(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년01월02일
(11) 등록번호 10-0663319
(24) 등록일자 2006년12월22일

(21) 출원번호 10-2005-7008975(분할)
(22) 출원일자 2005년05월18일
심사청구일자 2005년05월18일
번역문 제출일자 2005년05월18일
(62) 원출원 특허10-1999-7009425
원출원일자 : 1999년10월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP1998/002180
국제출원일자 1998년04월14일
(65) 공개번호 10-2005-0052549
(43) 공개일자 2005년06월02일
심사청구일자 2002년01월22일
(87) 국제공개번호 WO 1998/46645
국제공개일자 1998년10월22일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남,

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 97106109.8 1997년04월14일 유럽특허청(EPO)(EP)

(73) 특허권자
마이크로메트 에이지
독일 뮌헨, 스타펠지스트리트 2,81477

(72) 발명자
쿠페르 페터
독일 모스브르크 데-85368, 그라프-콘라트-스트라세 2

라움 토비아스
독일 뮌헨 데-80798, 젠트네르스트라세 20

(74) 대리인 신관호

심사관 : 김지윤

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 인간 17-1에이항원에 대해 특이성을 갖는 인간항체 및 그용도

(57) 요약

인간에게 면역원성이 낮거나 면역원성 없는 항-인간 항원 수용체의 제조방법으로서, 기능적으로 재배열된 VH와 VL면역글로블린 사슬의 조합을 선택하는 단계들로 구성되며, 적어도 상기 VH사슬은 본질적으로 초회항원자극되지않은 성숙한 인간 B림프구 또는 본질적으로 아네르기성인 인간 B 세포로부터 얻어지며, 상기 VL사슬은 자연적으로 발생하는 B세포 레퍼토리로부터 얻어지며, 상기 사슬은 재조합 벡터로부터 발현되고, 인간항원과의 결합을 위해 인 비트로 디스플레이 시스템을 이용한다.

또한 인간에게 면역원성이 낮거나 비면역원성인 수용체는 인간항원에 작용하도록 제공되며, 상기 수용체는 본 발명에 의한 방법에 의해 얻을 수 있다. 상기 수용체는 바람직하게는 항체 또는 그 단편이며, 또는 상기 항체의 VH/VL사슬으로 구성되는 면역포합체이다.

특히 수용체는 인간종양항원에 대해 작용하며, 바람직하게는 EpCAM, EGP 또는 GA-733-2로 알려진 인간종양항원 17-1A에 대해 작용한다. 그리고 본 발명의 방법을 수행하기에 유용한 키트와 상술한 수용체를 포함하여 구성되는 약학적 조성물이 제공된다.

대표도

도 27

특허청구의 범위

청구항 1.

악성종양세포 표면에 발현된 것과 같은 인간 17-1A항원에 대해 특이성을 갖는 인간 항체에 있어서,

상기 항체의 적어도 VH 영역이 인간 IgD 레퍼토리(repertoire)로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 인간 17-1A항원에 대해 특이성을 갖는 인간 항체.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

상기 인간항체는 항인(anti-human) 항원 수용체를 제조하기 위한 방법에 따라 얻어질 수 있고,

상기 방법은,

기능적으로 재배열된 VH 및 VL 면역글로블린 사슬의 조합을 선택하는 단계(b)로서, 적어도 상기 VH 사슬은 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구(unprimed mature human B-lymphocytes)의 인간 IgD 레퍼토리로부터 얻어지고, 상기 VL 사슬은 자연적으로 발생하는 인간 B세포 레퍼토리로부터 얻어지며, 상기 사슬들은 재조합 벡터로부터 발현되는 상기 단계(b)와,

인간항원에 결합하기 위하여 인 비트로 디스플레이 시스템(in vitro display system)을 이용하는 단계(c)로 구성되며,

상기 선택단계(b)에 앞서 다른 종으로부터의 목표 항원 특이항체(target antigen-specific antibody)의 V 사슬과 함께 상기 항원에 결합하기 위해 상기 VH 사슬 또는 상기 VL 사슬을 선택하는 단계(a)가 수행되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

상기 인간항체는 면역글로블린 또는 Fv-단편과 같은 면역글로블린 단편을 제조하기 위한 방법에 따라 얻어질 수 있고,

상기 방법은,

기능적으로 재배열된 VH 및 VL 면역글로블린 사슬의 조합을 선택하는 단계(b)로서, 적어도 상기 VH 사슬은 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구(unprimed mature human B-lymphocytes)의 인간 IgD 레퍼토리로부터 얻어지고, 상기 VL 사슬은 자연적으로 발생하는 인간 B세포 레퍼토리로부터 얻어지며, 상기 사슬들은 재조합 벡터로부터 발현되는 상기 단계(b)와,

인간항원에 결합하기 위하여 인 비트로 디스플레이 시스템(in vitro display system)을 이용하는 단계(c)로 구성되며,

상기 선택단계(b)에 앞서 다른 종으로부터의 목표 항원 특이항체(target antigen-specific antibody)의 V 사슬과 함께 상기 항원에 결합하기 위해 상기 VH 사슬 또는 상기 VL 사슬을 선택하는 단계(a)가 수행되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 4.

제 2항 또는 제3항에 있어서,

상기 VH와 상기 VL면역글로블린 사슬은 모두 인간 IgD 레퍼토리로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 5.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 인 비트로 디스플레이 시스템은 파지(phage) 디스플레이 시스템이 되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 6.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 재배열된 사슬의 조합은 하나 이상의 다른 라이브러리로부터 발현되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 7.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 인간 항원은 17-1A와 같은 종양 항원인 되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 8.

제 7항에 있어서,

상기 VH 사슬은 도 7(뉴클레오티드 1 내지 381)과 도 8(뉴클레오티드 1 내지 339)에 도시된 두 개의 서열중 하나로 구성되고,

상기 VL 사슬은 도 6(뉴클레오티드 1 내지 321)과 도 9(뉴클레오티드 1 내지 321)에 도시된 두 개의 서열중 하나로 구성되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 9.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 선택단계(b)는,

(i) 항원수용체를 발현하는 표시 비히클(display vehicle)을,

(a) 고정된 목표 항원 또는 그 단편에,

(b) 목표 항원 또는 그 단편을 발현하는 선택적으로 표지된 세포에 또는,

(c) 가용성 목표 항원 또는 그 단편과 결합시키고,

(ii) 비특이적으로 결합한 표시 비히클(a와 b)을 세척한 후, 특이적으로 결합한 표시 비히클을 추출하거나,

(iii) 목표 항원 용액 또는 목표 항원을 발현하는 세포의 현탁액에서 목표항원과 결합한 표시 비히클(b와 c)의 포지티브를 증가시키므로,

항원 수용체를 포함하는 분리된 표시 비히클은 선택적으로 복제에 의해 배가되며, 상기 (i) 내지 (iii)에 기술된 인 비트로 선택(in vitro selection)을 수차례 추가로 반복되는 과정을 거치게 되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 10.

제 9항에 있어서,

상기 가용성 목표 항원 또는 그 단편은 표지된 목표 항원 또는 그 단편인 것을 특징으로 하는 인간항체

청구항 11.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 다른 종으로부터의 목표항원 특이항체의 사슬은 쥐의 VH 또는 VL 사슬이 되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 12.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 적절한 조합의 선택은,

(a) 상기 인간 항원에 결합하기 위해 서로 다른 다양한 VL 사슬과 함께 한 개의 동일한 VH 사슬을 테스트하는 단계 또는,

(b) 상기 인간 항원에 결합하기 위해 서로 다른 다양한 VH 사슬과 함께 한 개의 동일한 VL 사슬을 테스트하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 13.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 방법은,

선택단계 후, 인간 VH 사슬과 인간 VL 사슬 또는 그에 해당하는 핵산을 얻는 단계와,

상기 사슬을 동일하거나 또는 다른 VH 사슬 또는 VL 사슬과 융합하여, 무겁거나(CH) 가벼운 사슬(CL) 또는 그 일부의 면역글로블린 불변영역 또는 비면역글로블린 사슬과 그에 해당하는 핵산으로 각각 만드는 단계를 추가로 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 14.

제 13항에 있어서,

상기 불변영역의 사슬은 IgG1 또는 IgG3로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 15.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 방법은,

선택단계 후에, 인간 VH 사슬과 VL 사슬을 얻는 단계와,

상기 사슬을 되도록이면 방사성 동위원소 또는 화학치료에 사용되는 물질과 같은 낮은 분자량의 비단백질 약물과 물리적으로 연결하는 단계를 추가로 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 16.

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 VH 사슬 또는 VL 사슬은 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구(unprimed mature human B-lymphocytes)의 인간 IgD 레퍼토리로부터 얻어지는 mRNA의 RT-PCR 증폭의 결과인 핵산서열로부터 발현되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 17.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 항체는 바람직하게는, 펩티드 번호 8, 11, 13, 14, 59, 60, 77 및 79의 적어도 하나의 아미노산 서열로 구성되는 17-1A 항원의 세포외 영역의 에피토프(epitope)를 인식하는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 18.

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 VH 사슬은 도 7(뉴클레오티드 1 내지 381) 및 도 8 (뉴클레오티드 1 내지 339)에 도시된 두 개의 서열 중 적어도 하나의 CDR로 구성되며, 그리고/또는 상기 VL 사슬은 도 6(뉴클레오티드 1 내지 321) 및 도 9(뉴클레오티드 1 내지 321)에 도시된 두 개의 서열 중 적어도 하나의 CDR로 구성되는 것을 특징으로 하는 인간항체.

청구항 19.

제 1항 또는 제 2항 중 어느 한 항의 항체와 선택적으로 약학적으로 수용가능한 담체(carrier)를 포함하는 종양을 치료하거나 또는 예방하기 위한 약학적 조성물.

청구항 20.

제 19항에 있어서,

상기 종양은 상피에서 기원하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간에게 면역원성이 낮거나 면역원성이 없는 항-인간항원 수용체의 제조방법에 관한 것으로, 기능적으로 재배열된 VH와 VL 면역글로블린 사슬의 조합을 선택하는 단계로 구성되며, 적어도 상기 VH 사슬은 기본적으로 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구 또는 아네르기성(anergic) 인간 B세포에서 유래하며, 상기 VL사슬은 자연적으로 발생하는 인간 B세포 레퍼토리에서 유래하고, 상기 사슬은 재조합 벡터로부터 발현되고 인간항원에 결합하기 위해 생체외 디스플레이 시스템(in vitro display system)을 사용하는 것이다.

본 발명은 또한 인간에게 면역원성이 낮거나 면역원성이 없으며 인간 항원에 작용하는 수용체에 관한 것으로, 상기 수용체는 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있다. 상기 수용체는 바람직하게는 항체 또는 그 단편이거나 상기 항체의 VH/VL사슬들로 이루어진 면역포합체(immunoconjugates)이다. 특히 본 발명의 수용체는 인간 종양 항원에 대해 작용하며, 바람직하게는 EpCAM, EGP-40 또는 GA 733-2로 알려진 인간 종양 항원 17-1A에 작용한다. 마지막으로 본 발명은 본원발명에 의한 방법을 수행하기에 유용한 키트에 관한 것이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

인간 면역시스템과 같은 포유동물의 면역시스템은 자기 항원에 대해 특이성을 갖는 면역반응성 세포와 분자를 선별한다. 이에 대한 면역시스템의 조절장애는 류머티즘성 관절염과 같은 자가면역 질병을 초래할 수 있다. 그러므로 일반적으로 자동반응형 항체 또는 T 세포에 대한 면역시스템의 감시는 매우 유효하다. 그러나, 포유동물, 특히 인체에서 발현되는 항원에 대해 작용하는 자동반응항체를 갖는 것이 유익한 경우가 있을 수 있다. 그러한 항원은 예를 들면 항원과 결합된 종양이다. 예를 들면 인간 17-1A 또는 EpCAM 항원, 단순 상피세포에 의해 발현되는 표면 당단백질과 그로부터 유도되는 악성

종양은 암의 모노클로날항체 치료, 특히 후일 연속적인 전이를 초래하여 환자의 증상을 악화시킬 수 있는 확산된 종양세포로 인해 고통받는 말기질병(minimal residual desease) 환자에 대한 가치있는 목표가 될 수 있다. 말기 직장암(minimal residual colorectal cancer) 환자에 있어서, 인간 17-1A 항원에 대해 특이성을 갖는 쥐의 모노클로날 항체는 최초의 종양 수술 후에 4개월 동안 5차례에 걸쳐 체계적으로 적용되었을 때, 즉 각 환자에게 모두 900㎎ 항체를 투여하였을 경우(Reithmuller, Lancet 343(1994), 1177-1183), 치료하지 않은 환자에 비하여 5년 간의 사망율이 30% 감소하였다. 그러나 항체 치료 과정에서, 환자들은 쥐의 면역글로블린에 대하여 강한 항체반응을 나타내었다. 이들 인간 항-마우스 항체(HAMAs ; Human Anti-Mouse Antibodies)는 연속적인 항체치료에 대해 심각한 제한이 되며 또한 그 효과를 상당히 감소시킨다. 뿐만 아니라, 이전의 항체치료 또는 쥐의 면역글로블린과의 또 다른 접촉에 의해 유도되는 이미 형성된 HAMAs는 후의 항체치료를 심각하게 방해할 수 있다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 최소 면역원성을 갖는 치료용 항체가 바람직하다. 이 목표를 달성하기 위해 예를 들면 치료용 항체 또는 항체의 유도체들을 그들의 아미노산 서열에 의해 전적으로 인간화하고, 인간 항체의 이디오타입의 면역원성 특징을 인간면역시스템에 의해 내성을 갖는 인간 Ig-가변영역을 이용하여 최소화하는 것을 시도하게 된다.

그러나 인간항원에 대한 인간항체의 생성은 다음의 두 가지 중요한 문제에 직면하게 된다.

(1)하이브리도마 또는 다른 세포 복제기술은 쥐의 하이브리도마 기술에 비하여 인간 항체 생성 세포선을 생성하는 데 있어서 상당히 비효율적이라는 것이 입증되었다.

(2)자동반응항체는 자기내성을 중재하는 메커니즘에 의해 자연적으로 발생하는 항체의 레퍼토리를 상대적으로 효율적으로 고갈시킨다.

인간항체를 발현하는 유전자 전이된 쥐(Bruggemann, Immunol. Today 17(1996), 391-397),그것의 조합된 항체 라이브러리 및 Ig의 무거운 사슬 및 가벼운 사슬(VH 및 VL)의 가변영역을 생체외에서 조합하도록 하고 그들의 항원 결합 특이성을 생체외에서 선별할 수 있도록 하는 파지 디스플레이기술(phage display technology)(Winter, Annu. Rev. Immunol. 12(1994), 433-455)에 의해 일반적으로 인간항체는 보다 쉽게 이용할 수 있게 되었다. 파지 표시방법에 의해 10^7 내지 10^9개의 다른 VL/VH 또는 VH/VL 쌍 중에서 하나의 특정한 결합체를 쉽게 분리할 수 있게 되었다. 이것은 특히 레퍼토리 클로닝에 대한 소스(source)로서 면역된 숙주의 B-림프구를 이용함으로써 가변영역의 레퍼토리가 특정 결합체에 대해 증가하는 경우에 특히 그렇다.

그러나, 종종 특정 결합체의 빈도는 자연적으로 발생하는 항체 레퍼토리에 있어서는 상당히 저하된다. 이것은 특히 자기항원에 결합하는 항체의 경우에 그러하다. 일반적인 크기(10^7 내지 10^9개의 독립 클론)의 조합 항체 라이브러리에서 만들어지는 자기 내성을 갖는 숙주의 VL 및 VH의 랜덤조합은 종종 파지 디스플레이 방법에 의해 자동반응하는 항체의 생체외 선별에서 성공을 거두기에 충분하지 않다.

이 문제를 우회하기 위한 하나의 방법은 자연적으로 발생하는 레퍼토리에서 자기반응하는 항체의 낮은 빈도를 보상하기 위해 큰 조합 항체 라이브러리를 사용하는 것이다. 그러나 10^9 개의 독립 클론의 크기를 초과하는 조합 항체 라이브러리는 플라스미드-DNA를 E.coli- 세포로 형질전환시키는 효율에 있어서의 현재의 기술적 제약으로 인해 매우 달성하기 어렵다.

자기반응항체의 출현을 불충분하게 하고, 자기항원을 특이적으로 인식하는 항체의 분리기회를 현저하게 감소시키는 자연적으로 발생하는 항체 레퍼토리에서의 자기 내성 경향을 극복하기 위해, 반합성 또는 완전합성된 VH- 및/또는 VL- 사슬 레퍼토리를 이용한 접근이 개발되었다. 예를 들면 재배열되지 않은 인간 V-세포절편의 완전한 레퍼토리는 게놈 DNA에서 복제되고, 생체내의 V-J- 또는 V-D-J 재조합과 유사한 기능적인 가변 영역 유전자의 생체외 재조합에 이용된다(Hoogenboom, J.Mol.Biol. 227(1992), 381-338; Nissim, EMBO J.13(1994) 692-698; Griffiths, EMBO J, 13(1994), 3245-3260). 보통, V-D-/D-J-접합 및 D-절편의 다양성은 주로 무거운 사슬 CDR3의 예외적인 길이 및 서열 가변성을 초래하며, 또한 V-J-접합 다양성은 가벼운 사슬 CDR3의 서열 가변성에 기여한다. 그리고 이는 완전 합성 및 반합성 방법에서 축퇴된 올리고뉴클레오티드를 사용한 랜덤 서열에 의해 모방된다(Hoogeboom(1994), supra;Nissm, supra;Griffiths, supra;Barbas, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A89(1992), 4457-4461).

그러나, 인간 V-유전자 서열에 기초한 반합성 또는 완전합성 레퍼토리로부터 인간 항원에 결합하기 위해 선택되는 VL/VH- 또는 VH/VL 쌍은 인간에게 원하지 않는 면역반응을 유도하는 면역원성 에피토프를 형성할 위험이 있고

(Hoogenboom, TIBTECH 15(1997), 62-70), 특히 완전히 랜덤화된 서열 레퍼토리에서 유래된 CDR3 영역은 제거의 결과로 외부 항원으로서 인식되어 제거되도록 하지 않으면 인간 면역 감시를 견디지 못하기 때문에 잠재된 면역원성 에피토프를 형성하도록 예정되어 있다. 이것은 인간항체를 발현하는 유전자 전이된 쥐항체로부터의 인간항체의 경우에도 이들 면역글로블린 분자가 쥐에 대해 내성을 가질 뿐 인간 면역시스템에 내성을 갖도록 선택되지 않았기 때문에 동일하게 적용된다.

따라서 본 발명의 기본적인 기술적인 목적은 인간에게 면역원성이 적거나 면역원성을 갖지 않고, 인간 체내에서 목표 항원에 대해 사용될 수 있는 수용체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

따라서 본 발명은 인간에게 면역원성이 낮거나 면역원성이 없는 항-인간항원 수용체의 제조방법에 관한 것으로, 기능적으로 재배열된 VH와 VL 면역글로블린 사슬의 조합을 선택하는 단계로 구성되며, 적어도 상기 VH 사슬은 기본적으로 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간의 B-림프구 또는 아네르기성 인간 B세포에서 유래되며, 상기 VL사슬은 자연적으로 발생하는 인간 B세포 레퍼토리에서 유래되고, 상기 사슬은 제조합 벡터로부터 발현되며, 인간항원에 결합하기 위해 생체외 디스플레이 시스템을 사용하는 것이다.

본 발명의 방법은 심각한 정도로 인간에게 면역원성을 갖지 않거나 혹은 전혀 면역원성을 갖지 않으면서 항원을 공격하는데 사용될 수 있는 있는 수용체의 제공에 있어서 매우 유용하다. 상기 수용체는 세포항원을 목표로 하므로써 종양, 자동면역질병, 이식 후의 이식거부 등의 치료에 유용하며, 또한 병리학적 과정에서 관여하는 키 분자를 목표로 하므로써 알러지, 염증, 내분비적인 퇴행성 질병 등의 다양한질병에 대해 사용가능하다는 유용성을 갖는다.

본 발명에 의한 수용체의 VH/VL 면역글로블린 사슬은 물론 종래 잘 알려진 기술을 이용하여 그들의 핵산 및 아미노산 서열을 규명할 수 있다(Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Habour Laboratory Press, Cold Habour, NY(1989)참조). 일단 핵산서열 또는 아미노산서열이 결정되면 본 발명의 수용체는 합성 또는 반합성 수용체를 생성하는 합성 또는 반합성방법 또는 인간 면역글로블린 수용체를 발현하는 유전자 전이 쥐를 사용하는 방법 등의 기타 방법으로도 제조가능하며, 상술한 합성 또는 반합성 방법 또는 유전자전이 쥐에 의해 생성하는 방법은 또한 본 발명의 범위에 포함되는 것이다.

수용체가 인간 항원에 결합한 후, 수용체는 보다 더 정제될 수 있다. 예를 들면 항원 특이성을 나타내지 않는 비결합 수용체는 세정처리에의해 제거될 수 있다. 결합된 수용체는 인간 항원으로부터 용출되어 보다 더 정제되고, 원하는 수용체 및/또는 해당하는 재조합 벡터가 순수한 형태로 분리될 때까지 원하는 수용체의 발현, 결합 및 선택의 추가단계가 추가될 수 있다.

따라서 본 발명의 방법은 인간 면역시스템에 의한 Ig-가변 영역의 사전선택(preseletion)을 이용할 수 있다. 수용체는 배타적으로 인간 조합항체 라이브러리로부터 생체외에서 선택된 레퍼토리에서 유래하거나, 또는 본질적으로 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구 또는 바람직하게는 본질적으로 아네르기성 인간- B세포에 의해 발현된 자연적으로 발생하는 항체 레퍼토리로 만들어진다. 그러나, Ig 가변영역은 상기 B세포를 나타내는 다른 다양한 소스에서 유래될 수도 있다.

상기 VH 또는 VL 사슬의 소스가 되는 B세포의 기원에 대한 과학적인 배경은 다음에서 설명하는 바와 같다.

세포막 항원 수용체인 IgD 및 IgM을 발현하는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구는 유전자 결여를 초래하는 다가 자기항원(multivalent self antigen) 또는 제 1여포(primary follicle)에서 배제시켜 아네르기 및 단명을 초래하는 가용성 일가 자기항원(monovalent self antigen)과 마주치지 않는다면, 2차림프계 조직으로의 이동 동안 제 1여포로 들어간다.

배타적으로 IgM을 발현하는 미성숙 B-세포와 자기항원이 골수에서 접촉하므로써 항원가수(antigen valency)에 따라 염색체 결여 또는 아네르기를 초래하게 된다. 아네르기성 B세포는 비록 표면 IgD를 발현하지만, 제 1여포에 접근하지 않고 T세포의 도움 없이는 상기 수용체를 통해 항원에 반응할 수 없고 이들 세포는 단지 수일간의 짧은 수명을 가질 뿐이다.

반대로 자기항원과 만나지 않아 제 1여포에 접근한 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구는 수 주간의 장기간의 수명을 갖는다. 상술한 바와 같은 자기내성을 조절하는 매커니즘에도 불구하고, 이들 장기간 생존하는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구들은 여전히 잠재적으로 자기 반응하는 B 세포를 함유하고 있어 T세포의 내성으로 인해 특이성 있는 T세포의 도움을 받기 어렵고, 따라서 확산 및 항체분비가 어렵다. 현재 낮은 레벨로 존재하며, 다수의 자기항원에 대해 반응

하지 않는 B세포는 이 형태이며, B세포 뿐 아니라 헬퍼 T세포에도 영향을 미친다. 본 발명에서 이들 수명이 길고, 비반응성이며, 잠재적으로 자기 반응하는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구는 예를 들면 파지 디스플레이방법에 의해 인간항원에 대한 인간항체를 선택하기에 특히 적합한 조합 항체 라이브러리를 구축하기 위하여 가장 유망한 자연적으로 발생하는 인간항체 레퍼토리로서 동정된다.

본 발명의 기초로 사용되는 선택된 항체 레퍼토리는 주로 체내에서 장기간의 수명을 갖는 B세포에서 얻어지고, 따라서 상당한 시간 동안 인간 면역시스템에 노출되어 인간면역시스템에 대해 면역원성인 상당히 가변적인 CDR-3 영역 내에서 특히 에피토프를 형성하는 항체 분자를 상당한 정도로 제거할 수 있을 것으로 기대된다. 그러므로 상기 항체 레퍼토리에서 선택된 인간항체는 반합성 또는 완전합성된 인간항체 라이브러리에서 선택된 인간 항체에 비해 인간에게서 낮은 면역원성의 특징을 나타낼 것으로 기대된다.

외부 항원과의 접촉에 의해 활성화되는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B세포는 IgD의 발현을 중단하고, 가용성 면역글로블린을 분비하는 플라즈마 세포 내로의 클론확산 및 분화를 시작한다. 항체 반응의 초기단계는 IgM-항체에 의해 지배되지만, 후에는 IgG와 IgA가 지배적인 아이소타입이 되고, IgE는 기여도는 작지만 항체반응에서 생물학적으로 중요한 부분을 차지하게 된다.

IgM, IgG, IgA, IgE를 발현하는 성숙하고 초회항원 자극되지 않은 IgD-네거티브인 성숙한 항원-초회항원 자극된 B 림프구와 달리 IgD-포지티브 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B세포는 아직 클론 확산을 개시하지 않았으므로 조합 IgD-라이브러리는 보통 외부 항원에 의해 야기되는 면역반응과 현재 또는 이전에 관계되는 중복 표현되는 항체특이성을 나타내지는 않고, 따라서 레퍼토리의 다양성과, 자기항원과 결합할 가능성이 크지 않은 항체후보를 위한 라이브러리 공간의 낭비를 감소시키게 된다. 이것은 자연적으로 발생하는 인간 항체 레퍼토리로부터 인간 항원에 대한 인간 항체를 생체외에서 선택하기 위한 인간 IgM 조합 항체 라이브러리의 사용을 장려하였던 종래기술과는 명백하게 다른 점이다(Hoogenboom (1997), supra).

본 발명에 의한 방법의 바람직한 실시의 형태에서 상기 항원 수용체는 면역글로블린 또는 그 단편이다.

면역글로블린의 단편은 Fab 또는 $F(ab)_2$ 단편과 같이 종래에 알려진 어떤 단편이라도 사용될 수 있다.

본 발명에 의한 방법의 특히 바람직한 실시의 형태에서 상기 면역글로블린 단편은 Fv-단편이다.

또한 다른 본 발명의 바람직한 실시의 형태에서 적어도 상기 VH와 선택적으로 상기 VL 면역글로블린 사슬은 인간 IgD 레퍼토리로부터 유래한다.

상기 수용체와 낮은 면역원성을 위해 선택된 바람직한 항체 레퍼토리는 인간 IgD-항체 라이브러리에서 가장 잘 나타난다. IgD는 만일 그들이 유전자 결여를 초래하는 다가 자기항원 또는 1차 여포에서 배제시킴으로써 아네르기 및 단명의 원인이 되는 가용성 일가 자기항원과 마주치지 않는다면 2차 림프계 조직으로 이동하는 동안 1차 여포로 들어가는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구 상에 표면 IgM과 함께 세포막 항원 수용체로서 발현된다. 또한 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구의 항체 레퍼토리외에, 인간 IgD-라이브러리는 가용성 일가 자기항원과 접촉하여 아네르기성으로 되나 B세포 아네르기 대신 유전자 결여를 초래하는 다가 자기항원과 유사한 인간 세포표면 분자와의 특이결합에 거의 기여하지 못하는 단명의 B세포만을 나타낸다.

또 다른 본 발명의 바람직한 실시의 형태에서, 상기 생체외 디스플레이 시스템은 파지 디스플레이 시스템(phage display system)이다.

상기 파지 디스플레이 시스템은 과거에는 특정 목표에 결합하는 다양한 펩타이드와 단백질의 선택에 편리하게 이용되었다. 이 사실에 근거하여, 면역글로블린 VH와 VL사슬은 파지 디스플레이 시스템에 유용한 분자로 구성되는 벡터로 편리하게 복제될 수 있다. 이와 같은 분자와 벡터는 각각 종래 기술에서 널리 알려져 있으므로(Winter, supra; Barbas, METHODS:A Companion to Methods in Enzymology 2(1991), 119-124), 여기서는 상세한 설명이 필요하지 않다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서는 재배열된 사슬의 상기 조합이 하나 또는 그 이상의 다른 라이브러리로부터 발현된다.

상기 실시의 형태는 만약 특정목표에 결합하는 VH 또는 VL사슬이 알려져 있고, 결합을 재구성하거나 향상시키는 해당하는 제 2VL사슬이 선택될 경우 특히 바람직하다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 실시의 형태에서는 상기 인간항원은 종양항원이다.

인간항원이 종양항원인 경우, 상기 항원은 상기 종양의 표피상에 발현되는 것이 바람직하다. 이 경우, VH와 VL사슬은 독소와 결합하는 것이 바람직하다. 상기 결합은 예를 들면 화학적 커플링에 의해 단백질 레벨 또는 유전공학에 의해 핵산 레벨에 영향을 미칠 수 있다.

상기 종양항원은 17-1A 항원인 것이 특히 바람직하다.

본 발명에 의한 또 다른 바람직한 실시의 형태에 있어서, 상기 VH사슬은 도 7에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-381)과 도 8에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-339)의 2개의 서열 중 하나로 구성되거나 및/또는 상기 VL사슬은 도 6에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321)과 도 9에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321) 중 하나로 구성된다. 상기 VL영역이 두 개의 VH영역과 결합할 수 있을 경우, 이들 특정 VH와 VL영역에 대한 수용체는 인간 17-1A항원에 대해 특이성을 갖는 첫번째 인간항체가 된다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서, 상기 선택단계는

(ⅰ)항원 수용체를 발현하는 표시비히클이,

(a)고정된 목표 항원 또는 그 단편;

(b)목표 항원 또는 그 단편을 발현하는 선택적으로 표시된 세포; 또는

(c)가용성의 바람직하게는 표시된 목표 항원 또는 그 단편과 결합하는 단계와,

(ⅱ)비특이적으로 결합한 표시 비히클(a,b)을 씻어내고, 비특이적 수단(예를 들면 낮은 pH의 버퍼) 또는 특이적 수단(예를 들면, 항체에 특이성이 있는 목표항원)에 의해 특이적으로 결합한 표시비히클을 용출하는 단계, 또는

(ⅲ)예를 들면, 표시된 목표항원에 결합하는 마그네틱 비드 또는 목표 항원을 발현하는 표시된 세포를 이용하여 목표 항원을 발현하는 세포의 현탁액 또는 목표 항원 용액에서 목표항원과 결합한 표시비히클(b, c)의 포지티브를 증가시켜서, 복제에 의해 선택적으로 증식된 항원수용체를 포함하는 표시비히클을 분리하여 상술한 바와 같은 생체외 선택과정을 반복한다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서는, 상기 선택단계 이전에 상기 VH 또는 상기 VL사슬이 대용 V 사슬(surrogate V 사슬)과 함께 상기 항원에 결합되기 위해 선택된다.

상기 두 단계의 과정은 다른 종으로부터 목표항원에 특이성을 갖는 템플레이트 항체를 사용하여 이용될 수 있다. 예를 들면 인간 목표항원에 대한 쥐의 모노클로날 항체를 사용할 수 있다. 우선 인간 VL- 또는 VH 레퍼토리는 쥐의 템플레이트 항체로부터 단일 대용 VH- 또는 VL-사슬과 결합하고, 필라멘투스 파지상에 표시되고, 항원 결합을 위해 생체외에서 선택된다. 따라서 완전한 라이브러리 크기가 인간 VL- 또는 VH-레퍼토리에 배타적으로 이용될 수 있고, 후보 인간 VL- 또는 VH-사슬은 분리되어 인간 목표 항원의 특이적 결합에 기여할 수 있게 된다. 제 2단계에서, 템플레이트 항체의 대용 가변영역은 제 2회의 생체외 선택후에 이어지는 대응하는 인간 가변 영역의 레퍼토리에 의해 대체되고, 역시 완전한 라이브러리 크기가 단일 VH- 또는 VL 영역의 레퍼토리에 배타적으로 이용될 수 있다. 따라서 가능한 많은 VL-과 VH- 영역의 후보들이 단일단계의 과정에 의한 경우보다 2단계 과정에 의한 제한된 라이브러리의 크기 조건 하에서 항원결합을 위해 스크린될 수 있다.

인간 17-1A 항원에 대해 특정적으로 결합하는 인간항체의 가변영역을 코딩하는 DNA 서열의 클로닝을 위해, 파지 디스플레이 방법에 의한 인간 IgD-조합 항체 라이브러리의 스크리닝을 위한 이들 두 단계의 선택과정이 효율적으로 채택된다. 우선, 인간 17-1A항원에 특이적으로 결합하는 쥐의 모노클로날 항체 M79(Gottlinger, Int. J. Cancer 38(1986), 47-53)의 Fd-무거운 사슬 절편(VH+ CH1)이 각각 인간 카파(kappa)가벼운 사슬과 람다(lamda) 가벼운 사슬 레퍼토리와 각각 결합한다. 그 결과 라이브러리는 필라멘투스 파지 상에 표시되고, 고정된 재조합 인간 17-1A 항원에 대한 수회의 패닝

(panning)에 의해 생체외에서 선택된다. 가용성 Fab 단편은 항원 결합을 위해 수 차례 패닝 후 여러 개의 클론으로부터 발현되고 ELISA를 사용하여 스크리닝된다. 패닝과정에서 증가된 강한 결합체 각각은 서열 분석에 의해 동일한 인간 카파 가벼운 사슬을 함유하고 있음이 밝혀졌다. K8로 불리는 인간 가벼운 사슬은 인간 Ig-D 무거운사슬 라이브러리와 결합되어 다시 필라멘투스 파지에서 표시되고, 고정된 재조합 인간 17-1A 항원에 대한 수 차례의 패닝 후 생체외에서 선택된다. 여러 개의 Fab단편이 항원 결합을 위해 각 회 패닝된 후 여러개의 클론으로부터 발현되고 ELISA에 의해 스크린된다. 패닝 과정에서 증가된 결합체의 서열 분석결과 D4.5와 D7.2로 불리는 두 개의 다른 무거운 사슬-가변영역이 밝혀졌다. 이들은 각각 K8-가벼운 사슬과 결합하여 인간 17-1A항원에 특이성을 갖는 서로 다른 인간항원 결합위치를 형성한다. 인간 가벼운 사슬 레퍼토리와 무거운 사슬 레퍼토리는 IgD-무거운 사슬에 특이성이 있을 뿐아니라 카파 또는 람다 가벼운 사슬에 특이성 있는 RT-PCR을 이용함으로써 여러 명의 기증자의 인간 혈액 및 골수 샘플에서 분리된 전체 RNA의 몇 가지 표본으로부터 복제된다. 만약, IgD-포지티브 B세포가 RNA제조를 위해 정제되지 않는다면, 체내에서 IgD 무거운 사슬과 결합하는 가벼운 사슬 레퍼토리를 선택적으로 증가시키는 것이 불가능하기 때문에, 사용된 가벼운 사슬 라이브러리는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 또는 아네르기성의 B-림프구의 항체 레퍼토리로 제한되지 않는다. 그러나, 항원 인식에서의 무거운 사슬의 우세로 인하여, 이는 자기항원에 대한 인간항체의 선별을 위한 IgD-레퍼토리의 잇점을 실질적으로 손상시키지 않는다. 또한 이와같은 가벼운 사슬의 인간면역시스템 선별에 대한 노출로 인하여 인간에게서 낮은 면역원성을 나타낸다는 특징을 보증하게 된다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서는 상기 대용 사슬이 쥐의 VH 또는 VL사슬이다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서는 상기 적당한 조합의 선별은,

(a) 상기 인간 항원에 결합하기 위한 서로 다른 다양한 VL사슬과 결합된 하나 및 그와 동일한 VH사슬을 테스트하고, 또는

(b) 상기 인간 항원에 결합하기 위한 서로 다른 다양한 VH사슬과 결합된 하나 및 그와 동일한 VL사슬을 테스트하는 과정을 포함한다.

상기 실시의 형태는 만약 VL 또는 VH사슬이 인간 목표분자와 특정적으로 상호작용하는 것이 알려진 경우에는 효율적으로 사용될 수 있다. 그리고 적당한 제 2사슬이 목표분자에 대한 결합을 향상시키기 위해 선택될 수 있다.

본 발명에 의한 방법의 바람직한 실시의 형태에서는 또한 상기 방법은 선별단계 후에 인간 VH와 VL사슬 또는 그에 해당하는 핵산을 입수하여, 상기 사슬을 동일하거나 다른 VH 또는 VL사슬과 융합하여 무거운 사슬(CH) 또는 가벼운 사슬(CL) 또는 그들의 일부의 면역글로블린의 불변 영역(constant region) 또는 펩타이드, 단백질, 핵산, 작은 조직세포, 호르몬, 신경전달체, 펩티도미닉(peptidominic), PNAs 등의 생물학적으로 활성인 분자로 만든다(Milnr, Nature Medicine 1 (1995), 8879-880; Hupp, Cell 83(1995), 237-245;Gibbs and Oliff, Cell 79(1994), 193-198). 다른 기능적인 분자는 예를 들면 화학적인 수단에 의해 VH와 VL사슬에 물리적으로 연결되거나 공지된 재조합 DNA기술에 의해 융합될 수 있다.

본 발명의 실시의 형태는 인간 체내에서 원하는 목표항원에 사용가능한 특정한 약을 개발하는데 특히 유용하다. 예를 들면, 종양항원이 목표일 경우, VH와 VL사슬은 핵산 또는 아미노산 수준에서 독성 부분과 융합되어 면역독성으로 만들거나 세포수용체의 세포 외 부분(extracellular portion) 또는 가용성 시토킨 또는 그 일부와 각각 융합하여 항-종양면역반응을 강화하도록 하거나, 또는 항체-Fv-단편과 융합하여 이중 특이성을 갖는 항체 유도체를 생성하게 된다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에서는 상기 불변 영역의 사슬은 인간 IgG1 또는 IgG3에서 유래된다.

인간 IgG1 또는 IgG3의 불변 영역 사슬은 목표항원을 발현하는 세포가 체내에서 반드시 파괴되어야 하는 경우 특히 유용하게 사용된다. 이들 IgG-서브클래스가 항체의존세포독성(ADCC;Antibody Dependent Cellular Cytotoxity)을 조절하는데 효율적이며, 이들 항체 서브클래스에 의해 결합되고 인식된 세포의 파괴에 공헌한다는 사실은 널리 알려져 있다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에 의하면, 상기 VH 및/또는 VL사슬은 방사성동이원소 또는 화학치료에 사용되는 물질과 같은 낮은 분자량의 비프로테인 약물과 결합하여 상기 약물의 생체내 목표에 대한 특이성을 강화시킨다.

본 발명에 의한 방법의 또 다른 바람직한 실시의 형태에 의하면, 상기 VH 또는 VL사슬은 기본적으로 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구 또는 아네르기성 인간 B세포에서 유래되는 mRNA의 RT-PCR 증폭의 결과인 핵산서열로부터 발현된다.

RT-PCR에 의한 VH 또는 VL사슬을 확대하기 위해 일단 그것의 적당한 근원이 동정되고, 분리되는 것이 바람직하다. RT-PCR에 의해 VH 또는 VL사슬을 확대하기 위해서는 인간골수 또는 보다 바람직하게는 사람 혈액의 유핵세포의 mRNA를 사용하는 것이 바람직한데, 이는 이들 조직부분이 인간에게서 가장 쉽게 이용가능한 B-세포 근원이기 때문이다. 또한 RNA 준비 전에 마그네틱 비드 또는 세포분류에 기초한 흘림세포계측법(flow cytometry)을 이용하여 상기 조직의 유핵세포로부터 아네르기성 B-세포 또는 보다 바람직하게는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구를 분리하는 것이 바람직하다. RT-PCR에 의해 확대된 VH와 VL사슬 모두를 보증하는 이들 절차는 B-세포군에서 유래된다. 또한 만약 상기 조직으로부터의 유핵세포의 모든 부분의 mRNA가 RT-PCR에 의해 VH 또는 VL사슬의 확대에 사용되었다면, 예를 들면 성숙한 초회항원 자극되지 않은 인간 B-림프구와 아네르기성 인간-B세포에서만 발현되는 인간 IgD-무거운 사슬으로부터 배타적으로 PCR-생성물을 만드는 표 1에 열거된 IgD-특이성을 갖는 3' PCR-프라이머를 사용하여 인간 IgD의 무거운 사슬 Fd-절편(VH-CH1)의 절반으로 VH-영역을 확대하는 것이 바람직하다.

본 발명에 의한 방법의 바람직한 실시의 형태에서는 또한 인간에게 면역원성이 낮거나 면역원성이 없는 항-인간 항원 수용체가 제공되며, 상기 수용체는 기본적으로 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구 또는 기본적으로 아네르기성인 인간 B-세포로부터 얻어진 기능적으로 재배열된 VH 및 VL사슬을 조합하여 구성되고, 상술한 본 발명에 의한 방법에 의해 얻어진다.

본 발명의 항체의 잇점은 상술한 설명에서 대략 설명되었다. 인간 항원에 대해 작용하며, 인간을 근원으로 하여 얻어지며, 인간에게서 면역원성이 낮거나, 면역원성이 없는 대응항체는 종래 기술에서는 분리되지 못했었다. 따라서 본 발명에 의한 항체는 약학 및 의약의 다양한 분야에서 이용가능한 항체에 대한 새로운 개발의 시작이 된다.

본 발명에 의한 방법의 바람직한 실시의 형태에서는 또한 상기 수용체는 항체 또는 그 단편이다.

본 발명에 의한 방법의 바람직한 실시의 형태에서는 상기 수용체는 인간 종양 항원, 특히 가장 바람직하게는 인간 17-1A 항원에 대해 특이성을 갖는다.

본 발명의 수용체는 또한 상기 VH사슬이 도 7에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-381)과 도 8에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-339) 중 하나로 구성되고, 상기 VL사슬은 도 6에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321)과 도 9에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321) 중 하나로 구성된다.

본 발명은 또한 본 발명의 수용체를 구성하는 VH사슬 또는 그 일부에 관한 것이다.

본 발명은 또한 본 발명의 수용체를 구성하는 VL사슬 또는 그 일부에 관한 것이다.

본 발명에 의한 방법의 특히 더 바람직한 실시의 형태에서는 상기 VH사슬의 일부는 CDR3영역이다.

또한 본 발명은 기능적으로 재배열된 VH와 VL면역글로블린 사슬의 조합으로 구성되는 키트에 관련된 것으로 VH사슬과 VL사슬 중 적어도 하나는 초회항원 자극되지 않은 성숙한 인간 B-림프구 또는 아네르기성인 인간 B세포에서 분리된 것으로 상기 사슬은 생체외 디스플레이 시스템에서 재조합벡터로부터 발현가능하다.

상기 키트는 본 발명의 방법을 수행하는 데 유용하며, 따라서 원하는 특이성의 수용체를 얻는데 유용하다.

바람직하게는 상기 키트에서 상기 생체외 디스플레이 시스템은 파지 디스플레이 시스템이다.

본 발명은 또한 인간 17-1A 항원에 대해 특이성을 갖는 인간 서열에서 유래한 항체에 관한 것이다.

본 발명의 방법에 의하면, 우선 인간 17-1A에 대해 특이성을 갖는 인간항체가 개발된다. 이미 지적한 바와 같이 항원과 결합된 인간종양에 대한 인간의 항체는 면역시스템의 자기내성을 조절하는 메커니즘을 갖게 되기 때문에 생체내에서 자동반응하는 항체를 발현하는 B-림프구를 제거하게 되므로 이것은 간단한 작업이 아니다. 알려진 종양결합항원 17-1A(tumor associated antigens 17-1A)는 상피종양의 발현외에도 다른 종양의 항원에 비해 보통 상피조직의 넓은 영역에서 편재되어 발현된다. 그러므로 17-1A 항원은 현재 종양항원보다는 범-상피항원(pan-epithelial antigen)을 나타내는 것으로 간주된다. 반면, erb-B2(Her 2/neu), Muc-1(PEM) 또는 톰슨-프리드리히항원(Thomson-Friedreich) 등 상피종양에서 발견되는 소위 종양항원들은, 일반적으로 보통의 상피 조직에서 훨씬 제한된 발현배턴을 나타낸다. 따라서 이 항원의 편재성으로 인하여 B세포가 장기간 17-1A 항원을 마주치지 않는 것은 거의 불가능하기 때문에 친화력(affinity)이 낮더라도 17-

1A 반응성 항체를 발현하는 B-림프구에 대한 자기내성의 선택력은 예외적으로 크게 된다. 그러므로 본 발명에 의해 발견된 바에 의하면 17-1A에 특이성을 갖는 항원 또는 적어도 그에 대응하는 무거운 사슬은 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구와 같은 인간 B-세포의 항체 레퍼토리에서 분리될 수 있다. 이들 B-세포는 생체내에서 수명이 길고, 성숙 위치(site of maturation)에서조차 17-1A 항원의 존재에도 불구하고 그들의 성숙 이전의 고갈을 피할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 형태의 B-세포의 내성이 가용성 자기 항원에 의해서만 유도되기 때문에 17-1A 항원의 경우에는 B-세포의 아네르기는 발생하지 않는다. 잠재적인 17-1A 반응성에도 불구하고 장기간 생존하는 B-세포만이 인간 면역글로블린 가변 영역의 레퍼토리를 나타내고, 즉, 인간에게 반복적이며 체계적으로 투여되도록 만들어진 인간항체 및 항체의 유도체의 생성에 사용되었을 때 인간의 면역시스템에 대해 충분히 내성을 갖을 수 있다. 이것은 면역시스템의 감시기능에 의해 면역원성 서열에서 이미 스크리닝되고 제거되었기 때문이다. 그러므로 상기의 높은 생체내 친화성(compatibility)을 갖는 인간 항체서열은 예를 들면, 본 발명에 의한 방법에 의해 건강한 인간의 B-세포 레퍼토리에서 또한 발견될 수 있으므로, 본 발명은 또한 17-1A항원에 대해 특이성을 갖고, 또한 얻어진 방법에 관계없이 생체내에서 반복적으로 사용되기에 적합한 인간항체에 관한 것이다. 따라서 이제 처음으로 17-1A 항원을 수반하는 종양세포의 감시 및/또는 파괴에 유용하게 사용가능한 인간항체가 개발된 것이다.

따라서 본 발명의 항체는 인간에게 면역원성이 낮거나 비면역원성이라는 잇점을 갖는다. 바람직한 실시의 형태에서, 상기 항체는 상술한 방법에 의해 얻을 수 있다. 또 다른 실시의 형태에서는 본 발명의 항체는 바람직하게는 펩타이드 번호 8, 11, 13, 14, 59, 60, 77, 79의 아미노산 서열 중 적어도 하나로 구성되는 17-1A 항원의 세포 외 영역(extracellulary domain)의 에피토프를 인식한다. 바람직하게는 본 발명의 항체의 VH사슬은 도 7에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-381)과 도 8에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-339) 중 하나의 적어도 하나의 CDR로 구성되고, 및/또는 VL사슬은 도 6에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321) 및 도 9에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321) 중 적어도 하나의 CDR로 구성된다. 특히 바람직한 것은 상기 VH사슬이 도 7에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-381)과 도 8에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-339) 중 하나로 구성되고, 상기 VL사슬은 도 6에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321)과 도 9에 도시된 서열(뉴클레오티드 1-321) 중 하나로 구성되는 항체인 경우이다.

상기 수용체와 바람직하게는 낮은 면역원성으로 선택된 항체 레퍼토리는 인간 IgD-항체 라이브러리에서 가장 잘 나타난다. IgD는 만일 그들이 유전자 결여를 초래하는 다가 자기항원 또는 배타적인 형태의 일차 여포로 인하여 아네르기성 및 단명을 초래하는 가용성 일가 자기항원과 마주치지 않는다면 2차 림프계 조직으로 이동하는 동안 1차 여포로 들어가는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구 상에 표면 IgM과 함께 세포막 항원 수용체로서 발현된다. 가용성 일가 자기항원과 접촉하여 아네르기성으로 되는 단명의 B-세포의 항체레퍼토리를 나타내는 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B-림프구 인간 IgD-라이브러리를 제외하고는 특정 결합체가 아네르기성 B-세포 대신 유전자 결여를 초래하는 다가 자기-항원과 유사한 인간 세포표면 분자에 특이적 결합체를 제공하지 않는다.

또한 본 발명은 본 발명의 일부를 구성하는 상술한 수용체 중 적어도 하나가 단독으로 사용되거나 또는 약학적으로 수용가능한 담체 또는 부형제와 조합하여 구성된 약학적 조성물에 관계된 것이다. 상기 적절한 약학적 담체의 예는 알려진 인산완충된 염 수용액, 물, 물/기름의 에멀젼과 같은 에멀젼, 다양한 형태의 침윤제(wetting agent), 살균용액 등이있다. 상기 담체를 포함하여 구성되는 조성물은 널리 알려진 종래의 방법에 의해 처방될 수 있다.

이들 약학적 조성물은 적절한 복용량으로 투여될 수 있다. 적절한 조성물의 투여는 예를 들면, 정맥투여, 복강 내 투여, 피하투여, 근육내투여, 국부 또는 내피투여 등의 다양한 방법으로 가능하다.

따라서 본 발명은 치료용, 종양의 방지 및/또는 지연용의 약학적 조성물의 제조를 위해 본 발명의 방법에 따라 제조된 수용체 또는 그 일부를 사용하는 용도에 관한 것이고, 바람직하게는 종양은 상피에서 기원한 것이다.

도 1 은 중요 제한위치에 의한 pComb3H의 클로닝위치를 나타낸다.

다음의 약자를 사용한다: 프로모터(promotor)는 P; 가변 가벼운 사슬영역(variable 가벼운 사슬 domain)은 VL, 불변 가벼운 사슬영역(constant 가벼운 사슬 domain)은 CL, 가변 무거운 사슬영역(variable 무거운 사슬 domain)은 VH, 불변 무거운 사슬영역1(constant 무거운 사슬 domain)은 CH1, 유핵 선도 배열(procaryotic leader sequence)은 L1/2라고 한다. pComb3H에서 유전자III로 지정된 영역은 예컨대 VCSM13과 같은 페라멘투스 파지의 유전자의 III 생성물에서 비감염부분을 암호화한다.

도 2는 pComb3H-플라스미드와 완전히 발현된 M13-파지의 도식. pComb3H 위에 리더(L) ompA, 가벼운 사슬, 리더(L) pelB, 무거운 사슬 및 유전자III가 도시되어 있다. 완전히 발현된 M13-파지는 가벼운 사슬 및 유전자III 생성물의 비감염부

분(non-infectious part)에 연결된 무거운 사슬의 Fd-절편(VH+ CH1)을 포함하는 일정한 Fab 항체-절편의 표현형을 표면에 나타내고, 표시된 Fab-단편의 가벼운 사슬 및 무거운 사슬을 코딩하는 단일가닥 DNA로서 대응 유전자형을 포함한다. 감염 유전자III-단백질은 헬퍼 파지 VCSM13에 의해 제공된다.

도 3은 가용성 Fab-단편의 ELISA이다. 각각 키메라화된 M79의 Fd-절편 및 클론마다 단일 인간 카파 사슬을 포함하는 가용성 Fab-단편의 페리플라즈마 표본을 준비한다. ELISA 플레이트를 가용성 17-1A 항원과 함께 하룻밤 배양한다. 결합된 Fab-항체 단편의 검출은 페록시다제(peroxidase)가 결합된 폴리클로날 항인 간 면역글로블린 항체를 이용하여 행한다. ELISA는 ABTS-기질 용액(ABTS=2,2 Azino-bis(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산))을 첨가하고 405nm(y축)의 파장에서 측정된 기질 반전을 측정함으로써 완료된다. 클론은 x축에 존재하고 첫 번째 숫자는 패닝 횟수를 가리키고 두 번째는 클론의 번호이다. 클론 1.5-9는 하나의 랜덤 카파사슬과 키메라 M79 Fd 단편의 조합을 포함하고 네거티브 컨트롤(negative control)을 나타낸다.

도 4는 가용성 Fab 단편의 ELISA이다. 각각 k8 가벼운 사슬 및 단일의 인간 Ig 델타사슬 Fd-절편을 포함하는 가용성 Fab-단편의 페리플라즈마 표본을 준비한다. ELISA 플레이트를 가용성 17-1A 항원과 함께 하룻밤 배양한다. 결합된 Fab-항체 단편의 검출은 페록시다제가 결합된 스트렙타아비딘(streptavidine)과 바이오타이닐레이트된(biotinylated) 폴리글로날 항인간 카파 가벼운 사슬 항체를 이용하여 행한다. ELISA는 ABTS-기질 용액(ABTS=2,2 Azino-bis(3-에틸벤즈아졸린-6-술폰산))을 첨가하고, 405nm(y축)의 파장에서 기질 반전을 측정함으로써 완료된다. 클론은 x축에 존재하고 첫 번째 숫자는 패닝의 횟수를 가리키고 두 번째 숫자는 클론의 번호이다. 클론 1.2-6은 하나의 랜덤 Ig 델타 무거운 사슬 Fd 절편과 k8 가벼운 사슬의 조합을 포함하고 네거티브 컨트롤을 나타낸다.

도 5는 가용성 Fab 단편의 ELISA이다. 각각 D4.5 Fd-절편 및 클론마다 단일 인간 카파 사슬를 포함하는 가용성 Fab-단편의 페리플라즈마 표본을 준비한다. ELISA 플레이트를 가용성 17-1A 항원과 함께 하룻 밤 배양한다. 결합된 Fab-항체 단편의 검출은 페록시다제가 결합된 스트렙타아비딘과 바이오타이닐레이트된 폴리클로날 항인간 카파 가벼운 사슬 항체를 이용하여 행한다. ELISA는 ABTS-기질 용액(ABTS=2,2 Azino-bis(3-에틸벤즈티아졸린-6-술폰산))과 405nm(y축)의 파장에서 기질 반전을 측정함으로써 완료된다. 클론은 x축에 존재하고 첫 번째 숫자는 패닝의 횟수를 가리키고 두 번째 숫자는 클론의 번호이다. S.는 선택의 제 1회 선별 전의 클론에 대한 약칭이다. 클론 S.1-3은 하나의 랜덤 Ig 델타 무거운 사슬 Fd 절편과 k8 가벼운사슬의 조합을 포함하고 네거티브 컨트롤을 나타낸다.

도 6은 인간 카파 8 가벼운 사슬 가변영역의 DNA- 및 단백질-서열이다. 번호는 뉴클리오티드(nt) 위치를 나타내고, 아미노산은 단일 문자코드로 표시된다. CDR1은 nt70에서 nt102까지 포함하고, CDR2는 nt148에서 nt168까지 포함하고, CDR3은 nt265에서 nt294까지 포함한다.

도 7은 인간 D4.5 무거운 사슬 가변영역의 DNA-서열이다. 번호는 뉴클리오티드(nt) 위치를 나타내고, 아미노산은 단일 문자코드로 표시된다. CDR1은 nt91에서 nt105까지 포함하고, CDR2는 nt148에서 nt198까지 포함하고, CDR3은 nt292에서 nt351까지 포함한다. 무거운 사슬 가변영역과 Ig 델타 불변영역의 CH1 영역 사이의 경계는 nt384에서 시작하는 델타 불변영역 단백질 서열에 의해 nt382와 nt383 사이에 위치한다.

도 8은 인간 D7.2 무거운 사슬 가변영역의 DNA-서열이다. 번호는 뉴클리오티드(nt) 위치를 나타내고, 아미노산은 단일 문자코드로 표시된다. CDR1은 nt91에서 nt105까지 포함하고, CDR2는 nt148에서 nt198까지 포함하고, CDR3은 nt292에서 nt309까지 포함한다. 무거운 사슬 영역과 Ig 델타 불변영역의 CH1 영역 사이의 경계는 nt343에서 시작하는 델타 불변영역 단백질 서열에 의해 nt340과 nt341 사이에 위치한다.

도 9는 인간 카파 5.1 가벼운 사슬 가변영역의 DNA- 및 단백질-서열이다. 번호는 뉴클리오티드(nt) 위치를 나타내고, 아미노산은 단일 문자코드로 표시된다. CDR1은 nt70에서 nt102까지 포함하고, CDR2는 nt148에서 nt168까지 포함하고, CDR3은 nt265에서 nt294까지 포함한다.

도 10은 k8-D4.5-Fab 단편을 포함하는 페리플라스마 표본의 결합 활성(binding activity)을 테스트하기 위해 17-1A 포지티브 카토 세포에서 Fab 항체-단편 컨트롤 항체 M79의 흘림 세포계측법 분석이다. 카토세포는 a)관련없는 페리플라즈마 표본, b)10μg/ml 키메라(2가!)Mn9, c)k8-D4.5 페리플라즈마 표본, d)k8-D4.5 페리플라즈마 표본의 1:10 희석액과 함께 배양되었다. 상대 세포수는 y축에 표시되고, 상대적인 형광밀도는 x축에 표시된다.

*도 11은 k8-D4.5-, k5.1-D4.5 또는 관련없는 k-D4.5-Fab-단편을 포함하는 페리플라즈마 표본(pp)의 결합활성을 테스트하기 위해 17-1A 포지티브 카토 세포, 17-1A 트랜스펙트된(transfected) CHO-세포와 트랜스팩트되지 않은 CHO-세포 각각에서 Fab 항체 단편 및 완전한 항체의 흘림 세포계측법 분석이다. 카토-세포는 a)관련없는 페리플라즈마 표본

(파선) 또는 k5.1-D4.5-pp(실선), b)20μg/ml M79-항체(실선) 또는 대응하는 쥐 IgG2a 아이소타입 컨트롤(파선)과 함께 배양된다. 17-1A-트랜스펙트된 CHO-세포는 c)관련없는 페리플라즈마 표본(파선) 또는 k5.1-D4.5-pp(실선), d)관련없는 페리플라즈마 표본(파선) 또는 k8-D4.5-pp(실선), 또는 e)20μg/ml M79-항체(실선) 또는 대응하는 쥐 IgG2a 아이소타입 컨트롤(파선)과 함께 배양된다. b), d), e)에서 관련된 pp(각각, k5.1-D4.5Fab-pp 및 k8-D4.5-Fab-pp)와 쥐의 항체 M79의 배양과 검출은 트랜스펙트되지 않은 CHO-세포(점선)에서 또한 수행되었다. 상대 세포의 수는 y축에 나타내고, 상대 형광밀도는 x축에 나타낸다.

도 12는 중요 제한위치에 의한 pEF-ADA의 클론위치를 나타낸다. 다음의 약자를 사용한다: 프로모터(promotor)는 P, 가변 가벼운 사슬영역(variable 가벼운 사슬 domain)은 VL, 불변 가벼운 사슬영역(constant 가벼운 사슬 domain)은 CL, 유핵 선도 배열은 Leuc라고 한다.

도 13은 중요 제한위치에 의한 pEF-DHFR의 클론위치를 나타낸다. 다음의 약자를 사용한다: 프로모터(promotor)는 P, 가변 무거운 사슬영역(variable 무거운 사슬 domain)은 VH, 불변 무거운 사슬영역1/2/3(constant 무거운 사슬 domain 1/2/3)은 CH1/2/3, 유핵 선도배열은 Leuc라고 한다.

도 14는 인간 항체 H79 표본의 SDS-PAGE이다. 약 10μg의 각 항체는 환원 및 비환원 조건하에서 12.5% 변성 폴리아크릴아미드-겔에서 실시되어 쿠마시 블루로 착색된다.

레인1 : 마커(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW[kDa])

레인2 : H79 인간 IgG1-버젼(비환원)

레인3 : 환원 조건 하의 H79 인간 IgG1-버젼

레인4 : H79 쥐 IgG1-버젼(비환원)

레인5 : 환원 조건 하의 H79 쥐 IgG1-버젼

도 15는 인간 항체 H79와 HD70 표본의 SDS-PAGE이다. 10μg의 H79와 3.5μg의 HD70은 비환원(겔1) 및 비환원(겔2) 조건 하의 12.5% 변성 폴리아크릴아미드-겔에서 실시되어 쿠마시 블루로 착색된다.

겔1: 레인1 : 마커(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW[kDa])

레인2 : H79 인간 IgG1-버젼(비환원)

레인3 : HD70 인간 IgG1-버젼(비환원)

겔2: 레인4 : Marker(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW[kDa])

레인5 : 환원 조건 하의 H79 인간 IgG1-버젼

레인6 : 환원 조건 하의 HD70 인간 IgG1-버젼

도 16은 정제된 H79 쥐 IgG1와 정제된 H79 인간 IgG1의 결합 활성을 테스트하기 위한 17-1A 포지티브 카토 세포의 흘림세포계측법이다. 카토-세포는 IgG 아이소타입-컨트롤(각각, 10μg/ml의 인간 IgG1과 쥐IgG1), 포지티브 컨트롤(각각, 10μg/ml의 M79와 키메라 M74);(모두 17-1A 특이성) 및 H79 인간 IgG1 또는 H79 쥐 IgG1(각, 10μg/ml과 1μg/ml)와 함께 배양된다. 상대 세포의 수는 y축에 나타내고, 상대 형광밀도는 x축에 나타낸다.

도 17 은 정제된 항체 H79 인간 IgG1, H79 쥐IgG1, HD70, D7.2, M79, 파노렉스(panorex) 및 아이소타입 컨트롤(인간 IgG1, 쥐 IgG1과 2a)의 결합 활성을 테스트하기 위한 17-1A 포지티브 카토 세포, 17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포와 트랜스펙트되지 않는 CHO-세포에서 항체(각각, 농도:20μg/ml)의 흘림 세포 계측법이다. a)카토-세포의 H79 인간 IgG1(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), b)카토-세포의 H79 쥐 IgG1(실선)과 쥐 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), c)카토-세포의 HD70(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), d)카토-세포의 D7.2(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), e)카토-세포의 M79(실선)과 쥐 IgG2a 아이소타입 컨트롤(파선), f)카토-세포의 파노렉스(실선)과 쥐 IgG2a 아

이소타입 컨트롤(파선), g)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 H79 인간 IgG1(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), h)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 H79 쥐 IgG1(실선)과 쥐 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), i)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 HD70(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), j)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 D7.2(실선)과 인간 IgG1 아이소타입 컨트롤(파선), k)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 M79(실선)과 쥐 IgG2a 아이소타입 컨트롤(파선), l)17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포의 파노렉스(실선)와 쥐 IgG2a 아이소타입 컨트롤(파선). 도 17(l)은 트랜스펙트되지 않은 CHO-세포(점선)의 적절한 항체의 배양 및 검출의 결과를 보여준다.

도 18은 ^{51}Cr 항체 의존 세포독성 분석결과이다. ^{51}Cr 방출(release)을 위해 이펙터 세포(effector cell)로서의 비자극 인체 주변 혈액의 단핵 세포(unstimulated human peripheral blood monomuclear cell)(PBMCs, 5×10^5 세포)가 표지된 목표세포(^{51}Cr로 2시간 동안 표지된 카토-세포) 및 항체와 함께 37℃에서 4 내지 20시간 동안 다른 농도에서 배양된다. 대응되는 비결합 아이소타입(h-IgG=인간 IgG1; mIgG2a=쥐 IgG2a)이 네거티브컨트롤(H79=H79huIgG1)로서 사용된다. 특정의 붕괴(lysis)가 ((cpm, 실험 방출값) -(cpm, 자발 방출값))/((cpm, 최대 방출값) - (cpm, 자발 방출값))로서 계산된다.

도 19는 M79(포지티브) 컨트롤로 착색된 건강한 인간의 결장 조직의 광학 현미경 사진이다. 정상 점막 조직의 저온부(cryosection) 5nm를 포지티브컨트롤(10㎍/㎖)로서 쥐의 M79항체(IgG2a)와 배양한다. 결합된 쥐의 항체 검출은 페록시다제 결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 이루어지고 카바졸(브라운)로 착색된다. 그리고 헤말란(블루)으로 카운터 염색(counter staining)된다.

도 20은 H79쥐의 IgG1로 착색된 건강한 사람의 결장 조직의 광학 현미경 사진이다. 정상 점막 조직의 저온부 5nm가 H79 항체의 쥐의 IgG버전(10㎍/㎖)과 배양된다. 결합된 쥐의 IgG1 항체의 검출은 페록시다제 결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터 착색(counter staining)된다.

도 21은 M79(포지티브 컨트롤)로 착색된 결장암의 광학 현미경 사진이다. 결장암의 저온부(cryosection) 5nm는 포지티브 컨트롤로서 쥐의 M79 항체(10㎍/㎖)와 배양된다. 결합된 쥐의 IgG1 항체의 검출은 페록시다제 결합된 폴리크로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터착색된다.

도 22는 H79 쥐의 IgG1으로 착색된 결장암의 광학현미경 사진이다. 결장암 조직의 저온부(cryosection) 5nm는 H79항체의 쥐의 IgG1버전(10㎍/㎖)과 배양된다. 결합된 쥐의 IgG1 항체의 검출은 페록시다제 결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 염색된다. 헤말란(블루)으로 카운터 착색된다.

도 23은 쥐의 IgG2a 아이소타입 컨트롤로 착색된 건강한 인간의 결장조직의 광학 현미경 사진이다. 정상점막조직의 저온부(cryosection) 5nm가 네거티브컨트롤로서 관계없는 쥐의 IgG2a 항체(10㎍/㎖)와 배양된다. 결합된 쥐의 IgG1 항체의 검출이 페록시다제결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터착색된다.

도 24는 IgG1 아이소타입 컨트롤로 착색된 건강한 인간 결장 조직의 광학 현미경 사진이다. 정상 점막 조직의 저온부(cryosection) 5nm가 네거티브 컨트롤로서 무관한 쥐의 IgG1항체(10㎍/㎖)와 배양된다. 결합된 쥐의 항체의 검출이 페록시다제결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터착색된다.

도 25는 쥐의 IgG2a 아이소타입 컨트롤로 착색된 인간의 결장암 조직의 광학 현미경 사진이다. 정상점막조직의 저온부 5nm가 네거티브컨트롤로서 무관한 쥐의 IgG2a 항체(10㎍/㎖)와 배양된다. 결합된 쥐의 항체의 검출이 페록시다제결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터착색된다.

도 26은 쥐의 IgG1 아이소타입 컨트롤로 착색된 인간 결장암 조직의 광학 현미경 사진이다. 정상 점막 조직의 저온부 5nm가 네거티브 컨트롤로서 무관한 쥐의 IgG1항체(10㎍/㎖)와 배양된다. 결합된 쥐의 항체의 검출이 페록시다제결합된 폴리클로날 항-쥐-Ig 항체에 의해 수행되고 카바졸(브라운)로 착색된다. 헤말란(블루)으로 카운터착색된다.

도 27은 쥐의 항체 M79와 인간의 항체 H79, HD70의 에피토프 분석으로 각각 인간 17-1A 항원에 대해 특이성을 갖는다. 항체는 인간 17-1A 항원의 전체 세포외 아미노산 서열을 포함하며, 두 개의 아미노산이 이동한 13개의 아미노산으로 이루어진 119개의 폴리펩타이드로 구성된 펩타이드의 격자열로 배양된다. 상기 펩타이드는 C-말단에 개별 스포트로서 펩스포트 멤브레인(Pep Spots membrane)(Jerini Biotools, Berlin)과 공유결합한다. 결합된 쥐의 M79항체는 화학형광법(chemoluminescene)에 의해 HRP(horse radish peroxidase)와 결합된 항-쥐 면역글로블린 항체에 의해 Pep Spots

Membrane 상에 검출된다. 단일 펩타이드 스포트에 의한 2차 항체의 반응성으로 인한 신호는 Pep Spots Membrane의 해당하는 컨트롤 착색에서 나타난다. 펩타이드 스포트 87, 펩타이드 스포트 38과 95에서 주된 배경 착색을 제거함으로써 쥐의 항체 M79의 특이적 결합이 나타나게 된다. 수 개의 펩타이드 스포트에 의해 2차 HRP결합된 항-인간 면역글로블린 항체의 높은 교차반응성으로 인하여 결합된 인간 항체 H79와 HD70은 전기영동에 의해 Pep Spots Membraine에서 블퍼팅 멤브레인(blotting membrane)으로 이동하고, 상기 항 인간 2차 항체와 화학형광법에 의해 검출된다. 인간 항체 H79의 특이적 결합은 펩타이드 스포트 8, 11, 13, 14, 59-60, 77,79에서 주로 검출되지만, 인간 항체 HD70의 경우에는 결합이 검출되지 않는다.

실시예 1 : 조합 항체 라이브러리의 구축과 파지 디스플레이

인간 면역글로블린(Ig) 가벼운 사슬 및 Ig 무거운 사슬 Fd-DNA 단편의 라이브러리는, Chomczynski의 분석생화학(Analytical Biochemistry) 162(1987) 156-162의 기재에 따라 RT-PCR에 의해, 각각, 4명 및 10명의 인간 기증자의 말초 혈액 림프구(PBL)와 골수 샘플로부터 제공된 전체 RNA에 대해 카파, 람다 및 Fd 델타 고유 프라이머 세트로 구성하였다. cDNA는 표준방법(Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, second edition)에 따라 합성하였다.

무거운 사슬 단편에 대해서 5'-Xhol 및 3'-Spel 인식 위치와, 가벼운 사슬에 대해서 5'-Sacl 및 3'-Xbal 인식 위치를 발생시키는 프라이머 세트를 선택하였다:

델타 Fd cDNA-단편의 PCR증폭을 위해, 5개의 다른 5'-VH족 고유 프라이머를 각각 하나의 3'-CH1 델타 프라이머와 결합하였다. 카파(K) 가벼운 사슬의 PCR증폭을 위해, 5개의 다른 5'-VK족 고유 프라이머를 각각 하나의 3'-CK 프라이머와 결합하였다. 람다(L) 가벼운 사슬 단편의 증폭을 위해, 8개의 다른 5'VL족 고유 프라이머를 하나의 3'-CL 프라이머와 결합하였다.

Fab DNA-단편의 증폭을 위한 프라이머 세트(5'~3')가 이하 표 1에 도시되어 있다.

증폭을 위해 다음의 PCR프로그램을 사용하였다:

94℃에서 15초 동안 변성(denaturation), 52℃에서 50초 동안 프라이머 어닐링(annealing), 40회의 72℃에서 90초 동안의 프라이머 신장(extension), 그리고 나서 72℃에서 10분간의 최종 신장(extension)

[표 1a]

프라이머세트

무거운 사슬 Fd-단편

5′ 프라이머

VH1,3,5,7: AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG

VH2: CAG(AG)TCACCTTGCTCGAGTCTGG

VH4: CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG

VH4B: CAGGTGCAGCTACTCGAGTGGGG

VH6: CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3′ 프라이머

CD1: TGCCTTACTAGTCTCTGGCCAGCGGAAGAT

카파사슬 단편

5′ 프라이머

VK1: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC

VK3: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTG(AT)TGAC(AG)CAGTCTCC

VK2/4: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGATGAC(CT)CAGTCTCC

VK5: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC

VK6: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCTCC

3′ 프라이머

CK1D:

GCGCCGTCTAGAATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGA

CGGGCGAACTCAG

[표 1b]

람다사슬 단편

5′ 프라이머

VL1: AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC

VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG

VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG

VL4: TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG

VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC

VL6: CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC

VL7: CAGGTTGAGCTCACTCAACCGCCC

VL8: CAGGCTGAGCTCACTCAGCCGTCTTCC

3′ 프라이머

CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG

카파 가벼운 사슬 단편(SacI과 XbaI로 다이제스트) 450ng을 pComb3(Barbas, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 88(1991) 7978-7982)으로부터 유도된 파지미드(phagmid) pComb3H(SacI과 XbaI로 다이제스트;대형 DNA단편) 1400ng과 접합하고 여기에서 무거운 사슬 위치는 17-1A단백질의 세포 부분에 작용하는 키메라화한 쥐 항체(M79)(인간 IgG1 (CH1) 함유)의 Fd단편에 의해 점유되어 있다(pComb3H 클로닝 위치는 도 1 참조).

이 결과 조합 항체 DNA 라이브러리는 전기영동(electroporation)(2.5㎸, 0.2㎝ 간격 cuvette, 25FD, 200Ohm, Biorad gene-pulser)에 의해 일렉트로컴피턴트(electrocompetent) 에스케리시아 콜리(Escherichia coli) XLI Blue 300㎕로 변형되었고 따라서 이 결과 4×10^{7} 라이브러리 크기의 독립적인 클론들이 되었다. 한 시간의 표현형 발현 이후에, pComb 벡터에 의해 코딩된 카베니실린 내성체에 대해 포지티브 형질변환체(transformant)가 선택되었다. 이 선택 이후에, 이 클론들은 필라멘터스(M13) 파지를 생성 및 분비하는 헬퍼 파지(VCSM13)의 1×10^{12} 파지 입자의 감염성 투여량으로 감염되었고, 이들 각각은 하나의 인간 가벼운 사슬과 키메라(M79)의 Fd절편을 코딩하는 한 가닥의 pComb3H-DNA를 포함하며, 파지 표면상의 대응 Fab 단편을 퍼지 코팅 단백질 III의 비감염 부분에 전이적 융합체로서 표시한다(파지 디스플레이, 도 2 참조).

상기 복제된 Fab 레퍼토리를 가지는 이 파지 라이브러리는 PEG8000/NaCl 침전 및 원심분리에 의해 배양 부유물로부터 수확되고, TBS/1% BSA에서 재용해되고, 96개 웰 ELISA 플레이트상에 고정된 재조합 s17-1A와 배양되었다. s17-1A는 상술한 바와 같이 준비되었다(Mack, Proc. Natl. Sci. U.S.A.92(1995) 7021-7025). 목표 항원과 특이적으로 결합하지 않은 Fab 파지는 TBS/0.5% Tween으로 10회 까지의 세정단계에 의해 제거되었다. 결합제는 pH2.2의 HCL-글리신을 사용하여 용 출되었고, pH 12의 2M Tris로 용출액을 중화한 후에 새로운 미감염 E.coli XL1 Blue 배양균의 감염에 이용하였다. 항원 결합 Fab 단편을 코딩하면서 pComb 파지미드(phagmid) 복제로 성공적으로 형질변환된 세포들은, 다시 카베니실린 내성에 대해 선택되었고, 그리고 나서 VCSM13 헬퍼 파지(helper phage)로 감염되어 제 2회의 항체 디스플레이와 생체외 선택을 시작하였다.

5회의 항원 결합 Fab 파지의 생성 및 선택 후에, 선택된 Fab 레퍼토리를 포함하는 플라스미드 DNA가 준비되었다.

가용성 Fab 단백질의 생성을 위해, 유전자 III DNA 단편이 플라스미드로부터 절리되고 따라서 유전자 III 단백질에 의해 Fd 무거운 사슬의 전이적 용융이 파괴되었다. 렐리게이션(religation) 후에, 이 플라스미드 DNA의 풀은 100㎕의 열 충격에 견디는 E. coli XL1 Blue로 형질변형되었고 카베니실린(Carb) LB- Agar 상에 플레이트된다. 단일 콜로니는 10㎖ LB-Carb-배양액/20mM $MgCl_2$에서 배양되었고 Fab 발현은 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(IPTG)를 최종 농도 1mM가 될 때까지 부가하므로써 6시간 후에 유도되었다. 이 가용성 Fab단편의 발현과 생체외 선택은 Burton 저, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(1991), 10134-10137에 따라 행하였다. 세포는 20시간 후에 수확되었다. 페리플라즈마(periplasma) 제조는 4회의 냉동(에탄올/드라이아이스)과 해동(37℃)에 의해 행해졌고, s17-1A에 결합한 Fab 단편에 대해 ELISA 테스트하였다. 27개의 클론 중 23개가 결합 활성을 나타내었다. 시퀀싱후에, 가장 강한 신호를 나타내는 2개의 클론(도 3 참조)이 동일한 카파 사슬을 가지는 것으로 나타났고 이를 k8로 칭하였다. 도 6을 참조하라.

상기 인간 카파 가벼운 사슬(k8)은 인간 Ig 델타 무거운 사슬 풀에 대한 결합 파트너로서 사용된다. 2250ng의 인간 델타 무거운사슬 Fd DNA 단편(XhoI과 SpeI에 의해 다이제스트된)이 가벼운 사슬부분에서 k8 DNA-단편을 함유하는 7000ng의 파지미드 벡터 pCombH(XhoI과 SpeI에 의해 다이제스트된 대형 DNA 단편)과 접합된다.

17-1A항원에 대해 특이적으로 결합하는 무거운사슬 가변 영역에 대한 근원으로서 인간 델타 사슬 레퍼토리를 선택한 것은 k8 가벼운 사슬과 결합할 경우 최적의 선택이다. 델타사슬은 아직 확산되지 않은 자기항원에 특이성을 갖는 아네르기성 B-세포 및 성숙한 초회항원 자극되지 않은 B세포에서만 생성된다. 그러므로 그들의 무거운 사슬 레퍼토리의 다양성은 보다 크고, 각각의 단일 특이성의 수는 다른 면역글로블린 아이소타입의 무거운 사슬 레퍼토리에 비해 낮다.

pComb-k8-델타-Fd-단편 라이브러리가 5개의 동등한 전기영동(2.5kv, 0.2cm 갭 큐벳, 25FD, 200 Ohm)에 의해 총 1500㎕의 E.coli XL1 Blue로 형질변환되어 독립적인 1.1×10^{9}개의 최종적인 클론을 생성한다.

생체외에서 이 조합 항체 라이브러리의 선택은 상술한 인간 가벼운 사슬 레퍼토리에 대해 행해진다. 4회의 패닝 후에 가용성 Fab 단편이 8개의 클론으로부터 만들어진다.

페리플라즈마 표본은 ELISA로 테스트된다. 클론 중 하나는 강한 항원 결합(도 4 참조)을 나타낸다. 이 클론은 D 4.5로 불리우고, Fd델타 단편의 DNA는 역 델타 CH1-특이성 프라이머(reverse delta CH1-specific primer)에 의해 시퀀싱된다(도 7 참조).

Fab단편과 결합한 또 다른 s17-1A는 D4.5에 비하여 훨씬 약한 ELISA 신호에 의해 7회 라운딩에서 처음 나타나고, 그 후 수 회의 패닝을 거친 후 분리된다. 상기 클론은 D 7.2로 지정되고 DNA서열은 델타 특이성 프라이머(도 8 참조)를 이용하여 결정되었다.

17-1A 특이성 Fab단편을 형성하기 위한 D4.5 델타 무거운 사슬 Fd 절편과 결합하는 가벼운 사슬 파트너를 동정하기 위해 리셔플링(resuffling) 실험이 수행된다. 450ng의 인간 카파 가벼운 사슬 단편과 450ng의 인간 람다 가벼운 사슬 단편(모두 Sacl과 Xbal로 다이제스트)이 각각 1400ng의 파지미드(phagmid) pComb3H(Sacl과 Xbal로 다이제스트, 대형 DNA단편)로 접합되고, 무거운 사슬 위치는 이미 D 4.5 Fd 단편에 의해 점유되었다.

결과되는 조합 항체 라이브러리(카파와 람다)는 각각 전기영동(2.5kV, 0.2㎝ 갭 큐벳, 25FD, 200 Ohm, Biorad gene-pulser)에 의해 300㎕의 일렉트로컴피턴트한 *Escherichia coli.* XL1 Blue로 형질전환 된다. 따라서 그 결과 얻어지는 라이브러리의 사이즈는 카파 라이브러리에 대해, 0.5×10^7 독립클론과 람다 라이브러리에 대해 1.4×10^7 의 독립클론이다. 표현형의 발현 후 한 시간 경과 후에, 포지티브 형질전환체가 pComB 벡터에 의해 코딩된 카베니실린 내성으로 선택된다. 그리고 이들 클론은 헬퍼 파지(VCSM13)의 1×10^{12} 파지 수의 감염 복용량으로 감염되어 필라멘투스 M13 파지의 생성 및 분비를 초래하고, 이들 각각은 단일한 인간 가벼운 사슬과 D4.5 무거운 사슬 Fd 절편을 코딩하는 단일 가닥 pComb3H-DNA를 포함하고,파지 표면 상에 해당하는 Fab 절편을 파지 코팅 단백질 Ⅲ의 감염되지 않은 부분에 전이 융합으로서 파지 표면에 표시한다.

클론된 Fab(카파와 람다) 레퍼토리를 포함하는 파지 라이브러리는 PEG8000/NaCl 침전과 원심분리에 의해 배양 상등액으로부터 분리되어 다시 TBS/1%BSA에서 재용해되어 96 웰 ELISA 플레이트에 고정된 재조합 s17-1A와 배양된다. 목표 항원과 특이적으로 결합하지 않는 Fab 파지는 TBS/0.5% Tween으로 10번 세정하여 제거된다. 두 개의 라이브러리(카파와 람다)의 결합자(binder)는 pH 2.2의 HCl-글리신으로 추출되고 pH 12의 2M Tris로 용출액을 중화시킨 후 하나는 카파에 대해, 하나는 람다 라이브러리에 대해 새로운 감염되지 않은 E.coli XL1 Blue 배양액의 감염에 사용된다. pComb 파지미드 복제에 의해 성공적으로 전이된 세포는 Fab 단편과 결합하는 항원을 코딩하고, 다시 카베니실린 내성에 대해 선택되고 헬퍼 파지 VCSM 13에 의해 감염되어 2회의 항체 표시와 생체외 선택을 개시한다.

5회의 항원-결합 Fab 파지의 생성 및 선택 후에 만들어진 플라스미드 DNA는 각각의 패닝에서 선택된 Fab레퍼토리를 함유한다.

가용성 Fab 단백질의 생성을 위해 유전자 Ⅲ DNA 단편이 플라스미드에서 절리되어 Fd 무거운 사슬 절편과 유전자 Ⅲ 단백질 간의 전이융합을 파괴하고, 이 플라스미드 DNA 풀은 100㎕의 열충격에 견디는 E.coli XL1 Blue로 형질변환되어 카베니실린(Carb) LB-Agar 상에 플레이트된다. 단일 콜로니들은 10㎖ LB-Carb배양액/20mM $MgCl_2$ 에서 배양되고 Fab 발현은 최종 농도가 1mM이 되도록 이소프로필-β-D-티오갈락토시드(IPTG)를 첨가하여 6시간 후에 유도된다. 세포는 20시간 후 수확되고, 페리플라스마 제조가 냉동과 해동에 의해 수행되어 Fab단편의 s17-1A의 결합이 ELISA로 테스트된다.

주되게는 5회째의 패닝(panning)에서 얻어지는 카파 라이브러리의 클론 45개와 람다 라이브러리의 클론 45개와, 그 밖의 회의 패닝에서 얻어지는 나머지 부분까지 17-1A항원에 대한 결합이 시험된다. 5회째에서 나타나는 k5.1(카파라이브러리)로 지정된 하나의 클론만이 결합활성을 나타낸다(도 5 참조). k5.1의 카파 V-영역의 DNA 서열이 결정되었다(도 9 참조).

실시예 2: E.coli XL1 Blue에서의 박테리아 발현

실시예 1에서 설명한 바와 같이 하나의 가벼운 사슬과 하나의 무거운 사슬의 FD-절편을 포함하는 pComb3H로 형질전환된 E.coli XL1 Blue는 유전자 Ⅲ 단편의 제거와 IPTG에 의한 유도 후 충분한 양으로 가용성 Fab를 생성한다. 무거운 사슬 Fd-절편과 가벼운 사슬이 집합하여 기능적인 Fab단편을 생성하는 페리플라즈마로 된다.

더 좋은 페리플라즈마 표본을 얻기 위해 세포는 20mM의 $MgCl_2$이 가해진 SB매체 내에서 배양되고, 수확 후 PBS 내에서 재용해된다. -70℃에서의 냉동 및 37℃에서의 해동을 4회 반복함으로써 박테리아의 외부 멤브레인이 온도 충격에 의해 파괴되고 Fab 단편을 포함하는 가용성 페리플라즈마틱 프로테인이 상등액 안으로 배출된다. 원심분리에 의해 손상된 세포와 세포잔해를 제거한 후, Fab 항체-단편을 포함하는 상등액이 수집되어 이후의 실험을 위해 사용된다.

우선 k8-D4.5-Fab와 k5.1-D4.5-Fab 페리 플라즈마가 고정된 s17-1A 항원의 결합에 대해 테스트되어 강한 ELISA신호(실시예 1 참조)를 나타낸다.

고정된 s17-1A와 결합된 k8-D4.5-Fab와 k5.1-D4.5-Fab 단편의 검출은 호스 래디쉬 컨쥬게이트 아비딘(horse raddish conjugated Avidine)(1㎍/㎖ PBS)에 의해 검출된 폴리클로날 바이오티닐레이티드(biotinylated) 항-인간-카파 가벼운 사슬항체(1㎍/㎖ PBS)를 사용하여 수행된다. 신호는 2,2' Azino-bis(3에틸벤즈-티아졸린-6-술폰산)(3-Ethylbenz-Thiazoline-6-Sulfonic Acid)와 Na-퍼보레이트(Na-perborate)를 함유하는 기질용액을 첨가함으로써 만들어지고 405nm의 파장에서 검출된다.

카토-세포(kato-cell)(위암 세포선을 발현하는 17-1A)에서의 2개의 17-1A 포지티브 인간 Fab단편(k8-D4.5-Fab 단편과 k5.1- D4.5- Fab)과, 17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포(CHO/17-1A)와 트랜스펙트되지 않은 CHO-세포의 결합을 테스트하기 위해 다시 페리플라즈마 제조가 수행된다. CHO트랜스펙트된 세포선은 GA733-2로 알려진(Szala, Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A. 87(1990), 3542-3546) 17-1A 항원의 완전한 아미노산 서열을 코딩하는 DNA-단편을 표준절차(Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Habour Laboratory Press, Cold Spring Habour, NY(1989)에 의해 유핵 발현 벡터 pEF-DHFR(Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9 (1995) 7201-7025)로 서브클로닝하여 만들어진다.

그 결과가 얻어지는 플라스미드는 N del에 의해 선형화되고, 안정된 발현을 위해 DHFR-결여의 CHO-새포로 트랜스펙트된다. 트랜스-멤브레인 17-1A의 발현은 최종농도가 500nM가 되도록 DHFR-인히비터 메토트랙사이트(MTX;Methotrexat)의 농도를 연속적으로 증가시킴으로써 유도되는 단계적인 유전자 증폭에 의해 증가되고, 그 농도는 20nM와 100nM 사이의 단계가 된다(Kaufmann, Method Enzymol. 185(1990), 537-566).

200,000개의 세포(Kato-, CHO/17-1A 또는 CHO세포)가 비오티닐레이트 폴리클로날 항-인간,-카파 가벼운 사슬 항체(20㎍/㎕ PBS)와 FITC-컨쥬게이트 스트렙트아비딘(Streptavidine)과 함께 관련 Fab 또는 무관한 Fab를 함유한 페리플라즈마 중 하나와 함께 배양된다. 표지된 세포는 흘림세포계측법에 의해 분석된다. k8-D4.5-Fab와 k5.1-D4.5-Fab를 함유하는 페리플라즈마는 각각 관계없는 페리플라즈마(네거티브 컨트롤)에 비하여 분명한 신호를 나타내지만 17-1A항원에 대한 특이성을 나타내는 트랜스팩트되지 않은 CHO-세포의 착색은 나타나지 않는다. 항 17-1A 항체 M79(Gottlinger, Int.J. Cancer 38(1986), 45-53)는 17-1A-포지티브 세포에 대한 포지티브 컨트롤로서 사용되고 쥐의 IgG2a 항체는 아이소타입 컨트롤로서 사용된다(도 10과 도 11 참조).

실시예 3 : CHO-세포의 유핵발현

박테리아는 비록 기능적인 Fab 단편을 발현하더라도 완전히 기능적인 면역글로블린을 생성할 수 없다.

완전히 기능적인 항체를 생성하기 위해서는, 포유류 세포가 사용되어야 하며 따라서 k8-가벼운 사슬 및 D4.5 무거운 사슬의 가변 영역이 포유류의 발현 벡터(expression vectors)로 서브클론되어야 한다.

a.) 가벼운 사슬(k8 및 k5.1): 적당한 말단 제한 위치를 발생하기 위해서는, k8 및 K5.1 DNA 단편은 PCR에 의해 재증폭되어야 하며, 그 결과 3'-말단에서

SalI 및 Not I-위치와 5'-말단에서 Bsu361-위치에 의해 카파 단편이 만들어진다. 이들 단편(k8 및 K5.1)은 Bsu361 및 Not I에 의해 플라스미드 BSPOLL내로 서브클론되고, 따라서 PCR-유도된 변이를 방지하도록 포유류의 선도 배열을 첨가하여 시퀀싱한다.

EcoRI 및 SalI, k8 및 k5.1의 이용은 BSPOLL로부터 절리되고, 쥐의 디히드로폴레이트(dihydrofolate) 환원효소(DHFR)를 코딩하는 cDNA를 쥐의 아데노신 탈아미노효소(deaminase)(ADA)를 코딩(edcoding)하는 cDNA와 교체함으로써 발현벡터 pEF-DHFR(Mack, Proc, Natl. Acad, Sci. U.S.A 92(1995)7021-7025)로부터 유도된 유핵 발현 벡터 pEF-ADA(도 12 참조)로 서브클론된다.

각각의 가벼운 사슬(k8 및 k5.1)에 대해서, 10^7개의 CHO 세포가 각각 100㎍의 선형화된 플라스미드 DNA로 트랜스펙트되고, 이어서 발현 벡터에 의해 코딩된 아데노신 탈아미노효소(ADA) 활성에 대한 선택하는 조건하에서 배양된다.

잔존하는 ADA-포지티브세포는 D4.5 또는 D7.2 가변영역을 포함하는 무거운 사슬과 트랜스펙트를 위해 배양된다.

b.) 무거운 4.5의 가변 영역 : 델타 Fd단편 D4.5로부터, 가변영역은 양 말단(both ends)에서 Bsu361 제한위치를 발생하는 PCR에 의해 재증폭된다. 그리고 그 결과 V-D4.5 DNA-단편은 이들 제한 위치를 이용함으로써 사람의 IgG1 무거운 사슬 불변영역을 코딩하는 DNA-단편과 유핵 사슬 선도배열을 이미 포함하는 유핵 발현 벡터 pEF-DHFR 내로 서브클론된다(도 13참조). 따라서 D4.5 무거운 사슬 가변 영역은 선도 배열과 무거운 사슬 불변영역 사이에 삽입된다. 가변 영역은 시퀀싱되고 완전한 클론은 H79V-D4.5 hu IgG1로 불려진다.

조직의 착색을 위해, 사람의 IgG1 무거운 사슬 불변영역은 서브 클론용 Xba1를 이용하는 쥐의 IgG1 무거운 사슬 불변영역으로 교체된다. 이 플라스미드를 H79V-D4.5 MIgG1으로 부른다.

사람과 쥐의 D4.5 무거운 사슬의 IgG1-버전 모두는 각각 k8 가벼운 사슬로 이미 발현하는 10^7개의 CHO-셀로 각각 트랜스펙트된다. 사람의 IgG1-버전은 또한 k5.1 가벼운 사슬을 발현하는 CHO세포로 트랜스펙트된다. 100㎍의 선형화된 플라스미드 DNA는 무거운 사슬 트랜스펙션에 사용된다.

D7.2 무거운 사슬 Fd-단편의 가변영역은 pEF-DHFR 내로 서브클론되어 상술한 바와 같이 VD4.5에 대해 플라스미드를 발현하는 사람의 IgG1 무거운 사슬이 된다. 그리고 이 발현 플라스미드는 H79V-D4.5 hu IgG1에 대해 상기 기술된 것처럼 k8 가벼운 사슬을 발현하는 CHO세포로 트랜스펙트된다.

트랜스펙트된 세포는 기술된 것처럼 ADA- 및 DHFR- 활성에 선택된다(Kaufman, Methods Enzymol. 185(1990), 537-566).

그 결과 얻은 세포선을 H79-huIgG1(VD4.5huIgG1-k8), H79-MIgG1(VD4.5MIgG1-k8), D7.2(VD7.2huIgG1-k8) 및 HD70(VD4.5huIgG1-k5.1)로 지정한다.

4개의 anti-17A-항체(H79-huIgG1, H79-MIgG1, D7.2 및 HD70) 중 하나를 각각 생성하는 4개의 다른 30 ml의 융합성 세포-배양액 중 3일 동안의 배양 상등액은 고정된 s17-1A에 대한 결합을 위해 ELISA에 의해 테스트된다. 1개의 약한 ELISA신호를 나타내는 D7.2를 제외하고, 3개의 다른 항체는 강한 신호를 나타내어, 쥐 항체 M79의 범위 내에서 결합 친화력을 나타내는 것으로 추정된다.

대량의 항체 생산은 500ml배지를 이용하는 롤러버틀(rollerbottle)로 실행된다.

항체 H79-huIgG1, D7.2 및 HD70은 프로테인 A 친화성 칼럼(affinity column)을 이용함으로써 정제된다. H79-MIgG1 항체는 항-쥐 IgG 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다.

재결합된 항체의 순도(Purity) 및 분자량은 환원 및 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 결정된다(도 14 및 15).

단백질 정제 및 SDS-PAGE는 표준 절차에 따라서 실행된다.

실시예 4 : H79 항체 및 HD70의 기능분석

Ⅳ.1. 고정된 항원에서의 테스트

정제된 항체의 대응표본과 각각 사람과 쥐의 IgG1-트랜스펙턴트(transpectant)의 융합성 배양액 30ml 중 3일후의 배양 상등액이 고정된 s17-1A항원에 대한 결합이 ELISA에 의해 테스트되고 쥐의 M79 항 17-1A 항체와 비교된다.

검출은 Ⅱ에 기술된 것처럼 실행된다.

항체 H79(huIgG1- 및 MIgG1 version) 및 HD70은 쥐의 M79범위 내에서 매우 유사한 친화력을 갖는 것으로 추정된다.

Ⅳ.2. 친화력의 결정

표면 플라스몬 공명 측정(surface plasmon resonance measurement)이 BIACORE 2000장비를 사용하여 수행된다 (Biacore AB, Freiburg, Freiburg, Germany). 각각의 플로우 세포(flow cell)에서 재조합 가용성 17-1A항원의 고정과 상호작용의 분석은 BIACORE 2000의 자동실행에 의해 수행된다. 항원은 1차 아민 그룹을 통해 센서 칩 CM5에 공유결합적으로 결합된다.

4개의 플로우 셀 즉, 플로우 셀 1, 2, 3 및 4를 통해서 0.1 M N하이드록시숙신이미드/0.4M N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드(0.1M N-hydroxisuccinimide/ 0.4M N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (NHS/EDC9) 80㎍의 단일 분사로 CM5 센서 칩의 카르복실산염 덱스트란(dextran) 매트릭스(matrix)를 활성화하고, 계속해서 s17-1A-항원,(pH 4.7의 10mM 나트륨아세트산염, 60㎍/ml)의 분사중에 흐름 경로에 포함된다. 활성화된 표면에 대한 17-1A의 다른 접촉 시간은 거의 2500 응답 유니트에 이르게 된다(플로우 세포 1에서 RU9, 플로우 세포 2에서 14000 RU, 플로우 셀 3에 780 RU 및 플로우 셀4에서 290RU). 초과 활성화된 에스테르는 모두 4개의 플로우 세포에 대해 pH 5의 85㎕, 1 M 에탄올아민의 분사에 의해 저지된다.

결합실험은 10mM의 Hepes, 150mM NaCl, 3mM EDTA와 0.005% 계면활성제 P20를 함유하는 pH 7.4 의 버퍼에서 25℃에서 수행된다. 고정된 재조합 17-1A의 항체에 대한 결합속도는 주입하는 항체의 농도를 0.5 내지 2μM로 하여 설정한다. 센서칩은 100 mM의 글리신, 500mM의 NaCl, 0.005%의 Tween (pH3)에서 재생된다. 결합 및 분리속도상수, (Kon, Koff)는 상술한 Biacore AB(Karlsson, (1991) J Immuno Meth 145:229-240)의 BIA-평가소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

두 개의 세트의 친화력 결정이 수행되고(1.세트:M79, H79, D7.2, Panorex;2 세트:Panorex, HD70), 쥐의 파노렉스는 또한 내부 참조로서 세트 2에 포함되어 있다.

[표 2]

인간 17-A 항체 및 관련된 주의 17-1A 항체의 K_D, K_{on} 및 K_{off} 속도

항체	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	K_D (M)
1. 세트:			
쥐 M79	6.0×10^4	4.5×10^{-2}	7.5×10^{-7}
인간 H79	2.1×10^4	7.2×10^{-3}	3.4×10^{-7}
쥐 파노렉스	1.1×10^5	2.2×10^{-2}	2.0×10^{-7}
2. 세트:			
인간 HD70	0.9×10^5	3.5×10^{-2}	3.9×10^{-7}
쥐 파노렉스	1.0×10^5	2.7×10^{-2}	2.7×10^{-7}

Ⅳ3. 유핵 세포를 발현하는 17-1A에 대한 흘림 세포계측법

H79(인간과 쥐의 IgG1 버전), HD70(인간 IgG1), D 7.2(인간 IgG1)의 정제된 항체가 Kato세포를 발현하는 17-1A, 17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포와 트랜스펙트되지 않은 CHO-세포에 대해 FACS분석에 의해 시험된다.

2×10개^{5}의 세포가 정제된 H79-huIgG1, H79-MIgG1, HD70, D 7.2, M 79, Panorex, M 74CH(=인간 CHIgG1-인간 C 카파-쥐 항 -17-1A-항체 M74의 버전(Gottilinger, Int.J.Cancr 38(1986), 47-53)), 쥐의 IgG2a, 쥐의 IgG1, 또는 인간의 IgG1(20㎍/㎖ 항체)와 함께 각각 배양된다. 세포와 결합한 항체의 검출은 FITC표지된 항 쥐 IgG- 또는 항 인간 IgG 항체(각 20㎍/㎖)로 수행된다. 배양은 45-60분간 얼음에서 수행된다.

M79와 Panorex 뿐 아니라, H79 인간 IgG1, H79 쥐 IgG1와 HD70은 17-1A 포지티브 세포에 분명하게 결합하는 것을 보여준다. D7.2는 17-1A 포지티브 세포에 대해 약하지만, 의미있는 결합을 나타낸다. 트랜스펙트 되지 않은 CHO세포와 IgG-컨트롤에 결합을 나타내는 항체 중 Kato세포, CHO/17-1A-세포와 트랜스펙트 되지 않은 CHO세포에 대해 네커티브인 것은 없다(도 16, 도 17을 참조).

Ⅳ.세포독성 의존 항체(antibody dependent cellular cytoxicity)(^{51}Cr 방출)

^{51}Cr 방출을 위해 이펙터 세포(effector cell)로서 인간 말초 혈액의 단핵 세포(PBMCs)가 건강한 기증자의 신선한 연층(buffy coat)에서 분리된다. PBMCs는 100×g 원심분리단계에서 Ficoll 밀도 그래디언트 원심분리에 의해 분리된다. 자극되지 않은 PBMCs(5×10^{5} 세포)가 평평한 바닥의 마이크로타이터 플레이트의 각각의 웰에 10% FCS와 함께 RPMI 1640 미디엄에 10㎕의 첨가되고 37℃에서 하룻밤 배양된다. 목표 세포는 ^{51}Cr로 2시간 동안 표지된다. 다른 농도(50㎕)에서 표지된 목표 세포(100㎕)와 항체는 PBMCs에 부가되고 37℃에서 18시간 동안 배양된다. 해당하는 결합하지 않은 아이소타입은 네커티브컨트롤로서 사용된다. 특정한 라이시스는 ((cpm,실험 방출값)-(cpm,자발 방출))/((cpm, 최대 방출값)-(cpm, 자발방출값)로 계산된다.

인간 항 17-1A 항체 H79와 HD70은 상기 ^{51}Cr 방출분석에서 17-1A 포지티브 위암세포선 KATO 에 대해 상당한 독성을 나타낸다는 것이 밝혀졌다.

쥐의 항 17-1A 항체 M79와 Panorex는 상당히 낮은 레벨로 세포를 파괴하는 것이 입증되었다(도 18).

Ⅳ5.인간 세포에 대한 실험

결장암조직과 정상 결장 조직의 저온부를 각각 5nm씩 항체 H79(10㎍/㎖)의 쥐 IgG-버전과 함께 배양한다. 이 실험에서 쥐의 H79의 IgG1버전은 인간 조직에서 인간의 면역글로블린의 존재로 인해 비특이성 착색을 피하기 위해 사용되었다. 결합된 H79 MIgG1의 검출은 폴리클로날 항-쥐 Ig 항체와 결합된 페록시다제로 수행되고 카바졸로 착색된다. 카운터 착색은 헤말란으로 수행되었다.

그 결과는 광학 현미경에 의해 측정되었다.

쥐의 모노클로날 항체 M79(포지티브 컨트롤)뿐아니라 H79 MIgG1는 정상 결장점막 상에 강한 착색을 나타낸다(M79, 도 19; H79-MIgG1, 도 20). 그리고 결장암 세포에서는 약한 얼룩을 나타낸다(M79, 도 21, H79-MIgG1, 도 22). 반대로 아이소타입 컨트롤은 결장점막과 결장암 조직에서 어떤 얼룩도 나타내지 않는다(M79; 도 23, 25, H79-MIgG1; 도 24, 26)

실시예 Ⅴ:H79와 HD70의 에피토프 분석

인간 항체 H79와 HD 70과 쥐의 템플레이트 항체 M79에 의해 인식된 17-1A 에피토프를 비교하기 위해 17-1A 항원의 세포외 부분의 아미노산 서열에서 유래된 13개의 아미노산으로 구성된 펩티드가 Pep Spots Membrane에서 단일 스포트로서 합성된다. 이들 펩티드는 펩티드 1의 제 1아미노산은 17-1A 항원의 N-말단 아미노산과 동일하고 펩티드 119의 마지막 아미노산은 17-1A 항원의 세포외 부분의 C-말단 아미노산과 동일한 이웃하는 펩티드를 갖는 11개의 아미노산 오버랩에 의해 17-1A항원의 모든 세포외 아미노산 서열를 포함한다(표 3)(Szala, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 87(1990),3542-3546)

[표 3a]

합성 펩타이드(숫자는 펩타이드 스포트의 숫자에 해당)

1. TATFAAAQEECVC	2. TFAAAQEECVCEN
3. AAAQEECVCENYK	4. AQEECVCENYKLA
5. EECVCENYKLAVN	6. CVCENYKLAVNCF
7. CENYKLAVNCFVN	8. NYKLAVNCFVNNN
9. KLAVNCFVNNNRQ	10. AVNCFVNNNRQCQ
11. NCFVNNNRQCQCT	12. FVNNNRQCQCTSV
13. NNNRQCQCTSVGA	14. NRQCQCTSVGAQN
15. QCQCTSVGAQNTV	16. QCTSVGAQNTVIC
17. TSVGAQNTVICSK	18. VGAQNTVICSKLA
19. AQNTVICSKLAAK	20. NTVICSKLAAKCL
21. VICSKLAAKCLVM	22. CSKLAAKCLVMKA
23. KLAAKCLVMKAEM	24. AAKCLVMKAEMNG
25. KCLVMKAEMNGSK	26. LVMKAEMNGSKLG
27. MKAEMNGSKLGRR	28. AEMNGSKLGRRAK
29. MNGSKLGRRAKPE	30. GSKLGRRAKPEGA
31. KLGRRAKPEGALQ	32. GRRAKPEGALQNN
33. RAKPEGALQNNDG	34. KPEGALQNNDGLY
35. EGALQNNDGLYDP	36. ALQNNDGLYDPDC
37. QNNDGLYDPDCDE	38. NDGLYDPDCDESG
39. GLYDPDCDESGLF	40. YDPDCDESGLFKA
41. PDCDESGLFKAKQ	42. CDESGLFKAKQCN
43. ESGLFKAKQCNGT	44. GLFKAKQCNGTST
45. FKAKQCNGTSTCW	46. AKQCNGTSTCWCV
47. QCNGTSTCWCVNT	48. NGTSTCWCVNTAG
49. TSTCWCVNTAGVR	50. TCWCVNTAGVRRT
51. WCVNTAGVRRTDK	52. VNTAGVRRTDKDT
53. TAGVRRTDKDTEI	54. GVRRTDKDTEITC
55. RRTDKDTEITCSE	56. TDKDTEITCSERV
57. KDTEITCSERVRT	58. TEITCSERVRTYW
59. ITCSERVRTYWII	60. CSERVRTYWIIIE
61. ERVRTYWIIIELK	62. VRTYWIIIELKHK
63. TYWIIIELKHKAR	64. WIIIELKHKAREK
65. IIELKHKAREKPY	66. ELKHKAREKPYDS
67. KHKAREKPYDSKS	68. KAREKPYDSKSLR
69. REKPYDSKSLRTA	70. KPYDSKSLRTALQ
71. YDSKSLRTALQKE	72. SKSLRTALQKEIT
73. SLRTALQKEITTR	74. RTALQKEITTRYQ
75. ALQKEITTRYQLD	76. QKEITTRYQLDPK
77. EITTRYQLDPKFI	78. TTRYQLDPKFITS
79. RYQLDPKFITSIL	80. QLDPKFITSILYE
81. DPKFITSILYENN	82. KFITSILYENNVI

[표 3b]

83. ITSILYENNVITI	84. SILYENNVITIDL
85. LYENNVITIDLVQ	86. ENNVITIDLVQNS
87. NVITIDLVQNSSQ	88. ITIDLVQNSSQKT
89. IDLVQNSSQKTQN	90. LVQNSSQKTQNDV
91. QNSSQKTQNDVDI	92. SSQKTQNDVDIAD
93. QKTQNDVDIADVA	94. TQNDVDIADVAYY
95. NDVDIADVAYYFE	96. VDIADVAYYFEKD
97. IADVAYYFEKDVK	98. DVAYYFEKDVKGE
99. AYYFEKDVKGESL	100. YFEKDVKGESLFH
101. EKDVKGESLFHSK	102. DVKGESLFHSKKM
103. KGESLFHSKKMDL	104. ESLFHSKKMDLTV
105. LFHSKKMDLTVNG	106. HSKKMDLTVNGEQ
107. KKMDLTVNGEQLD	108. MDLTVNGEQLDLD
109. LTVNGEQLDLDPG	110. VNGEQLDLDPGQT
111. GEQLDLDPGQTLI	112. QLDLDPGQTLIYY
113. DLDPGQTLIYYVD	114. DPGQTLIYYVDEK
115. GQTLIYYVDEKAP	116. TLIYYVDEKAPEF
117. IYYVDEKAPEFSM	118. YVDEKAPEFSMQG
119. DEKAPEFSMQGLK	

합성 펩타이드에 대한 Pep Spots Membrane은 메탄올 내에서 10분간 혼합된 후 TBS-pH 8의 버퍼로 10분 동안 3회 세척한다. 멤브레인은 0.05g/㎖의 슈크로즈를 함유하는 카세인 베이스의 블록킹 용액에서 한시간 동안 블록킹되고, 다시 TBS pH 8/0.05% Tween 20(TBS-T)에서 혼합된다. 각각의 항 17-1A 항체는 멤브레인과 함께 블록킹 용액(1㎍ 항체/㎖)에서 3시간 동안 실온에서 배양된다. TBS-T에서 10분간 3회 세척한 후, HRP컨쥬게이트된 2차 항원(항 쥐/항 인간; 1㎍/㎖ 블록킹 용액)은 실온에서 멤브레인과 함께 2시간 동안 배양된다. 그리고 멤브레인은 10분동안 TBS-T에서 3회 세척된다. 결합된 항체의 검출은 화학형광법 키트 제조자의 규정(Boehringer)에 따라 M79의 경우 Pep Spots Membrane에서 직접 수행된다. 현상된 필름은 도 27에 제시되었다. 블럿은 50mM Tris-HCI pH 6.7, 100mM 2-메캅토에탄올과 2% (w/v) SDS를 함유하는 용액 내에서 50℃에서 30분간 세정된 후 재생되어 다음 항체의 에피토프 매핑에 재사용된다.

멤브레인 상에서 항-인간 면역글로블린 2차 항체의 폴리펩타이드-스포트에 대한 높은 비특이적 결합도로 인하여 항-인간 2차 항체 검출이 따르는 2차 블러팅-멤브레인으로의 분화된 전기이동이 Rudiger, EMBO 16(1997) 1501-1507에 의한 HD70, H79의 경우에 수행된다. 2차 항체와의 배양과 블럿 상의 항체 검출은 상술한 바와 같이 수행되었다. 현상된 필름은 도 27에 제시되었다.

상기 도면(도 27)에 도시된 바와 같이 펩티드 근거한 에피토프맵핑결과는 쥐 템플레이트 항체 M79에 의해 인식된 에피토프는 주로 펩타이드 스포트 38, 95에 의해 나타내지고, 이것은 인간 항체 H79에 의해 인식되는 에피토프가 펩타이드 스포트 8, 11, 13, 14, 59-60, 77 및 79에 나타나는 것과는 많은 차이가 있다. 인간 항체 HD70이 검출가능한 결합을 전혀 나타내지 않기 때문에 그것의 에피토프는 쥐 항체 M79의 에피토프와는 다를 것이라는 예측이 가능하고, 또한 인간항체 H79와 HD70의 에피토프와 동일하지 않을 것이라는 예상도 가능하다.

인간 항체 HD70의 경우 검출가능한 결합신호의 부재는 그 배열의 가능한 인식, 연속적이거나 비연속적인 에피포트의 가능한 인식 또는 부분적으로 혹은 전체적으로 탄수화물로 구성되는 에피토프의 인식으로부터 설명할 수 있으며, 다른 경우에 있어서는 짧은 펩타이드에 의한 에피토프 모방의 경우에 있어서는 설명하기 어렵다.

발명의 효과

본 발명은 17-1A항원에 대해 특이성을 갖고, 또한 얻어진 방법에 관계없이 생체내에서 반복적으로 사용되기에 적합한 인간항체에 관한 것으로서, 이제 처음으로 17-1A 항원을 수반하는 종양세포의 감시 및/또는 파괴에 유용하게 사용가능한 인간항체가 개발된 것이다. 따라서 본 발명의 항체는 인간에게 면역원성이 낮거나 비면역원성이라는 잇점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 중요 제한위치에 의한 pComb3H의 클로닝위치를 나타낸다.

도 2는 pComb3H-플라스미드와 완전히 발현된 M13-파지의 도식이다.

도 3은 가용성 Fab-단편의 ELISA이다.

도 4는 가용성 Fab 단편의 ELISA이다.

도 5는 가용성 Fab 단편의 ELISA이다.

도 6은 인간 카파 8 가벼운 사슬 가변영역의 DNA- 및 단백질-서열이다.

도 7은 인간 D4.5 무거운 사슬 가변영역의 DNA-서열이다.

도 8은 인간 D7.2 무거운 사슬 가변영역의 DNA-서열이다.

도 9는 인간 카파 5.1 가벼운 사슬 가변영역의 DNA- 및 단백질-서열이다.

도 10은 k8-D4.5-Fab 단편을 포함하는 페리플라스마 표본의 결합 활성(binding activity)을 테스트하기 위해 17-1A 포지티브 카토 세포에서 Fab 항체-단편 컨트롤 항체 M79의 흘림 세포계측법 분석이다.

도 11은 k8-D4.5-, k5.1-D4.5 또는 관련없는 k-D4.5-Fab-단편을 포함하는 페리플라즈마 표본(pp)의 결합활성을 테스트하기 위해 17-1A 포지티브 카토 세포, 17-1A 트랜스펙트된(transfected) CHO-세포와 트랜스팩트되지 않은 CHO-세포 각각에서 Fab 항체 단편 및 완전한 항체의 흘림 세포계측법 분석이다.

도 12는 중요 제한위치에 의한 pEF-ADA의 클론위치를 나타낸다.

도 13은 중요 제한위치에 의한 pEF-DHFR의 클론위치를 나타낸다.

도 14는 인간 항체 H79 표본의 SDS-PAGE이다.

도 15는 인간 항체 H79와 HD70 표본의 SDS-PAGE이다.

도 16은 정제된 H79 쥐 IgG1와 정제된 H79 인간 IgG1의 결합 활성을 테스트하기 위한 17-1A 포지티브 카토 세포의 흘림세포계측법이다.

도 17 은 정제된 항체 H79 인간 IgG1, H79 쥐IgG1, HD70, D7.2, M79, 파노렉스(panorex) 및 아이소타입 컨트롤(인간 IgG1, 쥐 IgG1과 2a)의 결합 활성을 테스트하기 위한 17-1A 포지티브 카토 세포, 17-1A 트랜스펙트된 CHO-세포와 트랜스펙트되지 않는 CHO-세포에서 항체(각각, 농도:20㎍/ml)의 흘림 세포 계측법이다.

도 18은 ^{51}Cr 항체 의존 세포독성 분석결과이다.

도 19는 M79(포지티브) 컨트롤로 착색된 건강한 인간의 결장 조직의 광학 현미경 사진이다.

도 20은 H79쥐의 IgG1로 착색된 건강한 사람의 결장 조직의 광학 현미경 사진이다.

도 21은 M79(포지티브 컨트롤)로 착색된 결장암의 광학 현미경 사진이다.

도 22는 H79 쥐의 IgG1으로 착색된 결장암의 광학현미경 사진이다.

도 23은 쥐의 IgG2a 아이소타입 컨트롤로 착색된 건강한 인간의 결장조직의 광학 현미경 사진이다.

도 24는 IgG1 아이소타입 컨트롤로 착색된 건강한 인간 결장 조직의 광학 현미경 사진이다.

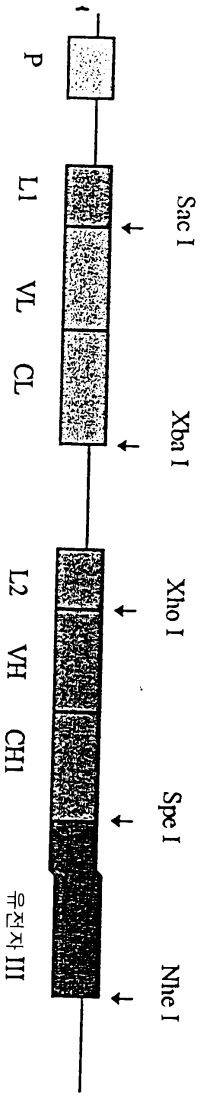
도 25는 쥐의 IgG2a 아이소타입 컨트롤로 착색된 인간의 결장암 조직의 광학 현미경 사진이다.

도 26은 쥐의 IgG1 아이소타입 컨트롤로 착색된 인간 결장암 조직의 광학 현미경 사진이다.

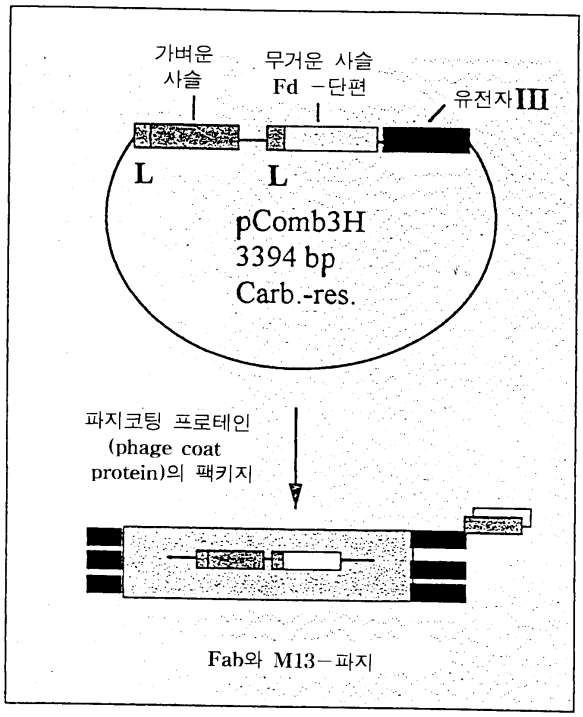
도 27은 쥐의 항체 M79와 인간의 항체 H79, HD70의 에피토프 분석이다.

도면

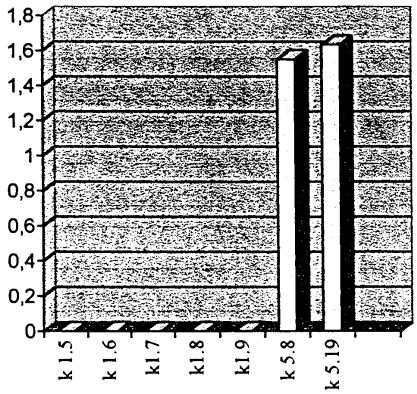
도면1



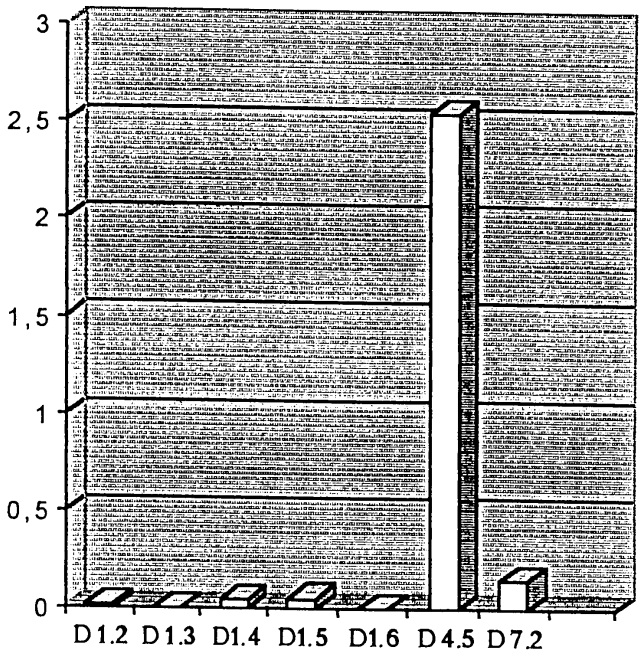
도면2


가벼운
사슬
무거운 사슬
Fd -단편
유전자III
L
L
pComb3H
3394 bp
Carb.-res.
파지코팅 프로테인
(phage coat
protein)의 팩키지
Fab와 M13-파지

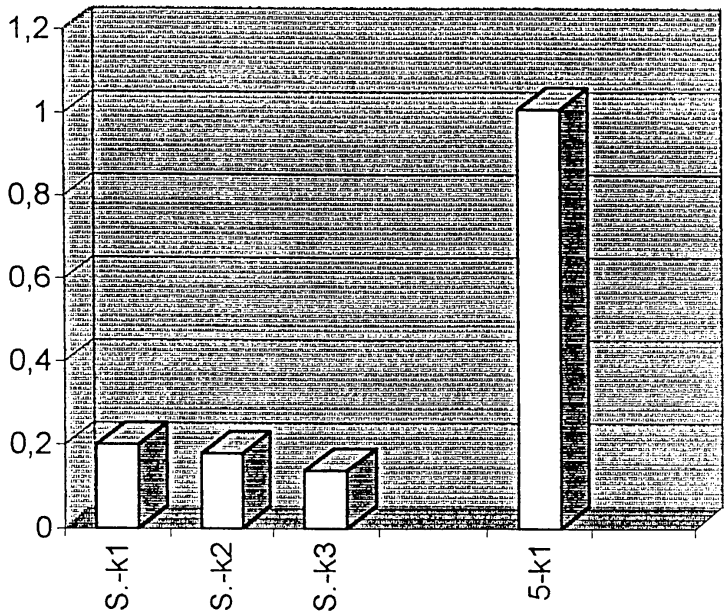
도면3


1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
k 1.5
k 1.6
k1.7
k1.8
k1.9
k 5.8
k 5.19

도면4


3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
D1.2 D1.3 D1.4 D1.5 D1.6 D4.5 D7.2

도면5


1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
S.-k1
S.-k2
S.-k3
5-k1

도면6

```
                9           18          27          36          45          54
5'  GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA GAC AGA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   L   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R

                63          72          81          90          99         108
    GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   T   I   T   C   R   T   S   Q   S   I   S   S   Y   L   N   W   Y

               117         126         135         144         153         162
    CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     Q   Q   K   P   G   Q   P   P   K   L   L   I   Y   W   A   S   T   R

               171         180         189         198         207         216
    GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T

               225         234         243         252         261         270
    CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   S   A   T   Y   Y   C   Q   Q

               279         288         297         306         315
    AGT TAC GAC ATC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     S   Y   D   I   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I   K
```

도면7

```
                9           18          27          36          45          54
5'  GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   V   Q   L   L   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S   L

                63          72          81          90          99         108
    AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   G   M   H   W

               117         126         135         144         153         162
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   S   Y   D

               171         180         189         198         207         216
    GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R

               225         234         243         252         261         270
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D

               279         288         297         306         315         324
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AAA GAT ATG GGG TGG GGC AGT GGC TGG AGA CCC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     T   A   V   Y   Y   C   A   K   D   M   G   W   G   S   G   W   R   P

               333         342         351         360         369         378
    TAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     Y   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S

               387         396         405         414
    TCA GCA CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     S   A   P   T   K   A   P   D   V   F   P   L
```

도면8

```
                9          18          27          36          45          54
5'  GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GTC GTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   V   Q   L   L   E   S   G   G   V   V   V   Q   P   G   G   S   L

               63          72          81          90          99         108
    AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M   H   W

              117         126         135         144         153         162
    GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TCA TAT GAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I   S   Y   D

              171         180         189         198         207         216
    GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R

              225         234         243         252         261         270
    GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D

              279         288         297         306         315         324
    ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AAA AAG GAA GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     T   A   V   Y   Y   C   A   K   K   E   G   Y   W   G   Q   G   T   L

              333         342         351         360         369
    GTC ACC GTC TCC TCA GCA CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   T   V   S   S   A   P   T   K   A   P   D   V   F   P   L
```

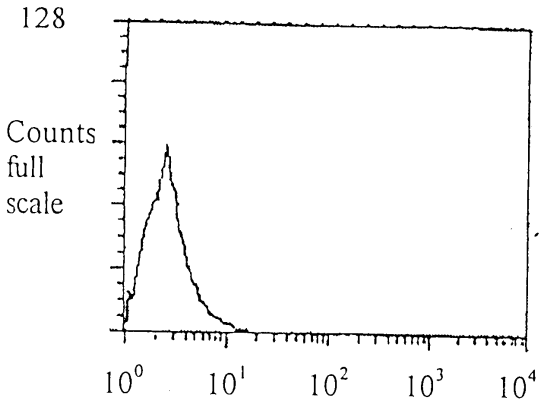
도면9

k5.1

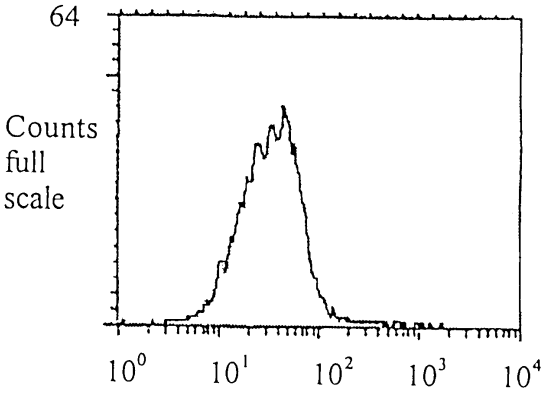
File Name : kappa5.1/11.97

```
                9          18          27          36          45          54
5'  GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   L   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R

               63          72          81          90          99         108
    GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S   I   S   S   Y   L   N   W   Y

              117         126         135         144         153         162
    CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     Q   Q   K   P   G   Q   P   P   K   L   L   I   Y   W   A   S   T   R

              171         180         189         198         207         216
    GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGC GGC AGT GAA TCT GGG ACA AAT TAC ACT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   E   S   G   T   N   Y   T

              225         234         243         252         261         270
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCT ACT TAC TTT TGT CAA CAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   F   C   Q   Q

              279         288         297         306         315         324
    TCT GAC AGT TTG CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAC ATT CAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     S   D   S   L   P   I   T   F   G   Q   G   T   R   L   D   I   Q
```

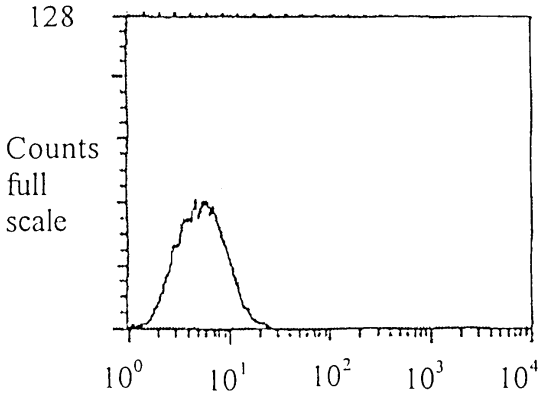
도면10a



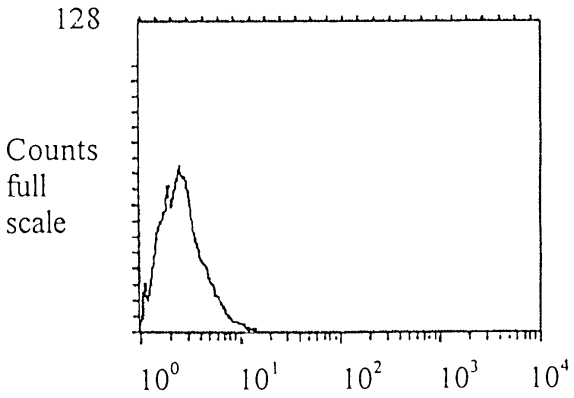
도면10b



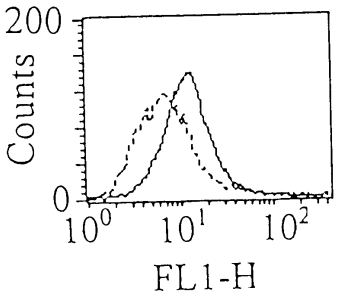
도면10c



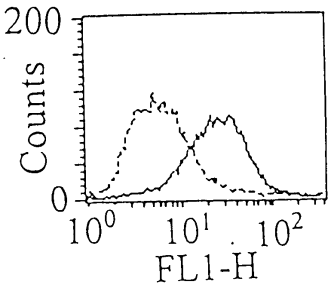
도면10d



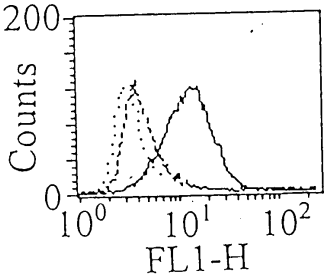
도면11a



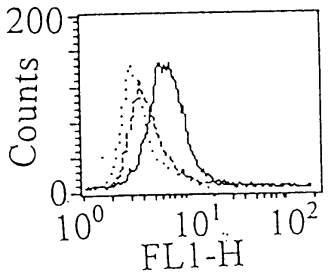
도면11b



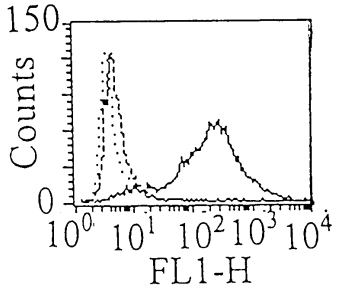
도면11c



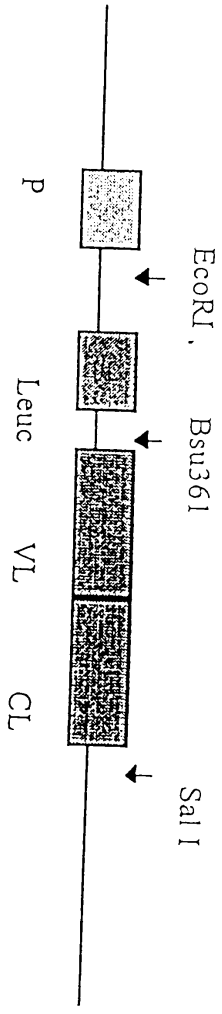
도면11d



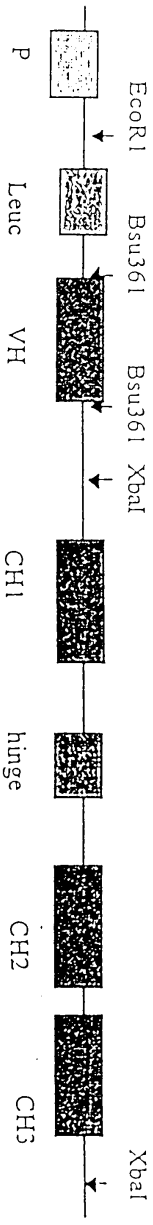
도면11e



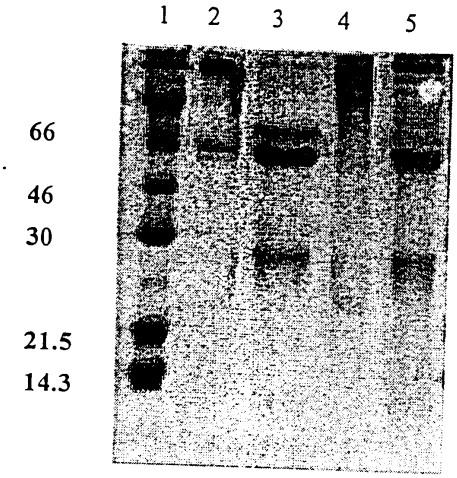
도면12



도면13

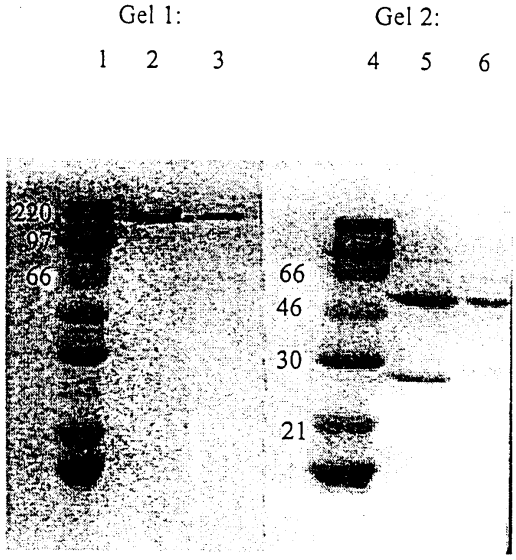


도면14



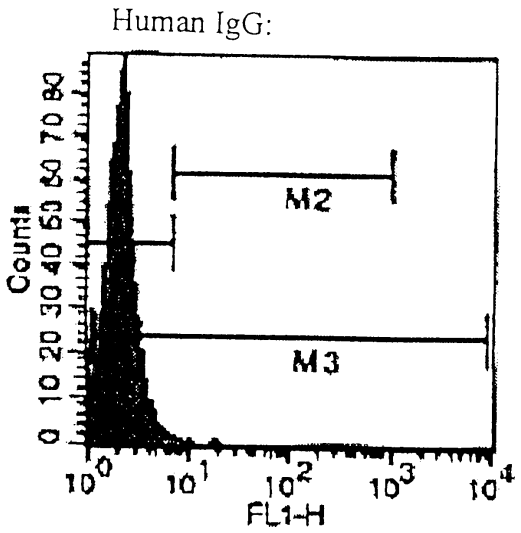
레인 1 : 마커(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW [kDa]
레인 2 : H79 인간 IgG1 (비환원)
레인 3 : 환원조건하의 H79 인간 IgG1
레인 4 : H79 쥐 IgG1 (비환원)
레인 3 : 환원조건하의 H79 쥐 IgG1

도면15

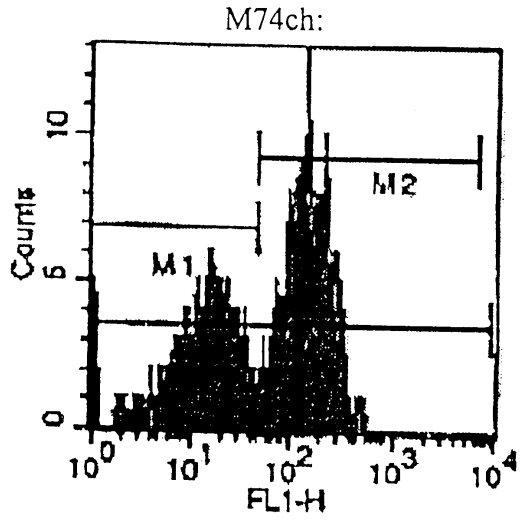


겔 1 : 레인 1 : 마커(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW [kDa]
레인 2 : H79 인간 IgG1 (비환원)
레인 3 : HD70 인간 IgG1 (비환원)
겔 2 : 레인 4 : 마커(겔의 좌측에 표시된 단일 밴드의 MW [kDa]
레인 5 : 환원조건하의 H79 인간 IgG1
레인 6 : 환원조건하의 HD70 인간 IgG1

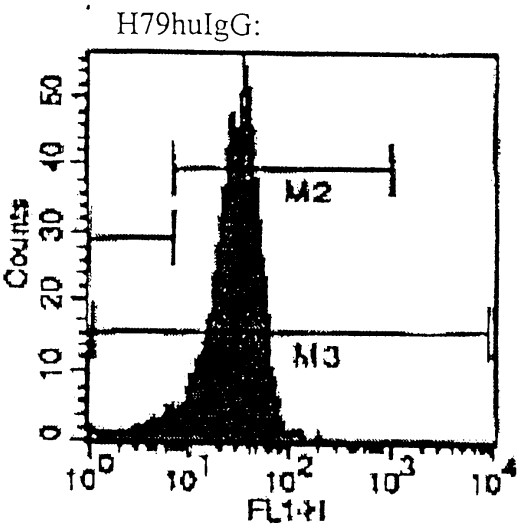
도면16a



도면16b

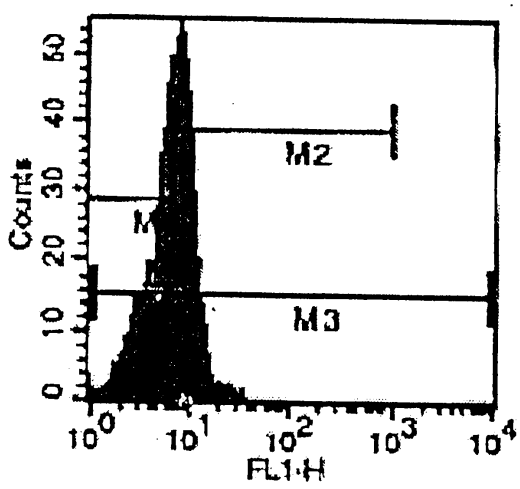


도면16c



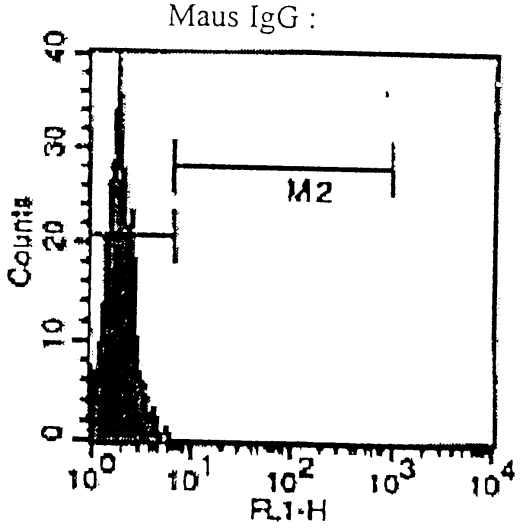
도면16d

H79huIgG 1:10:



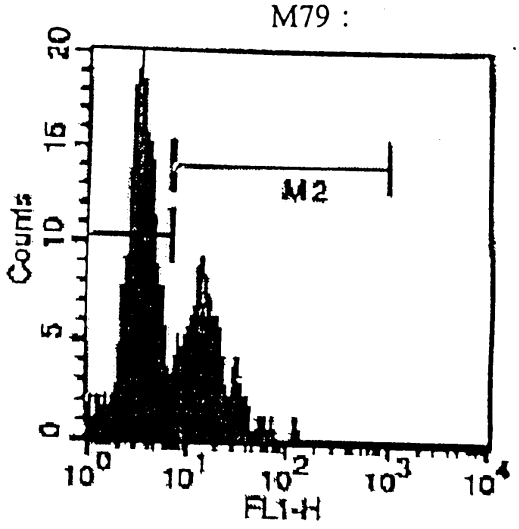
도면16e

Maus IgG :



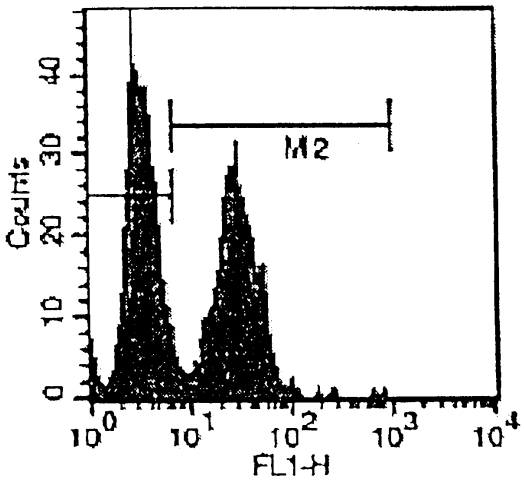
도면16f

M79 :



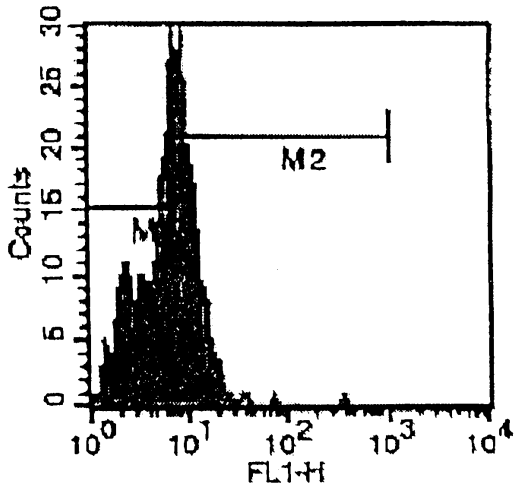
도면16g

H79IgG1M:

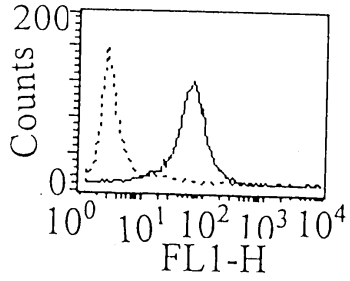


도면16h

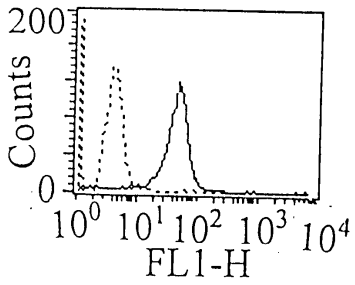
H79IgG1M (1:10):



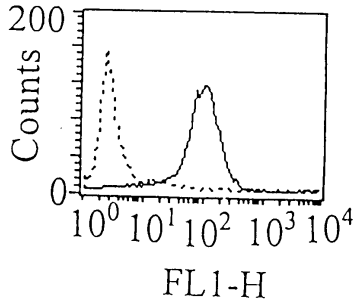
도면17a



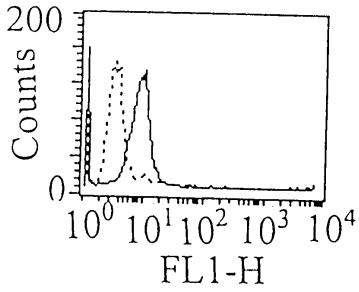
도면17b



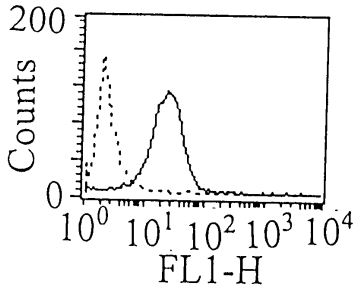
도면17c



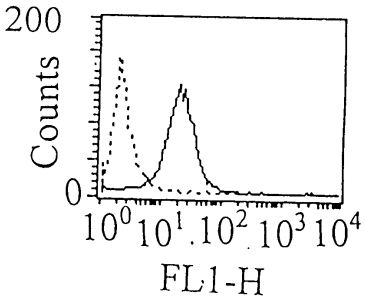
도면17d



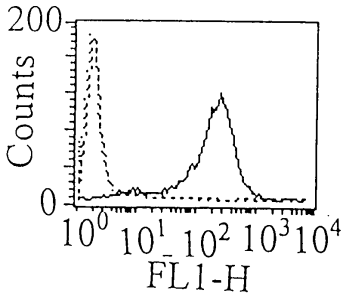
도면17e



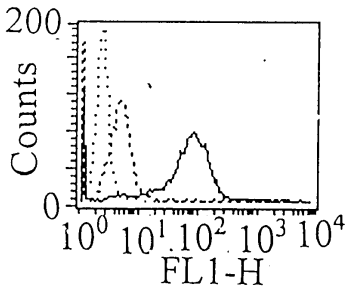
도면17f



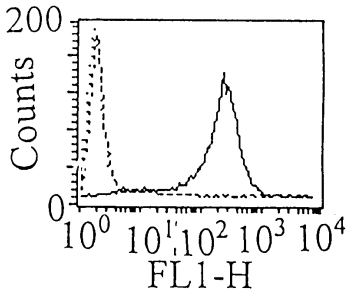
도면17g



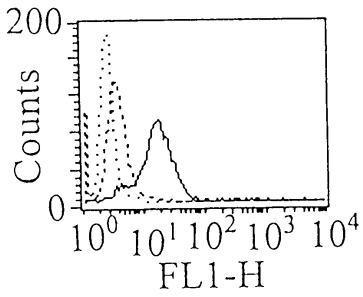
도면17h



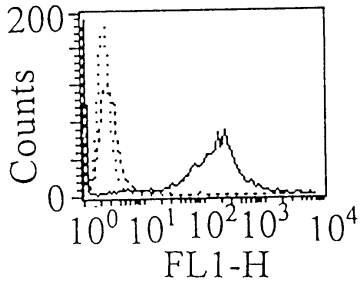
도면17i



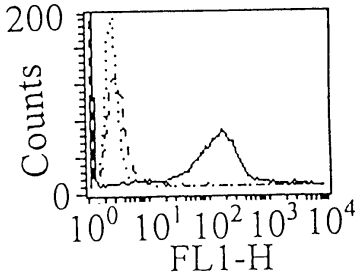
도면17j



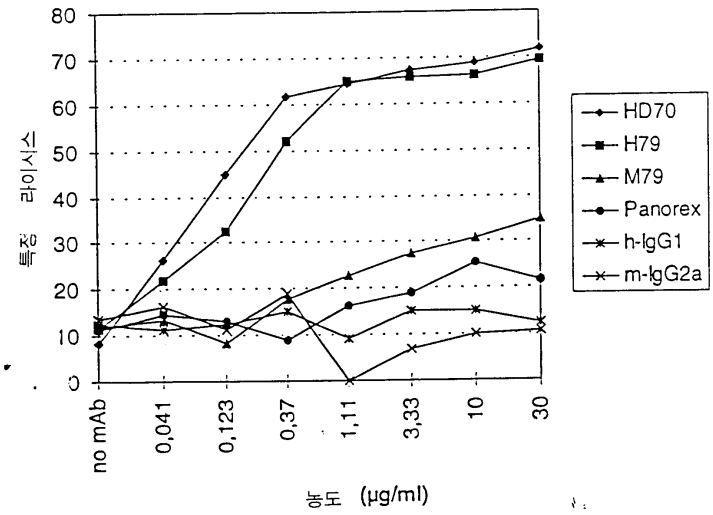
도면17k



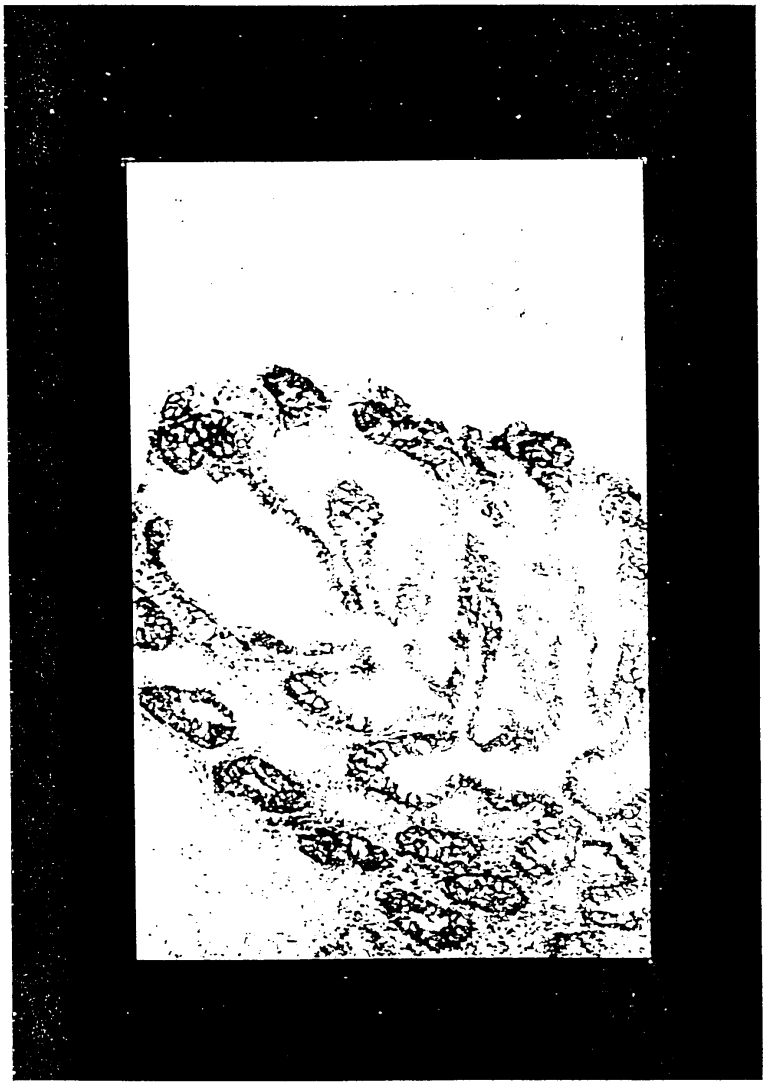
도면17l



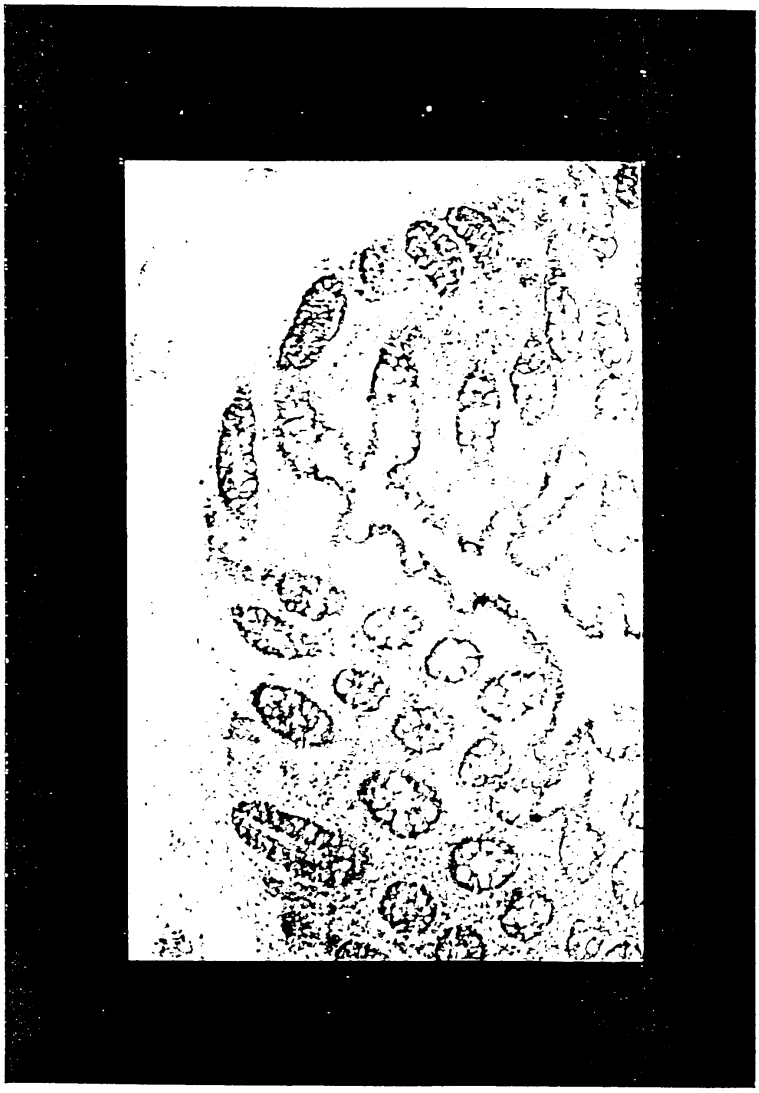
도면18



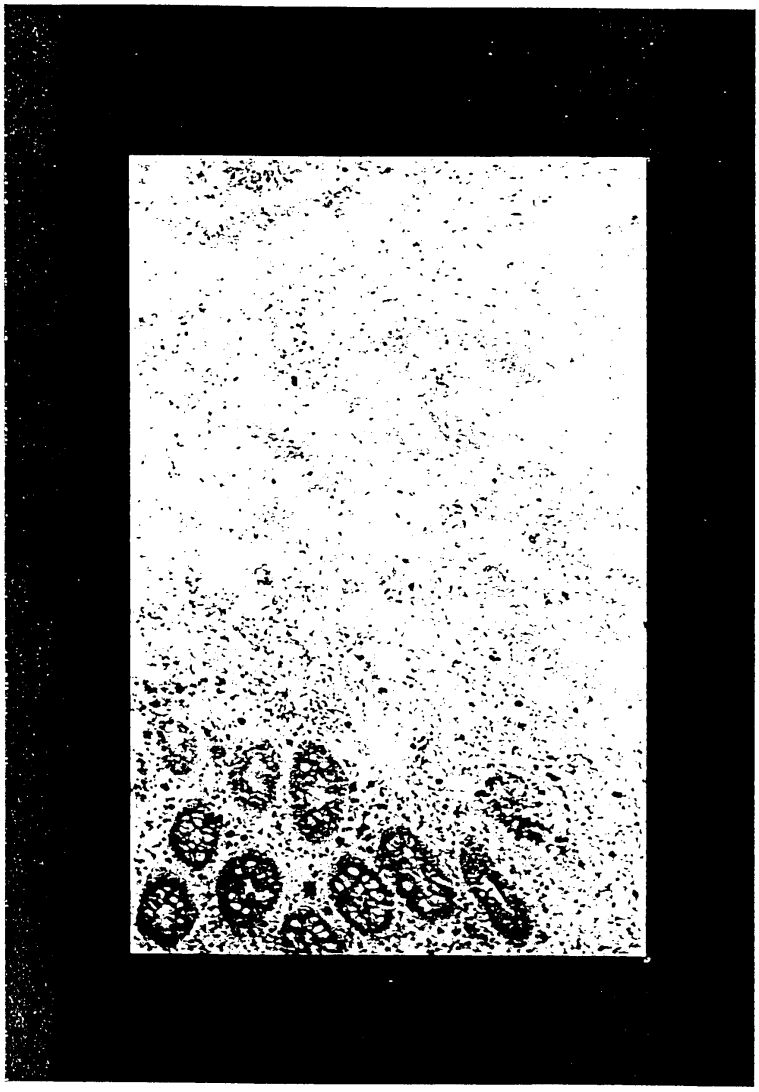
도면19



도면20



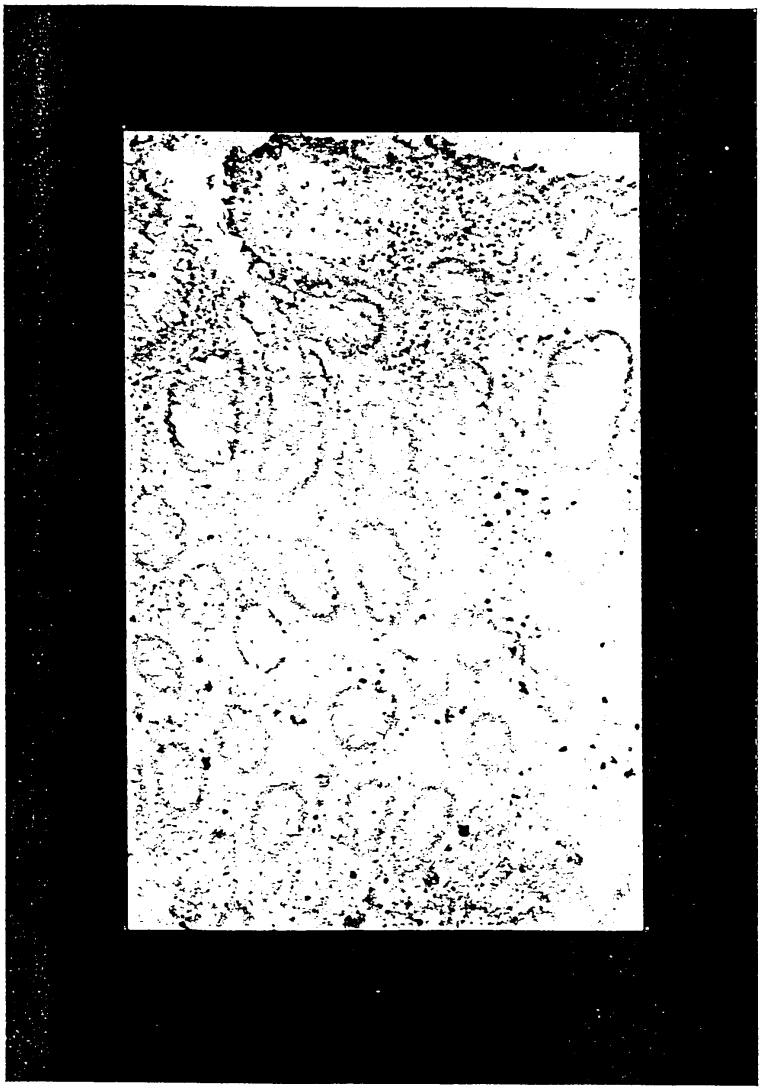
도면21



도면22



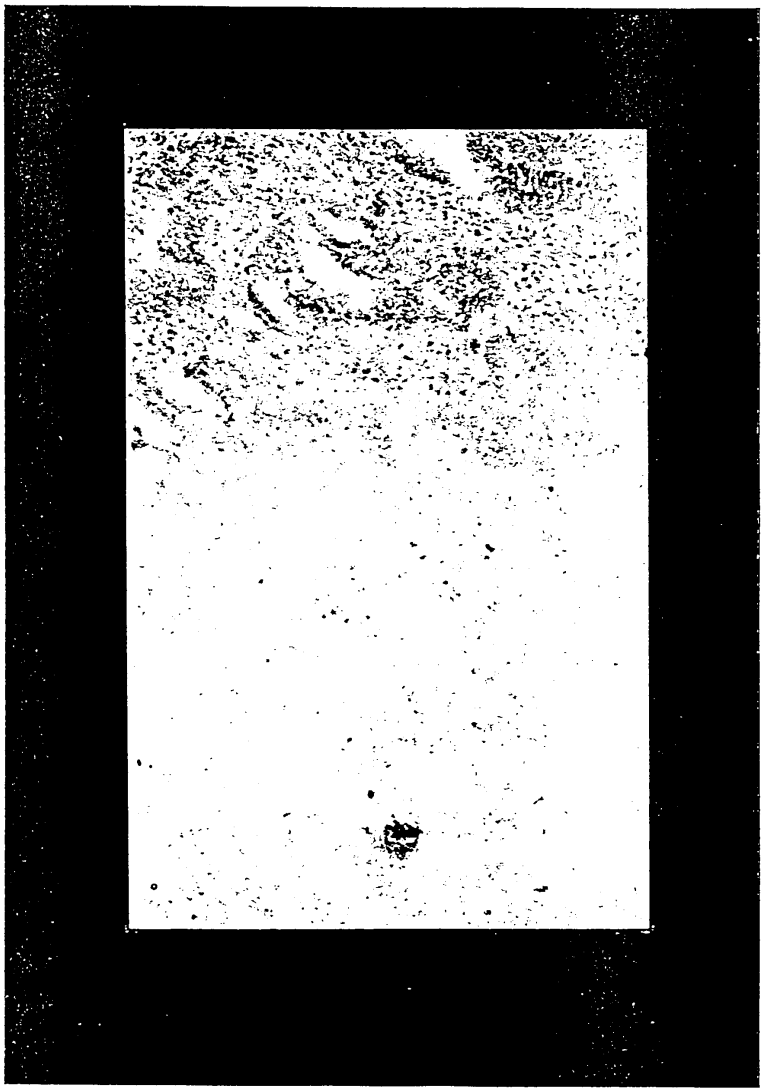
도면23



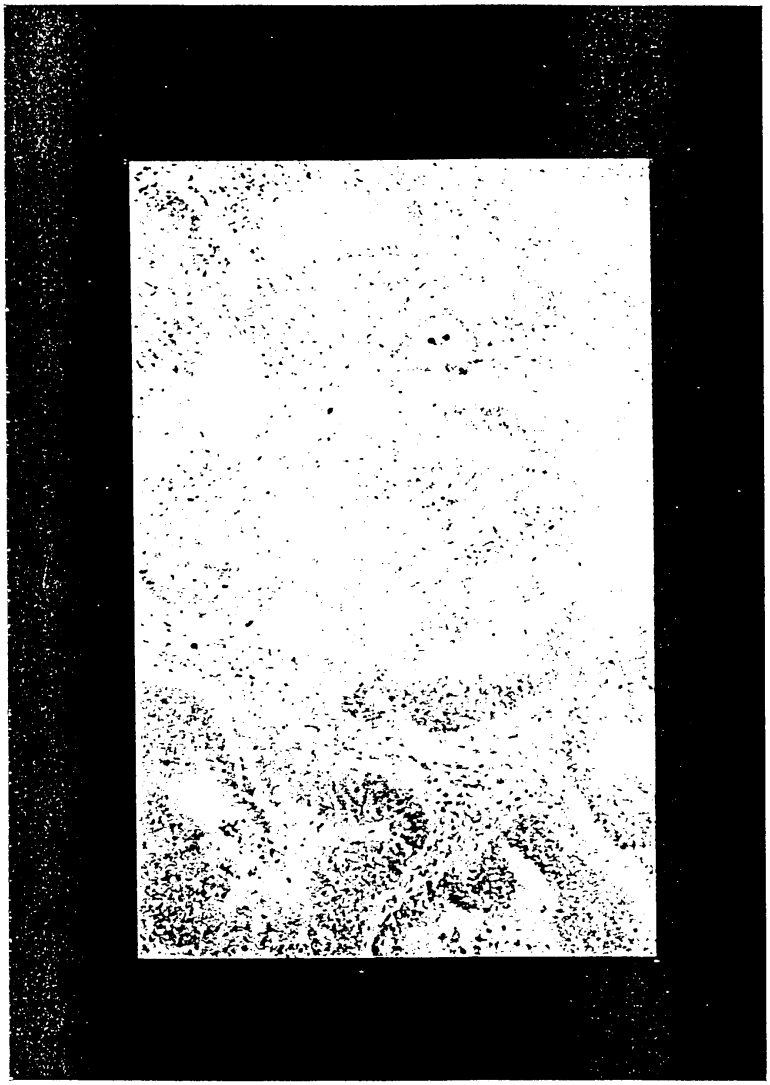
도면24



도면25

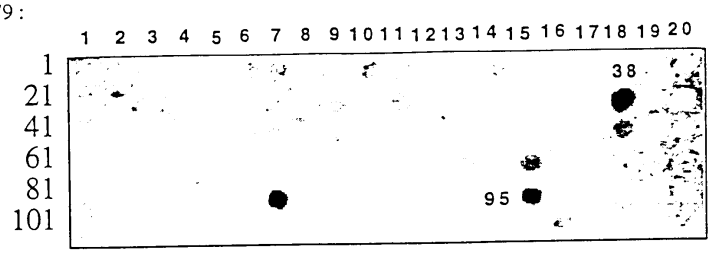


도면26

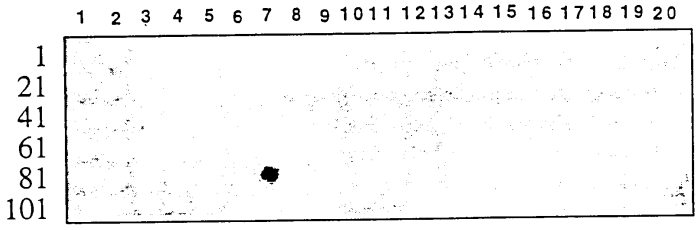


도면27

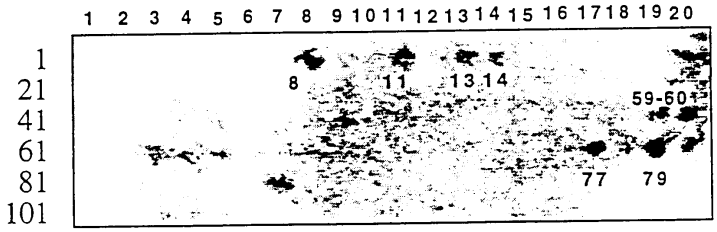
M79 :



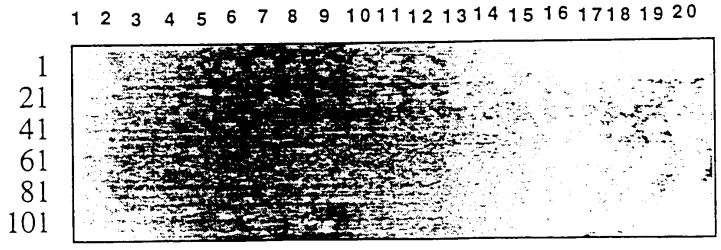
HRP-결합된 항-쥐 면역글로불린 2차 항체



H79 :



HD70 :



서열목록

(1) GENERAL INFORMATION:
(i) APPLICANT:
(A) NAME: KUFER, Peter
(B) STREET: Graf-Konrad-Strasse 2
(C) CITY: Moosburg
(E) COUNTRY: DE
(F) POSTAL CODE (ZIP): 85368
(A) NAME: RAUM, Tobias
(B) STREET: Zentnerstrasse 20
(C) CITY: Muenchen
(E) COUNTRY: DE

(F) POSTAL CODE (ZIP): 80798
(ii) TITLE OF INVENTION: Novel method for the production of anti-human antigen receptors and uses thereof
(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 148
(iv) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)
(v) CURRENT APPLICATION DATA:
APPLICATION NUMBER: WO PCT/EP98/02180
(vi) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: EP 97 10 6109.8
(B) FILING DATE: 14-APR-1997

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:
AGGTGCAGCT GCTCGAGTCT GG 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:
CAGAGTCACC TTGCTCGAGT CTGG 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:
CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:
CAGGTGCAGC TACTCGAGTG GGG 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:
CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:
TGCCTTACTA GTCTCTGGCC AGCGGAAGAT 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 38 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:
GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCC 38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 40 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:
GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATTGAC AGCAGTCTCC 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 39 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:
GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATGACC TCAGTCTCC 39

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 38 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:
GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CACACTCACG CAGTCTCC 38
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 38 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:
GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGCTGACT CAGTCTCC 38
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 58 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:
GCGCCGTCTA GAATTAACAC TCTCCCCTGT TGAAGCTCTT TGTGACGGGC GAACTCAG 58
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:
AATTTTGAGC TCACTCAGCC CCAC 24
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:
TCTGCCGAGC TCCAGCCTGC CTCCGTG 27
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:
TCTGTGGAGC TCCAGCCGCC CTCAGTG 27
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 33 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:
TCTGAAGAGC TCCAGGACCC TGTTGTGTCT GTG 33
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:
CAGTCTGAGC TCACGCAGCC GCCC 24
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:
CAGACTGAGC TCACTCAGGA GCCC 24
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:
CAGGTTGAGC TCACTCAACC GCCC 24
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:
CAGGCTGAGC TCACTCAGCC GTCTTCC 27
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "primer"
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:
CGCCGTCTAG AATTATGAAC ATTCTGTAGG 30
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:
Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:
Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:
Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:

Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 33:

Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 34:

Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 35:

Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 36:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 36:
Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 37:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 37:
Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 38:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 38:
Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 39:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 39:
Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 40:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 40:
Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 41:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 41:
Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 42:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 42:
Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 43:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 43:
Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 44:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 44:
Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 45:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 45:
Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 46:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 46:
Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 47:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 47:
Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 48:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 48:
Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 49:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 49:
Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 50:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 50:
Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 51:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 51:

Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 52:

Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 53:

Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 54:

Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 55:

Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 56:

Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 57:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 57:
Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 58:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 58:
Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 59:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 59:
Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 60:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 60:
Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 61:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 61:
Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 62:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 62:
Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 63:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 63:
Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 64:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 64:
Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 65:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 65:
Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 66:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 66:
Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 67:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 67:
Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 68:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 68:
Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 69:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 69:
Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 70:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 70:
Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 71:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 71:
Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 72:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 72:
Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 73:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 73:
Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 74:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 74:
Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 75:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 75:
Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 76:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 76:
Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 77:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 77:
Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 78:
Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 79:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 79:
Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 80:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 80:
Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 81:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 81:
Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 82:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 82:
Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 83:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 83:
Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 84:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 84:
Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 85:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 85:
Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 86:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 86:
Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 87:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 87:
Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 88:

Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 89:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 89:

Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 90:

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

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 91:

Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 92:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 92:

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

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 93:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 93:
Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 94:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 94:
Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 95:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 95:
Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 96:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 96:
Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 97:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 97:
Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 98:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 98:
Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 99:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 99:
Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 100:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 100:
Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 101:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 101:
Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 102:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 102:
Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 103:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 103:
Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 104:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptid
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 104:
Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 105:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 105:
Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 106:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 106:
Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 107:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 107:
Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 108:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 108:
Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 109:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 109:
Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 110:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 110:
Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 111:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 111:
Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 112:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 112:
Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 113:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 113:
Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 114:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 114:

Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 115:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 115:

Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 116:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 116:

Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 117:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 117:

Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 118:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 118:

Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys

1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 119:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 119:
Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 120:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 120:
Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 121:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 121:
Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 122:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 122:
Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 123:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 123:
Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 124:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids

(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 124:
Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 125:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 125:
Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 126:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 126:
Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 127:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 127:
His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 128:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 128:
Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 129:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 129:
Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 130:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 130:
Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 131:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 131:
Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 132:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 132:
Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 133:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 133:
Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr
1 5 10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 134:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 134:
Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 135:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 135:
Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 136:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 136:
Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 137:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 137:
Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 138:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 138:
Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 139:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 13 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 139:
Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly

```
     1               5                   10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 140:
     (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 13 amino acids
          (B) TYPE: amino acid
          (C) STRANDEDNESS: single
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ii) MOLECULE TYPE: peptide
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 140:
     Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys
     1               5                   10
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 141:
     (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 321 base pairs
          (B) TYPE: nucleic acid
          (C) STRANDEDNESS: double
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ix) FEATURE:
          (A) NAME/KEY: CDS
          (B) LOCATION:1..321
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 141:
GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA        48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT        96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
             20                  25                  30
TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT       144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45
TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC       192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60
AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT       240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                  70                  75                  80
GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG AGT TAC GAC ATC CCG TAC       288
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
                 85                  90                  95
ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA                          321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 142:
       (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 107 amino acids
          (B) TYPE: amino acid
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ii) MOLECULE TYPE: protein
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 142:
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
```

```
             20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                  70                  75                  80
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
                 85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 143:
     (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 414 base pairs
          (B) TYPE: nucleic acid
          (C) STRANDEDNESS: double
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ix) FEATURE:          (A) NAME/KEY: CDS          (B) LOCATION:1..414
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 143:
GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG        48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
        110                 115                 120
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    125                 130                 135
GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG       144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
140                 145                 150                 155
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG       192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                160                 165                 170
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT       240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
            175                 180                 185
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT       288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
        190                 195                 200
GCG AAA GAT ATG GGG TGG GGC AGT GGC TGG AGA CCC TAC TAC TAC TAC       336
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
    205                 210                 215
GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCA       384
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
220                 225                 230                 235
CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA                               414
Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
                240                 245
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 144:
       (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 138 amino acids
          (B) TYPE: amino acid
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ii) MOLECULE TYPE: protein
```

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 144:

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                 85                  90                  95
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125
Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
130 135
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 145:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 372 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION:1..372

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 145:

```
GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GTC GTG GTA CAG CCT GGG GGG        48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
    140                 145                 150
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
155                 160                 165                 170
GCC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG       144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                175                 180                 185
GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG       192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            190                 195                 200
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT       240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        205                 210                 215
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT       288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    220                 225                 230
GCG AAA AAG GAA GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC       336
Ala Lys Lys Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
235                 240                 245                 250
TCA GCA CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA                       372
Ser Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
```

```
                255                 260
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 146:
       (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 124 amino acids
          (B) TYPE: amino acid
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ii) MOLECULE TYPE: protein
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 146:
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
  1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
             20                  25                  30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
         35                  40                  45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Lys Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110
Ser Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
115 120
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 147:
     (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 321 base pairs
          (B) TYPE: nucleic acid
          (C) STRANDEDNESS: double
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ix) FEATURE:
          (A) NAME/KEY: CDS
          (B) LOCATION:1..321
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 147:
GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA        48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
125                 130                 135                 140
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT        96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                145                 150                 155
TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT       144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
            160                 165                 170
TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGC GGC       192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        175                 180                 185
AGT GAA TCT GGG ACA AAT TAC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT       240
Ser Glu Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    190                 195                 200
GAA GAT TTT GCT ACT TAC TTT TGT CAA CAG TCT GAC AGT TTG CCG ATC       288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Leu Pro Ile
205                 210                 215                 220
```

```
ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAC ATT CAA                              321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Gln
                225                 230
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 148:
       (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
          (A) LENGTH: 107 amino acids
          (B) TYPE: amino acid
          (D) TOPOLOGY: linear
    (ii) MOLECULE TYPE: protein
    (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 148:
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
             20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60
Ser Glu Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Leu Pro Ile
                 85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Gln
            100                 105
```