oligonucleotide	
<400> 179	
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca	33
<210> 180	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic	
peptide	
<400> 180	

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 181

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 181

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser

20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 182

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 182

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatatca acaaaagcca 180
gggcaatctc ctaaagttct gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtcctgat 240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tgtgcaggct 300
gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa gattatagca ctccgtggac gttcggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 183

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 183

atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60

<210> 184

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 184

Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Gly Val Asp Gly

20

<210> 185

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 185

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgc 69

<210> 186
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 186
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> 187
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide
<400> 187
aaggccagtc aggatgtgag tactgctgta gcc 33

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 188

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 189
<211> 45
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 189

tggtatcaac aaaagccagg gcaatctcct aaagttctga ttac

45

<210> 190

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 191

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 191

tgggcatcca cccggcacac t

21

<210> 192

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 192

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1

5

<210>

193

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 193

ggagtccttg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc 60

agtgtgcagg ctgaagacct ggcactttat tactgt 96

<210> 194

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 194

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 195

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 195

cagcaagatt atagcactcc gtggacg 27

<210> 196

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 196

Gln Gln Asp Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 197

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 197

ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa

30

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 198

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 199

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 199

Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe

35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Ser Gly Lys Ser Leu

50				55				60							
Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Asn
65				70				75				80			
Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
				85				90				95			
Thr	Ala	Tyr	Met	His	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val

100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Tyr	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ala
115					120					125					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala				
130					135					140					

<210> 200

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

 $\langle 400 \rangle$ 200

atgggatgga cctggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccaactctgag 60

gtccacctgc agcagtctgg acctgagctg gagaagcctg gcgttttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggtttctc attcactgac tacaacatga actgggtgaa acagagcagt 180

ggaaagagcc ttgagtggat tggaaatatt gatccttact atggacgtat taactataac 240

cagaaattca agggcaaggc cacattgagt gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

cacctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaac tggggcctac 360

acctcgggct actcctgggt tgcctactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420

<210> 201

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 201

atgggatgga cctggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactct 57

<210> 202

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 202

Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 203

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 203

gaggtccacc tgcagcagtc tggacctgag ctggagaagc ctggcgtttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttct 75

<210> 204

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 204

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 205

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 205

ggtttctcat tctactgacta c

21

<210> 206

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 206

Gly Phe Ser Phe Thr Asp Tyr

1

5

<210> 207

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 207

aacatgaact ggggtgaaaca gagcagtgga aagagccttg agtggattgg aatat

57

<210> 208

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 208

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

1

5

10

15

Gly Asn Ile

<210> 209

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 209

gataccttact atggacgt

18

<210> 210

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 210

Asp Pro Tyr Tyr Gly Arg

1 5

<210> 211

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 211

attaactata accagaaatt caagggaag gccacattga gtgtagacaa atcctccagc 60

acagcctaca tgcacctcaa gagcctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca 120

act 123

<210> 212

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 212

Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp

1	5	10	15
Lys	Ser	Ser	Ser
Thr	Ala	Tyr	Met
His	Leu	Lys	Ser
Leu	Thr	Ser	Glu
20	25	30	
Asp	Ser	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys	Ala
Thr	35	40	

<210> 213

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 213

ggggcctaca cctcgggcta ctctggttt gcttac 36

<

210> 214

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 214

Gly Ala Tyr Thr Ser Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

1	5	10

<210> 215

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 215

tggggccaag ggactctggt cactgtctct gca 33

<210> 216

<211> 11

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 216

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 217

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 217

Met Gly Leu Gln Val Gln Val Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ile

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly

50 55 60

Ala Ser Pro Lys Pro Leu Ile His Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

100 105 110

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

115 120 125

Ile Lys

130

<210> 218

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 218

atgggtttac aggtgcaggt tatcagcttc ctgttaatca gtgtcacagt cataatgtcc 60

agaggagaaa atgtgtcac ccagcttcca ggaataatgg ctgcctctct gggggagaag 120

gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 180

cagaggtcag gcgttcccc caaaccttg attcatagga catccaacct ggcttctggt 240

gtccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300

gtggaggctg aagatgatgc aacttattac tgccagcagt ggagtgggta cccattcacg 360

ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 390

<210> 219

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 219

atgggtttac aggtgcaggt tatcagcttc ctgttaatca gtgtcacagt cataatgtcc 60

agagga 66

<210> 220

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 220

Met Gly Leu Gln Val Gln Val Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly

20

<210> 221

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 221

gaaaaatgtgc tcaccagtc tccaggaata atggctgcct ctctggggga gaagtcacc 60

atgacctgc 69

<210> 222

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 222

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 223

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 223

agtgccagct caagtgtgtaag ttccagttac ttgcac 36

<210> 224

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 224

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 225

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 225

tggtaccagc agaggtcagg cgcttccccc aaacccttga ttcac 45

<210> 226

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 226

Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Ala Ser Pro Lys Pro Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 227

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 227

aggacatcca acctggcttc t 21

<210> 228

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 228

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 229

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 229

gggtgtcccag ctgcgttcag tggcagtggtg tctgggacct cttactctct cacaatcagc 60

agcgtggagg ctgaagatga tgcaacttat tactgc 96

<210> 230

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 230

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 231

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 231

cagcagtgga gtggttaccc attcacg

27

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 232

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 233

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 233

ttcggtcgg ggacaaagtt ggaaataaaa

30

<210> 234

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 234

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 235

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 235

Met Asp Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

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

35 40 45

Thr Asp Tyr Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp

115 120 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 236

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 236

atggattgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg ggctgaactg gtgaggcctg gggctctcagt gaagatttcc 120

tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tatgctatgc actgggtgaa gcagagtcac 180

gcaaagagtc tagagtggat tggaagtatt agtacttact atggtgatac taattacaac 240

cagaaattca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg 300
gaacttgcca gactgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag aggtaattac 360
gacgactggt acttcaatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

<210> 237

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 237

atggattgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcc 57

<210> 238

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 238

Met Asp Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 239

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 239

caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt 60

tcctgcaagg gttct 75

<210> 240

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 240

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser

20 25

<210> 241

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 241

ggctacacat tcaactgatta t 21

<210> 242

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 242

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

1 5

<210> 243

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 243

gctatgcact ggggtgaagca gagtcatgca aagagtctag agtggattgg aagtatt 57

<210> 244

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 244

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly Ser Ile

<210> 245

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 245

agtacttact atggtgat 18

<210> 246

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 246

Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp

1 5

<210> 247

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 247

actaattaca accagaaatt caagggaag gccacaatga ctgtagacaa atcctccagc 60

acagcctata tggaacttgc cagactgaca tctgaggatt ctgccatcta ttactgtgca 120

aga 123

<210> 248

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 248

Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp

1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu

20 25 30

Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

35 40

<210> 249

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 249

ggtaattacg acgactggta cttcaatgtc 30

<

210> 250

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 250

Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val

1 5 10

<210> 251

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 251

tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc tca 33

<210> 252

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 252

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 253

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 253

Met Arg Ile Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile
 50 55 60
 Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95
 Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala
 100 105 110
 Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

<210> 254

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 254

atgaggattc ctgctcacgt ttttggttc ttgttgctct gggttccagg tgccagatgt 60

gacatccaaa tgaccagtc tccatcttc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 120

ctcacttgtc gggcaagtca ggatattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 180

gatggaacta ttaaactgt gatttatagc acatccactt tagattctgg tgtccaaaa 240

aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag cctagagtct 300

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgctagtt ctccgtacac gttcggaggg 360

ggggccaagc tggaaataaa a 381

<210> 255

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide

<400> 255

atgaggattc ctgctcacgt ttttggttc ttgttgctct gggttccagg tgccagatgt 60

<210> 256

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 256

Met Arg Ile Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys

20

<210> 257

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 257

gacatccaaa tgaccagtc tccatcttc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgt 69

<210> 258

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 258

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys

20

<210> 259

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 259

cgggcaagtc aggatattag tggttactta agc

33

<210> 260

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 260

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1

5

10

<210> 261

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 261

tggcttcagc agaaaccaga tggaactatt aaacgtctga tttat

45

<210> 262

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 262

Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210

> 263

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 263

agcacatcca ctttagattc t

21

<210> 264

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 264

Ser Thr Ser Thr Leu Asp Ser

1 5

<210> 265

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 265

gggtgtcccaa aaaggttcag tggcagtagg tctgggtcag attattctct caccatcagc

60

agcctagagt ctgaagattt tgcagactat tactgt

96

<210> 266

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 266

Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 267

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 267

ctacaatatg ctagttctcc gtacacg

27

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 268

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 269

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 269

ttcggagggg gggccaagct ggaaataaaa

30

<210> 270

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 270

Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 271

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 271

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile

35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Ile Phe Asp

65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn

85 90 95

Thr Val Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Trp Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 272

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 272

atgaaatgca gctggattat cttcttcttg atggctgtgg ttacaggggt caattcagag 60

gttcagctgc agcagctctgg ggcagaactt gtgcagccag ggcctcagt caagttgtcc 120

tgtacagctt ctggcttcaa tattaaagac acctatatgc actgggtaaa acagaggcct 180

gaacagggcc tggagtggat tggaaggatt gatcctgcga atggtaaaac tatttttgac 240

ccgaagttcc aggtcaaggc cactataact gccgacacat cctccaacac agtctacctg 300

catctcagca gcctgacatc tgaggacact gccatctatt actgtgcttg gttacttcct 360

tactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 408

<210> 273

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 273

atgaaatgca gctggattat cttcttcttg atggctgtgg ttacaggggt caattca 57

<210> 274

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 274

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

1 5 10 15

Val Asn Ser

<210> 275

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 275

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgcagc caggggcctc agtcaagttg 60

tcctgtacag cttct 75

<210> 276

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 276

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser

20 25

<210> 277

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 277

ggcttcaata ttaaagacac c 21

<210> 278

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 278

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

1 5

<210> 279

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 279

tatatgcact gggtaaaaca gaggcctgaa cagggcctgg agtggattgg aaggatt 57

<210> 280

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 280

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 281

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 281

gatacctgcga atggtaaa 18

<210> 282

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 282

Asp Pro Ala Asn Gly Lys

1 5

<210> 283

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 283

actatattttg acccgaagtt ccaggtcaag gccactataa ctgccgacac atcctccaac 60

acagtctacc tgcattctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccatcta ttactgtgct 120

tgg 123

<210> 284

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 284

Thr Ile Phe Asp Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp

1 5 10 15

Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu

20 25 30

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Trp

35 40

<210> 285

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 285

ttacttcctt actactttga ctac

24

<210> 286

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 286

Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 287

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 287

tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca

33

<210> 288

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 288

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 289

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 289

Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly

50 55 60

Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly

65 70 75 80

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Lys Trp Ser His Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu

115 120 125

Leu Lys

130

<210> 290

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 290

atggattttc atgtgcagat tttagcttc atgctaataca gtgtcacagt catgtgtgcc 60

agtggggaaa ttgtactcac ccagttcca gcagtcattg ctgcattcc aggggagaag 120

gtccattca cctgcagcgt cagttcaagt ataagttcca gcaacttgca ctggtaccag 180

cagaagtcag gaacctgcc caaactctgg atttatggca catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgttc gcttcagttg cagtgatct gggacctctt attctctcac aatcagcagc 300

atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgtcaaaagt ggagtcatta cccgctcacg 360

ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 390

<210> 291

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 291

atggattttc atgtgcagat ttccagcttc atgctaata gtgtcacagt catgttgtcc 60

agtggg 66

<210> 292

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 292

Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr

1 5 10 15

Val Met Leu Ser Ser Gly

20

<210> 293

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 293

gaaattgtac tcacccagtc tccagcagtc atggctgcat ctccaggga gaaggtcacc 60

atcacctgc 69

<210> 294

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 294

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 295

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 295

agcgtcagtt caagtataag ttccagcaac ttgcac 36

<210> 296

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 296

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His

1 5 10

<210> 297

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 297

tggtaccagc agaagtcagg aacctcgccc aaactctgga tttat 45

<210> 298

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 298

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 299

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 299

ggcacatcca acctggcttc t 21

<210> 300

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 300

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 301

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 301

ggagtccttg ttgcttcag tggcagtgga tctgggacct cttattctct cacaatcagc 60
agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgt 96

<210> 302

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 302

Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1	5	10	15
Leu	Thr	Ile	Ser
Ser	Met	Glu	Ala
Glu	Asp	Ala	Ala
Thr	Tyr	Tyr	Cys
20	25	30	

<210> 303

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 303

caaaagtgga gtcattaccc gctcagc 27

<210> 304

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 304

Gln Lys Trp Ser His Tyr Pro Leu Thr

1	5

<210> 305

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 305

ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa

30

<210> 306

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 306

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

1

5

10

<210> 307

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 307

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg

20

25

30

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

35

40

45

Thr Thr Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn

65

70

75

80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95
Thr Ala His Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 308

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 308

atggaaaggc actggatctt tctcttctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60
gtccagctgc agcagctctgc agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttactacc tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct 180
ggacagggtc tggagtggat tggacacatt aatcctagca gtggatatac tgagtacaat 240
cagaaattca aggacaagac cacttgact gcagacaaat cctccagcac agcccacatg 300
caactgagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acacccttgg 360
gactgaact actggggcca aggcaccact ctacagctct cctca 405

<210> 309

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 309

atggaaaggc actggatctt tctcttctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcc 57

<210> 310

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 310

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 311

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 311

caggtccagc tgcagcagtc tgcagctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttct 75

<210> 312

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 312

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 313

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 313

ggctacacct ttactaccta c 21

<210> 314

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 314

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 315

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 315

acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga cagggtctgg agtggattgg acacatt 57

<210> 316

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 316

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

1 5 10 15

Gly His Ile

<210> 317

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 317

aatcctagca gtggatat

18

<210> 318

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 318

Asn Pro Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 319

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 319

actgagtaca atcagaaatt caaggacaag accacactga ctgcagacaa atcctccagc

60

acagcccaca tgcaactgag cagcctaaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca

120

aga

123

<210> 320

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 320

Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp

1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu

20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

35 40

<210> 321

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 321

caccctggg actcgaacta c 21

<210> 322

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 322

His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr

1 5

<210> 323

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 323

tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 33

<210> 324

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 324

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 325

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 325

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asp Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro

50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn

85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr

100 105 110

Ile Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115 120 125

<210> 326

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 326

atgagtgtgc ccactcagct cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaatattgac agttatttag catggtatca gcagaaacag 180

ggaagatctc ctgactcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattctctca agatcaacag cctgcagtct 300

gaagatgttg cgagatatta ctgtcaacat tattatatta ctccattcac gttcggctcg 360

gggacaaaagt tggaataaaa a 381

<210> 327

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 327

atgagtgtgc ccactcagct cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

<210> 328

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 328

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

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 329

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 329

gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgt 69

<210> 330

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 330

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 331

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 331

cgagcaagtg agaattattga cagttattta gca 33

<210> 332

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 332

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 333

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 333

tggtatcagc agaaacaggg aagatctcct cagctcctgg tctat 45

<210> 334

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 334

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

1 5 10 15

<210> 335

<211> 21

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 335

gctgcaacaa acttagcaga t 21

<210> 336

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 336

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 337

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 337

gggtgtgcat caaggttcag tggcagtggg tcaggcacac agtattctct caagatcaac 60

agcctgcagt ctgaagatgt tgcgagatat tactgt 96

<210> 338

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 338

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 339

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 339

caacattatt atattactcc attcacg 27

<210> 340

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 340

Gln His Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 341

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 341

ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 30

<210> 342

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 342

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 343

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 343

Val Thr Tyr Ala Gln Leu

1 5

<210> 344

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 344

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Val

1 5

<210> 345

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 345

Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

<210> 346

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 346

Val Gly Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 347

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 347

Glu Ser Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe

1 5 10

<210> 348

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 348

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 349

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 349

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr

1 5

<210> 350

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 350

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr

1 5

<210> 351

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 351

Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr

1 5

<210> 352

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 352

Glu Asn Ile Asp Ser Tyr

1 5

<210> 353

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 353

Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 354

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 354

Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr

1 5

<210> 355

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 355

Thr Arg Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 356

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 356

Gln Asp Val Ser Thr Ala

1 5

<210> 357

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 357

Gly Phe Ser Phe Thr Asp Tyr Asn

1 5

<210> 358

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 358

Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Arg Ile

1 5

<210> 359

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 359

Ala Thr Gly Ala Tyr Thr Ser Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 360

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 360

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 361

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 361

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala

1 5

<210> 362

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 362

Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Thr

1 5

<210> 363

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 363

Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val

1 5 10

<210> 364

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 364

Gln Asp Ile Ser Gly Tyr

1 5

<210> 365

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 365

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

1 5

<210> 366

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 366

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr

1 5

<210> 367

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 367

Ala Trp Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 368

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 368

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn

1 5

<210> 369

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 369

Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr

1 5

<210> 370

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 370

tgttctgcac aagaca

16

<210> 371

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 371

gtaaggatgc aggtcatgag t

21