



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0107503
(43) 공개일자 2012년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/22 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7019174

(22) 출원일자(국제) 2010년12월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2012년07월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/061760

(87) 국제공개번호 WO 2011/079185

국제공개일자 2011년06월30일

(30) 우선권주장

61/284,743 2009년12월23일 미국(US)

61/414,052 2010년11월16일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사
우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자

우, 지우민

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

우, 얀

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위혜숙, 양영준

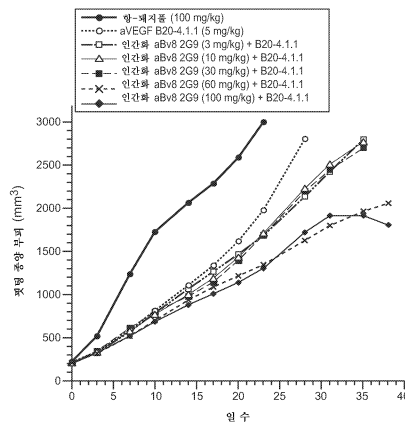
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 항-BV8 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 Bv8에 대한 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도40



(72) 발명자

유, 란란

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

페라라, 나폴레옹

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

리앙, 웨이-칭

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

맹, 유-주 지.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

티엔, 자넷

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 D, F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;
- (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;
- (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 C, S 또는 T이고; X₃은 A, L, N, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- (vi) DX₁NYGEAYAMDY (여기서, X₁은 G 또는 S임)를 포함하는 HVR-H3

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 6개의 HVR 서열:

- (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 D, F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;
- (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;
- (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 C, S 또는 T이고; X₃은 A, L, N, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- (vi) DX₁NYGEAYAMDY (여기서, X₁은 G 또는 S임)를 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, HVR-L1이 서열번호 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145 및 151로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146 및 152로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148 및 154로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149 및 155로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150 및 156으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항-Bv8 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,

(i) KASQSSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;

(ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;

(iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;

(iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;

(v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 A, L, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및

(vi) DSNYGEAYAMDY를 포함하는 HVR-H3

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 하기 6개의 HVR 서열:

(i) KASQSSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;

(ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;

(iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;

(iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;

(v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 A, L, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및

(vi) DSNYGEAYAMDY를 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, HVR-L1이 서열번호 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145 및 151로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146 및 152로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148 및 154로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149 및 155로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150 및 156으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항-Bv8 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (2) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (3) 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (4) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (5) 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (6) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (2) 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (3) 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (4) 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (5) 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (6) 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (2) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (3) 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (4) 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (5) 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (6) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;
 - (2) 서열번호 122의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;
 - (3) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;
 - (4) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;
 - (5) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및
 - (6) 서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3
- 을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 240 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 241을 추가로 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 14

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 11을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 15

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 13을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항-Bv8 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.02 nM 미만의 Kd 값으로 인간 Bv8에 결합하는 항-Bv8 항체.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 2G9 항-Bv8 항체보다 2배 이상 단단하게 인간 Bv8에 결합하는 항-Bv8 항체.

청구항 18

하기 6개의 HVR 서열:

(i) SASS X₁VFYMH (여기서, X₁은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-L1;

(ii) DTSX₁LAS (여기서, X₁은 K 또는 N임)를 포함하는 HVR-L2;

(iii) QQWS X₁X₂PX₃T (여기서, X₁은 F, S, W 또는 Y이고; X₂은 D 또는 E이고; X₃은 I, L 또는 M임)를 포함하는 HVR-L3;

(iv) GFX₁X₂STX₃GMGVS (여기서, X₁은 L 또는 Y이고; X₂은 I 또는 L이고; X₃은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-H1;

(v) HIYWDDTRYNP₁SLKS를 포함하는 HVR-H2; 및

(vi) RDHGYWFDY를 포함하는 HVR-H3

을 포함하는 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, HVR-L1이 서열번호 169, 175, 181, 187 및 193으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 170, 176, 182, 188 및 194로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 171, 177, 183, 189 및 195로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 172, 178, 184, 190 및 196으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 173, 179, 185, 191 및 197로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 174, 180, 186, 192 및 198로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 항-Bv8 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 핵산.

청구항 21

제20항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

청구항 23

제21항 또는 제22항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 24

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 담체를 포함하는 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 제약 조성물인 조성물.

청구항 27

(a) 적합한 숙주 세포에서 제21항 또는 제22항의 벡터를 발현시키고, (b) 항체를 회수하는 것을 포함하는, 항-Bv8 항체의 제조 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 숙주 세포가 원핵세포인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 숙주 세포가 진핵세포인 방법.

청구항 30

대상체에게 유효량의 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양, 암 또는 세포 증식성 장애의 치료 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 암이 유방암, 결장직장암, 폐암, 신암, 교모세포종, 식도암, 흑색종, 방광암, 난소암, 췌장암 및 간세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 암이 유방암, 결장직장암, 폐암, 신암, 난소암 또는 교모세포종인 방법.

청구항 33

혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 앓는 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항-Bv8 항체를 투여하여 상기 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 것을 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 앓는 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 병리학적 상태가 신생물성 상태인 방법.

청구항 35

대상체에게 유효량의 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 내피 세포 증식의 억제 방법.

청구항 36

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 유효량의 제2 의약을 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 항-Bv8 항체가 제1 의약인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 제2 의약이 또 다른 항체, 화학요법제, 세포독성제, 항혈관신생제, 면역억제제, 전구약물, 시토키인, 시토키인 길항제, 세포독성 방사선요법, 코르티코스테로이드, 항구토제, 암 백신, 진통제 또는 성장-억제제인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 제2 의약이 항혈관신생제인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 항혈관신생제가 항-VEGF 항체인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 항-VEGF 항체가 베바시주맙인 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 의약을 항-Bv8 항체의 투여 이전에 또는 이후에 투여하는 방법.

청구항 42

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 의약을 항-Bv8 항체와 공동으로 투여하는 방법.

청구항 43

제30항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 유효량의 화학요법제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본원은 35 USC 119(e) 하에 2009년 12월 23일자로 출원된 가출원 번호 61/284,743 및 2010년 11월 16일자로 출원된 가출원 번호 61/414,052 (이들 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 대해 우선권을 주장하는, 37 CFR 1.53(b)(1) 하에 출원된 정식 출원이다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-Bv8 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0005]

이미 존재하는 내피로부터의 새로운 혈관 형성을 수반하는 혈관신생이 다양한 장애의 발병기전과 관련이 있다는 것은 현재 널리 확립되어 있다. 이러한 것은 고형 종양 및 전이, 아테롬성동맥경화증, 수정체후 섬유증식

증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 증후군, 예컨대 증식성 망막병증, 예를 들어, 당뇨병성 망막병증, 연령-관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부, 류마티스 관절염 및 건선을 포함한다. 문헌 [Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992)]; [Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol., 53: 217-239 (1991)]; 및 [Garner A., "Vascular diseases", In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710].

[0006] 종양 성장의 경우에, 혈관신생은 증식증에서 신생물로의 이행, 및 종양의 성장 및 전이를 위한 영양분의 제공에 결정적이라 여겨진다. 문헌 [Folkman et al., Nature, 339: 58 (1989)]. 신생혈관형성은 종양 세포가 정상 세포에 비해 성장 이익 및 증식 자율성을 획득할 수 있도록 한다. 종양은 이용가능한 모세관 층으로부터의 거리로 인해 수 mm의 크기만으로 증식할 수 있는 단일 이상 세포로서 시작되는 것이 일반적이고, 장기간 동안 추가의 성장 및 확산 없이 '휴면 상태'인 채로 있을 수 있다. 이후, 일부 종양 세포가 혈관신생 표현형으로 전환되어 내피 세포를 활성화시키고, 내피 세포가 증식하여 새로운 모세 혈관으로 성숙된다. 이러한 새로 형성된 혈관은 원발성 종양의 지속적인 성장을 허용할 뿐만 아니라, 전이성 종양 세포의 확산 및 콜로니 재형성까지도 허용한다. 따라서, 유방암 뿐만 아니라 여러 다른 종양에서 종양 절편 내의 미세혈관의 밀도와 환자 생존 사이의 상관관계가 관찰되었다. 문헌 [Weidner et al., N. Engl. J. Med, 324: 1-6 (1991)]; [Horak et al., Lancet, 340: 1120-1124 (1992)]; [Macchiarini et al., Lancet, 340: 145-146 (1992)]. 혈관신생 전환을 제어하는 정확한 메카니즘은 널리 이해되어 있지 않지만, 종양 덩어리의 신생혈관형성은 다수의 혈관신생 자극인자 및 억제제의 최종적인 균형으로 인한 것이라 여겨진다 (문헌 [Folkman, 1995, Nat Med 1(1):27-31]).

[0007] 혈관 발생 프로세스는 엄격하게 조절된다. 현재까지, 대부분 주변 세포에 의해 생산된 분비형 인자인 상당한 수의 분자가 EC 분화, 증식, 이동 및 코드-유사 구조로의 융합을 조절하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)가 혈관신생을 자극하고 혈관 투과성을 유도하는데 수반되는 핵심 인자로서 확인되었다. 문헌 [Ferrara et al., Endocr. Rev., 18: 4-25 (1997)]. 단일 VEGF 대립유전자의 손실조차 배아 치사를 초래한다는 발견은 혈관계의 발달 및 분화에서 이러한 인자가 수행하는 대체불가능한 역할을 지적한다. 또한 VEGF는 종양 및 안내 장애와 관련된 신생혈관형성의 핵심 매개물인 것으로 나타났다. 상기 문헌 [Ferrara et al., Endocr. Rev.]. VEGF mRNA는 검사된 대다수의 인간 종양에서 과다발현된다. 문헌 [Berkman et al., J. Clin. Invest., 91: 153-159 (1993)]; [Brown et al., Human Pathol., 26: 86-91 (1995)]; [Brown et al., Cancer Res., 53: 4727-4735 (1993)]; [Mattern et al., Brit. J. Cancer, 73: 931-934 (1996)]; [Dvorak et al., Am. J. Pathol., 146: 1029-1039 (1995)].

[0008] Bv8은 부신 피질 모세관 내피 세포의 증식, 생존 및 이동을 유도하는 것으로 나타났다 (문헌 [LeCouter, J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003)]). Bv8 및 EG-VEGF는 코리파제 폴드(colipase fold)로 불리는 5개의 디설피드 가교 모티프에 의해 규정된 보다 큰 클래스의 펩티드에 구조적으로 속하는, 고도로 관련된 2가지 분비 단백질 (프로키네틴신-1 및 -2로도 지칭됨)이다 (문헌 [DeCouter, J. et al., Nature 420, 860-867 (2002)]; [LeCouter, J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003)]; [Li, M. et al., Mol Pharmacol 59, 692-698 (2001)]). Bv8은 초기에는 개구리 봄비나 바리에가테(Bombina variegata)의 피부로부터의 분비 단백질로서 확인되었다 (문헌 [Mollay, C. et al., Eur J Pharmacol 374, 189-196 (1999)]). Bv8의 클로닝 및 발현이 2003년 3월 13일자로 공개된 WO 03/020892에 기재되어 있다. Bv8 및 EG-VEGF는 고도로 관련된 2가지 G-단백질 커플링된 수용체 (GPCR), EG-VEGF/PKR-1 (R1) 및 EG-VEGF/PKR-2 (R2)에 결합한다 (문헌 [Masuda, Y et al., Biochem Biophys Res Commun 293, 496-402 (2002)]; [Lin, D.C. et al., J Biol Chem 277, 19276-19280 (2002)]). EG-VEGF 및 Bv8은 특이적 내피 세포 유형에 대해 선택적인 미토겐으로서 특징 규명되었다 (문헌 [LeCouter, J. et al., Nature 412(6850):877-84 (2001)] 및 [LeCouter, J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 100, 2685-2690 (2003)]). 이러한 패밀리에 기인하는 기타 활성은 침해수용 (상기 문헌 [Mollay, C. et al.]), 위장관 운동성 (상기 문헌 [Li, M. et al.]), 일주기성 운동 리듬의 조절 (문헌 [Cheng, M.Y., et al., Nature 417, 405-410 (2002)]) 및 후각 망울 신경발생 (문헌 [Matsumoto, S., et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, 4140-4145 (2006)])을 포함한다. 또한, Bv8은 시험관 내에서 과립구 및 단핵구 콜로니의 생성을 자극하였다 (상기 문헌 [LeCouter, J. et al. (2003)]; 문헌 [Dorsch, M. et al., J. Leukoc Biol 78(2), 426-34 (2005)]). Bv8은 대식 세포에 대한 화학유인 물질로서 특징 규명되었다 (문헌 [LeCouter et al., Proc Natl Acad Sci USA 101, 16813-16919 (2004)]).

[0009] 다수의 질환 및 장애에 있어서의 혈관신생의 역할을 고려할 때, 이러한 프로세스를 유발하는 하나 이상의 생물학적 효과를 감소시키거나 억제하는 수단을 갖는 것이 바람직하다. 특허 출원 및 공보를 포함하여 본원에

서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 부분적으로 Bv8에 대한 다양한 항체를 기반으로 한다. Bv8은 중요하고 유리한 치료 표적으로서 제시되고, 본 발명은 Bv8의 발현 및/또는 활성화와 관련된 병리학적 상태를 표적화하는데 사용하기 위한 치료제 및 진단제로서의 항체를 제공한다. 따라서, 본 발명은 Bv8과 관련된 방법, 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다.
- [0011] 특정 실시양태에서,
- [0012] (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 D, F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- [0013] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;
- [0014] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;
- [0015] (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0016] (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 C, S 또는 T이고; X₃은 A, L, N, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0017] (vi) DX₁NYGEAYAMDY (여기서, X₁은 G 또는 S임)를 포함하는 HVR-H3
- [0018] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0019] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 하기 3개의 HVR 서열:
- [0020] (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 D, F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- [0021] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2; 및
- [0022] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;
- [0023] 및 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 240을 포함한다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 하기 3개의 HVR 서열:
- [0025] (i) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0026] (ii) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 C, S 또는 T이고; X₃은 A, L, N, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0027] (iii) DX₁NYGEAYAMDY (여기서, X₁은 G 또는 S임)를 포함하는 HVR-H3;
- [0028] 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 241을 포함한다.
- [0029] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:
- [0030] (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 D, F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- [0031] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;
- [0032] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;

- [0033] (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0034] (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 C, S 또는 T이고; X₃은 A, L, N, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0035] (vi) DX₁NYGEAYAMDY (여기서, X₁은 G 또는 S임)를 포함하는 HVR-H3
- [0036] 을 포함하는 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0037] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 VL 위치 28 및 29 중 하나 또는 둘 모두에 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 VH 위치 52a에 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 VH 위치 54에 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 VH 위치 95 및 96 중 하나 또는 둘 모두에 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 (1) VL 위치 28 및 29 중 하나 또는 둘 모두에; 및/또는 (2) VH 위치 52a에; 및/또는 (3) VH 위치 54에; 및/또는 (4) VH 위치 95 및 96 중 하나 또는 둘 모두에 돌연변이를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 뮤린/키메라 항-Bv8 항체와 비교하여 VH 위치 96에 돌연변이를 추가로 포함하고, VH 위치 95에 돌연변이를 포함하지 않는다.
- [0038] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 서열번호 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145 및 151로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146 및 152로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148 및 154로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149 및 155로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150 및 156으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 3개의 경쇄 HVR 서열은 서열번호 240이다. 특정 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 3개의 중쇄 HVR 서열은 서열번호 241이다.
- [0040] 특정 실시양태에서,
- [0041] (i) KASQSX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;
- [0042] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;
- [0043] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;
- [0044] (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0045] (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 A, L, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0046] (vi) DSNYGEAYAMDY를 포함하는 HVR-H3
- [0047] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 가변

도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0048] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 하기 3개의 HVR 서열:

[0049] (i) KASQX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;

[0050] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2; 및

[0051] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;

[0052] 및 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 240을 포함한다.

[0053] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 하기 3개의 HVR 서열:

[0054] (i) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;

[0055] (ii) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 A, L, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및

[0056] (iii) DSNYGEAYAMDY를 포함하는 HVR-H3;

[0057] 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 서열번호 241을 포함한다.

[0058] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:

[0059] (i) KASQX₁X₂YX₃X₄X₅SYMN (여기서, X₁은 L 또는 V이고; X₂는 D 또는 I이고; X₃은 F, G, S, W 또는 Y이고; X₄는 A, G, H 또는 V이고; X₅는 D, E 또는 Y임)을 포함하는 HVR-L1;

[0060] (ii) AASX₁X₂EX₃ (여기서, X₁은 N 또는 Y이고; X₂는 L 또는 R이고; X₃은 S 또는 T임)을 포함하는 HVR-L2;

[0061] (iii) QQINEDPFT를 포함하는 HVR-L3;

[0062] (iv) GYX₁X₂X₃X₄YDMH (여기서, X₁은 S 또는 T이고; X₂는 F 또는 L이고; X₃은 F, M, P, T 또는 V이고; X₄는 D, E, H, I 또는 N임)를 포함하는 HVR-H1;

[0063] (v) YIX₁X₂YX₃GX₄T X₅YNQKFKG (여기서, X₁은 H, S 또는 T이고; X₂는 S 또는 T이고; X₃은 A, L, S 또는 T이고; X₄는 A, E 또는 S이고; X₅는 I, L, S 또는 T임)를 포함하는 HVR-H2; 및

[0064] (vi) DSNYGEAYAMDY를 포함하는 HVR-H3

[0065] 을 포함하는 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0066] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 서열번호 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145 및 151로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146 및 152로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148 및 154로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149 및 155로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150 및 156으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0067] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 3개의 경쇄 HVR 서열은 서열번호 240이다. 특정 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크

서열 마이너스 3개의 중쇄 HVR 서열은 서열번호 241이다.

[0068] 또 다른 실시양태에서,

[0069] (1) 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0070] (2) 서열번호 62의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0071] (3) 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0072] (4) 서열번호 64의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0073] (5) 서열번호 65의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0074] (6) 서열번호 66의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0075] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0076] 또 다른 실시양태에서,

[0077] (1) 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0078] (2) 서열번호 86의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0079] (3) 서열번호 87의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0080] (4) 서열번호 88의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0081] (5) 서열번호 89의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0082] (6) 서열번호 90의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0083] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0084] 또 다른 실시양태에서,

[0085] (1) 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0086] (2) 서열번호 92의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0087] (3) 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0088] (4) 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0089] (5) 서열번호 95의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0090] (6) 서열번호 96의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0091] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0092] 또 다른 실시양태에서,

[0093] (1) 서열번호 121의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H1;

[0094] (2) 서열번호 122의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H2;

[0095] (3) 서열번호 123의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-H3;

[0096] (4) 서열번호 124의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L1;

[0097] (5) 서열번호 125의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L2; 및

[0098] (6) 서열번호 126의 아미노산 서열을 포함하는 HVR-L3

[0099] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

[0100] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.

특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열

마이너스 3개의 경쇄 HVR 서열은 서열번호 240이다. 특정 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 3개의 중쇄 HVR 서열은 서열번호 241이다.

- [0101] 한 실시양태에서, 서열번호 7을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0102] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 9를 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 10을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0103] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 11을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0104] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 13을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0105] 특정 실시양태에서, 서열번호 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0106] 특정 실시양태에서, 서열번호 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0107] 한 실시양태에서, 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0108] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0109] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0110] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0111] 특정 실시양태에서, 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0112] 특정 실시양태에서, 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0113] 한 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0114] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0115] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0116] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 서열번호 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다. 특정 실시양태에서, 서열번호 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0118] 특정 실시양태에서, Bv8에 결합하는 항체가 약 0.02 nM 미만의 Kd 값으로 인간 Bv8에 결합하는 것인 상기 항-

Bv8 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

- [0119] 특정 실시양태에서, Bv8에 결합하는 항체가 약 0.01 nM 미만의 Kd 값으로 인간 Bv8에 결합하는 것인, 상기 항-Bv8 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0120] 특정 실시양태에서, Bv8에 결합하는 항체가 키메라 2G9 항-Bv8 항체보다 2배 이상 단단하게 인간 Bv8에 결합하는 것인, 상기 항-Bv8 항체 또는 그의 단편이 제공된다. 특정 실시양태에서, Bv8에 결합하는 항체가 키메라 2G9 항-Bv8 항체보다 5배 이상 단단하게 인간 Bv8에 결합하는 것인, 상기 항-Bv8 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0121] 특정 실시양태에서, Kd 값은 표면 플라즈몬 공명 검정을 이용하여 측정된다. 특정 실시양태에서, Kd 값은 전장 항-Bv8 항체를 사용하여 측정된다. 특정 실시양태에서, Kd 값은 항-Bv8 항체의 Fab 버전을 사용하여 측정된다.
- [0122] 특정 실시양태에서,
- [0123] (i) SASS X_1VFYMH (여기서, X_1 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-L1;
- [0124] (ii) $DTSX_1LAS$ (여기서, X_1 은 K 또는 N임)를 포함하는 HVR-L2;
- [0125] (iii) $QQWS X_1X_2PX_3T$ (여기서, X_1 은 F, S, W 또는 Y이고; X_2 는 D 또는 E이고; X_3 은 I, L 또는 M임)를 포함하는 HVR-L3;
- [0126] (iv) $GFX_1X_2STX_3GMGVS$ (여기서, X_1 은 L 또는 Y이고; X_2 는 I 또는 L이고; X_3 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0127] (v) $HIYWDDDTRYNPSLKS$ 를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0128] (vi) $RDHGYWFX_1Y$ (여기서, X_1 은 D 또는 T임)를 포함하는 HVR-H3
- [0129] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0130] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:
- [0131] (i) SASS X_1VFYMH (여기서, X_1 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-L1;
- [0132] (ii) $DTSX_1LAS$ (여기서, X_1 은 K 또는 N임)를 포함하는 HVR-L2;
- [0133] (iii) $QQWS X_1X_2PX_3T$ (여기서, X_1 은 F, S, W 또는 Y이고; X_2 는 D 또는 E이고; X_3 은 I, L 또는 M임)를 포함하는 HVR-L3;
- [0134] (iv) $GFX_1X_2STX_3GMGVS$ (여기서, X_1 은 L 또는 Y이고; X_2 는 I 또는 L이고; X_3 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0135] (v) $HIYWDDDTRYNPSLKS$ 를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0136] (vi) $RDHGYWFX_1Y$ (여기서, X_1 은 D 또는 T임)를 포함하는 HVR-H3
- [0137] 을 포함하는 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0138] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 서열번호 157, 163, 169, 175, 181, 187 및 193으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 158, 164, 170, 176, 182, 188 및 194로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 159, 165, 171, 177, 183, 189 및 195로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 160, 166, 172, 178, 184, 190 및 196으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 161, 167, 173, 179, 185, 191 및 197로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 162, 168, 174, 180, 186, 192 및 198로 이루어진 군으로부터 선택된 것으로 아미노산 서열을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0139] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 III 컨센서스

스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.

- [0140] 특정 실시양태에서,
- [0141] (i) SASS X_1VFYMH (여기서, X_1 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-L1;
- [0142] (ii) $DTSX_1LAS$ (여기서, X_1 은 K 또는 N임)를 포함하는 HVR-L2;
- [0143] (iii) $QQWS X_1X_2PX_3T$ (여기서, X_1 은 F, S, W 또는 Y이고; X_2 는 D 또는 E이고; X_3 은 I, L 또는 M임)를 포함하는 HVR-L3;
- [0144] (iv) $GFX_1X_2STX_3GMGVS$ (여기서, X_1 은 L 또는 Y이고; X_2 는 I 또는 L이고; X_3 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0145] (v) $HIYWDDDTRYNPSLKS$ 를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0146] (vi) $RDHGYWFDY$ 를 포함하는 HVR-H3
- [0147] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0148] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:
- [0149] (i) SASS X_1VFYMH (여기서, X_1 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-L1;
- [0150] (ii) $DTSX_1LAS$ (여기서, X_1 은 K 또는 N임)를 포함하는 HVR-L2;
- [0151] (iii) $QQWS X_1X_2PX_3T$ (여기서, X_1 은 F, S, W 또는 Y이고; X_2 는 D 또는 E이고; X_3 은 I, L 또는 M임)를 포함하는 HVR-L3;
- [0152] (iv) $GFX_1X_2STX_3GMGVS$ (여기서, X_1 은 L 또는 Y이고; X_2 는 I 또는 L이고; X_3 은 P 또는 S임)를 포함하는 HVR-H1;
- [0153] (v) $HIYWDDDTRYNPSLKS$ 를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0154] (vi) $RDHGYWFDY$ 를 포함하는 HVR-H3
- [0155] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0156] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 서열번호 157, 163, 169, 175, 181, 187 및 193으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 158, 164, 170, 176, 182, 188 및 194로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 159, 165, 171, 177, 183, 189 및 195로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 160, 166, 172, 178, 184, 190 및 196으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 161, 167, 173, 179, 185, 191 및 197로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 174, 180, 186, 192 및 198로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0157] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.
- [0158] 또 다른 실시양태에서, 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변 도메인 및 서열번호 24를 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0159] 특정 실시양태에서,
- [0160] (i) $EASQSVDDDDSYM N$ 을 포함하는 HVR-L1;
- [0161] (ii) $ATSNLAS$ 를 포함하는 HVR-L2;
- [0162] (iii) $QQSNEDPFT$ 를 포함하는 HVR-L3;
- [0163] (iv) $GYTFTNSWMN$ 을 포함하는 HVR-H1;

- [0164] (v) RIDPSDSETHYNQKFKD를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0165] (vi) DSSYDGFYAMDY를 포함하는 HVR-H3
- [0166] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0167] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:
- [0168] (i) EASQSVDDDDSYMN을 포함하는 HVR-L1;
- [0169] (ii) ATSNLAS를 포함하는 HVR-L2;
- [0170] (iii) QQSNEPFT를 포함하는 HVR-L3;
- [0171] (iv) GYTFTNSWMN을 포함하는 HVR-H1;
- [0172] (v) RIDPSDSETHYNQKFKD를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0173] (vi) DSSYDGFYAMDY를 포함하는 HVR-H3
- [0174] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0175] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 서열번호 199 및 205로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L2가 서열번호 200 및 206으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-L3이 서열번호 201 및 207로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H1이 서열번호 202 및 208로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H2가 서열번호 203 및 209로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, HVR-H3이 서열번호 204 및 210으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0176] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.
- [0177] 특정 실시양태에서,
- [0178] (i) KSSEYVSNALS를 포함하는 HVR-L1;
- [0179] (ii) GTNKLED를 포함하는 HVR-L2;
- [0180] (iii) QQGYDIPT를 포함하는 HVR-L3;
- [0181] (iv) GFTFSDYFMG를 포함하는 HVR-H1;
- [0182] (v) GIDTKSYNYATYYSGSVKG를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0183] (vi) NYGNYGAFDS를 포함하는 HVR-H3
- [0184] 으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 추가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0185] 특정 실시양태에서, 하기 6개의 HVR 서열:
- [0186] (i) KSSEYVSNALS를 포함하는 HVR-L1;
- [0187] (ii) GTNKLED를 포함하는 HVR-L2;
- [0188] (iii) QQGYDIPT를 포함하는 HVR-L3;
- [0189] (iv) GFTFSDYFMG를 포함하는 HVR-H1;
- [0190] (v) GIDTKSYNYATYYSGSVKG를 포함하는 HVR-H2; 및
- [0191] (vi) NYGNYGAFDS를 포함하는 HVR-H3
- [0192] 을 포함하는, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.

- [0193] 특정 실시양태에서, HVR-L1이 아미노산 서열 서열번호 211을 포함하고, HVR-L2가 아미노산 서열 서열번호 212를 포함하고, HVR-L3이 아미노산 서열 서열번호 213을 포함하고, HVR-H1이 아미노산 서열 서열번호 214를 포함하고, HVR-H2가 아미노산 서열 서열번호 215를 포함하고, HVR-H3이 아미노산 서열 서열번호 216을 포함하는 것인, Bv8에 결합하는 항체 또는 그의 단편이 제공된다.
- [0194] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 및 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 추가로 포함한다.
- [0195] 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체의 프레임워크 서열의 적어도 일부는 인간 컨센서스 프레임워크 서열이다. 한 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv 또는 (Fab')₂ 단편으로부터 선택된 항체 단편이다.
- [0196] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산이 제공된다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 한 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 한 실시양태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵세포이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 CHO 세포이다. 한 실시양태에서, 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하고, 항체를 단리하는 것을 포함하는, 항-Bv8 항체의 제조 방법이 제공된다.
- [0197] 특정 실시양태에서, 본 발명은 또한 상기 임의의 항-Bv8 항체를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 상기 임의의 항-Bv8 항체를 제약상 허용되는 담체와 혼합하여 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0198] 특정 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 제약상 허용되는 담체와 혼합하여 포함하는, 종양 전이의 예방 또는 치료를 위한 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0199] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-Bv8 항체의 Bv8에 대한 결합을 허용하는 조건 하에 생물학적 샘플을 상기 항체와 접촉시키고, 항체와 Bv8 사이에 복합체가 형성되었는지 여부를 검출하는 것을 포함하는, 생물학적 샘플에서 Bv8의 존재를 검출하는 방법이 제공된다.
- [0200] 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양, 암 또는 세포 증식성 장애의 치료 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암, 결장직장암, 폐암, 신암, 교모세포종, 식도암, 흑색종, 방광암, 난소암, 췌장암 및 간세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암, 결장직장암, 폐암, 신암, 난소암 또는 교모세포종이다. 고려되는 암의 예시적이고 비제한적인 목록이 본원의 "정의" 부분에 제공된다.
- [0201] 특정 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 앓는 대상체에게 유효량의 본원에 제공된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 혈관신생을 감소시키거나 억제하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 병리학적 상태는 신생물성 상태이다. 특정 실시양태에서, 병리학적 상태는 비-신생물성 상태이다. 고려되는 비-신생물성 상태의 예시적이고 비제한적인 목록이 본원의 "정의" 부분에 제공된다. 특정 실시양태에서, 비-신생물성 상태는 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 미숙아 망막병증, 신생혈관 녹내장, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관형성, 망막/맥락막 신생혈관형성 및 류마티스 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0202] 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 내피 세포 증식의 억제 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 내피 세포는 부신 피질 내피 세포이다.
- [0203] 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 호중구 이동의 억제 방법이 제공된다.
- [0204] 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양 전이의 억제 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 전이는 림프계에 존재한다. 특정 실시양태에서, 전이는 원위 기관에 존재한다.
- [0205] 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 통증

의 치료, 예방 또는 감소 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 통증은 급성 또는 만성 통증이다. 특정 실시양태에서, 통증은 급성 또는 만성 염증성 통증이다. 특정 실시양태에서, 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 류마티스 관절염의 치료 방법이 제공된다.

[0206] 특정 실시양태에서, 상기 및 본원에 기재된 방법은 대상체에게 유효량의 제2 의약을 투여하는 것 (여기서 항-Bv8 항체가 제1 의약임)을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 의약은 또 다른 항체, 화학요법제, 세포독성제, 항혈관신생제, 면역억제제, 전구약물, 시토킨, 시토킨 길항제, 세포독성 방사선요법, 코르티코스테로이드, 항구토제, 암 백신, 진통제 또는 성장-억제제이다. 특정 실시양태에서, 제2 의약은 항혈관신생제이다. 특정 실시양태에서, 제2 의약 또는 항혈관신생제는 항-VEGF 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다. 특정 실시양태에서, 제2 의약은 항-Bv8 항체의 투여 이전에 또는 이후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 제2 의약은 항-Bv8 항체와 공동으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 방법은 대상체에게 유효량의 제3 의약 (여기서, 제3 의약은 화학요법제임)을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0207] 고려되는 화학요법제의 예시적이고 비제한적인 목록이 본원의 "정의" 부분에 제공된다. 특정 실시양태에서, 화학요법제는 파클리탁셀, 카르보플라틴, 시스플라틴, 겐시타빈 및 페메트렉세드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0208] 특정 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태를 앓는 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 항혈관신생제와 조합하여 투여함으로써 상기 항혈관신생제의 억제 활성을 개선시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 항혈관신생제의 효능을 개선하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태는 종양, 암 또는 세포 증식성 장애이다. 특정 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 상태는 비-신생물성 상태이다. 특정 실시양태에서, 비-신생물성 상태는 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 미숙아 망막병증, 신생혈관 녹내장, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관형성, 망막/맥락막 신생혈관형성 및 류마티스 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 비-신생물성 상태는 류마티스 관절염이다.

[0209] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간 환자이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간 암 환자이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 전이가 발생한 것으로 진단되었을 수 있거나, 전이 발생의 위험이 있을 수 있는 인간 암 환자이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 VEGF 길항제로부터 재발되었거나 VEGF 길항제에 대해 불응성이다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다.

[0210] 특정 실시양태에서, 항혈관신생제는 항-Bv8 항체의 투여 이전에 또는 이후에 투여된다. 특정 실시양태에서, 항혈관신생제는 항-Bv8 항체와 공동으로 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-항원 작용제는 항-VEGF 작용제이다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 항-VEGF 항체이다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다.

[0211] 본원에 기재된 임의의 실시양태 또는 그의 임의의 조합은 본원에 기재된 임의의 및 모든 항-Bv8 항체 및 본 발명의 방법에 적용된다.

도면의 간단한 설명

[0212] 도 1a-f: 항-Bv8 항체의 경쇄 및 중쇄 HVR 루프 서열. 도면은 경쇄 HVR 서열, L1, L2 및 L3, 및 중쇄 HVR 서열, H1, H2 및 H3을 나타낸다. 각 항체에 대한 서열 넘버링은 하기와 같다: 키메라 2G9 (HVR-H1은 서열번호 49이고; HVR-H2는 서열번호 50이고; HVR-H3은 서열번호 51이고; HVR-L1은 서열번호 52이고; HVR-L2는 서열번호 53이고; HVR-L3은 서열번호 54임); h2G9.K4G1.폴리쉬 (HVR-L1은 서열번호 55이고; HVR-L2는 서열번호 56이고; HVR-L3은 서열번호 57이고; HVR-H1은 서열번호 58이고; HVR-H2는 서열번호 59이고; HVR-H3은 서열번호 60임); h2G9.K4G1.v19 (HVR-L1은 서열번호 61이고; HVR-L2는 서열번호 62이고; HVR-L3은 서열번호 63이고; HVR-H1은 서열번호 64이고; HVR-H2는 서열번호 65이고; HVR-H3은 서열번호 66임); h2G9.K4G1.v25 (HVR-L1은 서열번호 67이고; HVR-L2는 서열번호 68이고; HVR-L3은 서열번호 69이고; HVR-H1은 서열번호 70이고; HVR-H2는 서열번호 71이고; HVR-H3은 서열번호 72임); h2G9.K4G1.v27 (HVR-L1은 서열번호 73이고; HVR-L2는 서열번호 74이고; HVR-L3은 서열번호 75이고; HVR-H1은 서열번호 76이고; HVR-H2는 서열번호 77이고; HVR-H3은 서열번호 78임); h2G9.K4G1.v37 (HVR-L1은 서열번호 79이고; HVR-L2는 서열번호 80이고; HVR-L3은 서열번호 81이고; HVR-H1은 서열번호 82이고; HVR-H2는 서열번호 83이고; HVR-H3은 서열번호 84임); h2G9.K4G1.v52 (HVR-L1은 서열번호 85이고; HVR-L2는 서열번호 86이고; HVR-L3은 서열번호 87이고; HVR-H1은 서열번호 88이고; HVR-H2는 서열번호 89이고; HVR-H3은 서열번호 90임); h2G9.K4G1.v55 (HVR-L1은 서열번호 91이고; HVR-L2는 서열

번호 92이고; HVR-L3은 서열번호 93이고; HVR-H1은 서열번호 94이고; HVR-H2는 서열번호 95이고; HVR-H3은 서열번호 96임); h2G9.K4G1.v63 (HVR-L1은 서열번호 97이고; HVR-L2는 서열번호 98이고; HVR-L3은 서열번호 99이고; HVR-H1은 서열번호 100이고; HVR-H2는 서열번호 101이고; HVR-H3은 서열번호 102임); h2G9.K4G1.v64 (HVR-L1은 서열번호 103이고; HVR-L2는 서열번호 104이고; HVR-L3은 서열번호 105이고; HVR-H1은 서열번호 106이고; HVR-H2는 서열번호 107이고; HVR-H3은 서열번호 108임); h2G9.K4G1.v65 (HVR-L1은 서열번호 109이고; HVR-L2는 서열번호 110이고; HVR-L3은 서열번호 111이고; HVR-H1은 서열번호 112이고; HVR-H2는 서열번호 113이고; HVR-H3은 서열번호 114임); h2G9.K4G1.v67 (HVR-L1은 서열번호 115이고; HVR-L2는 서열번호 116이고; HVR-L3은 서열번호 117이고; HVR-H1은 서열번호 118이고; HVR-H2는 서열번호 119이고; HVR-H3은 서열번호 120임); h2G9.K4G1.v73 (HVR-L1은 서열번호 121이고; HVR-L2는 서열번호 122이고; HVR-L3은 서열번호 123이고; HVR-H1은 서열번호 124이고; HVR-H2는 서열번호 125이고; HVR-H3은 서열번호 126임); h2G9.K4G1.v75 (HVR-L1은 서열번호 127이고; HVR-L2는 서열번호 128이고; HVR-L3은 서열번호 129이고; HVR-H1은 서열번호 130이고; HVR-H2는 서열번호 131이고; HVR-H3은 서열번호 132임); h2G9.K4G1.v77 (HVR-L1은 서열번호 133이고; HVR-L2는 서열번호 134이고; HVR-L3은 서열번호 135이고; HVR-H1은 서열번호 136이고; HVR-H2는 서열번호 137이고; HVR-H3은 서열번호 138임); h2G9.K4G1.v80 (HVR-L1은 서열번호 139이고; HVR-L2는 서열번호 140이고; HVR-L3은 서열번호 141이고; HVR-H1은 서열번호 142이고; HVR-H2는 서열번호 143이고; HVR-H3은 서열번호 144임); h2G9.K4G1.v92 (HVR-L1은 서열번호 145이고; HVR-L2는 서열번호 146이고; HVR-L3은 서열번호 147이고; HVR-H1은 서열번호 148이고; HVR-H2는 서열번호 149이고; HVR-H3은 서열번호 150임); h2G9.K4G1.v19H/v55L (HVR-L1은 서열번호 151이고; HVR-L2는 서열번호 152이고; HVR-L3은 서열번호 153이고; HVR-H1은 서열번호 154이고; HVR-H2는 서열번호 155이고; HVR-H3은 서열번호 156임); 키메라 2B9 (HVR-L1은 서열번호 157이고; HVR-L2는 서열번호 158이고; HVR-L3은 서열번호 159이고; HVR-H1은 서열번호 160이고; HVR-H2는 서열번호 161이고; HVR-H3은 서열번호 162임); h2B9.v1 (HVR-L1은 서열번호 163이고; HVR-L2는 서열번호 164이고; HVR-L3은 서열번호 165이고; HVR-H1은 서열번호 166이고; HVR-H2는 서열번호 167이고; HVR-H3은 서열번호 168임); h2B9.v10 (HVR-L1은 서열번호 169이고; HVR-L2는 서열번호 170이고; HVR-L3은 서열번호 171이고; HVR-H1은 서열번호 172이고; HVR-H2는 서열번호 173이고; HVR-H3은 서열번호 174임); h2B9.v23 (HVR-L1은 서열번호 175이고; HVR-L2는 서열번호 176이고; HVR-L3은 서열번호 177이고; HVR-H1은 서열번호 178이고; HVR-H2는 서열번호 179이고; HVR-H3은 서열번호 180임); h2B9.v37 (HVR-L1은 서열번호 181이고; HVR-L2는 서열번호 182이고; HVR-L3은 서열번호 183이고; HVR-H1은 서열번호 184이고; HVR-H2는 서열번호 185이고; HVR-H3은 서열번호 186임); h2B9.v56 (HVR-L1은 서열번호 187이고; HVR-L2는 서열번호 188이고; HVR-L3은 서열번호 189이고; HVR-H1은 서열번호 190이고; HVR-H2는 서열번호 191이고; HVR-H3은 서열번호 192임); h2B9.v76 (HVR-L1은 서열번호 193이고; HVR-L2는 서열번호 194이고; HVR-L3은 서열번호 195이고; HVR-H1은 서열번호 196이고; HVR-H2는 서열번호 197이고; HVR-H3은 서열번호 198임); 키메라 3F1 (HVR-L1은 서열번호 199이고; HVR-L2는 서열번호 200이고; HVR-L3은 서열번호 201이고; HVR-H1은 서열번호 202이고; HVR-H2는 서열번호 203이고; HVR-H3은 서열번호 204임); h3F1.v1 (HVR-L1은 서열번호 205이고; HVR-L2는 서열번호 206이고; HVR-L3은 서열번호 207이고; HVR-H1은 서열번호 208이고; HVR-H2는 서열번호 209이고; HVR-H3은 서열번호 210임); 및 키메라 2D3 (HVR-L1은 서열번호 211이고; HVR-L2는 서열번호 212이고; HVR-L3은 서열번호 213이고; HVR-H1은 서열번호 214이고; HVR-H2는 서열번호 215이고; HVR-H3은 서열번호 216임).

아미노산 위치는 하기 기재된 바와 같은 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다.

도 1g. 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 카바트 경쇄 HVR 서열은 서열번호 240으로 나타낸다. 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 카바트 중쇄 HVR 서열은 서열번호 241로 나타낸다.

도 2a-b. 항-Bv8 항체 2G9 변이체의 (a) 경쇄 가변 도메인 및 (b) 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 3a-b. 항-Bv8 항체 2B9 변이체의 (a) 경쇄 가변 도메인 및 (b) 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 4a-b. 항-Bv8 항체 3F1 변이체의 (a) 경쇄 가변 도메인 및 (b) 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 5a-b. 항-Bv8 항체 2D3 변이체의 (a) 경쇄 가변 도메인 및 (b) 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 6a-b. 인간화 항-Bv8 항체 2B9 변이체의 (a) 경쇄 가변 도메인 및 (b) 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 7. (1) 마우스 2G9 (m2G9) 프레임워크 서열 및 인간 컨센서스 카파 I 프레임워크 서열 및 (2) m2G9 프레임워크 서열 및 인간 컨센서스 카파 IV 프레임워크 서열 사이의 차이를 보여주는 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 8. (1) 마우스 2G9 (m2G9) 프레임워크 서열 및 인간 컨센서스 하위군 I (G1) 프레임워크 서열 및 (2) m2G9 프레임워크 서열 및 인간 컨센서스 하위군 III (G3) 프레임워크 서열 사이의 차이를 보여주는 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열. 위치는 카바트에 따라 넘버링되고 초가변 영역은 박스로 표시하였다.

도 9. 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1.폴리쉬, h2G9.K4G1.v27, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v63, h2G9.K4G1.v64, h2G9.K4G1.v67, h2G9.K4G1.v77 및 h2G9.K4G1.v80에 대한 L1, L2 및 L3 아미노산 서열.

도 10. 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1.폴리쉬, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v25, h2G9.K4G1.v37, h2G9.K4G1.v65, h2G9.K4G1.v73, h2G9.K4G1.v75, h2G9.K4G1.v77, h2G9.K4G1.v92에 대한 H1, H2 및 H3 아미노산 서열.

도 11은 키메라 2D3 항체가 키메라 2B9 뿐만 아니라 키메라 3F1 및 키메라 2G9 항체와는 다른 에피토프(들)를 가질 수 있음을 보여준다. ELISA 경쟁 검정은 키메라 3F1 및 키메라 2G9 항체가 인간 Bv8에 대한 키메라 2B9 결합과 경쟁하였음을 보여준다. 키메라 2D3은 단지 부분적으로만 인간 Bv8에 대한 키메라 2B9 항체 결합과 경쟁하였다.

도 12는 마우스 2G9, 키메라 2G9, 마우스 2B9, 키메라 2B9 및 키메라 3F1에 의해 인간 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 차단을 보여준다. 검정의 결과는 키메라 2G9가 인간 Bv8-유도된 ACE 세포 증식을 완전히 억제할 수 있음을 보여준다.

도 13은 키메라 2G9, h2G9.K4G1, h2G9.K4G3, h2G9.K1G1 및 h2G9.K1G3 항-Bv8 항체에 의한 인간 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 차단을 보여준다. 검정의 결과는 키메라 2G9 항-Bv8 항체가 20 μ g/mL 항체 농도에서 가장 높은 차단 활성을 가짐을 보여준다.

도 14a-b는 인간 Bv8에 대한 h2G9.K4G1 변이체 (L1: D28E, D28S, G29A, G29S, H2: C52aA, C52aS, N54A, N54S, H3: D95E, D95S, G96A 및 G96S)의 결합을 입증하는 파지 경쟁 검정 결과를 도시한다.

도 15는 키메라 2G9 및 h2G9.K4G1.폴리쉬 항-Bv8 항체에 의한 인간 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 차단을 보여준다.

도 16은 인간 Bv8에 대하여 친화도-개선된 h2G9.K4G1.폴리쉬 변이체 (L1/L2 소프트-무작위화 라이브러리로부터의 h2G9.K4G1.v27, v52, v55, v63, v64, v67, v77, v80)의 결합을 입증하는 파지 경쟁 검정 결과를 도시한다.

도 17은 인간 Bv8에 대하여 친화도-개선된 h2G9.K4G1.폴리쉬 변이체 (H1/H2 소프트-무작위화 라이브러리로부터의 h2G9.K4G1.v19, v25, v37, v65, v73, v75, v77, v92)의 결합을 입증하는 파지 경쟁 검정 결과를 도시한다.

도 18은 인간 Bv8에 대한 하기 항-Bv8 항체 (Fab): h2G9.K4G1.폴리쉬, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55 및 h2G9.K4G1.v73의 해리 상수를 보여준다.

도 19는 인간 Bv8 및 시노물구스 원숭이 Bv8에 대한 인간화 항-Bv8 항체 (Fab 및 IgG) h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55의 해리 상수를 보여준다.

도 20은 25°C에서 인간 Bv8 고정된 비아코어(BIAcore) 칩 상에 50nM 항-Bv8 Fab 항체를 주사한 경우에 이탈 속도 향상을 나타내는 센서그램을 보여준다.

도 21은 인간 Bv8 및 시노물구스 원숭이 Bv8에 대한 하기 항-Bv8 항체 (IgG): 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55의 해리 상수를 보여준다. 결과는 인간화 항-Bv8 항체, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55의 친화도가 키메라 2G9 항-Bv8 항체 보다 2배 이상 단단한 것으로 나타났음을 보여준다.

도 22는 인간화 항-Bv8 항체가 인간 Bv8의 마우스 2G9 항체에 대한 결합을 차단함을 보여준다. 5가지 친화도 성숙 인간화 항-Bv8 항체 (h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 및 h2G9.K4G1.v19H/v55L)는 모 폴리쉬 K4G1 분자와 비교하여 대략 5 내지 8배 강한 차단 능력을 가졌다.

도 23은 지정 농도 ($\mu\text{g/mL}$)에서의 키메라 2G9, h2G9K4G1.폴리쉬, h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 및 h2G9K4G1.v73 항-Bv8 항체에 의한 인간 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 차단을 보여준다. 인간화 항-Bv8 항체 h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 및 h2G9K4G1.v73은 인간 Bv8-유도된 ACE 증식의 차단에 있어서 유의한 개선을 보여주었다.

도 24는 지정 농도 ($\mu\text{g/mL}$)에서의 h2G9K4G1.폴리쉬, h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v55 및 키메라 2D3 항-Bv8 항체에 의한 마우스 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 차단을 보여준다.

도 25. HM7 인간 결장암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 26. A673 인간 횡문근육종 암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 27. HT55 인간 결장암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 28. Calu-6 인간 폐암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 29. Colo-205 인간 결장암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 30. HPAC 인간 췌장암 치료에서의 키메라 3F1, 키메라 2B9, 키메라 2D3 및 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 31. Calu-6 인간 폐암 치료에서의 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 32. HM7 인간 결장암 치료에서의 키메라 2D3, h2G9.K4G1.폴리쉬, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 33. A673 인간 횡문근육종 암의 치료에서의 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 34. HT55 인간 결장암 치료에서의 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 35. Colo-205 인간 결장암 치료에서의 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 36. HPAC 인간 췌장암 치료에서의 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55 항-Bv8 항체의 효능 연구.

도 37. LXFL529 인간 비소세포 폐 암종 세포 치료에 있어서, 항-VEGF 항체의 존재 및 부재하에서의 항-Bv8 마우스 항체 (3F1 및 2B9)의 효능 연구.

도 38은 단일 작용제로서의 또는 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한 루이스 폐 암종 (LLC) 동종이식편의 성장 억제를 보여준다.

도 39는 단일 작용제로서의 또는 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한 HM7 인간 결장직장 암종 이종이식편의 성장 억제를 보여준다.

도 40은 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한 H460 인간 비소세포 폐 암종 이종이식편의 성장 억제를 보여준다.

도 41은 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한, H460 인간 비소세포 폐 암종 이종이식편을 보유하는 마우스의 생존기간 연장을 보여준다.

도 42는 단독의 또는 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한, HT29 인간 결장직장 암종 이종이식편의 성장 억제를 보여준다.

도 43은 단독의 또는 항-VEGF 항체와 조합된 항-Bv8 항체에 반응한, HT29 인간 결장직장 암종 이종이식편을

보유하는 마우스의 생존기간 연장을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0213] 발명의 상세한 설명
- [0214] 본 발명은 항-Bv8 항체에 관한 방법, 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다. 상기 방법, 조성물, 키트 및 제조품에 대한 상세한 설명을 본원에서 제공한다.
- [0215] 일반적 기술
- [0216] 본원에서 기재하거나 언급하는 기술 및 절차는 일반적으로 널리 이해되어 있고, 통상적인 방법론, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001)], [Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al., eds., (2003))]; 시리즈 [METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995))], [Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL], 및 [ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))]에 기재되어 있는 광범위하게 활용되는 방법론을 이용하여 당업자에 의해 통상적으로 사용된다.
- [0217] 정의
- [0218] 용어 "Bv8", "Bv8 동족체", "프로키네티신-2" ("PK2", "KAL4" 및 "MIT1"로도 공지되어 있음)는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 전장 폴리펩티드 및/또는 전장 폴리펩티드의 활성 단편을 지칭한다. 천연 서열 Bv8은 Bv8의 자연 발생 전전구 형태, 전구 형태 및 성숙 형태 및 말단절단 형태, 자연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태 및 자연 발생 대립유전자 변이체)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 천연 Bv8 아미노산 서열은 서열번호 235 내지 239에 나타난다. 인간 및 뮤린 Bv8 서열은 또한, 예를 들어 문헌 [Wechselberger et al. (FEBS Lett. 462:177-181 (1999))] 및 [Li et al. (Mol. Pharm. 59:692-698 (2001))]에 개시되어 있다.
- [0219] "Bv8 수용체"는 Bv8이 결합하고 Bv8의 생물학적 특성을 조정하는 분자이다. 따라서, 용어 "Bv8 수용체"는 그의 의미 내에 PKR1/GPR73/EG-VEGF 수용체-1/PROKR1 및 PKR2/GPR73L1/EG-VEGF 수용체-2/PROKR2 (문헌 [LeCouter et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:2685-2690]; [Lin et al., 2002, J. Biol. Chem., 277:19276-19280]; [Masuda et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Commun., 293:396-402])를 포함한다.
- [0220] 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성인"이 폴리펩티드와 관련하여 사용되는 경우, 이것은 특이적으로 결합하고 세포 반응, 예를 들어 증식, 이동 등을 조절하는 분자의 능력을 지칭한다. 세포 반응은 또한 수용체를 통해 매개되는 것, 예를 들어 이동 및/또는 증식 (이에 제한되지 않음)을 포함한다.
- [0221] 본원의 목적상, Bv8과 관련하여 "활성인" 또는 "활성"은 천연 또는 자연 발생 Bv8의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 보유하는 Bv8의 형태(들)를 지칭하며, 여기서 "생물학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 Bv8이 보유하는, 항원성 에피토프에 대항하여 항체의 생산을 유도하는 능력 이외의, 천연 또는 자연 발생 Bv8에 의해 야기되는 생물학적 기능 (억제성 또는 자극성)을 지칭하고, "면역학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 Bv8이 보유하는, 항원성 에피토프에 대항하여 항체의 생산을 유도하는 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, Bv8의 생물학적 활성은 골수 세포 가동화를 조절하고/거나, 종양 혈관신생을 촉진하고/거나, 종양 전이를 촉진하는 능력이다.
- [0222] 용어 "항-Bv8 항체" 또는 "Bv8에 결합하는 항체"는 Bv8을 표적화하는데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용할 만큼 충분한 친화도로 Bv8과 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, Bv8에 결합하는 항체는 $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0.1 \text{ nM}$, 또는 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 의 해리 상수 (Kd)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 다양한 종으로부터의 Bv8 사이에서 보존된 Bv8의 에피토프에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 및 키메라 2D3으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체로서 인간 Bv8의 동일한 에피토프에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 인간 Bv8에 대한 결합에 대하여 키메라 2G9, h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 및 키메라 2D3으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체와 경쟁한다.
- [0223] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내재적

결합 친화도를 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_d)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상의 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태가 하기 기재되어 있다.

[0224]

특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 비표지된 항원의 연속 적정물의 존재 하에 (125 I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후에 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 검정에서 기재되는 바와 같이 (문헌 [Chen, et al. (1999) J. Mol Biol 293:865-881]), 항-Bv8 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 검정 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스(Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [125 I]-항원을 관심 Fab (예를 들어, 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함)의 연속 희석액과 혼합한다. 이어서, 관심 Fab를 밤새 인큐베이션하되; 그러나, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈(Tween)TM-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μ l/웰의 섬광제 (마이크로신티(MicroScint)TM-20; 팩커드(Packard))를 첨가하고, 플레이트를 탑카운트(TopCount) 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다. 다른 실시양태에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 유닛 (RU)으로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어TM-2000 또는 비아코어TM-3000 (비아코어, 인크.(BIAcore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용함으로써 측정한다. 간략하게 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지침에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 유닛 (RU)을 달성하도록 5 μ l/분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 미반응 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 동역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM에서 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈TM 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (비아코어TM 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881]을 참조한다. 결합 속도가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 을 초과하면, 결합 속도는 분광측정계, 예컨대 정지 유동 장착 분광광도계 (아비브 인스트루먼트(Aviv Instruments)) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM 아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉(ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 통과 대역)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0225]

"단리된" 핵산 분자는 항체 핵산의 천연 공급원 내에서 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염성 핵산 분자로부터 확인되어 이로부터 분리시킨 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 조건 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는, 예를 들어 천연 세포의 경우와 상이한 염색체 위치에 존재하며 통상적으로 항체를 발현하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0226]

본원에 사용된 용어 "벡터"는 그에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 가지 유형의 벡터가 "플라스미드"인데, 이는 부가의 DNA 절편을 라이게이션시킬 수 있는 환상 이중가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡

터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이같은 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "재조합 벡터" 또는 "발현 벡터")로서 칭해진다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0227] 본원에서 상호교환적으로 사용된 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 나타내고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이러한 변형은 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열에 비뉴클레오타이드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 합성 후에, 예컨대 표지와의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형은, 예를 들어 "캡", 1개 이상의 자연 발생 뉴클레오타이드의 유사체로의 치환, 뉴클레오타이드 간 변형, 예컨대 비하전된 연결 (예를 들어 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등)을 갖는 것 및 하전된 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것, 펜던트 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입체 (예를 들어, 아크리딘, 프소칼렌 등)가 있는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 함유하는 것, 알킬레이터를 함유하는 것, 변형된 연결이 있는 것 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등), 뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실기가 예를 들어 포스포네이트 기, 포스포에이트 기로 대체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오타이드에 대한 추가의 연결이 제조되도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH가 포스포릴화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 표준 보호기로 유도체화될 수도 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헥톨로스, 비-시클릭 유사체 및 염기성 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드를 비롯한, 당염기에 일반적으로 공지되어 있는 리보스 또는 데옥시리보스의 유사한 형태를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결이 대안적인 연결기로 대체될 수 있다. 이러한 대안적인 연결기에는 포스포에이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈")로 대체된 실시양태가 포함되지만 이에 제한되지는 않으며, 여기서 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H, 또는 에테르(-O-) 연결을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬이다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 적용된다.

[0228] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로, 길이가 약 200개 미만의 뉴클레오타이드인 (반드시 그럴 필요는 없음) 짧은, 일반적으로 단일 가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오타이드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 서로 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오타이드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0229] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 광범위한 의미로 상호교환적으로 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 더욱 상세하게 기술됨)을 포함할 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙된 항체일 수 있다.

[0230] "단리된" 항체는 천연 환경 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 항체이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 항체가 95 중량%를 초과하도록, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하도록, (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계를

통해 제조될 것이다.

- [0231] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하고 각각의 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성과 관련하여 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 모두에서 상보성 결정 영역 또는 초가변 영역 (CDR 또는 HVR, 본원에서 상호교환적으로 사용됨)이라 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이는 β -시트 구조를 연결하고 몇몇 경우에는 이러한 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개의 HVR에 의해 연결된 β -시트 형상을 상당 부분 채택하고 있다. 각 쇄에서의 HVR들은 FR 영역에 의해 함께 근접하게 위치되어 있고, 다른 쇄로부터의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는 것에 직접 수반되지는 않지만, 항체-의존적 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.
- [0232] 항체를 파파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라고 불리는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 나머지 "Fc" 단편이 생성되는데, Fc라는 명칭은 그의 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다.
- [0233] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 2-쇄 Fv 중에서, 이러한 영역은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인이 단단하게 비공유적으로 회합된 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv 중에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv중에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다. 이러한 형상에서, 각 가변 도메인의 3개의 HVR은 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면의 항원 결합 부위를 규정한다. 전체적으로, 6개의 HVR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR 만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0234] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 보유하는 Fab'를 나타낸다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.
- [0235] 임의의 척추동물 중으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 칭해지는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.
- [0236] 이뮤노글로불린은 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스로 지정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 몇 가지는 하위클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있다.
- [0237] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부만을 포함하고, 이때 이 부분은 무손상 항체 내에 존재할 때 이 부분과 정상적으로 관련된 기능을 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부 유지한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 항원과 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은, 무손상 항체 내에 존재하는 경우에 Fc 영역과 통상적으로 연관된 생물학적 기능들, 예를 들어 FcRn 결합성, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합성 중의 적어도 하나의 기능을 보유하고 있다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 이같은 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.
- [0238] 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"가 본원에서 사용되는 경우, 이것은 서열에서 초가변이고/거나 구조적으

로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특유의 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재 하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)]; [Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0239] 많은 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하며, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 코티아는 구조적 루프의 위치를 대신 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이들 각각의 HVR로부터의 잔기를 하기 나타낸다.

루프 카바트	AbM	코티아	접촉
-----	---	-----	-----
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(카바트 넘버링)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 넘버링)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0240]

[0241] HVR은 다음과 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 상기 문헌 [Kabat et al.]에 따라 넘버링된다.

[0242] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0243] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 HVR로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 그것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은, 예를 들어 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0244] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 생산된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 당업계에 공지된 각종 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et

al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한, 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스(xenomice)에게 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)TM 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관해서는 예를 들어 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0245]

본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 이 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것으로 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서 표적 결합 폴리펩티드 서열은 복수개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선택 과정은 복수개의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 독특한 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도 개선, 표적 결합 서열의 인간화, 세포 배양물 중 그의 생성 개선, 생체내에서의 그의 면역원성 감소, 다중특이적 항체의 생성 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 모노클로날 항체임을 이해해야 한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지정된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대해 지정된다. 모노클로날 항체 제제는 이것의 특이성에 더하여 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않았다는 점에서 유리하다.

[0246]

수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것으로 나타내며, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975)]; [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)], [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)] 참조), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지 디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)]; [Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)]; [Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)]; [Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)]; 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자 또는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술로 제조할 수 있다.

[0247]

구체적으로, 본원에서의 모노클로날 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고,쇄 (들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)] 참조). 키메라 항체는 항체의 항원 결합 영역이 예를 들어 마카쿠 원숭이를 관심 항원으로 면역화하여 생성된 항체로부터 유래된 프리마티제드(PRIMATIZED)[®] 항체를 포함한다.

[0248]

용어 "다중특이적 항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 다중에피토프 특이성을 갖는 항체를 포함한다. 이러한 다중특이적 항체는 $V_H V_L$ 유닛이 다중에피토프 특이성을 갖는, 중쇄 가변 도메인 (V_H) 및 경쇄

가변 도메인 (V_L)을 포함하는 항체, 각각의 $V_H V_L$ 유닛이 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 V_L 및 V_H 도메인을 갖는 항체, 각각의 단일 가변 도메인이 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체, 전장 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab, Fv, dsFv, scFv, 디아바디, 이중특이적 디아바디 및 트리아바디, 및 공유 또는 비공유 연결된 항체 단편을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에 따르면, 다중특이적 항체는 각 에피토프에 5 μ M 내지 0.001 pM, 3 μ M 내지 0.001 pM, 1 μ M 내지 0.001 pM, 0.5 μ M 내지 0.001 pM, 또는 0.1 μ M 내지 0.001 pM의 친화도로 결합하는 IgG 항체이다.

[0249] "다중에피토프 특이성"은 동일하거나 상이한 항원(들) 상의 2개 이상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 "이중특이적"은 2개의 상이한 에피토프에 결합하는 능력을 지칭한다. "단일특이적"은 하나의 에피토프에만 결합하는 능력을 지칭한다.

[0250] 표현 "단일 도메인 항체" (sdAb) 또는 "단일 가변 도메인 (SVD) 항체"는 일반적으로 단일 가변 도메인 (V_H 또는 V_L)이 항원 결합을 부여할 수 있는 항체를 지칭한다. 즉, 단일 가변 도메인은 표적 항원을 인식하기 위해 또 다른 가변 도메인과의 상호작용을 필요로 하지 않는다. 단일 도메인 항체의 예는 낙타류 (라마 및 낙타) 및 연골어류 (예를 들어, 너스 상어)로부터 유래된 것 및 인간 및 마우스 항체로부터 재조합 방법으로 유래된 것을 포함한다 (문헌 [Nature (1989) 341:544-546]; [Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56]; [Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235]; [Trends Biotechnol (2003):21:484-490]; WO 2005/035572; WO 03/035694; 문헌 [Febs Lett (1994) 339:285-290]; WO00/29004; WO 02/051870).

[0251] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇠 내에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토했을 위해, 문헌 [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0252] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 정해진 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 기타 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다.

[0253] 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 쇠 (V_H - V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭한다. 동일 쇠 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디 역시 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0254] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이들의 변형은 상기 문헌 [Kabat et al.]에서 항체 수집물의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링 서열과 정렬함으로써 주어진 항체에 대하여 결정할 수 있다.

[0255] 카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 지칭하기 위해 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 지수"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 때 사용된다 (예를 들어, 상기 문헌 [Kabat et al.]에 보고된 EU 지수). "카바트에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 본원에서 달리 언급되지 않는다면, 항체 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다. 본원에서 달리 언급하지 않는다면, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 가출원 번호 60/640,323에서 EU 넘버링에 대한 도면 참조).

- [0256] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.
- [0257] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 관련이 있음) (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징과 관련하여 이들 2개 값 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주할 정도의, 상기 값 사이의 충분히 높은 정도의 유사성을 나타낸다. 상기 2개 값 사이의 차이는 참조/비교 값의 함수로서 예를 들어 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만 및/또는 약 10% 미만이다.
- [0258] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 감소된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 2개의 수치값 (일반적으로, 하나는 분자와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 분자와 관련이 있음) (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징과 관련하여 이들 2개 값 사이의 차이를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주할 정도의, 상기 값 사이의 충분히 높은 정도의 차이를 나타낸다. 상기 2개 값 사이의 차이는 참조/비교 값의 함수로서 예를 들어 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과 및/또는 약 50% 초과이다.
- [0259] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예에는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화가 포함된다.
- [0260] 본원에서의 용어 "Fc 영역"은 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 정의하는데 사용된다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226에서의 아미노산 잔기로부터, 또는 Pro230으로부터 이것의 카르복실 말단까지의 범위로 경계지어 진다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 생성 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작으로 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.
- [0261] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 상기 이펙터 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합할 것을 필요로 하고, 예를 들어 본원의 정의에서 개시된 바와 같은 다양한 검정을 사용하여 평가할 수 있다.
- [0262] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이들의 자연 발생 변이체를 포함한다.
- [0263] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)을 통하여 천연 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖고, 예를 들어 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서의 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과의 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 그와의 약 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 그와의 약 95% 이상의 상동성을 보유할 것이다.
- [0264] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 하위클래스의 수용체를 포함하고, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (예를 들어, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 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 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다.

- [0265] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG의 태아로의 전달 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]) 및 이뮤노글로불린의 항상성 조절을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997)]; [Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997)]; [Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조).
- [0266] 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 인간 FcRn에 대한 생체내 결합 및 혈청 반감기는, 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 투여한 영양류에서 검정할 수 있다. PCT 공보 WO 2000/42072 (Presta) 및 미국 출원 번호 12/577,967 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]을 참조한다.
- [0267] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능(들)을 수행한다. ADCC를 조절하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.
- [0268] "항체-의존성 세포 매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, NK 세포, 호중구 및 대식 세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)와 결합된 분비형 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포를 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있게 하고, 이후에 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특허 번호 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험 관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 PBMC 및 NK 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 생체내 평가할 수 있다.
- [0269] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에 표적 세포의 용해를 나타낸다. 고전적인 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재되어 있는 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 변형된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 변이체 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 또한 참조한다.
- [0270] 용어 "Fc 영역-포함 항체"는 Fc 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 항체의 정제 동안, 또는 항체를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 항체를 포함하는 조성물은 K447을 갖는 항체, 모든 K447이 제거된 항체, 또는 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0271] 본원의 목적상 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크로부터 유래되거나 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 "유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 기존의 아미노산 변화가 존재하는 경우에는, 바람직하게 5개 이하, 바람직하게 4개 이하, 또는 3개 이하의 기존의 아미노산 변화가 존재한다. 기존의 아미노산 변화가 VH에 존재하는 경우, 바람직하게는 이들 변화가 위치 71H, 73H 및 78H 중의 단지 3개, 2개 또는 1개에서만 일어나는 경우, 예를 들어 이들 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열 면에서 동일하다.
- [0272] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은

가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 카과 IV이다. 한 실시양태에서, VH의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 I이다. "VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다.

- [0273] "VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0274] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 중쇄 하위군 III의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0275] "VL 하위군 IV 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 경쇄 카과 하위군 IV 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0276] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al.]의 가변 경쇄 카과 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 취득된 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0277] "의약"은 해당 장애 또는 그의 증상, 또는 부작용을 치료하기 위한 활성 약물이다.
- [0278] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법으로의 치료가 이로울 임의의 상태이다. 여기에는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태 포함)이 포함된다. 본원에서 치료될 장애의 비-제한적인 예로는 악성 및 양성 종양; 암종, 모세포종, 및 육종이 포함된다.
- [0279] 질환의 "병리상태"는 환자의 행복을 위태롭게 하는 모든 현상을 포함한다. 암의 경우, 이것은 비정상적인 또는 제어가능하지 않은 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상적인 기능수행의 방해, 비정상적인 수준의 시토킨 또는 기타 분비 생성물의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 저해 또는 악화 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다는.
- [0280] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상적인 세포 증식과 관련된 장애를 지칭한다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.
- [0281] 본원에 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성 또는 양성 여부와 상관 없음), 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 본원에서 지칭되는 바와 같이, 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 상호 배타적인 것이 아니다.
- [0282] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 뇌하수체 암, 식도암, 성상세포종, 연부 조직 육종, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 신암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관 암종, 담낭 암종, 위암, 흑색종 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.
- [0283] 혈관신생의 조절이상은 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있는 여러 장애를 유발할 수 있다. 이러한 장애에는 미신생물성 및 신생물성 상태 둘 모두가 포함된다. 신생물성에는 상기 기재된 것들이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0284] 본 발명의 항체 및 항체 단편으로 치료할 수 있는 비-신생물성 상태는 예를 들어 원치않는 또는 이상 비대증, 양성 전립선 비대증, 통증 (급성 및 만성), 예를 들어 염증성 통증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선성 관절염, 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 색소성 망막염, 척수 근위축증 및 소뇌 변성), 자가면역 질환, 건선, 건선성 플라크, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화관, 하시모토 갑상선염, 혈관신생 장애, 안구 질환, 예컨대 추정 안구 히스토플라스마증 증후군, 망막 혈관형성, 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 예를 들어 미숙아 망막병증, 당뇨병성 신병증, 수정체후 섬유증증식증, 신생혈관 녹내장, 연령-관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관형성, 각막 이식편 신생혈관형성, 각막 이식 거부, 망막/맥락막 신생혈관형성, 각의 신생혈관형성 (피부홍조), 안구 신생혈관 질환, 혈관 질환, 혈관 상피 세포의 비정상적인 증식을 수반하는 상태, 혈관 재협착증, 길랑-바레 증후군, 폴립, 예컨대 결장 폴립, 가족성 선종성 폴립증, 비강 폴립 또는 위장 폴립, 위장 궤양, 영아

비후성 유문 협착, 비뇨기 폐쇄성 증후군, 메네테리에병, 분비성 선종 또는 단백질 손실 증후군, 섬유선종, 호흡기 질환, 담낭염, 신경섬유종증, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 비대증 (예를 들어, 그레이브병), 각막 및 기타 조직 이식, 염증성 질환, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 패혈증, 만성 폐쇄성 폐 질환, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 죽종, 화상, 외상, 방사선, 졸중, 저산소증 또는 허혈 후의 부종, 심근 경색으로 인한 부종, 허혈성 손상, 뇌 허혈 사건 후의 손상, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 졸중/폐쇄성 두부 손상/외상 관련), 혈소판 응집으로 인한 혈전, 섬유증 또는 부종 질환, 예컨대 간 경변, 폐 섬유증, 사르코이드증, 갑상선염, 전신 고점도 증후군, 활액 염증, RA에서의 판누스 형성, 골화성 근염, 비대성 골 형성, 골 관련 병리, 예컨대 골관절염, 구루병 및 골다공증, 불응성 복수, 골 또는 관절 염증, 골수이형성 증후군, 재생불량성 빈혈, 신장 또는 간; T-세포 매개 과민증 질환, 파제트병, 다낭성 신장 질환, 체액의 제3공간 질환 (췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 궤양성 대장염), 신장 장애, 신장 동종이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 또는 이식 거부, 염증성 장 질환, 급성 및 만성 신병증 (예를 들어, 증식성 사구체신염 및 당뇨병-유도된 신장 질환), 신증 증후군, 원치않는 또는 이상 조직 종괴 성장 (비-암), 비만, 지방 조직 종괴 성장, 혈우병 관절, 비후성 반흔, 모발 성장의 억제, 오슬러-웨버-랑뒤 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부의 과민 반응, 피부 부 장애, 예를 들어 건선 및 피부염, 습진, 광노화 (예를 들어, 인간 피부의 UV 조사에 의해 야기됨), 비후성 반흔 형성, 생식 관련 상태, 예컨대 자궁내막증, 난소 과자극 증후군, 다낭성 난소 질환, 자간전증, 기능장애성 자궁 출혈, 또는 불규칙과다월경, 자궁 섬유증, 조속 산통, 복수, 심낭 삼출 (예를 들어, 심막염 관련), 흉막 삼출, 내독소 쇼크 및 진균 감염, 특정 미생물 감염, 예를 들어 아데노바이러스, 한타바이러스, 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 예르시니아(*Yersinia*) 종 및 보르데텔라 페르투스시(*Bordetella pertussis*)로부터 선택된 미생물 병원체 감염, 및 정신의학적인 장애 (예를 들어, 정신분열증, 양극성 우울증, 자폐증 및 주의력 결핍 장애)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0285] 용어 "전암성"은 전형적으로 암으로 진행되거나 암을 발생시키기는 상태 또는 성장을 지칭한다. "전암성" 성장은 비정상적인 세포 주기 조절, 증식 또는 분화를 특징으로 하는 세포를 가질 것인데, 이는 세포 주기 조절, 세포 증식 또는 분화의 마커에 의해 결정될 수 있다.
- [0286] "이형성"은 조직, 기관 또는 세포의 임의의 비정상적인 성장 또는 발생을 의미한다. 특정 실시양태에서, 이형성은 고등급 또는 전암성이다.
- [0287] "전이"는 암이 그의 원발성 부위로부터 신체 내 다른 부위로 확산되는 것을 의미한다. 암 세포는 원발성 종양으로부터 분리되어, 림프관 및 혈관 내로 침투하고, 혈류를 통하여 순환하여 신체 내 그 밖의 정상 조직의 원위 중심에서 성장 (전이)할 수 있다. 전이는 국소 또는 원위일 수 있다. 전이는 종양 세포가 원발성 종양으로부터 이탈되고, 혈류 또는 림프를 따라 움직이고, 원위 부위에서 멈추는 것에 따른 순차적인 과정이다. 이러한 새로운 부위에서 상기 세포는 혈액 공급을 확립시키고 성장하여 생명을 위협하는 종괴를 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 용어 전이성 종양은 전이가 가능하지만 아직 신체의 다른 조직 또는 기관으로 전이되지 않은 종양을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 전이성 종양은 신체의 다른 조직 또는 기관으로 전이된 종양을 지칭한다.
- [0288] 종양 세포 내에서의 자극성 분자 경로와 억제성 분자 경로 모두가 이러한 거동을 조절하고, 종양 세포와 원위 부위의 숙주 세포 사이의 상호 작용이 또한 유의하다.
- [0289] "비-전이성"은, 양성인 암, 또는 여전히 원발성 부위 내에 있으면서 림프계 또는 혈관계로 침투되지 않았거나 원발성 부위 이외의 조직 내로 침투되지 않은 암을 의미한다. 일반적으로, 비전이성 암은 0, I 또는 II기의 암 및 때때로 III기 암인 임의의 암이다.
- [0290] 본원에 사용된 "전-전이 기관" 또는 "전-전이 조직"은 원발성 종양 또는 신체의 또 다른 부위로부터 암 세포가 전혀 검출되지 않은 기관 또는 조직을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에 사용되는 바와 같은 전-전이 기관 또는 전-전이 조직은 이러한 기관 또는 조직으로 원발성 종양 또는 신체의 또 다른 부위로부터의 암 세포가 확산되기 전 단계의 기관 또는 조직을 지칭한다. 전-전이 기관 또는 전-전이 조직의 예는 폐, 간, 뇌, 난소, 골 및 골수를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0291] "원발성 종양" 또는 "원발성 암"은 본래의 암을 의미하고, 대상체 신체 내 또 다른 조직, 기관 또는 위치에 위치하는 전이 병변이 아니다.
- [0292] "전이 기관" 또는 "전이 조직"은 가장 넓은 의미로 사용되고, 원발성 종양으로부터의 암 세포 또는 신체의 또 다른 부위로부터의 암 세포가 확산된 기관 또는 조직을 지칭한다. 전이 기관 및 전이 조직의 예는 폐, 간,

뇌, 난소, 골 및 골수를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0293] 본원에서 "암 재발"은 치료 후 암이 다시 생기는 것을 지칭하고, 원발성 기관에서 암이 다시 생기는 것 뿐만 아니라 암이 원발성 기관을 벗어나 다시 생기는 원위 재발을 포함한다.

[0294] "종양 부담"은 신체 내 암 세포 수, 종양 크기 또는 암의 양을 의미한다. 종양 부담은 또한 종양 부하라고 지칭되기도 한다.

[0295] "종양 수"는 종양의 수를 의미한다.

[0296] 본원에 사용된 "치료"는 치료될 개체 또는 세포의 자연적인 경과를 변경하려는 시도에서의 임상적 개입을 지칭하고, 예방을 위해 또는 임상 병리상태의 과정 도중에 수행될 수 있다. 원하는 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병적 결과의 경감, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 고식, 및 예후의 차도 또는 개선을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발생을 지연시키기 위해 사용된다.

[0297] 용어 "항-신생물성 조성물"은 적어도 1종의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암 치료에 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제 (항암제)의 예는 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아폽토시스성 작용제, 항튜불린제, 및 암 치료를 위한 기타 작용제, 예컨대 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바(TARCEVA)[®]), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡(Gleevec)[™] (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토키인, 하기 표적: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 기타 생물활성제 및 유기화합제 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그의 조합 또한 본 발명에 포함된다.

[0298] 용어 "항암 요법" 또는 "암 요법"은 암 치료에 유용한 요법을 지칭한다. 항암 치료제의 예는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아폽토시스성 작용제, 항-튜불린 작용제, 및 암 치료를 위한 기타 작용제, 예컨대 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바[®]), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡[®] (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 에르비투스(Erbix)[®] (세록시맵, 임클론(Imclone)), 인터페론, 시토키인, 하기 표적: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 기타 생물활성제 및 유기화합제 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 그의 조합 또한 본 발명에 포함된다.

[0299] "방사선 요법"은, 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴시키는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도시키기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 의미한다. 당업계에는 투여량 및 치료의 지속시간을 결정하는 수많은 방법이 공지되어 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 1일 당 10 내지 200 유닛 (그레이(Gray))의 범위이다.

[0300] 본원에 사용된 용어 "VEGF" 또는 "VEGF-A"는 문헌 [Leung et al. (1989) Science 246:1306] 및 [Houck et al. (1991) Mol. Endocrin., 5:1806]에 기재된 바와 같은 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189- 및 206- 아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자와 함께, 그의 자연 발생 대립유전자 형태 및 프로세싱된 형태를 지칭한다. 용어 "VEGF"는 또한 비-인간 중, 예컨대 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 무린 VEGF의 경우에는 mVEGF 등과 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단된 형태를 지칭하는데 사용된다. VEGF의 임의의 이러한 형태들에 대한 언급은 본원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)", "VEGF-A₁₀₉" 또는 "VEGF165"에 의해 확인될 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다.

[0301] "VEGF 길항제"는 1종 이상의 VEGF 수용체에 대한 결합을 포함하지만 이들로 한정되는 것은 아닌 VEGF 활성을

중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나, 감소시키거나, 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합함으로써 1종 이상의 수용체에 대한 그의 결합을 봉쇄시키는 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체, VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제, 및 VEGF에 결합하는 면역억제제, 예컨대 VEGF Trap을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 용어 "VEGF 길항제"에는 구체적으로 항체, 항체 단편, 기타 결합 폴리펩티드, 펩티드 및 비-펩티드 소분자를 비롯한, VEGF에 결합하여 VEGF 활성을 중화하거나, 차단하거나, 억제하거나, 없애거나, 감소시키거나, 방해할 수 있는 분자가 포함된다. 따라서, 용어 "VEGF 활성"은 구체적으로 VEGF의 VEGF 매개된 생물학적 활성을 포함한다.

[0302] VEGF 폴리펩티드과 관련한 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성인" 또는 "VEGF 활성"은 전장 및/또는 말단절단형 VEGF와 관련이 있는 물리/화학적 특성 및 생물학적 기능을 지칭한다. 특정 실시양태에서, VEGF 활성은 혈관신생을 유도 및/또는 자극 및/또는 촉진시킨다. 특정 실시양태에서, VEGF 활성은 신생혈관형성을 유도 및/또는 자극 및/또는 촉진시킨다. 특정 실시양태에서, VEGF 활성은 혈관 투과성을 유도 및/또는 조정한다. 특정 실시양태에서, VEGF 활성은 내피 세포 이동 및/또는 내피 세포 증식을 유도 및/또는 자극 및/또는 촉진시킨다.

[0303] 항-VEGF 중화 항체는 누드 마우스에서 다양한 인간 종양 세포주의 성장을 억제하고 (문헌 [Kim et al., Nature 362:841-844 (1993)]; [Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-1797 (1995)]; [Borgstroem et al., Cancer Res. 56:4032-4039 (1996)]; [Melnik et al., Cancer Res. 56:921-924 (1996)]), 또한 허혈성 망막 장애의 모델에서 안내 혈관신생을 억제한다. 문헌 [Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)].

[0304] 용어 "항-VEGF 항체" 또는 "VEGF에 결합하는 항체"는 충분한 친화도 및 특이성으로 VEGF와 결합할 수 있는 항체를 지칭하며, 이러한 항체는 VEGF를 표적화하는데 있어서의 진단제 및/또는 치료제로서 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 방해하는데 있어서의 치료제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,582,959, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 선택된 항체는 통상적으로 VEGF에 대해 충분히 강력한 결합 친화도를 가질 것이다. 예를 들어, 항체는 100 nM 내지 1 pM 사이의 K_d 값으로 hVEGF에 결합할 수 있다. 항체 친화도는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기반 검정 (예컨대 PCT 출원 공보 번호 WO2005/012359에 기재된 바와 같은 비아코어 검정); 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA); 및 경쟁 검정 (예를 들어, RIA)으로 결정할 수 있다. 상기 항체를 대상으로 다른 생물학적 활성 검정을 수행하여, 예를 들어 치료제로서의 그의 효과를 평가할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있고, 표적 항원 및 항체의 의도된 용도에 따라 달라진다. 이것의 예는 HUVEC 억제 검정, 종양 세포 성장 억제 검정 (예를 들어, WO 89/06692에 기재된 바와 같음), 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-매개 세포독성 (CDC) 검정 (미국 특허 5,500,362), 및 효능작용 활성 또는 조절 검정 (WO 95/27062 참조)을 포함한다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 또는 VEGF-E 또는 기타 성장 인자, 예컨대 PlGF, PDGF 또는 bFGF 어느 것에도 결합하지 않을 것이다. 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체, 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체 (문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599] 참조), 예를 들어 (이에 제한되지 않음) "베바시주맵 (BV)" (또한 "rhUMAb VEGF" 또는 "아바스틴(AVASTIN)[®]"이라고도 공지됨)이라고 공지된 항체를 포함한다. 아바스틴[®]은 현재 시판되고 있다. 베바시주맵은 돌연변이된 인간 IgG₁ 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF가 그의 수용체에 결합하는 것을 차단하는 무린 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성 결정 영역을 포함한다. 베바시주맵의 아미노산 서열의 대략 93% (대부분의 프레임워크 영역을 포함함)는 인간 IgG₁로부터 유래되고, 상기 서열의 약 7%는 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주맵은 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 베바시주맵 및 기타 인간화 항-VEGF 항체는 2005년 2월 26일자로 허여된 미국 특허 번호 6,884,879에 추가로 기재되어 있다. 추가의 항-VEGF 항체는 PCT 출원 공보 번호 WO 2005/012359에 기재된 바와 같은 G6 또는 B20 시리즈 항체 (예를 들어, G6-23, G6-31, B20-4.1)를 포함한다. 추가의 바람직한 항체에 대해서는 미국 특허 번호 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020; 6,054,297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 번호 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 및 20050112126; 및 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164

(2004)]을 참조한다.

[0305] 본원에 사용된 용어 "B20 시리즈 폴리펩티드"는 VEGF에 결합하는 항체를 비롯한 폴리펩티드를 지칭한다. B20 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267 (이들 특허 출원의 내용은 명백히 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 B20 항체 또는 B20-유래 항체의 서열로부터 유래된 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, B20 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재된 바와 같은 B20-4.1이다. 또 다른 실시양태에서, B20 시리즈 폴리펩티드는 PCT 공보 번호 WO 2009/073160 (그 전체 개시내용은 명백히 본원에 참조로 포함됨)에서 기재된 바와 같은 B20-4.1.1이다.

[0306] 본원에 사용된 용어 "G6 시리즈 폴리펩티드"는 VEGF에 결합하는 항체를 비롯한 폴리펩티드를 지칭한다. G6 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재된 G6 항체 또는 G6-유래 항체의 서열로부터 유래된 항체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재되어 있는 G6 시리즈 폴리펩티드는 G6-8, G6-23 및 G6-31을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0307] "혈관신생 인자 또는 작용제"는 혈관의 발달을 자극하는, 예를 들어 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈관의 안정성 및/또는 혈관형성 등을 촉진하는 성장 인자이다. 예를 들어, 혈관신생 인자는, 예를 들어 VEGF 및 VEGF 패밀리의 구성원 (VEGF-B, VEGF-C 및 VEGF-D), PlGF, PDGF 패밀리의 구성원, 섬유모세포 성장 인자 패밀리의 구성원 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴), 에프린, 텔타-유사 리간드 4 (DLL4), Del-1, 섬유모세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 간세포 성장 인자 (HGF)/분산 인자 (SF), 인터류킨-8 (IL-8), 렙틴, 미드카인, 뉴로펩틴, 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판 유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB 또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 종양 괴사 인자-알파 (TNF-알파) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이는 또한 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 표피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 패밀리의 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179]; [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지의 혈관신생 인자가 기입되어 있는 표 1); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206]을 참조한다.

[0308] "항혈관신생제" 또는 "신생혈관 억제제"는 혈관신생, 혈관형성 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 억제하는 저분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 그의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어 VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체에 대한 항체, VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트(SUTENT)[®]/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706)이다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오테라틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991)]; [Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003)] (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관신생 요법이 기입되어 있는 표 3); [Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999)]; [Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003)] (예를 들어, 항혈관신생 인자가 기입되어 있는 표 2); 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)] (예를 들어, 임상 시험에서 사용되는 항혈관신생제가 기입되어 있는 표 1)을 참조한다. 특정 실시양태에서, 항혈관신생제는 항-VEGF 작용제, 예컨대 항-VEGF 항체 (예를 들어, 베바시주맵)이다.

[0309] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리마이신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 삽입제, 효소 및 그의 단편 예컨대 뉴클레오티드분해 효소, 항생제, 및 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 (그의 단편 및/또는 변이체 포함) 또는 소분자 독소와 같은 독소, 및 하기에 개시되는 다양한 항종양 또는 항암 작용제를 포함하도록 의도된다. 다른 세포독성제는 하기 기재되어 있다. 종양치사제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

[0310] "독소"는 세포의 성장 또는 증식에 해로운 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질이다.

[0311] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예에는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)[®]); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술폰, 임프로술폰 및 피포술폰; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아펠라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌펠라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리에틸로펠라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)[®]); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 베툴린산; 캄프토테신 (예를 들어, 합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCANTIN)[®]), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)[®]), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노 캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (예를 들어, 그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토파이신 (특히 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (예를 들어, 합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코디티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤펌친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네딘 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색단백질 에네딘 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (예를 들어, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®]), 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주입물 (독실(DOXIL)[®]), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)[®]), PEG화 리포솜 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX)[®]) 및 테옥시독소루비신), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)[®]), 페메트렉세드 (알림타(ALIMTA)[®]) 테가푸르 (우프트랄(UFTORAL)[®]), 카페시타빈 (크셀로다(XELODA)[®]), 에포틸론, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 테메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)[®], 필데신(FILDESIN)[®]); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니돌; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)[®]), 파클리탁셀의 알부민-조각 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)[™]), 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)[®]); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 작용제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)[®]), 및 카르보플라틴; 튜블린 중합으로 미세소관이 형성되는 것을 저해하는 빈카, 예를 들어 빈블라стин (벨반(VELBAN)[®]), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)[®]), 빈데신 (엘디신[®], 필데신[®]), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBIN)[®]); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코

보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산, 예를 들어 백사로텐 (타르그레틴 (TARGRETIN)[®]); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)[®] 또는 오스탁 (OSTAC)[®]), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)[®]), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타 (ZOMETA)[®]), 알렌드로네이트 (포사막스(FOSAMAX)[®]), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)[®]), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)[®]), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)[®]); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연루된 신호전달 경로 중의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)[®] 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)[®] 백신, 류벡틴 (LEUVECTIN)[®] 백신, 및 박시드(VAXID)[®] 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸 (LURTOTECAN)[®]); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)[®]); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트[®], 화이자); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레코시브 또는 에토리코시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조미 (벨케이드(VELCADE)[®]); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 올리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)[®]); 픽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파문(RAPAMUNE)[®]); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)[™]); 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 시클로포스포미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP; 및 5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴[™])을 사용한 치료법에 대한 약어인 FOLFOX가 포함된다.

[0312] 본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항-호르몬제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)[®]), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)[®]), 이독시펜, 드롤록시펜, 탈록시펜 (에비스타(EVISTA)[®]), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절자 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 폴베스트란트 (파슬로텍스(FASLODEX)[®]) 및 EM800 (이같은 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 억제할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)[®]), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)[®]), 레트로졸 (페마라(FEMARA)[®]) 및 아미노글루테티미드, 및 기타 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)[®]), 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)[®]), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)[®] 및 엘리가르드(ELIGARD)[®]), 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스테론, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸스틸베스트롤 및 프레마린, 및 안드로겐/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든 트랜스레티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 및 또한 상기한 것 중 2종 이상의 조합물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아닌 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0313] 본원에 사용된 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포 (예컨대 Bv8을 발현하는 세포)의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기의 세포 (예컨대 Bv8을 발현하는 세포)의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및

ara-C는 또한 S기 정지로 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)]의, 예를 들어 p. 13에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레[®], 론-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔[®], 브리스톨-마이어스 스퀴브(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제제를 야기한다.

[0314] "독소루비신"은 안트라시클린 항생제이다. 독소루비신의 완전한 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-릭소-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0315] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 이뮤노어드헤신 (하기 정의 참조)을 지칭한다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)이, 예를 들어, 폴리펩티드의 정제 동안, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 재조합에 의해 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역이 있는 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 K447이 있는 폴리펩티드, 모든 K447이 제거된 폴리펩티드, 또는 K447 잔기가 존재하는 폴리펩티드와 존재하지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0316] "개체", "대상체" 또는 "환자"는 척추동물이다. 특정 실시양태에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물에는 가축 (예컨대 소), 경주용 동물, 애완동물 (예컨대 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0317] "유효량"은 목적하는 치료 또는 예방 결과 달성에 필요한 투여량에서 그에 필요한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.

[0318] 본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 "치료 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 목적하는 반응을 도출할 수 있는 본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 능력과 같은 요인들에 따라 달라질 수 있다. 또한 치료 유효량은 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 치료적으로 유의한 효과가 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 목적하는 예방 결과 달성에 필요한 투여량에서 그에 필요한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 반드시 아니지만 전형적으로, 예방 용량은 질환의 보다 초기 단계 전에, 또는 보다 초기 단계에서 대상체에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다.

[0319] "불응성"은 치료에 대한 질환 또는 상태의 내성 또는 비-반응성을 지칭한다 (예를 들어, 제공되는 치료에도 불구하고 신생물성 형질 세포의 수가 증가함). 특정 실시양태에서, 용어 "불응성"은 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및 화학요법 치료를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌 임의의 이전 치료에 대한 내성 또는 비-반응성을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "불응성"은 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하는 임의의 이전의 치료에 대한 질환 또는 상태의 고유의 비-반응성을 지칭한다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다.

[0320] "재발성"은 상기 질환 상태로의 환자의 질병의 회귀, 특히 명백한 회복 또는 부분적 회복 후 증상의 복귀를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 재발된 상태는 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 이전 치료 전의 질병으로 복귀하는 과정 또는 질병으로의 복귀를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 재발성 상태는 VEGF 길항제, 항혈관신생제 및/또는 화학요법 치료를 포함하는 암 요법에 대한 초기의 강한 반응 후에 질병으로 복귀하는 과정 또는 질병으로의 복귀를 지칭한다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체이다.

[0321] 용어 "효능"은 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되고, 원하는 효과를 야기하는 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 효능은 포화 수준에서 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 최대 관찰 효과를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 효능은 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 EC₅₀을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 효능은 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 효력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 효능은 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질이 질환의 경과 또는 기간에 유의한 효과, 예를 들어 본원에 정의된 바와 같은 임상적 이점을 생성하는 능력을 지칭한다.

[0322] 용어 "EC₅₀"은 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질이 기준선과 최대치 사이의 절반인 반응을 유도하는

농도를 지칭한다. 특정 실시양태에서, EC_{50} 은 최대 효과의 50%가 관찰되는 이뮤노글로불린, 항체 또는 Fc 융합 단백질의 농도를 나타낸다. 특정 실시양태에서, EC_{50} 은 생체내 최대 효과의 50% 달성에 필요한 혈장 또는 혈청 농도를 나타낸다.

[0323] 암 치료에서의 효능은 본 발명의 항체, 융합 단백질, 접합된 분자 또는 조성물이 암성 세포의 성장 또는 전이를 억제하거나 감소시키거나, 또는 암과 관련이 있는 하나 이상의 증상을 호전시키거나 경감시키는 능력을 검출하여 입증될 수 있다. 예를 들어 본 발명의 항체, 융합 단백질, 접합된 분자 또는 조성물의 투여 후 암성 세포의 성장 또는 전이의 감소, 암과 관련이 있는 하나 이상의 증상의 호전, 또는 사망률 및/또는 이환율에서의 감소가 있는 경우, 처치가 치료적인 것으로 간주된다. 본 발명의 항체, 융합 단백질 또는 조성물은 시험관내, 생체의 및 생체내 검정에서 종양 형성을 감소시키는 능력에 대해 시험될 수 있다. 암 요법의 경우, 생체내 효능은 예를 들어 또한 생존 기간, 질환 진행까지의 시간 (TTP), 반응률 (RR), 반응 기간 및/또는 삶의 질을 평가하여 측정될 수 있다.

[0324] 임상적 이익은 다양한 종점, 예를 들어 질환 진행의 어느 정도까지의 억제, 예를 들어 지연 및 완전한 정지, 질환 에피소드 및/또는 증상의 수 감소, 병변 크기의 감소, 인접한 말초 기관 및/또는 조직으로의 질환 세포 침윤의 억제 (즉, 감소, 지연 또는 완전한 정지), 질환 확산의 억제 (즉, 감소, 지연 또는 완전한 정지), 질환 병변을 퇴행시키거나 제거할 수는 있지만 반드시 그래야 하는 것은 아닌 자가면역 반응의 감소, 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 어느 정도까지의 완화, 치료 후 질환이 없는 상태, 예를 들어 무진행 생존을 보이는 기간의 증가, 전체 생존의 증가, 반응률의 증가, 및/또는 치료 후 주어진 시점에서의 사망률 감소를 평가하여 측정할 수 있다.

[0325] "유지 요법"은 질환의 재발 또는 진행 가능성을 감소시키기 위해 제공되는 치료 요법을 의미한다. 유지 요법은 최대로는 대상체의 수명까지 연장된 기간을 포함하는 임의의 길이의 시간 동안 제공될 수 있다. 유지 요법은 초기 요법 후에 제공될 수 있거나, 또는 초기 또는 추가의 요법과 함께 제공될 수 있다. 유지 요법에 사용되는 투여량은 다양할 수 있고, 다른 유형의 요법에 사용되는 투여량과 비교할 때 감소된 투여량을 포함할 수 있다.

[0326] 본원에서의 "아주반트 요법"은 잔류 질환의 증거가 전혀 검출될 수 없어서 질환 재발의 위험을 감소시키는, 수술 후에 제공되는 요법을 지칭한다. 아주반트 요법의 목표는 암의 재발을 예방하여 암-관련 사망 기회를 감소시키는 것이다.

[0327] 1종 이상의 추가의 치료제와의 "조합" 투여는 동시 (공동) 투여 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.

[0328] 본원에서, 용어 "동시에" 또는 "공동으로"는 2종 이상의 치료제의 투여가 적어도 일부의 투여 시간이 중첩되는 경우를 지칭하는데 사용된다. 따라서, 공동 투여는 1종 이상의 다른 작용제(들)을 불연속적으로 투여한 후에 연속하여 1종 이상의 작용제(들)을 투여하는 경우의 투여 요법을 포함한다.

[0329] "생물학적 샘플" (상호교환적으로 "샘플" 또는 "조직 또는 세포 샘플"로 칭해짐)은 개체로부터 수득된 다양한 샘플 유형을 포함하고, 진단 또는 모니터링 검정에서 사용될 수 있다. 상기 정의는 생물학적 기원의 혈액 및 기타 액체 샘플, 고체 조직 샘플 예컨대 생검 표본 또는 이로부터 유래된 조직 배양물 또는 세포, 및 그의 자손을 포함한다. 상기 정의는 획득 후 임의의 방식으로, 예컨대 시약으로의 처리, 가용화, 또는 특성 성분, 예컨대 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드의 풍부화, 또는 구획화 목적으로 반-고체 또는 고체 매트릭스 내에 포매시키는 것에 의해 조작된 샘플을 또한 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 임상 샘플을 포함하고, 배양 세포, 세포 상청액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생체액, 및 조직 샘플을 또한 포함한다. 생물학적 샘플의 공급원은 신선하고/거나, 동결되고/거나, 보존된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분; 체액 예컨대 뇌척수액, 양수, 복막액, 또는 간질액; 대상체의 임신 또는 발달 중 임의의 시점으로부터의 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 원발성 또는 전이성 종양으로부터 수득하였다. 생물학적 샘플은 자연계에서는 조직과 천연적으로 혼합되지 않는 화합물, 예를 들어 보존제, 항응고제, 완충제, 항응고제, 영양분, 항생제 등을 함유할 수 있다.

[0330] 본원의 목적상, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단된 조직 또는 세포의 박편을 의미한다. 조직 샘플의 다수의 절편을 취하여 본 발명에 따른 분석에 사용할 수 있음이 이해된다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플의 동일 절편을 형태적 및 분자적 수준 둘 다에서 분석하거나, 단백질 및 핵산 둘 다에 대하여 분석한다.

[0331] 용어 "제약 제제", "제약 조성물" 또는 "치료 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이라도 하는 형태

이고 제제가 투여되는 대상체에게 허용되지 않은 독성을 보이는 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균될 수 있다.

[0332] "멸균" 제제는 무균 상태이거나 또는 모든 살아있는 미생물 및 이들의 포자가 존재하지 않는다.

[0333] 본원에 사용된 단어 "표지"는 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되거나 융합되어, 접합되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체가 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변형을 촉매할 수도 있다.

[0334] 본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동물에게 비독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™ 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 플루로닉스(PLURONICS)™를 포함한다.

[0335] "리포솜"은 약물을 포유동물에게 전달하는데 유용한, 각종 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 통상적으로, 리포솜의 성분들은 생체막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다.

[0336] 조성물

[0337] 본 발명의 항-Bv8 항체는 바람직하게는 모노클로날이다. 본원에 제공된 항-Bv8 항체의 Fab, Fab', Fab'-SH 및 (Fab')₂ 단편 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이러한 항체 단편들은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 소화에 의해 생성될 수 있거나, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 이러한 항체 단편은 키메라 항체 단편 또는 인간화 항체 단편일 수 있다. 이러한 단편들은 하기 기재된 진단 및 치료 목적에 유용하다.

[0338] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득하는데, 즉 집단을 구성하는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아니라는 것으로 나타낸다.

[0339] 본 발명의 항-Bv8 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.

[0340] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. Bv8에 대한 항체가 Bv8 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성될 수 있다. Bv8은 당업계에 널리 공지되어 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있으며, 그 일부가 본원에 추가로 기재되어 있다. 예를 들어, 인간 및 마우스 Bv8의 재조합 생산이 하기 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 동물을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 Bv8로 면역화시킨다. 바람직한 실시양태에서, Bv8-IgG1 융합 단백질로 동물을 면역화시킨다. 보통 동물을 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노캠 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 몬타나주 해밀턴)를 사용하여 Bv8의 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화시키고, 용액을 여러 부위에 피내로 주사한다. 2주 후, 동물을 부스팅시킨다. 7일 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항-Bv8 역가에 대해 검정한다. 역가가 정점지속에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다.

[0341] 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0342] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배

지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

- [0343] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 미국 메릴랜드주 로크빌 소재의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생산과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0344] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 Bv8에 대한 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.
- [0345] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석으로 결정할 수 있다.
- [0346] 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지에는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포가 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장될 수 있다.
- [0347] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.
- [0348] 본 발명의 항-Bv8 항체를 조합 라이브러리로서 사용함으로써 제조하여 바람직한 활성 또는 활성들을 갖는 합성 항체 클론을 스크리닝할 수 있다. 원칙적으로, 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 합성 항체 클론이 선택된다. 원하는 항원에 대한 친화성 크로마토그래피에 의해 이러한 파지 라이브러리가 패닝된다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론이 항원에 흡착되고, 따라서 라이브러리 내의 비결합 클론으로부터 분리된다. 이후에, 결합 클론이 항원으로부터 용리되고, 항원 흡착/용리의 추가적인 사이클에 의해 추가로 풍부화될 수 있다. 본 발명의 임의의 항-Bv8 항체는 관심 대상 파지 클론을 선택하는데 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후, 관심 대상 파지 클론으로부터의 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-Bv8 항체 클론을 구축함으로써 얻을 수 있다.
- [0349] 항체의 항원-결합 도메인은 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)로부터 각각 하나씩의, 아미노산 약 110개의 2개의 가변 (V) 영역으로부터 형성되고, 둘 모두 3개의 초가변 루프 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 나타낸다. 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유적으로 연결된 단일-쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 VH 및 VL이 불변 도메인에 각각 융합되어 비공유적으로 상호작용하는 Fab 단편으로서, 가변 도메인이 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에 사용된 scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 총괄적으로 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로 지칭된다.
- [0350] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리가 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 별도로 클로닝되어 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있고, 그 후 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자가 항원 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하도록 나이브(naive) 레퍼토리를 클로닝할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배

열리지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다.

[0351] 필라멘트형 파지가 마이너(minor) 코트 단백질 pIII에 대한 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일한 폴리펩티드 쇠 상에서 VH 및 VL 도메인이 연결된 단일-쇄 Fv 단편으로서, 또는 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의 쇠는 pIII에 융합되고 다른 하나는 박테리아 숙주 세포 주변세포질로 분비되어, 여기서 일부 야생형 코트 단백질을 대체함으로써 Fab-코트 단백질 구조의 어셈블리가 파지 표면 상에 디스플레이되게 되는 Fab 단편으로서 디스플레이될 수 있다.

[0352] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수거된 면역 세포로부터 수득한다. 항-Bv8 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 요망되는 경우, 개체를 항체 반응을 생성하도록 Bv8로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 구축을 위해 회수한다. 바람직한 실시양태에서, 항-Bv8 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 Bv8 면역화가 Bv8에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 갖는 (또한 기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-Bv8 항체 반응을 생성함으로써 얻어진다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 하기에서 기재된다.

[0353] 항-Bv8 반응성 세포 집단에 대한 추가의 풍부화물은, 예를 들어 Bv8 친화성 크로마토그래피 또는 형광색소-표지된 Bv8에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해, Bv8-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 분리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 얻을 수 있다.

[0354] 대안적으로, 비면역화 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL을 사용함으로써, 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 Bv8이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축을 포함하는 라이브러리의 경우에는, 개체로부터 줄기 세포를 수확하여 재배열되지 않은 항체 유전자 절편을 코딩하는 핵산을 제공한다. 관심 대상 면역 세포는 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼목, 이리, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 조류 종 등으로부터 수득될 수 있다.

[0355] 항체 가변 유전자 절편 (VH 및 VL 절편 포함)을 코딩하는 핵산을 관심 대상 세포로부터 회수하여, 증폭시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 원하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후에 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역방향 프라이머 및 J-절편을 기초로 하는 정방향 프라이머를 사용하여, V 유전자를 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있다. 그러나, cDNA로부터의 증폭을 위해, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더(leader) 엑손을 기초로 할 수 있고, 정방향 프라이머가 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역을 기초로 할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 축퇴성을 혼입시킬 수 있다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 기재된 바와 같이, 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이, 면역 세포 핵산 샘플에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 라이브러리 다양성을 최대화한다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 회귀 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.

[0356] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리가 시험관내에서 V 유전자 절편으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되어 있으며 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이러한 클로닝된 절편들 (H1 및 H2 루프의 모든 주요 형태 포함)은 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol.

Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 모든 서열 다양성이 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 VH 레퍼토리가 또한 제조될 수 있다. 인간 V_K 및 V_L 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 광범위한 VH 및 VL 폴드, 및 L3 및 H3 길이를 기초로 하는 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭에 이어서, 배선 V-유전자 절편이 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.

[0357] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 함께 다양한 방식으로 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 다양한 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나, 또는 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 이. 콜라이(E. coli) 형질전환 효율로 인한 라이브러리 크기의 한계를 극복하기 위해 Fab 절편의 2쇄 속성을 이용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리를 하나는 파지미드 내로, 다른 하나는 파지 벡터 내로 개별적으로 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하도록 하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 개수로만 한정된다 (약 10^{12} 개 클론). 두 벡터는 VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘에서 재조합되어 파지 비리온 내에 공동패키징 되도록 하는 생체내 재조합 신호를 함유한다. 이러한 거대 라이브러리는 양호한 친화도 (약 10^{-8} M의 K_d^{-1})를 갖는 다양한 항체를 대량으로 제공한다.

[0358] 대안적으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일 벡터 내로 순차적으로 클로닝할 수 있거나, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 어셈블리한 후에 클로닝할 수 있다. VH 및 VL DNA를 가요성 펩티드 스페이서를 코딩하는 DNA로 연결시켜 단일-쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성시키는데 PCR 어셈블리가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 기술에서는, 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 "세포내 PCR 어셈블리"를 이용하여 VH 및 VL 유전자를 램프구 내에서 PCR로 조합시킨 후에 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝한다.

[0359] 나이브 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생산된 항체는 중등도의 친화도 (약 10^6 내지 10^7 M⁻¹의 K_d^{-1})일 수 있으나, 또한 상기 문헌 [Winter et al. (1994)]에 기재된 바와 같이 시험관내에서 2차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의해 친화도 성숙을 모방할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법으로 오류-빈발 폴리머라제 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에서 보고됨)를 사용하여 시험관내에서 돌연변이를 무작위로 도입시킬 수 있다. 추가로, 예를 들어 관심 대상 CDR에 스페닝된 무작위 서열을 보유하는 프라이머로의 PCR을 이용하여, 선택된 개별적인 Fv 클론에서 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이시키고, 친화도가 더 높은 클론을 스크리닝함으로써 친화도 성숙이 수행될 수 있다. WO 96/07754 (1996년 3월 14일 공개)에 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하여 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 또 다른 효과적인 접근법은 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 자연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 갖는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 수 회 라운드의 선택 재선택으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 10^{-9} M 범위인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.

[0360] Bv8 서열 및 아미노산 서열은 당업계에, 예를 들어 문헌 [Wechselberger et al. (FEBS Lett. 462:177-181 (1999))] 및 [Li et al. (Mol. Pharm. 59:692-698 (2001))]에 공지되어 있다. Bv8을 코딩하는 핵산은 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해서 제조될 수 있다. 이들 방법은 문헌 [Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989)]에 기재된 방법들 중 임의의 것, 예컨대 트리에스테르, 포스포이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스포네이트 방법에 의한 화학적 합성이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, Bv8 코딩 DNA를 설계하는데 발현 숙주 세포가 선호하는 코돈이 사용된다. 대안적으로, Bv8을

코딩하는 DNA는 게놈 또는 cDNA 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

- [0361] Bv8을 코딩하는 DNA 분자의 구축 후, DNA 분자는 발현 벡터, 예를 들어, 플라스미드 중의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되는데, 여기서, 제어 서열은 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식된다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 복제 및 제어 서열을 함유한다. 통상적으로 벡터는 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 단백질을 코딩하는 서열을 보유한다. 원핵 및 진핵 숙주 세포에서의 발현을 위한 적절한 벡터는 당업계에 공지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다. 진핵생물, 예컨대 효모, 또는 다세포 생물, 예컨대 포유동물로부터 유래된 세포가 사용될 수 있다.
- [0362] 임의로, Bv8을 코딩하는 DNA가 분비 리더 서열에 작동가능하게 연결되어, 숙주 세포에 의한 발현 생성물이 배양 배지 내로 분비된다. 분비 리더 서열의 예로는 stII, 에코틴, lamB, 헤르페스 GD, lpp, 알칼리성 포스파타제, 인버타제, 및 알파 인자가 포함된다. 또한, 단백질 A의 아미노산 36개의 리더 서열이 본원에 사용하기에 또한 적합하다 (문헌 [Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)]).
- [0363] 숙주 세포가 상기 기재된 본 발명의 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염, 바람직하게는 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하도록 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.
- [0364] 형질감염은 임의의 코딩 서열이 실제로 발현되는지 여부와 상관 없이 숙주 세포 내로 발현 벡터가 들어가는 것을 지칭한다. 수많은 형질감염 방법, 예를 들어, $CaPO_4$ 침전 및 전기천공이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 벡터의 작동의 임의의 지시가 숙주 세포 내에서 일어나는 경우 성공적인 형질감염이 일반적으로 인지된다. 형질감염 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.
- [0365] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 생물 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 형질전환 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 일부가 본원에서 추가로 기재된다.
- [0366] Bv8을 생산하는데 사용된 원핵 숙주 세포는 상기 문헌 [Sambrook et al.]에 일반적으로 기재된 바와 같이 배양될 수 있다.
- [0367] 당업계에 널리 공지되어 있고 일부가 본원에 추가로 기재되어 있는 다양한 배지 중에서 Bv8을 제조하는데 사용되는 포유동물 숙주 세포를 배양할 수 있다.
- [0368] 본 개시내용에서 언급된 숙주 세포는 시험관내 배양물 내의 세포, 뿐만 아니라 숙주 동물 내에 있는 세포를 포함한다.
- [0369] Bv8의 정제는 당업계에 인지된 방법을 사용하여 달성될 수 있고, 그의 일부는 본원에서 기재된다.
- [0370] 정제된 Bv8은 파지 디스플레이 클론의 친화성 크로마토그래피 분리에서 사용하기 위해 아가로스 비드, 아크릴아미드 비드, 유리 비드, 셀룰로스, 다양한 아크릴계 공중합체, 히드록실 메타크릴레이트 젤, 폴리아크릴계 및 폴리메타크릴계 공중합체, 나일론, 중성 및 이온성 담체 등과 같은 적합한 매트릭스에 부착될 수 있다. Bv8 단백질을 매트릭스에 부착시키는 것은 문헌 [Methods in Enzymology, vol. 44 (1976)]에 기재된 방법에 의해 달성될 수 있다. 단백질 리간드를 폴리카라이드 매트릭스, 예를 들어 아가로스, 텍스트란 또는 셀룰로스에 부착시키기 위해 통상적으로 사용되는 기술은 담체를 할로겐화 시아노겐으로 활성화시키고 이어서 펩티드 리간드의 1차 지방족 또는 방향족 아민을 활성화된 매트릭스에 커플링시키는 것을 포함한다.
- [0371] 대안적으로, Bv8은 흡착 플레이트의 웰을 코팅하는데 사용될 수 있거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에서 발현될 수 있거나 세포 분류에서 사용될 수 있거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합될 수 있거나, 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에서 사용될 수 있다.
- [0372] 파지 입자의 적어도 일부와 흡착제의 결합에 적합한 조건 하에 파지 라이브러리 샘플을 고정된 Bv8과 접촉시킨다. 일반적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체 상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차로 Bv8 항원 경쟁에 의해 용리시킨다. 단일 라운드의 선택으로 파지

가 20 내지 1,000배 풍부화될 수 있다. 또한, 풍부화된 파지가 박테리아 배양에서 성장되어, 추가적인 선택 라운드에 적용될 수 있다.

[0373] 선택 효율은 세척 동안의 해리 동역학, 및 단일 파지 상의 다중 항체 단편들이 동시에 항원과 맞물릴 수 있는지 여부를 비롯한 다수의 인자에 따라 달라진다. 신속한 해리 동역학 (및 약한 결합 친화도)의 항체는 단시간 세척, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 내의 항원의 높은 코팅 밀도를 사용함으로써 유지될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합을 장려한다. 느린 해리 동역학 (및 양호한 결합 친화도)의 항체의 선택은 문헌 [Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990)] 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같은 1가 파지 디스플레이 및 장시간 세척, 및 문헌 [Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같은 항원의 낮은 코팅 밀도를 사용함으로써 증진될 수 있다.

[0374] Bv8에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체 사이에서의 선택이 가능하다. 그러나, 선택된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 상기 기재된 친화도 성숙 기술들 중 일부에서 수행되는 바와 같은 돌연변이)는 다수의 돌연변이체를 일으키기 쉽고, 이때 대부분은 항원에 결합하고 몇몇은 친화도가 더 높다. Bv8을 제한하여, 드문 고친화도 파지를 경쟁시켜 선택할 수 있다. 보다 높은 친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지를 과량의 비오틴화 Bv8과 함께 인큐베이할 수 있으나, 비오틴화 Bv8은 Bv8에 대한 표적 물 친화도 상수보다 더 낮은 몰농도의 농도로 사용된다. 이후에, 고친화도-결합 파지가 스트렙타비딘이 코팅된 상자성 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그의 결합 친화도에 따라 선택될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 파지로부터 2배 정도 더 높은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체 상에 결합된 파지를 세척하는데 사용된 조건이 해리 동역학을 기초로 식별하도록 또한 조작될 수 있다.

[0375] Bv8 클론은 선택된 활성일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 Bv8 및 그의 리간드 (예를 들어, Bv8 수용체 PKR1 및 PKR2) 사이의 결합을 차단하는 Bv8 항체를 제공한다. 이러한 Bv8 항체에 대응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브러리로부터 Bv8 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비-차단 활성이 요망되는 Bv8 및 제2 단백질 선택하고; (3) 항-Bv8 파지 클론을 고정된 Bv8에 흡착시키고; (4) 과잉의 제2 단백질을 사용하여, 제2 단백질의 결합 결정자와 중복되는 또는 그와 공통되는 Bv8-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용리시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용리시킴으로써 선택할 수 있다. 임의로, 본원에 기재된 선택 절차를 1회 이상 반복함으로써 원하는 차단/비차단 특성을 갖는 클론을 추가로 풍부화시킬 수 있다.

[0376] 본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 관심 대상 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열분석된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣고, 그 후 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 원하는 모노클로날 항체의 합성물을 수득할 수 있다. 박테리아에서의 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 검토 문헌은 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993)] 및 [Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151 (1992)]을 포함한다.

[0377] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 상기 문헌 [Kabat et al.]으로부터 얻을 수 있음)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 또 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론이 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모든 인간 전장 또는 부분적 길이의 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)이 형성된다.

[0378] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-Bv8 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 류틴 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 비이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유적

으로 연결시킴으로써 하이브리도마 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

[0379] 항체 단편

[0380] 본 발명은 항체 단편을 포함한다. 항체 단편은 통상의 수단, 예컨대 효소 소화에 의해, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서는, 온전한 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 제거가 신속하고, 고형 중양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해서는 문헌 [Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134]을 참조한다.

[0381] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 쉽게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458를 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 용합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 융합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck]을 참조한다. 예를 들어, 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0382] 인간화 항체

[0383] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비-인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "도입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "도입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 추가변 영역 서열로 치환하여 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327]; [Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536])에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 추가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0384] 인간화 항체의 제조에 사용될 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성을 감소시키는데 중요할 수 있다. 소위 "최적 맞춤(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이후, 설치류의 것과 가장 근접한 인간 서열을 인간화 항체를 위한 인간 프레임워크로서 수용한다. 예를 들어, 문헌 [Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296]; [Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901]을 참조한다. 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러가지 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623]을 참조한다.

[0385] 추가로, 항원에 대한 높은 친화도 및 기타 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 항체를 인간화하는 것이 일반적으로 바람직하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를

조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 추가된 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0386] 인간 항체

[0387] 본 발명의 인간 항체는 인간-유래된 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 언급된 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 함함으로써 구축할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가, 예를 들어 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)]에 기재되어 있다.

[0388] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이같은 배선 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접종 시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)]을 참조한다.

[0389] 유전자 서플링은 또한 비-인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있고, 이때 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅(imprinting)"이라고도 지칭되는 이러한 방법에 따라, 본원에 기재된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비-인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라 집단을 생성시킨다. 항원에 의한 선택 결과로서, 인간 쇄에 의해 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비-인간 쇄의 제거시에 파괴된 항원 결합 부위가 복원된 비-인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되며, 즉 에피토프가 인간 쇄 파트너의 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비-인간 쇄를 대체하기 위해 상기 과정을 반복하는 경우에 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일자로 공개된 PCT WO 93/06213 참조). HVR 그래프팅에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이러한 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 HVR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0390] 다중특이적 항체

[0391] 본 발명의 다중특이적 항체의 한 예는 Bv8 및 또 다른 항원에 결합하는 항체를 포함한다. 다른 실시양태에서, 다중특이적 항체는 Bv8의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다중특이적 항체는 또한 Bv8을 발현하는 세포에 세포독성제를 위치시키는데 사용될 수 있다. 이러한 항체는 Bv8-결합 아암, 및 세포독성제, 예컨대 사포린, 항-인터페론- α , 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토타렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐에 결합하는 아암을 보유한다. 다중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0392] 다중특이적 항체의 다양한 제조 방법이 당업계에 설명되어 있다. 제1 접근법 중 하나는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 포함하고, 이때 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마(quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 상기 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생성 수율이 낮다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일자로 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991)]에 개시되어 있다.

[0393] 다른 접근법에 따라, 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 예를 들어 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 특정 실시양태에서, 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재한다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우에는 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기

체 내로 공동형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇠의 동일하지 않은 비율이 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇠의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우, 또는 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0394] 이러한 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암 내에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른쪽 아암 내의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇠 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 세부사항에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0395] 또 다른 접근법에 따르면, "놉-인투-홀(knob-into-hole)" 또는 "KnH" 기술은 돌출부 (놉)를 하나의 폴리펩티드 내로, 그리고 공동(cavity) (홀)을 다른 폴리펩티드 내로 이들이 상호작용하는 계면에서 도입함으로써 시험관 내에서 또는 생체 내에서 함께 2개의 폴리펩티드의 페어링을 유도하는 기술을 지칭한다. 예를 들어, KnH는 항체의 Fc:Fc 결합 계면, CL:CH1 계면 또는 VH/VL 계면에서 도입되었다 (예를 들어, US20007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 및 문헌 [Zhu et al. (1997) Protein Science 6:781-788]). 이것은 특히 다중특이적 항체의 제조 동안 함께 2개의 상이한 중쇄의 페어링을 유도할 때 유용하다. 예를 들어, 그의 Fc 영역에 KnH를 갖는 다중특이적 항체는 각각의 Fc 영역에 연결된 단일 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있거나, 또는 유사하거나 상이한 경쇄 가변 도메인과 페어링하는 상이한 중쇄 가변 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에 따르면, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 계면에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

[0396] 다중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체들은, 예를 들어 원치않는 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089)를 위해서 제안되었다. 이중접합 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제 및 가교 기술이 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980).

[0397] 항체 단편으로부터 다중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등물량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0398] Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 회수될 수 있고, 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링 반응을 실시하였다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상적인 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0399] 제조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된

후, 다시 산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0400] 2 원자가 초과인 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0401] 다가 항체

[0402] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것) (예를 들어, 4가 항체)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 특정 실시양태에서, 다가 항체는 3개 내지 약 8개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 한 실시양태에서, 다가 항체는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드쇄 (예를 들어, 2개의 폴리펩티드쇄)를 포함하고, 여기서의 상기 폴리펩티드쇄(들)는 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드쇄(들)는 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드쇄이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드쇄(들)는 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역쇄를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 적어도 2개 (예를 들어, 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 추가로 포함한다.

[0403] 단일-도메인 항체

[0404] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항-Bv8 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드쇄이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 왈탐; 예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0405] 항체 변이체

[0406] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Bv8 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 목적하는 특징을 갖는 최종 구축물이 생성되도록 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0407] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는데 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체되어 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정련된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작

위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 이뮤노글로불린을 목적하는 활성에 대해 스크리닝한다.

- [0408] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 하나의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합, 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 상기 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.
- [0409] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체가 글리코실화되는 정도를 증가시키거나 감소시키도록 변경된다. 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 어느 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.
- [0410] 항체에 대한 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 상기한 트리펩티드 서열이 생성되거나 제거되도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 또한 본래의 항체 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가, 결실 또는 치환을 통해 수행될 수도 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).
- [0411] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 전형적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에 대한 N-연결에 의해 일반적으로 부착되는 분지된 2분지의 올리고사카라이드를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32]을 참조한다. 상기 올리고사카라이드는 각종 탄수화물, 예를 들어 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스 및 시알산, 뿐만 아니라 2분지형 올리고사카라이드 구조의 "줄기" 내의 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체 내의 올리고사카라이드의 변형은 특정의 개선된 특성을 지닌 항체 변이체를 제조하기 위해 이루어질 수 있다.
- [0412] 예를 들어, Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 결여된 탄수화물 구조를 지닌 항체 변이체가 제공된다. 이러한 변이체는 개선된 ADCC 기능을 지닐 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))를 참조한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 대한 간행물의 예에는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]이 포함된다. 탈푸코실화 항체를 생산할 수 있는 세포주의 예에는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, (Presta, L.); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al., 특허 실시예 11), 및 녹아웃 세포주, 예컨대 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 녹아웃 CHO 세포 (예를 들어, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]; [Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)가 포함된다.
- [0413] 이등분된 올리고사카라이드를 갖는 항체 변이체가 추가로 제공되는데, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 부착된 이분지의 올리고사카라이드가 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이같은 항체 변이체는 푸코실화가 감소될 수 있고/거나 ADCC 기능이 개선될 수 있다. 이같은 항체 변이체의 예가, 예를 들어 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.); 및 US 2005/0123546 (Umana et al.)에 기재되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이러한 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)에 기재되어 있다.
- [0414] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC를 추가로 개선시켜 주는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 치환은 상기 기재된 모든 변이와 조합해서 일어날 수 있다.

- [0415] 특정 실시양태에서, 본 발명은, 모든 이펙터 기능은 아니지만 몇몇 이펙터 기능을 보유하며, 생체 내에서의 항체의 반감기가 중요하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 항체 변이체를 고려한다. 특정 실시양태에서, 항체의 Fc 활성을 측정하여 원하는 특성만이 유지되는 것을 확인한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합은 없지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 없을 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈모세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 비제한적 예는 미국 특허 번호 5,500,362 (예를 들어 문헌 [Hellstrom, I., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌 [Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)]; 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법을 이용할 수 있다 (예를 들어, 유동 세포측정법을 위한 악티(ACTI)TM 비-방사성 세포독성 검정 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.), 캘리포니아주 마운틴 뷰); 및 사이토독스(CytoTox) 96[®] 비-방사성 세포독성 검정 (프로메가(Promega), 위스콘신주 매디슨) 참조). 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하여 CDC 활성이 결여되어 있는지를 확인하기 위해 또한 C1q 결합 검정을 수행할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해 CDC 검정을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]; [Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003)]; 및 [Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)] 참조). FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 결정 역시 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)] 참조).
- [0416] 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 기타 항체 변이체가 제공된다. 치환적 돌연변이유발을 위한 관심 부위는 초가변 영역을 포함하지만 FR 변경도 고려된다. 보존적 치환을 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 1에 나타낸다. "예시적인 치환"으로 표시된 보다 실질적인 변화를 하기 표 1에 제공하거나, 또는 아미노산 클래스와 관련하여 이하에서 추가로 기재한다. 아미노산 치환을 관심 항체 내로 도입하고, 생성물을 예를 들어 원하는 활성, 예컨대 개선된 항원 결합, 감소된 면역원성, 개선된 ADCC 또는 CDC 등에 대해 스크리닝할 수 있다.

표 1

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0417]

[0418] 항체의 생물학적 특성에 있어서의 변형은, (a) 치환 영역에서 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서 폴리펩티드 주쇄의 구조에 영향을 미치거나, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성에 영향을 미치거나, 또는 (c) 측쇄의 크기에 영향을 미치는 치환을 선택함으로써 수행될 수 있다. 아미노산은 그의 측쇄 특성의 유사성에 따라 하기 군으로 나눌 수 있다 (문헌 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

[0419] (1) 비극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0420] (2) 비하전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0421] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0422] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His(H)

[0423] 대안적으로, 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 하기 군으로 나눌 수 있다:

[0424] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0425] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0426] (3) 산성: Asp, Glu;

[0427] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0428] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0429] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0430] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기는 또한 보존적 치환 부위 내로 또는 나머지 (비보존된) 부위 내로 도입될 수 있다.

[0431] 치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기

를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 개발을 위해 선택된 생성 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 변형된 (예를 들어 개선된) 생물학적 특성을 가질 것이다. 예시적 치환 변이체는 친화도 성숙 항체이고, 이는 파지 디스플레이에 기초한 친화도 성숙 기술을 사용하여 편리하게 생성시킬 수 있다. 간략하게 설명하면, 여러 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7 개 부위)를 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환이 생성되도록 돌연변이시킨다. 이로써 생성된 항체를 필라멘트형 파지 입자로부터 각 입자 내에 패키징된 파지 코트 단백질 (예를 들어, M13의 유전자 III 생성물)의 적어도 일부에 대한 융합체로서 디스플레이시킨다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형시킬 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해서, 스캐닝 돌연변이유발 (예를 들어, 알라닌 스캐닝)을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체 및 항원 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 이웃 잔기가 당업계에 공지된 기술, 예를 들어 본원에서 상술된 기술에 따라 치환시킬 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 대상으로, 본원에 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술을 사용함으로써 스크리닝하고, 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 지닌 변이체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0432] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0433] 본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인의 위치를 비롯한 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 변형 (예를 들어 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0434] 본원의 설명 및 당업계의 교시에 따르면, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 대응 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변형을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고 이러한 항체는 그의 야생형 대응물과 비교하여 치료학적 유용성에 요구되는 실질적으로 동일한 특성을 유지할 것이다. 예를 들어, W099/51642에 기재된 바와 같이, 변경된 (즉, 개선된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포 독성 (CDC)을 초래할 특정 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 것으로 생각된다. Fc 영역 변이체의 기타 예에 관해서는 또한 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 W094/29351을 참조한다. W000/42072 (Presta) 및 WO 2004/056312 (Lowman)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 또한 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)]을 참조한다. 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 결합이 개선되고 반감기가 증가된 항체가 US2005/0014934A1 (Hinton et al.)에 기재되어 있다. 이들 항체는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 갖는 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역 아미노산 서열이 변경되고 C1q 결합 능력이 증가 또는 감소된 폴리펩티드 변이체가 미국 특허 번호 6,194,551B1, W099/51642에 기재되어 있다. 또한, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 참조한다.

[0435] 또 다른 측면에서, 본 발명은 Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 계면 내에서의 변형을 포함하는 항체를 제공한다. 이러한 변형은 이중이량체화를 용이하게 하고/하거나 촉진시킨다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내로의 돌출부 도입 및 제2 Fc 폴리펩티드 내로의 공동의 도입을 포함하고, 여기서 상기 돌출부는 상기 공동 내에 위치하여 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체화를 촉진시킬 수 있다. 이러한 변형을 갖는 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재되어 있다.

[0436] 또 다른 측면에서, 항체의 하나 이상의 잔기를 시스테인 잔기로 치환시킨 시스테인 조작된 항체, 예를 들어 "티오Mab"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이와 같이 치환된 잔기는 항체의 접근 가능한 부위에서 일어난다. 이들 잔기를 시스테인으로 치환함으로써 반응성 티올기가 항체의 접근 가능한 부위에 배치되게 되고, 이것을 이용하여 항체를 본원에 추가로 기재한 바와 같이 다른 모이어티, 예컨대 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 하나 이상의 하기 잔기가 시스테인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링).

- [0437] 항체 유도체
- [0438] 본 발명의 항-Bv8 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수가 가능한 추가적인 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시 메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드가 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과 중합체가 부착될 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.
- [0439] 또 다른 실시양태에서, 항체, 및 방사선 노출에 의해 선택적으로 가열될 수 있는 비단백질성 모이어티의 접합체가 제공된다. 한 실시양태에서, 비단백질성 모이어티는 탄소 나노튜브이다 (문헌 [Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)]). 방사선은 임의의 파장일 수 있고, 통상적인 세포에는 해를 끼치지 않지만 항체-비단백질성 모이어티에 근접한 세포는 사멸시키는 온도로 비단백질성 모이어티를 가열하는 파장을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0440] 활성 검정
- [0441] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 성질 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다.
- [0442] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-Bv8 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은, 예를 들어 Bv8 결합을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 하나 이상의 Bv8-관련 효과 측면의 조절, Bv8-매개 내피 세포 증식, 종양 전이를 포함한다.
- [0443] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 제조된 이뮤노글로불린은 그의 생물학적 활성에 대하여 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이뮤노글로불린은 그의 항원 결합 활성에 대하여 시험된다. 당업계에 공지되고 본원에서 사용될 수 있는 항원 결합 검정은 비제한적으로 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 이용한 임의의 직접적 또는 경쟁 결합 검정을 포함한다. 예시적인 항원 결합 검정은 하기 실시예 섹션에서 제공된다.
- [0444] 정제된 항체를 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광측정법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 일련의 검정에 의해 추가로 특성화할 수 있다.
- [0445] 일부 실시양태에서, 본 발명은, 모든 이펙터 기능은 아니지만, 몇몇 이펙터 기능을 보유하며, 생체 내에서의 항체의 반감기가 중요하지만 특정의 이펙터 기능 (예컨대 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 해로운 많은 적용 분야에 대한 바람직한 후보가 되는 변경된 항체를 고려한다. 특정 실시양태에서, 항체의 Fc 활성을 측정하여 원하는 특성만이 유지되는 것을 확인한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 Fc γ R 결합은 없지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 없을 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII을 발현한다. 조혈모세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 예가 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하여 CDC 활성이 결여되어 있는지를 확인하기 위해 또한 C1q 결합 검정을 수행할 수도 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌

[Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 또한, FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 측정을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0446] 일부 실시양태에서, 본 발명은 증가된 이펙터 기능 및/또는 증가된 반감기를 갖는 변경된 항체를 제공한다. 예를 들어, 미국 출원 번호 12/577,967을 참조한다.

[0447] 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0448] 본 발명의 항체의 재조합 생성을 위해서는, 이를 코딩하는 핵산을 분리시키고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 이용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 쉽게 분리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따라 달라진다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포 (일반적으로, 포유동물) 기원 중 하나이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 획득될 수 있음을 인지할 것이다.

[0449] a. 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0450] i. 벡터 구축

[0451] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 분리되어 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이중 폴리뉴클레오타이드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 달라질 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 함유한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0452] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주에 대하여 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹(marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유할 수 있거나, 또는 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.

[0453] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λGEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0454] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 시스트론의 발현을 조정하는, 시스트론의 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵세포 프로모터는 전형적으로 두 클래스의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건에서의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도 변화에 반응하여 그의 제어 하에 있는 시스트론의 전사 수준 증가를 개시시키는 프로모터이다.

[0455] 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 분리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이중 프로모터를 둘 다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사

및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

- [0456] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 그의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 이에 따라 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하도록 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션할 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269]).
- [0457] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이어야 한다. 이중 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해서, 신호 서열이, 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열로 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 둘 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.
- [0458] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB- 균주)는 디설피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다. 문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)].
- [0459] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 고세균 및 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스(Bacilli) (예를 들어, 비. 섭틸리스(B. subtilis)), 엔테로박테리아, 슈도모나스(Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(P. aeruginosa)), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 시겔라(Shigella), 리조비아(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 또는 파라코쿠스(Paracoccus)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (미국 특허 번호 5,639,635)을 갖는 균주 33D3을 비롯한, 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체가 포함된다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 특정 유전자형을 갖는 상기 언급된 박테리아의 임의의 유도체를 구축하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.
- [0460] ii. 항체 생산
- [0461] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.
- [0462] 형질전환은 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 구성요소에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.
- [0463] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵세포를 당업계에 공지되어 있는, 선택된 숙주 세포의 배양

에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰(Luria broth; LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

[0464] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타민, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트릴 및 디티오테라이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0465] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장을 위해, 바람직한 온도 범위는 예를 들어 약 20℃ 내지 약 39℃, 보다 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃, 보다 더 바람직하게는 약 30℃이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.

[0466] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.

[0467] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 파편 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[0468] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식(fed-batch) 발효 절차가 재조합 단백질의 생성에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 임펠러를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효기 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0469] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구축물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0470] 본 발명의 폴리펩티드의 생성 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤페론(chaperone) 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 지니고 있는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)를 과발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); 문헌 [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210].

[0471] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 박테리아 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그의 조합물을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 몇몇

이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어, 상기 문헌 [Joly et al. (1998)]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.); [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0472] 한 실시양태에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 사페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0473] iii. 항체 정제

[0474] 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex)[®] G-75를 이용한 겔 여과.

[0475] 한 측면에서, 고체상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고친화도로 결합하는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 유래의 41 kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼이다. 일부 용도에서, 오염물의 비특이적 부착을 방지하기 위하여 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅한다.

[0476] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양물로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정된 고체상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 관심 항체를 용리에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0477] b. 진핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0478] 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0479] (i) 신호 서열 성분

[0480] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 바람직하게 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0481] 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

[0482] (ii) 복제 기점

[0483] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0484] (iii) 선택 유전자 성분

[0485] 발현 및 클로닝 벡터는 선택가능한 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0486] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포들은 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 따라서 선택 계획에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0487] 포유동물 세포에 적합한 선택가능 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 취하는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0488] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유

하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC®

CRL-9096)이다.

[0489] 대안적으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택성 마커 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스페라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질감염되거나 공동-형질감염된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를, 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 선택성 마커에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택할 수 있다. 미국 특허 번호 4,965,199를 참조한다.

[0490] (iv) 프로모터 성분

[0491] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체 폴리펩티드 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵세포 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 다수의 유전자의 전사 시작부분으로부터 염기 70 내지 80개 상류에서 발견된 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (서열 206) (여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 대부분의 진핵생물 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 대한 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열 (서열 207)이 있다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

[0492] 포유동물 숙주 세포에서의 벡터로부터의 항체 폴리펩티드 전사는, 예를 들어, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 또는 열 충격 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어되고, 단 이같은 프로모터들은 숙주 세포 시스템과 상용성이다.

[0493] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0494] (v) 인핸서 요소 성분

[0495] 고등 진핵세포에 의한 본 발명의 항체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점의 후측 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 후측의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소에 대한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 항체 폴리펩티드-코딩 서열에 대해 5' 또는 3'인 위치에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5'인 부위에 위치한다.

[0496] (vi) 전사 종결 성분

[0497] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열 또한 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 이에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0498] (vii) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0499] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포에는 척추동물 숙주 세포를 비롯한 본원에 기재된 고등 진핵세포가 포함된다. 배양 (조직 배양)시의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC®

CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC®

CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC®

CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC®

CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC®

CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC®

CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC®

CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC®

CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC®

CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.

[0500] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0501] (viii) 숙주 세포의 배양

[0502] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 등록 30,985에 기재되어 있는 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신 (GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0503] (ix) 항체의 정제

[0504] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생성되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자형 파편인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 저해하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0505] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권고된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭

스는 가장 흔하게는 아가로스로이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 공극이 제어된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리 아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

[0506] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 대상으로, pH 약 2.5 내지 4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 저 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다.

[0507] 면역접합체

[0508] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환적으로 "항체-약물 접합체", 또는 "ADC"로 지칭됨)를 제공한다.

[0509] 면역접합체는 암의 치료에서 세포독성제, 즉 세포를 사멸시키거나 성장 또는 증식을 억제하는 약물의 국소 전달을 위해 사용되었다 (문헌 [Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549]; [Wu et al. (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146]; [Payne, G. (2003) i 3:207-212]; [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Deliv. Rev. 26:151-172]; 미국 특허 번호 4,975,278). 면역접합체는 종양으로의 약물 모이어티의 표적화된 전달 및 그 내부의 세포내 축적을 가능하게 하고, 이때 비접합된 약물의 전신 투여는 제거하고자 하는 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05]; [Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera et al., eds) pp. 475-506]). 이들 전략에 유용한 것으로서 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체가 둘 모두 보고되어 있다 (문헌 [Rowland et al. (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87]). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (상기 문헌 [Rowland et al. (1986)]). 항체-독소 접합체에 사용되는 독소는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소, 예컨대 리신, 소분자 독소, 예컨대 켈다나마이신 (문헌 [Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다. 독소는 튜블린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 비롯한 메카니즘에 의해 세포독성 효과를 발휘할 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성이 되거나 활성이 감소되는 경향이 있다.

[0510] 제발린(ZEVALIN)®

(이브리투모맵 티옥세탄, 비오겐(Biogen)/이덱(Idec))은 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지정된 류린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 111In 또는 90Y 방사성 동위원소로 구성된 항체-방사성 동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 칼리케아미신에 연결된 huCD33 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 밀로타르그(MYLOTARG)™ (겜투주맵 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스(Wyeth Pharmaceuticals))는 주사에 의한 급성 골수성 백혈병 치료용으로 2000년에 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 번호 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). 디설피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 huC242 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 칸투주맵 메르탄신 (이뮤노젠, 인

크.(Immunogen, Inc.))은 CanAg을 발현하는 암, 예컨대 결장암, 췌장암, 위암 및 기타 암의 치료를 위해 II상 시험 중이다. 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 MLN-2704 (밀레니엄 파.(Millennium Pharm.), BZL 바이올로지스(BZL Biologics), 이뮤노젠 인크.)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 아우리스타틴 펩티드인 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)이 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스(Lewis) Y에 특이적) 및 cAC10 (혈액 악성종양 상의 CD30에 특이적)에 접합되었고 (문헌 [Doronina et al. (2003) Nature Biotechnol. 21(7):778-784]), 치료용으로 개발 중이다.

[0511] 특정 실시양태에서, 면역접합체는 항체 및 화학치료제 또는 다른 독소를 포함한다. 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 본원에 (예를 들어, 상기에) 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토타카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오퍼시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 방사성접합된 항체의 생성을 위한 다양한 방사선택종이 이용가능하다. 이것의 예는 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 및 ^{186}Re 를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디아이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조한다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤젠-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사성뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO 94/11026을 참조한다.

[0512] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고려된다.

[0513] 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0514] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 항체 (전장 또는 단편)를 포함한다.

[0515] 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0516] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의한 제조에 비교적 이용하기 쉽고, (ii) 비-디설피드 링커를 통한 항체로의 접합에 적합한 관능기구의 유도체화에 대해 개량이 가능하고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 매력적인 약물 모이어티이다.

[0517] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 그의 제조 방법, 및 그의 치료 용도는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 또 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디설피드 링

커를 통해 접합된 면역접합체가 기재되어 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3×10^5 개의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관 내에서 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물과 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0518] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,208,020을 참조한다. 항체 분자 당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비-특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0519] 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하기 위한 많은 연결기가 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)], 및 2004년 10월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 것이 포함된다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 2004년 10월 8일자로 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디설피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디설피드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결기는 본원에 기재되고 예시되어 있다.

[0520] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미달-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미달-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미달 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 디설피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미달-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)]), 및 N-숙신이미달-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0521] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0522] 아우리스타틴 및 돌라스타틴

[0523] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 아우리스타틴 (미국 특허 번호 5635483; 5780588)에 접합된 항체를 포함한다. 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (US 5663149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 나타났다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0524] 예시적인 아우리스타틴 실시양태에는 2004년 11월 5일자로 출원된 미국 일련 번호 10/983,340의 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"에 개시되어 있는, N-말단 연결된 모노메틸 아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF가 포함된다.

[0525] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 널리 공지된 액상 합성 방법

(문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조할 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 US 5635483; US 5780588; 문헌 [Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al., Synthesis, 1996, 719-725]; 및 [Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863]의 방법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 문헌 [Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784]; 2004년 11월 5일자로 출원된 미국 일련 번호 10/983,340의 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands" (예를 들어, 링커 및 링커에 접합된 모노메틸발린 화합물, 예컨대 MMAE 및 MMAF의 제조 방법을 개시함)을 참조한다.

[0526] 칼리케아미신

[0527] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체의 제조에 대해서는, 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company))를 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ II, α 2I, α 3I, N-아세틸- γ II, PSAG 및 Θ I1을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포 독성 효과를 크게 증진시킨다.

[0528] 다른 세포독성제

[0529] 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제 패밀리를, 및 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 포함한다.

[0530] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

[0531] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0532] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 높은 방사성의 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 접합된 항체의 생산을 위해 이용가능하다. 그 예는 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb , 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 신티그래피 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, MRI로도 공지됨)용 스핀 표지, 예를 들어 여기서도 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0533] 방사성- 또는 다른 표지를 공지의 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있고, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. ^{99}Tc 또는 ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re 및 ^{111}In 과 같은 표지가 펩티드 내의 시스템인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도젠 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0534] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 2관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올

란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스-(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오티드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트 화제이다. WO 94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0535] 본 발명의 화합물은 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc., 미국 일리노이주 록포드)로부터) 시판되는 가교결합 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.

[0536] 항체 약물 접합체의 제조

[0537] 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체 당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 하기 화학식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 것; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유결합을 통해 D-L을 형성시킨 후, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것을 비롯하여, 당업자에게 공지되어 있는 유기 화학 반응, 조건, 및 시약을 이용하여 여러 경로로 제조할 수 있다. ADC를 제조하는 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0538] <화학식 I>

[0539] $Ab-(L-D)_p$

[0540] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리디니오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-아이오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")가 포함된다. 부가적인 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다. 또한, 2004년 11월 5일자로 출원된 미국 일련 번호 10/983,340의 "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"를 참조한다.

[0541] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 자연적으로 발생하는 것들 뿐만 아니라 소수의 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 중앙-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 이들의 선택도 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0542] 항체상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민기, (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실기 또는 아미노기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 쇠간 디술피드, 즉 시스테인 가교를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오프레이톨) 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 가교는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵성 기를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티올란 (트라우

트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그보다 많은 수의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편)에 도입될 수 있다.

- [0543] 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위한 항체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 펄아이오데이트 산화 시약으로 산화시켜서 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 슈프 염기 기는 안정적인 연결을 형성할 수도 있거나, 또는 예를 들어 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결을 형성할 수도 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-펄아이오데이트와 반응시키면, 약물상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨, 바이오컨쥬게이트 테크닉스(Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-펄아이오데이트와 반응시키면, 첫번째 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 그러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.
- [0544] 유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0545] 대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 목적하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.
- [0546] 또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있으며, 여기서 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소실제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.
- [0547] 본 발명의 조성물
- [0548] 또한, 본 발명은 항-Bv8 항체; 및 항-Bv8 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 (제약 조성물 포함)을 포함한다. 본원에 사용된 조성물은 Bv8에 결합하는 하나 이상의 항체, 및/또는 Bv8에 결합하는 하나 이상의 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 예컨대 완충제를 비롯한 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이것은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0549] 본 발명의 항-Bv8 항체를 포함하는 치료 제제는 저장을 위해, 목적하는 순도를 갖는 항체를 임의의 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)])와 수용액, 동결건조되거나 다른 건조된 제제의 형태로 혼합함으로써 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 기타 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈™, 플루로닉스(PLURONICS)™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.
- [0550] 본원에서의 제제는 또한 치료될 특정 적응증에 필요하다면 1가지를 초과하는 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에

유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

- [0551] 활성 성분은 또한, 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)]에 개시되어 있다.
- [0552] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0553] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 본 발명의 이뮤노글로불린을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 이뮤노글로불린이 오랜 시간 동안 신체 내에 유지되는 경우, 이들은 37℃에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 야기될 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술폰히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.
- [0554] 용도
- [0555] 본 발명의 항체는, 예를 들어 시험관내, 생체외 및 생체내 치료 방법에서 사용될 수 있다.
- [0556] 본 발명은 Bv8 발현 및/또는 활성, 예컨대 증가된 발현 및/또는 활성 또는 바람직하지 않은 발현 및/또는 활성과 관련된 질환 상태를 조정하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공하며, 상기 방법은 상기 질환 상태의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는 것을 포함한다.
- [0557] 한 측면에서, 본 발명은 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애의 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0558] 한 측면에서, 본 발명은 혈관신생 억제 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생의 억제 방법을 제공한다.
- [0559] 한 측면에서, 본 발명은 종양 전이 억제 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양 전이의 억제 방법을 제공한다.
- [0560] 한 측면에서, 본 발명은 내피 세포 증식 억제 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 내피 세포 증식의 억제 방법을 제공한다.
- [0561] 한 측면에서, 본 발명은 또 다른 항혈관신생제의 효능 개선 치료를 필요로 하는 개체에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여하는 것을 포함하는, 또 다른 항혈관신생제의 효능 개선 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체는 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다른 항혈관신생제는 VEGF, 예를 들어 항-VEGF 항체를 표적으로 한다.
- [0562] 모노클로날 및/또는 폴리클로날 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 친화도-성숙 항체, 인간화 항체 및/또는 항체 단편을 비롯한 임의의 적합한 항-Bv8 항체가 치료 방법에 사용될 수 있음을 이해한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체가 치료에 사용된다.
- [0563] 본원의 임의의 방법 중, 한 방법은 대상체 또는 환자에게 본원의 항-Bv8 항체와 함께 유효량의 제2 의약을 투여할 수 있고 (이때 본원의 항-Bv8 항체는 제1 의약임), 상기 제2 의약은 치료를 필요로 하는 대상체에서 상태를 치료할 수 있는 또 다른 활성제이다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또 다른 항체, 화학요법제(들) (화학요법제 카테일 포함), 항혈관신생제(들), 면역억제제(들), 시토키인(들), 시토키인 길항제(들), 및/또는 성장 억제제(들)과 함께 공동-투여될 수 있다. 이같은 제2 의약의 유형은 장애의 유형, 질환의 중증도, 환자의

상태 및 연령, 사용하는 제1 의약의 유형 및 용량 등을 비롯한 다양한 인자에 의해 따라 달라진다.

[0564] 예를 들어 본 발명의 항체가 종양 성장을 억제하는 경우, 이를 역시 종양 성장을 억제하는 하나 이상의 다른 치료제와 조합하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 치료 계획에 있어서, 예컨대 결장직장암, 폐암, 간세포 암종, 유방암 및/또는 췌장암을 비롯한 본원에 기재된 임의의 질환을 치료하는데 있어서, 항혈관신생제, 예컨대 항-VEGF 항체 (예를 들어, 아바스틴®

) 및/또는 항-ErbB 항체 (예를 들어, 헤르셉틴®

트라스투주맵 항-HER2 항체 또는 EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바®

)) 또는 HER2의 도메인 II에 결합하는 항-HER2 항체, 예컨대 옴니타르그(OMNITARG)™ 페르투주맵 항-HER2 항체)와 조합될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 환자는 조합된 방사선 요법 (예를 들어, 외부 빔 조사 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체에 의한 요법)을 받을 수도 있다. 상기 언급된 이러한 조합 요법에는 조합 투여 (이 경우에는 2종 이상의 작용제가 동일 또는 별도 제제에 포함됨) 및 개별 투여가 포함되고, 이 경우 본 발명 항체는 보조 요법 또는 요법들의 투여 전 및/또는 후에 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체를 또 다른 생물학적 분자, 예를 들어 또 다른 항체와 같은 비교적 비-세포독성인 작용제와 조합하는 것은 항체를 세포에 매우 독성인 기타 작용제인 화학요법제와 조합하는 것에 비해 세포독성을 감소시킬 것으로 기대된다.

[0565] 본원의 항체와 하나 이상의 제2 의약의 조합물에 의한 치료는 바람직하게는 암의 징후나 증상을 개선시킨다. 예를 들어, 이같은 요법은 제2 의약 단독 (예를 들어, 화학요법제 단독)으로 치료받은 환자에 비해 생존기간 (전체 생존기간 및/또는 무진행 생존기간)을 개선시킬 수 있고/거나, 목적 반응 (부분적 또는 완전한 반응)을 유발할 수 있다. 또한, 본원의 항체 및 하나 이상의 제2 의약(들)의 조합물에 의한 치료는 바람직하게는 환자에 대해 추가적이고, 보다 바람직하게는 상승작용적 (또는 추가적인 것 보다 훨씬 더 큰) 치료 이점을 야기한다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 제2 의약 투여와 적어도 1회의 본원의 항체 투여 사이의 기간은 약 1개월 이하이다. 특정 실시양태에서, 적어도 1회의 제2 약물 투여와 적어도 1회의 본원의 항체 투여 사이의 기간은 약 2주 이하이다. 특정 실시양태에서, 본원의 항체 및 제2 의약은 공동으로 투여된다.

[0566] 암의 치료를 위해, 제2 의약은 바람직하게는 또 다른 항체, 화학요법제 (화학요법제 각테일 포함), 항혈관신생제, 면역억제제, 전구약물, 시토키인, 시토키인 길항제, 세포독성 방사선요법제, 코르티코스테로이드, 항구토제, 암 백신, 진통제, 항-혈관 작용제 및/또는 성장 억제제이다. 세포독성제에는 DNA와 상호작용하는 작용제, 항대사물, 토포이소머라제 I 또는 II 억제제 또는 스피들 억제제 또는 안정화 작용제 (예를 들어, 바람직하게는 빈카 알칼로이드, 보다 바람직하게는 빈블라스틴, 테옥시빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 비네프딘, 빈포실틴, 빈줄리딘 및 빈푸닌으로부터 선택됨), 또는 화학요법에 사용되는 임의의 작용제, 예컨대 5-FU, 탁산, 독소루비신 또는 텍사메타손이 포함된다.

[0567] 일부 실시양태에서, 제2 의약은 암을 치료하는데 사용되는 또 다른 항체, 예컨대 HER2/neu 수용체의 세포의 도메인에 대해 지정된 항체, 예를 들어 트라스투주맵, 또는 그의 기능적 단편 중 하나, pan-HER 억제제, Src 억제제, MEK 억제제 또는 EGFR 억제제 (예를 들어, 항-EGFR 항체 (예컨대, EGFR의 티로신 키나제 활성을 억제하는 것), 예컨대 세톡시맵 (에르비투스®

), 디아닐리노프탈리미드, 피라졸로- 또는 피롤로피리도피리미딘, 퀴나질린, 게피티닙, 에를로티닙, 세톡시맵, ABX-EFG, 카네르티닙, EKB-569 및 PKI-166) 또는 이중-EGFR/HER-2 억제제, 예컨대 라파타닙이다. 추가의 제2 의약으로는 알렘투주맵 (캄패스(CAMPATH)™, FavID (IDKLH), 글리코실화가 변경된 CD20 항체, 예컨대 GA-101/글리카르트(GLYCART)™, 오블리메르센 (게나센스™, 탈리도미드 및 그의 유사체, 예컨대 레날리도미드 (레브리미드(REVLIMID)™, 이마티닙, 소라페닙, 오파투무맵 (휴맥스(HUMAX)-CD20™, 항-CD40 항체, 예를 들어 SGN-40 및 항-CD-80 항체, 예를 들어 갈락시맵이 포함된다.

[0568] 항구토제는 바람직하게는 온단세트론 히드로클로라이드, 그라니세트론 히드로클로라이드, 메트로클로프라미드, 돔페리돈, 할로페리돌, 시클리진, 로라제팜, 프로클로르페라진, 텍사메타손, 레보메프로마진 또는 트로피세트론이다. 백신은 바람직하게는 GM-CSF DNA 및 세포 기반 백신, 수지상 세포 백신, 재조합 바이러스 백신, 열 충격 단백질 (HSP) 백신, 동종이계 또는 자가 종양 백신이다. 진통제는 바람직하게는 이부프로펜, 나프록센, 콜린 마그네슘 트리살리실레이트 또는 옥시코돈 히드로클로라이드이다. 항-혈관 작용제는 바람직하게는 베바시주맵 또는 rhuMAb-VEGF이다. 추가의 제2 의약으로는 항-증식성 작용제, 예컨대 파

트레실 단백질 트랜스퍼라제 억제제, 항-VEGF 억제제, p53 억제제 또는 PDGFR 억제제가 포함된다. 본원의 제 2 의약은 또한 생물학적으로 표적화된 요법, 예컨대 예를 들어 특정 수용체에 대한 항체에 의한 치료 뿐만 아니라 소분자 표적화된 요법을 포함한다.

[0569] 본원에 기재된 것들, 예를 들어 정의 부분에 기재된 것들, 및 예를 들어 문헌 [Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000)]; [Ferrara et al., Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004)]; 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)]에 기재된 것들을 비롯한 많은 항혈관신생제가 확인되어 있고 당업계에 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 출원 US20030055006을 참조한다. 한 실시양태에서, 항-Bv8 항체는, 예를 들어 가용성 VEGF 수용체 (예를 들어 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 뉴로필린 (예를 들어 NRP1, NRP2)) 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단할 수 있는 압타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제 (RTK)의 저분자량 억제제, VEGF에 대한 안티센스 전략, VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임, VEGF의 길항제 변이체, 및 이들의 임의의 조합을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 항-VEGF 중화 항체 (또는 단편) 및/또는 또 다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제와 조합되어 사용된다. 대안적으로 또는 추가로, VEGF 길항제 및 기타 작용제에 더하여 2종 이상의 혈관신생 억제제가 임의로 환자에게 공동-투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 추가적인 치료제, 예를 들어, 항암제가 항-Bv8 항체, VEGF 길항제, 및 항혈관신생제와 조합되어 투여될 수 있다.

[0570] 본원에 유용한 화학요법제가 상기에, 예를 들어 "화학요법제"의 정의에 지개되어 있다.

[0571] 이같은 제2 의약은 본원의 항체 투여 이후 48시간 이내, 또는 상기 작용제 이후 24시간 이내, 또는 12시간 이내, 또는 3-12시간 이내에 투여될 수 있거나, 또는 미리 정해진 시간에 걸쳐, 바람직하게는 약 1 내지 2 일에 걸쳐 투여될 수 있다. 또한, 이같은 작용제의 용량은 필요량 미만일 수 있다.

[0572] 본원에서의 항체는 제2 의약과 공동으로, 순차적으로 또는 교대로, 또는 다른 요법과 비-반응성일 때 투여될 수 있다. 따라서, 제2 의약의 조합 투여는 별도의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 공-투여 (공동 투여), 및 임의 순서의 연속 투여 (바람직하게는, 양쪽 (또는 모든) 의약들이 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 기간이 있음)를 포함한다. 모든 이들 제2 의약은 서로 조합하여 사용할 수도 있거나, 또는 그 자체를 제1 의약과 함께 사용할 수도 있기 때문에, 본원에 사용된 "제2 의약"이라는 표현은 이것이 각각 제1 약물 이외의 유일한 의약라는 것을 의미하지 않는다. 따라서, 제2 의약이 1종의 의약일 필요는 없고, 1종 초과와 이러한 약물로 이루어지거나 이것을 포함할 수 있다.

[0573] 본원에서 제시되는 상기 제2 의약은 일반적으로 제1 의약과 동일한 투여량으로 동일한 투여 경로로, 또는 제1 의약의 약 1 내지 99%의 투여량으로 사용된다. 이러한 제2 의약이 조금이라도 사용되는 경우, 바람직하게는 이들은 특히 제1 의약의 초기 투여 이후의 투여시에 제1 의약이 존재하지 않는 경우보다 더 적은 양으로 사용되어, 이에 의해 야기되는 부작용을 제거하거나 감소시킨다.

[0574] 본 발명은 또한 불응성 종양, 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 억제 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장은, 하나 이상의 현재 이용가능한 요법 (예를 들어, 암 요법, 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법, 항-VEGF 항체 요법, 특히 특정 암에 대한 표준 치료 요법)을 받고 있거나 이러한 요법으로 치료받은 환자가 상기 환자의 치료에 임상적으로 적절하지 않거나 또는 환자가 상기 요법의 임의의 유익한 효과를 더이상 받지 못하여 이들 환자에게 추가의 효과적인 요법이 필요한 상태를 기재하는데 사용된다. 특정 실시양태에서, 암은, 암 세포의 수가 유의하게 감소되지 않았거나, 증가되었거나, 또는 종양 크기가 유의하게 감소되지 않았거나, 증가되었거나, 또는 암 세포의 크기 또는 수에서 임의의 추가의 감소가 일어나지 못한 경우에 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장이다. 특정 실시양태에서, 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 갖는 환자는 하나 이상의 현재 이용가능한 요법에 대해 내성이 발생한 것이다. 특정 실시양태에서, 용어 불응성은 하나 이상의 현재 이용가능한 요법 (예를 들어, 암 요법, 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법, 항-VEGF 항체 요법, 특히 특정 암에 대한 표준 치료 요법)을 받고 있거나 이러한 요법으로 치료받은 환자가 상기 환자의 치료에 임상적으로 적절하지 못한 상태를 기재하는데 사용된다. 특정 실시양태에서, 비-반응성/불응성 환자는 요법에 반응하지만 부작용으로 고통받는 환자, 요법에 반응하지 않는 환자, 요법에 만족스럽게 반응하지 않는 환자 등이다. 특정 실시양태에서, 암은 종양이 본질적으로 비-반응성이거나, 또는 이전 치료에 대해 내성인 비-반응성/불응성 종양이다. 특정 실시양태에서, 불응성은 VEGF-길항제를 포함하는 요법에 대해 질환 또는 상태가 본질적으로 비-반응성인 것을 지칭한다. 암 세포가 불응성, 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장인지의 여부를 결정하는 것은, 이러한 문맥에서의 "재발성" 또는 "불응성" 또는 "비-반응성"의 당업계에서 허용되는 의미를 사용하여, 암 세포에

대한 치료의 유효성을 검정하기 위한 당업계 공지 임의의 방법에 의해 생체내 또는 시험관내에서 이루어질 수 있다.

[0575] 본 발명은 대상체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키기 위해 유효량의 항-Bv8 항체를 투여함으로써, 상기 대상체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 환자에게 유효량의 항-Bv8 항체를 투여함으로써 VEGF 길항제를 포함하는 요법에 불응성인 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 다른 암 요법에 후속으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 암 요법과 동시에 투여된다. 대안적으로 또는 추가로, 항-Bv8 항체 요법은 또 다른 암 요법과 교대로 이루어지며, 이는 임의 순서로 수행될 수 있다. 본 발명은 또한 암에 걸리기 쉬운 환자에서 암의 발병 또는 재발을 예방하기 위해 1종 이상의 억제성 항체를 투여하는 방법을 포함한다. 일반적으로, 대상체는 암 요법을 받았거나 공동으로 암 요법을 받고 있는 중이다. 한 실시양태에서, 암 요법은 항혈관신생제, 예를 들어 VEGF 길항제로의 치료이다. 항혈관신생제는 당업계에 공지된 것, 및 본원의 정의 부분에 기재된 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 항혈관신생제는 항-VEGF 중화 항체 또는 단편 (예를 들어, 인간화 A4.6.1, 아바스틴®

(제넨테크, 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 등)이다. 예를 들어 미국 특허 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409, 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 불응성 종양을 치료하거나, 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키기 위해 추가의 작용제를 VEGF 길항제 및 항-Bv8 항체와 조합하여 투여할 수 있다.

[0576] 본 발명의 항-Bv8 항체 (및 보조 치료제)는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 국부 치료를 원하는 경우 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단으로 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 추가로, 항-Bv8 항체는, 특히 항체의 용량을 감소시키면서, 펄스 주입에 의해 적합하게 투여된다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다.

[0577] 본 발명의 항체의 결합 표적의 위치는 항체의 제조 및 투여에 있어서 고려될 수 있다. 결합 표적이 세포내 분자일 경우, 본 발명의 특정 실시양태는 결합 표적이 위치하는 세포에 도입되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항-Bv8 항체는 내부체로서 세포내에서 발현될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "내부체"는, 예를 들어 문헌 [Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997)]; [Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004)]; 미국 특허 번호 6,004,940 및 6,329,173; 미국 특허 출원 공보 번호 2003/0104402, 및 PCT 공보 번호 WO2003/077945에 기재된 바와 같이, 세포내에서 발현되고 표적 분자에 선택적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 지칭한다. 또한, 예를 들어 세포내 항체를 생성하기 위한 유전자 요법의 사용에 관한, 1996년 3월 14일에 공개된 WO96/07321을 참조한다.

[0578] 내부체의 세포내 발현은 표적 세포로의 목적하는 항체 또는 그의 항원 결합 부분을 코딩하는 핵산 (항체 또는 항원 결합 단편을 코딩하는 유전자에 정상적으로 회합되어 있는 야생형 리더 서열 및 분비 신호가 결합된 것)을 도입하는 것에 의해 이루어질 수 있다. 모든 또는 일부의 본 발명의 항체를 코딩하는 하나 이상의 핵산을 표적 세포에 전달하여 하나 이상의 내부체를 발현시킬 수 있고, 이는 세포내 표적 폴리펩티드에 결합하여 표적 폴리펩티드의 활성을 조절할 수 있다. 핵산을 세포에 도입하는 임의의 표준 방법을 사용할 수 있고, 예를 들어 미세주사, 탄도 주사, 전기천공, 인산칼슘 침전, 리포솜, 및 관심 핵산을 운반하는 레트로바이러스성, 아데노바이러스성, 아데노-관련 바이러스성 및 백시니아 바이러스에 의한 형질감염이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0579] 특정 실시양태에서, 핵산 (임의로 바이러스에 함유된 것)을 환자의 세포에 생체내 방법 및 생체의 방법으로 도입할 수 있다. 생체내 전달의 일례에서, 핵산을 환자에, 예를 들어 치료적 개입이 요구되는 부위에 직접 주사한다. 생체내 전달의 추가의 예에서, 바이러스성 벡터 (예컨대 아데노바이러스, 제I형 단순 포진 바이러스, 또는 아데노-관련 바이러스)에 의한 형질감염 및 지질-기반 시스템 (유전자의 지질-매개 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 이용하여 핵산을 세포에 도입한다. 특정 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜의 검토를 위해, 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)], 및 WO 93/25673 및 여기서 언급된 참고문헌을 참조한다. 생체의 치료의 예에서는, 환자의 세포를 제거하고, 단리된 세포에 핵산을 도입하고, 변형된 세포를 환자에게 직접적으로, 또는 예를 들어 환자에게 이식되는 다공성 막 내에 캡슐화하

여 투여한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,892,538 및 5,283,187 참조). 핵산의 생체의 전달을 위해 흔히 사용되는 벡터는 레트로바이러스성 벡터이다.

- [0580] 또 다른 실시양태에서, 항체를 내재화하는 방법이 제공된다. 항체는 세포 내로의 항체의 전달을 강화하는 특정 특성을 지닐 수 있거나, 또는 이같은 특성을 지니도록 변형될 수 있다. 이를 달성하기 위한 기술이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체의 양이온화는 세포내로의 그의 흡수를 용이하게 하는 것으로 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,703,019 참조). 리포펙션 또는 리포솜을 또한 사용하여 항체를 세포 내로 전달할 수 있다. 항체 단편이 사용되는 경우에는, 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 최소형 억제성 단편이 유리할 수 있다. 예를 들어 항체의 가변-영역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성하고/거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)]을 참조한다.
- [0581] 표적 세포 내로의 항체의 진입이 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 향상될 수 있다. 예를 들어, 특정 서열, 예컨대 HIV Tat 또는 안테나페디아(Antennapedia) 호메오도메인 단백질로부터 유래된 것이 세포막을 가로지르는 이중 단백질의 효율적인 흡수를 지시할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329]을 참조한다.
- [0582] 항체의 결합 표적이 뇌에 위치한 경우, 본 발명의 특정 실시양태는 혈액-뇌 장벽을 통과하는 항체를 제공한다. 물리적 방법, 지질-기반 방법, 줄기 세포-기반 방법, 및 수용체 및 채널-기반 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 혈액-뇌 장벽을 가로질러 분자를 수송하는 당업계 공지 접근법이 여러가지 존재한다.
- [0583] 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 항체를 수송하는 물리적 방법에는, 혈액-뇌 장벽을 완전히 우회하는 것, 또는 혈액-뇌 장벽에 개구를 생성시키는 것이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 우회 방법은 뇌로의 직접 주사 (예를 들어, 문헌 [Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)] 참조), 간질 주입/대류-증진 전달 (예를 들어, 문헌 [Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)] 참조), 및 뇌 내 전달 장치의 이식 (예를 들어, 문헌 [Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)]; 및 길포드 파마슈티칼 (Guildford Pharmaceutical)의 글리아델 웨이퍼즈(Gliadel Wafers)TM 참조)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 장벽 내 개구의 생성 방법에는 초음파 (예를 들어, 미국 특허 공보 번호 2002/0038086 참조), 삼투압 (예를 들어, 고장성 만니톨의 투여에 의한 (문헌 [Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)]), 예를 들어 브라디키닌 또는 투과화제 A-7에 의한 투과화 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, 및 5,686,416 참조), 및 항체를 코딩하는 유전자를 함유하는 벡터에 의한, 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 뉴런의 형질감염 (예를 들어, 미국 특허 공보 번호 2003/0083299 참조)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0584] 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 항체를 수송하는 지질-기반 방법에는, 혈액-뇌 장벽의 혈관 내피 상의 수용체에 결합하는 항체 결합 단편에 커플링되는 리포솜에 항체를 봉입시키는 것 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20020025313 참조), 및 저-밀도 지단백질 입자 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20040204354 참조) 또는 아포지단백질 E (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 20040131692 참조)로 항체를 코딩하는 것이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0585] 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 항체를 수송하는 줄기 세포-기반 방법은 신경 전구 세포 (NPC)가 관심 항체를 발현하도록 유전자 조작한 다음, 치료할 개체의 뇌에 줄기 세포를 이식하는 것을 수반한다. 문헌 [Behrstock et al. (2005) Gene Ther. 15 Dec. 2005 advanced online publication] (신경영양 인자 GDNF를 발현하도록 유전자 조작된 NPC를 설치류 및 영장류 모델의 뇌에 이식한 경우에 파킨슨병의 증상이 감소됨을 보고함)을 참조한다.
- [0586] 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 항체를 수송하는 수용체 및 채널-기반 방법에는 혈액-뇌 장벽의 투과성을 증가시키기 위한 글루코코르티코이드 차단제의 사용 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2002/0065259, 2003/0162695, 및 2005/0124533 참조); 칼륨 채널의 활성화 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2005/0089473 참조); ABC 약물 수송체의 억제 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2003/0073713 참조); 트랜스페린에 의한 항체 코팅 및 하나 이상의 트랜스페린 수용체의 활성 조절 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2003/0129186 참조); 및 항체의 양이온화 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,004,697 참조)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0587] 본 발명의 항-Bv8 항체는 우수 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고 투약되고 투여될 것이다. 이와 관

련하여 고려할 인자에는 치료할 특정 장애, 치료받을 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문인에게 공지된 다른 인자가 포함된다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항-Bv8 항체는 문제의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제 내에 존재하는 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 요인들에 따라 달라진다. 이는 일반적으로 상기 기재된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에 기재된 투여량의 약 1 내지 99%로, 또는 실험적으로/임상적으로 적절한 것으로 결정된 임의의 투여량 및 경로에 의해 사용된다.

[0588] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 하나 이상의 다른 추가의 치료제와 조합으로 사용될 때)은 치료될 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 항체가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 따라 달라질 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라서, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 아니면 연속적 주입에 의해서든 상관없이, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 초과인 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 치료는 일반적으로 상태에 따라 질환 증상이 원하는 수준으로 저해될 때까지 지속된다. 항체의 한 가지 예시적인 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg 또는 25 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 환자에게 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 매 3 주마다 투여될 수 있다 (예를 들어, 약 2회 내지 약 20회, 또는 예를 들어 약 6회 용량의 항체가 환자에게 제공되도록). 보다 높은 초기 부하 용량을 투여한 후, 1회 이상의 보다 낮은 용량을 투여할 수 있다. 예시적인 투여 요법은 항체를 약 4 mg/kg의 초기 부하 용량으로 투여한 후에 약 2 mg/kg씩의 매주 유지 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 투여 방식이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0589] 진단 방법 및 검출 방법

[0590] 본 발명의 항-Bv8 항체는 또한 항체를 이하에 기재된 바와 같이 표지하고/거나 불용성 매트릭스 상에 고정시킨 특정 세포 또는 조직에서 Bv8 발현을 검출하는 검정 (예컨대, 진단 또는 예측 검정)에 유용하다.

[0591] 또 다른 측면에서, 본 발명은 샘플에서 Bv8-항-Bv8 항체 복합체를 검출하는 것을 포함하는 Bv8의 검출 방법을 제공한다. 본원에 사용된 용어 "검출"은 대조군과 관련된 또는 대조군과 상관없는 정성적 및/또는 정량적 검출 (수준 측정)을 포함한다.

[0592] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체를 제공하며, 이때 항-Bv8 항체가 검출가능한 표지를 포함한다.

[0593] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-Bv8 항체 및 Bv8의 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 생체내 또는 시험관내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Bv8 항체는 검출가능하게 표지된다.

[0594] 항-Bv8 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 Bv8 항체)는 널리 공지되어 있는 수많은 검출 검정 방법 중 어느 하나에서 Bv8을 검출하는데 사용될 수 있다.

[0595] 예를 들어, 목적하는 공급원으로부터 샘플을 수득하고, 샘플과 항-Bv8 항체를 혼합하여 항체가 혼합물에 존재하는 임의의 Bv8과 함께 항체/Bv8 복합체를 형성하도록 하고, 혼합물에 존재하는 임의의 항체/Bv8 복합체를 검출하는 것에 의해 생물학적 샘플에서 Bv8을 검정할 수 있다. 생물학적 샘플은 특정 샘플에 적합한 당업계에 공지된 방법에 의해서 검정용으로 제조될 수 있다. 샘플을 항체와 혼합하는 방법 및 항체/Bv8 복합체를 검출하는 방법은 사용된 검정의 유형에 따라 선택된다. 이러한 검정에는 면역조직화학, 경쟁 및 샌드위치 검정, 및 입체 억제 검정이 포함된다. 샘플 제조를 위해, 포유동물 (전형적으로 인간 환자)로부터의 조직 또는 세포 샘플을 사용할 수 있다. 샘플의 예는 암세포, 예를 들어 결장, 유방, 전립선, 난소, 폐, 위, 췌장, 림프종 및 백혈병 암세포를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. Bv8은 또한 혈청에서 측정할 수 있다. 샘플은 외과적 절제, 흡인 또는 생검을 포함하나 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 절차에 의해 얻을 수 있다. 조직은 신선하거나 냉동될 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플은 고정되고 파라핀 등에 포매된다. 조직 샘플은 통상의 방법으로 고정 (즉, 보존)될 수 있다 (예를 들어, 문헌 ["Manual of Histological

Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York]; [The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.] 참조). 당업자라면, 샘플이 조직학적으로 염색되거나 또는 다른 방법에 의해 분석되는 목적에 따라 고정액의 선택이 결정됨을 인지하고 있을 것이다. 당업자라면 또한 고정 기간이 조직 샘플의 크기 및 사용된 고정액에 따라 달라짐을 인지하고 있을 것이다. 예를 들어, 중성 완충된 포르말린, 보우인(Bouin) 또는 파라포름알데히드를 사용하여 샘플을 고정시킬 수 있다. 일반적으로, 샘플을 먼저 고정시킨 후에 농도가 상승하는 일련의 알코올을 통해 탈수시켜서 조직 샘플이 절편화될 수 있도록 파라핀 또는 다른 절편화 매질로 침윤 및 포매시킨다. 대안적으로, 조직을 절편화하여 수득된 절편을 고정시킬 수 있다. 예를 들어, 조직 샘플을 통상의 방법으로 파라핀에 포매시키고 처리할 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 사용될 수 있는 파라핀의 예는 파라플라스트(Paraplast), 브롤로이드(Broid) 및 티슈메이(Tissuemay)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 조직 샘플이 포매되면, 샘플을 마이크로톰 등으로 절편화시킬 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 이러한 절차의 예로서, 절편의 두께는 약 3 μm 내지 약 5 μm 의 범위일 수 있다. 절편화되면, 절편을 여러가지 표준 방법을 통해 슬라이드에 부착시킬 수 있다. 슬라이드 접착제의 예는 실란, 젤라틴, 폴리-L-리신 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 파라핀 포매된 절편은 양으로 하전된 슬라이드 및/또는 폴리-L-리신으로 코팅된 슬라이드에 부착될 수 있다. 파라핀이 포매 물질로서 사용된 경우, 조직 절편을 일반적으로 탈파라핀화하고 물에 재수화시킨다. 조직 절편은 통상적인 여러가지 표준 방법을 통해 탈파라핀화될 수 있다. 예를 들어, 크실렌 및 점차적으로 농도가 감소하는 일련의 알코올을 사용할 수 있다 (예를 들어, 상기 문헌 ["Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"] 참조). 다르게는, 시판되는 탈파라핀화 비-유기 작용제, 예컨대 Hemo-De7 (CMS, 텍사스주 휴스턴)을 사용할 수 있다.

[0596] Bv8에 대한 분석 방법은 모두 하나 이상의 다음과 같은 시약을 사용한다: 표지된 Bv8 유사체, 고정된 Bv8 유사체, 표지된 항-Bv8 항체, 고정된 항-Bv8 항체 및 입체 접합체. 표지된 시약은 또한 "추적자"로 공지되어 있다.

[0597] 사용되는 표지는 Bv8 및 항-Bv8 항체의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출가능한 관능기이다. 다수의 표지가 면역검정에서의 사용에 대해 공지되어 있고, 그 예에는 직접 검출될 수 있는 모이어티, 예컨대 형광색소, 화학발광체 및 방사성 표지, 뿐만 아니라 검출하기 위해서 반응시키거나 유도체화시켜야 하는 모이어티, 예컨대 효소가 포함된다.

[0598] 사용되는 표지는 Bv8 및 항-Bv8 항체의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출가능한 관능기이다. 다수의 표지가 면역검정에서의 사용에 대해 공지되어 있고, 그 예에는 직접 검출될 수 있는 모이어티, 예컨대 형광색소, 화학발광체 및 방사성 표지, 뿐만 아니라 검출하기 위해서 반응시키거나 유도시켜야 하는 모이어티, 예컨대 효소가 포함된다. 이러한 표지의 예는 방사성 동위원소 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 및 ^{131}I , 형광단, 예컨대 희토류 킬레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 움베틸페론, 루시페라제, 예컨대 반딧불이 루시페라제 및 박테리아 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제, 예컨대 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, HRP와 같은 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 사용하는 효소와 커플링된 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 락토퍼옥시다제 또는 마이크로퍼옥시다제, 비오틴/아비딘, 스핀 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등을 포함한다.

[0599] 이러한 표지들을 단백질 또는 폴리펩티드에 공유 결합시키기 위해 통상적인 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체를 상기-기재된 형광체, 화학발광체 및 효소 표지로 태깅하기 위하여 커플링제, 예로서, 디알데히드, 카르보다이미드, 디말레이미드, 비스-이미데이트, 비스-디아조화 벤지딘 등이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 3,940,475 (형광측정법) 및 3,645,090 (효소); 문헌 [Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962)]; [David et al., Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974)]; [Pain et al., J. Immunol. Methods, 40: 219-230 (1981)]; 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407-412 (1982)]을 참조한다. 본원에서 바람직한 표지는 양고추냉이 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스파타제와 같은 효소이다. 효소를 비롯한, 상기와 같은 표지를 항체에 접합시키는 것은 면역검정 기술에 있어 당업자에게 표준의 조작 절차이다. 예를 들어, 문

헌 [O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166]을 참조한다.

[0600] 특정 검정 방법에 대해서는 시약의 고정요구가 요구된다. 고정은 용액 내에 유리 상태로 남아있는 임의의 Bv8로부터 항-Bv8 항체를 분리하는 것을 수반한다. 이는 통상적으로 수-불용성 매트릭스 또는 표면에 흡착시키거나 (미국 3,720,760 (Bennich et al.)), 공유 커플링시키거나 (예를 들어, 글루타르알데히드 가교를 이용), 또는 항-Bv8 항체 또는 Bv8 유사체를 예를 들어 면역침전 이후 고정시키는 것에 의하는 것과 같이, 검정 절차 이전에 항-Bv8 항체 또는 Bv8 유사체를 불용성화하는 것에 의해 달성된다.

[0601] 샘플 내 단백질의 발현은 면역조직화학 및 염색 프로토콜을 사용하여 검사할 수 있다. 조직 절편의 면역조직화학 염색은 샘플 내 단백질의 존재를 평가 또는 검출하는 신뢰할 수 있는 방법으로 나타난 바 있다. 면역조직화학 ("IHC") 기술은 프로브에 대한 항체를 이용하고, 일반적으로 발색 또는 형광 방법에 의해 계내에서 세포 항원을 가시화시킨다. 샘플 제조를 위해, 포유동물 (전형적으로 인간 환자)로부터의 조직 또는 세포 샘플을 사용할 수 있다. 샘플은 외과적 절제, 흡인 또는 생검을 포함하나 이로 제한되지 않는 당업계에 공지된 다양한 절차에 의해 얻을 수 있다. 조직은 신선하거나 냉동될 수 있다. 한 실시양태에서, 샘플은 고정되고 파라핀 등에 포매된다. 조직 샘플은 통상의 방법에 의해 고정 (즉, 보존)될 수 있다. 당업자라면, 샘플이 조직학적으로 염색되거나 또는 다른 방법에 의해 분석되는 목적에 따라 고정액의 선택이 결정됨을 인지하고 있을 것이다. 당업자라면 또한 고정 기간이 조직 샘플의 크기 및 사용된 고정액에 따라 달라짐을 인지하고 있을 것이다.

[0602] IHC는 형태 염색 및/또는 형광 계내 혼성화와 같은 부가적인 기술과 함께 수행할 수 있다. 2가지 일반적인 IHC 방법; 즉 직접 및 간접 검정을 이용할 수 있다. 첫번째 검정에 따르면, 항체의 표적 항원 (예를 들어, Bv8)에 대한 결합을 직접 측정한다. 이러한 직접 검정은 추가의 항체 상호작용 없이도 가시화될 수 있는 표지된 시약, 예를 들어 형광 태그 또는 효소-표지된 1차 항체를 사용한다. 전형적인 간접 검정에서는, 미결합 1차 항체가 항원에 결합한 후, 표지된 2차 항체가 상기 1차 항체에 결합한다. 2차 항체가 효소 표지에 접합된 경우, 항원이 가시화되도록 발색 또는 형광 기질을 첨가한다. 여러 2차 항체가 1차 항체 상의 상이한 에피토프와 반응할 수 있기 때문에 신호 증폭이 발생한다.

[0603] 면역조직화학에 사용되는 1차 및/또는 2차 항체는 전형적으로 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 수 많은 표지가 이용 가능하다.

[0604] 앞서 논의한 샘플 제조 절차 외에, IHC 이전, 동안 또는 이후에 조직 절편을 추가로 처리하는 것이 바람직할 수 있는데, 예를 들어 시트레이트 완충제 중에서 조직 샘플을 가열하는 것과 같은 에피토프 회복 방법을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Leong et al., Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)] 참조).

[0605] 임의의 차단 단계 후에, 조직 절편을 1차 항체가 조직 샘플 중의 표적 단백질 항원에 결합하기에 적합한 조건하에 충분한 기간 동안 1차 항체에 노출시킨다. 이를 달성하기에 적절한 조건은 통상적인 실험으로 결정할 수 있다. 항체가 샘플에 결합하는 정도는 상기 논의된 검출가능한 표지 중 어느 하나를 사용하여 결정한다. 바람직하게는, 표지는 발색 기질, 예컨대 3,3'-디아미노벤지딘 발색체의 화학적 변형을 촉매하는 효소 표지 (예를 들어, HRP)이다. 바람직하게는, 효소 표지는 1차 항체에 특이적으로 결합하는 항체에 접합된다 (예를 들어, 1차 항체는 토끼 폴리클로날 항체이고, 2차 항체는 염소 항-토끼 항체이다).

[0606] 이와 같이 제조한 시료를 장착하여 커버 글라스를 덮을 수 있다. 이어서, 예를 들어 현미경을 사용하여 슬라이드 평가를 수행하고, 당업계에서 통상 사용되는 염색 강도 기준을 사용할 수 있다.

[0607] 경쟁 또는 샌드위치 검정으로 공지된 다른 검정 방법도 잘 확립되어 있으며 상업적 진단 산업에서 널리 사용되고 있다.

[0608] 경쟁 검정은 제한된 수의 항-Bv8 항체 항원-결합 부위에 대해 시험 샘플 Bv8과 경쟁하는 추적자 Bv8 유사체의 능력에 의존한다. 항-Bv8 항체를 일반적으로는 경쟁 전 또는 후에 불용성화시킨 다음, 항-Bv8 항체에 결합된 추적자 및 Bv8를 결합되지 않은 추적자 및 Bv8로부터 분리한다. 이러한 분리는 경사분리 (결합 파트너가 사전에 불용화된 경우) 또는 원심분리 (결합 파트너가 경쟁 반응 후에 침전된 경우)에 의해 달성된다. 시험 샘플 Bv8의 양은 마커 물질의 양으로 측정되는 바와 같은 결합된 추적자의 양에 반비례한다. 기지량의 Bv8에 대한 용량-반응 곡선을 제작하여 시험 결과와 비교함으로써 시험 샘플에 존재하는 Bv8의 양을 양적으로 측정한다. 이러한 검정은, 측정가능한 마커로서 효소가 사용되는 경우에 ELISA 시스템이라 지칭된다.

- [0609] "동중" 검정이라 불리는 또 다른 종류의 경쟁 검정은 상 분리를 필요로 하지 않는다. 여기서는, 항-Bv8 항체가 Bv8에 결합하는 경우에 항-Bv8 항체의 존재가 효소 활성을 변형시키도록, Bv8과 효소의 접합체를 제조하여 사용한다. 이러한 경우, Bv8 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편을 2관능성 유기 가교에 의해 퍼옥시다제와 같은 효소에 접합시킨다. 항-Bv8 항체의 결합이 표지의 효소 활성을 억제하거나 강화시키도록 항-Bv8 항체와 함께 사용하기 위한 접합체가 선택된다. 상기 방법 그 자체는 EMIT이라는 명칭하에 널리 실시된다.
- [0610] 동중 검정을 위한 입체 장애 방법에서는 입체 접합체를 사용한다. 상기 접합체는, 합텐에 대한 항체가 실질적으로 항-Bv8 항체와 동시에 접합체에 결합할 수 없도록, 작은 Bv8 단편에 저분자량 합텐을 공유적으로 연결 시킴으로써 합성된다. 이 검정 절차하에서, 시험 샘플에 존재하는 Bv8은 항-Bv8 항체와 결합함으로써 항-합텐이 접합체에 결합하게 하여, 접합체 합텐의 특징 변화, 예를 들어 합텐이 형광단인 경우에는 형광의 변화를 일으킬 것이다.
- [0611] 샌드위치 검정은 Bv8 또는 항-Bv8 항체의 측정에 유용하다. 순차적 샌드위치 검정에서는, 고정된 항-Bv8 항체를 사용하여 시험 샘플 Bv8를 흡착하고, 세척에 의해 시험 샘플을 제거하고, 결합된 Bv8를 사용하여 제2의 표지된 항-Bv8 항체를 흡착한 다음, 결합된 물질을 잔류 추적자로부터 분리한다. 결합된 추적자의 양은 시험 샘플 Bv8에 정비례한다. "동시" 샌드위치 검정에서는, 표지된 항-Bv8를 첨가하기 전에 시험 샘플을 분리하지 않는다. 항-Bv8 모노클로날 항체를 하나의 항체로 사용하고, 폴리클로날 항-Bv8 항체를 다른 항체로 사용하는 순차적 샌드위치 검정이, Bv8에 대해 샘플을 시험하는데 유용하다.
- [0612] 상기 내용은 단지 Bv8에 대한 예시적인 검출 검정이다. 본원에 기재된 생물검정을 비롯하여, Bv8을 측정하기 위해 항-Bv8 항체를 사용하는 현재나 이후에 개발되는 다른 방법은 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0613] 한 측면에서, 본 발명은 개체, 예컨대 인간 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플 중의 폴리뉴클레오티드(들) (예를 들어, Bv8 폴리뉴클레오티드) (예를 들어, 그의 존재 또는 부재, 또는 양)를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 폴리뉴클레오티드를 검출하는 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 여기에는, 예를 들어 RT-PCR, 태깅, 증폭 방법, 폴리뉴클레오티드 마이크로어레이 등이 포함된다.
- [0614] 폴리뉴클레오티드 (예컨대 mRNA)의 검출 방법은 널리 공지되어 있고, 예를 들어 상보적 DNA 프로브를 사용하는 혼성화 검정 (예컨대, 표지된 Bv8 리보프로브를 이용한 계내 혼성화), 노던 블롯 및 관련 기술, 및 다양한 핵산 증폭 검정 (예컨대 Bv8에 특이적인 상보적 프라이머를 사용하는 RT-PCR, 및 다른 증폭 유형의 검출 방법, 예컨대 분지형 DNA, SPIA, 리보-SPIA, SISBA, TMA 등)이 포함된다.
- [0615] 포유동물 유래의 생물학적 샘플은 노던 블롯, 도트 블롯 또는 PCR 분석을 이용하여, 예를 들어 Bv8 mRNA에 대해 편리하게 검정할 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 검정, 예컨대 정량적 PCR 검정은 당업계에 널리 공지되어 있다. 본 발명의 예시적인 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 Bv8 mRNA를 검출하는 방법에는 적어도 하나의 프라이머를 이용하는 역전사에 의해 샘플로부터 cDNA를 생성하고; Bv8 폴리뉴클레오티드를 센스 및 안티센스 프라이머로 사용하여 여기서 Bv8 cDNA를 증폭시킴으로써 상기 생성된 cDNA를 증폭시키고; 증폭된 Bv8 cDNA의 존재 또는 부재를 검출하는 것이 포함된다. 또한, 상기 방법에는, 생물학적 샘플 중의 Bv8 mRNA의 양 (수준)을 측정하는 (예를 들어, 하우스키핑 유전자, 예컨대 액틴 패밀리 구성원의 비교 대조군 mRNA 서열 수준을 동시에 조사함으로써) 하나 이상의 단계가 포함될 수 있다. 임의로, 증폭된 Bv8 cDNA의 서열을 결정할 수 있다.
- [0616] 프로브 및/또는 프라이머를 검출가능한 마커, 예컨대 방사성 동위원소, 형광 화합물, 생물발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이터 또는 효소로 표지할 수 있다. 상기 프로브 및 프라이머를 샘플 중의 Bv8 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하는데 사용할 수 있고, Bv8 단백질 발현 세포를 검출하는 수단으로서 사용할 수 있다. 당업자는, 매우 많은 서로 다른 프라이머 및 프로브를 제조할 수 있고 (예를 들어, 본원에서 제공되는 서열에 기초하여), 이를 효율적으로 사용하여 Bv8 mRNA를 증폭하고/거나, 클로닝하고/거나, 그의 존재 또는 부재 및/또는 양을 측정할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0617] 본 발명의 임의의 방법에는, 마이크로어레이 기술을 이용하여 조직 또는 세포 샘플 중의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 Bv8 폴리뉴클레오티드를 검출하는 것을 포함하는 프로토콜이 포함된다. 예를 들어, 핵산 마이크로어레이를 이용하여, 시험군 및 대조군 조직 샘플로부터 얻은 시험군 및 대조군 mRNA 샘플을 역전사시키고, 표지하여 cDNA 프로브를 제조한다. 이후, 프로브를 고체 지지체에 고정된 핵산의 어레이에 혼성화시킨다. 상기 어레이를 이 어레이의 각 구성원의 서열 및 위치를 알 수 있게 배열한다. 예를 들어, 특정 질환 상태에서 발현될 잠재력을 갖는 유전자의 선택물을 고체 지지체상에 배열할 수 있다. 특정 어레이 구성원을 갖는 표지된 프로브의 혼성화는, 프로브가 유래된 샘플이 상기 유전자를 발현함을 나타낸다. 질환 조직의 차등적 유전자

발현 분석은 가치있는 정보를 제공할 수 있다. 마이크로어레이 기술에서는 단일 실험 내에서 수천 개 유전자의 mRNA 발현 프로파일을 평가하기 위해 핵산 혼성화 기술 및 전산화 기술을 이용한다. (예를 들어, 2001년 10월 11일자로 공개된 WO 01/75166 참조; (예를 들어, 어레이 제작의 논의에 대해서는 미국 5,700,637, 미국 특허 5,445,934, 및 미국 특허 5,807,522, 문헌 [Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996)]; [Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999)] 참조)). DNA 마이크로어레이는, 유리 또는 다른 기판에서 직접 합성되거나 이것으로 스팟팅되는 유전자 단편을 함유하는 미니어처 어레이이다. 수천개의 유전자는 통상적으로 단일 어레이로 나타난다. 전형적인 마이크로어레이 실험은 다음 단계를 수반한다: 1. 샘플로부터 단리된 RNA로부터 형광 표지된 표적의 제조, 2. 표지된 표적의 마이크로어레이에 대한 혼성화, 3. 어레이의 세척, 염색 및 스캐닝, 4. 스캐닝된 영상의 분석 및 5. 유전자 발현 프로파일의 생성. 현재, 2가지 주요 유형의 DNA 마이크로어레이가 사용된다: 올리고뉴클레오타이드 (통상적으로, 25 내지 70량체) 어레이 및 cDNA로부터 제조된 PCR 생성물을 함유하는 유전자 발현 어레이. 어레이를 형성하는 경우, 올리고뉴클레오타이드는 미리 제작되어 표면에 스팟팅되거나, 또는 표면에서 직접 합성될 수 있다 (계내).

[0618]

아피메트릭스 진칩(Affymetrix GeneChip)[®]

시스템은, 유리 표면상에서 올리고뉴클레오타이드를 직접 합성하여 제작되는 어레이를 포함하는 시판되는 마이크로어레이 시스템이다. 프로브/유전자 어레이: 올리고뉴클레오타이드 (통상적으로 25량체)는 반도체-기재 포토리소그래피 및 고체상 화학적 합성 기술의 조합에 의해 유리 웨이퍼 상에서 직접 합성된다. 각각의 어레이는 400,000개 이하의 상이한 올리고를 함유하고, 각각의 올리고는 수백만개의 카피로 존재한다. 올리고뉴클레오타이드 프로브는 어레이상의 공지된 위치에서 합성되기 때문에, 혼성화 패턴 및 신호 강도는 아피메트릭스 마이크로어레이 스위트(Affymetrix Microarray Suite) 소프트웨어에 의해 유전자 정체 및 상대적인 발현 수준의 면으로 해석될 수 있다. 각각의 유전자는 어레이에서 일련의 상이한 올리고뉴클레오타이드 프로브에 의해 나타난다. 각각의 프로브 쌍은 완전 매치 올리고뉴클레오타이드 및 미스매치 올리고뉴클레오타이드로 이루어진다. 완전 매치 프로브는 특정 유전자에 대해 정확하게 상보적인 서열을 갖기 때문에 유전자 발현을 결정한다. 미스매치 프로브는 중심 염기 위치에서의 단일 염기 치환에 의해 완전 매치 프로브와 상이하여 표적 유전자 전사체의 결합을 방해한다. 이것은 완전 매치 올리고에 대해 측정된 신호에 기여하는 백그라운드 및 비-특이적 혼성화를 결정하는 것을 돕는다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 완전 매치 프로브의 혼성화 강도로부터 미스매치 프로브의 혼성화 강도를 감하여 각 프로브 세트에 대한 절대 강도 값 또는 특이적 강도 값을 결정한다. 프로브는 진뱅크(GenBank)[®]

및 다른 뉴클레오타이드 정보보관소의 최근 정보를 기초로 선택한다. 상기 서열은 유전자의 3' 말단의 독특한 영역을 인식한다고 여겨진다. 진칩(GeneChip)[®]

혼성화 오븐 ("회전식(rotisserie)" 오븐)을 사용하여 한번에 최대 64개 어레이의 혼성화를 수행한다. 플루이딕스 스테이션(fluidics station)은 프로브 어레이의 세척 및 염색을 수행한다. 이는 완벽하게 자동화되어 있고, 4가지 모듈을 함유하며, 각 모듈에는 하나의 프로브 어레이가 들어간다. 각 모듈은 미리 프로그래밍된 플루이딕스 프로토콜을 이용하여 마이크로어레이 스위트 소프트웨어를 통해 독립적으로 제어된다. 스캐너는 공초점 레이저 형광 스캐너이며, 이는 프로브 어레이에 결합된 표지된 cRNA에 의해 방출되는 형광 강도를 측정한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어에 의한 컴퓨터 워크스테이션은 플루이딕스 스테이션 및 스캐너를 제어한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 프로브 어레이에 대해 미리 프로그래밍된 혼성화, 세척 및 염색 프로토콜을 이용하여 최대 8개의 플루이딕스 스테이션을 제어할 수 있다. 또한, 상기 소프트웨어는 혼성화 강도 데이터를 수득하고 이것을 적절한 알고리즘을 이용하여 각 유전자에 대한 존재/부재 신호로 전환한다. 마지막으로, 상기 소프트웨어는 실험들 사이의 비교 분석에 의해 유전자 발현의 변화를 검출하고, 결과를 .txt 파일 형식으로 구성하며, 이를 사용하여 다른 소프트웨어 프로그램으로 추가의 데이터 분석을 수행할 수 있다.

[0619]

일부 실시양태에서, 치료는 결장직장암, 폐암, 난소암, 뇌하수체 암, 췌장암, 유방 섬유선종, 전립선암, 두경부 편평 세포 암종, 연부 조직 육종, 유방암, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종, 위암, 결장직장암 (CRC), 상피 암종, 뇌암, 자궁내막암, 고환암, 담관암종, 담낭 암종 및 간세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 위한 것이다.

[0620]

생물학적 샘플은 본원에서 예를 들어 생물학적 샘플의 정의에서 기재된다.

[0621]

제조품

- [0622] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기재된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는, 단독으로 또는 다른 조성물(들)과 조합하여 상태를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 조성물을 보유하며, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 해당 조성물이 선택된 상태, 예컨대 암의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 더우기, 제조품은 (a) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (이 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 그 내부에 조성물을 함유하고 있는 제2 용기를 포함할 수 있다. 이러한 본 발명의 양태에서의 제조품은 상기 제1 및 제2 항체 조성물을 사용하여 특별한 질환, 예를 들어 암을 치료할 수 있다는 것을 표시한 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정균 주사용수 (BWF1), 인산염 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.
- [0623] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 제시된 일반적인 설명을 기초로 하여 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있음이 이해된다.
- [0624] 실시예
- [0625] 달리 나타내지 않는 한, 본 실시예에서 언급되는 시판 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다.
- [0626] 실시예 1: 항-Bv8 항체의 생성
- [0627] 본 실시예는 Bv8에 대해 지정된 뮤린 항-Bv8 항체의 인간화를 보여준다. 잔기 번호는 카바트 (문헌 [Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)])에 따른다. 단일 문자의 아미노산 약어를 사용하였다.
- [0628] 하이브리도마-유래 항-Bv8 항체의 생성
- [0629] 제조함 인간 Bv8 세포의 도메인 폴리펩티드 (페프로테크(PeproTech), 뉴저지주 록 힐)로 마우스 또는 햄스터를 면역화시킴으로써 항-Bv8 항체를 생성하였다. 도 2a, 2b, 3a, 3b, 4a 및 4b에 제시되어 있는 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 서열을 포함하는, 마우스 하이브리도마로부터 유래된 클론 2G9, 2B9, 3F1을 선택하였다. 도 5a 및 5b에 제시되어 있는 VH 및 VL 서열을 포함하는, 햄스터 하이브리도마로부터 유래된 클론 2D3을 또한 선택하였다.
- [0630] 하이브리도마-유래 항-Bv8 항체 가변 도메인의 클로닝 및 키메라 항체의 생성
- [0631] RNeasy 미니 키트 (카탈로그 74104; 퀴아젠(QIAGEN); 캘리포니아주 발렌시아)를 이용하여, 각각 마우스 항 Bv8 모노클로날 항체 2B9, 3F1 및 2G9, 뿐만 아니라 햄스터 항 Bv8 모노클로날 항체 2D3을 생산하는 하이브리도마 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 하기 축퇴성 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 이용함으로써 증폭시켰다:
- [0632] 2B9 경쇄 (LC) 정방향:
- [0633] 5'GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCAGCAATMA3' (서열번호 225)
- [0634] 2B9 중쇄 (HC) 정방향:
- [0635] 'GATCGACGTACGCTCAGGTGACKCTGAARGAGTCWGG3' (서열번호 226)
- [0636] 3F1 경쇄 (LC) 정방향:
- [0637] 5'GTACGATATCGTKCTSACCCARTCTCC3' (서열번호 227)
- [0638] 3F1 중쇄 (HC) 정방향:
- [0639] 5'GATCGACGTACGCTCAGGTGACKCTGAARGAGTCWGG3' (서열번호 228)
- [0640] 2G9 경쇄 (LC) 정방향:
- [0641] 5' GTACGATATCGTKCTSACCCARTCTCC 3' (서열번호 229)

- [0642] 2G9 중쇄 (HC) 정방향:
- [0643] 'GATCGACGTACGCTGAGGTYCAGCTSCAGCAGTCTGG3' (서열번호 230)
- [0644] 2D3 경쇄 (LC) 정방향:
- [0645] 5' GATCGATATCCARATGACNCARACNCC 3' (서열번호 231)
- [0646] 2D3 중쇄 (HC) 정방향:
- [0647] 5' GATCGA CGTACGCTGARGTGCARYTGGTGGARTCTGG3' (서열번호 232)
- [0648] 경쇄 역방향: 5'GCTGTAGGTGCTGTCTTTGCT3' (서열번호 233)
- [0649] 중쇄 역방향: 5'CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA3' (서열번호 234)
- [0650] 하기 IUB 코드에 따라 나타낸 프라이머 서열:
- [0651] IUB 코드
- [0652] G 구아닌
- [0653] A 아데닌
- [0654] T 티민
- [0655] C 시토신
- [0656] R (A 또는 G)
- [0657] Y (C 또는 T)
- [0658] M (A 또는 C)
- [0659] K (G 또는 T)
- [0660] S (C 또는 G)
- [0661] W (A 또는 T)
- [0662] H (A 또는 C 또는 T)
- [0663] B (C 또는 G 또는 T)
- [0664] V (A 또는 C 또는 G)
- [0665] D (A 또는 G 또는 T)
- [0666] N (A 또는 C 또는 G 또는 T)
- [0667] 정방향 프라이머는 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 각각의 경쇄 (LC) 및 중쇄 (HC) 역방향 프라이머는 종에 걸쳐 고도로 보존된 불변 경쇄 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1)의 영역에 어닐링되도록 설계하였다.
- [0668] 후속으로, 증폭된 PCR 생성물을 TA 클로닝 벡터 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)에 라이게이션시키고, 서열분석하였다. 이어서, 확인된 VL DNA 서열을, 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 pRK 포유동물 세포 발현 벡터 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289 (1992)])로 서브클로닝하였다. VH DNA 서열을 전장 인간 γ 1 불변 도메인을 코딩하는 pRK 벡터로 삽입하였다.
- [0669] LC 및 HC 발현 벡터를 퓨진(Fugene) 형질감염 시약 (로슈(Roche), 독일 만하임)을 사용하여 아데노바이러스-형질전환 인간 배아 신장 세포주 293으로 공동-형질감염시켰다. 항체를 혈청-무함유 배지에서 생산하고, 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제하였다.
- [0670] 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 상의 직접적 추가변 영역 그래프트
- [0671] 본 작업을 위해 사용된 파지미드는 1가 Fab-g3 디스플레이 벡터이고, 이는 단일 phoA 프로모터의 제어 하에 2개의 오픈 리딩 프레임으로 이루어진다. 제1 오픈 리딩 프레임은 수용자 경쇄의 VL 및 CL 도메인에 융합된 stII 신호 서열로 이루어지고, 제2 오픈 리딩 프레임은 수용자 중쇄의 VH 및 CH1 도메인에 융합된 stII 신호

서열, 및 이어지는 마이너 파지 코트 단백질 P3으로 이루어진다.

- [0672] 항-Bv8 항체의 CDR-그래프트 변이체 생성에 앞서, 마우스 항체의 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 인간 컨센서스 서열과 서열 정렬하였다.
- [0673] 클론 2B9 및 3F1에 있어서, 인간 컨센서스 경쇄 카파 1 (huKI) 및 인간 컨센서스 중쇄 하위군 III (huGIII)은 가장 가까운 인간 프레임워크였으며, 마우스 2B9 (m2B9) 및 마우스 3F1 (m3F1) 경쇄 및 중쇄 서열의 초가변 영역을 각각 huKI 및 huGIII 컨센서스 수용자 프레임워크로 그래프팅하여, h2B9.v1 (도 6a 및 6b) 및 h3F1.v1 (도 4a 및 4b)로 불리는 직접적 CDR-그래프트 변이체를 생성하였다.
- [0674] 흥미롭게도, 클론 2G9에 있어서, 마우스 2G9에 가장 가까운 인간 프레임워크는 인간 컨센서스 경쇄 카파 IV (huKIV) 및 인간 컨센서스 중쇄 하위군 I (huGI)이었다. 따라서, 먼저 마우스 2G9 (m2G9) 경쇄 및 중쇄의 초가변 영역을 각각의 huKI 및 huGIII 뿐만 아니라 huKIV 및 huGI 컨센서스 수용자 프레임워크로 그래프팅하여, h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1 및 h2G9.K4G3으로 확인된 4가지 상이한 CDR-그래프트 변이체를 생성하였다 (도 14 및 15). 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 카바트 경쇄 HVR 서열은 서열번호 240으로 나타낸다. 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 서열 마이너스 중쇄 HVR 서열은 서열번호 241로 나타낸다. 도 1g를 참조한다. VL 도메인에서, 하기 영역을 인간 컨센서스 수용자로 그래프팅하였다: L1의 위치 24-34, L2의 50-56 및 L3의 89-97. VH 도메인에서, H1의 위치 26-35, H2의 49-65, 71 및 73, 및 H3의 95-102를 그래프팅하였다.
- [0675] 직접적 CDR-그래프트 변이체 (h2B9.v1, h3F1.v1, h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1, h2G9.K4G3)를, 각각의 초가변 영역에 대해 별개의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, 파지 상에 디스플레이된 Fab 및 IgG 둘 모두로서 쿤켈(Kunkel) 돌연변이유발에 의해 생성하였다. 정확한 클론을 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0676] 인간화 2G9.K4G1의 선택 및 폴리싱
- [0677] 4가지 CDR-그래프트 항-Bv8 항체 변이체, h2G9.K1G1, h2G9.K1G3, h2G9.K4G1 및 h2G9.K4G3의 결합 친화도를 본원에 기재된 바와 같이 비아코어™-3000 기기를 이용하여 비아코어에 의해 측정하였다. 또한, 부신 피질 내피 세포 (ACE) 증식 검정을 본원에 기재된 바와 같이 수행하여 4가지 변이체의 Bv8 중화 활성을 조사하였다.
- [0678] 비아코어 분석의 결과는 변이체 h2G9.K1G1 및 h2G9.K1G3이 h2G9.K4G1 및 h2G9.K4G3과 비교하여 고농도 분석에서 유의하게 빠른 이탈 속도를 갖는다는 것을 보여주었다. 또한, ACE 증식 검정은 4가지 변이체 중에서, 변이체 h2G9.K4G1이 ACE 세포에 대한 Bv8의 결합을 거의 완전히 차단함으로써 최고 활성을 갖는다는 것을 보여주었다. 그러나, 비아코어 분석 및 ACE 증식 검정은 h2G9.K4G1 항-Bv8 항체의 결합 친화도 및 중화 활성이 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 것보다 여전히 낮다는 것을 나타내었다. 따라서, 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1을 그의 결합 친화도를 추가로 개선시키기 위한 친화도 성숙에 대해 선택하였다.
- [0679] 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1의 친화도 성숙을 개시하기 전에, HVR 서열을 제조 과정 중의 이성질체화, 짝을 이루지 않은 시스테인 및 탈아미드화와 관련된 잠재적 안정성 문제에 대해 분석하였다. 잠재적인 문제점이 하기 부위에서 확인되었다: (i) 경쇄 가변 서열의 위치 28 및 29에서의 인접한 잔기; (ii) 중쇄 가변 서열의 위치 52a; (iii) 중쇄 가변 서열의 위치 54; 및 (iv) 중쇄 가변 서열의 위치 95 및 96에서의 인접한 잔기.
- [0680] 상기에 언급된 잔기 위치에서 단일 아미노산 치환을 갖는 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1의 변이체를 생성하고, 각각의 변이체를 파지 상의 Fab로서 나타내었다. 하기 단일 아미노산 변형을 갖는 총 12개의 변이체를 생성하였으며, 그의 결합 친화도를 파지 경쟁 ELISA에 의해 평가하였다: CDR-L1 - D28E, D28S, G29A, G29S; CDR-H2 - C52aA, C52aS, N54A, N54S; CDR-H3: D95E, D95S, G96A, G96S. h2G9.K4G1과 비교한 12가지 변이체의 결합 친화도를 도 14a 및 14b에 나타내었다. 도면은 대부분의 변이체가 유사하거나 또는 다소 개선된 결합 친화도를 보유한다는 것을 보여주었다. 놀랍게도, CDR-H3에서 D95S 치환을 갖는 변이체는 1 μ M의 인간 Bv8에서 결합을 완전히 상실하였다. 또한, CDR-H3에서 D95E 치환을 갖는 변이체는 h2G9.K4G1과 비교하여 100배 만큼의 유의한 결합 친화도 저하를 나타내었다.
- [0681] h2G9.K4G1.폴리쉬로 식별되는 클론을 하기 4가지 아미노산 치환을 모두 조합하여 생성하였다: CDR-L1 - D28S; CDR-H2 - C52aS, N54S; CDR-H3: G96S. 비아코어 분석은 키메라 2G9 Fab 및 h2G9.K4G1.폴리쉬 Fab에 대한 유사한 결합 친화도를 보여주었고, 키메라 2G9 IgG 및 h2G9.K4G1.폴리쉬 IgG 둘 모두는 Bv8-유도된 ACE 세포 증식의 완전한 차단을 보여주었다 (도 21). 또한, CDR-L1 - D28S; CDR-H2 - C52aS, N54S; CDR-H3: G96S에서의 아미노산 치환 (항-Bv8 항체 h2G9.K4G1.폴리쉬)은 예상외로 키메라 2G9 항-Bv8 항체의 것에 근접한 결합 친화도를 복구하였다.

[0682] 초가변 영역의 소프트 무작위화

[0683] 서열 다양성을, 류린 초가변 영역 서열을 향해 바이어스를 유지하는 소프트 무작위화 전략을 이용하여 각각의 초가변 영역에 도입함으로써 클론 h2G9.K4G1.폴리쉬에 대한 친화도를 추가로 개선하였다. 이를 문헌 [Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)]에 처음 기재된 독성화 올리고뉴클레오타이드 합성 전략을 이용하여 달성하였다. 돌연변이될 초가변 영역 내의 제시된 위치에 대해, 야생형 아미노산을 코딩하는 코돈을 뉴클레오타이드의 70-10-10-10 혼합물로 독성화시켜, 각각의 위치에서 평균 50 퍼센트 비율의 돌연변이를 유발하였다. 소프트 무작위화 올리고뉴클레오타이드가 류린 초가변 영역 서열 뒤에 패턴화되었고, 이는 직접적 초가변 영역 그래프에 의해 규정된 동일한 영역을 포함하였다.

[0684] 파지 라이브러리의 생성

[0685] 각 초가변 영역에 대해 설계된 무작위화 올리고뉴클레오타이드 풀을 660 ng의 올리고뉴클레오타이드, 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, 및 5U 폴리뉴클레오타이드 키나제를 함유하는 6개의 20 µl 반응물에서 37°C 하에 1시간 동안 개별적으로 인산화시켰다. 이어서, 인산화된 6개의 올리고뉴클레오타이드 풀을 최종 용적 500 µl로 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂ 중에서 20 µg의 쿼켈 주형과 합하여 올리고뉴클레오타이드 대 주형 비가 3이 되도록 하였다. 혼합물을 90°C에서 4분, 50°C에서 5분 동안 어닐링시킨 다음, 얼음 상에서 냉각시켰다. 잉여의 어닐링되지 않은 올리고뉴클레오타이드를, 어닐링된 DNA의 과도한 변성을 방지하기 위하여 변형된 프로토콜을 이용하여 퀴아퀵(QIAquick) PCR 정제용 키트 (카탈로그 28106, 퀴아젠 인크., 캘리포니아주 발렌시아)로 제거하였다. 어닐링된 혼합물 500 µl에 PB 150 µl를 첨가하고, 혼합물을 2개 실리카 칼럼 사이에 분할시켰다. 각 칼럼을 PE 750 µl로 세척하고 별도의 스핀을 가하여 칼럼을 건조시킨 후, 각 칼럼을 110 µl의 10 mM 트리스, 1 mM EDTA, pH 8로 용리시켰다. 이어서, 어닐링되고 세정된 주형 (220 µl)에 1 µl 100 mM ATP, 10 µl 25 mM dNTP (각각 25 mM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 15 µl 100 mM DTT, 25 µl 10X TM 완충제 (0.5 M 트리스 pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 2400U T4 리가제, 및 30U T7 폴리머라제를 실온 하에 3시간 동안 첨가함으로써 상기 주형을 충전시켰다.

[0686] 이와 같이 충전시킨 생성물을 트리스-아세트레이트-EDTA/아가로스 겔 (문헌 [Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)]) 상에서 분석하였다. 3개의 밴드가 통상적으로 가시적이었다: 하부 밴드는 정확하게 충전되고 라이게이션된 생성물이고, 중간 밴드는 충전되긴 하였지만 라이게이션되지 않은 생성물이며, 상부 밴드는 가닥 교체된 생성물이었다. 상부 밴드는 T7 폴리머라제의 고유 부차 활성화에 의해 생성되며 피하기가 어렵지만 (문헌 [Lechner et al., J. Biol. Chem. 258:11174-11184 (1983)]), 이 밴드는 하부 밴드보다 30배 덜 효율적으로 변환되고, 통상적으로 라이브러리에 거의 일조하지 않는다. 중간 밴드는 최종 라이게이션 반응을 위한 5' 포스페이트의 부재에 기인하는데, 이러한 밴드는 효율적으로 변환되고 공공롭게도 주로 야생형 서열을 제공해준다.

[0687] 이어서, 충전된 생성물을 세정하고 SS320 세포 내로 전기천공시키고, 문헌 [Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)]에 기재된 바와 같이 M13/K07 헬퍼 파지의 존재 하에 증식시켰다. 라이브러리 크기는 1 내지 2 x 10⁹ 개 범위의 독립적인 클론이었다. 초기 라이브러리로부터의 무작위 클론을 서열 분석하여 라이브러리 질을 평가하였다.

[0688] 파지 선택

[0689] 인간 Bv8 (페프로텍)을 파지 선택을 위한 표적으로서 사용하였다. 제1 라운드 패닝을 위해, 인간 Bv8을 PBS 중에서 10 µg/ml로 맥시소르프(MaxiSorp) 마이크로타이터 플레이트 (눈크(Nunc)) 상에 코팅하였다. 제1 라운드의 선택 동안, 8 웰의 표적을 이용하였고; 이어지는 라운드의 선택에 대해 단일 웰의 표적을 이용하였다. 슈퍼 블록(Super Block) (피어스)을 이용하여 웰을 1시간 차단하였다. 파지를 배양 상청액으로부터 수확하고, 1% BSA 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에 현탁시켰다. 2 시간 동안 웰에 결합시킨 후, 결합되지 않은 파지를 0.05 % 트윈 20을 함유하는 PBS (PBT)로 광역 세척하여 제거하였다. 결합된 파지는, 웰을 50 mM HCl, 0.5 M KCl과 함께 30분 동안 항온 배양함으로써 용리시켰다. XL1 청색 세포 (스트라테진(Stratagene)) 및 M13/K07 헬퍼 파지 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))를 이용하여 파지를 증식 및 증폭시키고, 다음 라운드의 패닝을 위해 2YT 50 µg/ml 카르베나실린 중에 37°C에서 밤새 성장시켰다. 표적 코팅된 웰로부터 용리된 파지의 역가를 비-표적 코팅된 웰로부터 회수된 파지의 역가와 비교하여 강화를 평가하였다.

[0690] 제2 라운드 분류를 시작하면서, 선택의 엄격도를 증가시켜 친화도 개선된 클론을 분리할 수 있도록 하는 용액

분류 방법 (문헌 [Lee, C.V., et al. (2004) J. Mol. Biol 340(5): 1073-93])을 이용하여 파지 라이브러리를 분류하였다. 술폰-NHS-LC-비오틴 (b-Bv8, 피어스, 일리노이주 록포드)을 사용하여 인간 Bv8을 비오틴화시켰다. 마이크로타이터 웰을 4℃에서 밤새 PBS 중에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 뉴트라비딘으로 코팅하고, 이어서, 수퍼 블록 (피어스)을 사용하여 1 시간 동안 차단하였다. 제2 라운드 선택 동안, PBST 완충제 중에 현탁시킨 200 μl 파지를 실온 (RT)에서 2시간 동안 5 nM b-Bv8과 혼합하였다. b-Bv8과 결합된 파지를 실온에서 15분 동안 뉴트라비딘 코팅된 웰 상에 포획하고, 결합되지 않은 파지를 PBT 완충제로 세척하였다. 파지를 30 분 동안 100 mM HCl을 사용하여 용리시키고, 중화시키고, 상기 기재된 바와 같이 증식시켰다. 다음 라운드의 선택을 하기 예외를 두고 제2 라운드 선택과 유사하게 수행하였다: 라운드 3 및 4에서의 최종 b-Bv8 농도는 0.1 nM이었고, 라운드 5에서의 최종 b-Bv8 농도는 0.05 nM이었다. 라운드 4 및 5를 시작하면서, b-Bv8과의 파지 결합 후에, 각각 500 및 1000배 초과와 비-비오틴화 인간 Bv8을 실온에서 1-2시간 동안 혼합물에 첨가하여 빠른 이탈 속도 결합제와 경쟁시킨 후, 뉴트라비딘 상에 포획하였다.

[0691] 파지 IC₅₀을 결정하기 위한 파지 경쟁 ELISA

[0692] 맥시소프™ 마이크로타이터 플레이트를 PBS 중 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 재조합 인간 Bv8 (페프로테크)로 코팅한 후에, PBST 완충제 (PBS 중 0.5% BSA 및 0.05% 트윈 20)로 실온 (RT)에서 1시간 동안 차단하였다. 배양 상청액으로부터의 파지를 조직-배양 마이크로타이터 플레이트에서 실온에서 1시간 동안 PBST 완충제 중 연속 희석된 인간 Bv8과 함께 인큐베이션하고, 이후에 혼합물 80 μl 를 15분 동안 표적-코팅된 웰로 옮겨 결합하지 않은 파지를 포획하였다. 플레이트를 PBT 완충제 (PBS 중 0.05% 트윈 20)로 세척하고, HRP-접합된 항-M13 (아머삼 파마시아 바이오텍(Amersham Pharmacia Biotech))을 40분 동안 첨가하였다 (PBST 완충제 중 1:5000). 플레이트를 PBT 완충제로 세척하고, 테트라메틸벤지딘 기질 (키르케가드 앤 페리 래보라토리즈(Kirkegaard and Perry Laboratories), 미국 매릴랜드주 게이더스버그)을 첨가하여 발색시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 용액 중 표적 농도의 함수로 플롯팅하여 파지 IC₅₀을 결정하였다. 이를 파지의 표면 상에 디스플레이된 Fab 클론에 대한 친화도 추정치로 사용하였다. 도 14a 및 14b는 인간 Bv8에 대한 폴리쉬 h2G9.K4G1 변이체 (L1: D28E, D28S, G29A, G29S, H2: C52aA, C52aS, N54A, N54S, H3: D95E, D95S, G96A 및 G96S)의 결합을 나타내는 파지 경쟁 검정으로부터의 결과를 도시한다. 도 16 및 17은 인간 Bv8에 대한 친화도 개선된 h2G9.K4G1.폴리쉬 변이체 (L1/L2 소프트-무작위화 라이브러리로부터의 h2G9.K4G1.v27, v52, v55, v63, v64, v67, v77, v80; H1/H2 소프트-무작위화 라이브러리로부터의 h2G9.K4G1.v19, v25, v37, v65, v73, v75, v77, v92)의 결합을 나타내는 파지 경쟁 검정으로부터의 결과를 도시한다.

[0693] 비아코어에 의한 항체 친화도 결정

[0694] 항-Bv8 항체 (Fab 또는 IgG)의 결합 친화도 결정을 위해, 비아코어™-3000 기기에 의한 표면 플라즈몬 공명 (SRP) 측정을 이용하였다. 간략하게, CM5 바이오센서 칩을 공급업체의 지침에 따라 EDC 및 NHS 시약으로 활성화시키고, 인간 Bv8 (페프로테크) 또는 시노물구스 원숭이 (제넨테크; PUR21590)를 대략 150 반응 유닛 (RU)이 달성되도록 커플링시키고, 이어서 1M 에탄올아민을 사용하여 반응하지 않은 기를 차단하였다. 동역학적 측정을 위해, 항-Bv8 Fab (0.19 nM 내지 25 nM) 또는 IgG (0.019 nM 내지 10 nM)의 2배 연속 희석물을 25 ℃에서 30 μl /분의 유량으로 HBS-P 완충제 (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.005% 계면활성제 P20) 중에 주입하였다. 회합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 단순 일대일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 이밸류에이션 소프트웨어 버전 3.2)를 이용하여 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_d)를 k_{off}/k_{on} 비로서 계산하였다. 도 18 내지 21을 참조한다. 결과는 인간화 항-Bv8 항체, h2G9.K4G1.v19 및 h2G9.K4G1.v55가 키메라 2G9 항-Bv8 항체보다 인간 및 시노물구스 Bv8에 2배 이상 단단하게 결합한다는 것을 보여준다.

[0695] ACE 증식 검정

[0696] ACE 세포를 6-웰 플레이트 내의 성장 배지 중에 웰당 5000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 억제 검정을 위해, 항-Bv8 항체를 먼저 지정 농도 ($\mu\text{g/ml}$)로 첨가하였다. 0.5-1 시간 후, 이어서 인간 Bv8 (페프로테크)을 10 nM의 최종 농도로 첨가하였다. 6 일 후, 세포를 각 웰에 2x트립신 (김코(GIBCO)) 1 ml를 첨가함으로써 해리시키고, 이중 웰을 Z2 쿨터 입자 계수 및 크기 분석기 (베크만 쿨터(Beckman Coulter))를 이용하여 계수하였다. 도 12, 13, 15, 23 및 24를 참조한다. 도 23은 인간화 항-Bv8 항체 h2G9K4G1.v19, h2G9K4G1.v52, h2G9K4G1.v55 및 h2G9K4G1.v73이 인간 Bv8-유도된 ACE 증식을 차단함에 있어 유의한 개선을 나타냈음을 보여준다.

[0697] Bv8 항체 에피토프를 매핑하기 위한 경쟁 ELISA

- [0698] 눈크(NUNC)TM 96-웰 맥시소르프 이뮤노플레이트 (눈크; 덴마크 로스킬레)를 PBS 중에서 키메라 2B9 IgG를 사용하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 밤새 코팅하고, 이어서 PBST 완충제 (PBS 중 0.5% BSA 및 0.05% 트윈 20)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 인간 Bv8의 비오틴화를 EZ-링크 술포-NHS-LC-비오틴 (카탈로그 21335; 피어스; 일리노이주 록포드) 시약을 사용하여 1:4 (HuBv8:비오틴)의 물비로 제조하였다.
- [0699] 경쟁 검정에서 비오틴화 인간 Bv8의 양을 결정하기 위해, 100 nM에서부터 0.04 nM까지 3배 연속 희석된 비오틴화 인간 Bv8을 15분 동안 항체-코팅된 플레이트에 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 PBT 완충제 (PBS 및 0.05% 트윈 20)로 세척하였다. 결합된 비오틴화를, 양고추냉이 퍼옥시다제 (카탈로그 21126; 피어스; 일리노이주 록포드)와 접합시켜 PBST 완충제 중에 1:2500 희석한 스트렙타비딘을 사용하여 검출하였다. 45분의 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 테트라메틸벤지딘 (알앤디 시스템즈(R&D Systems)) 100 μl 를 대략 5분 동안 각 웰에 첨가하여 신호 누설을 유도하였다. 청색 색조가 나타나면, 1M의 인산 100 μl 를 각 웰에 첨가하여 누설 과정을 중지시켰다. 광학 밀도를 450 nm에서 분광광도법으로 판독하였다.
- [0700] Bv8 항체 에피토프를 키메라 2B9와 매핑하기 위해, IgG (키메라 2B9, 키메라 3F1, 키메라 2D3, 키메라 2G9 및 IgG 대조군)의 3배 연속 희석물을 먼저 실온에서 1-2시간 동안 PBST 완충제 중에서 상기 결합 검정에 의해 결정된 2 nM 비오틴화 인간 Bv8과 함께 인큐베이션하고, 이어서 이를 15분 동안 항체 (키메라 2B9 IgG; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-코팅된 플레이트로 이동시켰다. 이어서, 플레이트를 PBT 완충제로 세척하고, 플레이트 상에서 키메라 2B9 IgG에 결합된 비오틴화 인간 Bv8의 양을 상기 기재된 프로토콜에 의해 검출하였다.
- [0701] 경쟁 검정에서, 키메라 3F1 및 키메라 2G9 항체는 인간 Bv8에 대한 키메라 2B9 결합과 경쟁하였고, 이는 두 항체 모두가 키메라 2B9와 중복되는 에피토프를 갖는다는 것을 시사한다. 그러나, 키메라 2D3은 인간 Bv8에 대한 키메라 2B9 항체 결합과 단지 부분적으로 경쟁하는 것으로 나타났으며, 이는 키메라 2D3 항체가 키메라 2B9 뿐만 아니라 키메라 3F1 및 키메라 2G9 항체와 구분되는 에피토프(들)를 가지고 있을 수 있음을 시사한다 (도 11).
- [0702] 실시예 2: 생체내 효능 연구
- [0703] 인간 HT-55, Colo-205 (결장직장 암종), A673 (황문근육종), HPAC (췌장 암종) 및 Calu-6 (폐 암종) 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (버지니아주 매너시스)으로부터 입수하였다. 인간 결장직장 암종 HM7 세포주는 LS 174T의 유도체이다. Calu-6, A673, HPAC 및 HM7을 햄 F12, 저 글루코스 DMEM 1:1 중에서 성장시켰다. 콜로-205 및 HT-55를 RPMI 1640 배지 중에서 성장시켰다. 두 배지는 모두 10% v/v FBS, 1% v/v 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드), 2 mM L-글루타민 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드) 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푼지존(FUNGIZONE)TM (인비트로젠, 칼스배드, CA)으로 보충하였다. 세포를 전면배양시까지 5% CO₂ 하에 37°C에서 성장시키고, 수확하고, 멸균 매트릭셀에 ml당 15 x 10⁶ 개 세포로 재현탁시켰다. 이종이식편을 6 내지 8주령 BALB/c 누드 마우스 (찰스 리버(Charles River); 캘리포니아주 홀리스트)에서 마우스 당 1.5 x 10⁶ 개 세포의 배측 옆구리 피하 (S.C.) 주사에 의해 접종하고, 성장시켰다. 종양 세포 접종 24시간 후, 항-Bv8 항체, 키메라 2D3, 키메라 3F1, 키메라 2B9 및 키메라 2G9; 인간화 2G9 변이체 19, 인간화 2G9 변이체 55 및 인간화 2G9.K4G1.폴리쉬를 사용한 i.p. 처리 (10 mg/kg 용량, 주 2회)를 개시하였다. 대조군으로서, 본 발명자들은 항-GP-120 Mab (10 mg/kg, 주 2회), 및 항-VEGF Mab G6.31 또는 B20 (5 mg/kg, 주 2회)을 사용하였다 (문헌 [Liang, W.C., et al., J Biol Chem 281, 951-961 (2006)]). 모든 실험에서, 이식된 종양을 캘리퍼를 이용하여 장축 및 수직축을 따라 주 2회 측정하였다. 종양 부피를 타원체 부피 공식 (0.5 x L x W x W)을 이용하여 계산하고, 모든 처리에서의 군 당 10 마우스로부터의 평균 종양 부피 및 표준 오차를 도면에 나타내었다. 항-Bv8 항체는 또한 항-VEGF 항체와 함께 사용시, LXFL529 인간 폐 비소세포 암종에서 상가 효과를 가졌다. 베이지 누드 마우스 (n=7 내지 9)에 LXFL529 인간 폐 비소세포 암종 세포를 이식하였다. 이어서, 마우스를 종양 접종 후 24시간 이내에 대조군 항-돼지폴 1428 및 항-Bv8 마우스 항체 (3F1 및 2B9)로 처리하였다. 종양이 약 400 mm³에 도달한 후 마우스를 항-VEGF 항체로 처리하였다. 결과는 단일 작용제로서의, 그리고 항-VEGF 항체와 조합된 키메라 및 인간화 항-Bv8 항체로의 처리가 다양한 종양에서 종양 성장 감소를 일으켰음을 보여준다. 도 25 내지 37을 참조한다.
- [0704] 마우스 LLC (루이스 폐 암종), 인간 H460 (비소세포 폐 암종) 및 HT29 (결장직장 암종) 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (버지니아주 매너시스)으로부터 입수하였다. LLC 및 HM7 세포를 10% 태아 소 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 플러스 1% L-글루타민 (하이클론(Hyclone); 유타주 로간) 중에서 성장시켰다. 세포를 5% CO₂ 하에 37°C에서 성장시키고, 수확하고, 원심분리하고, 헵크스(Hanks') 평형 염 용액 (HBSS)으로 세척하고, 계

수하였다. LLC 세포를 50% HBSS 및 50% 매트릭젤™ (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences); 캘리포니아주 산 호세) 중에 재현탁시키고, HM7 세포를 HBSS (인비트로젠; 캘리포니아주 칼스배드) 중에 재현탁시켰다 (마우스에 주사하기 위해 둘 다 3.5×10^7 개 세포/mL의 농도로). H460 세포를 10% 태아 소 혈청, 100 유닛/mL 페니실린 G, 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신 술페이트, 1 mM 피루브산나트륨, 2 mM 글루타민, 10 mM HEPES, 0.075% 중탄산나트륨 및 25 $\mu\text{g/mL}$ 겐타미신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에서 배양하였다. 세포를 5% CO_2 및 95% 공기의 대기 하에 37°C에서 가슴 인큐베이터 내의 조직 배양 플라스크 중에서 배양하고, 이어서 수확하고, 마우스에 주사하기 위해 5×10^7 개 세포/mL의 농도로 인산염 완충 염수 (PBS) 중에 재현탁시켰다. 처음에 HT29 세포는 ATCC로부터 입수하였고, 후속으로 생성된 이종이식 종양을, 실험을 위한 이식 전에, 무흉선 누드 마우스에서 연속 피하 이식에 의해 생체내 세포주로서 유지하였다. LLC 세포를 8 내지 9주령 암컷 BALB/c 누드 마우스 (찰스리버, 캘리포니아주 홀리스트)에서 마우스 당 3.5×10^6 개 세포로 배측 옆구리 피하 (S.C.) 주사에 의해 접종하고, 동종이식편으로 성장시켰다. HM7 세포를 12주령의 나이든 암컷 무흉선 누드 (nu/nu) 마우스 (하틀란 스프라그 돌리, 인크.(Harlan Sprague Dawley, Inc.); 메릴랜드주 프레더릭)에서 마우스 당 3.5×10^6 개 세포로 뒷다리 S.C. 주사에 의해 접종하고, H460 세포를 10 내지 11주령의 암컷 무흉선 누드 (nu/nu) 마우스 (하틀란 스프라그 돌리, 인크.; 메릴랜드주 프레더릭)에서 마우스 당 1×10^7 개 세포로 배측 옆구리 S.C. 주사에 의해 접종하고, 1 mm³의 HT29 종양 단편을 11 내지 12주령의 나이든 암컷 무흉선 누드 (nu/nu) 마우스 (하틀란 스프라그 돌리, 인크.; 메릴랜드주 프레더릭)의 옆구리에 S.C. 이식하였다. 항-Bv8 항체 키메라 2D3, 뮤린 3F1 및 뮤린 2B9를 주 2회 10 mg/kg으로 i.p. 투여하고, 인간화 항-Bv8 항체 2G9를 주 1회 30 mg/kg으로 i.p. 투여하였다. 대조군으로서, 본 발명자들은 항-폐지폴 Mab (i.p., 30 또는 100 mg/kg, 주 2회) 및 항-VEGF Mab B20-4.1.1 (i.p., 5 mg/kg, 주 2회)을 투여하였다. 세포 접종 또는 종양 이식 (HT29) 후 하기 기간 후에 처리를 개시하였다: LLC의 경우 7시간, HM7의 경우 8일, H460의 경우 11일, 및 HT29의 경우 36일. 종양 무게 및 체중을 측정하고, 전신적 임상 관찰을 연구 기간 동안 매주 최소 2회 수행하였다. 종양 부피를 타원체 부피 공식 ($0.5 \times L \times W \times W$)을 이용하여 계산하였다. 시간이 지남에 따른 동일 동물로부터의 종양 부피의 반복 측정치를 분석하기 위해, 혼합-모델링 접근법을 이용하였고, 적합화된 종양 부피 데이터를 생성하였다 (문헌 [Pinheiro et al. nlme: linear and nonlinear mixed effects models; 2009; Version R package version 3.1-96]). 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯을 구성하여, 연구에 남아 있는 동물의 백분율을 시간의 함수로서 나타내었다. 단일 작용제로서의, 그리고 항-VEGF 항체와 조합된 뮤린 및 인간화 항-Bv8 항체로의 처리는 다양한 종양에서 종양 성장 감소 (도 38 내지 40, 및 42 참조) 및 생존 연장 (도 41 및 43 참조)을 유발하였다.

[0705] 실시예 3: 마우스 2G9 항체에 대한 인간 Bv8의 결합을 차단하는 인간화 항-Bv8 항체의 능력을 측정하기 위한 경쟁 ELISA

[0706] 맥시소르프 384 웰 플레이트를 50 mM 탄산나트륨 완충제 (pH 9.6) 중에서 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 모 마우스 2G9 IgG1 항체를 사용하여 25 μL /웰로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 플레이트를 0.05% 폴리소르베이트, pH 7.4를 함유하는 인산염 완충 염수 (PBS)로 세척하고, 0.5% BSA, 10 ppm 프로클린, pH 7.4를 함유하는 PBS를 사용하여 80 μL /웰로 차단하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척하였다. 0.5% BSA, 0.05% 폴리소르베이트 20, pH 7.4 및 비오틴화 인간 Bv8 (최종 농도 0.5 ng/mL 또는 57 pM)을 함유하는 PBS 중에 연속 희석된 인간화 2G9 항체 (0.11 pM-180 nM)의 혼합물을 25 μL /웰로 첨가하였다. 2시간 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 양고추냉이 퍼옥시다제 접합 스트렙타비딘 (지이 헬스케어(GE Healthcare))을 첨가하였다. 최종 30분 인큐베이션 후, 플레이트를 세척하고, 기질 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (키르케가드 앤 페리 래보러토리즈)을 첨가하였다. 1M 인산을 첨가하여 반응을 중지시키고, 흡광도를 멀티스캔 어센트(Multiskan Ascent) 리더 (썬모 사이언티픽(Thermo Scientific), 뉴햄프셔주 허드슨) 상에서 450 nm에서 판독하였다. 데이터 분석을 위해, 적정 곡선을 4-파라미터 비선형 회귀 곡선-적합화 프로그램을 사용하여 적합화시키고, IC50 농도를 결정하였다 (칼레이다그래프(KaleidaGraph), 시너지 소프트웨어, 펜실베이니아주 링딩).

[0707] 결과는 인간화 항-Bv8 항체 h2G9.K4G1.v19, h2G9.K4G1.v52, h2G9.K4G1.v55, h2G9.K4G1.v73 및 h2G9.K4G1.v19H/v55L이 키메라 2G9 및 h2G9.K4G1.폴리쉬 항-Bv8 항체와 비교하여 마우스 2G9 항체에 대한 인간 Bv8의 결합을 차단하는데 있어서 보다 우수한 능력을 갖는다는 것을 보여준다. 도 22를 참조한다.

[0708] 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 명확하게 포함된다.

[0709] 본 발명이 구체적 실시양태로 간주되는 것을 참조로 기재되었지만, 본 발명이 이같은 실시양태로 한정되지 않

는 것으로 이해되어야 한다. 이와 반대로, 본 발명은 하기 특허청구범위의 취지 및 범주 내에 포함되는 다양한 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0710] 특허청구범위를 포함하여 본원 전반에 걸쳐, 용어 "포함하는"은 포괄적이고, 제약을 두지 않은 번역 문구로서 사용되며, 이는 추가의 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다.

도면

도면1a

항제	L1																서열 번호
	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34		
2G9 키메라	K	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N	49	
h2G9.K4G1.폴리쉬	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	55	
h2G9.K4G1.v19	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	61	
h2G9.K4G1.v25	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	67	
h2G9.K4G1.v27	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	73	
h2G9.K4G1.v37	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	79	
h2G9.K4G1.v52	K	A	S	Q	S	L	I	Y	G	A	D	S	Y	M	N	85	
h2G9.K4G1.v55	K	A	S	Q	S	L	D	Y	Y	H	Y	S	Y	M	N	91	
h2G9.K4G1.v63	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	97	
h2G9.K4G1.v64	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	103	
h2G9.K4G1.v65	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	109	
h2G9.K4G1.v67	K	A	S	Q	S	L	D	Y	W	V	D	S	Y	M	N	115	
h2G9.K4G1.v73	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	121	
h2G9.K4G1.v75	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	127	
h2G9.K4G1.v77	K	A	S	Q	S	V	D	Y	G	G	D	S	Y	M	N	133	
h2G9.K4G1.v80	K	A	S	Q	S	V	D	Y	F	A	E	S	Y	M	N	139	
h2G9.K4G1.v92	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	145	
h2G9.K4G1.v19H/v55L	K	A	S	Q	S	L	D	Y	Y	H	Y	S	Y	M	N	151	
2B9 키메라	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	157	
h2B9.v1	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	163	
h2B9.v10	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	169	
h2B9.v23	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	175	
h2B9.v37	S	A	S	S	--	--	--	--	--	P	V	F	Y	M	H	181	
h2B9.v56	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	187	
h2B9.v76	S	A	S	S	--	--	--	--	--	S	V	F	Y	M	H	193	
3F1 키메라	E	A	S	Q	S	V	D	Y	D	D	D	S	Y	M	N	199	
h3F1.v1	E	A	S	Q	S	V	D	Y	D	D	D	S	Y	M	N	205	
2D3 키메라	K	S	S	E	--	--	--	--	Y	V	S	N	A	L	S	211	

도면1b

항제	L2							서열 번호
	50	51	52	53	54	55	56	
2G9 카메라	A	A	S	N	L	E	S	50
h2G9.K4G1.폴리쉬	A	A	S	N	L	E	S	56
h2G9.K4G1.v19	A	A	S	N	L	E	S	62
h2G9.K4G1.v25	A	A	S	N	L	E	S	68
h2G9.K4G1.v27	A	A	S	N	L	E	S	74
h2G9.K4G1.v37	A	A	S	N	L	E	S	80
h2G9.K4G1.v52	A	A	S	N	R	E	T	86
h2G9.K4G1.v55	A	A	S	N	R	E	S	92
h2G9.K4G1.v63	A	A	S	N	L	E	T	98
h2G9.K4G1.v64	A	A	S	N	R	E	S	104
h2G9.K4G1.v65	A	A	S	N	L	E	S	110
h2G9.K4G1.v67	A	A	S	N	R	E	T	116
h2G9.K4G1.v73	A	A	S	N	L	E	S	122
h2G9.K4G1.v75	A	A	S	N	L	E	S	128
h2G9.K4G1.v77	A	A	S	N	R	E	T	134
h2G9.K4G1.v80	A	A	S	Y	R	E	S	140
h2G9.K4G1.v92	A	A	S	N	L	E	S	146
h2G9.K4G1.v19H/v55L	A	A	S	N	R	E	S	152
2B9 카메라	D	T	S	K	L	A	S	158
h2B9.v1	D	T	S	K	L	A	S	164
h2B9.v10	D	T	S	K	L	A	S	170
h2B9.v23	D	T	S	K	L	A	S	176
h2B9.v37	D	T	S	N	L	A	S	182
h2B9.v56	D	T	S	K	L	A	S	188
h2B9.v76	D	T	S	K	L	A	S	194
3F1 카메라	A	T	S	N	L	A	S	200
h3F1.v1	A	T	S	N	L	A	S	206
2D3 카메라	G	T	N	K	L	E	D	212

도면1c

항제	L3										서열 번호
	89	90	91	92	93	94	95	96	97		
2G9 키메라	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	51	
h2G9.K4G1.폴리쉬	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	57	
h2G9.K4G1.v19	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	63	
h2G9.K4G1.v25	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	69	
h2G9.K4G1.v27	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	75	
h2G9.K4G1.v37	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	81	
h2G9.K4G1.v52	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	87	
h2G9.K4G1.v55	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	93	
h2G9.K4G1.v63	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	99	
h2G9.K4G1.v64	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	105	
h2G9.K4G1.v65	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	111	
h2G9.K4G1.v67	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	117	
h2G9.K4G1.v73	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	123	
h2G9.K4G1.v75	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	129	
h2G9.K4G1.v77	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	135	
h2G9.K4G1.v80	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	141	
h2G9.K4G1.v92	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	147	
h2G9.K4G1.v19H/v55L	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T	153	
2B9 키메라	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	159	
h2B9.v1	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	165	
h2B9.v10	Q	Q	W	S	F	D	P	I	T	171	
h2B9.v23	Q	Q	W	S	W	E	P	L	T	177	
h2B9.v37	Q	Q	W	S	Y	E	P	L	T	183	
h2B9.v56	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	189	
h2B9.v76	Q	Q	W	S	Y	D	P	M	T	195	
3F1 키메라	Q	Q	S	N	E	D	P	F	T	201	
h3F1.v1	Q	Q	S	N	E	D	P	F	T	207	
2D3 키메라	Q	Q	G	Y	D	I	P	--	T	213	

도면1d

항제	H1													서열 번호
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B		
2G9 키메라	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	52	
h2G9.K4G1.폴리쉬	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	58	
h2G9.K4G1.v19	G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	--	--	64	
h2G9.K4G1.v25	G	Y	S	L	F	H	Y	D	M	H	--	--	70	
h2G9.K4G1.v27	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	76	
h2G9.K4G1.v37	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	--	--	82	
h2G9.K4G1.v52	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	88	
h2G9.K4G1.v55	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	94	
h2G9.K4G1.v63	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	100	
h2G9.K4G1.v64	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	106	
h2G9.K4G1.v65	G	Y	T	F	M	H	Y	D	M	H	--	--	112	
h2G9.K4G1.v67	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	118	
h2G9.K4G1.v73	G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	--	--	124	
h2G9.K4G1.v75	G	Y	T	F	P	I	Y	D	M	H	--	--	130	
h2G9.K4G1.v77	G	Y	T	F	T	E	Y	D	M	H	--	--	136	
h2G9.K4G1.v80	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	--	--	142	
h2G9.K4G1.v92	G	Y	S	F	V	H	Y	D	M	H	--	--	148	
h2G9.K4G1.v19H/v55L	G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	--	--	154	
2B9 키메라	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	160	
h2B9.v1	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	166	
h2B9.v10	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	172	
h2B9.v23	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	178	
h2B9.v37	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	184	
h2B9.v56	G	F	Y	I	S	T	P	G	M	G	V	S	190	
h2B9.v76	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	196	
3F1 키메라	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	--	--	202	
h3F1.v1	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	--	--	208	
2D3 키메라	G	F	T	F	S	D	Y	F	M	G	--	--	214	

도면1e

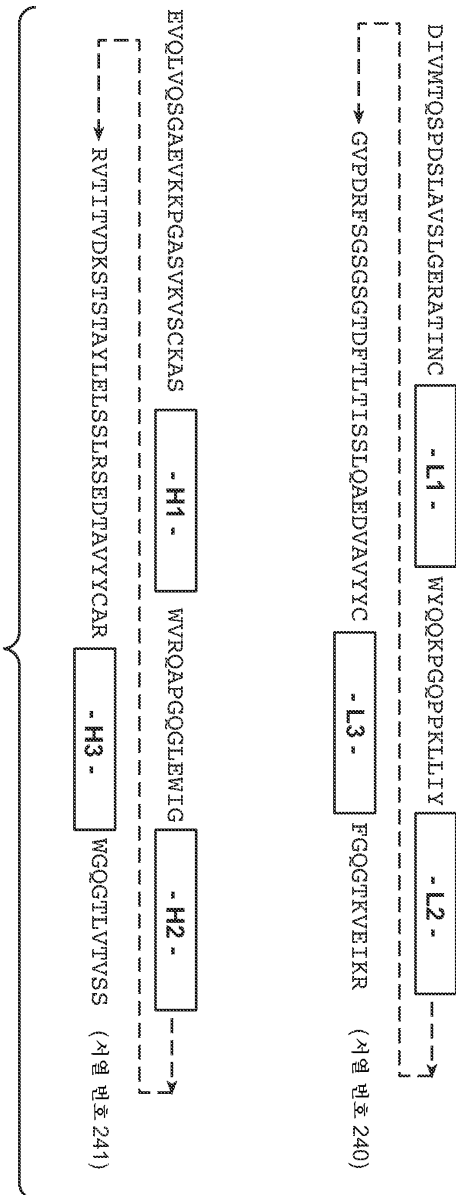
항제	H2																	서열 번호
	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
2G9 키메라	Y	I	S	C	Y	N	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	53
h2G9.K4G1.폴리쉬	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	59
h2G9.K4G1.v19	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G	65
h2G9.K4G1.v25	Y	I	S	T	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	71
h2G9.K4G1.v27	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	77
h2G9.K4G1.v37	Y	I	S	T	Y	A	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	83
h2G9.K4G1.v52	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	89
h2G9.K4G1.v55	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	95
h2G9.K4G1.v63	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	101
h2G9.K4G1.v64	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	107
h2G9.K4G1.v65	Y	I	S	S	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	113
h2G9.K4G1.v67	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	119
h2G9.K4G1.v73	Y	I	S	S	Y	L	G	A	T	I	Y	N	Q	K	F	K	G	125
h2G9.K4G1.v75	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	131
h2G9.K4G1.v77	Y	I	T	T	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	137
h2G9.K4G1.v80	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G	143
h2G9.K4G1.v92	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	149
h2G9.K4G1.v19H/v55L	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G	155
2B9 키메라	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	161
h2B9.v1	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	167
h2B9.v10	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	173
h2B9.v23	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	179
h2B9.v37	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	185
h2B9.v56	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	191
h2B9.v76	H	I	Y	-	W	D	D	D	T	R	Y	N	P	S	L	K	S	197
3F1 키메라	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	203
h3F1.v1	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	209

항제	H2																				서열 번호
	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65		
2D3 카메라	G	I	D	T	K	S	Y	N	Y	A	T	Y	Y	S	G	S	V	K	G	215	

도면1f

항제	H3												서열 번호
	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	
2G9 카메라	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	54
h2G9.K4G1.폴리쉬	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	60
h2G9.K4G1.v19	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	66
h2G9.K4G1.v25	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	72
h2G9.K4G1.v27	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	78
h2G9.K4G1.v37	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	84
h2G9.K4G1.v52	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	90
h2G9.K4G1.v55	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	96
h2G9.K4G1.v63	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	102
h2G9.K4G1.v64	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	108
h2G9.K4G1.v65	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	114
h2G9.K4G1.v67	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	120
h2G9.K4G1.v73	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	126
h2G9.K4G1.v75	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	132
h2G9.K4G1.v77	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	138
h2G9.K4G1.v80	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	144
h2G9.K4G1.v92	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	150
h2G9.K4G1.v19H/v55L	D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	156
2B9 카메라	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	T	Y	162
h2B9.v1	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	T	Y	168
h2B9.v10	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	174
h2B9.v23	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	180
h2B9.v37	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	186
h2B9.v56	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	192
h2B9.v76	R	D	H	G	Y	Y	W	--	--	F	D	Y	198
3F1 카메라	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	204
h3F1.v1	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	210
2D3 카메라	N	Y	G	N	Y	G	A	--	--	F	D	S	216

도면1g



도면2aa

		카바트#																																				카바트-CDRL1		코터아-CDRL1		접속-CDRL1		
		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	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
마우스/키메라 2G9	huk1TV	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	N	K	M	Y	L	A	N	Y	I	
h2G9 K4, 폴러리		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	N	W	Y
h2G9 K4.v19		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	W	Y
h2G9 K4.v52		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	L	I	Y	-	-	G	A	D	S	Y	M	N	N	W	Y
h2G9 K4.v55		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	L	I	Y	-	-	G	A	D	S	Y	M	N	N	W	Y
h2G9 K4.v73		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	W	Y
h2G9 K4.v19+h55L		D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	L	I	Y	-	-	S	G	D	S	Y	M	N	N	W	Y

도면 $2ab$

☐ 마우스 2G9 및 인간 컨센서스 IV (14) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

☐ 마우스 2G9 및 인간화 2G9 변이체 사이의 CDR 차이를 강조 표시함

[illegible]

카바트# 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트 - CDR L3
코티아 - CDR L3
접촉 - CDR L3

hukiv	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	T	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 1
마우스/키메라 2G9	E	D	E	D	A	A	T	V	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 3
h2G9 K4, 풀리커	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 5
h2G9 K4.v19	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 7
h2G9 K4.v52	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 9
h2G9 K4.v55	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 11
h2G9 K4.v73	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 13
h2G9 K4.v19H.v5L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	I	N	E	D	P	F	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 15

도면2ba

카바트#																																												
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	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40			
마우스/키메라2G9 h2G9.G1.폴리커 h2G9.G1.v19 h2G9.G1.v52 h2G9.G1.v55 h2G9.G1.v73 h2G9.K4.v19H.v55L	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	S	Y	I	H	-	-	W	V	R	Q	A		
	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
	E	V	Q	I	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
*																																												
																															카바트 - CDR H1													
																															코티아 - CDR H1													
																															접속 - CDR H1													

카바트# 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81

코티아 - CDR H2
카바트 - CDR H2
결속 - CDR H2

hum I P Q Q G L E W I G N I N P G S G N T N Y A Q K F Q G R V T I T R D T S T S T A Y L E
 마우스/키메라 2G9 [Q] G [K] S I L E W I G V I S C Y N G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S [S] T T A Y L E
 h2G9.G1.폴리쉬 P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E
 h2G9.G1.v19 P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E
 h2G9.G1.v52 P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E
 h2G9.G1.v55 P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E
 h2G9.G1.v73 P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E
 h2G9.K4.v19H/55L P G Q G L E W I G V I S S Y G G A T T Y N Q K F K G R V T I T V D K S T S T A Y L E

카바트# 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

카바트 - CDR H3
코티아 - CDR H3
결속 - CDR H3

hum I L S S I L R S E D T A V Y Y C A R [G] - - - - - F D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 2
 마우스/키메라 2G9 [F] W [S] L [T] S E D [S] A V Y Y C A R D G N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 4
 h2G9.G1.폴리쉬 L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 6
 h2G9.G1.v19 L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 8
 h2G9.G1.v52 L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 10
 h2G9.G1.v55 L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 12
 h2G9.G1.v73 L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 14
 h2G9.K4.v19H/55L L S S I L R S E D T A V Y Y C A R D S N Y G E A Y A M D Y W G Q G T L V T V S S 서열번호 16

□ 마우스 2G9 및 인간 컨센서스 하위군 I (25) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함
 □ 마우스 2G9 및 인간화 2G9 변이체 사이의 CDR 차이를 강조 표시함

도면 2bb

도면3a

☐ 마우스 2B9 및 인간 컨센서스 카파 I (24) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

마우스 2B9 및 인간화 2B9 변이체 사이의 CDR 차이를 강조 표시함

키보드# 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 A B C D 28 29 30 31 32 33 34 35 36

카바트-CDRL1	
코티아-CDRL1	

huk1	m289	7) m289	12B9 v76a
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q - - - S I S M Y L A M Y	D I V L T Q S P A I M S A S A S V G E K V T M T C S A S S - - - S V F Y M H W Y	D I V L T Q S P A I M S A S A S V G E K V T M T C S A S S - - - S V F Y M H W Y	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S S - - - S V F Y M H W Y

37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76

카바트 - CDR L2	접촉 - CDR L2
코티아 - CDR L2	

hukl	m289	2B9	2B9.v70a
Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P P R F S G S G T D T L	Q Q K S G T S P K F T W I Y D T S K L A S G V P R F S G S G T S Y S L I	Q Q K S G T S P K F T W I Y D T S K L A S G V P R F S G S G T S Y S L I	Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P P R F S G S G T D T L

77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카버트 - CDR L3
코티아 - CDR L3
접촉 - CDR L3

hukki	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 17
m2B9	N	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	F	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 18
7) 메라 2B9	N	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	F	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 21
12B3.V70a	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	F	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 23

[illegible]

도면4a

마우스 3F1 및 인간 컨센서트 카파 I (24) 사이의 포테임워크 차이를 강조 표시함

[illegible]

도면4b

☐ 무린 3F1 및 인간 컨센스 하위군 III (34) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

카바트#	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	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40				
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	A	S	G	F	T	F	S	S	S	Y	A	M	S	M	N	M	N	V	R	Q	A	A
m3F1	Q	V	V	Q	L	V	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	G	A	P	V	E	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	-	-	W	V	K	Q	R	R	
키메라3F1	Q	V	V	Q	L	V	Q	P	G	A	E	L	V	K	P	G	G	A	P	V	E	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	-	-	W	V	K	Q	R	R	
h3F1.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	S	W	M	N	-	-	W	V	R	Q	A	A		
카바트#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81				
hum III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	Y	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q			
m3F1	P	G	K	R	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	S	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	I	E			
키메라3F1	P	G	K	R	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	S	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	I	E			
h3F1.v1	P	G	K	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	D	S	S	E	T	H	Y	N	Q	K	F	K	D	R	A	T	I	S	V	D	K	S	K	N	T	A	Y	L	Q			
카바트#	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	103	104	105	106	107													
hum III	M	N	S	I	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 18														
m3F1	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 26												
키메라3F1	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 28												
h3F1.v1	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	S	S	Y	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 30												

카바트# 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 A B C D 28 29 30 31 32 33 34 35 36

카바트-CDRL1																																			
코티아-CDRL1																																			
접속-CDRL1																																			

huK1
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q - - - S I S M Y L A W Y
D I Q M T Q T P S S L S V S I I G D R V S I T C K S S E - - - Y V S N A L S W Y
* I Q M T Q E P S S L S V S I I G D R V S I T C K S S E - - - Y V S N A L S W Y
* *

웹스터 2D3
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q - - - S I S M Y L A W Y
D I Q M T Q T P S S L S V S I I G D R V S I T C K S S E - - - Y V S N A L S W Y
* I Q M T Q E P S S L S V S I I G D R V S I T C K S S E - - - Y V S N A L S W Y
* *

키메라 2D3
* *

카바트# 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76

카바트-CDRL2																																			
코티아-CDRL2																																			
접속-CDRL2																																			

huK1
Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S I E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
Q Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
Q Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
* Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
* *

웹스터 2D3
Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S I E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
Q Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
Q Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
* Q K S G K A P K L L I V S S G F N K L E D G V P S R F S G S G S G T Q F S L E I S
* *

키메라 2D3
* *

카바트# 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

카바트-CDRL3																																			
코티아-CDRL3																																			
접속-CDRL3																																			

huK1
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R 서열번호 17
웹스터 2D3 S L E A D D S G I Y F C Q Q G Y D I P - T F G Q G T K V E I K R 서열번호 31
키메라 2D3 S L E A D D S G I Y F C Q Q G Y D I P - T F G Q G T K V E I K R 서열번호 33
* S L E A D D S G I Y F C Q Q G Y D I P - T F G Q G T K V E I K R 서열번호 33

도면5a

☐ 웹스터 2D3 및 인간 컨센스 카파 I (21) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

도면5b

☐ 램스터 2D3 및 인간 컨센스 하위군 III (17) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

카바트#	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	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	N	S	W	N	W	V	R	Q	A
람스터 2D3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	N	S	W	N	W	V	R	Q	A
키메라 2D3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	N	S	W	N	W	V	R	Q	A
	*																																								*	
카바트#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
hum III	P	G	K	G	L	E	N	V	S	V	I	S	G	-	-	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
람스터 2D3	P	G	K	G	L	E	N	V	S	V	I	S	G	-	-	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
키메라 2D3	P	G	K	G	L	E	N	V	S	V	I	S	G	-	-	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
	*																																								*	
카바트#	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102	103	104	105	106	107							
hum III	I	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 18							
람스터 2D3	I	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 32							
키메라 2D3	I	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	서열번호 34							
	*																																								*	

도면6aa

마우스/키메라 2B9	카바트#																																								
	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 A B C D 28 29 30 31 32 33 34 35 36																																								
	huK1																																								
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	I
	D	I	V	I	T	Q	S	P	A	I	M	I	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y	
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	S	A	S	S	-	-	-	-	S	V	F	Y	M	H	W	Y		
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
* *																																									
*																																									

도면6ab

☐ 마우스/인간화 2B9 및 인간 컨센서스 카파 I 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함
☐ 마우스 2B9 및 인간화 2B9 변이체 사이의 CDR 차이를 강조 표시함

카바트#	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
huK1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
마우스/카바트 2B9	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v10	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v23	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v37	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v56	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
h2B9.v76	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	T	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S
	*							*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							*		*		*	*	*	*	*	*	*	*		
카바트#	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108								
huK1	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	Y	W	S	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 17						
마우스/카바트 2B9	N	W	E	A	E	D	A	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 35							
h2B9.v1	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 37							
h2B9.v10	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 39							
h2B9.v23	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 41							
h2B9.v37	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 43							
h2B9.v56	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 45							
h2B9.v76	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	W	S	S	D	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열번호 47							
	*												*																											

도면6ba

카바트#																																												
	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	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40		
마우스/기메라2B9	카바트-CDRH1																																											
	코티아-CDRH1																																											
	접촉-CDRH1																																											
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	M	W	V	R	Q	A		
h2B9.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
h2B9.v10	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
h2B9.v23	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
h2B9.v37	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
h2B9.v56	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
h2B9.v76	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	F	S	G	F	L	L	S	T	S	G	M	G	V	S	W	V	R	Q	A		
*																																												
*																																												

도면7a

카바트#	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	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	카바트-CDRL1																																									
	코타아-CDRL1																																									
	접속-CDRL1																																									
huK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	-	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	
m2G9	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	T	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
h2G9.K1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
huK1V	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	M	M	K	N	Y	L	A	W	Y
m2G9	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
h2G9.K4	D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	A	S	Q	S	V	D	Y	-	-	D	G	D	S	Y	M	N	W	Y
	*																																									*

도면7b

☐ 무린 2G9 및 인간 켄센스 카파 I (20) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

☐ 무린 2G9 및 인간 켄센스 카파 IV (14) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

카바트#	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
huK1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	V	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
m2G9	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	I	V	A	A	S	S	N	L	E	S	G	T	P	A	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I	N	I	H	P	V
h2G9.K1	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	V	A	A	S	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	
huK1V	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	I	V	W	A	S	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	
m2G9	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	I	V	A	A	S	S	N	L	E	S	G	T	P	A	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I	N	I	H	P	V
h2G9.K4	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	I	V	A	A	S	S	N	L	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	

카바트#	79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
huK1	Q P E D F A T Y Y C Q Q Y I N S L P W T F G Q G T K V E I K R
m2G9	E E E D A A T Y Y C Q Q Y I N E D P F T F G Q G T K V E I K R
h2G9.K1	Q P E D F A T Y Y C Q Q Y I N E D P F T F G Q G T K V E I K R
huK1V	Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T F G Q G T K V E I K R
m2G9	E E E D A A T Y Y C Q Q Y I N E D P F T F G Q G T K V E I K R
h2G9.K4	Q A E D V A V Y Y C Q Q Y I N E D P F T F G Q G T K V E I K R

카바트-CDR L3

코티아-CDR L3

접촉-CDR L3

서열번호 217

서열번호 218

서열번호 219

서열번호 1

서열번호 3

서열번호 220

도면 8a

카바트#	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	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40
hum I	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	I	H	-	-	W	V	R	Q	A	
m2G9	E	V	Q	L	Q	S	G	E	V	V	K	T	G	A	S	V	K	T	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A		
h2G9 G1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	M	W	V	R	Q	A	
m2G9	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	E	V	V	K	T	G	A	S	V	K	T	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
h2G9 G3	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	
	*																				*																*			*		

도면8b

카바트#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81

카바트# 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

	카바트 - CDR H3																																							
	코리아 - CDR H3																																							
	접속 - CDR H3																																							
hum I	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	서열번호 2			
m2G9	[E]	N	S	L	[T]	S	E	D	[S]	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	[S]	L	T	V	S	S	서열번호 4
h2G9.G1	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	서열번호 221
hum III	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	-	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	서열번호 222			
m2G9	[F]	N	S	L	[T]	S	E	D	[S]	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	[S]	L	T	V	S	S	서열번호 223
h2G9.G3	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	서열번호 224
	*														*												*				*						*			

- ☐ 무린 2G9 및 인간 컨센서스 하위군 I (25) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함
- ☐ 무린 2G9 및 인간 컨센서스 하위군 III (34) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함
- ☐ 인간화 2G9 및 인간 컨센서스 하위군 I (2) & III (4) 사이의 프레임워크 차이를 강조 표시함

도면9

L1/L2 소프트웨어

ID	CDR-L1											CDR-L2										
	24	25	26	27	A	B	C	D	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56
h2G9/K4G1.폴리쉬	K	A	S	Q	S	V	D	Y	S	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	S
h2G9/K4G1.v27	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	S
h2G9/K4G1.v52	K	A	S	Q	S	L	I	Y	G	A	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9/K4G1.v55	K	A	S	Q	S	L	D	Y	H	Y	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	S	
h2G9/K4G1.v63	K	A	S	Q	S	V	D	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	L	E	T	
h2G9/K4G1.v64	K	A	S	Q	S	V	D	Y	Y	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	S
h2G9/K4G1.v67	K	A	S	Q	S	L	D	Y	W	V	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9/K4G1.v77	K	A	S	Q	S	V	D	Y	G	G	D	S	Y	M	N	A	A	S	N	R	E	T
h2G9/K4G1.v80	K	A	S	Q	S	V	D	Y	F	A	E	S	Y	M	N	A	A	S	Y	R	E	S

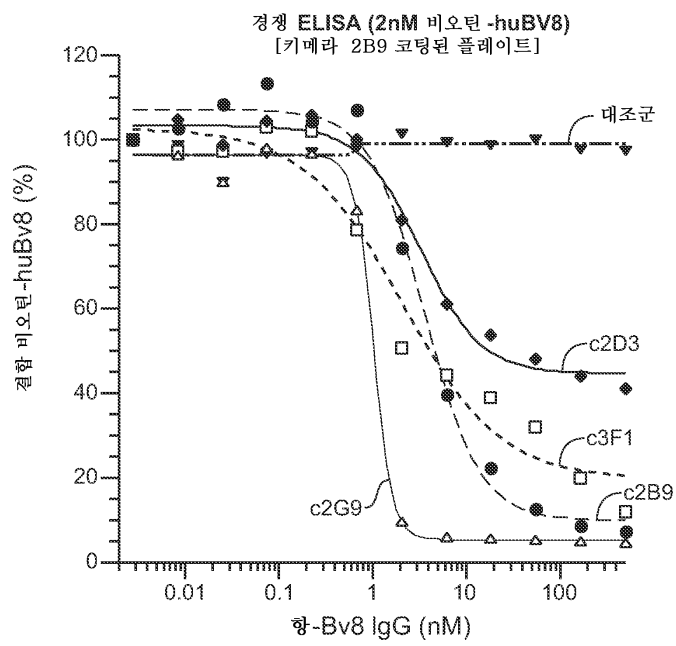
L1/L2 소프트웨어

ID	CDR-L3										
	89	90	91	92	93	94	95	96	97		
h2G9/K4G1.폴리쉬	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v27	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v52	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v55	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v63	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v64	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v67	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v77	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		
h2G9/K4G1.v80	Q	Q	I	N	E	D	P	F	T		

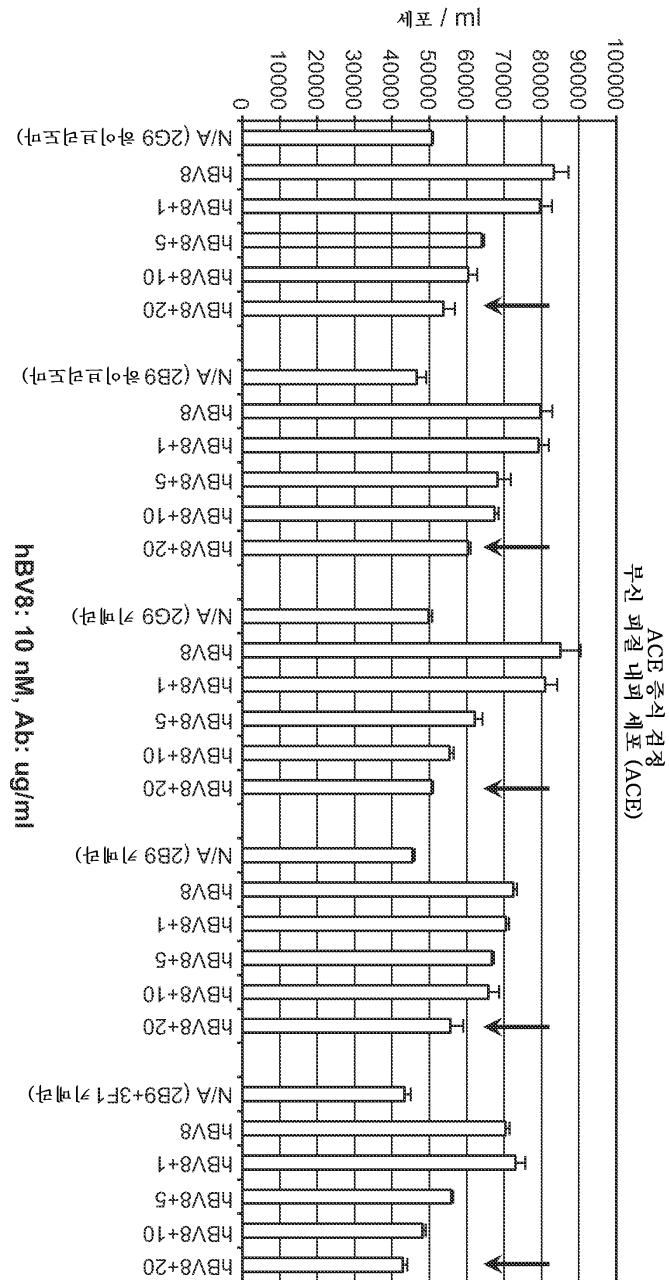
도면10

H1/H2 소프트웨어 라이브러리																															
ID		CDR-H1															CDR-H2														
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65			
h2G9.K4G1.폴리머		G	Y	S	F	T	D	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v19		G	Y	S	L	T	N	Y	D	M	H	Y	I	H	S	Y	S	G	S	T	L	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v25		G	Y	S	L	F	H	Y	D	M	H	Y	I	S	T	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v37		G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	Y	I	S	T	Y	A	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v65		G	Y	T	F	M	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	T	G	S	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v73		G	Y	S	F	T	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	L	G	A	T	I	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v75		G	Y	T	F	P	I	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v77		G	Y	T	F	T	E	Y	D	M	H	Y	I	T	T	Y	S	G	A	T	T	Y	N	Q	K	F	K	G			
h2G9.K4G1.v92		G	Y	S	F	V	H	Y	D	M	H	Y	I	S	S	Y	S	G	A	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G			
H1/H2 소프트웨어 라이브러리																															
ID		CDR-H3																													
		95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	101	102																		
h2G9.K4G1.폴리머		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v19		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v25		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v37		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v65		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v73		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v75		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v77		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		
h2G9.K4G1.v92		D	S	N	Y	G	E	A	Y	A	M	D	Y																		

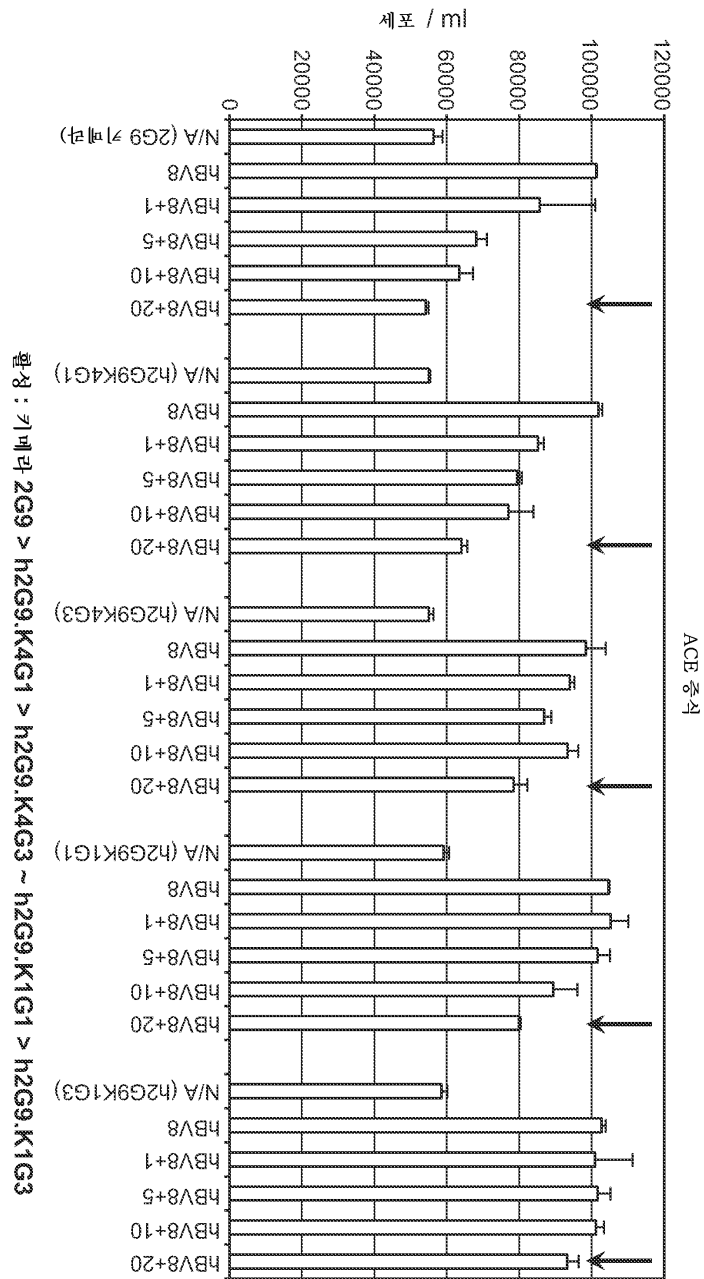
도면11



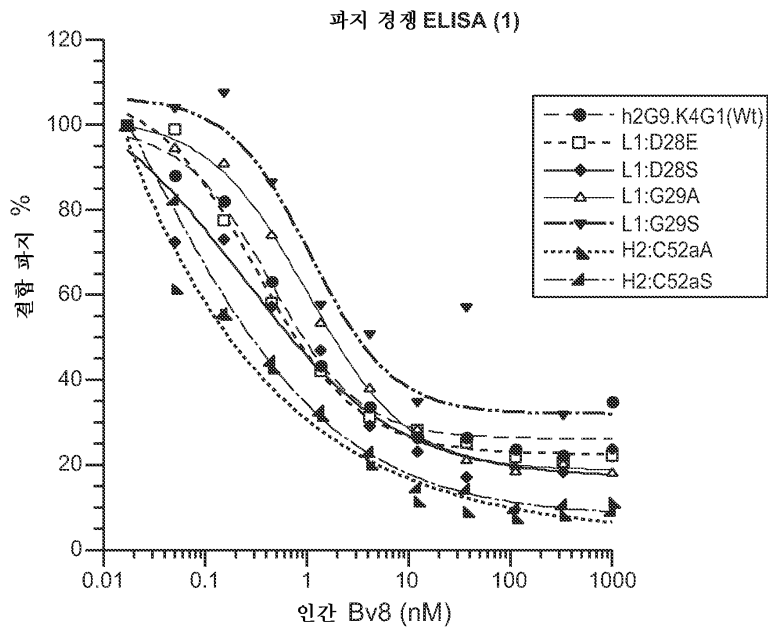
도면12



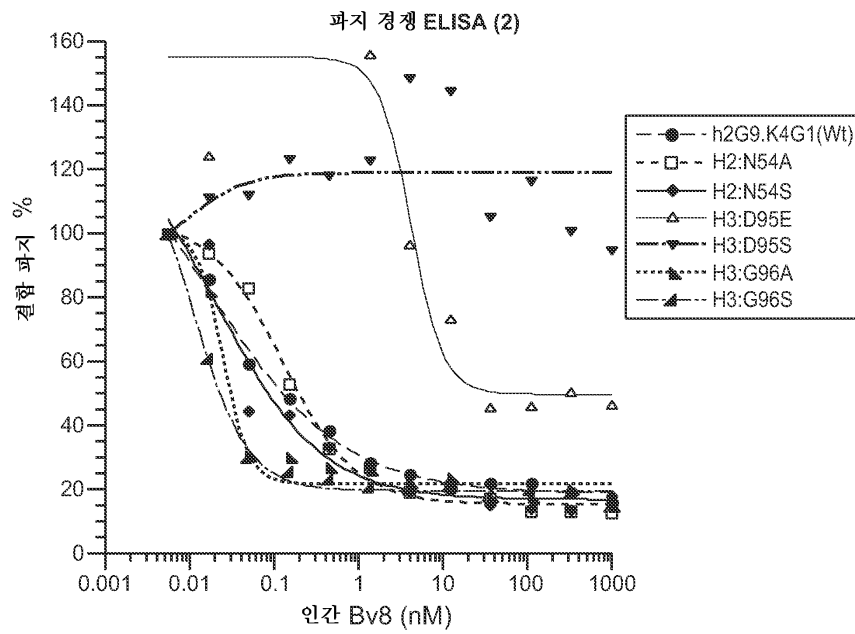
도면13



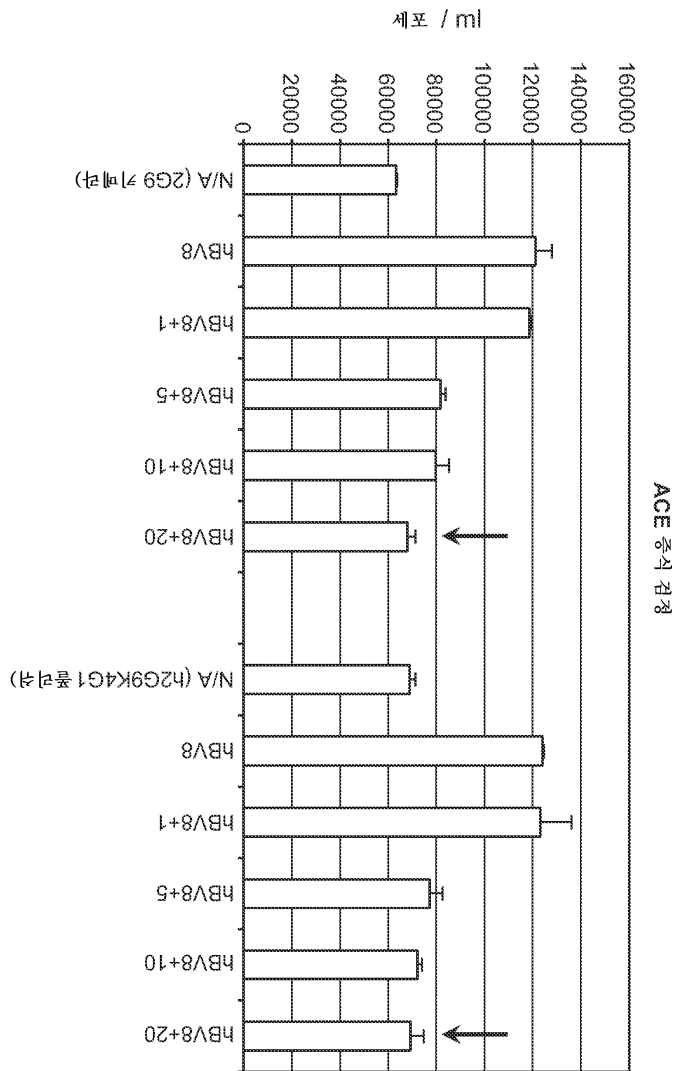
도면14a



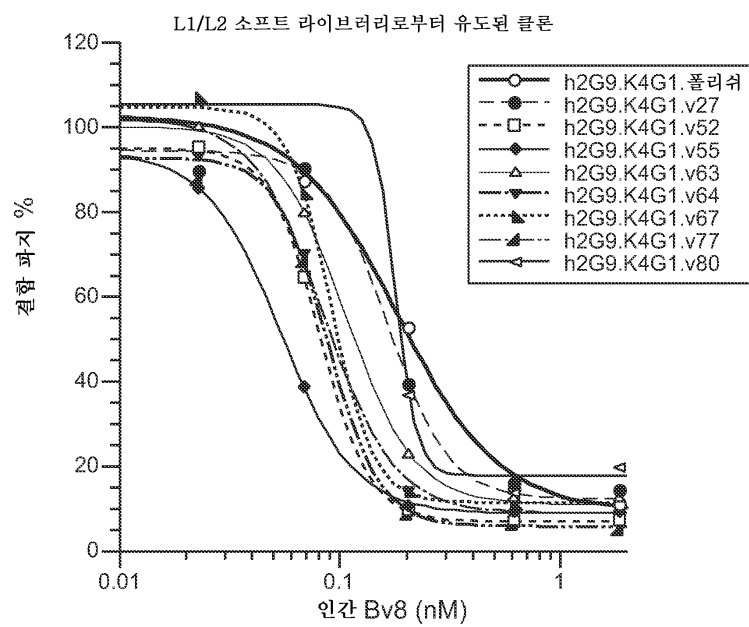
도면14b



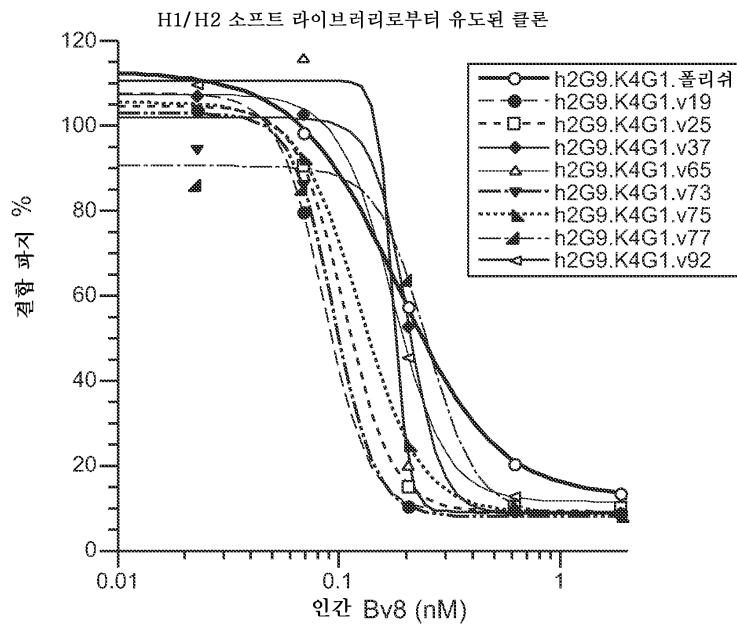
도면15



도면16



도면17



도면18

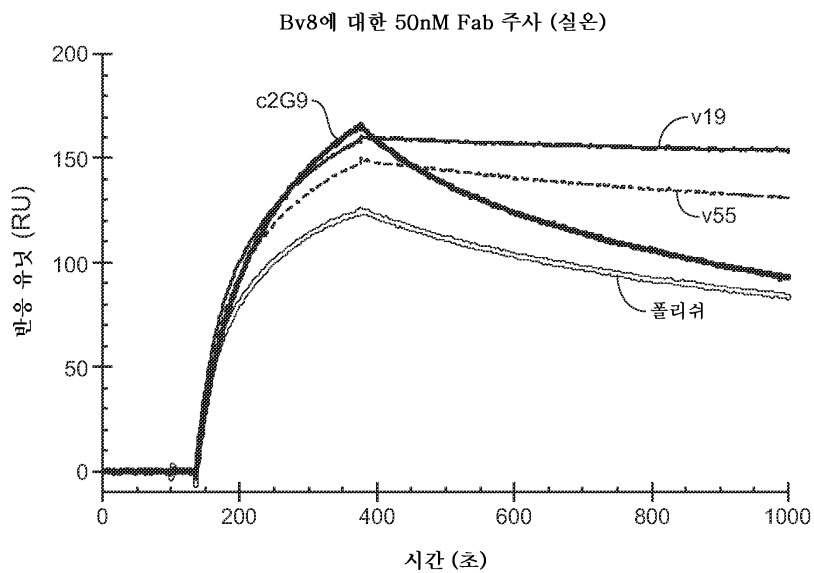
분석물	인간 Bv8 (N=3)		
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$
h2G9.K4G1.폴리쉬	4.75 ± 0.45	6.89 ± 1.13	1.44 ± 0.11
h2G9.K4G1.v19	4.71 ± 0.21	0.38 ± 0.02	0.08 ± 0.01
h2G9.K4G1.v52	4.43 ± 0.49	1.19 ± 0.32	0.27 ± 0.04
h2G9.K4G1.v55	4.84 ± 0.29	1.36 ± 0.06	0.28 ± 0.01
h2G9.K4G1.v73	3.52 ± 0.21	0.50 ± 0.01	0.14 ± 0.01

도면19

인간화 항-Bv8 클론	인간 Bv8				시노물구스 Bv8			
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$		$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$	
V19 Fab	3.59	0.16	0.04		2.67	0.28	0.10	
V55 Fab	3.96	0.72	0.18		3.1	1.29	0.42	
인간화 항-Bv8 클론	인간 Bv8				시노물구스 Bv8			
	$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$		$k_{on}(10^5 M^{-1} S^{-1})$	$k_{off}(10^{-4} S^{-1})$	$K_D(nM)$	
V19 IgG	7.60	2.05^*	2.007^*		5.01	2.05^*	2.009^*	
V55 IgG	9.5	2.05^*	2.005^*		7.8	2.05^*	2.006^*	

* 25°C에서 30분 동안 관찰된 이탈 속도 상수는 기기 (비아코이 3000)의 검출 한도 또는 그 부근이었으며; 따라서, 보고된 K_{off} 및 K_D 는 상한값이다.

도면20



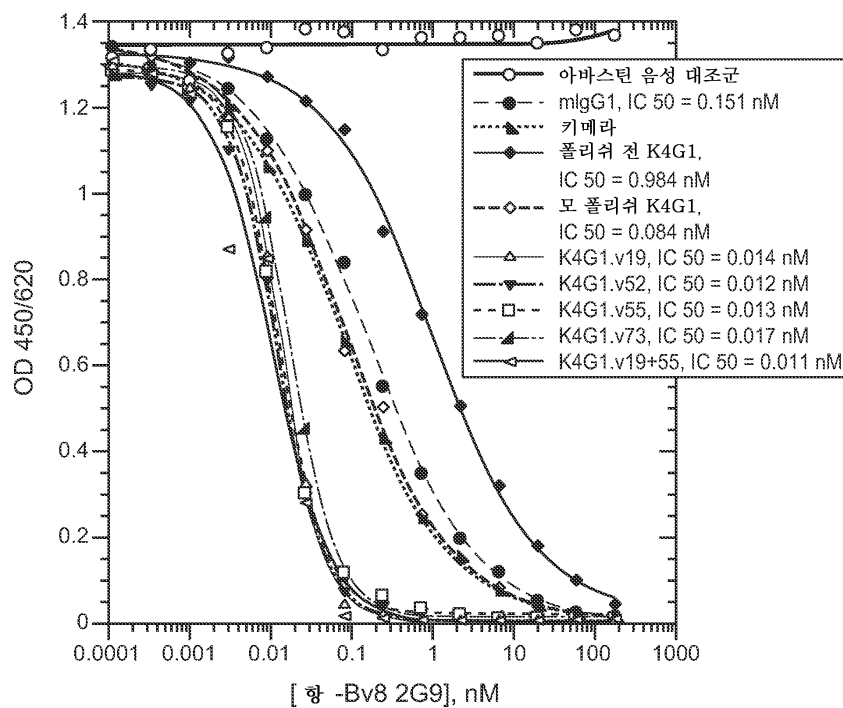
도면21

2G9 변이체 IgG 비아코어 분석

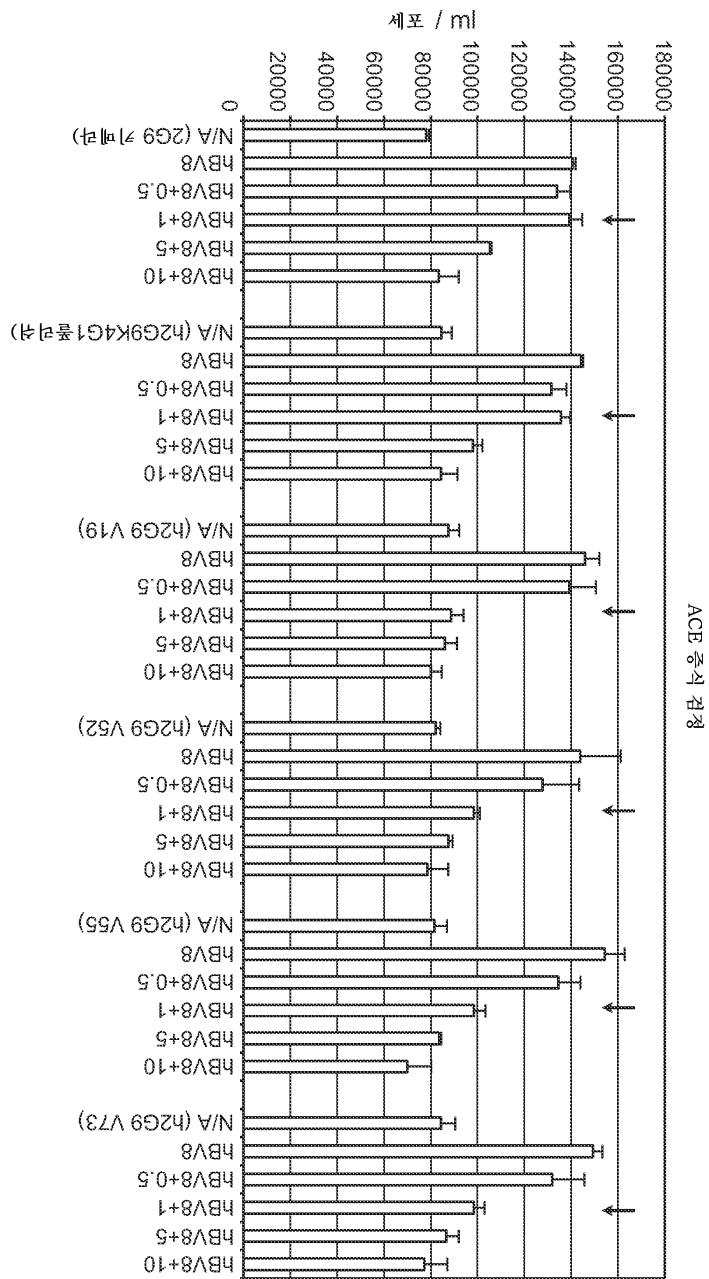
인간화 항-BV8 클론	인간 BV8				시노물구즈 BV8			
	k_{on} ($10^5 M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} ($10^{-4} s^{-1}$)	K_D (nM)		k_{on} ($10^5 M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} ($10^{-4} s^{-1}$)	K_D (nM)	
키메라 2G9	7.58	0.18	0.02		6.46	0.25	0.04	
h2G9.K4G1.폴리쉬	5.28	0.12	0.02		4.54	0.15	0.03	
h2G9.K4G1.V19	7.60	20.05 *	20.007 *		5.01	20.05 *	20.009 *	
h2G9.K4G1.V55	9.45	20.05 *	20.005 *		7.75	20.05 *	20.006 *	

* 25℃에서 30분 동안 관찰된 이탈 속도 상수는 기가 (비아코어 3000)의 검출 한도 또는 그 부근이었으며, 따라서, 보고된 K_D 및 k_{off} 는 상한값이다.

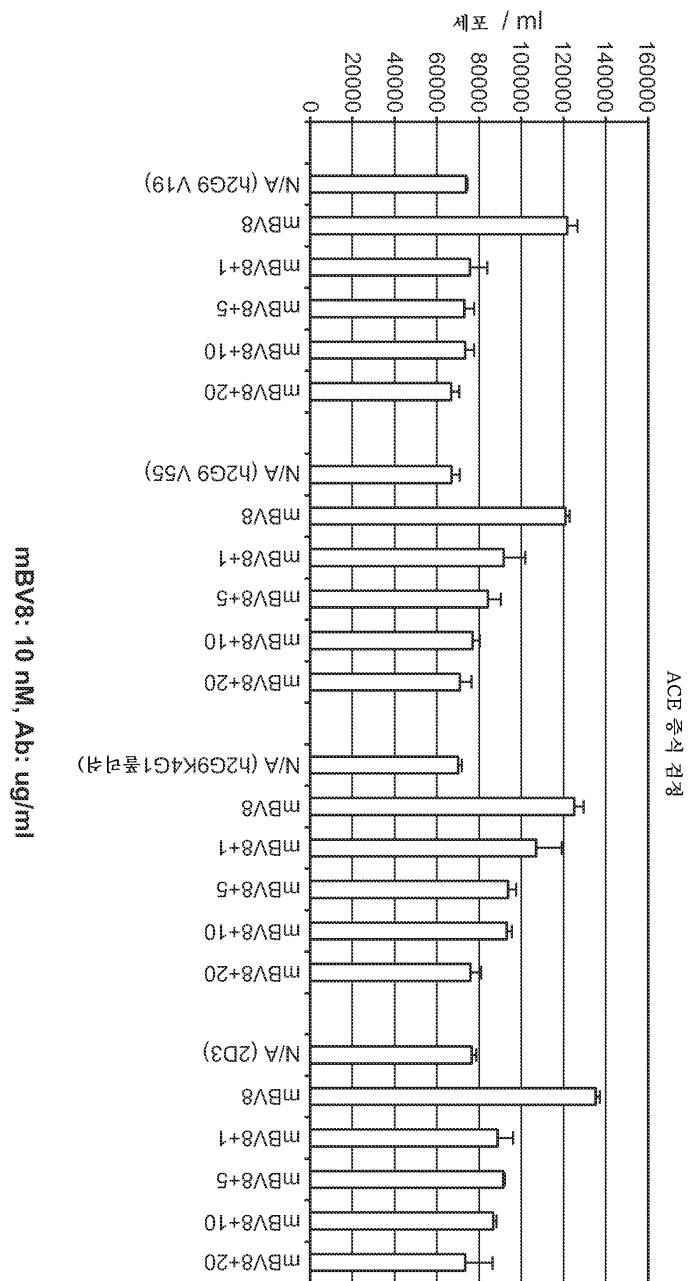
도면22



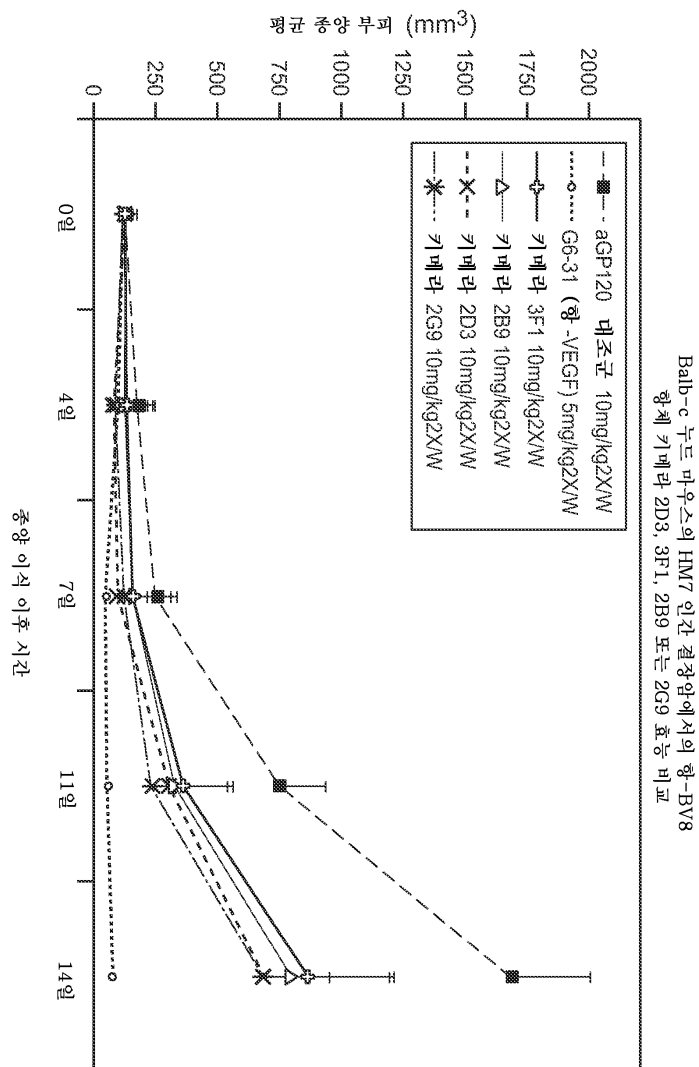
도면23



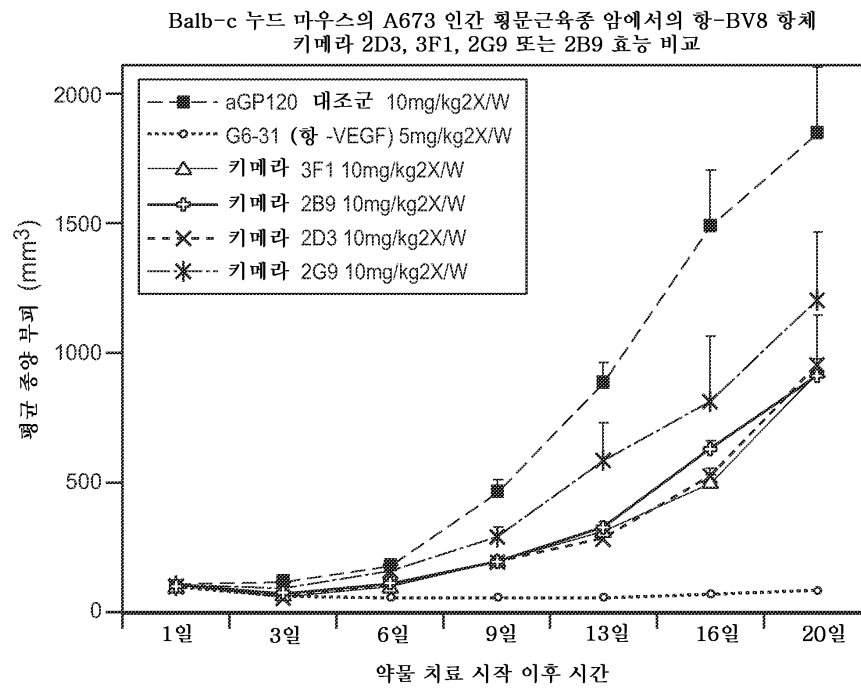
도면24



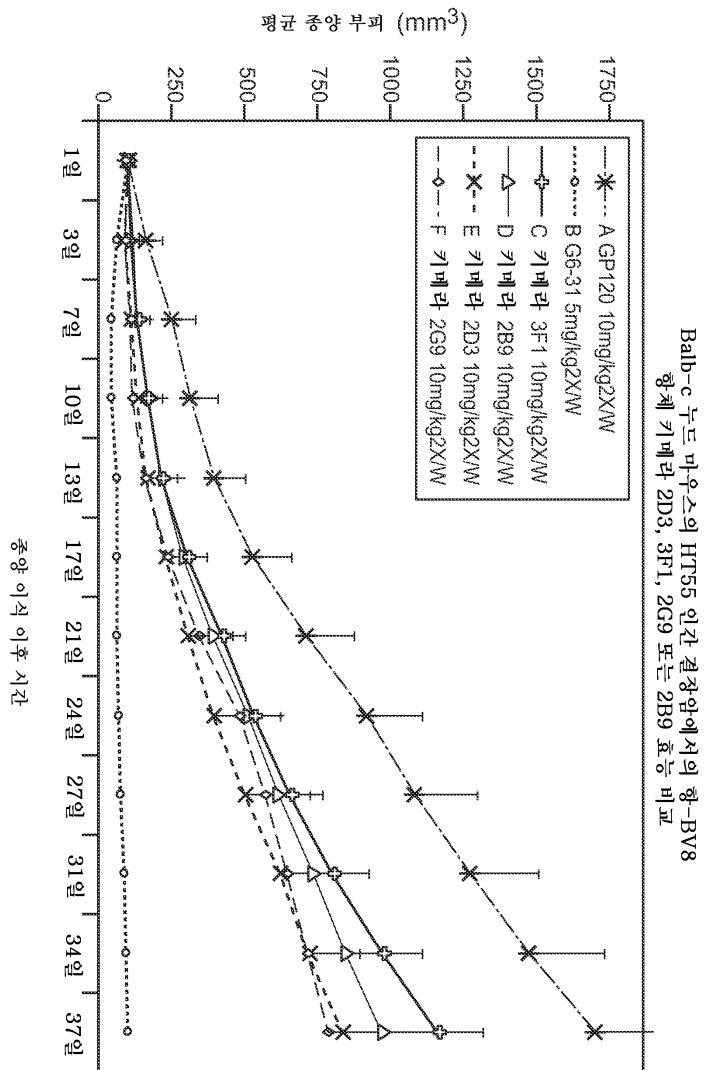
도면25



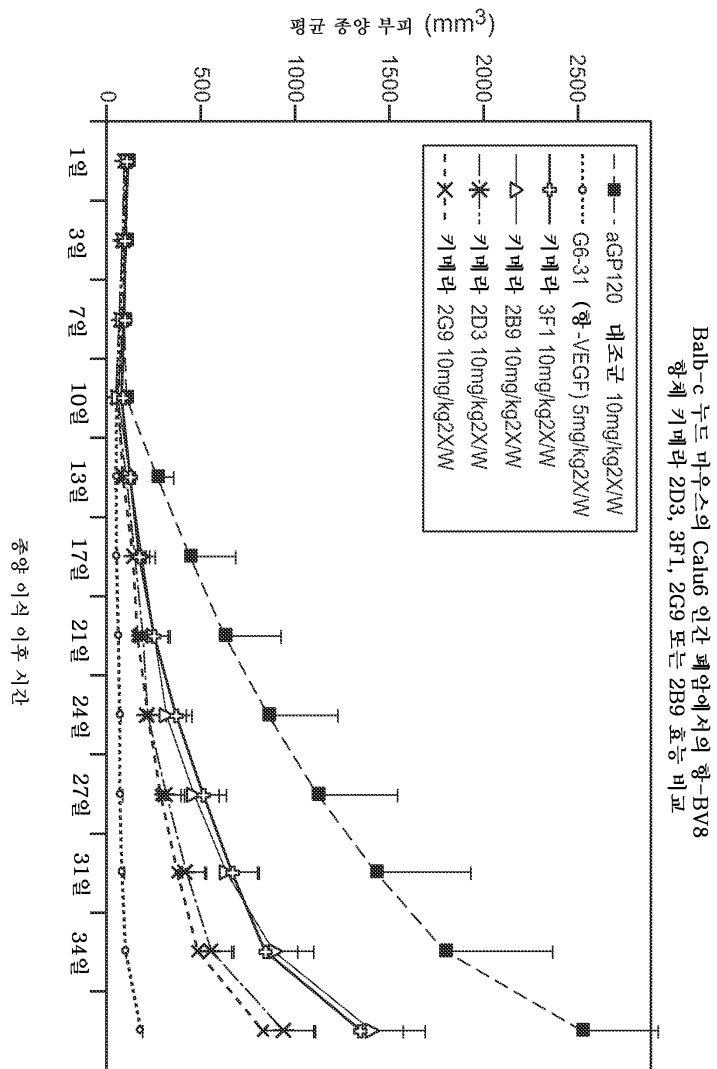
도면26



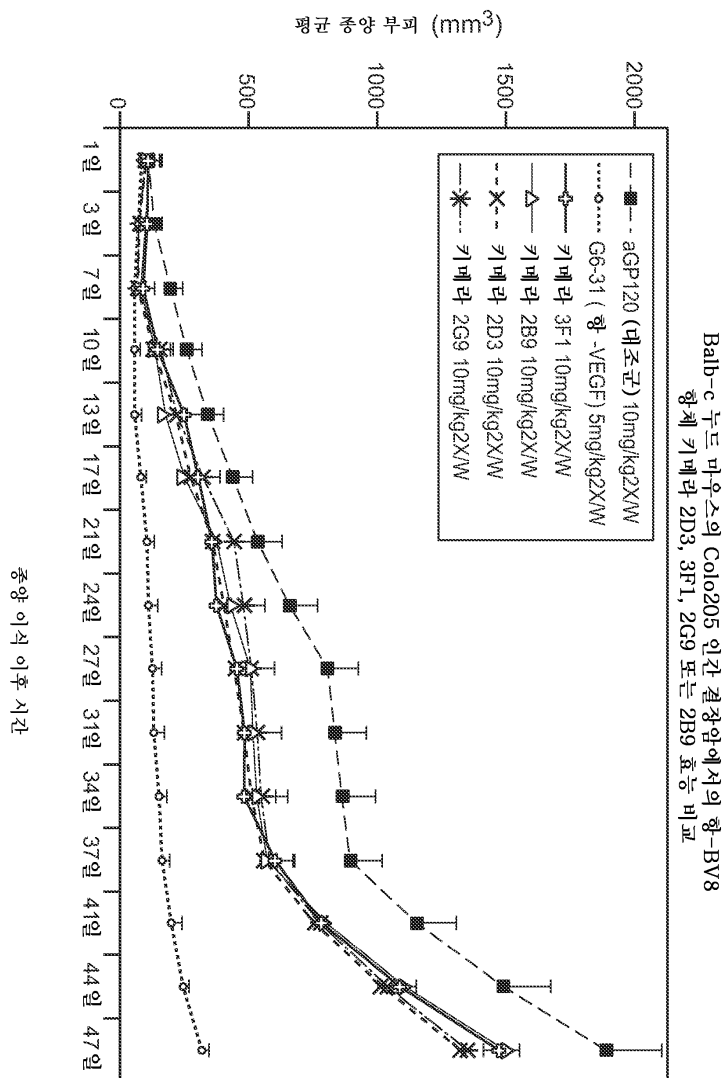
도면27



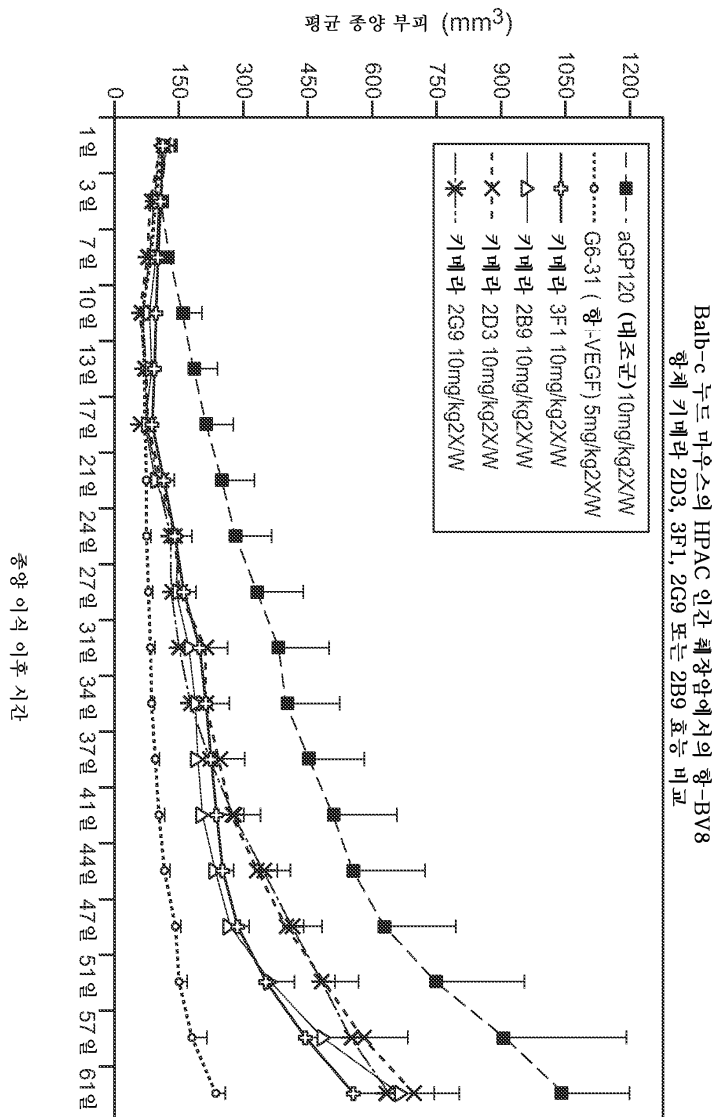
도면28



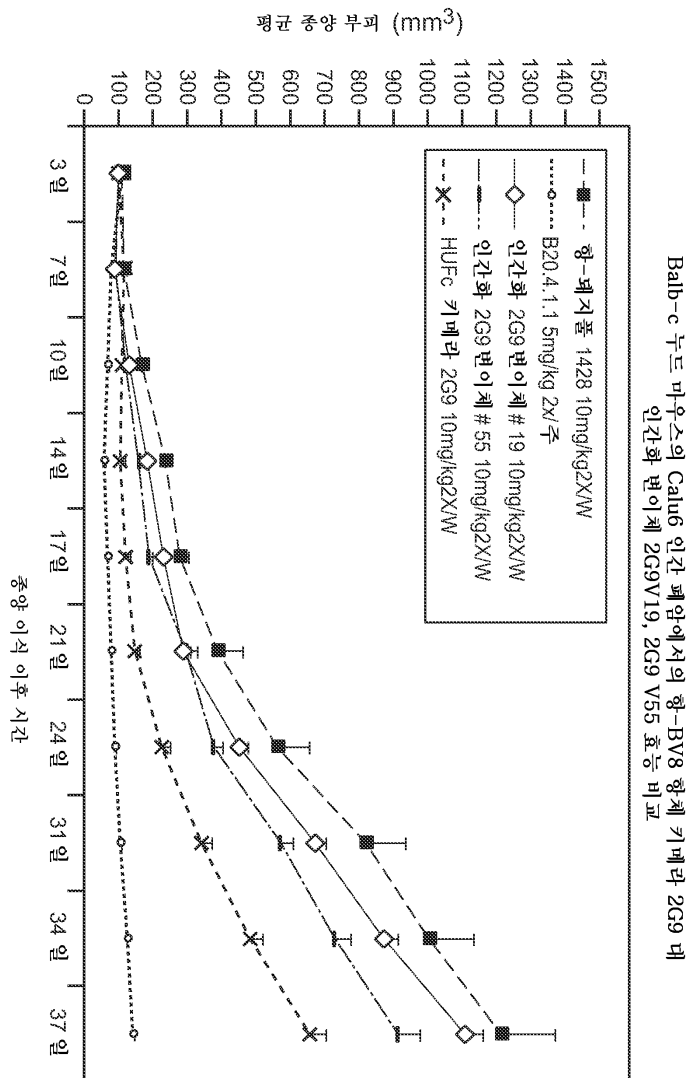
도면29



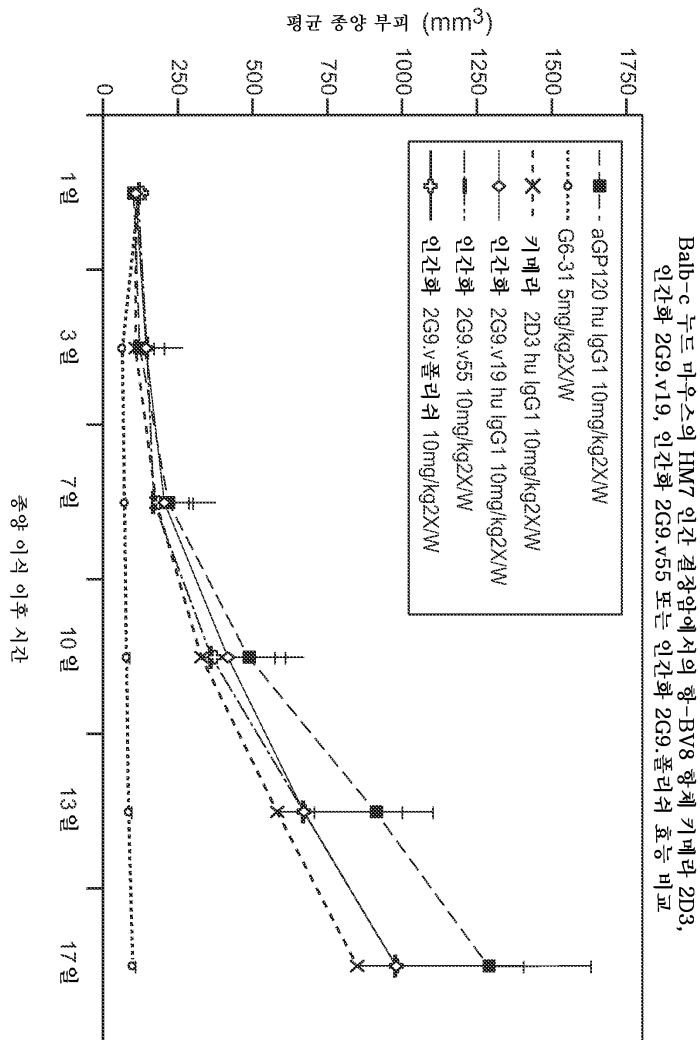
도면30



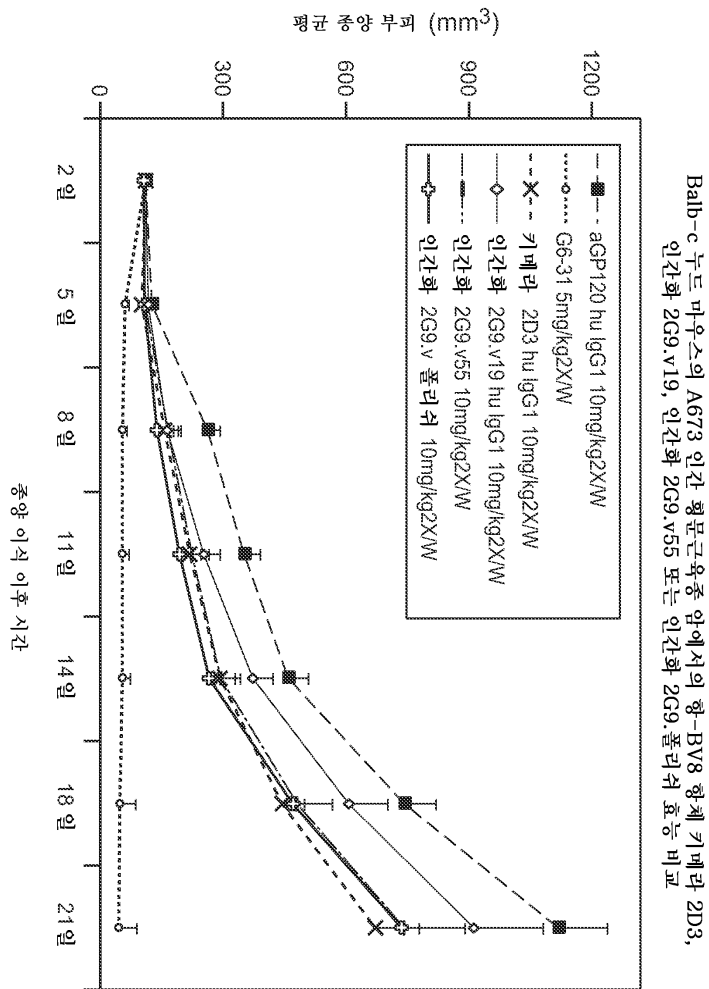
도면31



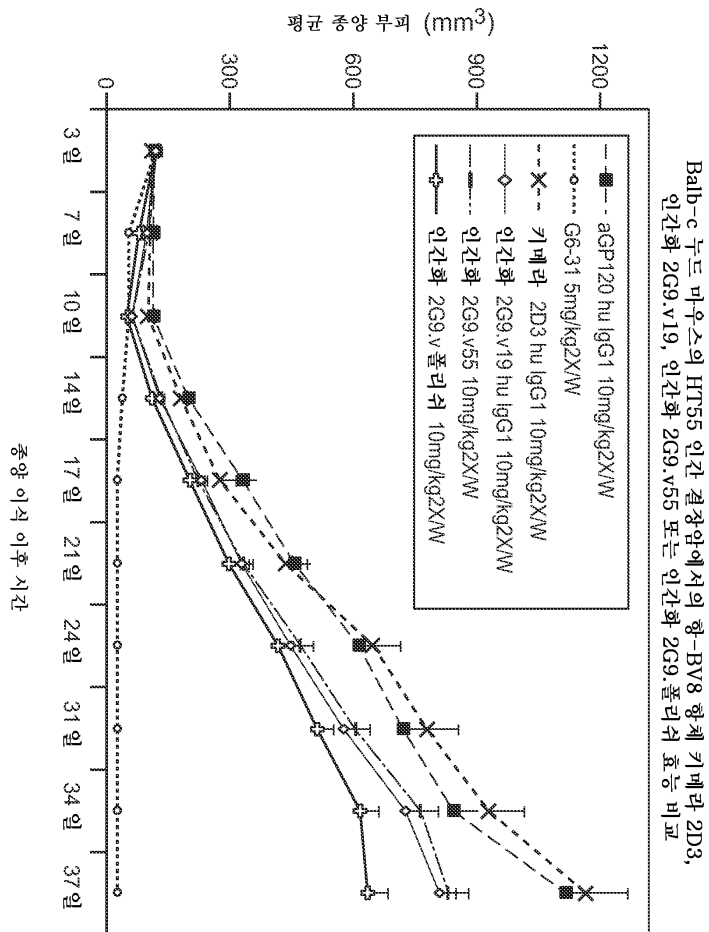
도면32



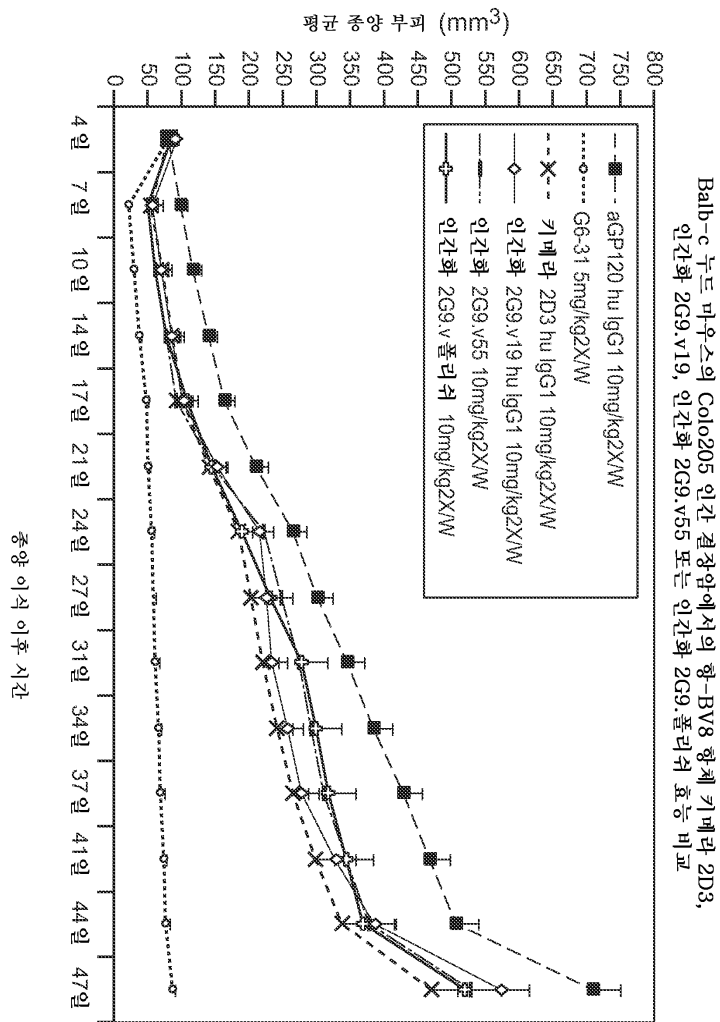
도면33



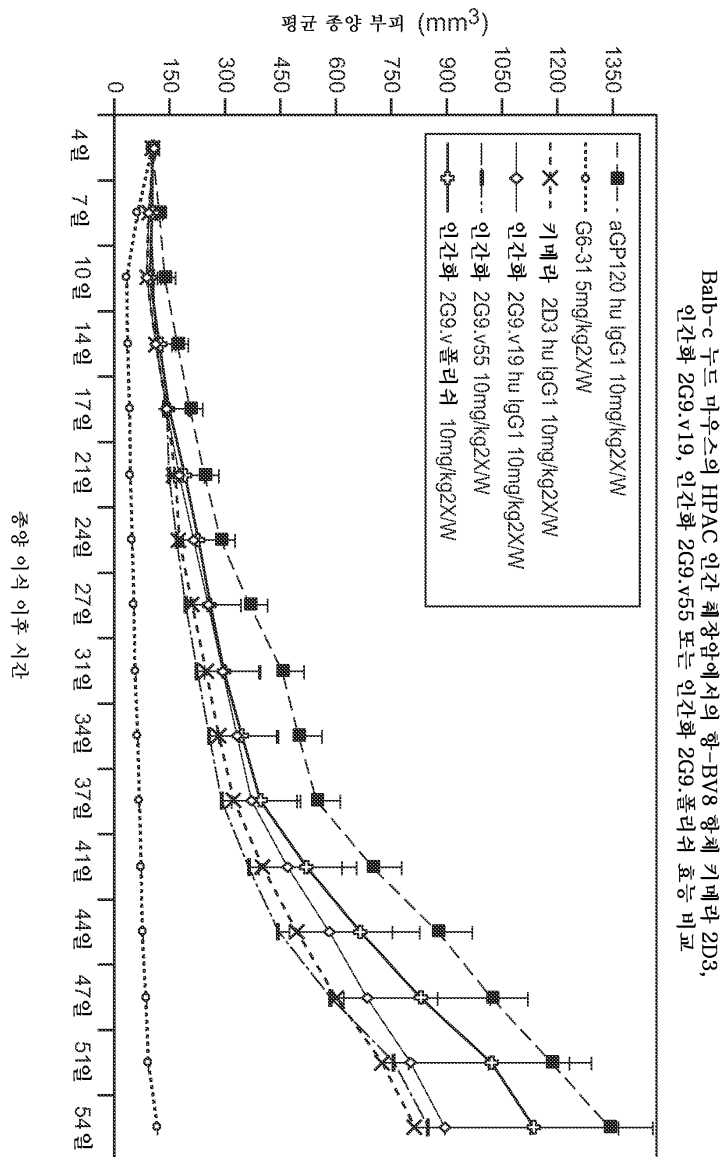
도면34



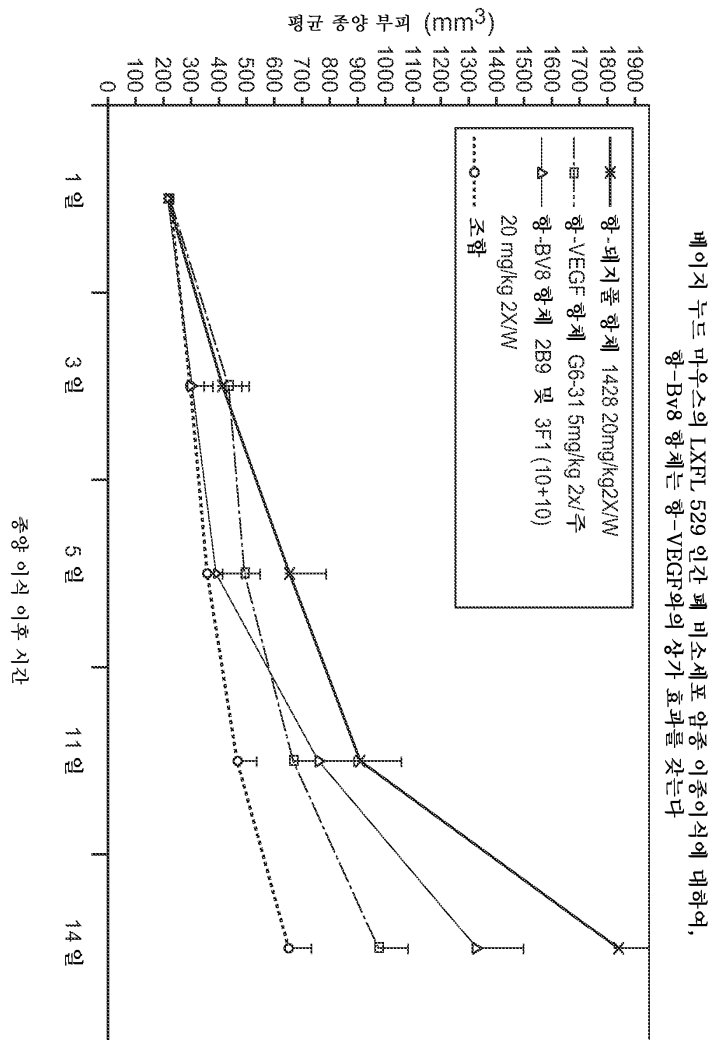
도면35



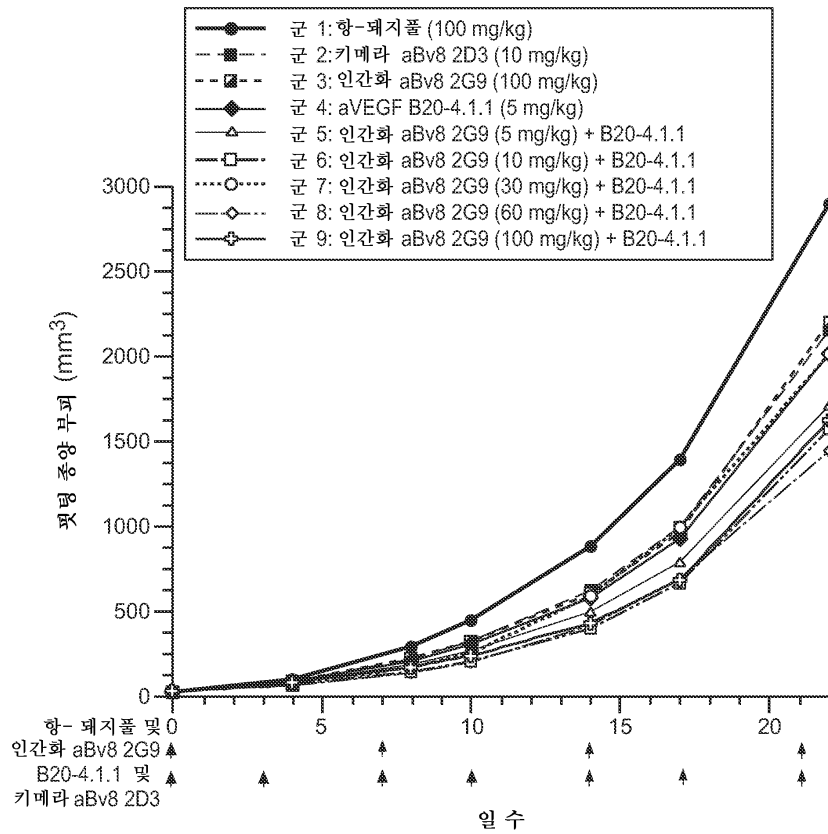
도면36



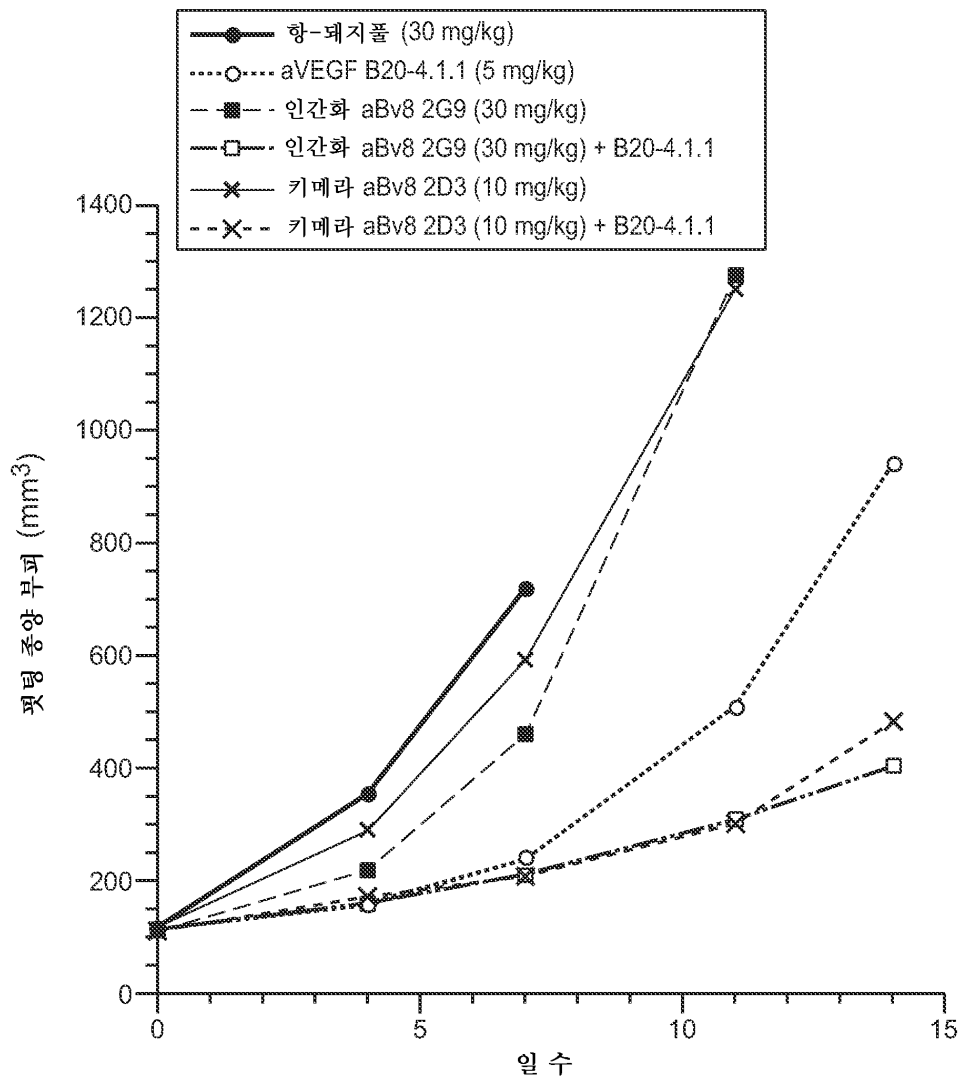
도면37



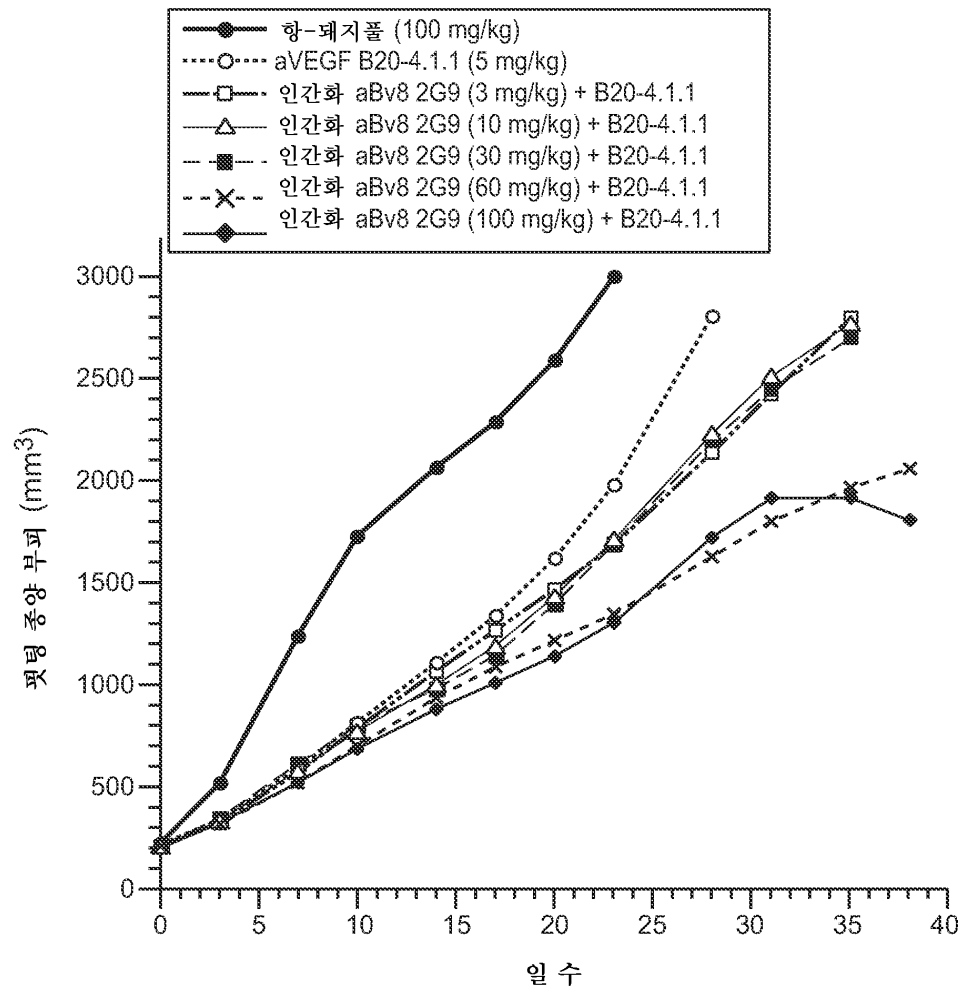
도면38



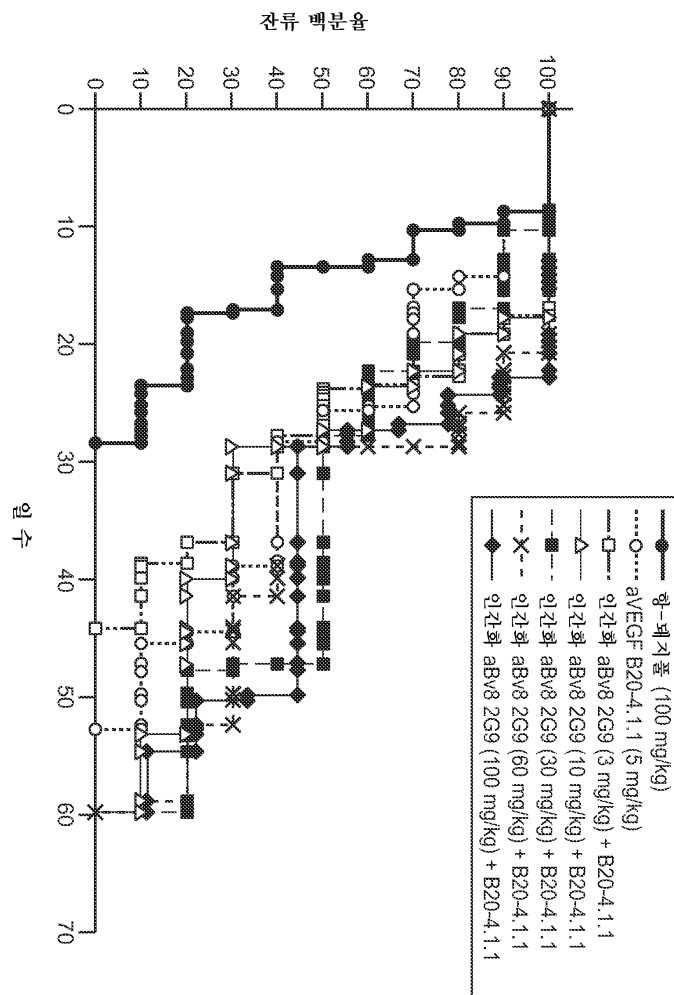
도면39



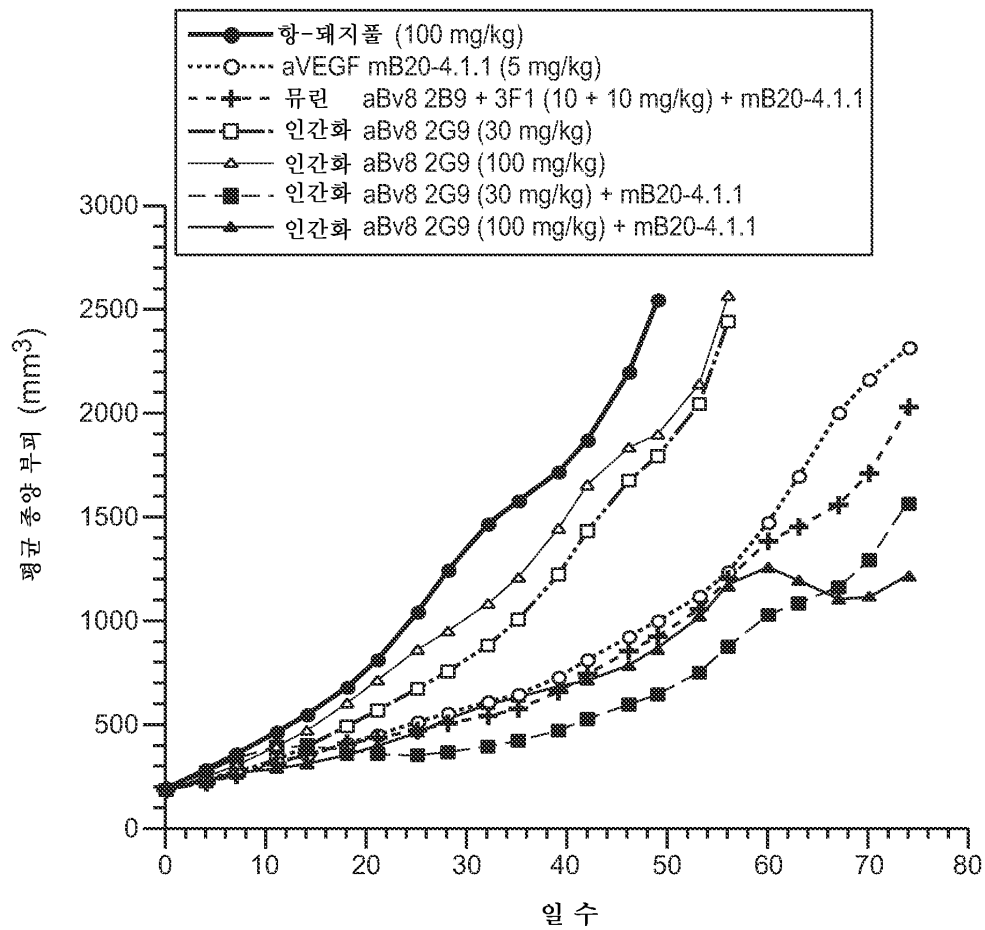
도면40



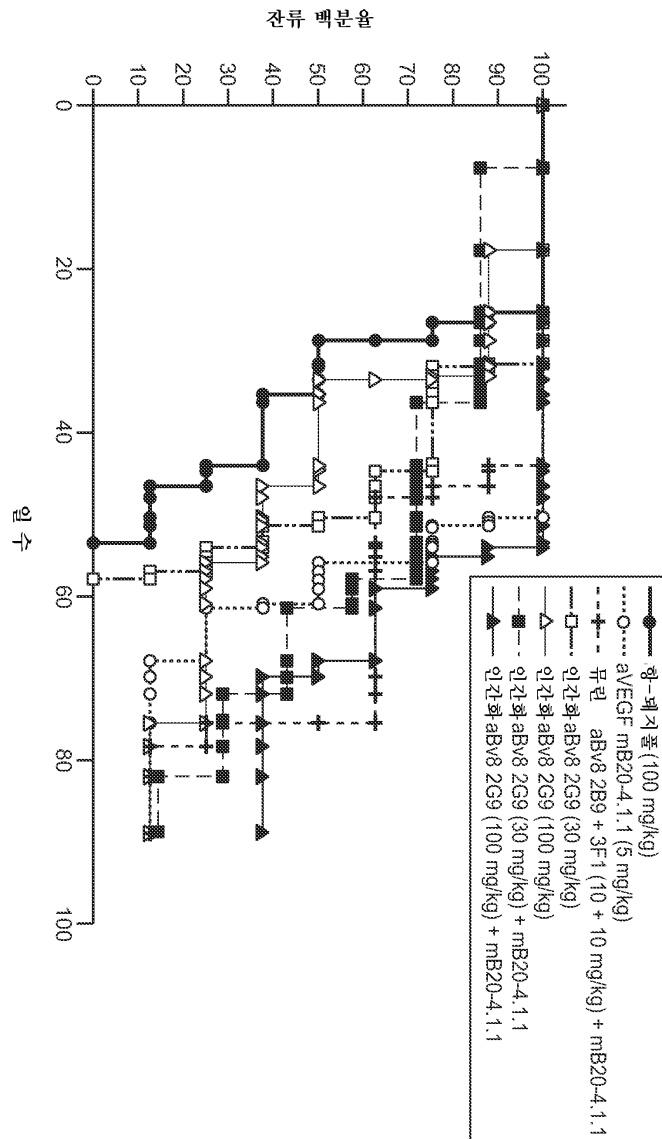
도면41



도면42



도면43



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC., et al.

<120> ANTI-BV8 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> P4373R1 WO

<141> 2010-12-22

<150> US 61/284,743

<151> 2009-12-23

<150> US 61/414,052

<151> 2010-11-16

<160> 241

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 1

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
1				5				10					15	
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu
				20				25					30	
Tyr	Ser	Ser	Asn	Asn	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				35				40					45	
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg
				50				55					60	
Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr
				65				70					75	
Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala
				80				85					90	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly
				95				100					105	
Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg						
				110										

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 2

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

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr
50 55 60
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser
65 70 75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100 105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
20 25 30
Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

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

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 4

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

Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Tyr
		50							55				60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
		65							70				75	
Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Phe	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
		80							85				90	
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ala
		95							100				105	
Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser
		110							115				120	
Ser														

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 5

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
1		5						10					15	
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp
		20						25					30	

Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 6

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

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

Asp Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala
95 100 105

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

110 115 120

Ser

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu

1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp

20 25 30

Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75

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

80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly			
1	5	10	15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr			
	20	25	30
Asn Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr			
	50	55	60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser			
	65	70	75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp			
	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala			
	95	100	105
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
	110	115	120
Ser			

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu			
1	5	10	15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile			
	20	25	30
Tyr Gly Ala Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
	35	40	45
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr			
	50	55	60

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

110

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 10

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala
95 100 105
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

110 115 120

Ser

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 11

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

Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Arg	Glu	Ser
				50						55				60
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				65						70				75
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr
				80						85				90
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ile	Asn	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
				95						100				105
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg								

110

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 12

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala
95 100 105
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120
Ser

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 13

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

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 14

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

His Tyr Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Thr Ile Tyr

50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser

65 70 75

Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala

95 100 105

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

110 115 120

Ser

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 15

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

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
 50 55 60
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
 80 85 90
 Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 16

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 16

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

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser
 65 70 75

Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala
95 100 105
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120
Ser

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 17

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 18

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 18

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20						25				30
Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				35						40				45
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr
				50						55				60
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				65						70				75
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
				80						85				90
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp
				95						100				105
Gly	Gln	Gly	Thr											

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 19

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

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg

50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

65 70 75

Asn Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ser Ser Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

Lys Arg

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 20

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

1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg

50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala

80 85 90

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr

95 100 105

Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 21

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro
1				5					10					15
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Phe
				20					25					30
Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr
				35					40					45
Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
				50					55					60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75
Asn	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90
Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105
Lys	Arg													

<210> 22

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 22

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser
				20					25					30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 35 40 45
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg
 50 55 60
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 65 70 75

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala
 80 85 90
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr
 95 100 105
 Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe
 20 25 30

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

Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ser Tyr Asp Pro Met Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

<210> 24

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg

50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

80 85 90

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr

95 100 105

Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 25

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu

1 5 10 15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp

20 25 30

Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr

80 85 90

Ser Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 26

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 26

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

1 5 10 15

Ala Pro Val Glu Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr

50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser

65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Ile His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe

95 100 105

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

115

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 27

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu

1 5 10 15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp

20 25 30

Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly

35 40 45

Gln Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

65 70 75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr

80 85 90

Ser Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly

95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 28

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 28

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

1 5 10 15

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

110 115

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 29

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

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Ser Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 30

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 30

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

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe
 95 100 105
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ser Ser Glu Tyr Val Ser
 20 25 30
 Asn Ala Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Val Ser Gly Thr Asn Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Glu Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Glu Ala Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
 80 85 90
 Gly Tyr Asp Ile Pro Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 Lys Arg

<210> 32

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ile Val Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Gln Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asp Tyr Phe Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Gly Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 65 70 75

Asp Ser Gln Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr
80 85 90
Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asn Tyr Gly Asn Tyr
95 100 105
Gly Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
110 115

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ser Ser Glu Tyr Val Ser
20 25 30
Asn Ala Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Val Ser Gly Thr Asn Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Glu Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Glu Ala Asp Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
80 85 90
Gly Tyr Asp Ile Pro Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg

<210> 34

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 34

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ile	Val	Lys	Pro	Ala
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20						25				30
Asp	Tyr	Phe	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Ile	Asp	Thr	Lys	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Thr
				50						55				60
Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				65						70				75
Asp	Ser	Gln	Ser	Met	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Arg	Thr
				80						85				90
Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr
				95						100				105
Gly	Ala	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr					
				110						115				

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 35

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro
1				5						10				15
Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Phe
				20						25				30
Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr
				35						40				45
Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg
				50						55				60

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

<210> 36

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 36

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

1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser
20 25 30
Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
35 40 45
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg
50 55 60
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
65 70 75

Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala
80 85 90
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr
95 100 105
Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
110

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 37

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr
35 40 45

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Ser Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105

Lys Arg

<210> 38

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 38

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser
20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg
50 55 60

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

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe
20 25 30
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr
35 40 45
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ser Phe Asp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg

<210> 40

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 40

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser
				20						25				30
Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				35						40				45
Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Asp	Thr	Arg
				50						55				60
Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr
				65						70				75
Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
				80						85				90
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	His	Gly	Tyr	Tyr
				95						100				105
Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr						
				110										

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 41

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

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg

50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ser Trp Glu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

Lys Arg

<210> 42

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg

50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

80 85 90

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr

95 100 105

Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 43

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Val	Phe
				20						25				30
Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr
				35						40				45
Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				50						55				60
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65						70				75
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80						85				90
Ser	Tyr	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95						100				105
Lys	Arg													

<210> 44

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 44

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser
				20						25				30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40 45
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg
 50 55 60
 Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
 65 70 75

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 80 85 90
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr
 95 100 105
 Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe
 20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr
 35 40 45

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ser Ser Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

<210> 46

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Tyr Ile Ser

20 25 30

Thr Pro Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg

50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

80 85 90

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr

95 100 105

Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe

20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr

35 40 45

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg

50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

80 85 90

Ser Tyr Asp Pro Met Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95 100 105

Lys Arg

<210> 48

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Leu Leu Ser

20 25 30

Thr Ser Gly Met Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

35 40 45

Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg

50 55 60

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr

65 70 75

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu

80 85 90

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp His Gly Tyr Tyr

95 100 105

Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

110

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 49

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1

5

10

15

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 50

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 51

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5

10

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 53

Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
1				5					10				15	
Lys	Gly													

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 54

Asp	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ala	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
				5					10		

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 55

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ser	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10				15	

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 56

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
			5			

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 57

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 58

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5

10

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 59

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 60

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> sequence is synthesized

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 62

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 63

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr
5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 64

Gly Tyr Ser Leu Thr Asn Tyr Asp Met His
5 10

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 65

Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 66

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 67

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 68

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 69

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 70

Gly Tyr Ser Leu Phe His Tyr Asp Met His

5

10

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 71

Tyr Ile Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 72

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 74

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 75

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 76

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5 10

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 77

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 78

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 79

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 80

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 81

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 82

Gly Tyr Ser Phe Thr His Tyr Asp Met His

5

10

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 83

Tyr Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 84

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 85

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Gly Ala Asp Ser Tyr Met Asn

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

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 86

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr

5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 87

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 88

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5 10

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 89

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

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

Lys Gly

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 90

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

><223> sequence is synthesized

<400> 91

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 92

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 93

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr
5

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 94

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His
5 10

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 95

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 96

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 96

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr
5 10

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 97

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 98

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Thr

5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 99

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 100

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5

10

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 101

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 102

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 103

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1

5

10

15

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 104

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser

5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 105

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 106

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5 10

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 107

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 108

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 108

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 109

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 110

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 111

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 112

Gly Tyr Thr Phe Met His Tyr Asp Met His

5

10

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 113

Tyr Ile Ser Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 114

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 115

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Trp Val Asp Ser Tyr Met Asn

1

5

10

15

<210> 116

<211> 7

<212> PRT

<213>

Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 116

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr

5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 117

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 118

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5

10

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 119

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 120

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213>

> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 121

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 122

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 123

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 124

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 124

Gly Tyr Ser Phe Thr His Tyr Asp Met His

5

10

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 125

Tyr Ile Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 126

<211>

> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 126

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 127

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 128

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 129

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 130

Gly Tyr Thr Phe Pro Ile Tyr Asp Met His

5 10

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 131

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 132

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 132

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400>

> 133

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Gly Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 134

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Thr

5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 135

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 136

<211>

10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 136

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Asp Met His

5

10

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 137

Tyr Ile Thr Thr Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223>

> sequence is synthesized

<400> 138

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 139

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 139

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe Ala Glu Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 140

Ala Ala Ser Tyr Arg Glu Ser

5

<210> 141

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 141

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 142

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asp Met His

5 10

<210> 143

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 143

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 144

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 144

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 145

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 145

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 146

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 146

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 147

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 148

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 148

Gly Tyr Ser Phe Val His Tyr Asp Met His

5

10

<210> 149

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 149

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 150

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 150

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 151

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 151

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Asp Tyr Tyr His Tyr Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 152

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser

5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 153

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 154

Gly Tyr Ser Leu Thr Asn Tyr Asp Met His

5

10

<210> 155

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 155

Tyr Ile His Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 156

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 156

Asp Ser Asn Tyr Gly Glu Ala Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 157

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 157

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His

5

10

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 158

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 159

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr

5

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 160

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
5 10

<210> 161

<211> 16

<212> PRT

<

213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 161

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Ser

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 162

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Thr Tyr
5 10

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 163

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His
5 10

<210> 164

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 164

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

5

<210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 165

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr

5

<210> 166

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 166

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

5

10

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 167

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1

5

10

15

Ser

<210> 168

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 168

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Thr Tyr

5 10

<210> 169

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 169

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His

5 10

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 170

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

5

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 171

Gln Gln Trp Ser Phe Asp Pro Ile Thr

5

<210> 172

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 172

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

5 10

<210> 173

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 173

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 174

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 174

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr

5 10

<210> 175

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 175

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His

5 10

<210> 176

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 176

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 177

Gln Gln Trp Ser Trp Glu Pro Leu Thr

5

<210> 178

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 178

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

5

10

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 179

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1

5

10

15

Ser

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 180

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr
5 10

<210> 181

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 181

Ser Ala Ser Ser Pro Val Phe Tyr Met His
5 10

<210> 182

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 182

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 183

Gln Gln Trp Ser Tyr Glu Pro Leu Thr
5

<210> 184

<211>

> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 184

Gly Phe Leu Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser

5 10

<210> 185

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 185

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 186

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 186

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr

5 10

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 187

Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met His

5 10

<210> 188

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 188

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

5

<210> 189

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 189

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Leu Thr

5

<210> 190

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 190

Gly Phe Tyr Ile Ser Thr Pro Gly Met Gly Val Ser

5

10

<210> 191

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 191

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1

5

10

15

Ser

<210> 192

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 192

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr

5

10

<210> 193

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 193

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr	Met	His
				5				10	

<210> 194

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 194

Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser
			5			

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 195

Gln	Gln	Trp	Ser	Tyr	Asp	Pro	Met	Thr
			5					

<210> 196

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 196

Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Val	Ser
				5					10		

<210> 197

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 197

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 198

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 198

Arg Asp His Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Tyr

5 10

<210> 199

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 199

Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 200

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 200

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

5

<210> 201

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 201

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 202

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 202

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn

5

10

<210> 203

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 203

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1

5

10

15

Lys Asp

<210> 204

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 204

Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

5

10

<210> 205

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 205

Glu Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Asp Asp Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 206

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 206

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

5

<210> 207

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 207

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr

5

<210> 208

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 208

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn

5 10

<210> 209

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 209

Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

1 5 10 15

Lys Asp

<210> 210

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 210

Asp Ser Ser Tyr Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

5 10

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 211

Lys Ser Ser Glu Tyr Val Ser Asn Ala Leu Ser

5 10

<210> 212

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 212

Gly Thr Asn Lys Leu Glu Asp

5

<210> 213

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 213

Gln Gln Gly Tyr Asp Ile Pro Thr

5

<210> 214

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 214

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Gly

5

10

<210> 215

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 215

Gly Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly

1

5

10

15

Ser Val Lys Gly

<210> 216

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 216

Asn Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Phe Asp Ser

5

10

<210> 217

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 217

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 218

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 218

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
 20 25 30
 Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 50 55 60
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 219

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 219

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
20 25 30
Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90
Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 220

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 220

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
1				5						10				15
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp
				20						25				30
Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
				35						40				45
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
				50						55				60
Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
				65						70				75
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr
				80						85				90
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ile	Asn	Glu	Asp	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
				95						100				105
Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg								
				110										

<210> 221

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 221

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
1				5							10			15
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr
				20						25				30
Asp	Tyr	Asp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Tyr
				50						55				60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Gly Glu Ala
95 100 105
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

Ser

<210> 222

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 222

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
35 40 45
Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr
50 55 60
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
65 70 75
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
80 85 90
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp
95 100 105
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 223

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 223

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Thr	Gly
1				5								10		15
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr
				20						25				30
Asp	Tyr	Asp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Gln	Gly	Lys	Ser	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Cys	Tyr	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Tyr
				50						55				60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				65						70				75
Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Phe	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
				80						85				90
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Asn	Tyr	Gly	Glu	Ala
				95						100				105
Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser
				110						115				120

Ser

<210> 224

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 224

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr
				20						25				30

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

Ser

<210> 225

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 13

<223> N is Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 16

<223> N is Guanine or Cytosine

<220><221> Unsure

<222> 19

<223> N is Adenine or Cytosine

<220><221> Unsure

<222> 22

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 34

<223> N is Adenine or Cytosine

<400> 225

gtcagatatc gtnctnacnc antctccagc aatna 35

<210> 226

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 23

<223> N is Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 29

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 35

<223> N is Adenine or Thymine

<400> 226

gatcgacgta cgctcaggtg acnctgaang agtcngg 37

<210> 227

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 13

<223> N is Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222>

> 16

<223> N is Guanine or Cytosine

<220><221> Unsure

<222> 22

<223> N is Adenine or Guanine

<400> 227

gtacgatatc gtnctnacc antctcc 27

<210> 228

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 23

<223> N is Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 29

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 35

<223> N is Adenine or Thymine

<400> 228

gatcgacgta cgctcaggtg acnctgaang agtcngg 37

<210> 229

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 13

<223> N is Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 16

<223> N is Guanine or Cytosine

<220><221> Unsure

<222> 22

<223> N is Adenine or Guanine

<400> 229

gtacgatatc gtnctnacc antctcc 27

<210> 230

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 20

<223> N is Cytosine or Thymine

<220><221> Unsure

<222>

> 26

<223> N is Guanine or Cytosine

<400> 230

gatcgacgta cgctgaggtg cagctncagc agtctgg 37

<210> 231

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 13

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 19

<223> N is Adenine, Cytosine, Guanine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 22

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 25

<223> N is Adenine, Cytosine, Guanine or Thymine

<400> 231

gatcgatatc canatgacnc anacncc 27

<210> 232

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 17

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 23

<223> N is Adenine or Guanine

<220><221> Unsure

<222> 24

<223> N is Cytosine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 32

<223> N is Adenine or Guanine

<400> 232

gacgcacgta cgctgangtg canntgggtg antctgg 37

<210> 233

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 233

gctgtaggtg ctgtctttgc t 21

<210> 234

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<220><221> Unsure

<222> 5

<223> N is Adenine or Thymine

<220><221> Unsure

<222> 11

<223> N is Adenine or Cytosine

<400> 234

ctggncaggg ntccagagtt cca 23

<210> 235

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 235

```

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
  1           5           10           15
Pro Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile

                20           25           30
Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys
                35           40           45
Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro
                50           55           60
Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val
                65           70           75
Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro
                80           85           90

Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu
                95           100          105
Ala Gln Lys

```

<210> 236

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 236

```

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
  1           5           10           15
Pro Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr
                20           25           30
Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys
                35           40           45
Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met

```

50	55	60
Gly Gln Val Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro		
65	70	75
Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly		
80	85	90
Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala		
95	100	105

Arg Lys

<210> 237

<211> 81

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 237

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly
1 5 10 15
Gly Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile
20 25 30
Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr
35 40 45
Arg Lys Val Pro Phe Val Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro

50	55	60
Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe		
65	70	75
Ile Cys Leu Ala Arg Lys		
80		

<210> 238

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 238

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly
1 5 10 15
Gly Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile

20 25 30

Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr

35 40 45

Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro

50 55 60

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

65 70 75

Ile Cys Leu Ala Gln Lys

80

<210> 239

<211> 81

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 239

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly

1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile

20 25 30

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

35 40 45

Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro

50 55 60

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

65 70 75

Ile Cys Leu Ala Arg Lys

80

<210> 240

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 240

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
 Lys Val Glu Ile Lys Arg
 80

<210> 241

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> sequence is synthesized

<400> 241

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
 20 25 30
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile Thr Val
 35 40 45
 Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg
 50 55 60
 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

80