



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0125044
(43) 공개일자 2018년11월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/30 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7032867(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년02월17일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7018394
원출원일자(국제) 2010년02월17일
심사청구일자 2017년08월02일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/024407
- (87) 국제공개번호 WO 2010/096434
국제공개일자 2010년08월26일
- (30) 우선권주장
12/388,504 2009년02월18일 미국(US)

- (71) 출원인
루드비히 인스티튜트 포 캔서 리서치 리미티드
스위스 취리히 체하-8001 슈타델호퍼슈트라세 22
- (72) 발명자
올드 로이드 제이.
미국 뉴욕주 10024 뉴욕 아파트먼트 6디 웨스트
엔드 애비뉴 600
존스 테렌스 그랜트
오스트레일리아 클레이튼주 3168 라이트 스트리트
27-31 모나쉬 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

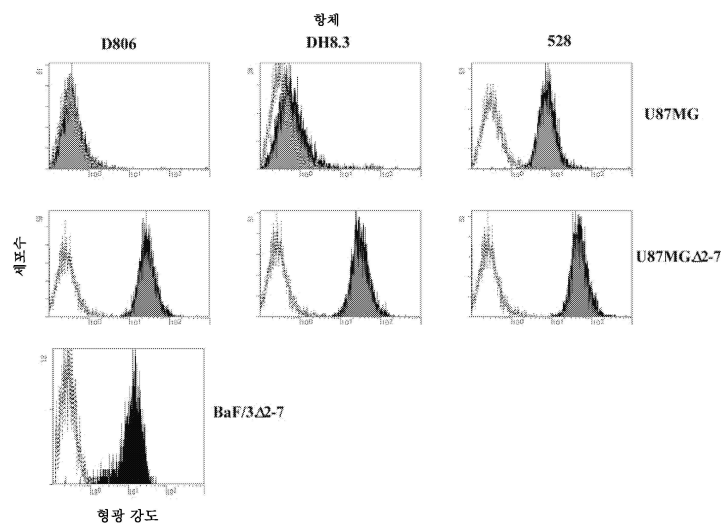
전체 청구항 수 : 총 86 항

(54) 발명의 명칭 특이적 결합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 증폭된 상피 성장인자 수용체(EGFR) 및 EGFR의 de2-7 EGFR 절두형에 결합하는, 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편에 의해 인식되는 에피토프는 이상 해독후 변형 시 증가되거나 분명해진다. 이러한 특이적 결합 구성원은 암의 진단 및 치료에 유용하다. 또한, 본 발명의 결합 구성원은 화학요법 또는 항암제 및/또는 다른 항체 또는 이의 단편과 함께 치료법에 사용될 수도 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/68 (2017.08)

C07K 16/2863 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

(72) 발명자

파노우시스 쿤

오스트레일리아 빅토리아주 멜버른 3085 맥클레오드 어스킨 로드 77

스콧 앤드류 마크

오스트레일리아 빅토리아주 3101 쿼 코탐 로드 367

레너 크리스토프

독일 66424 홈부르크/자르 링슈트라쎄 8

리터 게르트

미국 뉴욕주 10021 뉴욕 아파트먼트 10에이 이스트 63번 스트리트 430

융블루트 아힘

미국 뉴욕주 10021 뉴욕 아파트먼트 9디 이스트 63번 스트리트 450

슈토케르트 엘리자베트

오스트리아 1010 빈 플랑켄가쎄 1/8

콜린스 피터

영국 쉼비2 아이에이치엘 케임브리지 펜톤 스트리트 67

캐비니 웨스터 케이.

미국 캘리포니아주 92014 텔 마 비스타 데 이아 티에라 4657

황 후에이-전 쑤

미국 캘리포니아주 92067 랜초 산타 페 피.오. 박스 247

버제스 앤토니 월크스

오스트레일리아 3124 빅토리아주 캠버웰 레인지 스트리트 32

나이스 에두아르 폴린스

오스트레일리아 빅토리아주 3182 세인트 킬다 오테사 스트리트 9

머레이 앤

미국 뉴욕주 10021 뉴욕 요크 애비뉴 1275

마크 조지

미국 뉴욕주 10021 뉴욕 요크 애비뉴 1275

명세서

청구범위

청구항 1

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다수 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 상기 항체는 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302(서열번호 14)의 서열 내의 에피토프에 결합하며, 상기 항체는 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않고 서열번호 4에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않는, 분리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가, 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 및 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가, 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 및 서열번호 134에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체가, 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 및 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체가, 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 및 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역이 서열번호 44, 45 및 46에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 49, 50 및 51에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역이 서열번호 130, 131 및 132에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 135, 136 및 137에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역이 서열번호 23, 24 및 25에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 28, 29 및 30에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역이 서열번호 33, 34 및 35에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 38, 39 및 40에 제시한 아미노산 서열과 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 분리된 항체가 항체 F(ab')₂, scFv 단편, 이중항체(diabody), 삼중항체(triobody) 또는 사중항체(tetrabody) 형태인, 분리된 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 검출성 또는 기능성 표지를 추가로 포함하는, 분리된 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 검출성 또는 기능성 표지가, 공유 부착된 약물인, 분리된 항체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 표지가 방사능표지인, 분리된 항체.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 분리된 항체가 폐경화된, 분리된 항체.

청구항 19

제1항의 분리된 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산.

청구항 20

제1항에 따른 분리된 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 항체의 발현을 유발시키는 조건 하에 핵산을 발현시키고, 상기 항체를 회수함을 포함하는, 방법.

청구항 21

제1항에 따른 분리된 항체의 유효량을 사람 환자에게 투여함을 포함하여, 사람 환자의 종양을 치료하는 방법.

청구항 22

제1항의 분리된 항체를 포함하는, EGFR이 이상 발현되거나 EGFR이 절두형 단백질 형태로 발현되는 종양의 진단

용 키트.

청구항 23

제22항에 있어서, 시약 및/또는 사용설명서를 추가로 포함하는, EGFR이 이상 발현되거나 EGFR이 절두형 단백질 형태로 발현되는 종양의 진단용 키트.

청구항 24

제1항에 따른 분리된 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 화학치료제, 항-EGFR 항체, 방사능면역치료제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항암제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 화학치료제가 티로신 키나제 억제제, 인산화 캐스캐이드 억제제, 해독후 조절제, 세포 성장 또는 분열 억제제(예: 항유사분열제), 시그널 전달 억제제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 티로신 키나제 억제제가 AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 항-EGFR 항체가 항-EGFR 항체 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 30

제24항에 따른 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 포유동물의 암을 예방 및/또는 치료하는 방법.

청구항 31

제24항에 따른 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 포유동물에서 이상 발현된 EGFR을 생산하는 뇌-상주성 암(brain-resident cancer)을 치료하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 뇌-상주성 암이 아교모세포종, 수질모세포종, 수막종, 신생물 성상세포종 및 신생물 동정맥 기형으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 포유동물에서 이상 발현된 EGFR을 생산하는 뇌-상주성 암을 치료하는 방법.

청구항 33

제1항의 분리된 항체를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주.

청구항 34

제1항의 분리된 항체를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주로서, 상기 단세포 숙주가 조직 배양물 중의 이.콜라이(E. coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 바실러스(Bacillus), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 효모, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 및 BMT10 세포,

식물 세포, 곤충 세포 및 사람 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 단세포 숙주.

청구항 35

증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재를 검출하는 방법으로서, (a) 증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재가 의심되는 포유동물 유래의 생물학적 샘플을, 제1항의 분리된 항체에의 상기 EGFR의 결합이 일어나게 하는 조건 하에, 상기 분리된 항체와 접촉시키고; (b) 상기 샘플 유래의 상기 EGFR과 상기 분리된 항체 사이에 결합이 일어났는지 여부를 검출함에 의해, 상기 EGFR을 측정하고, 결합의 검출은 상기 샘플 중의 상기 EGFR의 존재 또는 활성을 나타내는, 방법.

청구항 36

제35항의 방법에 따라 EGFR의 존재 또는 활성을 검출함을 포함하는 포유동물의 암을 검출하는 방법으로서, 상기 EGFR의 존재의 검출은 상기 포유동물 내의 종양 또는 암의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 37

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항체의 상기 중쇄는 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체의 상기 경쇄는 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 39

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역은 서열번호 44, 45 및 46에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 서열번호 49, 50 및 51에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 40

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 134에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 항체의 상기 중쇄가 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체의 상기 경쇄가 서열번호 134에 제시한 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 42

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역은 서열번호 130, 131 및 132에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 서열번호 135, 136 및 137에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 43

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 항체의 상기 중쇄가 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체의 상기 경쇄가 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 45

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역은 서열번호 23, 24 및 25에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 서열번호 28, 29 및 30에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 46

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는, 분리된 항체.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 항체의 상기 중쇄가 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체의 상기 경쇄가 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 48

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 중쇄의 가변 영역은 서열번호 33, 34 및 35에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 서열번호 38, 39 및 40에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체.

청구항 49

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 상기 항체는 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302(서열번호 14)의 서열 내의 에피토프에 결합하며,

상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 하기 서열식 (I)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (II)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 하기 서열식 (III)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고;

상기 중쇄의 가변 영역은 하기 서열식 (IV)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (V), (VI) 또는 (VII)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 하기 서열식 (VIII)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하며;

상기 항체는 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않고, 서열번호 4

에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않는, 분리된 항체:

서열식 (I)

HSSQDIXaa₁SNIG

(여기서, Xaa₁은 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다);

서열식 (II)

HGTNLXaa₂D

(여기서, Xaa₂는 하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다);

서열식 (III)

VQYXaa₃QFPWT

(여기서, Xaa₃은 A, G, 및 A 또는 G 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다);

서열식 (IV)

SDXaa₄AWN

(여기서, Xaa₄는 F, Y, 및 F 또는 Y 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다);

서열식 (V)

YISYSGNTRYXaa₅PSLKS

(여기서, Xaa₅는 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다);

서열식 (VI)

YISYSXaa₆NTRYNPSLKS

(여기서, Xaa₆은 G, A, 및 G 또는 A 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다);

서열식 (VII)

YISYSGNTRYNPSLXaa₇S

(여기서, Xaa₇은 염기성 아미노산 잔기이다);

서열식 (VIII)

Xaa₈TAGRGFPY

(여기서, Xaa₈은 V, A, 및 V 또는 A 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다).

청구항 50

제49항에 있어서, Xaa₁이 N이고; Xaa₂가 D이고; Xaa₃이 A이고; Xaa₄가 F이고; Xaa₅가 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이고; Xaa₆이 G이고; Xaa₇이 K이고; Xaa₈이 V인, 분리된 항체.

청구항 51

제50항에 있어서, Xaa₅가 N 또는 Q인, 분리된 항체.

청구항 52

제49항에 있어서, Xaa₁이 N 또는 S인, 분리된 항체.

청구항 53

제49항에 있어서, Xaa₂가 D 또는 E인, 분리된 항체.

청구항 54

제49항에 있어서, Xaa₃이 A 또는 G인, 분리된 항체.

청구항 55

제49항에 있어서, Xaa₄가 F 또는 Y인, 분리된 항체.

청구항 56

제49항에 있어서, Xaa₅가 N 또는 Q인, 분리된 항체.

청구항 57

제49항에 있어서, Xaa₆이 G 또는 A이고, Xaa₇이 독립적으로 K 또는 R인, 분리된 항체.

청구항 58

제49항에 있어서, Xaa₈이 V 또는 A인, 분리된 항체.

청구항 59

제49항에 있어서, 상기 분리된 항체가 항체 F(ab')₂, scFv 단편, 이중항체, 삼중항체 또는 사중항체 형태인, 분리된 항체.

청구항 60

제49항에 있어서, 검출성 또는 기능성 표지를 추가로 포함하는, 분리된 항체.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 검출성 또는 기능성 표지가, 공유 부착된 약물인, 분리된 항체.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 표지가 방사능표지인, 분리된 항체.

청구항 63

제49항에 있어서, 상기 분리된 항체가 폐길화된, 분리된 항체.

청구항 64

제49항의 분리된 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산.

청구항 65

제49항에 따른 분리된 항체를 제조하는 방법으로서, 상기 항체의 발현을 유발시키는 조건 하에 핵산을 발현시키고, 상기 항체를 회수함을 포함하는, 방법.

청구항 66

제49항에 따른 분리된 항체의 유효량을 사람 환자에게 투여함을 포함하여, 사람 환자의 종양을 치료하는 방법.

청구항 67

제49항의 분리된 항체를 포함하는, EGFR이 이상 발현되거나 EGFR이 절두형 단백질 형태로 발현되는 종양의 진단

용 키트.

청구항 68

제67항에 있어서, 시약 및/또는 사용설명서를 추가로 포함하는, EGFR이 이상 발현되거나 EGFR이 절두형 단백질 형태로 발현되는 종양의 진단용 키트.

청구항 69

제49항에 따른 분리된 항체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 70

제69항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 희석제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 71

제69항에 있어서, 화학치료제, 항-EGFR 항체, 방사능면역치료제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항암제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 화학치료제가 티로신 키나제 억제제, 인산화 캐스캐이드 억제제, 해독후 조절제, 세포 성장 또는 분열 억제제(예: 항유사분열제), 시그널 전달 억제제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 티로신 키나제 억제제가 AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 74

제71항에 있어서, 상기 항-EGFR 항체가 항-EGFR 항체 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 75

제69항에 따른 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 포유동물의 암을 예방 및/또는 치료하는 방법.

청구항 76

제69항에 따른 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 포유동물에서 이상 발현된 EGFR을 생산하는 뇌-상주성 암을 치료하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 뇌-상주성 암이 아교모세포종, 수질모세포종, 수막종, 신생물 성상세포종 및 신생물 동정맥 기형으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 포유동물에서 이상 발현된 EGFR을 생산하는 뇌-상주성 암을 치료하는 방법.

청구항 78

제49항의 분리된 항체를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주.

청구항 79

제49항의 분리된 항체를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주로서, 상기 단세포 숙주가 조직 배양물 중의 이.콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 효모, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 및 BMT10 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 사람 세포로 이루어진 그룹 중에서

선택되는, 단세포 숙주.

청구항 80

증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재를 검출하는 방법으로서, (a) 증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재가 의심되는 포유동물 유래의 생물학적 샘플을, 제49항의 분리된 항체에의 상기 EGFR의 결합이 일어나게 하는 조건 하에, 상기 분리된 항체와 접촉시키고; (b) 상기 샘플 유래의 상기 EGFR과 상기 분리된 항체 사이에 결합이 일어났는지 여부를 검출함에 의해, 상기 EGFR을 측정하고, 결합의 검출은 상기 샘플 중의 상기 EGFR의 존재 또는 활성을 나타내는, 방법.

청구항 81

제80항의 방법에 따라 EGFR의 존재 또는 활성을 검출함을 포함하는 포유동물의 암을 검출하는 방법으로서, 상기 EGFR의 존재의 검출은 상기 포유동물 내의 종양 또는 암의 존재를 나타내는, 방법.

청구항 82

EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 상기 항체는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 상기 항체는 사람 야생형 EGFR의 잔기 273-501의 서열 내의 에피토프에 결합하며,

상기 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 경쇄의 가변 영역은 아미노산 서열 HSSQDINSNIG(서열번호 18)를 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 아미노산 서열 HGTNLDD(서열번호 19)를 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 아미노산 서열 VQYQFPWT(서열번호 20)를 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고;

상기 중쇄의 가변 영역은 아미노산 서열 SDFAWN(서열번호 15)을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (IX)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 아미노산 서열 VTAGRGPY(서열번호 17)을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 분리된 항체:

서열식 (IX)

YISYSGNTRYXaa₉PSLKS

(여기서, Xaa₉는 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다).

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 항체가 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302(서열번호 14)의 서열 내의 에피토프에 결합하는, 분리된 항체.

청구항 84

제82항에 있어서, Xaa₉가 N 또는 Q인, 분리된 항체.

청구항 85

제82항에 있어서, 상기 결합 도메인 영역이 사람 항체 골격에 의해 운반되는, 분리된 항체.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 사람 항체 골격이 사람 IgG1 항체 골격인, 분리된 항체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원 데이터

[0002] 본 국제 PCT 특허 출원은 2009년 2월 18일에 출원된 미국 특허출원 제12/388,504호에 대해 우선권을 주장하며, 이의 교시 전체는 본원에 참고 인용된다. 본 국제 PCT 특허 출원은 또한 2002년 5월 13일에 출원된 미국 특허출원 제10/145,598호(현재, 2009년 9월 15일자로 등록된 미국 특허 제7,589,180호); 2001년 5월 11일에 출원된 미국 임시특허출원 제60/290,410호; 2001년 9월 28일에 출원된 미국 임시특허출원 제60/326,019호; 2001년 12월 21일에 출원된 미국 임시특허출원 제60/342,258호; 2002년 5월 13일에 출원된 국제 PCT 특허출원 제PCT/US02/15185호(2002년 11월 21일에 WO 02/092771로 공개됨); 2008년 8월 14일에 출원된 국제 PCT 특허출원 제PCT/US2008/009771호(2009년 2월 19일에 WO 2009/023265로 공개됨); 및 2007년 8월 14일에 출원된 미국 임시특허출원 제60/964,715호의 각 교시 전체를 참고인용한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 증폭된 상피 성장인자 수용체(EGFR) 및 EGFR의 엑손 2 내지 7의 프레임내 결실부에 결합하여 세포의 도메인으로부터 267개 아미노산이 결손된 절두형 EGFR 수용체(de2-7 EGFR)를 산출하는, 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편에 의해 인식되는 에피토프는 이상 해독후 변형 시 증가되거나 분명해진다. 이러한 특이적 결합 구성원은 암의 진단 및 치료에 유용하다. 또한, 본 발명의 결합 구성원은 화학요법 또는 항암제 및/또는 다른 항체 또는 이의 단편과 함께 치료법에 사용될 수도 있다.

배경 기술

[0005] 화학치료 수단에 의한 증식성 질환, 특히 암의 치료는 사람 또는 동물 체내의 표적 증식 세포 및 다른 정상 세포에서의 차이를 개발하는데 의존적이다. 예를 들어, 많은 화학제는 빠르게 복제하는 DNA에 의해 흡수되도록 설계되어, DNA 복제 및 세포 분열 과정을 방해한다. 다른 접근법은 발달된 사람 조직, 예컨대 종양 항원 또는 배아 항원에서 정상적으로 발현되지 않는 종양 세포 또는 다른 비정상 세포의 표면에서 항원을 확인하는 것이다. 이러한 항원은 항원을 차단하거나 중화시킬 수 있는 항체와 같은 결합 단백질로 표적화될 수 있다. 또한, 항체 및 이의 단편을 비롯한 결합 단백질은 종양 부위에서 독성 체제를 직접 또는 간접적으로 활성화시킬 수 있는 독성 체제 또는 다른 물질을 전달할 수 있다.

[0006] EGFR은 많은 종류의 상피 종양에서 과발현되기 때문에 종양-표적화된 항체 치료법에 매력적인 표적이다(Voldborg et al.(1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* 8, 1197-206; den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition, pp. 2424-31. London: Academic Press (1998)). 더욱이, EGFR의 발현은 많은 종양 종류, 예컨대 위, 결장, 방광, 유방, 전립선, 내막, 신장 및 뇌(예: 신경아교종)의 나쁜 예후와 연관이 있다. 결과적으로, 많은 EGFR 항체가 문헌에 보고되었고, 몇몇은 임상 평가 중이다(Baselga et al. (2000) Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 18, 904; Faillot et al. (1996): A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery.* 39, 478-83; Seymour, L. (1999) Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat. Rev.* 25, 301-12)).

[0007] 두경부암, 편평세포 폐암, 뇌 신경아교종 및 악성 성상세포종 환자에서 EGFR mAb를 이용한 연구의 결과는 고무적이었다. 대부분의 EGFR 항체의 항종양 활성은 리간드 결합을 차단하는 능력에 의해 증강된다(Sturgis et al. (1994) Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck. Surg.* 111, 633-43; Goldstein et al. (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.* 1, 1311-8). 이러한 항체는 세포 증식 조절 및 항체 의존적 면역 기능(예: 보체 활성화)을 통해 자신의 효능을 매개할 수 있다. 하지만, 이러한 항체의 사용은 간 및 피부와 같이 EGFR의 높은 내인성 수준을 보유하는 기관에서 흡수되어 제한될 수 있다(Baselga et al., 2000; Faillot et al., 1996).

[0008] 또한, EGFR 유전자의 증폭(즉, EGFR 유전자의 다중 카피)을 함유하는 종양의 상당한 비율은 de2-7 EGFR, Δ EGFR 또는 Δ 2-7(이 용어들은 본원에서 호환 사용됨)로 알려진 수용체의 절두형(Wikstrand et al. (1998) The class

III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.* 4, 148-158)을 공동발현한다(Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 82, 186-94). de2-7 EGFR에서 관찰되는 재배열은 엑손 2-7에 걸쳐 있는 801개 뉴클레오타이드가 결손된 프레임내 성숙 mRNA를 생산한다(Wong et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 89, 2965-9; Yamazaki et al. (1990) A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 773-9; Yamazaki et al. (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol. Cell Biol.* 8, 1816-20; Sugawa et al. (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8602-6). 대응하는 EGFR 단백질은 세포외 도메인의 잔기 6-273 및 융합 연결부에 신규 글리신 잔기를 함유하는 267개 아미노산 결실을 보유한다(Sugawa et al., 1990). 글리신 잔기의 삽입과 함께 상기 결실은 결실 계면에 독특한 연결부 펩타이드를 생산한다(Sugawa et al., 1990).

[0009] de2-7 EGFR은 신경아교종, 유방암, 폐암, 난소암 및 전립선암을 비롯한 다수의 종양 종류에서 보고되었다(Wikstrand et al. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.* 57, 4130-40; Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 82, 186-94; Wikstrand, et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII in are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 55, 3140-8; Garcia de Palazzo et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 53, 3217-20). 이러한 절두형 수용체는 리간드에 결합하지 않지만, 낮은 구성적 활성을 보유하고 누드 마우스에서 종양 이종이식편으로 성장한 신경아교종 세포에 상당한 성장 이점을 부여하고(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7727-31), NIH3T3 세포(Batra et al. (1995) Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ.* 6, 1251-9) 및 MCF-7 세포를 형질전환시킬 수 있다. 신경아교종 세포에서 de2-7 EGFR에 의해 활용되는 세포 기전은 완전히 밝혀지지 않았지만, 아포토시스 감소(Nagane et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.* 56, 5079-86) 및 소량의 증식 증강(Nagane et al., 1996)을 포함한다.

[0010] 이러한 절두형 수용체의 발현은 종양 세포에 제한되기 때문에, 항체 치료법에서 매우 특이적인 표적이다. 따라서, 많은 연구진들은 de2-7 EGFR의 독특한 펩타이드에 특이적인 폴리클로날(Humphrey et al. (1990) Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4207-11) 및 모노클로날(Wikstrand et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas; Okamoto et al. (1996) Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer.* 73, 1366-72; Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer.* 63, 537-43) 항체의 생성을 보고했다. 독특한 de2-7 펩타이드로 면역화 후에 분리된 일련의 마우스 mAb는 모두 누드 마우스에서 성장한 표적화된 de2-7 EGFR 양성 이종이식편과 절두형 수용체에 대해 선택성과 특이성을 보였다(Wikstrand et al. (1995); Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 57, 1510-5; Reist et al. (1995) Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.* 55, 4375-82).

[0011] 하지만, de2-7 EGFR 항체의 1가지 잠재적 단점은 EGFR 유전자의 증폭을 나타내는 일정 비율의 종양만이 de2-7EGFR을 발현한다는 점이다(Ekstrand et al. (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor

receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 89, 4309-13). de2-7 EGFR을 함유하는 종양의 정확한 비율은 완전하게 확정된 것이 없는데, 그 이유는 다른 기술(즉, PCR 대 면역조직화학) 및 다양한 항체의 사용이 그 존재의 빈도에 대한 매우 광범위한 보고 값을 제공했기 때문이다. 공개된 데이터는 약 25 내지 30%의 신경아교종이 de2-7 EGFR을 발현하고, 이 발현은 역형성 정상세포종에서 가장 낮고 다형성 아교모세포종에서 가장 높다는 것을 나타낸다(Wong et al. (1992); Wikstrand et al. (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.* 4, 148-58; Moscatello et al. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 55, 5536-9). de2-7 EGFR 발현 신경아교종 내에서 양성 세포의 비율은 37-86% 범위로 보고되어 있다(Wikstrand et al. (1997)). 27%의 유방 암종과 17%의 폐암은 de2-7 EGFR 양성인 것으로 발견되었다(Wikstrand et al. (1997); Wikstrand et al. (1995); Wikstrand et al. (1998); 및 Hills et al., 1995). 따라서, de2-7 EGFR 특이적 항체는 일정 비율의 EGFR 양성 종양에서만 유용한 것으로 생각할 수 있을 것이다.

[0012] 따라서, EGFR 항체 활성화에 대한 현존하는 증거는 고무적이지만, 앞에서 생각된 적용가능 범위 및 효능에 대한 관찰된 제한은 여전히 남아 있다. 따라서, 광범위한 종양에 효능을 입증하는 항체 및 유사 체제를 개발하는 것이 필요하며, 이는 본 발명이 지향하는 목적 달성을 위한 것이다.

[0013] 본원에 인용된 문헌들은 이것이 본 발명에 대해 선행 기술이라는 인정으로서 간주되지 않아야 할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 야생형 EGFR과 어떠한 아미노산 서열 변경 또는 치환도 나타내지 않고 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 발견되고 정상 세포 또는 야생형 세포에서는 일반적으로 검출할 수 없는 EGFR 에피토프를 인식하는 분리된 특이적 결합 구성원, 특히 항체 또는 이의 단편을 제공한다(본원에 사용된 "야생형 세포"란 용어는 내인성 EGFR을 발현하되, de2-7 EGFR은 발현하지 않는 세포를 고려하며, 이 용어는 특히 EGFR 유전자를 과발현하는 세포는 배제한다; "야생형"이란 용어는 비정상 또는 종양발생성 세포보다 정상 세포에 존재하는 유전자형 또는 표현형 또는 다른 특징을 의미한다). 또 다른 관점에서, 본 발명은 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 발견되고 일반적으로 정상 세포 또는 야생형 세포에서 검출할 수 없으며 이상 해독후 변형 또는 이상 발현 시에 증가되거나 또는 분명한 EGFR 에피토프를 인식하는 특이적 결합 구성원, 구체적으로 항체 또는 이의 단편을 제공한다. 본 명세서에 제공된 비제한적 특정예에서, EGFR 에피토프는 해독후 변형이 야생형 세포에서 EGFR의 정상 발현 시에 관찰되는 정도까지 충분하지 않거나 완전하지 않은 경우에 EGFR 에피토프가 증가되거나 분명하다. 한 관점에서, EGFR 에피토프는 초기 또는 단순 탄수화물 변형 또는 초기 글리코실화, 특히 높은 만노스 변형 후에 증가되거나 분명하고, 복합 탄수화물 변형의 존재 시에는 감소되거나 분명하지 않다.

[0015] 항체 또는 이의 단편, 예컨대 면역원성 단편일 수 있는 특이적 결합 구성원은 이상 발현의 부재 및 정상 EGFR 해독후 변형의 존재 하에 정상 또는 야생형 EGFR 에피토프를 함유하는 정상 세포 또는 야생형 세포에 실질적으로 결합하거나 이를 인식하지 못한다.

[0016] 더 상세하게는, 본 발명의 특이적 결합 구성원은 항체 또는 이의 단편일 수 있는데, 이는 특히 이상 해독후 변형의 존재 하에, EGFR을 과발현(예컨대, EGFR 유전자가 증폭된다)하거나 de2-7 EGFR을 발현하는 세포에 존재하고, 특히 정상 해독후 변형의 존재 하에 정상 조건 하에 EGFR을 발현하는 세포에서 일반적으로 검출할 수 없는 EGFR 에피토프를 인식한다.

[0017] 본 발명자들은 이상 발현된 EGFR을 특이적으로 인식하는, 본원에서 mAb806, ch806, hu806, mAb175, mAb124 및 mAb1133으로 표시한 항체를 예로 들은 신규 모노클로날 항체를 발견했다. 특히, 본 발명의 항체는 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 발견되고 일반적으로 정상 세포 또는 야생형 세포에서 검출할 수 없으며 이상 해독후 변형 시에 증가하거나 또는 분명한 EGFR 에피토프를 인식한다. 또한, 본 발명의 신규 항체는 증폭된 야생형 EGFR 및 de2-7 EGFR을 인식하나, de2-7 EGFR 돌연변이의 독특한 연결 펩타이드와 다른 에피토프에 결합한다. 본 발명의 항체는, 특히 이상 해독후 변형 후, 증폭된 EGFR 및 돌연변이 EGFR(본원에서 de2-7 돌연변이로 예시됨)을 비롯한 이상 발현된 EGFR을 특이적으로 인식한다. 또한, 이러한 항체들은 EGFR의 정상 양을 발현하는 신경아교종 세포주의 세포 표면에서 발현되는 EGFR을 인식하지 않는 반면, ELISA 플레이트의 표면에 고정화된 EGFR(sEGFR)의 세포의 도메인에 결합하여, 입체형태적 에피토프의 인식을 시사한다. 이 항체들은 EGFR 유전자의

증폭을 보유하나, de2-7 EGFR을 발현하지 않는 A431 세포의 표면에 결합한다. 중요한 것은, 이러한 항체들은 내인성 야생형(wt) EGFR의 발현 수준이 대부분의 다른 정상 조직에서보다 높으나 EGFR이 이상 발현되거나 증폭된 것은 아닌, 간 및 피부와 같은 정상 조직에는 유의적으로 결합하지 않았다.

[0018] 본 발명의 항체는 이상 EGFR 발현, 예컨대 EGFR 증폭 및/또는 EGFR 돌연변이, 특히 de2-7EGFR이 존재하는 종양 또는 세포를 염색하거나 또는 다른 방식으로 인식하여 EGFR 종양 또는 종양발생성 세포의 성질을 특이적으로 분류할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 증폭된 EGFR을 함유하는 종양 및 de2-7 EGFR 양성 이종이식편에 대하여 유의적인 생체내 항종양 활성을 증명한다.

[0019] de2-7 EGFR 및 증폭된 EGFR에는 결합하지만, 정상 야생형 EGFR에는 결합하지 않는 상기 항체들의 독특한 특이성은 종래 공지된 EGFR 항체로 관찰할 수 있는 정상 조직 흡수와 연관된 문제점 없이, 두경부암, 유방암, 전립선암 및 신경아교종과 같은 다수의 종양 종류를 확인, 특성화 및 표적화하는 진단학적 및 치료요법적 용도를 제공한다.

[0020] 따라서, 본 발명은 연결 펩타이드와 상이한 에피토프에서 de2-7 EGFR에는 결합하지만, EGFR 유전자의 증폭 부하에 정상 세포에서 EGFR에 실질적으로 결합하지 않는 특이적 결합 단백질, 예컨대 항체를 제공한다. 증폭이란, 세포가 EGFR 유전자의 다중 카피를 포함하는 것을 의미하기도 한다.

[0021] 본 발명의 항체에 의해 인식되는 에피토프는 성숙 정상 또는 야생형 EGFR 서열의 잔기 273-501을 함유하는 영역 내에 위치하고, 성숙 정상 또는 야생형 EGFR 서열의 잔기 287-302(서열번호 14)를 포함하는 것이 바람직하다. 따라서, EGFR 서열의 잔기 273-501 및/또는 287-302(서열번호 14)를 함유하는 영역 내에 위치한 에피토프에서 de2-7 EGFR에 결합하는 특이적 결합 단백질, 예컨대 항체도 제공한다. 이 에피토프는 당업자에게 공지된 임의의 통상적인 에피토프 매핑 기술로 결정할 수 있다. 대안적으로, 잔기 273-501 및/또는 287-302(서열번호 14)를 암호화하는 DNA 서열을 분해할 수 있고, 이 단편을 적당한 숙주에서 발현시킬 수 있다. 항체 결합은 앞에서 언급한 바와 같이 측정할 수 있다.

[0022] 바람직한 관점에서, 항체는 본 발명자들이 확인하고 특성화한 항체, 특히 증폭된 EGFR 및 de2-7EGFR에서 발견되는 것처럼 이상 발현된 EGFR을 인식하는 항체의 특성을 보유하는 것이다.

[0023] 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 VH 및 VL 서열을 보유하는 항체의 적어도 10%가 ELISA 분석에서 상기 항체와의 경쟁에 의해 de2-7 EGFR에 대한 결합이 차단되는 조건 하에, 본 발명의 항체와 경쟁할 수 있는 항체를 제공한다. 구체적으로, 항-유전자형(anti-idiotypic) 항체가 고려되고 본원에 예시된다. 항-유전자형 항체 LMH-11, LMH-12 및 LMH-13이 본원에 제공된다.

[0024] 항체의 이의 표적 항원에 대한 결합은 항체 중쇄 및 경쇄의 상보성-결정 영역(CDR)을 통해 매개되고, CDR3의 역할이 특히 중요하다. 따라서, 본 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄 및 바람직하게는 두 쇄 모두의 CDR3 영역을 기반으로 하는 특이적 결합 구성원은 생체내 치료법에 유용한 특이적 결합 구성원일 것이다.

[0025] 따라서, 확인된 본 발명의 항체의 CDR, 특히 CDR3 영역을 기반으로 하는 항체와 같은 특이적 결합 단백질은 de2-7 EGFR 상태에 상관없이 증폭된 EGFR을 보유하는 종양을 표적화하는데 유용할 것이다. 본 발명의 항체는 정상, 야생형 수용체에 유의적으로 결합하지 않으므로, 정상 조직에 유의적으로 흡수되지 않을 것이며, EGFR 항체의 제한은 현재 개발 중이다.

[0026] 다른 관점에서, 종양 세포가 다수의 EGFR 유전자 카피를 함유하는, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있고, EGFR 수용체의 절두형 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체를 제공하며, 이 항체는 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 이 항체는 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302(서열번호 14)의 서열 내의 에피토프에 결합하며, 이 항체는 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않고 서열번호 4에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않는다.

[0027] 다른 관점에서, 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는 분리된 항체를 제공한다.

[0028] 다른 관점에서, 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 134에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는 분리된 항체를 제공한다.

[0029] 다른 관점에서, 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열을

보유하는 경쇄를 포함하는 분리된 항체를 제공한다.

- [0030] 다른 관점에서, 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 포함하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0031] 다른 관점에서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 44, 45 및 46에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0032] 다른 관점에서, 경쇄의 가변 영역이 서열번호 49, 50 및 51에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0033] 다른 관점에서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 130, 131 및 132에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0034] 다른 관점에서, 경쇄의 가변 영역이 서열번호 135, 136 및 137에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0035] 다른 관점에서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 23, 24 및 25에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0036] 다른 관점에서, 경쇄의 가변 영역이 서열번호 28, 29 및 30에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0037] 다른 관점에서, 중쇄의 가변 영역이 서열번호 33, 34 및 35에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0038] 다른 관점에서, 경쇄의 가변 영역이 서열번호 38, 39 및 40에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는, 중쇄 및 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0039] 다른 관점에서, 항체 F(ab')₂, scFv 단편, 이중항체(diabody), 삼중항체(triobody) 또는 사중항체(tetrabody)의 형태인 분리된 항체를 제공한다.
- [0040] 다른 관점에서, 검출성 또는 기능성 표지를 추가로 포함하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0041] 다른 관점에서, 검출성 또는 기능성 표지는 공유 부착된 약물이다.
- [0042] 다른 관점에서, 표지는 방사능표지이다.
- [0043] 다른 관점에서, 폐결화된 분리된 항체를 제공한다.
- [0044] 다른 관점에서, 본 명세서에서 언급된 분리된 항체를 암호화하는 서열을 포함하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0045] 다른 관점에서, 상기 언급한 바와 같은 핵산을 항체 발현을 유발시키는 조건 하에 발현시키는 단계 및 항체를 회수하는 단계를 포함하여, 분리된 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0046] 다른 관점에서, 본 명세서에서 언급한 분리된 항체의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하여, 사람 환자의 종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0047] 다른 관점에서, 본 명세서에서 언급한 분리된 항체를 포함하는, EGFR이 이상 발현되거나 EGFR이 절두형 단백질의 형태로 발현되는 종양의 진단용 키트를 제공한다.
- [0048] 다른 관점에서, 키트는 시약 및/또는 사용 설명서를 추가로 포함한다.
- [0049] 다른 관점에서, 본 명세서에서 언급한 분리된 항체를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0050] 다른 관점에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 비히클, 담체 또는 희석제를 추가로 포함한다.
- [0051] 다른 관점에서, 약제학적 조성물은 추가로 화학요법제, 항-EGFR 항체, 방사성면역치료제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 항암제를 포함한다.
- [0052] 다른 관점에서, 화학치료제는 티로신 키나제 억제제, 인산화 캐스캐이드 억제제, 해독후 조절제, 세포 성장 또는 분열 억제제(예: 항-유사분열제), 시그널 전달 억제제 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0053] 다른 관점에서, 티로신 키나제 억제제는 AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0054] 다른 관점에서, 항-EGFR 항체는 항-EGFR 항체 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF 및 이들의 병용물로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0055] 다른 관점에서, 본 명세서에 언급한 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하여, 포유동물의 암을 예방 및/또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0056] 다른 관점에서, 본 명세서에 언급한 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하여, 포유동물에서 이상 발현된 EGFR을 생산하는 뇌-상주성 암(brain-resident cancer)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0057] 다른 관점에서, 뇌-상주성 암은 아교모세포종, 수질모세포종, 수막종, 신생물성 성상세포종 및 신생물성 동정맥 기형으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0058] 다른 관점에서, 본 명세서에 언급한 분리된 항체를 암호화하는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주를 제공한다.
- [0059] 다른 관점에서, 단세포 숙주는 조직 배양물 중의 이.콜라이(E. coli), 슈도모나스(Pseudomonas), 바실러스(Bacillus), 스트렙토마이세스(Streptomyces), 효모, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 및 BMT10 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 사람 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0060] 다른 관점에서, (a) 증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재가 의심되는 포유동물 유래의 생물학적 샘플을, 청구항 1의 분리된 항체에의 EGFR의 결합이 일어나게 하는 조건 하에 상기 분리된 항체와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 샘플 유래의 EGFR과 분리된 항체 사이에 결합이 일어났는지 여부를 검출하는 단계에 의해 EGFR을 측정하고, 결합의 검출이 샘플 중의 EGFR의 존재 또는 활성을 나타내는, 증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0061] 증폭된 EGFR, de2-7EGFR 또는 고 만노스 글리코실화를 보유한 EGFR의 존재를 검출하는 방법의 다른 관점에서, EGFR 존재의 검출은 포유동물에 종양 또는 암의 존재를 나타낸다.
- [0062] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0063] 다른 관점에서, 항체의 중쇄는 서열번호 42에 제시한 아미노산 서열을 함유하고, 항체의 경쇄는 서열번호 47에 제시한 아미노산 서열을 함유한다.
- [0064] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 중쇄 가변 영역이 서열번호 44, 45 및 46에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고, 경쇄 가변 영역이 서열번호 49, 50 및 51에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0065] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 중쇄와 서열번호

호 134에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 경쇄를 함유하는 분리된 항체를 제공한다.

- [0066] 다른 관점에서, 항체의 중쇄는 서열번호 129에 제시한 아미노산 서열을 함유하고, 항체의 경쇄는 서열번호 134에 제시한 아미노산 서열을 함유한다.
- [0067] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄의 가변 영역이 서열번호 130, 131 및 132에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 135, 136 및 137에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0068] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄가 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하고, 상기 경쇄가 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0069] 다른 관점에서, 항체의 중쇄는 서열번호 22에 제시한 아미노산 서열을 함유하고, 항체의 경쇄는 서열번호 27에 제시한 아미노산 서열을 함유한다.
- [0070] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄의 가변 영역이 서열번호 23, 24 및 25에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 28, 29 및 30에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0071] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄가 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하고, 상기 경쇄가 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0072] 다른 관점에서, 항체의 중쇄는 서열번호 32에 제시한 아미노산 서열을 함유하고, 항체의 경쇄는 서열번호 37에 제시한 아미노산 서열을 함유한다.
- [0073] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄의 가변 영역이 서열번호 33, 34 및 35에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 38, 39 및 40에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0074] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302의 서열 내의 에피토프에 결합하며,
- [0075] 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 하기 서열식 (I)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (II)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 하기 서열식 (III)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고;
- [0076] 상기 중쇄의 가변 영역이 하기 서열식 (IV)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (V), (VI) 또는 (VII)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노

산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 하기 서열식 (VIII)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하며;

- [0077] 상기 항체가 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 중쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않고, 서열번호 4에 제시한 아미노산 서열을 보유하는 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지 않는 분리된 항체를 제공한다:
- [0078] 서열식 (I)
- [0079] HSSQDIXaa₁SNIG
- [0080] (여기서, Xaa₁은 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다)(서열번호 151);
- [0081] 서열식 (II)
- [0082] HGTNLXaa₂D
- [0083] (여기서, Xaa₂는 하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다)(서열번호 152);
- [0084] 서열식 (III)
- [0085] VQYXaa₃QFPWT
- [0086] (여기서, Xaa₃은 A, G, 및 A 또는 G 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다)(서열번호 153);
- [0087] 서열식 (IV)
- [0088] SDXaa₄AWN
- [0089] (여기서, Xaa₄는 F, Y, 및 F 또는 Y 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다)(서열번호 154);
- [0090] 서열식 (V)
- [0091] YISYSGNTRYXaa₅PSLKS
- [0092] (여기서, Xaa₅는 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다)(서열번호 155);
- [0093] 서열식 (VI)
- [0094] YISYSXaa₆NTRYNPSLKS
- [0095] (여기서, Xaa₆은 G, A, 및 G 또는 A 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다)(서열번호 156);
- [0096] 서열식 (VII)
- [0097] YISYSGNTRYNPSLXaa₇S
- [0098] (여기서, Xaa₇은 염기성 아미노산 잔기이다)(서열번호 157);
- [0099] 서열식 (VIII)
- [0100] Xaa₈TAGRGFPY
- [0101] (여기서, Xaa₈은 V, A, 및 V 또는 A 대신 보존적 치환되는 아미노산 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택된다)(서열번호 158).
- [0102] 다른 관점에서, Xaa₁은 N; Xaa₂는 D; Xaa₃은 A; Xaa₄는 F; Xaa₅는 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이고; Xaa₆은 G; Xaa₇은 K; Xaa₈은 V이다.

- [0103] 다른 관점에서, Xaa₅는 N 또는 Q이다.
- [0104] 다른 관점에서, Xaa₁은 N 또는 S이다.
- [0105] 다른 관점에서, Xaa₂는 D 또는 E이다.
- [0106] 다른 관점에서, Xaa₃은 A 또는 G이다.
- [0107] 다른 관점에서, Xaa₄는 F 또는 Y이다.
- [0108] 다른 관점에서, Xaa₅는 N 또는 Q이다.
- [0109] 다른 관점에서, Xaa₆은 G 또는 A이고 Xaa₇은 독립적으로 K 또는 R이다.
- [0110] 다른 관점에서, Xaa₈은 V 또는 A이다.
- [0111] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 de2-7 EGFR 연결 펩타이드에 결합하지 않고, 사람 야생형 EGFR의 잔기 273-501의 서열 내의 에피토프에 결합하며,
- [0112] 상기 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 아미노산 서열 HSSQDINSNIG(서열번호 18)를 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 아미노산 서열 HGTNLDD(서열번호 19)를 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 아미노산 서열 VQYQFPWT(서열번호 20)를 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하고;
- [0113] 상기 중쇄의 가변 영역이 아미노산 서열 SDFAWN(서열번호 15)을 보유하는 제1 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 하기 서열식 (IX)에 제시한 아미노산 서열에 대응하는 아미노산 서열을 보유하는 제2 폴리펩타이드 결합 도메인 영역; 및 아미노산 서열 VTAGRGFPY(서열번호 17)을 보유하는 제3 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 포함하는 분리된 항체를 제공한다:
- [0114] 서열식 (IX)
- [0115] YISYSGNTRYXaa₉PSLKS
- [0116] (여기서, Xaa₉는 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산 잔기이다)(서열번호 159).
- [0117] 다른 관점에서, 항체는 사람 야생형 EGFR의 잔기 287-302(서열번호 14)의 서열 내의 에피토프에 결합한다.
- [0118] 다른 관점에서, Xaa₉는 N 또는 Q이다.
- [0119] 다른 관점에서, 결합 도메인 영역은 사람 항체 골격에 의해 운반된다.
- [0120] 다른 관점에서, 사람 항체 골격은 사람 IgG1 항체 골격이다.
- [0121] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄가 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하고, 상기 경쇄가 서열번호 4에 제시한 아미노산 서열에 실질적으로 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 분리된 항체를 제공한다.
- [0122] 다른 관점에서, 항체의 중쇄는 서열번호 2에 제시한 아미노산 서열을 함유하고, 항체의 경쇄는 서열번호 4에 제시한 아미노산 서열을 함유한다.
- [0123] 다른 관점에서, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양(여기서, 상기 종양의 세포들은 상기 EGFR 유전자의 다중 카피를 함유한다) 및 EGFR 수용체의 절두형 버전 de2-7을 발현하는 종양 상의 EGFR에 결합할 수 있는 분리된 항체로서, 이 항체가 중쇄 및 경쇄를 함유하고, 이 중쇄의 가변 영역이 서열번호 15, 16 및 17에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드 결합 도메인 영역을 함유하고, 상기 경쇄의 가변 영역이 서열번호 18, 19 및 20에 제시한 아미노산 서열에 매우 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 폴리펩타이드

드 결합 도메인 영역을 함유하는 분리된 항체를 제공한다.

[0124]

다른 목적과 장점은 이하 예시적인 도면과 첨부된 특허청구범위를 참조로 하여 열거한 이하 상세한 설명의 검토로부터 당업자에게 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0125]

도 1은 신경아교종 세포주의 유세포분석 결과를 나타낸다. U87MG(밝은 회색 히스토그램) 및 U87MG.△2-7(암회색 히스토그램) 세포는 나타낸 바와 같이 무관한 IgG2b 항체(흰색 히스토그램), DH8.3(de2-7 EGFR에 특이적), mAb806 또는 528(야생형 및 de2-7 EGFR에 결합한다)로 염색했다.

도 2A-D는 mAb806, mAbDH8.3 및 mAb528의 ELISA 결과를 나타낸다. (A) sEGFR 코팅된 ELISA 플레이트에 대한 농도 증가하는 mAb806(▲) DH8.3(●) 또는 528(■) 항체의 결합. (B) 농도 증가하는 가용성 EGFR(sEGFR) 용액에 의한 sEGFR 코팅된 ELISA 플레이트에 대한 mAb806 및 mAb528 결합의 억제. (C) 농도 증가하는 DH8.3의 de2-7 연결 펩타이드에 대한 결합은 고정된 야생형 sEGFR에 대한 mAb806 및 mAb528의 결합 곡선을 예증한다(D).

도 2E 및 2F는 C-말단 비오틴화된 펩타이드를 사용하고 본 발명의 모노클로날 항체를 다른 공지된 항체, 이 중에서 de2-7 EGFR 돌연변이체의 연결 펩타이드를 인식하는 L8A4 항체 및 대조군과 함께 포함하는 BIAcore 결합 연구의 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 mAb806 및 DH8.3 항체의 내재화를 도시한다. U87MG.△2-7 세포를 mAb806(▲) 또는 DH8.3(●)과 함께 4℃에서 예비항온처리하고, 37℃로 옮긴 뒤, FACS로 내재화를 측정했다. 데이터는 3회(DH8.3) 또는 4회(mAb806) 분리 실험의 각 시점에서의 평균 내재화 ± SE를 나타낸다.

도 4A 및 4B는 U87MG 및 U87MG.△2-7 이종이식편을 보유하는 누드 마우스에서의 방사능표지된 (a) 125 I-mAb806 및 (b) 131 I-DH8.3의 생체분포(%ID/g 종양 조직)를 도시한 것이다. 각 점은 n=4인 1시간째 외에는 5마리 마우스의 평균 ± SE를 나타낸다.

도 5A 및 5B는 U87MG.△2-7 이종이식편을 보유하는 누드 마우스에 존재하는 (a) 종양:혈액 또는 (b) 종양:간 비율로 나타낸 방사능표지된 125 I-mAb806(흰색 막대) 및 131 I-DH8.3(흑색 막대) 항체의 생체분포를 도시한 것이다.

도 6A-C는 EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 세포주의 유세포분석을 도시한 것이다. A431 세포는 mAb806, DH8.3 또는 528(흑색 히스토그램)로 염색했고, 무관한 IgG2b 항체(흰색 히스토그램)와 비교했다.

도 7A 및 7B는 U87MG.△2-7 및 A431 이종이식편을 보유한 누드 마우스의 방사능표지된 (a) 125 I-mAb806 및 (b) 131 I-528의 생체분포(% ID/g 종양 조직)를 도시한 것이다.

도 8A-D는 U87MG.△2-7(A,C) 및 A431 이종이식편(B,D)을 보유한 누드 마우스에 존재하는, 종양:혈액(A,B) 또는 종양:간(C,D) 비율로 나타낸 방사능표지된 125 I-mAb806(흰색 막대) 및 131 I-528(흑색 막대) 항체의 생체분포를 도시한 것이다.

도 9A 및 9B는 예방적 모델에서 (A) U87MG 및 (B) U87MG.△2-7 이종이식편 성장 속도에 미치는 mAb806의 항종양 효과를 도시한 것이다. 3×10^6 U87MG 또는 U87MG.△2-7 세포는 0일째 4 내지 6주령의 BALB/c 누드마우스(n=5)의 양 옆구리로 s.c. 주사했다. 종양 세포 접종 하루 전부터 1mg의 mAb806(●); 0.1mg의 mAb806(▲); 또는 비히클(○)을 마우스에게 i.p. 주사했다. 주사는 화살표로 표시한 것처럼 2주 동안 매주 3회 투여했다. 데이터는 평균 종양 용적 ± S.E.로 표현했다.

도 10A, 10B 및 10C는 정착된 모델(established model)에서 (A) U87MG, (B) U87MG.△2-7 및 (C) U87MG.wtEGFR 이종이식편에 미치는 mAb806의 항종양 효과를 도시한 것이다. 3×10^6 U87MG, U87MG.△2-7 또는 U87MG.wtEGFR 세포를 4 내지 6주령의 BALB/c 누드 마우스(n=5)의 양 옆구리에 s.c. 주사했다. 종양이 65 내지 80 mm³의 평균 종양 용적에 도달했을 때부터 1mg 용량의 mAb806(●); 0.1mg의 mAb806(▲); 또는 비히클(○)을 마우스에게 i.p. 주사했다. 주사는 화살표로 표시한 것처럼 2주 동안 매주 3회 투여했다. 데이터는 평균 종양 용적 ± S.E.로 표현했다.

도 11A 및 11B는 (A) 예방적 모델 및 (B) 정착된 모델에서 A431 이종이식편에 미치는 mAb806의 항종양 효과를

도시한 것이다. 3×10^6 A431 세포는 4 내지 6주령의 BALB/c 누드 마우스($n=5$)의 양 옆구리로 s.c. 주사했다. 마우스에게 주사는 예방적 모델에서는 종양 세포 접종 하루 전부터 또는 종양이 200 mm³의 평균 종양 용적에 이르렀을 때 1mg 용량의 mAb806(●) 또는 비히클(○)을 i.p. 주사했다. 주사는 화살표로 표시한 것처럼 2주 동안 매주 3회 투여했다. 데이터는 평균 종양 용적 \pm S.E.로 표현했다.

도 12는 예방적 모델에서 A431 이종이식편에 미치는, AG1478 치료와 병용된 mAb806 치료의 항종양 효과를 도시한 것이다. 데이터는 평균 종양 용적 \pm S.E.로 표현했다.

도 13은 증가하는 AG1478 농도(0.5 μ M 및 5 μ M)의 존재 하에 A431 세포에 대한 mAb806 결합성을 도시한 것이다.

도 14A 및 14B는 806 VH 쇄 유전자의 (A) 핵산 서열 및 (B) 이의 아미노산 해독(각각 서열번호 1 및 서열번호 2)을 도시한 것이다.

도 15A 및 15B는 806 VL 쇄 유전자의 (A) 핵산 서열 및 (B) 이의 아미노산 해독(각각 서열번호 3 및 서열번호 4)을 도시한 것이다.

도 16은 캐뻛(Kabat)에 따라 번호를 매긴 VH 쇄 서열(서열번호 2)을 나타내며, 밑줄친 부분은 CDR(서열번호 15, 16 및 17)이다. VH 쇄 서열(서열번호 2)의 주요 잔기는 24, 37, 48, 67 및 78이다.

도 17은 캐뻛(Kabat)에 따라 번호를 매긴 VL 쇄 서열(서열번호 4)을 나타내며, 밑줄친 부분은 CDR(서열번호 18, 19 및 20)이다. VL 쇄 서열(서열번호 4)의 주요 잔기는 36, 46, 57 및 71이다.

도 18A-18D는 병용 항체 요법, 특히 mAb806 및 528 항체의 치료요법적 효과를 측정하기 위해 설계한 생체내 연구 결과를 도시한 것이다. 마우스는 U87MG. Δ 2-7(A 및 B), U87MG.DK(C) 또는 A431(D) 세포의 접종을 받았다.

도 19A-D는 전자현미경에 의한 내재화 분석을 도시한 것이다. U87MG. Δ 2-7 세포는 mAb806 또는 DH8.3과 예비항온처리하고, 그 다음 4°C에서 금 접합된 항-마우스 IgG와 항온처리하고, 37°C로 옮긴 뒤, 여러 시점마다 전자현미경으로 내재화를 조사했다. (A) 5분 후 피막소(coated pit)(화살표)에 대한 DH8.3 항체의 국재화; (B) 2분 후 거대음세포작용(macropinocytosis)(화살표)에 의한 mAb806의 내재화; (C) 20분 후 리소좀(화살표)에 대한 DH8.3의 국재화; (D) 30분 후 리소좀(화살표)에 대한 mAb806의 국재화. 모든 이미지의 원본 배율은 X30,000이다.

도 20은 ¹²⁵I-mAb806을 주사한 후 8시간 후에 수집한 U87MG. Δ 2-7 이종이식편 절편의 방사능사진촬영을 도시한 것이다.

도 21은 EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 세포주의 유세포분석을 도시한 것이다. HN5 및 MDA-468 세포는 무관련 IgG2b 항체(점선 표시된 흰색 히스토그램), mAb806(흑색 히스토그램) 또는 528(실선 표시된 흰색 히스토그램)로 염색했다. DH8.3 항체는 두 세포주 모두에서 전적으로 음성이었다(데이터는 제시되지 않음).

도 22는 세포주 유래의 EGFR의 면역침전을 도시한 것이다. EGFR은 mAb806, sc-03 항체 또는 IgG2b 이소타입 대조군으로 ³⁵S-표지된 U87MG. Δ 2-7 또는 A431 세포로부터 면역침전시켰다. 측면의 화살표는 de2-7 및 wtEGFR의 위치를 나타낸다. 3가지 독립 실험에서 동일한 밴딩 패턴을 수득했다.

도 23은 ¹²⁵I-mAb806을 주사한 후 24시간 후에 수집한 A431 이종이식편 절편의 방사능사진촬영을 도시한 것으로, 생조직에 대한 국재화 부위가 표시되어 있다(화살표).

도 24A 및 24B는 전신 mAb806 처리 후, 두개내의 U87MG. Δ EGFR(A) 및 LN-Z308.EGFR(B) 이종이식편을 보유한 누드 마우스의 생존율 연장을 도시한 것이다. U87MG.EGFR 세포 (1×10^5) 및 LN-Z308. Δ EGFR 세포 (5×10^5)는 누드 마우스 뇌에 이식했고, 동물은 이식 후 0일부터 14일까지 mAb806, PBS 또는 이소타입 IgG로 처리했다.

도 24C 및 24D는 mAb806 처리에 의한 두개내 종양의 성장 억제율을 도시한 것이다. mAb806 또는 이소타입 IgG 대조군으로 처리한 누드 마우스(그룹당 5마리)는 U87MG.EGFR(C)에 대해서는 9일째, LN-Z308. Δ EGFR(D)에 대해서는 15일째 안락사시키고, 뇌를 수거하고, 고정시킨 뒤, 단면화했다. 데이터는 대조군의 종양 용적을 100%로 하여 계산했다. 값은 평균 \pm SD이다. ***, $P < 0.001$; 대조군 대 mAb806. 화살표머리, 종양 조직.

도 24E는 종양내 mAb806 처리에 의한 두개내 U87MG. Δ EGFR 이종이식편을 보유한 누드 마우스의 생존율 연장을 나타낸다. U87MG. Δ EGFR 세포는 기술한 것처럼 이식했다. 5 μ l 용적에서 mAb806 또는 이소타입 IgG 대조군 10mg

을 1일째부터 격일로 종양-주사 부위에 5회 주사했다.

도 25A, 25B 및 25C는 mAb806이 U87MG.DK 또는 U87MG 뇌 종양은 아니고 U87MG.wtEGFR 뇌종양을 보유한 마우스의 생존율을 연장시킨다는 것을 보여준다. U87MG(A), U87MG.DK(B) 또는 U87MG.wtEGFR(C) 세포(5×10^5)는 누드 마우스 뇌에 이식했고, 동물은 이식 후 0일부터 14일까지 mAb806으로 처리한 다음, 치료를 중단한 후 관찰했다.

도 26A는 U87MG 세포주와 mAb806 반응성의 FACS 분석을 도시한 것이다. U87MG, U87MG.△EGFR, U87MG.DK 및 U87MG.wtEGFR 세포는 항-EGFR mAb 528, EGFR.1 및 항-△EGFR 항체, mAb806으로 염색했다. 모노클로날 EGFR.1 항체는 wtEGFR만을 인식했고, 모노클로날 528 항체는 wtEGFR 및 △EGFR과 반응했다. mAb806은 U87MG.△EGFR 및 U87MG.DK와 강하게 반응했고, U87MG.wtEGFR과는 약하게 반응했다. 가로좌표의 막대, 1차 항체의 부재 하에 세포의 최대 염색성. 결과는 3가지 독립 실험으로 재생되었다.

도 26B는 EGFR 형태의 mAb806 면역침전을 도시한 것이다. 돌연변이체 및 wtEGFR은 U87MG(레인 1), U87△.EGFR(레인 2), U87MG.DK(레인 3) 및 U87MG.wtEGFR 세포(레인 4)로 면역분리하고, 그 다음 항-총 EGFR 항체, C13으로 웨스턴 블로팅하여 검출했다.

도 27A 및 27B는 mAb806의 전신 처리가 U87MG.△EGFR 뇌종양에서의 △EGFR 및 Bcl-XL 발현의 인산화를 감소시킨다는 것을 보여준다. U87MG.△EGFR 종양은 mAb806 처리 9일째 절제하고, 액체 질소로 즉시 동결시킨 후, 종양 용해물 준비 전에 -80°C 에 보관했다.

(A) △EGFR의 자가인산화 정도 및 발현의 웨스턴 블롯 분석. 종양 용해물 $30\mu\text{g}$ 을 SDS-폴리아크릴아미드 겔로 처리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮긴 뒤, 항-포스포티로신 mAb로 탐침한 다음, 벗겨낸 다음, 항-EGFR 항체 C13으로 재탐침했다.

(B) (A)에서와 동일한 종양 용해물의 사용에 의한 Bcl-XL의 웨스턴 블로팅. 막을 항-사람 Bcl-X 폴리클로날 항체로 탐침했다. 레인 1 및 2, 이소타입 대조군으로 처리한 U87MG.△EGFR 뇌종양; 레인 3 및 4, mAb806으로 처리한 U87MG.△EGFR 뇌종양.

도 28은 mAb806 처리가 U87MG.△EGFR 종양에서 성장 및 혈관형성을 감소시키고 아포토시스와 대식세포 축적을 증가시킨다는 것을 보여준다. 종양 절편은 Ki-67로 염색했다. 세포 증식성 지수는 각 그룹의 마우스 4마리 유래의 두개내 종양에 존재하는, 무작위 선택한 4개의 고배율시야(X400)로부터의 Ki-67 양성인 총 세포 백분율로 평가했다. 데이터는 평균 \pm SE이다. 아포토시스 세포는 TUNEL 분석으로 검출했다. 아포토시스 지수는 각 그룹의 4마리 마우스 유래의 두개내 종양에 존재하는, 무작위 선택한 4개의 고배율시야(X400)로부터의 TUNEL-양성 세포:총 세포수의 비율로 평가했다. 데이터는 평균 \pm SE이다. 종양 절편은 항-CD31 항체로 면역염색했다. MVA는 각 그룹의 4마리 마우스 유래의 두개내 종양에서 무작위 선택한 4개의 시야(X200)로부터의 전산화된 이미지 분석으로 분석했다. mAb806-처리된 U87MG.△EGFR 종양에서 대식세포의 종양주변 침윤. 종양 절편은 항-F4/80 항체로 염색했다.

도 29는 모체 및 형질감염된 U87MG 신경아교종 세포주의 유세포분석을 도시한 것이다. 세포는 표시한 바와 같이 무관한 IgG2b 항체(흰색 히스토그램) 또는 528 항체 또는 mAb806(흑색 히스토그램)로 염색했다.

도 30은 세포주로부터 EGFR의 면역침전을 도시한 것이다. EGFR은 ^{35}S -표지된 U87MG.wtEGFR, U87MG.△2-7 및 A431 세포로부터 mAb806(806), sc-03 항체(c-말단) 또는 IgG2b 이소타입 대조군(con)으로 면역침전시켰다. 화살표, de2-7 및 wtEGFR의 위치.

도 31은 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편의 대표적인 H&E-염색된 파라핀 절편을 도시한 것이다. U87MG.△2-7(종양 접종 후 24일 후에 수집함) 및 U87MG.wtEGFR(종양 접종 후 42일 후에 수집함) 이종이식편은 상기 도 10에 설명한 바와 같이 처리한 마우스로부터 절제하고, H&E로 염색했다. 비히클-처리된 U87MG.△2-7(종양 접종 후 18일 후 수집) 및 U87MG.wtEGFR(종양 접종 후 37일 후 수집) 이종이식편은 극소수의 괴사 부위를 보여주었고(왼쪽 패널), mAb806으로 처리된 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편에서는 광범위한 괴사(화살표)가 관찰되었다(오른쪽 패널).

도 32는 U87MG, U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 유래의 동결된 절편에서 EGFR 발현의 면역조직화학 분석을 도시한 것이다. 절편은 상기 도 31에 기술된 시점에서 수집했다. 이종이식편 절편은 528 항체(왼쪽 패널) 및 mAb806(오른쪽 패널)으로 면역염색했다. wtEGFR, 증폭 EGFR 또는 de2-7 EGFR에 대한 면역반응성의 감소는 mAb806 처리된 이종이식편에서는 관찰되지 않았다. 시험관내 데이터와 일치하게, 모체 U87MG 이종이식편은

528 항체에 대해 양성이지만 mAb806 염색에 대해서는 음성이었다.

도 33은 제조된 이중시스트론성(bicistronic) 발현 작제물의 모식도이다. 키메라 항체쇄의 전사는 연장 인자-1 프로모터에 의해 개시되고, 강한 합성 종결 서열에 의해 종결된다. IRES 서열은 경쇄의 암호화 영역과 NeoR 및 중쇄 및 dhfr 유전자 사이에 도입되었다.

도 34A 및 34B는 U87MG-de2-7 이중이식편 종양을 보유한 BALB/c 누드마우스에서 수행된, (A) ^{125}I 또는 (B) ^{111}In 으로 방사능표지된 ch806의 생체분포 분석을 도시한 것이다. 마우스는 방사능표지된 항체 $5\mu\text{g}$ 를 주사받고, 각 시점마다 그룹 중 마우스 4마리씩 8시간, 28시간, 48시간 또는 74시간에 희생시켰다. 기관을 수집하고, 중량을 잴 다음, 방사능을 감마 계수기로 측정했다.

도 35A 및 35B는 (A) %ID 그래프 종양 조직 및 (B) 종양 대 혈액 비를 도시한 것이다. 인듐-111 항체는 약 30% ID/g 조직 및 4.0의 종양 대 혈액 비를 나타낸다.

도 36은 정착된 종양 모델에서 키메라 항체 ch806의 치료 효능을 도시한 것이다. PBS $100\mu\text{l}$ 중의 3×10^6 U87MG.△2-7 세포는 4 내지 6 주령의 암컷 누드 마우스의 양 옆구리에 s.c. 접종했다. mAb806은 양성 대조군으로 포함했다. 치료는 종양의 평균 용적이 50mm^3 에 도달했을 때 개시했고, 표시된 일자에 총 5회 주사 동안 i.p. 투여된 ch806 또는 mAb806 1mg 으로 이루어졌다. 데이터는 각 치료 그룹마다 평균 종양 용적 \pm S.E.로 표현했다.

도 37은 항-EGFR 키메라 IgG1 항체 ch806 및 대조군 cG250이 표적 (A) U87MG.de2-7 및 (B) A431 세포에 미치는 CDC 활성을 보여준다. 3반복 측정값의 평균(막대; \pm SD) 세포독성 %를 제시했다.

도 38은 ch806 및 이소타입 대조군 cG250($0-10\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의해 매개되는, 작용인자(effector):표적 세포 비 50:1에서의 표적 (A) U87MG.de2-7 및 (B) A431 세포에 미치는 ADCC를 도시한 것이다. 결과는 3반복 측정값의 평균(막대; \pm SD) 세포독성 %로 표현했다.

도 39는 광범위한 작용인자:표적 비 범위에서 표적 U87MG.de2-7 세포에 대한 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 모체 mAb806 및 ch806에 의해 매개되는 ADCC를 도시한 것이다. 3반복 측정값의 평균(막대; \pm SD)을 제시했다.

도 40은 huIgG가 아닌 결합된 ch806이 처음 선택한 항체를 생산하는 25가지 하이브리도마를 보여준다. 이러한 항-ch806 하이브리도마 중 높은 친화도 결합성이 있는 4가지(클론 3E3, 5B8, 9D6 및 4D8)는 이어서 한계 희석으로 단세포로부터 클론 증대를 수행하고, LMH(Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma)-11, -12, -13 및 -14로 각각 표시했다. 또한, huIgG에 특이적인 mAb를 생산하는 2 하이브리도마도 클로닝하고 다시 클론 2C10(LMH-15) 및 2B8(LMH-16)로 특성화했다.

도 41A, 41B 및 41C는 클론 증대 후, sEGFR621로 ch806 또는 mAb806 항원 결합 활성을 증화시키는 능력에 대해 하이브리도마 배양 상청액을 ELISA로 3반복 조사했다. 평균(\pm SD) 결과는 sEGFR 코팅된 플레이트에 대한 ch806 및 쥐 mAb806 결합의 용액 내 차단으로 항-유전자형 mAb LMH-11, -12, -13 및 -14의 길항제 활성을 증명했다(LMH-14는 제시되지 않음).

도 42A, 42B 및 42C는 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 정제된 (A) LMH-11, (B) LMH-12 및 (C) LMH-13으로 코팅된 미세역가 플레이트를 나타낸다. 3가지 정제된 클론을 혈청 또는 1% FCS/배지에서 ch806 또는 mAb806을 포획하는 능력에 대해 비교했다. 2차 접합체 아비딘-HRP 및 ABTS 기질에 대한 대조군 외에도, 혈청 및 1% FCS/배지 중의 이소타입 대조군 항체 hu3S193 및 m3S193이 포함되었다. 결과는 검출용 비오틀화된-LMH-12($10\mu\text{g}/\text{ml}$)를 사용하여 3반복 샘플의 평균(\pm SD)으로 제시하고, 포획 및 검출을 위해 사용된 LMH-12가 혈청($3\text{ng}/\text{ml}$) 중의 ch806에 대해 최고 감수성을 나타냈고, 배경 결합은 무시할 수 있는 정도였다.

도 43은 포획 및 검출을 위해 각각 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-유전자형 LMH-12 및 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 비오틀화된 LMH-12를 사용한 최적의 약동학적 ELISA 조건을 증명한다. 3가지 다른 ELISA는 3명의 건강한 공여체 유래의 공여체 혈청(●) 또는 1% BSA/배지(■) 중의 ch806을 혈청(●) 또는 1% BSA/배지(▼) 중의 이소타입 대조군 hu3S193으로 측정하기 위해 4반복으로 수행했다. 또한, 2차 접합체 아비딘-HRP(◆) 및 ABTS 기질(육각형) 단독에 대한 대조군도 각 ELISA에 포함시켰다. 평균(\pm SD) 결과는 검출 한계 $3\text{ng}/\text{ml}$ 하에 혈청 중의 ch806($2\mu\text{g}/\text{ml}-1.6\text{ng}/\text{ml}$)을 측정하는데 있어서 매우 재현성 있는 결합 곡선을 증명한다($n=12$; $1-100\text{ng}/\text{ml}$, 분산계수 $<25\%$; $100\text{ng}/\text{ml}-5\mu\text{g}/\text{ml}$, 분산계수 $<15\%$). 배경 결합은 검사된 3 혈청 중 어떤 혈청에서도 분명하지 않았고, 이소타입 대조군 hu3S193에서는 무시할 수 있는 정도의 결합이 관찰되었다.

도 44는 CHO 세포에서 발현되고, mAb806으로 블로팅한, 재조합 sEGFR의 면역블롯을 나타낸다. 재조합 sEGFR은

N-결합 글리코실화를 제거하기 위해 PNGaseF로 처리하거나(탈글리코실화), 또는 처리하지 않았고(무처리), 단백질을 SDS-PAGE 상에서 전개시킨 뒤, 막으로 이동시키고 mAb806으로 면역블로팅했다.

도 45는 ³⁵S-표지된 세포주(U87MG.Δ2-7, U87MG-wtEGFR 및 A431) 유래의 EGFR의 여러 항체(SC-03, 806 및 528 항체)에 의한 면역침전을 도식한 것이다.

도 46은 ³⁵S-메티오닌/시스테인으로 펄스-표지화한 후 여러 시점(0분 내지 240분)에서 여러 세포(A431 및 U87MG.Δ2-7) 유래의 EGFR의 면역침전을 도식한 것이다. 항체 528 및 806은 면역침전에 사용했다.

도 47은 고 만노스형 탄수화물을 제거하기 위한 EndoH 분해 후(+) 및 이 분해 없이(-) 다양한 항체(SC-03, 806 및 528)를 이용한 다양한 세포주(U87MGΔ2-7, U87MG-wtEGFR 및 A431) 유래의 EGFR의 면역침전을 도식한 것이다.

도 48은 A431 및 U87MG.Δ2-7 세포주의 세포 표면 요오드화, 그 다음 Endo H 분해 하에 또는 이 분해 없이 806 항체에 의해 면역침전을 수행한 결과를 도식한 것으로, A431 세포의 세포 표면에서 mAb806에 의해 결합된 EGFR이 EndoH 민감형인 것이라는 것을 확인시켜준다.

도 49는 pREN ch806 LC Neo 벡터(서열번호 7)를 나타낸다.

도 50은 pREN ch806 HC DHFR 벡터(서열번호 8)를 나타낸다.

도 51A-D는 mAb124 VH 및 VL 채 핵산 서열(각각 서열번호 21 및 26) 및 아미노산 서열(각각 서열번호 22 및 27)을 도식한 것이다.

도 52A-D는 mAb1133 VH 및 VL 채 핵산 서열(각각 서열번호 31 및 36) 및 아미노산 서열(각각 서열번호 32 및 37)을 도식한 것이다.

도 53은 hu806H(VH+CH) 발현 카트리지를 함유하는 pEE12.4 및 hu806L(VL+CL) 발현 카트리지를 함유하는 pEE6.4를 포함하는 조합된 이중 유전자 론자(Lonza) 플라스미드의 DNA 플라스미드를 도식한 것이다.

도 54는 도 53에서 설명한 조합된 론자 플라스미드의 DNA 서열(서열번호 41; 상보체 서열번호 162)을 나타낸다. 이 서열은 또한 hu806 항체와 관련된 모든 해독(서열번호 42-51 및 163-166)도 보여준다. 플라스미드는 서열 확인하고, 암호화 서열 및 해독을 검사했다. 서열 구역은 관심 영역을 표시하기 위해 음영을 주었고, 음영진 영역은 실제 스플라이스 연결부에 해당한다. 색 코드는 다음과 같다:

(회색): 시그널 영역, 중쇄 및 경쇄 가변 영역에서 모두 발견된 최초 암호화 서열;

(라벤더색): hu806 VH 채, 베니어링(veneering)된 중쇄 가변 영역;

(핑크색): hu806 CH 채, 코돈 최적화된 중쇄 불변 영역;

(녹색): hu806 VL 채, 베니어링된 경쇄 가변 영역; 및

(황색): hu806 CL 채, 코돈-최적화된 경쇄 불변 영역.

도 55A 및 55B는 hu806 해독된 아미노산 서열(서열번호 164 및 166의 VH 및 VL 채 및 이들 각각의 시그널 펩타이드(서열번호 163 및 165); 서열번호 43 및 48의 CH 및 CL 채)을 나타내고, VH 및 VL 채의 캐뻑 번호(각각 서열번호 164 및 165)와 밀접한 CDR(서열번호 44-46 및 49-51)을 제공한다.

도 56A, 56B, 56C, 57A, 57B 및 57C는 베니어링 설계의 초기 단계를 도식한 것으로, 표면 노출되는 mAb806 서열(서열번호 167의 VH 채 및 서열번호 12의 VL 채)의 아미노산 잔기의 등급화를 나타낸 것이다. 등급은 각 잔기 위에 별표(*) 숫자로 매기고, 가장 노출된 잔기는 3개의 별표로 표시했다. 이 도면은 최초 베니어링된 산물(서열번호 168의 VH 채 및 서열번호 180의 VL 채)을 형성하기 위해 초기 올리고뉴클레오타이드(VH 채: 도 56C 및 서열번호 52 및 169-177); VL 채: 도 57C 및 서열번호 62, 66, 68 및 181-187)가 중첩되는 방식을 나타낸 디자인을 포함한다.

도 58은 코돈 최적화된 huIgG1 중쇄 DNA 서열(서열번호 80; 상보체 서열번호 178) 및 아미노산 해독(서열번호 43) 맵을 나타낸 것이다.

도 59는 hu806 VH + CH 아미노산 서열(8C65AAG hu806 VH + CH; 서열번호 81)을 mAb806 VH 채(서열번호 167)의 본래 참조 파일에 비교한 단백질 정렬을 나타낸다. 강조된 영역은 VH 채의 보존된 아미노산 서열을 나타낸다.

CDR은 밀줄친 부분이다. 별표는 최초 베니어링 과정에서 계획되고 수행된 변화를 나타낸다. 번호를 붙인 부위는 이후 변형에 대한 참고용이다.

도 60은 mAb806 VL쇄(서열번호 179)의 본래 참조 파일에 대해 hu806 VL+CL 아미노산 서열(8C65AAG hu806 시그널 + VL + CL; 서열번호 83)을 대응 정렬한 것이다. 이것은 변형 #7에서 이루어진 변화를 예시하기 위해 포함된 전구체 작제물인 추가 파일(r2vk1 hu806 시그널 + VL + CL; 서열번호 82)을 포함한다.

도 61은 대응하는 ch806 서열(pREN ch806 LC Neo; LICR; 서열번호 189)과 hu806 시그널+VL 및 CL 서열의 뉴클레오타이드 및 아미노산 정렬(8C65AAG hu806 V1+C1; 서열번호 190 및 188)을 도시한 것이다. 도 62에 기술된 바와 같이 변형시키고 주석을 달았다.

도 62는 대응하는 mAb806 서열[코돈 변화(cc) 및 베니어링(ven) 전인 mAb806 VH쇄; 서열번호 191]과 hu806 시그널+VH 서열(8C65AAG hu806 VH쇄; 서열번호 192)의 뉴클레오타이드 정렬을 도시한 것이다. 도 59 및 60의 아미노산 변화 이전의 뉴클레오타이드 변화를 예시했고, 뿐만 아니라 아미노산에 어떠한 변화도 초래하지 않는 보존적 핵산 변화를 나타냈다. hu806의 시그널과 VH쇄 사이의 인트론은 더욱 용이한 관찰을 제거했다. 시그널 서열과 CDR은 밀줄친 부분이다. 대응 아미노산 서열(서열번호 42)은 정렬 상에 중첩되어 있다.

도 63은 Biacore에 의해 측정된, 재조합 EGFR-ECD에 대한 일시적 형질감염체 293 세포로부터 수득한 정제된 hu806 항체의 결합성을 도시한 것이다. 정제된 대조군 사람 IgG1 항체에 의해서는 EGFR-ECD에 대한 결합성이 관찰되지 않았다.

도 64는 IgG1 hu806을 암호화하는 플라스미드 8C65AAG의 서열(서열번호 41)과 주석의 진뱅크(GenBank) 형식의 텍스트 문서이다.

도 65는 mAb806 유래 CDR의 아미노산 서열(서열번호 15-18, 20 및 193) 및 mAb175 유래 CDR의 아미노산 서열(서열번호 130-132, 135 및 194-195)을 정렬한 것이다. 두 항체 사이의 서열 차이는 진하게 표시했다.

도 66A 및 66B는 mAb175를 이용한 세포주 및 정상 사람 간의 면역조직화학 염색을 나타낸 것이다. (A) 비오틀린화된 mAb175는 A431 세포(wtEGFR을 과발현한다), U87MG.△2-7 세포(△2-7EGFR 발현) 및 U87MG 세포(중간 수준으로 wtEGFR을 발현)를 함유하는 블록으로부터 제조된 섹션을 염색하는데 사용했다. (B) mAb175(왼쪽 패널), 이소타입 대조군(중심 패널) 및 2차 항체 대조군(오른쪽 패널)을 이용한 정상 사람 간 염색(400x). 특이적인 동양 혈관 또는 간세포 염색은 관찰되지 않았다.

도 67A, 67B 및 67C는 효모에서 발현된 EGFR의 단편과 mAb806 및 mAb175의 반응성을 도시한 것이다. (A) 효모-발현된 EGFR 단편의 mAb175 및 mAb806-표지화의 평균 형광 시그널을 표시한 대표적인 유세포분석 히스토그램. 효모 발현 시, 일정 비율의 세포는 2개의 히스토그램 피크를 산출하는 단백질을 표면에 발현하지 않는다. 9E10 항체는 모든 단편이 선형 C-말단 c-myc 태그를 포함하기 때문에 양성 대조군으로 사용했다. (B) 다양한 EGFR 단편에 대한 항체 결합성 정리. (C) EGFR 단편은 효모 펠릿을 800℃로 30분 동안 가열하여 변성시켰다. c-myc 태그는 모든 경우에 9E10 항-myc 항체에 의해 여전히 인식되었고, 이것은 열처리가 효모 표면 발현 단백질을 훼손하지 않는다는 것을 증명한다. 변성 확인을 위해, 입체형태 민감성 EGFR 항체 mAb225를 사용했다.

도 68A, 68B, 68C 및 68D는 뇌 및 전립선암 이종이식편에 미치는 mAb175의 항종양 효과를 나타낸다. (A) U87MG.△2-7 이종이식편을 보유하는 마우스(n=5)에게 PBS, 1mg의 mAb175 또는 mAb806(양성 대조군)을 출발 종양 용적이 100mm³가 되었을 때 6일, 8일, 10일, 13일, 15일 및 17일에 2주 동안 2주 동안 매주 3회씩 i.p. 주사했다. 데이터는 평균 종양 용적±SE로 표현했다. (B) 세포는 2가지 무관한 항체(청색, 솔리드 및 녹색, 중공형), 전체 EGFR을 위한 mAb 528(핑크색, 솔리드), mAb806(밝은 청색, 중공형), 및 mAb175(오렌지색, 중공형)로 염색하고 FACS로 분석했다. (C) DU145 세포는 용해한 뒤, mAb628, mAb806, mAb175 또는 2가지 독립된 무관한 항체로 IP 처리하고, 그 후 EGFR에 대해 면역블로팅했다. (D) DU145 이종이식편을 보유하는 마우스(n=5)는 초기 종양 용적이 85mm³가 되었을 때 18-22일, 25-29일 및 39-43일째 매일 PBS, 1mg mAb175 또는 mAb806을 i.p. 주사로 투여받았다. 데이터는 평균 종양 용적 ±SE로 나타냈다.

도 69A, 69B, 69C, 69D, 69E 및 69F는 Fab 단편에 결합된 EGFR 펩타이드 287-302의 결정 구조를 도시한 것이다: (A) 경쇄, 적색; 중쇄, 청색; 결합된 펩타이드, 황색; 및 EGFR 유래의 중첩된 EGFR₂₈₇₋₃₀₂, 자주색을 보여주는 Fab 806 그림. (B) 경쇄, 황색; 중쇄, 녹색; 결합된 펩타이드, 라일락색; 및 EGFR(DI-3) 유래의 EGFR₂₈₇₋₃₀₂, 자주색을 보여주는 Fab 175 그림. (C) Fab 175에 결합된 펩타이드와 수용체 내의 EGFR₂₈₇₋₃₀₂의 유사성을 보여주는 (B)의 상세도. 펩타이드 주쇄는 Cα 트레이스로 표시하고, 상호작용성 측쇄는 스틱으로 표시했다. 주쇄

에 있어서, O 원자는 적색; N, 청색; S, 오렌지색; C로 표시했다. (D) 공간적 중첩을 보여주는 Fab175:펩타이드 복합체와 EGFR의 중첩. (C)에서와 같이 착색, EGFR187-286 표면은 청록색으로 착색함. (E) (D)에 대한 직교 조감도, EGFR187-286은 불투명 청색으로 표시하고 경쇄(오렌지색) 및 중쇄(녹색) 표면은 투명하게 표시했다. (F) 항원 결합 부위를 조감하는 175 Fab 복합체의 상세한 입체조감도. (C)에서와 같이 착색, 측쇄 수소 결합은 흑색 점으로 표시. 복합체 형성 시에 매장된 물 분자는 적색 구로 표시했다.

도 70A, 70B, 70C 및 70D는 EGFR에 대한 mAb806 결합에 미치는 271-283 시스템 결합의 영향을 도시한 것이다. (A) wtEGFR, EGFR-C271A, EGFR-C283A 또는 C271A/C283A 돌연변이체로 형질감염된 세포는 mAb528(솔리드 핑크색 히스토그램), mAb806(청색선) 또는 단독 2차 항체(자주색)로 염색한 뒤, FACS로 분석했다. 클래스-매칭된 무관한 항체를 이용하여 이득을 설정했다. (B) EGFR-C271A 또는 C271/283A EGFR을 발현하는 BaF3 세포는 기술된 것처럼 MTT 분석에서 EGF에 대한 반응에 대해 조사했다. 데이터 점의 볼츠만 적합(Bolzman fit)을 사용하여 EC_{50} s를 수득했다. 데이터는 3반복 측정값의 평균 및 sd를 나타낸다. (C) 야생형 또는 EGFR-C271A/C283A를 발현하는 BaF3 세포는 IL-3 및 혈청 결핍화시킨 후, EGF 또는 비히클 대조군에 노출시켰다. 전세포 용해물을 SDS-PAGE로 분리하고, 항-포스포티로신 항체(상단 패널) 또는 항-EGFR 항체(하단 패널)로 면역블로팅했다. (D) 야생형(왼쪽 패널) 또는 C271A/C283A(오른쪽 패널) EGFR을 발현하는 BaF3 세포는 항체 무함유(흰색 기호), 10 μ g/ml씩의 mAb528(회색 원) 또는 mAb806(흑색 삼각형) 존재 하에 증가하는 EGF 농도로 자극했다. 데이터는 3반복 측정값의 평균 및 sd로 나타냈다.

도 71A, 71B 및 71C는 (A) 성대의 전이성 편평 세포 암종을 보유한 환자의 ^{111}In ch806의 생체분포를 도시한 전신 감마 카메라 영상으로, 오른쪽 목에 있는 종양에서의 정량적으로 높은 흡수율을 보여준다(화살표). 또한, 혈액 풀(pool) 활성 및 간에서 유리 ^{111}In 의 미소한 분해대사도 관찰된다. (B) 이 환자의 목을 단일 광자 컴퓨터 단층 촬영(SPECT)한 영상으로, 생존 종양(화살표)에서 ^{111}In -ch806의 흡수를 보여주고, 중심 흡수의 감소는 괴사를 보여준다. (C) 이 목의 대응 CT 스캔은 중심 괴사와 오른쪽 목의 큰 종양 덩어리(화살표)를 증명해준다.

도 72A 및 72B는 무결박 EGFR1-621의 입체 구조 모델을 도시한 것이다. 수용체 주쇄는 청색으로 그리고 리간드 TGF- α 는 적색으로 그렸다. mAb806/175 에피토프는 청록색으로 그리고, 디설파이드 결합은 황색으로 그렸다. 수용체에 에피토프를 고정시키는 디설파이드 결합의 원자는 공간-채움 형식으로 표시했다. 이 모델은 결합된 입체 형태 유래의 EGFR-ECD CR2 도메인을 리간드 존재 하에 무결박 EGFR 단량체 구조 위에 도킹시켜 작제했다.

도 73은 EGFR 단편과 mAb806의 반응성을 보여준다. 가용성 1-501 EGFR 단편 또는 GH/EGFR 단편 융합 단백질(GH 274-501, GH-282-501, GH-290-501 및 GH-298-501)을 발현하는 벡터로 형질감염된 293T 세포의 용해물은 SDS-PAGE로 분리하고, 막으로 이동시킨 뒤, mAb806(왼쪽 패널) 또는 항-myc 항체 9B11(오른쪽 패널)로 면역블로팅했다.

도 74A 및 74B는 mAb175 VH 쇄 핵산 서열(서열번호 128) 및 아미노산 서열(들)(서열번호 129)을 각각 도시한 것이다.

도 75A 및 75B는 mAb175 VL 쇄 핵산 서열(서열번호 133) 및 아미노산 서열(들)(서열번호 134)을 각각 도시한 것이다.

도 76A, 76B 및 76C는 소량(100ml)의 진탕 플라스크 배양물 중의 GS-CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NS0(36) hu806 형질감염체의 (A) 용적 산물 농도 및 (B) 생세포 농도를 도시한 것이다. 산물 농도는 코팅 항체로서 806 항-유전자형을 사용하고 표준물로서 ch806 임상 로트: J06024를 사용하여 ELISA로 추산했다; (C) 15L 교반 탱크 생물반응기에서의 GS-CHO 40A10 형질감염 세포 성장 및 용적 생산량. 생세포 밀도($\blacklozenge \times 10^5$ 세포/ml), 세포 생존도(\blacksquare) 및 생산량(\blacktriangle mg/L).

도 77A, 77B, 77C, 77D 및 77E는 소량 배양에 의해 생산된 단백질 A 정제된 hu806 항체 작제물 및 대조군 ch806과 mAb 806의 크기 배제 크로마토그래피(Biosep SEC-S3000) 분석을 도시한 것이다. 각 도면의 상단 패널에는 A214nm에서의 크로마토그램을, 하단 패널에는 A280nm에서의 크로마토그램을 제시했다.

도 78은 대량 생산 및 단백질-A 정제 후, 단백질-A 정제된 hu806 항체 작제물 40A10의 크기 배제 크로마토그래피(Biosep SEC-S3000) 분석을 도시한 것이다. A214nm에서의 크로마토그램을 제시했고, 이는 1.2% 응집물이 존재하여 98.8% 순도를 나타냈다.

도 79는 노벡스(Novex, USA) 제품인 사전주조된 4-20% 트리스/글리신 겔을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여,

환원 조건 하에 정제된 형질감염체 hu806 제조물($5\mu\text{g}$) GS CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NS0(36) hu806을 분석한 것을 도시한 것이다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.

도 80은 사전주조된 4-20% 트리스/글리신 겔을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여, 비환원 조건 하에 정제된 형질감염체 hu806 제조물($5\mu\text{g}$) GS CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NS0(36)을 분석한 것을 도시한 것이다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.

도 81은 사전주조된 4-20% 트리스/글리신 겔을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여, 대량 생산 후 정제된 형질감염체 hu806 GS CHO 40A10 ($5\mu\text{g}$)을 분석한 것을 도시한 것이다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.

도 82는 15L 생산 후 정제된 형질감염체 hu806 GS CHO 40A10($5\mu\text{g}$)의 등전점 전기영동 겔 분석을 도시한 것이다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다. 레인 1, pI 마커; 레인 2, hu806(3개의 이소폼, pI 8.66 내지 8.82); 레인 3, pI 마커.

도 83은 A431 세포에 대한 결합성을 도시한 것이다: 단백질 A-정제된 hu806 항체 제조물($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 이소타입 대조군 huA33($20\mu\text{g}/\text{ml}$)의 유세포분석. 대조군은 2차 항체 단독(녹색) 및 ch806(적색)을 포함한다. hu806 작제물은 소규모 배양으로 생산했다.

도 84는 A431 세포에 대한 결합성을 도시한 것이다: 표시된 바와 같은 세포 표면상의 야생형 EGFR의 약 10%에 결합하는 정제된 mAb806, ch806 및 hu806 40A10 항체 제조물($20\mu\text{g}/\text{ml}$), 528(야생형 및 de2-7 EGFR에 결합함) 및 무관련 대조군 항체($20\mu\text{g}/\text{ml}$)의 유세포분석.

도 85는 U87MG.de2-7 신경아교종 세포에 대한 결합을 도시한 것이다. 정제된 mAb806, ch806 및 hu806 40A10 항체 제조물($20\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 528 항-EGFR 및 무관련 대조군 항체($20\mu\text{g}/\text{ml}$)의 유세포분석.

도 86은 (A) U87MG.de2-7 신경아교종 세포 및 (B) A431 암종 세포에 대한 ^{125}I -방사능표지된 806 항체 작제물의 특이적 결합을 도시한 것이다.

도 87은 U87MG.de2-7 세포에 대한 ^{125}I -방사능표지된 (A) ch806 및 (B) hu806 항체 작제물 결합의 스캐차드 (Scatchard) 분석을 도시한 것이다.

도 88은 A431 세포에 대한 ^{125}I -방사능표지된 (A) ch806 및 (B) hu806 항체 작제물 결합의 스캐차드 분석을 도시한 것이다.

도 89A 및 89B는 50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM 및 300nM의 농도 증가하는 고정화된 펩타이드를 통과하는 (A) hu806 및 (B) ch806에 의한 287-302 EGFR 806 펩타이드 에피토프의 결합에 대한 BIAcore 분석을 도시한 것이다.

도 90A 및 90B는 (A) 일정 범위의 작용인자 대 표적 세포 비(E:T = 0.78:1 내지 100:1) $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 각 항체에서 측정되고; (B) 표적 A431 상의 각 항체의 농도 범위($3.15\text{ ng}/\text{ml}$ - $10\mu\text{g}/\text{ml}$) 상에서 E:T = 50:1에서 측정된 표적 A431 세포에 대한 ch806- 및 hu806-매개의 항체 의존적 세포 세포독성을 도시한 것이다.

도 91은 BALB/c 누드 마우스의 정착된 A431 이종이식편의 치료를 도시한 것이다. 5마리 마우스 그룹들에게 2주 동안 6x1mg 용량의 항체 요법을 표시된 바와 같이(화살표) 제공했다. 연구 종결시까지 평균 \pm SEM 종양 용적을 제시했다.

도 92는 BALB/c 누드마우스의 정착된 U87MG.de2-7 이종이식편의 치료를 도시한 것이다. 5마리 마우스 그룹들에게 2주 동안 6x1mg 용량의 항체 요법을 표시된 바와 같이(화살표) 제공했다. 연구 종결시까지 평균 \pm SEM 종양 용적을 제시했다.

도 93은 mAb806 펩타이드 (A) N, (B) HN 및 (C) HA에 대한 무작위 코일 화학적 이동 값의 편차를 도시한 것이다. 펩타이드는 5% H_2O_2 , 70mM NaCl 및 50mM NaPO_4 (pH 6.8)를 함유하는 H_2O 용액에 제조했다. 순차 정렬을 위해 사용된 모든 스펙트럼은 Bruker Avance500에서 298K 하에 획득했다.

도 94A, 94B, 94C, 94D, 94E 및 94F는 ^{111}In -ch806 주입 후 5일째 환자 7의 전신 감마 카메라 영상, A) 앞 및 b) 뒤를 도시한 것이다. 폐의 전이성 병변에서(화살표) ^{111}In -ch806의 높은 흡수가 분명했다. C) 및 D)는 CT 스캔에서의 전이성 병변(화살표)을 도시한 것이다. E) 흉부의 3D SPECT 영상, 및 F) 전이성 병변에서 ^{111}In -

ch806의 특이적 흡수를 보여주는 SPECT 및 CT의 공동-기록된 수평단면(transaxial) 영상을 도시한 것이다.

도 95A, 95B, 95C, 95D, 95E 및 95F는 ^{111}In -ch806의 주입 후 A) 0일, B) 3일 및 C) 7일 후에 획득한 환자 8의 두경부 평면 영상을 도시한 것이다. 초기 혈액 풀 활성화는 0일째 관찰했고, 우측 전엽에서 역행성 성상세포종 중 ^{111}In -ch806의 흡수가 3일경(화살표)에 분명히 나타났고, 7일경에 증가했다. ^{111}In -ch806의 특이적 흡수는 D) 뇌의 SPECT 영상(화살표)에서, E) ^{18}F -FDG PET에서 분명한 종양(화살표) 부위에서, F) MRI에서 확인된다.

도 96A, 96B, 96C 및 96D는 종양 샘플에서 선별된 806 항원 발현의 차이에도 불구하고, 환자 4에 비해 환자 3의 종양에서 ^{111}In -ch806의 유사한 흡수가 분명하다는 것을 보여준다. A) 환자 4의 SPECT 수평단면 영상에서 폐 전이부(화살표) 중에 ^{111}In -ch806 국제화 및 심혈관 풀 활성화(B)이 분명했다. B) 대응하는 CT 스캔. 보관된 종양은 806 발현에 있어서 <10% 양성인 것으로 관찰되었다. C) 환자 3의 폐 전이부(화살표)에서 나타나는 ^{111}In -ch806 국제화, 및 심장 혈액 풀 활성화(B)이 분명하다. D) 대응하는 CT 스캔. 보관된 종양은 806 발현에 있어서 50-75% 양성인 것으로 관찰되었다.

도 97은 ELISA로 측정된 ch806 단백질의 수집된 집단 약동학. 관찰 및 예측된 ch806(%ID/L) 대 주입후 시간(hr).

도 98A 및 98B는 A) 표준화된 전신 제거율 및 B) 5 mg/m²(■), 10mg/m²(△), 20mg/m²(▽) 및 40 mg/m²(◆) 용량 수준에서 ^{111}In -ch806의 간 제거율에 대한 개별 환자의 결과를 도시한 것이다. 데이터의 선형 회귀는 각 패널 [A) $r^2 = 0.9595$; B) $r^2 = 0.9415$]에 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0126] 본 발명에 따르면 당업계의 기술에 속하는 종래 분자생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 다음과 같은 문헌에 상세하게 설명되어 있다. 예컨대, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-E [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984) 참조.
- [0127] 본 명세서에 사용된 다음 용어들은 제한 없이 제공된 정의를 나타내는 것으로 간주한다.
- [0128] "특이적 결합 구성원"이란 용어는 서로 결합 특이성이 있는 분자 쌍의 구성원을 의미한다. 특이적 결합 쌍의 구성원들은 자연 유래인 것이거나 또는 완전 또는 부분 합성 생산된 것일 수 있다. 분자 쌍의 한 구성원은 분자 쌍의 다른 구성원의 특별한 공간 및 극성 조직에 특이적으로 결합하여 상보적인 공동 또는 표면 구역을 보유한다. 따라서, 쌍의 구성원들은 서로에 특이적으로 결합하는 성질이 있다. 특이적 결합 쌍 종류의 예로는 항원-항체, 비오틴-아비딘, 호르몬-호르몬 수용체, 수용체-리간드, 효소-기질이 있다. 본 출원은 항원-항체형 반응에 관한 것이다.
- [0129] 다양한 문법적 형태의 "이상 발현"이란 용어는 과발현되지 않는 상태에 반해 더 많은 단백질이 존재하거나 어떤 1회에 검출될 수 있도록, 증강된 발현 또는 해독, 단백질 프로모터 또는 조절인자의 변조, 단백질용 유전자의 증폭 또는 증강된 반감기 또는 안정성을 비롯한 임의의 수법에 의해 유발되는 단백질 양의 증가와 같은 조직 내 단백질의 임의의 강화된 또는 변경된 발현 또는 과발현을 의미하고, 포함할 수 있다. 이상 발현은 서열 변경, 결실 또는 삽입, 또는 변경된 폴딩으로 인해 돌연변이된 단백질 또는 변형체에서처럼 변경된 단백질이 발현되는 것을 포함해서, 단백질의 증강된 발현 또는 증가된 수준 또는 양으로 인해 세포내 단백질 발현 또는 해독후 변경 기전이 혹사되거나 그렇지 않다면 붕괴되는 임의의 시나리오 또는 변경을 포함하고 관찰한다.
- [0130] "이상 발현"이란 용어는 비정상 양 또는 수준의 효과적인 원인에 상관없이 단백질의 비정상(보통 증가된) 양/수준이 존재하는 상태를 포함하기 위해 본 명세서에 특별히 선택된 것임을 이해하는 것이 중요하다. 따라서, 단백질의 비정상적 양은 유전자 증폭의 부재 하에 단백질의 과발현으로부터 초래될 수 있고, 이는 예컨대 암 환자의

두경부로부터 취한 많은 세포/조직 샘플 등에서 나타나는 경우이며, 반면 다른 샘플들은 유전자 증폭에 기인할 수 있는 비정상적 단백질 수준을 나타낸다.

[0131] 이러한 후자와 관련하여, 본 발명을 예시하기 위해 본 명세서에 제시한 본 발명자들의 특정 작업은 EGFR의 증폭 으로부터 산출되는 비정상적 단백질 수준을 나타내는 특정 샘플의 분석을 포함한다. 따라서, 이것은 본 명세서 에 증폭을 참고로 하는 실험 발견들의 제공 및 EGFR의 비정상적 수준을 설명하는데 있어서 용어 "증폭/증폭된" 및 이의 유사 용어의 사용을 설명한다. 하지만, 단백질의 비정상적 양 또는 수준의 관찰은, 본 발명의 결합 구성원에 의존하여 임상적 중재를 계획하는 환경 또는 상황을 정의하며, 이러한 이유로 본 명세서는 "이상 발현" 이란 용어가 EGFR 수준의 대응하는 비정상을 산출하는 원인 환경을 더욱 광범위하게 포착하는 것으로 생각한다.

[0132] 따라서, 다양한 문법적 형태의 "과발현" 및 "증폭"이란 용어들은 독특한 기술적 의미가 있는 것으로 생각되지만, 이 용어들이 본 발명의 상황에서 비정상적 EGFR 단백질 수준이 존재하는 상태를 나타내는 한 서로 동등한 것으로 간주되어야 한다. 결과적으로, "이상 발현"이란 용어는 본 발명의 목적 범위 내에서 "과발현" 및 "증폭"이란 용어를 포함하는 것으로 생각될 때 선택되었고, 이에 따라 용어들은 모두 본 명세서에 사용된 것처럼 서로 동등한 것으로 간주할 수 있다.

[0133] "항체"란 용어는 자연 생산되거나, 또는 부분적으로 또는 전적으로 합성 생산된 면역글로불린을 의미한다. 이 용어는 또한 항체 결합 도메인이거나 이와 상동성인 결합 도메인을 보유한 임의의 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함하기도 한다. CDR 이식 항체도 이 용어에 의해 예상되기도 한다.

[0134] 항체는 수많은 방식으로 변형될 수 있으므로, "항체"란 용어는 필요한 특이성이 있는 결합 도메인을 보유하는 임의의 특이적 결합 구성원 또는 물질을 포함하는 것으로서 간주되어야 한다. 따라서, 이 용어는 천연이든 또는 부분 또는 완전 합성된 것이든 간에, 면역글로불린 결합 도메인을 함유하는 임의의 폴리펩타이드를 비롯하여, 항체 단편, 유도체, 기능성 등가물 또는 항체 동족체를 포함한다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현은 EP-A-0120694 및 EP-A-0125023 및 미국 특허 4,816,397 및 4,816,567에 설명되어 있다.

[0135] 완전항체의 단편이 항원 결합 기능을 수행할 수 있다는 것은 밝혀져 있다. 결합 단백질의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward, E.S. et al.(1989) Nature 341, 544-546); (v) 분리된 CDR 영역; (vi) 결합된 두 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 (Fab')₂ 단편; (vii) VH 도메인과 VL 도메인이 항원 결합 부위를 형성하기 위해 결합하도록 하는 펩타이드 링커에 의해 결합되어 이 는 단일쇄 Fv 분자(scFv)(Bird et al.(1988) Science. 242, 423-426; Huston et al.(1988) PNAS USA. 85, 5879-5883); (viii) 다가 항체 단편(scFv 이량체, 삼량체 및/또는 사량체(Power and Hudson(2000) J. Immunol. Methods 242, 193-204); (ix) 이특이적 단일쇄 Fv 이량체(PCT/US92/09965) 및 (x) 유전자 융합에 의해 작제된 다가 또는 다중특이적 단편인 "이중항체"(W094/13804; P. Holliger et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448)이다.

[0136] "항체 결합 부위"는 항원에 특이적으로 결합하는, 경쇄 또는 중쇄 및 경쇄 가변 영역 및 초가변 영역으로 구성된 항체 분자의 구조적 부분이다.

[0137] 본 명세서에 사용된 다양한 문법적 형태의 "항체 분자"란 어구는 무손상 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분을 모두 고려한다.

[0138] 항체 분자의 예는 무손상 면역글로불린 분자, 실질적으로 무손상인 면역글로불린 분자 및 과라토프를 함유하는 면역글로불린 분자의 부분으로, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 F(v)로 당업계에서 알려져 있는 부분을 포함하며, 이 부분들은 본 명세서에 기술된 치료요법적 방법에 사용하기에 바람직하다.

[0139] 또한, 항체는 이특이성으로, 항체의 한 결합 도메인이 본 발명의 특이적 결합 구성원이고 다른 결합 도메인은 다른 특이성, 예컨대 작용인자 기능 등을 보장하는 것일 수 있다. 본 발명의 이특이성 항체는 항체의 한 결합 도메인이 본 발명의 특이적 결합 구성원, 예컨대 이의 단편이고, 다른 결합 도메인이 상이한 항체 또는 이의 단편, 예컨대 상이한 EGFR 항체의 단편, 예를 들어 항체 528(미국 특허 4,943,533), 키메라성 및 사람화된 225 항체(미국 특허 4,943,533 및 W096/40210), 항-de2-7 항체, 예컨대 DH8/3(Hills, D. et al.(1995) Int.J.Cancer. 63(4), 537-543), 항체 L8A4 및 Y10(Reist, CJ et al.(1995) Cancer Res. 55(19): 4375-4382; Foulon CF et al.(2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62(Modjtahedi H et al.(1993) Cell Biophys. Jan-Jun; 22(1-3): 29-46; Modjtahedi et al.(2002) P.A.A.C.R.55(14): 3140-3148, 또는 위스트랜드 등의 항체(Wikstrand C. et al.(1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148)를 포함한다. 다른 결합 도메인은 신경 또는 아교세포-특이적 항

체에서처럼, 특정 세포 종류를 인식하거나 표적으로 하는 항체일 수 있다. 본 발명의 이특이적 항체에서, 본 발명의 항체의 한 결합 도메인은 특정 세포 수용체를 인식하고/하거나 특정 세포 수용체를 인식하고/하거나 특정 방식으로, 예컨대 면역 조절인자(예컨대, 인터루킨(들)), 성장 조절인자 또는 사이토킨(예컨대, 종양 괴사 인자(TNF), 특히 본원에 전문이 참고인용된 2002년 2월 13일에 출원된 U.S.S.N. 60/355,838에 증명되어 있는 TNF 이특이적 방식), 독소(예: 리신) 또는 항유사분열 또는 아포토시스성 제제 또는 인자처럼 세포를 조절하는 분자 또는 다른 결합 도메인과 조합될 수 있다.

[0140] 항체 분자의 Fab 및 F(ab')₂ 부분은 공지된 방법에 의한 실질적 무손상 항체 분자에 대한 파파인 및 펩신 각각의 단백질 분해 반응에 의해 제조할 수 있다(예컨대, 미국 특허 4,342,566 참조, Theofilopolous et al.). 또한, Fab' 항체 분자 부분도 공지되어 있으며, 이는 두 중쇄 부분을 연결하는 디설파이드 결합을 머캡토에탄올로 환원시키고, 그 다음 수득되는 단백질 머캡탄을 요오도아세트아미드와 같은 시약으로 알킬화함으로써 F(ab')₂ 부분으로부터 생산한다. 무손상 항체 분자를 함유하는 항체가 본 발명에 바람직하다.

[0141] 다양한 문법적 형태의 "모노클로날 항체"란 어구는 특정 항원과 면역반응할 수 있는 항체 결합 부위를 한 종만 보유하는 항체를 의미한다. 따라서, 모노클로날 항체는 일반적으로 면역반응하는 임의의 항원에 대해 단일 결합 친화성을 나타낸다. 또한, 모노클로날 항체는 각각 다른 항원에 대해 면역특이적인 복수의 항체 결합 부위를 보유하는 항체 분자, 예컨대 이특이성(키메라성) 모노클로날 항체도 포함할 수 있다.

[0142] "항원 결합 도메인"이란 용어는 항원 일부 또는 전체에 특이적으로 결합하고 상보적인 구역을 포함하는 항체 부분을 의미한다. 항원이 큰 경우, 항체는 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있고, 이 부분은 에피토프라 불린다. 항원 결합 도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역(VL) 및 항체 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 것이 바람직하다.

[0143] "해독후 변형"은 해독 완료 후 리보솜에서 방출된 후 또는 초기 폴리펩타이드에서 공동해독적으로 단백질이 겪는, 공유 변형을 비롯한 어느 한 변형 또는 변형(들)의 조합을 포함할 수 있다. 해독후 변형은 인산화, 미리스틸화, 유비퀴틴화, 글리코실화, 조효소 부착, 메틸화 및 아세틸화를 포함하지만, 이에 국한되지 않는다. 해독후 변형은 단백질의 활성, 단백질의 세포내 또는 세포외 운명, 단백질의 안정성 또는 반감기 및/또는 리간드, 수용체 또는 다른 단백질에 의한 인식을 조절하거나 영향을 미칠 수 있다. 해독후 변형은 세포 소기관 내에서, 핵 내에서 또는 세포질 내에서 또는 세포외에서 일어날 수 있다.

[0144] "특이적"이란 용어는 특이적 결합 쌍의 한 구성원이 이의 특이적 결합 파트너(들) 외에 다른 분자들에 대해 어떠한 유의적 결합을 나타내지 않는 상황을 언급하는데 사용될 수 있다. 또한, 이 용어는 예컨대 항원 결합 도메인이 다수의 항원에 의해 운반되는 특정 에피토프에 특이적인 경우에 적용할 수도 있으며, 이러한 경우에 항원 결합 도메인을 운반하는 특이적 결합 구성원은 에피토프를 운반하는 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다.

[0145] "포함한다"란 용어는 하나 이상의 특징 또는 성분의 존재를 포함한다는 의미, 즉 허용한다는 의미에서 일반적으로 사용된다.

[0146] "~로 본질적으로 이루어진"이란 표현은 더 큰 산물에 공유 부착하지 않는, 일정 수의 잔기들의 산물, 특히 펩타이드 서열을 의미한다. 앞에서 언급한 본 발명의 펩타이드의 경우에, 당업자는 펩타이드의 N- 또는 C-말단이 약간 변형된 것을 예상할 수 있고, 예컨대 보호기 등을 첨가하는 말단의 화학적 변형, 예컨대 C-말단의 아미드화를 예상할 수 있다는 것을 알고 있을 것이다.

[0147] "분리된"이란 용어는 본 발명의 특이적 결합 구성원, 또는 이러한 결합 구성원을 암호화하는 핵산이 본 발명에 따라 존재하는 상태를 의미한다. 구성원 및 핵산은 이들의 자연 환경에서, 또는 이의 제조가 시험관내 또는 생체내에서 수행되는 재조합 DNA 기술에 의해 이루어질 때 제조된 환경(예컨대, 세포 배양물)에서 함께 발견되는 다른 폴리펩타이드 또는 핵산과 같은 자연 연관된 물질이 없거나 실질적으로 없는 것일 것이다. 구성원 및 핵산은 희석제 또는 보강제와 배합될 수 있고, 실제 목적을 위해 분리될 수 있으며, 예컨대 구성원은 면역분석용 미세역가 플레이트를 코팅하는데 사용된다면 다른 담체 또는 젤라틴과 일반적으로 혼합되거나, 또는 진단이나 치료법에 사용될 때에는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합될 것이다. 특이적 결합 구성원은 자연적으로 또는 이종 진핵생물 세포계에 의해 글리코실화될 수 있고, 또는 글리코실화되지 않을 수도 있다(예컨대, 원핵생물 세포에서 발현에 의해 생산되는 경우).

[0148] 또한, 본 명세서에 사용된 "글리코실화" 및 "글리코실화된"이란 용어는 당단백질이라 불리는 단백질의 올리고사카라이드 첨가에 의한 해독후 변형을 포함한다. 올리고사카라이드는 당단백질의 글리코실화 부위에 첨가되며, 예컨대 N-결합된 올리고사카라이드 및 O-결합된 올리고사카라이드가 있다. N-결합된 올리고사카라이드는 Asn 잔

기에 첨가되고, 이 Asn 잔기는 특히 N-X-S/T 서열(여기서 X는 Pro 또는 Asp일 수 없다)에 존재하는 것이며, 이것은 당단백질에서 발견되는 가장 일반적인 것이다. N-결합된 당단백질의 생합성에서, 고 만노스 형 올리고사카라이드(일반적으로, 돌리콜, N-아세틸글루코사민, 만노스 및 글루코스로 구성됨)는 소포체(ER)에 가장 먼저 형성된다. 그 다음, 고 만노스 형 당단백질은 ER로부터 골지체로 수송되고, 여기서 올리고사카라이드의 추가 가공 및 변형이 일어난다. O-결합된 올리고사카라이드는 Ser 또는 Thr 잔기의 하이드록실 그룹에 첨가된다. O-결합된 올리고사카라이드에서, N-아세틸글루코사민은 먼저 ER에서 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제에 의해 Ser 또는 Thr 잔기로 전달된다. 그 다음, 단백질은 추가 변형과 사슬 연장이 일어나는 골지체로 이동한다. O-결합된 변형은 추가로 다른 조건 하에 글리코실화보다는 인산화될 수 있는 Ser 또는 Thr 부위에서 OGlcNAc 모노사카라이드만을 간단히 첨가함으로써 일어날 수 있다.

[0149] 본 명세서에 사용된 "pg"는 피코그램을 의미하고, "ng"는 나노그램을 의미하며, "ug" 또는 "μg"은 마이크로그램을 의미하고, "mg"은 밀리그램을 의미하고, "ul" 또는 "μl"는 마이크로리터를 의미하고, "ml"은 밀리리터를 의미하고, "l"은 리터를 의미한다.

[0150] "806 항체", "mAb806", "ch806"란 용어, 및 구체적으로 열거되지 않은 임의의 변형체는 호환해서 사용되기도 하며, 본 명세서와 특허청구범위에 사용된 것처럼 단일 또는 다중 단백질을 비롯한 단백질성 물질을 의미하며, 본 명세서에 기술되고 서열번호 2 및 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열 데이터를 보유하는 단백질, 및 서열번호 7 및 8에 포함되고 그 일부를 형성하고 본 명세서 및 특허청구범위에 제시된 활성 프로필을 보유하는 키메라 항체 ch806까지 확장된다. 따라서, 실질적으로 동등하거나 변경된 활성을 나타내는 단백질도 마찬가지로 고려한다. 이러한 변형은 예컨대 고의적인 것, 예를 들어 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 수득되는 변형일 수 있고, 또는 우연한 것, 예를 들어 복합체 또는 이의 명명된 서브유닛의 생산자인 숙주에서 돌연변이를 통해 수득되는 것일 수 있다. 또한, "806 항체", "mAb806" 및 "ch806"이란 용어는 본 명세서에 구체적으로 언급된 단백질뿐 아니라 실질적 상동성인 모든 유사체 및 대립유전자 변형을 포함하는 것으로 간주한다.

[0151] "사람화된 806 항체", "hu806" 및 "베니어링된 806 항체"란 용어 및 구체적으로 열거하지 않은 임의의 변형체는 호환해서 사용되기도 하며, 본 명세서와 특허청구범위에 사용된 것처럼 단일 또는 다중 단백질을 비롯한 단백질성 물질을 의미하며, 본 명세서에 기술되고 서열번호 42 및 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열 데이터를 보유하고 본 명세서 및 특허청구범위에 제시된 활성 프로필을 보유하는 단백질까지 확장된다. 따라서, 실질적으로 동등하거나 변경된 활성을 나타내는 단백질도 마찬가지로 고려한다. 이러한 변형은 예컨대 고의적인 것, 예를 들어 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 수득되는 변형일 수 있고, 또는 우연한 것, 예를 들어 복합체 또는 이의 명명된 서브유닛의 생산자인 숙주에서 돌연변이를 통해 수득되는 것일 수 있다. 또한, "사람화된 806 항체", "hu806" 및 "베니어링된 806 항체"란 용어는 이 범위 내에 본 명세서에 구체적으로 언급된 단백질뿐 아니라 실질적 상동성인 모든 유사체 및 대립유전자 변형을 포함하는 것으로 간주한다.

[0152] "175 항체" 및 "mAb175"란 용어 및 구체적으로 열거되지 않은 임의의 변형체는 호환해서 사용되기도 하며, 본 명세서와 특허청구범위에 사용된 것처럼 단일 또는 다중 단백질을 비롯한 단백질성 물질을 의미하며, 본 명세서에 기술되고 서열번호 129 및 서열번호 134에 제시된 아미노산 서열 데이터를 보유하고 본 명세서 및 특허청구범위에 제시된 활성 프로필을 보유하는 단백질까지 확장된다. 따라서, 실질적으로 동등하거나 변경된 활성을 나타내는 단백질도 마찬가지로 고려한다. 이러한 변형은 예컨대 고의적인 것, 예를 들어 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 수득하는 변형일 수 있고, 또는 우연한 것, 예를 들어 복합체 또는 이의 명명된 서브유닛의 생산자인 숙주에서 돌연변이를 통해 수득하는 것일 수 있다. 또한, "175 항체" 및 "mAb175"란 용어는 본 명세서에 구체적으로 언급된 단백질뿐 아니라 실질적 상동성인 모든 유사체 및 대립유전자 변형을 포함하는 것으로 간주한다.

[0153] "124 항체" 및 "mAb124"란 용어 및 구체적으로 열거되지 않은 임의의 변형체는 호환해서 사용되기도 하며, 본 명세서와 특허청구범위에 사용된 것처럼 단일 또는 다중 단백질을 비롯한 단백질성 물질을 의미하며, 본 명세서에 기술되고 서열번호 22 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열 데이터를 보유하고 본 명세서 및 특허청구범위에 제시된 활성 프로필을 보유하는 단백질까지 확장된다. 따라서, 실질적으로 동등하거나 변경된 활성을 나타내는 단백질도 마찬가지로 고려한다. 이러한 변형은 예컨대 고의적인 것, 예를 들어 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 수득한 변형일 수 있고, 또는 우연한 것, 예를 들어 복합체 또는 이의 명명된 서브유닛의 생산자인 숙주에서 돌연변이를 통해 수득한 변형일 수 있다. 또한, "124 항체" 및 "mAb124"란 용어는 본 명세서에 구체적으로 언급된 단백질뿐 아니라 실질적 상동성인 모든 유사체 및 대립유전자 변형을 포함하는 것으로 간주한다.

[0154] "1133 항체" 및 "mAb1133"이란 용어 및 구체적으로 열거되지 않은 임의의 변형체는 호환해서 사용되기도 하며,

본 명세서와 특허청구범위에 사용된 것처럼 단일 또는 다중 단백질을 비롯한 단백질성 물질을 의미하며, 본 명세서에 기술되고 서열번호 32 및 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열 데이터를 보유하고 본 명세서 및 특허청구범위에 제시된 활성 프로필을 보유하는 단백질까지 확장된다. 따라서, 실질적으로 동등하거나 변경된 활성을 나타내는 단백질도 마찬가지로 고려한다. 이러한 변형은 예컨대 고의적인 것, 예를 들어 부위 지시된 돌연변이 유발을 통해 수득한 변형일 수 있고, 또는 우연한 것, 예를 들어 복합체 또는 이의 명명된 서브유닛의 생산자인 숙주에서 돌연변이를 통해 수득한 변형일 수 있다. 또한, "1133 항체" 및 "mAb1133"이란 용어는 본 명세서에 구체적으로 언급된 단백질뿐 아니라 실질적 상동성인 모든 유사체 및 대립유전자 변형을 포함하는 것으로 간주한다.

[0155] 본 명세서에 기술된 아미노산 잔기는 "L" 이성체형인 것이 바람직하다. 하지만, "D" 이성체형의 잔기가 임의의 L-아미노산 잔기를 대체할 수 있는데, 단 면역글로불린-결합의 원하는 기능적 성질이 그 폴리펩타이드에 의해 유지되어야 한다. NH₂는 폴리펩타이드의 아미노산 말단에 존재하는 유리 아미노 그룹을 의미한다. COOH는 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 존재하는 유리 카르복시 그룹을 의미한다. 표준 폴리펩타이드 명명법(J.Biol.Chem., 243: 3552-59(1969))에 따라 아미노산 잔기의 약어는 다음 대응표에 제시했다:

대응표

<u>1문자</u>	<u>기호</u>	<u>3문자</u>	<u>아미노산</u>
Y		Tyr	티로신
G		Gly	글리신
F		Phe	페닐알라닌
M		Met	메티오닌
A		Ala	알라닌
S		Ser	세린
I		Ile	이소류신
L		Leu	류신
T		Thr	트레오닌
V		Val	발린
P		Pro	프롤린
K		Lys	리신
H		His	히스티딘
Q		Gln	글루타민
E		Glu	글루탐산
W		Trp	트립토판
R		Arg	아르기닌
D		Asp	아스파르트산
N		Asn	아스파라긴
C		Cys	시스테인

[0156]

[0157] 모든 아미노산 잔기 서열은 왼쪽과 오른쪽 배향이 통상적인 방향인 아미노산 말단에서 카르복시 말단으로 존재하는 식으로 본 명세서에 제시되어 있음을 유의해야 한다. 또한, 아미노산 잔기 서열의 시작 또는 말단에 있는 대시는 하나 이상의 아미노산 잔기의 추가 서열에 대한 펩타이드 결합을 나타낸다는 것을 유의해야 한다. 상기 표는 본 명세서에 대안적으로 나타날 수 있는 3문자 및 1문자 표시법을 상관 지어 제시했다.

[0158] "레플리콘(replicon)"은 생체내 DNA 복제의 자율적 단위로서 기능하는, 즉 자신의 조절 하에 복제할 수 있는 임의의 유전 인자(예: 플라스미드, 염색체, 바이러스)이다.

[0159] "벡터"는 다른 DNA 분절이 부착되어 분절의 복제를 유발할 수 있는, 플라스미드, 파지 또는 코스미드와 같은 레플리콘이다.

[0160] "DNA 분자"는 일본쇄 형태 또는 이본쇄 나선형인 데옥시리보뉴클레오타이드(아데닌, 구아닌, 티민 또는 사이토신)의 중합체 형태를 의미한다. 이 용어는 분자의 1차 및 2차 구조만을 의미하며, 임의의 특정 3차 형태에 제한되지 않는다. 따라서, 이 용어는 특히 선형 DNA 분자(예: 제한 단편), 바이러스, 플라스미드 및 염색체에서 발견되는 이본쇄 DNA를 포함한다. 특정 이본쇄 DNA 분자의 구조를 논하는데 있어서, 서열은 DNA의 비전사 쉘(즉, mRNA에 상동성인 서열을 보유한 쉘)을 따라 5'에서 3' 방향의 서열만을 제공하는 통례에 따라 본 명세서에 기술될 수 있다.

[0161] "복제 오리진"은 DNA 합성에 참여하는 DNA 서열을 의미한다.

- [0162] DNA "암호화 서열"은 적당한 조절 서열의 조절 하에 배치되었을 때 생체내에서 폴리펩타이드로 전사 및 해독되는 이본쇄 DNA 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5' 말단(아미노 말단)의 개시 코돈과 3'(카르복시) 말단의 해독 종결 코돈에 의해 결정된다. 암호화 서열은 원핵생물 서열, 진핵생물 mRNA 유래의 cDNA, 진핵생물(예: 포유동물) DNA 유래의 게놈 DNA 서열 및 심지어 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 폴리아데닐화 시그널 및 전사 종결 서열은 일반적으로 암호화 서열에 대해 3'에 위치할 것이다.
- [0163] 전사 및 해독 조절 서열은 DNA 조절 서열로, 예컨대 숙주 세포에서 암호화 서열의 발현을 위해 마련한 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 시그널, 종결인자 등이다.
- [0164] "프로모터 서열"은 세포에서 RNA 폴리머라제에 결합할 수 있고 하류(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 본 발명을 정의하기 위해, 프로모터 서열은 그 3' 말단이 전사 개시 부위에 접하고 있고 배경 이상으로 검출할 수 있는 수준으로 전사를 개시하는데 필요한 최소 수의 염기 또는 인자를 포함하기 위해 상류(5' 방향)로 연장된다. 프로모터 서열 내에서는 전사 개시 부위(뉴클레아제 S1로 매핑하여 간편하게 한정됨) 뿐만 아니라 RNA 폴리머라제의 결합에 책임이 있는 단백질 결합 도메인(컨센서스 서열)을 찾을 수 있다. 진핵생물의 프로모터는 종종 "TATA" 박스 및 "CAT" 박스를 포함하지만, 반드시 포함하는 것은 아니다. 원핵생물 프로모터는 -10 및 -35 컨센서스 서열 외에 샤인 달가노 서열을 포함한다.
- [0165] "발현 조절 서열"은 다른 DNA 서열의 전사 및 해독을 조절하는 DNA 서열이다. 암호화 서열은 RNA 폴리머라제가 암호화 서열을 mRNA로 전사하고, 이어서 암호화 서열에 의해 암호화된 단백질로 해독할 때 세포 내에서 전사 및 해독 조절 서열의 "조절 하에" 있다.
- [0166] "시그널 서열"은 암호화 서열 앞에 포함될 수 있다. 이 서열은 폴리펩타이드의 N-말단에 시그널 펩타이드를 암호화하고, 이는 숙주 세포와 소통하여 폴리펩타이드를 세포 표면으로 유도하거나 폴리펩타이드를 배지로 분비하고, 이 시그널 펩타이드는 단백질이 세포를 떠나기 전에 숙주 세포에 의해 절단된다. 시그널 서열은 원핵생물 및 진핵생물에 고유한 다양한 단백질과 결합되어 있는 것을 찾아볼 수 있다.
- [0167] 본 발명의 프로브를 언급하는 경우에 본 명세서에 사용된 "올리고뉴클레오타이드"란 용어는 2개 이상의 리보뉴클레오타이드로 구성된 분자, 바람직하게는 3개보다 많은 리보뉴클레오타이드로 구성된 분자로서 정의된다. 이의 정확한 크기는 결과적으로 올리고뉴클레오타이드의 최종 기능 및 용도에 따라 달라지는 많은 요인들에 따라 좌우될 것이다.
- [0168] 본 명세서에 사용된 "프라이머"란 용어는 핵산 쇠에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉 DNA 폴리머라제와 같은 유도제 및 뉴클레오타이드의 존재 하에 적당한 온도와 pH에서 배치되었을 때, 합성 개시점으로서 작용할 수 있는, 정제된 제한 분해물에서처럼 자연 발생물이든지 또는 합성 생산된 것인지에 상관없는, 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머는 이본쇄 또는 이본쇄일 수 있고 유도제의 존재 하에 원하는 연장 산물의 합성을 개시하기에 충분히 길어야 한다. 프라이머의 정확한 길이는 많은 요인들, 예컨대 온도, 프라이머의 근원 및 방법의 사용에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 진단 용도의 경우, 표적 서열의 복잡성에 따라, 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 일반적으로 15 내지 25개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함하지만, 더 적은 수의 뉴클레오타이드를 포함할 수도 있다.
- [0169] 본원에서 프라이머는 특정 표적 DNA 서열의 다른 쇠에 "실질적으로" 상보적인 것으로 선택한다. 이것은 프라이머가 각각의 쇠와 하이브리드화하기에 충분히 상보적이어야 한다는 것을 의미한다. 따라서, 프라이머 서열은 주형의 정확한 서열을 반영할 필요는 없다. 예를 들어, 비상보적 뉴클레오타이드 단편은 프라이머 서열의 나머지가 쇠에 상보적인 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있다. 대안적으로, 프라이머 서열이 하이브리드화할 쇠의 서열과 충분히 상보적이어서 연장 산물의 합성에 주형을 형성하기만 한다면, 프라이머에는 비상보성 염기 또는 더 긴 서열이 산재할 수 있다.
- [0170] 본 명세서에 사용된 "제한 엔도뉴클레아제" 및 "제한효소"란 용어는 각각 특정 뉴클레오타이드 서열이나 그 부근에서 이본쇄 DNA를 절단하는 세균 효소를 의미한다.
- [0171] 세포는 외인성 또는 이종 DNA가 세포 내로 도입되었을 때 이 DNA에 의해 "형질전환된" 것이다. 형질전환 DNA는 세포의 게놈을 구성하는 염색체 DNA에 통합(공유 결합)되거나 통합되지 않을 수 있다. 예컨대, 원핵생물, 효모 및 포유동물 세포에서, 형질전환 DNA는 플라스미드와 같은 에피솜 인자에서 유지될 수 있다. 진핵생물 세포와 관련하여, 안정하게 형질전환된 세포는 형질전환 DNA가 염색체 복제를 통해 딸 세포로 유전될 정도로 염색체에 통합된 것이다. 이러한 안정성은 진핵생물 세포가 형질전환 DNA를 함유하는 딸세포 집단으로 구성된 세포주 또는 클론을 확립시키는 능력으로 입증한다. "클론"은 단세포 또는 공통 조상으로부터 유사분열에 의해 유래되는

세포 집단이다. "세포주"는 많은 세대동안 시험관내에서 안정한 성장을 할 수 있는 원발성 세포 클론이다.

[0172] 2개의 DNA 서열은 적어도 약 75%(바람직하게는 적어도 약 80%, 가장 바람직하게는 적어도 약 90 또는 95%)의 뉴클레오타이드가 한정된 길이의 DNA 서열 상에서 부합할 때 "실질적으로 상동성"이다. 실질적으로 상동성인 서열은 서열 데이터뱅크에서 입수할 수 있는 표준 소프트웨어를 사용하여 서열을 비교하거나, 또는 특정 시스템마다 한정된 바와 같은 엄중 조건 등에서 서던 하이브리드화 실험을 통해 확인할 수 있다. 적당한 하이브리드화 조건의 한정은 당업자의 기술 범위내에 있다[예컨대, Maniatis et al., 상기 참조; DNA Cloning, Vol. I & II, 상기 문헌 참조; Nucleic Acid Hybridization, 상기 문헌 참조].

[0173] 또한, 개시된 서열을 가진 항체를 암호화하되, 이러한 서열에 축퇴성인 본 발명의 특이적 결합 구성원(항체)을 암호화하는 DNA 서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. "축퇴성"이란 특정 아미노산을 특정하기 위해 다른 3문자 코돈이 사용되는 것을 의미한다. 각각 특정 아미노산을 암호화하기 위해 다음과 같은 코돈이 호환해서 사용될 수 있다는 것은 당업계에 공지되어 있다:

페닐알라닌 (Phe 또는 F)	UUU 또는 UUC
류신 (Leu 또는 L)	UUA 또는 UUG 또는 CUU 또는 CUC 또는 CUA 또는 CUG
이소류신 (Ile 또는 I)	AUU 또는 AUC 또는 AUA
메티오닌 (Met 또는 M)	AUG
발린 (Val 또는 V)	GUU 또는 GUC 또는 GUA 또는 GUG
세린 (Ser 또는 S)	UCU 또는 UCC 또는 UCA 또는 UCG 또는 AGU 또는 AGC
프롤린 (Pro 또는 P)	CCU 또는 CCC 또는 CCA 또는 CCG
트레오닌 (Thr 또는 T)	ACU 또는 ACC 또는 ACA 또는 ACG
알라닌 (Ala 또는 A)	GCU 또는 GCG 또는 GCA 또는 GCG
티로신 (Tyr 또는 Y)	UAU 또는 UAC
히스티딘 (His 또는 H)	CAU 또는 CAC
글루타민 (Gln 또는 Q)	CAA 또는 CAG
아스파라긴 (Asn 또는 N)	AAU 또는 AAC
리신 (Lys 또는 K)	AAA 또는 AAG
아스파르트산 (Asp 또는 D)	GAU 또는 GAC
글루탐산 (Glu 또는 E)	GAA 또는 GAG
시스테인 (Cys 또는 C)	UGU 또는 UGC
아르기닌 (Arg 또는 R)	CGU 또는 CGC 또는 CGA 또는 CGG 또는 AGA 또는 AGG
글리신 (Gly 또는 G)	GGU 또는 GGC 또는 GGA 또는 GGG
트립토판 (Trp 또는 W)	UGG
종결 코돈	UAA (오퍼) 또는 UAG (앰버) 또는 UGA (오팔)

[0174]

[0175] 상기 특정된 코돈은 RNA 서열에 대한 것으로 이해되어야 한다. DNA의 대응 코돈은 U 대신 T로 치환된 것이다.

[0176]

돌연변이는 예컨대 특정 코돈이 다른 아미노산을 암호화하는 코돈으로 변화되도록 개시된 본 발명의 항체 서열에 이루어질 수 있다. 이러한 돌연변이는 일반적으로 가능한 가장 적은 수의 뉴클레오타이드 변화에 의해 이루어진다. 이러한 종류의 치환 돌연변이는 최종 단백질에서 아미노산을 비보존적 방식(즉, 특정 크기 또는 특징이 있는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 다른 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시켜) 또는 보존적 방식(즉, 특정 크기 또는 특징을 가진 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 동일한 그룹에 속하는 아미노산으로 변화시켜)으로 변화시키기 위해 이루어질 수 있다. 이러한 보존적 변화는 일반적으로 최종 단백질의 구조 및 기능을 덜 변화시킨다. 비보존적 변화는 최종 단백질의 구조, 활성 또는 기능을 더욱 변경시킬 가능성이 있다. 본 발명은 최종 단백질의 활성 또는 결합 특성을 유의적으로 변경시키지 않는 보존적 변화를 함유하는

서열을 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0177] 다음은 다양한 아미노산 그룹의 한 예이다:

[0178] 비극성 R 그룹을 보유하는 아미노산

[0179] 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌

[0180] 비하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산

[0181] 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민

[0182] 하전된 극성 R 그룹을 보유하는 아미노산(pH 6.0에서 음하전을 띠)

[0183] 아스파르트산, 글루탐산

[0184] 염기성 아미노산(pH 6.0에서 양하전을 띠)

[0185] 리신, 아르기닌, 히스티딘(pH 6.0)

[0186] 또 다른 그룹은 페닐 그룹을 보유하는 아미노산일 수 있다:

[0187] 페닐알라닌, 트립토판, 티로신

[0188] 다른 그룹은 분자량(즉, R 그룹의 크기)에 따라 이루어질 수 있다:

글리신	75
알라닌	89
세린	105
프롤린	115
발린	117
트레오닌	119
시스테인	121
류신	131
이소류신	131
아스파라긴	132
아스파르트산	133
글루타민	146
리신	146
글루탐산	147
메티오닌	149
히스티딘 (pH 6.0에서)	155
페닐알라닌	165
아르기닌	174
티로신	181
트립토판	204

[0189]

[0190] 특히 바람직한 치환은 다음과 같다:

[0191] - 양하전이 유지될 수 있도록 Arg 대신 Lys 및 그 반대;

[0192] - 음하전이 유지될 수 있도록 Asp 대신 Glu 및 그 반대;

[0193] - 유리 -OH가 유지될 수 있도록 Thr 대신 Ser;

[0194] - 유리 NH₂가 유지될 수 있도록 Asn 대신 Gln.

[0195] 또한, 아미노산 치환은 특히 바람직한 성질을 가진 아미노산을 대신 사용하기 위해 도입될 수 있다. 예를 들어, Cys는 다른 Cys와 디설파이드 가교를 형성하기 위한 잠재 부위에 도입될 수 있다. His은 특히 "촉매적" 부위로

도입될 수 있다(즉, His은 산 또는 염기로서 작용할 수 있고 생화학적 촉매작용에서 가장 일반적인 아미노산이다). Pro은 이의 특별한 평면 구조로 인해 도입될 수 있고, 이는 단백질 구조에 3-턴을 유도한다.

[0196] 두 아미노산 서열은 아미노산 잔기의 적어도 약 70%(바람직하게는 적어도 약 80%, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 또는 95%)가 동일하거나, 또는 보존적 치환을 나타낼 때 "실질적으로 상동성"이다.

[0197] DNA 작제물의 "이중성" 영역은 본래 큰 분자와 결합된 상태로 발견되지 않는 큰 DNA 분자 내의 식별가능한 DNA 분절이다. 따라서, 이중성 영역이 포유동물 유전자를 암호화할 때, 이 유전자는 보통 유기체 근원의 게놈 내에서 포유동물 게놈 DNA에 인접해 있지 않은 DNA가 인접해 있을 것이다. 이중성 암호화 서열의 다른 예는 암호화 서열 자체가 자연에서 발견되지 않는 작제물이다(예컨대, 게놈 암호화 서열이 인트론을 함유하는 cDNA 또는 천연 유전자와 다른 코돈을 보유하는 합성 서열). 대립유전자 변형 또는 자연발생의 돌연변이 사건은 본 명세서에 정의된 바와 같은 DNA의 이중 영역을 생성시키지 않는다.

[0198] "약제학적으로 허용되는"이란 어구는 생리학적으로 허용되고 사람에게 투여했을 때 위 상해, 현기증 등과 같은 알레르기성 또는 유사한 부적당한 반응을 일반적으로 일으키지 않는 분자 실재물 및 조성물을 의미한다.

[0199] 본 명세서에 사용된 "치료학적 유효량"이란 어구는 표적 세포 덩어리, 암세포 또는 종양의 그룹의 성장 또는 진행 또는 유사분열 활성 또는 다른 병리 상태의 특징의 임상적으로 유의적인 변화를 차단하고, 바람직하게는 적어도 약 30%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90% 감소시키기에 충분한 양을 의미하기 위해 본 명세서에 사용한다. 예를 들어, EGFR 활성화 또는 EGFR 양성 세포의 활성이나 양이나 수의 정도, 특히 항체 또는 결합 구성원 반응성 또는 양성 세포의 정도는 감소될 수 있다.

[0200] DNA 서열은 발현 조절 서열이 이 DNA 서열의 전사 및 해독을 제어 및 조절한다면 발현 조절 서열에 "작동적으로 결합"된 것이다. "작동적으로 결합된"이란 용어는 발현될 DNA 서열 앞에 적당한 개시 시그널(예: ATG)을 보유하고, 정확한 판독 프레임을 유지하여 DNA 서열이 발현 조절 서열의 조절 하에서 발현되어 이 DNA 서열에 의해 암호화된 목적 산물이 생산될 수 있는 것을 포함한다. 재조합 DNA 분자에 삽입시키고자 하는 유전자가 적당한 개시 시그널을 함유하지 않는 경우에, 이러한 유전자 앞에 개시 시그널을 삽입할 수도 있다.

[0201] "표준 하이브리드화 조건"이란 용어는 하이브리드화 및 세척 시 5 x SSC 및 65℃와 실질적으로 동일한 염 및 온도 조건을 의미한다. 하지만, 당업자는 이러한 "표준 하이브리드화 조건"이 완충액 중의 나트륨 및 마그네슘 농도, 뉴클레오타이드 서열 길이 및 농도, 부정합 비율, 포름아미드 비율 등을 비롯한 특정 조건에 따라 달라진다는 것을 잘 알고 있을 것이다. 또한, "표준 하이브리드화 조건"의 측정에는 하이브리드화하는 두 서열이 RNA-RNA, DNA-DNA 또는 RNA-DNA인지가 중요하다. 이러한 표준 하이브리드화 조건은 공지된 공식에 따라 당업자라면 쉽게 결정할 수 있는데, 하이브리드화는 보통 예상되거나 측정된 Tm보다 10 내지 20℃ 낮은 온도에서 필요한 경우 더 엄중한 세척 조건으로 실시한다.

[0202] 본 발명은 에피토프가 이상 해독후 변형 후 증강되거나 분명한 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 발견되고 정상 또는 야생형 세포에서 검출할 수 없는 EGFR 에피토프를 인식하는, 신규 특이적 결합 구성원, 특히 항체 또는 이의 단편, 예컨대 면역원성 단편을 제공한다. 특별한, 하지만 비제한적인 양태에서, 결합 구성원, 예컨대 항체는 단순한 탄수화물 변형 또는 조기 글리코실화 후 증강되거나 분명하고 복잡한 탄수화물 변형 또는 글리코실화의 존재 하에 감소되거나 분명하지 않은 EGFR 에피토프를 인식한다. 특이적 결합 구성원, 예컨대 항체 또는 이의 단편은 과발현의 부재 및 정상 EGFR 해독후 변형의 존재 하에 정상 또는 야생형 EGFR 에피토프를 함유하는 정상 세포 또는 야생형 세포에 결합하거나 인식하지 못한다.

[0203] 또한, 본 발명은 에피토프가 증강, 발현 또는 분명한 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 노출되고, 정상 또는 야생형 세포에서는 검출할 수 없는 EGFR 에피토프, 특히 EGFR 펩타이드(₂₈₇CGADSYMEEDGVRKC₃₀₂ (서열번호 14))를 인식하는 신규 항체 806, 175, 124, 1133, ch806 및 hu806 및 이의 단편, 예컨대 면역원성 단편을 제공한다. 특별하지만, 비제한적인 양태에서, 항체는 단순한 탄수화물 변형 또는 조기 글리코실화 후 증강되거나 분명하고 복잡한 탄수화물 변형 또는 글리코실화의 존재 시에는 감소되거나 분명하지 않은 EGFR 에피토프를 인식한다. 이러한 항체 또는 이의 단편은 과발현, 증폭 또는 종양발생성 사건의 부재 하에 정상 또는 야생형 EGFR 에피토프를 함유하는 정상 세포 또는 야생형 세포에 결합하거나 인식하지 못한다.

[0204] 본 발명의 특정 관점에 따르면, 그리고 진술한 바와 같이, 본 발명자들은 증폭된 야생형 EGFR 및 de2-7 EGFR을 특이적으로 인식하지만, de2-7 EGFR 돌연변이의 독특한 연결 펩타이드와 상이한 에피토프에 결합하는, 신규 모노클로날 항체 806, 175, 124, 1133, ch806 및 hu806을 발견했다. 또한, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및

hu806은 신경아교종 세포의 세포 표면에서 발현된 정상 야생형 EGFR을 인식하지 못하지만, ELISA 플레이트의 표면에 고정된 EGFR의 세포외 도메인에는 결합하여, 폴리펩타이드 면을 지닌 입체형태적 에피토프를 시사한다.

[0205] 중요한 것은, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, ch806 및 hu806은 대부분의 다른 정상 조직에서보다 높은 수준의 내인성 wtEGFR을 발현하지만, EGFR이 과발현되거나 증폭된 것은 아닌 간 및 피부와 같은 정상 조직에는 유의적으로 결합하지 않는다는 점이다. 따라서, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806은 de2-7 EGFR 및 증폭된 EGFR을 인식하지만 정상인 야생형 EGFR 또는 de2-7 EGFR의 특징인 독특한 연결 펩타이드를 인식하지 못하는 신규하고 유용한 특이성을 증명한다. 바람직한 관점에서, 본 발명의 mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806은 도 14B 및 15B; 74B 및 75B; 51B 및 51D; 52B 및 52D; 및 55A 및 55B에 각각 도시된 VH 및 VL 채 CDR 도메인 아미노산 서열(각각 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47; 서열번호 42는 서열번호 163 및 164의 hu806 VH 채 시그널 펩타이드 및 VH 채 서열을 각각 포함하고, 서열번호 47은 서열번호 165 및 166의 hu806 VL 채 시그널 펩타이드 및 VL 채 서열을 각각 포함함)을 포함한다.

[0206] 다른 관점에서, 본 발명은 175 항체의 VH 및 VL 채 서열(각각 서열번호 129 및 134)을 보유하는 항체의 적어도 10%가 ELISA 분석에서 상기 항체와 경쟁에 의해 de2-7 EGFR에 대한 결합이 차단되는 조건 하에, 175 항체와 경쟁할 수 있는 항체를 제공한다. 전술한 바와 같이, 항-유전자형 항체도 고려한다.

[0207] 본 발명은 증폭된 EGFR을 발현하거나 de2-7 EGFR을 발현하는 세포에 존재하고 정상 또는 야생형 EGFR을 발현하는 세포에서는 검출할 수 없으며, 특히 정상 해독후 변형의 존재 시에는 검출할 수 없는 EGFR 에피토프를 인식하는 특이적 결합 구성원, 특히 항체 또는 이의 단편에 관한 것이다.

[0208] 또한, 본 발명의 추가 비제한적 관찰 또는 특징으로서, 조기 글리코실화 또는 단순한 탄수화물 변형의 특징인 고 만노스 그룹의 존재 하에서의 에피토프 인식을 주목하고 본원에서 입증했다. 따라서, 변경된 또는 이상 글리코실화는 항체 에피토프의 존재 및/또는 인식을 도모하고 항체 에피토프의 일부를 포함한다.

[0209] 글리코실화는 당단백질이라 불리는 단백질에 올리고사카라이드 첨가에 의한 해독후 변형을 포함한다. 올리고사카라이드는 당단백질의 글리코실화 부위에 첨가되며, 예컨대 N-결합된 올리고사카라이드 및 O-결합된 올리고사카라이드가 있다. N-결합된 올리고사카라이드는 Asn 잔기에 첨가되고, 이 Asn 잔기는 특히 N-X-S/T 서열(여기서 X는 Pro 또는 Asp일 수 없다)에 존재하는 것이며, 이것은 당단백질에서 발견되는 가장 일반적인 것이다. N-결합된 당단백질의 생합성에서, 고 만노스 형 올리고사카라이드(일반적으로, 돌리콜, N-아세틸글루코사민, 만노스 및 글루코스로 구성됨)는 소포체(ER)에 가장 먼저 형성된다. 그 다음, 고 만노스 형 당단백질은 ER로부터 골지체로 수송되고, 여기서 올리고사카라이드의 추가 가공 및 변형이 일어난다. O-결합된 올리고사카라이드는 Ser 또는 Thr 잔기의 하이드록실 그룹에 첨가된다. O-결합된 올리고사카라이드에서, N-아세틸글루코사민은 먼저 ER에서 N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제에 의해 Ser 또는 Thr 잔기로 전달된다. 그 다음, 단백질은 추가 변형과 사슬 연장이 일어나는 골지체로 이동한다.

[0210] 본 발명의 특정 관점에 따르면, 그리고 전술한 바와 같이, 본 발명자들은 증폭된 야생형 EGFR 및 de2-7 EGFR을 특이적으로 인식하지만, de2-7 EGFR 돌연변이의 독특한 연결 펩타이드와 상이한 에피토프에 결합하는, 신규 모노클로날 항체, 예컨대 여기서 mAb806(및 이의 키메라형 ch806), mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806으로 지칭되는 항체를 발견했다. 본 발명의 항체는 과발현된 EGFR, 예컨대 증폭된 EGFR 및 돌연변이 EGFR(본원에 예시된 de2-7 돌연변이), 특히 이상 해독후 변형 후의 EGFR을 특이적으로 인식한다. 또한, 이러한 항체들은 신경아교종 세포의 세포 표면에서 발현된 정상 야생형 EGFR을 인식하지 못하지만, ELISA 플레이트의 표면에 고정된 EGFR의 세포외 도메인에는 결합하여, 폴리펩타이드 면을 지닌 입체형태적 에피토프를 시사한다. 중요한 것은, 이 항체들이 대부분의 다른 정상 조직에서보다 높은 수준의 내인성 wtEGFR을 발현하지만, EGFR이 과발현되거나 증폭된 것은 아닌 간 및 피부와 같은 정상 조직에는 유의적으로 결합하지 않는다는 점이다. 따라서, 이 항체들은 de2-7 EGFR 및 증폭된 EGFR을 인식하지만 정상인 야생형 EGFR 또는 de2-7 EGFR의 특징인 독특한 연결 펩타이드를 인식하지 못하는 신규하고 유용한 특이성을 증명한다.

[0211] 바람직한 관점에서, 상기 항체들은 본 발명자들이 확인 및 특성화한 항체, 특히 증폭된 EGFR 및 de2-7 EGFR을 인식하는 항체의 특징을 가진 항체이다. 특히 바람직한 관점에서, 항체는 mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806 또는 이의 활성 단편이다. 또 다른 바람직한 관점에서, 본 발명의 항체는 도 16 및 17; 74B 및 75B; 51B 및 51D; 52B 및 52D; 및 55A 및 55B에 각각 도시된 VH 및 VL 채 아미노산 서열을 포함한다.

[0212] 바람직하게는, 특이적 결합 구성원 또는 항체의 에피토프는 성숙한 정상 또는 야생형 EGFR 서열의 잔기 273-501을 함유하는 영역 내에 위치하고, 바람직하게는 에피토프는 성숙한 정상 또는 야생형 EGFR 서열의 잔기 287-

302(서열번호 14)를 함유한다. 따라서, EGFR 서열의 잔기 273-501을 함유하는 영역 내에 위치한 에피토프에서 de2-7 EGFR에 결합하고 EGFR 서열의 잔기 287-302(서열번호 14)를 함유하는 항체와 같은 특이적 결합 단백질도 제공한다. 이 에피토프는 당업자에게 공지된 종래 임의의 에피토프 매핑 기술에 의해 결정될 수 있다. 대안적으로, 잔기 273-501 및 287-302(서열번호 14)를 암호화하는 DNA 서열을 분해할 수 있고, 수득되는 단편을 적당한 숙주에서 발현시킬 수 있다. 항체 결합은 앞에서 언급한 바와 같이 측정할 수 있다.

[0213] 구체적으로, 구성원은 성숙한 정상 또는 야생형 EGFR의 잔기 273-501, 및 더욱 구체적으로 잔기 287-302(서열번호 14)를 함유하는 에피토프에 결합할 것이다. 하지만, 동일하거나 실질적으로 유사한 반응성 패턴을 나타내는 다른 항체도 본 발명의 관점을 형성한다. 이것은 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47에 제시한 VH 및 VL 쇠 도메인을 각각 함유하는 항체와 상기 구성원들을 비교하여 측정할 수 있다. 이러한 비교는 일반적으로 결합 패턴을 직접 비교할 수 있도록 세포의 핵 제조물로부터 만든 2반복 블롯에 결합 구성원을 결합시킨 웨스턴 블롯을 이용하여 수행될 것이다.

[0214] 다른 관점에서, 본 발명은 항체들 중 하나의 VH 및 VL 쇠 서열을 보유하는 항체의 적어도 10%가 ELISA 분석에서 상기 항체와 경쟁에 의해 de2-7EGFR에 대한 결합이 차단되는 조건 하에 mAb806과 경쟁할 수 있는 항체를 제공한다. 앞서 언급한 바와 같이, 항-유전자형 항체도 고려되며, 본원에 예시한다.

[0215] 다른 관점에서, 본 발명은 항체들 중 하나의 VH 및 VL 쇠 서열을 보유하는 항체의 적어도 10%가 ELISA 분석에서 상기 항체와 경쟁에 의해 de2-7EGFR에 대한 결합이 차단되는 조건 하에 mAb175, mAb124 및/또는 mAb1133과 경쟁할 수 있는 항체를 제공한다. 앞서 언급한 바와 같이, 항-유전자형 항체도 고려되며, 본원에 예시한다.

[0216] 다른 관점에서, 본 발명은 항체들 중 하나의 VH 및 VL 쇠 서열을 보유하는 항체의 적어도 10%가 ELISA 분석에서 상기 항체와 경쟁에 의해 de2-7EGFR에 대한 결합이 차단되는 조건 하에 mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및/또는 hu806과 경쟁할 수 있는 항체를 제공한다. 앞서 언급한 바와 같이, 항-유전자형 항체도 고려되며, 본원에 예시한다.

[0217] 성숙한 야생형 EGFR의 잔기 273-501 및 더 구체적으로 잔기 287-302(서열번호 14)를 함유하는 에피토프로 본질적으로 이루어진 분리된 폴리펩타이드는 본 발명의 다른 관점을 형성한다. 본 발명의 펩타이드는 특히 진단 분석 또는 키트에 유용하며, 치료요법적 또는 예방요법적으로, 예컨대 항종양 또는 항암 백신으로서 유용하다. 따라서, 본 발명의 펩타이드 조성물은 약제학적 조성물 및 면역원성 조성물을 포함한다.

[0218] 진단 및 치료 용도

[0219] 종양발생성, 과증식성 또는 비정상 세포에서 발견되고 정상 또는 야생형 세포에서 검출할 수 없으며, 이상 해독 후 변형 시에 증강되거나 분명한 EGFR 에피토프를 인식하고, wtEGFR이 아닌 de2-7 EGFR 및 증폭된 EGFR에 결합하는 특이적 결합 멤버(들), 특히 항체 또는 이의 단편의 독특한 특이성은 수많은 종양발생성 세포 종류 및 종양 종류, 예컨대 두경부, 유방, 폐, 방광 또는 전립선 종양 및 신경아교종을, 종래 공지된 EGFR 항체에서 볼 수 있는 정상 조직 흡수와 연관된 문제점 없이, 확인, 특성화, 표적화 및 치료, 감소 또는 제거하는 진단 및 치료 용도를 제공한다. 따라서, EGFR을 과발현하는 세포(예컨대, 증폭이나, 돌연변이 또는 변형 EGFR의 발현에 의해), 특히 이상 해독 후 변형을 나타내는 항체는 본 발명의 결합 구성원(들), 특히 항체(들) 또는 이의 단편들을 이용해서 인식, 분리, 특성화, 표적화 및 치료 또는 제거할 수 있다.

[0220] 본 발명의 추가 관점에 따르면, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및/또는 hu806을 투여하는 것을 포함하여, 종양, 암성 상태, 전암성 상태 및 과증식 세포 성장과 관련되거나 이로부터 산출되는 모든 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0221] 따라서, 본 발명의 항체는 EGFR 과발현, 특히 증폭 및/또는 EGFR 돌연변이, 특히 de2-7EGFR이 존재하는 종양 또는 세포를 염색하거나 다른 방식으로 인식하여 EGFR 종양 또는 종양발생성 세포의 성질을 특이적으로 분류할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체, 예컨대 mAb806(및 키메라 항체 ch806), mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806은 증폭된 EGFR을 함유하는 종양 및 de2-7 EGFR 양성 이종이식편에 대하여 유의적인 생체내 항종양 활성을 증명한다.

[0222] 앞에서 개략한 바와 같이, 본 발명자들은 본 발명의 특이적 결합 구성원이 EGFR의 종양-연관 형태(de2-7EGFR 및 증폭된 EGFR)는 인식하지만, 정상 세포에서 발현될 때의 정상 야생형 수용체는 인식하지 못한다는 것을 발견했다. 항체 인식은 EGFR 유전자의 과발현을 나타내는 세포에서 발현된 EGFR의 이상 해독 후 변형(예컨대, 독특한 글리코실화, 아세틸화 또는 인산화 변형체)에 의존적인 것으로 생각된다.

[0223] 이하에 설명되는 바와 같이, 본 발명의 항체는 치료 연구에 사용되었고, 사람 종양의 과발현성(예컨대, 증폭된)

EGFR 이중이식편 및 사람 de2-7EGFR 발현성 이중이식편의 성장을 억제하며 이러한 종양 내에서 유의적인 괴사를 유도하는 것으로 밝혀졌다.

[0224] 더욱이, 본 발명의 항체는 예방 모델에서 두개내 종양의 성장을 억제한다. 이 모델은 누드 마우스에 de2-7 EGFR을 발현하는 신경아교종 세포를 주사한 뒤, 같은 날 또는 1 내지 3일 내에, 경우에 따라 반복 용량으로 항체를 두개내 주사하는 것을 수반한다. 항체의 용량은 약 10 μ g이 적당하다. 항체를 주사한 마우스를 대조군과 비교한 결과, 치료된 마우스의 생존율이 유의적으로 증가한 것을 발견했다.

[0225] 따라서, 본 발명의 추가 관점에 따르면 본 발명의 특이적 결합 구성원을 투여하는 것을 포함하여, 종양, 암성 상태, 전암성 상태 및 과증식성 세포 성장과 관련되거나 이로부터 산출되는 임의의 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

[0226] 본 발명의 항체는 사람 또는 동물 대상체의 종양, 특히 상피 종양을 진단 및 치료하는 방법에 사용하기 위해 설계된 것이다. 이러한 종양은 신경아교종, 유방, 폐, 전립선, 두경부 종양을 비롯한, 이에 국한되지 않는 임의의 종류의 원발성 또는 속발성 고형 종양일 수 있다.

[0227] 결합 구성원 및 항체 생성

[0228] 하이브리도마에 의해 모노클로날 항체를 제조하는 일반적인 방법론은 공지되어 있다. 또한, 무한증식성 항체 생산 세포주는 융합 외에 다른 기술, 예컨대 종양원성 DNA에 의한 B 림프구의 직접 형질전환, 또는 엡스타인-바르 바이러스에 의한 형질감염에 의해 생성할 수 있다[예컨대, M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques"(1980); Hammering et al., "Monoclonal Antibodies and T cell Hybridomas"(1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies"(1980); 또한, 미국 특허 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 및 4,493,890 참조].

[0229] EGFR에 대하여 생산된 모노클로날 항체 패널은 다양한 성질, 즉 이소형, 에피토프, 친화성 등에 대하여 선별할 수 있다. 특히 유익한 것은, EGFR의 활성을 모방하는 모노클로날 항체 또는 이의 서브유닛이다. 이러한 모노클로날 항체는 특이적 결합 구성원 활성 분석에서 쉽게 확인할 수 있다. 또한, 천연 또는 재조합 특이적 결합 구성원의 면역친화성 정제가 가능한 경우에는 고 친화성 항체도 유용하다.

[0230] 폴리클로날 항-EGFR 항체를 생산하는 방법도 당업계에 공지되어 있다[예컨대, 미국 특허 4,493,795, Nestor et al. 참조]. 일반적으로 유용한 항체 분자의 Fab 및/또는 F(ab')₂ 부분을 함유하는 모노클로날 항체는 본원에 참고인용된 서적[Antibodies-A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1988)]에 기술된 하이브리도마 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 간략히 설명하면, 모노클로날 항체 조성물이 생산되는 하이브리도마를 제조하기 위해, 적당한 EGFR로 과면역화된 포유동물의 비장으로부터 수득한 림프구와 골수종 또는 다른 자가-영속성 세포주를 융합시킨다.

[0231] 비장세포는 일반적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 6000을 이용해 골수종 세포와 융합시킨다. 융합된 하이브리드는 HAT에 대한 민감성으로 선택한다. 본 발명을 수행하는데 유용한 모노클로날 항체 생산성 하이브리도마는 본 발명의 항체 또는 결합 구성원과 면역반응하는 능력 및 표적 세포에서 특정 종양발생성 또는 과증식성 활성을 억제하는 능력에 따라 확인한다.

[0232] 본 발명을 수행하는데 유용한 모노클로날 항체는 적당한 항원 특이성의 항체 분자를 분비하는 하이브리도마를 함유하는 영양 배지를 포함한 모노클로날 하이브리도마 배양을 개시하여 생산할 수 있다. 이 배양은 하이브리도마가 항체 분자를 배지로 분비하기에 충분한 조건과 시간 기간 동안 유지한다. 그 후, 항체-함유 배지를 수집한다. 그 다음, 항체 분자는 공지된 기술로 추가 분리할 수 있다.

[0233] 이러한 조성물을 제조하는데 유용한 배지는 당업계에 공지되어 있고, 시중에서 입수할 수 있으며, 합성 배양 배지, 근교계 마우스 등을 포함한다. 합성 배지의 예는 4.5g/l 글루코스, 20mm 글루타민, 20% 소 태아 혈청이 보충된 돌베코 최소 필수 배지(DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8: 396(1959))이다. 근교계 마우스 계통의 예는 Balb/c이다.

[0234] 모노클로날 항-EGFR 항체를 생산하는 방법도 당업계에 공지되어 있다[Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953(1983)]. 일반적으로, EGFR 또는 이의 펩타이드 유사체는 전술한 항-EGFR 모노클로날 항체 생산 방법에서 면역원으로서 단독으로 사용되거나 면역원성 담체에 접합되어 사용된다. 하이브리도마는 종양발생성, 비정상 또는 과증식성 세포에 존재하는 EGFR과 면역반응하는 항체를 생산하는 능력을 통해 선별한다. 다른 항-EGFR 항체는 HuMAX-EGFr 항체(Genmab/Medarex 제품), 108 항체(ATCC HB9764) 및 미국 특허 6,217,866,

및 항체 14E1(Schering AG 제품, 미국 특허 5,942,602)을 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0235] 재조합 결합 구성원, 키메라, 이특이성 및 단편

[0236] 일반적으로, 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47의 CDR1 영역으로 각각 제시된 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 함유하는 CDR1 영역은 종양 항원에 대한 CDR1 영역의 결합을 허용하는 구조로 운반될 것이다. 예컨대, 서열번호 4의 CDR1 영역인 경우에, 이것은 서열번호 4의 VL 채 영역에 의해 운반되는 것이 바람직하다(다른 언급된 서열들도 이와 마찬가지로이다).

[0237] 일반적으로, 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47의 CDR2 영역으로서 각각 제시된 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 함유하는 CDR2 영역은 CDR2 영역이 종양 항원에 결합하도록 하는 구조로 운반될 것이다. 서열번호 4의 CDR2 영역인 경우에, 예컨대 이것은 서열번호 4의 VL 채영역에 의해 운반되는 것이 바람직하다(다른 언급된 서열들도 이와 마찬가지로이다).

[0238] 일반적으로, 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47의 CDR3 영역으로서 각각 제시된 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열을 함유하는 CDR3 영역은 CDR3 영역이 종양 항원에 결합하도록 하는 구조로 운반될 것이다. 서열번호 4의 CDR3 영역인 경우에, 예컨대 이것은 서열번호 4의 VL 채영역에 의해 운반되는 것이 바람직하다(다른 언급된 서열들도 이와 마찬가지로이다).

[0239] "제시된 서열과 실질적으로"란, 본 발명의 CDR 영역, 예컨대 CDR3 영역이 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47의 특정 영역과 각각 동일하거나 또는 매우 상동성일 것이라는 것을 의미한다. "매우 상동성인"이란, 하나 이상의 CDR에 몇몇 치환만이, 바람직하게는 1 내지 8개, 바람직하게는 1 내지 5개, 바람직하게는 1 내지 4개, 또는 1 내지 3개 또는 1 내지 2개의 치환만이 이루어질 수 있는 것으로 고려한다. 또한, 이러한 용어들은 CDR에 대한 절두형도 포함하는 것으로 고려하는데, 단 최종 항체는 mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806이 나타내는 바와 같은, 본원에서 논한 항체 클래스의 독특한 성질을 나타내야 한다.

[0240] 본 발명의 CDR, 특히 CDR3을 운반하는 구조는 일반적으로 CDR 영역이 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 자연 발생의 VH 및 VL 채 항체 가변 도메인의 CDR 영역에 대응하는 위치에 위치해 있는 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 이의 실질적인 부분로 이루어질 것이다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조와 위치는 문헌 [Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition. US Department of Health and Human Services, 1987, 및 현재 인터넷(<http://immuno.bme.nwu.edu>)에서 이용할 수 있는 업데이트]를 참조로 하여 측정할 수 있다. 또한, 당업자에게 공지된 바와 같이, CDR 결정은 다양한 방식으로 수행할 수 있다. 예컨대, 캐뻛(Kabat), 코티아(Chothia) 및 복합 도메인 결정 분석을 사용할 수 있다. 이와 관련하여 예컨대 <http://www.bioinf.org.uk/abs#cdrid>를 참조한다.

[0241] 본 발명의 항체에서 VH 채 CDR 잔기로서 제시한 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열은 사람 중쇄 가변 도메인 또는 이의 실질적으로 부분에 존재하고, 본 발명의 항체에서 VL 채 CDR 잔기로서 제시한 서열과 실질적으로 같은 아미노산 서열은 사람 경쇄 가변 도메인 또는 이의 실질적인 부분에 존재하는 것이 바람직하다.

[0242] 가변 도메인은 임의의 생식계열 또는 재배열된 사람 가변 도메인 유래이거나 또는 공지된 사람 가변 도메인의 컨센서스 서열을 기초로 한 합성 가변 도메인일 수 있다. 본 발명의 CDR3 유래의 서열, 예컨대 이전 문단에서 정의한 바와 같은 서열은 재조합 DNA 기술을 이용하여 CDR3 영역이 없는 가변 도메인의 레퍼토리 내로 도입될 수 있다.

[0243] 예를 들어, 막스 등(Marks et al, Bio/Technology, 1992, 10:779-783)은 가변 도메인 영역의 5' 말단에 지향성 이거나 인접한 컨센서스 프라이머를 사람 VH 유전자의 제3 골격 영역에 대한 컨센서스 프라이머와 함께 사용하여 CDR3이 없는 VH 가변 도메인의 레퍼토리를 제공하는, 항체 가변 도메인의 레퍼토리를 생산하는 방법을 기술한다. 막스 등은 또한 이 레퍼토리를 특정 항체의 CDR3과 조합할 수 있는 방식도 설명한다. 유사한 기술을 사용하여, 본 발명의 CDR3 유래의 서열을 CDR3이 없는 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리로 셔플링(shuffling)할 수 있고, 이와 같이 셔플링된 전체 VH 또는 VL 도메인은 동족 VL 또는 VH 도메인과 조합되어 본 발명의 특이적 결합 구성원을 제공한다. 그 다음, 이 레퍼토리는 적당한 특이적 결합 구성원을 선택할 수 있도록, W092/01047의 파지 디스플레이계와 같은 적당한 숙주계에서 디스플레이할 수 있다. 레퍼토리는 10^4 이상의 개별 구성원 중 어떤 구성원으로도 이루어질 수 있고, 예컨대 10^6 내지 10^8 또는 10^{10} 구성원으로 이루어질 수 있다.

[0244] 유사 셔플링 또는 조합 기술은 또한 스템머(Stemmer, Nature, 1994, 370: 389-391)에 의해서도 개시되었는데, 스템머는 p-락타마제 유전자에 관한 기술을 설명하지만, 이 접근법이 항체 생산에 사용될 수도 있다는 것을 깨

닫는다.

- [0245] 또 다른 대안은, 가변 도메인 전체에 돌연변이를 발생시키기 위해, 예컨대 mAb806 VH 또는 VL 유전자의 무작위 돌연변이유발을 이용하여 본 발명의 CDR3 유래의 서열을 운반하는 신규 VH 또는 VL 영역을 제조하는 것이다. 이러한 기술은 오류가 많은(error-prone) PCR을 이용하는 그램 등(Gram et al. 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576-3580)이 설명한다.
- [0246] 사용될 수 있는 다른 방법은 VH 또는 VL 유전자의 CDR 영역에 돌연변이유발을 유도하는 것이다. 이 기술은 문헌 [Barbas et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3809-3813] 및 [Schier et al., 1996, J.Mol.Biol. 263:551-567]에 개시되어 있다.
- [0247] 전술한 모든 기술들은 당업계에 그 자체가 공지되어 있고, 따라서 본 발명의 일부 구성이 아니다. 당업자는 이러한 기술을 사용하여 당업계의 통상적인 방법론에 따라 본 발명의 특이적 결합 구성원을 제공할 수 있을 것이다.
- [0248] 면역글로불린 가변 도메인의 실질적인 부분은 개재 골격 영역과 함께 적어도 3개의 CDR 영역을 포함할 것이다. 이 부분은 또한 제1 및 제4 골격 영역 중 어느 하나 또는 둘 모두의 적어도 50%를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 50%는 제1 골격 영역의 C-말단 50%와 제4 프레임워크 영역의 N-말단 50%이다. 가변 도메인의 실질적인 부분의 N-말단 또는 C-말단 끝에 있는 추가 잔기는 자연 발생의 가변 도메인 영역과는 일반적으로 결합되지 않은 것일 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 기술에 의해 제조한 본 발명의 특이적 결합 구성원의 작제는 클로닝 또는 다른 조작 단계를 용이하게 위해 도입시킨 링커에 의해 암호화된 N-말단 또는 C-말단 잔기의 도입을 초래할 수 있다. 다른 조작 단계는 이하에 더 상세히 논하는 바와 같이 면역글로불린 중쇄, 다른 가변 도메인(예컨대, 이중항체의 생산 시에), 또는 단백질 표지를 비롯한 추가 단백질 서열에 본 발명의 가변 도메인을 결합시키기 위한 링커의 도입을 포함한다.
- [0249] 본 발명의 바람직한 관점에 따르면, 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및 42 및 47에 각각 제시된 서열과 실질적으로 같은 서열을 기반으로 하는 결합 도메인의 쌍을 함유하는 특이적 결합 구성원이 바람직하지만, 이 서열들을 기반으로 하는 단일 결합 도메인도 본 발명의 추가 관점을 구성한다. VH 쇠에 실질적으로 제시된 서열을 기반으로 하는 결합 도메인인 경우에, 이러한 결합 도메인은 면역글로불린 VH 도메인이 특이적 방식으로 표적 항원에 결합할 수 있다는 것이 알려져 있기 때문에 종양 항원의 표적화 인자로서 사용될 수 있다.
- [0250] 어떤 한 단일 쇠 특이적 결합 도메인인 경우에, 이 도메인들은 본 명세서에 개시된 mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 및 hu806 항체와 동일하거나 또는 이 항체들만큼 양호한 생체내 성질을 보유하는 2-도메인 특이적 결합 구성원을 형성할 수 있는 상보성 도메인을 선별하는데 사용될 수 있다.
- [0251] 이것은 미국 특허 5,969,108에 개시된 바와 같은 소위 계층적 이중 조합 접근법을 이용하는 파지 디스플레이 선별 방법으로 달성할 수 있으며, 여기서 H 또는 L 쇠 클론을 함유하는 개별 콜로니는 다른 쇠(L 또는 H)를 암호화하는 클론의 전체 라이브러리를 감염시키는데 사용되고, 수득되는 2쇄 특이적 결합 구성원은 상기 문헌에 기술된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 따라 선택한다. 이 기술은 또한 막스 등(상기 동일 문헌)에도 개시되어 있다.
- [0252] 본 발명의 특이적 결합 구성원은 또한 항체 불변 영역 또는 이의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, VL 쇠 서열을 기반으로 하는 특이적 결합 구성원은 이의 C-말단 끝이 사람 C λ 쇠의 사람 C κ , 바람직하게는 C λ 쇠를 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인에 부착할 수 있다. 이와 유사하게, VH 쇠 서열을 기반으로 하는 특이적 결합 구성원은 그 C-말단 끝이 임의의 항체 이소형 유래의 면역글로불린 중쇄 전부 또는 일부, 예컨대 IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM, 및 임의의 이소형 서브클래스, 구체적으로 IgG1, IgG2b 및 IgG4에 부착할 수 있다. IgG1이 바람직하다.
- [0253] 25년 전, 모노클로날 항체(mAb) 기술의 출현은 유용한 연구 시약의 엄청난 레퍼토리를 제공했고, 암 치료법, 자가면역 장애, 이식 거부, 항바이러스 예방에서 승인된 약제 시약으로서, 그리고 혈전방지제로서 항체를 사용할 기회를 창출했다(Glennie and Johnson, 2000). 쥐의 mAb를 키메라 mAb(쥐의 V 영역, 사람 C-영역) 및 mAb 상보성 결정 영역(CDR)만이 쥐 기원인 사람화된 시약으로 전환시키는 분자 조작 기술의 적용은 mAb 요법의 임상적 성공에 중요한 것이었다. 조작된 mAb는 현저히 감소된 면역원성 또는 면역원성 부재, 증가된 혈청 반감기를 나타내고, mAb의 사람 Fc 부분은 세포독성 세포 및 보체의 면역 작용인자를 동원하는 잠재성을 증가시킨다(Clark 2000). 생체분포, 약동학 및 임상적으로 투여된 mAb에 대한 모든 면역 반응의 유도에 대한 조사는 약제 및 내인

성 단백질을 서로 구별할 분석의 개발을 필요로 한다.

- [0254] 또한, 항체 또는 이의 임의의 단편은 임의의 세포 독소, 세균 또는 다른 독소, 예컨대 슈도모나스 외독소, 리신 또는 디프테리아 독소와 접합하거나 재조합 융합될 수 있다. 사용된 독소의 일부는 전체 독소이거나, 또는 독소의 임의의 특정 도메인일 수 있다. 이러한 항체-독소 분자는 여러 종류의 암을 표적화하고 치료하는데 성공적으로 사용되었다(예컨대, Pastan, *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24; 1333 (2):C1-6; Kreitman et al., *N. Engl. J. Med.* 2001 Jul 26; 345 (4):241-7; Schnell et al., *Leukemia*. 2000 Jan; 14 (1):129-35; Ghetie et al., *Mol. Biotechnol.* 2001 Jul; 18 (3):251-68 참조).
- [0255] 이특이적 및 삼특이적 다량체는 여러 scFv 분자를 결합시켜 제조할 수 있고, 종양에 T-세포 동원을 위한 가교 시약(면역요법), 바이러스 재표적화(유전자 요법) 및 적혈구 세포 응집 시약(면역진단)으로서 설계했다(예컨대, Todorovska et al., *J. Immunol. Methods*. 2001 Feb 1; 248 (1-2):47-66; Tomlinson et al., *Methods Enzymol.* 2000; 326:461-79; McCall et al., *J. Immunol.* 2001 May 15; 166 (10):6112-7 참조).
- [0256] 완전 사람 항체는 사람 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 큰 부분을 운반하는 유전자전이 마우스를 면역화하여 제조할 수 있다. 이러한 마우스, 이러한 마우스의 예는 XenomouseTM (Abgenix, Inc.)(미국 특허 6,075,181 및 6,150,584), HuMAb-MouseTM (Medarex, Inc./GenPharm)(미국 특허 5,545,806 및 5,569,825), TransChromo Mouse (Kirin) 및 KM Mouse(Medarex/Kirin)는 당업계에 공지되어 있다.
- [0257] 그 다음, 항체는 예컨대 표준 하이브리도마 기술 또는 파지 디스플레이로 제조할 수 있다. 이러한 항체는 완전 사람 아미노산 서열만을 함유할 것이다.
- [0258] 완전 사람 항체는 또한 사람 라이브러리로부터 파지 디스플레이를 사용하여 제조할 수도 있다. 파지 디스플레이는 문헌[Hoogenboom HR and Winter G. (1992) *J. Mol. Biol.* 227 (2):381-8; Marks JD et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222 (3):581-97; 및 미국 특허 5,885,793 및 5,969,108)]에서와 같이 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0259] 치료 항체 및 용도
- [0260] 본 발명의 특이적 결합 구성원의 생체내 성질, 특히 종양:혈액 비 및 제거율에 관한 생체내 성질은 mAb806과 적어도 비슷할 것이다. 이러한 특이적 결합 구성원은 사람 또는 동물 대상체에게 투여된 후, >1:1의 피크 종양 대 혈액 비를 나타낼 것이다. 이러한 비율에서 특이적 결합 구성원은 또한 종양 대 기관 비가 1:1 이상인 것이 바람직하고, 2:1 이상인 것이 더욱 바람직하며, 5:1 이상인 것이 더욱 바람직하다. 이러한 비율에서, 특이적 결합 구성원은 또한 종양 부위에서 떨어진 기관에서 기관 대 혈액 비가 <1:1인 것이 바람직하다. 이러한 비율은 투여된 특이적 결합 구성원의 분해대사 및 분비 기관은 제외한다. 따라서, scFv 및 Fab의 경우(후속 실시예에 제시된 것처럼), 결합 구성원은 신장을 통해 분비되고, 다른 기관보다 여기에 더 많이 존재한다. 전체 IgG의 경우에 제거율은 적어도 부분적으로 간을 통해 이루어질 것이다. 무손상 항체의 피크 국제화 비율은 일반적으로 특이적 결합 구성원을 투여한 후 10 내지 200시간 사이에 달성될 것이다. 더 구체적으로, 상기 비율은 무흉선 누드 마우스의 한쪽 옆구리에 피하 형성된 약 0.2 내지 1.0 g의 종양 이종이식편에서 측정할 수 있다.
- [0261] 본 발명의 항체는 검출성 또는 기능성 표지로 표지될 수 있다. 검출성 표지로는 방사능표지, 예컨대 동위원소, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ⁹⁹Tc 및 ¹⁸⁶Re를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니며, 이들은 항체 영상화 기술에 공지된 통상적인 화학을 이용하여 본 발명의 항체에 부착될 수 있다. 표지는 또한 형광 표지 및 MRI-CT 영상 기술에 통용되는 표지를 포함한다. 또한, 양고추냉이 퍼옥시다제와 같은 효소 표지도 포함한다. 표지는 또한 특이적 동족 검출성 모이어티, 예컨대 표지화된 아비딘에 대한 결합을 통해 검출할 수 있는 비오틴과 같은 화학적 모이어티를 포함한다.
- [0262] 기능성 표지는 종양 조직의 파괴를 유발하기 위해 종양 부위에 표적화되도록 설계한 물질을 포함한다. 이러한 기능성 표지는 세포독성 약물, 예컨대 5-플루오로우라실 또는 리신, 및 종양 부위에서 전구약물을 활성 약물로 전환시킬 수 있는, 세균 카르복시펩티다제 또는 니트로리덕타제와 같은 효소도 포함한다.
- [0263] 또한, 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 비롯한 항체, 및 특이적 결합 구성원, 항체 및/또는 이의 서브유닛의 생산 또는 활성을 조절하는 약물은 특정 진단 용도가 있을 수 있으며, 예컨대 암, 전암성 병변, 과증식성 세포 성장과 관련되거나 이로부터 초래되는 상태 등과 같은 상태를 검출 및/또는 측정하기 위한 목적에 이용될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합 구성원, 항체 또는 이의 서브유닛은 예컨대 융합된 마우스 비장 림프구와 골

수중 세포를 이용하는 하이브리도마 기술과 같은 공지의 기술에 의해, 다양한 세포 배지에서 자신들에 대한 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체를 생산하는데 사용될 수 있다. 이와 마찬가지로, 본 발명의 특이적 결합 구성원의 활성(들)을 모방하거나 길항작용하는 소분자가 발견되거나 합성될 수 있고, 진단 및/또는 치료 프로토콜에 사용될 수 있다.

[0264] 방사능표지된 특이적 결합 구성원, 구체적으로 항체 및 이의 단편은 시험관내 진단 기술 및 생체내 방사능영상 기술 및 방사능면역요법에 유용하다. 생체내 영상화 기술에서, 본 발명의 특이적 결합 구성원은 방사능동위원소(들)보다는 영상화제, 예컨대 비제한적으로 자기공명영상 증강제와 접합될 수 있으며, 이때 예컨대 항체 분자에는 킬레이트화 그룹을 통해 다수의 상자성 이온이 부하된다. 킬레이트화 그룹의 예로는 EDTA, 포피린, 폴리아민 크라운 에테르 및 폴리옥심이 포함된다. 상자성 이온의 예로는 가돌리늄, 철, 망간, 레늄, 유로퓸, 란탄, 홀뮴 및 에르븀을 포함한다. 본 발명의 추가 관점에서, 방사능표지된 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편, 특히 방사능면역접합체는 방사능면역요법에, 특히 암 치료를 위한 방사능표지된 항체로서 유용하다. 또 다른 관점에서, 방사능표지된 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편은 방사능면역-지침 수술 기술에 유용한데, 여기서 암 세포를 제거하는 수술 전, 이 수술 동안 또는 수술 후에 암 세포, 전암성 세포, 종양 세포 및 과증식성 세포의 존재 및/또는 위치를 확인하고 나타낼 수 있다.

[0265] 본 발명의 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편이 다른 분자 또는 제제에 접합되거나 부착되어 있는, 본 발명의 면역접합체 또는 항체 융합 단백질은 추가로 화학적 제거제, 독소, 면역조절제, 사이토킨, 세포독성제, 화학요법제 또는 약물에 접합된 결합 구성원을 포함하며, 이에 국한되지는 않는다.

[0266] 방사능면역요법(RAIT)은 임상시험에 사용되어 다양한 항체 면역접합체를 이용하여 효능을 입증했다. ¹³¹I 표지된 사람화된 항-암배아 항원(항-CEA) 항체 hMN-14는 결장직장 암에서 평가되었고(Behr TM et al.(2002) Cancer 94(4Suppl): 1373-81), 90Y 표지를 보유한 동일 항체는 갑상선 수질 암종에서 평가되었다(Stein R et al(2002) Cancer 94(1): 51-61). 또한, 모노클로날 항체를 이용한 방사능면역요법도 비-호지킨 림프종 및 췌장암에서 평가되고 보고되었다(Goldenberg DM (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39 (1-2):195-201; Gold DV et al. (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39 (1-2) 147-54). 또한, 특정 항체를 이용한 방사능면역요법은 미국 특허 6,306,393 및 6,331,175에도 기술되어 있다. 방사능면역지침술(RIGS)도 임상실습에 소개되었고, 항-CEA 항체 및 종양-관련 항원에 대해 지향성인 항체를 이용하는 것을 포함한 유용성과 효능을 입증했다(Kim JC et al (2002) Jut. J. Cancer 97(4):542-7; Schneebaum, S. et al. (2001) World J. Surg. 25(12):1495-8; Avital, S. et al. (2000) Cancer 89(8):1692-8; McIntosh DG et al (1997) Cancer Biother. Radiopharm. 12 (4):287-94).

[0267] 본 발명의 항체는 치료를 요하는 환자에게 임의의 적당한 경로를 통해, 보통 혈류 또는 CSF 내로 주사에 의해, 또는 종양 부위에 직접 투여할 수 있다. 정확한 용량은 다수의 요인에 따라 달라질 수 있는데, 예컨대 항체가 진단용인지 또는 치료용인지에 따라, 종양의 크기와 위치에 따라, 항체의 정확한 성질에 따라(완전 항체, 단편, 이중항체 여부 등), 및 항체에 부착된 검출성 또는 기능성 표지의 성질에 따라 달라질 것이다. 치료법에 방사능 핵종이 사용되는 경우, 적당한 최대 단일 용량은 약 45 mCi/m² 내지 최대 약 250 mCi/m²이다. 바람직한 투여량은 15 내지 40 mCi 범위이고, 더욱 바람직한 투여량 범위는 20 내지 30 mCi 또는 10 내지 30 mCi 범위이다. 이러한 치료법은 골수 또는 줄기 세포 대체를 필요로 할 수 있다. 종양 영상화 또는 종양 치료에 전형적인 항체 용량은 0.5 내지 40mg 범위, 바람직하게는 1 내지 4 mg의 F(ab')₂형 항체일 것이다. 노출된 항체는 용량당 20 내지 1000mg 단백질의 용량, 또는 용량당 20 내지 500mg 단백질의 용량, 또는 용량당 20 내지 100mg 단백질의 용량으로 투여되는 것이 바람직하다. 이 용량은 성인 환자의 1회 치료용 용량으로서, 아동 및 유아에 대해서는 비례해서 조정할 수 있고, 다른 항체 형식에 대해서는 분자량에 비례해서 조정할 수도 있다. 치료는 매일, 주당 2회, 매주 또는 매달 간격으로 의사의 판단에 따라 반복할 수 있다.

[0268] 이러한 제제는 제2 결합 단백질, 예컨대 앞에서 설명한 EGFR 결합 단백질을 포함할 수 있다. 특히 바람직한 형태에서, 제2 결합 단백질은 이하에 논하는 528 또는 225와 같은 모노클로날 항체이다.

[0269] 약제학적 조성물 및 치료 조성물

[0270] 본 발명의 특이적 결합 구성원은 보통 특이적 결합 구성원 외에 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있는 약제학적 조성물의 형태로 투여될 것이다.

[0271] 따라서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 활성 성분 외에, 당업자에게 공지된 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체, 완충액, 안정제 또는 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 비독성이어야 하고 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로, 즉

경구용 또는 주사용, 예컨대 정맥내 주사용인지에 따라 달라질 것이다.

- [0272] 경구 투여용 약제학적 조성물은 정제, 캡슐, 분말 또는 액체 형태일 수 있다. 정제는 젤라틴과 같은 고체 담체 또는 보강제를 포함할 수 있다. 액체 약제학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동식물유, 광유 또는 합성유와 같은 액체 담체를 포함한다. 생리적 식염수, 텍스트로스 또는 다른 당 용액 또는 글리콜, 예컨대 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 포함되기도 한다.
- [0273] 정맥내 주사 또는 환부 주사용인 경우, 활성 성분은 발열원 제거된 비경구적으로 허용되는 수용액 형태일 것이고, 적당한 pH, 등장성 및 안정성이 있는 것이다. 당업자는 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사, 락트산염 첨가된 링거 주사와 같은 등장성 비히클 등을 이용하여 적당한 용액을 잘 제조할 수 있다. 필요하다면, 보존제, 안정제, 완충액, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 포함될 수도 있다.
- [0274] 조성물은 치료하고자 하는 상태에 따라 동시에 또는 순차적으로 다른 치료 또는 치료제 또는 제제와 함께 투여하거나 단독 투여할 수 있다. 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 결합 구성원, 구체적으로 항체 또는 이의 단편 및 다른 제제 또는 치료제, 예컨대 항암 제제 또는 치료제, 호르몬, 항-EGFR 제제 또는 항체 또는 면역 조절제를 함유하는 조성물을 포함한다. 더욱 일반적으로, 이러한 항암 제제는 티로신 키나제 억제제 또는 인산화 캐스캐이드 억제제, 해독후 조절제, 세포 성장 또는 분열 억제제(예: 항-유사분열제), 또는 시그널 전달 억제제일 수 있다. 다른 치료 또는 치료제는 통증 경감 약물, 예컨대 비스테로이드성 항염증 약물(예: 아스피린, 파라세타몰, 이부프로펜 또는 케토프로펜), 또는 아편제, 예컨대 몰핀 또는 항-구토제를 적당한 용량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 이 조성물은 티로신 키나제 억제제(예컨대, AG1478 및 ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), 독소루비신, 테모졸로마이드, 시스플라틴, 카르보플라틴, 니트로소우레아, 프로카바진, 빈크리스틴, 하이드록시우레아, 5-플루오로우라실, 사이토신 아라비노사이드, 사이클로포스파미드, 에피도도필로톡신, 카무스틴, 로무스틴 및/또는 다른 화학요법과 병용해서(순차적으로(즉, 전 또는 후에) 또는 동시에) 투여할 수 있다. 따라서, 이러한 제제들은 항-EGFR 특이적 제제, 또는 티로신 키나제 억제제, 예컨대 AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774 또는 SU-6668일 수 있고, 또는 더욱 일반적으로 항암제 및 항신생물제, 예컨대 독소루비신, 시스플라틴, 테모졸로마이드, 니트로소우레아, 프로카바진, 빈크리스틴, 하이드록시우레아, 5-플루오로우라실, 사이토신 아라비노사이드, 사이클로포스파미드, 에피도도필로톡신, 카무스틴 또는 로무스틴일 수 있다. 또한, 조성물은 호르몬, 예컨대 텍사메타손, 면역 조절제, 예컨대 인터루킨, 종양 괴사 인자(TNF) 또는 다른 성장 인자 또는 면역반응을 자극하고 암 세포 또는 종양의 감소 또는 제거를 자극하는 사이토신과 함께 투여될 수 있다.
- [0275] TNF와 같은 면역 조절제는 TNF 수용체에 대한 결합뿐만 아니라 본 발명의 항체에 의해 인식되는 EGFR 에피토프를 인식하는 이특이성 항체 형태로 본 발명의 구성원과 함께 병용될 수 있다. 또한, 조성물은 다른 항-EGFR 항체, 예컨대 비제한적으로 항-EGFR 항체 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 및 ABX-EGF와 함께 투여하거나, 또는 그 항체들과 배합물을 포함할 수 있다.
- [0276] 종래, 항-EGFR 항체와 함께 독소루비신 및 시스플라틴과 같은 제제의 사용은 증강된 항종양 활성을 산출했다(Fan et al., 1993; Baselga et al., 1993). 독소루비신과 mAb528의 배합은 정착된 A431 이종이식편의 완전한 근절을 초래한 반면, 어느 한 제제의 단독 치료는 일시적인 성장 억제만을 유발했다(Baselga et al., 1993). 이와 마찬가지로, 시스플라틴과 mAb528 또는 225의 배합도 역시 잘 정착된 A431 이종이식편의 근절을 초래했는데, 이는 어느 한 제제의 치료만을 사용했을 때에는 관찰되지 않는 것이었다(Fan et al., 1993).
- [0277] 통상적인 방사능요법
- [0278] 또한, 본 발명은 통상적인 방사능요법과 함께 결합 구성원을 사용하기 위한 치료 조성물을 고려하고 포함한다. EGF 수용체를 표적으로 하는 항체 치료는 통상적인 방사능요법의 효과를 증강시킬 수 있는 것으로 시사된 바 있다(Milas et al., Clin. Cancer Res. 2000 Feb;6(2):701, Huang et al., Clin. Cancer Res. 2000 Jun;6(6):2166).
- [0279] 본원에서 증명되는 것처럼, 본 발명의 결합 구성원, 특히 항체 또는 이의 단편, 바람직하게는 mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 또는 hu806 또는 이의 단편과 항암 치료제, 특히 항-EGFR 치료제, 예컨대 다른 항-EGFR 항체의 배합물은 이종이식된 종양에 대하여 효과적인 치료, 특히 상승작용을 나타낸다. 실시예에서는 AG1478과 mAb806의 배합물이 각 제제의 단독 치료 시보다 유의적으로 증강된 A431 이종이식 종양 용적의 감소를 초래한다는 것을 입증하고 있다. AG1478(4-(3-클로로아닐리노)-6,7-디메톡시퀴나졸린)은 EGF 수용체 키나제의 강력하고 선택적인 억제제이며, 본원에 전문이 참고인용되는 미국 특허 5,457,105에 특별히 설명되어 있다(Liu,

W. et al (1999) *J. Cell Sci.* 112:2409; Eguchi, S. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:8890; Levitsky, A. and Gazit, A. (1995) *Science* 267:1782 참조). 본 명세서의 실시예들은 또한 다른 항-EGFR 항체, 특히 528 항-EGFR 항체에 의한 본 발명의 항체의 치료학적 상승작용을 입증한다.

- [0280] 또한, 본 발명은 치료 방법을 수행하는데 유용한 치료 조성물을 고려한다. 대상체의 치료 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제(담체)와 활성 성분으로서 본 명세서에 기술된 하나 이상의 특이적 결합 구성원, 이의 폴리펩타이드 유사체 또는 이의 단편을 혼합물로 포함한다. 바람직한 양태에서, 조성물은 표적 세포와 본 발명의 결합 구성원/항체의 특이적 결합을 조절할 수 있는 항원을 포함한다.
- [0281] 활성 성분으로서 폴리펩타이드, 유사체 또는 활성 단편을 함유하는 치료 조성물의 제조는 당업계에 잘 알려져 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로 제조된다. 하지만, 주사 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액으로 제조하기에 적합한 고체 형태로도 제조할 수 있다. 또한, 이 조성물은 유화될 수도 있다. 활성 치료 성분은 종종 활성 성분과 용해성이고 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합된다. 적당한 부형제는, 예컨대 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이의 배합물이다. 또한, 필요하다면, 조성물은 활성 성분의 효과를 증강시키는 습윤제 또는 유화제, pH 완충제와 같은 소량의 보조 물질을 함유할 수 있다.
- [0282] 폴리펩타이드, 유사체 또는 활성 단편은 중화된 약제학적으로 허용되는 염 형태로서 치료 조성물에 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산 또는 인산과 같은 무기산으로 형성되거나, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 제조되는 산 부가 염(폴리펩타이드 또는 항체 분자의 유리 아미노 그룹에 형성됨)을 포함한다. 유리 카르복시 그룹으로부터 형성된 염은 또한 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래할 수 있다.
- [0283] 치료용 폴리펩타이드, 유사체 또는 활성 단편을 함유하는 조성물을 통상적으로 예컨대 단위 용량의 주사로서 정맥내 투여한다. 본 발명의 치료 조성물과 관련하여 사용된 "단위 용량"이란 용어는 사람에 대한 단위 투여량으로서 적당한 물리적으로 분리된 단위를 의미하며, 각 단위는 필요한 희석제, 즉 담체 또는 비히클과 함께 원하는 치료 효과를 생산하기 위해 계산된 소정량의 활성 물질을 함유한다.
- [0284] 이 조성물은 투여 제형에 적합한 방식으로 치료학적 유효량으로 투여한다. 투여할 양은 치료받는 대상체, 활성 성분을 이용하는 대상체의 면역계 역량 및 원하는 EGFR 결합능의 정도에 따라 달라진다. 투여해야 하는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 따라 달라지고 각 개체마다 특이적이다. 하지만, 적당한 투여량은 하루에 개체의 체중 kg 당 약 0.1 내지 20, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 10, 더욱 바람직하게는 1 내지 수 mg 범위의 활성 성분일 수 있고, 투여 경로에 따라 달라진다. 초기 투여 및 추가 샷에 적당한 요법은 달라지기도 하지만, 초기 투여 이후 1시간 이상의 간격으로 반복 용량을 후속 주사 또는 다른 투여 방식으로 수행하는 것이 일반적이다. 대안적으로, 혈액 내에 10 nM 내지 10 μ M의 농도를 유지하기에 충분한 연속 정맥내 주입도 고려한다.
- [0285] 경구 투여용 약제학적 조성물은 정제, 캡슐, 분말 또는 액체 형태일 수 있다. 정제는 젤라틴과 같은 고형 담체 또는 보강제를 함유할 수 있다. 액체 약제학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동물유 또는 식물유, 광유 또는 합성유와 같은 액체 담체를 포함한다. 생리적 식염수 용액, 텍스트로스 또는 다른 당류 용액 또는 글리콜, 예컨대 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 포함될 수도 있다.
- [0286] 정맥내 주사 또는 환부에 주사 시에, 활성 성분은 발열원이 없고 적당한 pH, 등장성 및 안정성인 비경구적으로 허용되는 수용액 형태일 것이다. 당업자는 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 락트산염 첨가된 링거 주사액과 같은 등장성 비히클을 이용하여 적당한 용액을 제조할 수 있다. 필요하다면, 보존제, 안정제, 완충액, 항산화제 및/또는 다른 첨가제도 첨가할 수 있다.
- [0287] 진단 분석
- [0288] 또한, 본 발명은 본 발명의 특이적 결합 구성원에 의해 인식되는 능력을 참조로 하여 이상 발현된 EGFR과 같은 자극의 존재를 검출하는 방법을 비롯한 다양한 진단 용도에 관한 것이다. 이전에 언급한 바와 같이, EGFR은 다양한 공지의 기술로 자신에 대한 항체를 생산하는데 사용할 수 있고, 이러한 항체는 의심되는 표적 세포에서 특정 EGFR 활성의 존재에 대한 검사에서처럼 분리 및 이용될 수 있다.
- [0289] 본 발명의 특이적 결합 구성원, 특히 항체 및 이의 단편의 진단 용도로는 당업자에게 공지되고 표준적이며 본원의 설명을 기반으로 하는 시험관내 및 생체내 용도를 포함한다. EGFR 상태의 시험관내 측정 및 평가, 특히 EGFR의 이상 발현과 관련하여 평가하기 위한 진단 분석 및 키트는 암, 전암성 상태, 과증식 세포 성장과 관련된 상태를 보유하는 것으로 공지되거나 보유한 것으로 의심되는 샘플을 비롯한 환자 샘플 또는 종양 샘플을 진단, 평

가 및 모니터하는데 이용할 수 있다. EGFR 상태의 측정 및 평가는 또한 본 발명의 특정 화학치료제 또는 특이적 결합 구성원, 특히 항체, 예컨대 이의 배합물을 투여하기 위해 또는 약물의 임상 실험을 위해 환자의 적합성을 측정하는데 유용하다. 이러한 유형의 진단 모니터링 및 측정은 이미 유방암에서 HER2 단백질에 대한 항체를 이용하여 수행중에 있고(Hercep Test, Dako Corporation), 여기서 이 분석은 헤르셉틴을 이용하여 항체 요법의 환자를 평가하는데 사용되기도 한다. 생체내 적용은 중앙의 영상화 또는 개체의 암 상태의 평가, 예컨대 방사능 영상화를 포함한다.

[0290] 앞에서 시사한 바와 같이, 본 발명의 진단 방법은 EGFR/단백질에 대한 길항제, 예컨대 항-EGFR 항체, 바람직하게는 친화성-정제된 폴리클로날 항체, 더욱 바람직하게는 mAb의 유효량을 포함하는 분석을 이용하여 세포 샘플 또는 배지를 조사하는 단계를 포함한다. 또한, 본원에 사용된 항-EGFR 항체 분자는 Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 F(v) 부분 또는 전체 항체 분자 형태인 것이 바람직하다. 앞에서 논한 바와 같이, 이 방법으로부터 혜택을 볼 수 있는 환자는 암, 전암성 병변, 바이러스 감염, 과증식 세포 성장 또는 다른 유사 병리적 혼란을 수반하거나 이로부터 초래되는 병리상태를 앓고 있는 환자를 포함한다. 표적 세포의 조사를 돕기 위해 EGFR을 분리하고 항-EGFR 항체를 유도하며, 항-EGFR 항체의 능력을 측정 및 최적화하는 방법은 모두 당업계에 잘 알려져 있다.

[0291] 본 발명의 진단 방법에 사용된 항-EGFR 항체는 친화성 정제된 폴리클로날 항체인 것이 바람직하다. 특히, 이 항체는 모노클로날 항체(mAb)인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 본원에 사용된 항-EGFR 항체 분자는 전체 항체 분자의 Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 F(v) 부분의 형태일 수도 있다.

[0292] 앞에서 상세히 설명한 바와 같이, EGFR에 대한 항체(들)는 공지된 하이브리도마 기술을 포함하는 표준 방법에 의해 생산 및 분리할 수 있다. 편의상, EGFR에 대한 항체(들)는 여기서 Ab₁이라 부르며, 다른 종에서 유발된 항체(들)는 Ab₂라 부른다.

[0293] 세포에 EGFR의 존재는 이의 측정에 이용할 수 있는 일반적인 시험관내 또는 생체내 면역학적 절차로 확인할 수 있다. 다수의 유용한 절차가 공지되어 있다. 특히 유용한 절차 3가지는 검출성 표지로 표지된 EGFR, 검출성 표지로 표지된 항체 Ab, 또는 검출성 표지로 표지된 항체 Ab₂를 이용한다. 이러한 방법들은 다음과 같은 방정식으로 요약될 수 있고, 여기서 별표는 그 입자가 표지된 것을 나타내고, "R"은 EGFR을 나타낸다:

[0294] A. $R^* + Ab_1 = R^*Ab_1$,

[0295] B. $R + Ab^* = RAb_1^*$

[0296] C. $R + Ab_1 + Ab_2^* = RAb_1Ab_2^*$

[0297] 이러한 방법들과 이들의 응용은 당업자에게는 모두 익숙하므로, 본 발명의 범위 안에서 활용될 수 있다. "경쟁적" 방법인 방법 A는 미국 특허 3,654,090 및 3,850,752에 기술되어 있다. "샌드위치" 방법인 방법 C는 미국 특허 RE31,006 및 4,016,043에 기술되어 있다. 또 다른 방법으로서 "이중 항체" 또는 "DASP" 방법 등이 공지되어 있다.

[0298] 상기 각 경우마다, EGFR은 하나 이상의 항체(들) 또는 결합 파트너와 복합체를 형성하고, 이 복합체의 한 구성원이 검출성 표지로 표지된다. 복합체가 형성된 사실과, 필요하다면 그 양은, 표지의 검출에 이용할 수 있는 공지된 방법으로 측정할 수 있다.

[0299] 상기로부터 Ab₁과 반응하는 것이 Ab₂의 특징적인 성질이라는 것을 알 수 있을 것이다. 이것은 한 포유동물 종에서 유발된 Ab₁이 다른 종에서 항체 Ab₂를 유발하는 항원으로서 사용되었기 때문이다. 예를 들어, Ab₂는 항원으로서 토끼 항체를 이용하여 염소에서 발생시킬 수 있다. 따라서, Ab₂는 염소에서 발생된 항-토끼 항체일 것이다. 본 상세한 설명과 청구범위에서 Ab₁은 1차 또는 항-EGFR 항체라 불릴 것이고, Ab₂는 2차 또는 항-Ab₁ 항체라 불릴 것이다.

[0300] 본 연구에 가장 일반적으로 이용되는 표지는 자외선 등에 노출 시 형광을 발생하는 화학물질, 방사능 원소, 효소이다.

[0301] 다수의 형광 물질이 공지되어 있고 표지로서 이용될 수 있다. 그 예로는 플루오레세인, 로다민, 아우라민, 텍사스 레드, AMCA 블루 및 루시퍼 엘로우가 있다. 특별한 검출 물질은 이소티오시아네이트를 통해 플루오레세인과

접합되고 염소에서 제조된 항-토끼 항체이다.

[0302] EGFR 또는 이의 결합 파트너(들), 예컨대 본 발명의 특이적 결합 구성원은 또한 방사능원소 또는 효소로 표지될 수 있다. 방사능 표지는 현재 이용가능한 임의의 계수 절차에 따라 검출할 수 있다. 바람직한 동위원소는 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc 및 ^{186}Re 중에서 선택될 수 있다.

[0303] 효소 표지도 마찬가지로 유용하고, 현재 이용되는 임의의 비색기술, 분광광도측정 기술, 형광분광광도측정 기술, 전류측정 기술 또는 가스계량 기술로 검출할 수 있다. 효소는 가교 분자, 예컨대 카르보다이미드, 디이소시아네이트, 글루타르알데하이드 등과 반응에 의해 선택 입자에 접합된다. 이러한 절차에 사용될 수 있는 많은 효소들은 공지되어 있고 이용될 수 있다. 퍼옥시다제, β -글루쿠로니다제, β -D-글루코시다제, β -D-갈락토시다제, 우레아제, 글루코스 옥시다제 + 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스파타제가 바람직하다. 미국 특허 3,654,090; 3,850,752; 및 4,016,043은 대체 표지화 물질 및 방법을 개시하기 위해 예를 들어 언급하고 있다.

[0304] 본 발명에 따라 유리하게 이용될 수 있는 특별한 분석 시스템은 수용체 분석으로 알려져 있다. 수용체 분석에서, 분석되는 물질, 예컨대 특이적 결합 구성원은 적당히 표지되고, 그 다음 표지된 물질과 미표지된 물질의 일정량과 함께 특정 세포 검사 콜로니가 접종되고, 그 후 결합 연구를 수행하여 표지된 물질이 세포 수용체에 결합한 정도를 측정한다. 이러한 방식으로 물질 간에 친화성 차이를 확인할 수 있다.

[0305] 따라서, 특이적 결합 구성원의 정제된 양은 방사능표지될 수 있고, 예컨대 항체 또는 다른 억제제 등과 배합되어 결합 연구가 수행될 수 있다. 그 다음, 다양한 양의 표지 및 미표지된 미배합 특이적 결합 구성원을 함유하는 용액이 제조될 수 있고, 그 후 세포 샘플이 접종된 다음 항온처리될 수 있다. 그 다음, 수득되는 세포 단층은 세척하고, 가용화한 뒤, 표준 오차가 <5%이도록 충분한 시간 동안 감마 계수기에서 계수한다. 그 다음, 이러한 데이터는 스캐차드 분석으로 처리하고, 그 후 물질 활성에 관한 관찰 및 결론이 도출될 수 있다. 이상은 예시적이지만, 수용체 분석을 수행하고 이용할 수 있는 방식을 예시한 것으로, 이 경우에 분석된 물질의 세포 결합능은 구별가능한 특징으로서 작용할 수 있다.

[0306] 본 발명에 따라 고려되고 유용한 분석은 "시스/트랜스" 분석으로 알려진 것이다. 간략히 설명하면, 이 분석법은 2개의 유전자 작제물을 이용하며, 이 중 하나는 일반적으로 적당한 세포주로 형질감염되었을 때 당해의 특정 수용체를 지속적으로 발현하는 플라스미드이고, 다른 하나는 수용체/리간드 복합체의 조절 하에서 루시퍼라제와 같은 리포터(reporter)를 발현하는 플라스미드이다. 따라서, 예컨대 특정 수용체의 리간드로서 화합물을 평가하는 것이 바람직하다면 첫 번째 플라스미드는 선택된 세포주에서 수용체를 발현시키는 작제물이며, 두 번째 플라스미드는 특정 수용체에 대한 반응 성분이 삽입되어 있는 루시퍼라제 유전자에 결합된 프로모터를 보유할 것이다. 검사 중인 화합물이 수용체의 작용물질인 경우에 리간드는 수용체와 복합체를 형성할 것이며, 수득되는 복합체는 반응 성분에 결합하여 루시퍼라제 유전자의 전사를 개시시킬 것이다. 그 다음, 산출되는 화학발광도는 분광광도계로 측정하고, 용량 반응 곡선을 작도하여 공지의 리간드와 비교한다. 이러한 방법은 인용이 목적인 미국 특허 4,981,784 및 PCT 국제 공개 번호 WO 88/03168에 상세히 설명되어 있다.

[0307] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 의학적 전문가가 사용하기에 적합한 시판용 검사 키트가 의심되는 표적 세포 중의 EGFR의 이상 발현, 예컨대 비제한적으로 증폭된 EGFR 및/또는 EGFR 돌연변이의 존재 여부를 측정하기 위해 제조될 수 있다. 앞에서 논한 검사 기술에 따르면, 이러한 키트의 한 분류는 적어도 표지된 EGFR 또는 이의 결합 파트너, 예컨대 특이적인 항체, 및 사용법, 물론 "경쟁적", "샌드위치", "DASP" 등과 같은 선택 방법에 따라 다른 사용법을 포함할 것이다. 또한, 키트는 완충제, 안정화제 등과 같은 기타 시약을 함유할 수도 있다.

[0308] 따라서, 검사 키트는 EGFR의 이상 발현 또는 해독후 변형에 대한 세포의 존재 또는 능력을 증명하기 위한 용도로 제조할 수 있는 것으로서,

[0309] (a) 존재하는 특이적 결합 구성원 또는 이에 대한 특이적인 결합 파트너를 검출성 표지에 직접 또는 간접 부착시켜 수득한 소정량의 적어도 하나의 표지된 면역화학적 반응성 성분;

[0310] (b) 다른 시약; 및

[0311] (c) 본 키트의 사용 안내서를 포함한다.

[0312] 더욱 구체적으로, 진단 검사 키트는

[0313] (a) 일반적으로 고체 상에 결합되어 면역흡착체를 형성하거나, 또는 대안적으로 적당한 태그, 또는 이러한 복수

의 말단 산물 등(또는 이들의 결합 파트너)에 각각 하나씩 결합된, 공지된 양의 전술한 바와 같은 특이적 결합 구성원(또는 결합 파트너);

[0314] (b) 필요한 경우, 다른 시약; 및

[0315] (c) 이 검사 키트의 사용 안내서를 포함할 수 있다.

[0316] 또 다른 변형으로서, 검사 키트는 소정의 방법(예: "경쟁적", "샌드위치", "이중 항체" 등)에 따라 작용하는 검사 키트를 제조하고 전술한 목적에 사용할 수 있으며,

[0317] (a) 특이적 결합 구성원을 검출성 표지에 커플링시켜 수득한 표지된 성분;

[0318] (b) 적어도 하나의 시약이

[0319] (i) 표지된 성분(a)과 결합할 수 있는 리간드;

[0320] (ii) 표지된 성분(a)의 결합 파트너와 결합할 수 있는 리간드;

[0321] (iii) 측정될 성분(들) 중 적어도 하나와 결합할 수 있는 리간드; 및

[0322] (iv) 측정될 성분(들) 중 적어도 한 성분의 적어도 하나의 결합 파트너들과 결합할 수 있는 리간드로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 리간드 또는 고정된 리간드인 하나 이상의 추가 면역화학적 시약; 및

[0323] (c) EGFR, 특이적 결합 구성원과 이에 대한 특이적 결합 파트너 사이에 면역화학적 반응을 일으키는 하나 이상의 성분을 검출 및/또는 측정하기 위한 방법의 성능에 대한 안내서를 포함한다.

[0324] 전술한 바와 같이, EGFR의 활성, EGFR의 이상 발현 또는 해독후 변형 및/또는 특이적 결합 구성원의 활성 또는 결합을 조절하는데 효과적인 잠재 약물을 선별하는 분석 시스템을 제조할 수 있다. 수용체 또는 결합 구성원은 검사 시스템에 첨가될 수 있고, 잠재성이 있는 약물 역시 최종 세포 배양물에 첨가될 수 있으며, 그 후 잠재성이 있는 약물 단독의 첨가에 의하거나 또는 공지된 제제(들)의 첨가 함량의 효과로 인한 세포의 S기 활성의 임의의 변화를 관찰하기 위하여 배양물을 조사한다.

[0325] 핵산

[0326] 본 발명은 본 발명의 특이적 결합 구성원을 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함한다. 바람직한 관점에서, 본 발명은 앞에서 정의한 본 발명의 폴리펩타이드, 예컨대 본 발명의 항체의 VH 및 VL 쇄의 CDR 잔기로서 제시한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 제공한다.

[0327] 또한, 본 발명은 전술한 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 작제물을 제공한다.

[0328] 또한, 본 발명은 전술한 하나 이상의 작제물을 함유하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 임의의 특이적 결합 구성원을 암호화하는 핵산은 제공된 그 자체가 본 발명의 한 관점을 구성하고, 이의 암호화 핵산으로부터 발현시키는 것을 포함하는 특이적 결합 구성원의 생산 방법도 마찬가지이다. 발현은 적당한 조건 하에 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포를 배양하여 편리하게 수행할 수 있다. 발현에 의한 생산 후, 특이적 결합 구성원은 임의의 적당한 기술을 이용해 분리 및/또는 정제할 수 있고, 그 다음 적당한 경우 사용할 수 있다.

[0329] 본 발명에 따른 특이적 결합 구성원 및 암호화 핵산 분자 및 벡터는 예컨대 이의 자연 환경으로부터 실질적으로 순수한 형태 또는 균질한 형태로 분리 및/또는 정제되어 제공될 수 있고, 또는 핵산의 경우에는 필요한 기능을 가진 폴리펩타이드를 암호화하는 서열 외에 다른 기원의 핵산 또는 유전자가 없이 또는 실질적으로 없이 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고, 완전 또는 부분 합성물일 수 있다.

[0330] 다양한 여러 숙주 세포에서 폴리펩타이드를 클로닝 및 발현하기 위한 시스템은 공지되어 있다. 적당한 숙주 세포로는 세균, 포유동물 세포, 효모 및 배클로바이러스계가 포함된다. 이중 폴리펩타이드의 발현을 위해 당업계에서 이용할 수 있는 포유동물 세포주로는 중국 햄스터 난소 세포, HeLa 세포, 어린 햄스터 신장 세포, NSO 마우스 골수종 세포 및 기타 많은 세포를 포함한다. 일반적으로 바람직한 세균 숙주는 이.콜라이이다.

[0331] 이.콜라이와 같은 원핵생물 세포에서 항체 및 항체 단편의 발현에 대해서는 당업계에 잘 확립되어 있다. 검토를 위해, 예컨대 문헌[Pluckthun, A., Bio/Technology 9: 545-551(1991)]을 참조한다. 또한, 배양물에서 진핵생물 세포의 발현은 특이적 결합 구성원의 생산을 위한 선택사항으로서 당업자라면 이용가능하며, 최근 논문에 대해서는 예컨대 문헌[Raff, M.E.(1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J.J. et al.(1995) Curr.

Opinion Biotech 6: 553-560]을 참조한다.

- [0332] 적당한 벡터는 적당한 조절 서열, 예컨대 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 적당한 다른 서열을 함유하는 것으로 선택 또는 작제할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 바이러스 성, 적당한 경우 예컨대 파지, 또는 파지미드일 수 있다. 더 상세한 설명은, 예컨대 Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press를 참조한다. 핵산의 조작을 위한 많은 공지된 기술 및 프로토콜, 예컨대 핵산 작제물 제조, 돌연변이유발, 서열분석, 세포에의 DNA 도입, 유전자 발현 및 단백질 분석은 문헌[Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992]에 더 상세하게 설명되어 있다. 상기 Sambrook 등 및 Ausubel 등의 문헌은 본원에 참고인용된다.
- [0333] 따라서, 본 발명의 다른 관점은 본원에 개시된 핵산을 함유하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 관점은 숙주 세포에 상기 핵산을 도입시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이 도입은 이용가능한 모든 기술을 이용할 수 있다. 진핵생물 세포에서 적당한 기술은 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공, 리포솜-매개 형질감염 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예컨대 백시니아 또는 곤충 세포에는 배콜로바이러스를 이용한 형질도입을 포함할 수 있다. 세균 세포의 경우, 적당한 기술은 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 이용한 형질감염을 포함할 수 있다.
- [0334] 도입은 핵산으로부터 발현을 유발하거나 허용하여, 예컨대 유전자 발현 조건 하에 숙주 세포를 배양한 후 후속될 수 있다.
- [0335] 한 양태에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈(예컨대, 염색체)에 통합된다. 통합은 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진하는 서열의 혼입에 의해 촉진될 수 있다.
- [0336] 또한, 본 발명은 전술한 바와 같이 특이적 결합 구성원 또는 폴리펩타이드를 발현하기 위해 발현계 중에 전술한 바와 같은 작제물을 사용하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0337] 전술한 바와 같이, 본 발명은 또한 서열번호 2 및 4; 129 및 134; 22 및 27; 32 및 37; 및/또는 42 및 47에 제시된 아미노산 서열을 보유하는, 특이적 결합 구성원, 특히 항체 또는 이의 단편을 암호화하는 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자 또는 이의 축퇴성 변형체에 관한 것이며, 바람직하게는 결합 구성원 또는 항체를 암호화하는 핵산 분자, 특히 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자는 상기 서열들 중 하나를 암호화하는 DNA 서열에 상보적이거나 뉴클레오타이드 서열을 보유한다.
- [0338] 본 발명의 다른 특징은 본원에 개시된 DNA 서열의 발현이다. 당업계에 공지된 바와 같이, DNA 서열은 적당한 발현 벡터에서 발현 조절 서열에 작동적으로 결합시키고, 이 발현 벡터를 이용하여 적당한 단세포 숙주를 형질전환시켜 발현시킬 수 있다.
- [0339] 이와 같은 발현 조절 서열에 본 발명의 DNA 서열의 작동적 결합은 물론 이미 DNA 서열의 일부가 아니라면, DNA 서열의 상류에 정확한 관독 프레임으로 개시 코돈 ATG를 제공하는 것을 포함한다.
- [0340] 본 발명의 DNA 서열의 발현에는 매우 다양한 숙주/발현 벡터 조합이 이용될 수 있다. 유용한 발현 벡터는 예컨대 염색체성, 비염색체성 및 합성 DNA 서열의 분절들로 이루어질 수 있다. 적당한 벡터에는 SV40 및 공지된 세균 플라스미드의 유도체, 예컨대 이.콜라이 플라스미드 col E1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체들과 RP4와 같은 플라스미드; 파지 DNA, 예컨대 파지 X의 다양한 유도체, 예컨대 NM989, 및 다른 파지 DNA, 예컨대 M13 및 필라멘트형 일본채 파지 DNA; 효모 플라스미드, 예컨대 2 μ 플라스미드 또는 이의 유도체; 진핵생물 세포에 유용한 벡터, 예컨대 곤충 또는 포유동물 세포에 유용한 벡터; 플라스미드와 파지 DNA의 조합에서 유래되는 벡터, 예컨대 파지 DNA 또는 다른 발현 조절 서열을 이용하도록 변형시킨 플라스미드 등이 포함된다.
- [0341] 다양한 발현 조절 서열 중 임의의 서열, 즉 여기에 작동적으로 결합된 DNA 서열을 발현을 조절하는 서열은 본 발명의 DNA 서열을 발현하기 위해 상기 벡터들에 이용될 수 있다. 이러한 유용한 발현 조절 서열에는 예컨대 SV40, CMV, 백시니아, 폴리오마 또는 아데노바이러스의 초기 프로모터 또는 후기 프로모터, lac 시스템, trp 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, LTR 시스템, 파지 λ 의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 피막 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 해당작용 효소의 프로모터, 산 포스파타제(예: Pho5)의 프로모터, 효모 교배 인자의 프로모터 및 원핵생물 또는 진핵생물 세포 또는 이들의 바이러스들의 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려진 다른 서열들, 및 이들의 다양한 조합물이 포함된다.
- [0342] 또한, 단세포 숙주 세포는 다양한 종류가 본 발명에 따른 DNA 서열의 발현에 유용하다. 이러한 숙주로는 공지된

진핵생물 및 원핵생물 숙주가 포함될 수 있으며, 예컨대 조직 배양물 중의 이.콜라이, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 바실러스(*Bacillus*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 효모와 같은 진균, 및 동물 세포, 예컨대 CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W 및 L-M 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(예: COS1, COS7, BSC1, BSC40 및 BMT10), 곤충 세포(예: Sf9) 및 사람 세포 및 식물 세포가 있다.

[0343] 일부 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주는 본 발명의 DNA 서열을 발현하는 능력이 비슷하게 양호할 수 있다는 것은 당연하다. 하지만, 동일한 발현 시스템에 의해 모든 숙주가 동일한 유효 기능을 발휘하지는 않는다. 그렇지만, 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 원하는 발현을 달성하기 위해 과도한 실험없이도 적당한 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주를 선택할 수 있다. 예컨대, 벡터 선택 시, 숙주는 그 벡터가 작동할 수 있는 것인지 고려되어야 한다. 벡터의 카피수, 카피수를 조절하는 능력 및 벡터에 의해 암호화되는 다른 임의의 단백질, 예컨대 항생제 마커의 발현도 고려되어야 한다.

[0344] 발현 조절 서열의 선택 시에는 보통 다양한 요인이 고려된다. 예컨대, 시스템의 상대적 강도, 조절성 및 발현될 특정 DNA 서열 또는 유전자와의 상용성, 및 특히 잠재적인 2차 구조에 관해서 고려된다. 적합한 단세포 숙주는 예컨대 선택된 벡터와의 상용성, 분비 특징, 단백질을 정확하게 폴딩하는 능력, 발효 조건 뿐만 아니라 발현되는 DNA 서열에 의해 암호화된 산물이 숙주에게 미치는 독성 및 발현 산물의 정제 용이성 등을 고려하여 선택한다.

[0345] 이러한 요인은 물론 다른 요인을 고려하여 당업자는 발효조 또는 대량 동물 배양물에서 본 발명의 DNA 서열을 발현하는 다양한 벡터/발현 조절 서열/숙주 조합을 작제할 수 있다.

[0346] 또한, 본 발명의 범위 안에서 유도된 단백질 복합체/서브유닛의 뉴클레오타이드 서열을 이용하여 펩타이드 유사체를 제조할 수 있을 것으로 생각된다. 단편과 같은 유사체는 상기 펩타이드의 단백질분해성 분해, 예컨대 펩신 분해를 통해 제조할 수 있다. 뮤테인과 같은 다른 유사체는 수용체 펩타이드 암호화 서열의 표준 부위 지시된 돌연변이유발법을 통해 제조할 수 있다. 프로모터로서 또는 억제체로서의 작용 여부에 관계없이 소분자와 같은 "특이적 결합 구성원 활성화"를 나타내는 유사체는 공지된 생체내 및/또는 시험관내 분석을 통해 확인할 수 있다.

[0347] 앞에서 언급한 바와 같이, 수용체 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 클로닝보다는 합성법으로 제조할 수 있다. DNA 서열은 특이적 결합 구성원 아미노산 서열에 대한 적당한 코돈을 이용하여 설계할 수 있다. 일반적으로, 서열이 발현에 사용될 경우, 계획한 숙주에 바람직한 코돈을 선택한다. 전체 서열은 표준 방법에 따라 제조한 올리고뉴클레오타이드를 중첩(overlap)시킨 후 완전한 암호화 서열로 어셈블리하여 제조한다[예컨대, Edge, *Nature*, 292: 756(1981); Nambair et al., *Science*, 223: 1299(1984); Jay et al., *J.Biol.Chem.*, 259: 6311(1984)].

[0348] 합성 DNA 서열은 특이적 결합 구성원 또는 "뮤테인(mutein)"을 발현하는 유전자의 작제를 용이하게 한다. 또는, 뮤테인을 암호화하는 DNA는 천연 특이적 결합 구성원 유전자 또는 cDNA의 부위 지시된 돌연변이유발을 통해 제조할 수 있지만, 통상적인 폴리펩타이드 합성을 사용하여 직접 뮤테인을 제조할 수도 있다.

[0349] 단백질에 비천연 아미노산을 부위 특이적으로 혼입시키는 일반 방법에 대해서는 문헌[Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, 244: 182-188(April 1989)]에 설명되어 있다. 이 방법은 비천연 아미노산을 이용하여 유사체를 제조하는데 사용할 수 있다.

[0350] 본 발명은 해독 수준에서 EGFR의 발현을 방해하는데 사용할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 리보자임의 제조도 포함한다. 이 접근법은 안티센스 핵산 및 리보자임을 이용하여 특이적 mRNA를 안티센스 핵산으로 차폐하거나 리보자임으로 절단하여 특이적 mRNA의 해독을 차단한다.

[0351] 안티센스 핵산은 특이적 mRNA 분자의 적어도 일부에 상보성인 DNA 또는 RNA 분자이다(Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988 참조). 이 핵산은 세포에서 상기 mRNA에 하이브리드화하여 이분체 분자를 형성한다. 이 세포는 mRNA를 이분체 형태로 해독하지 않는다. 따라서, 안티센스 핵산은 mRNA의 단백질로의 발현을 방해한다. 약 15개 뉴클레오타이드의 올리고머와 AUG 개시 코돈에 하이브리드화하는 분자는 합성이 쉽고 큰 분자보다 생산 세포에 도입될 때 문제를 일으킬 가능성이 적기 때문에 특히 효과적일 것이다. 안티센스 방법은 시험관내에서 많은 유전자의 발현을 억제하는데 사용되었다(Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988).

[0352] 리보자임은 DNA 제한 엔도뉴클레아제와 다소 유사한 방식으로 다른 일본체 RNA 분자를 특이적으로 절단하는 능력을 보유하는 RNA 분자이다. 리보자임은 특정 mRNA가 자신의 인트론을 절제하는 능력이 있다는 관찰로부터 발견되었다. 연구자들은 이러한 RNA의 뉴클레오타이드 서열을 변형시켜 RNA 분자의 특이적 뉴클레오타이드 서열을 인식하고 이를 절단하는 분자를 조작할 수 있었다(Cech, 1988). 이들은 서열 특이적이기 때문에, 특정 서열의

mRNA만이 불활성화된다.

- [0353] 연구자들은 2종류의 리보자임, 테트라히메나형(Tetrahymena-type) 및 "해머헤드"형(hammerhead-type)을 확인했다(Hasselhoff and Gerlach, 1988). 테트라히메나형 리보자임은 4염기 서열을 인식하는 반면, "해머헤드"형은 11 내지 18개 염기 서열을 인식한다. 인식 서열의 길이가 길수록 표적 mRNA 중에서 독점적으로 일어날 가능성이 커진다. 따라서, 해머헤드형 리보자임이 특정 mRNA 종의 불활성화에 있어서 테트라히메나형 리보자임보다 바람직하고, 18개 염기 인식 서열이 이보다 짧은 인식 서열에 비해 바람직하다.
- [0354] 따라서, 본 명세서에 개시된 DNA 서열은 이에 대한 안티센스 분자 및 EGFR 및 이의 리간드의 mRNA를 절단하는 리보자임을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0355] 본 발명은 이하 비제한적 실시예를 참조로 하면 더욱 쉽게 이해될 수 있으며, 이러한 실시예는 본 발명의 예시로서 제공된 것이다. 이하 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 더욱 완전하게 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 광범위한 범위를 제한하는 것으로서 간주해서는 안 된다.
- [0356] 실시예 1
- [0357] 항체의 생성 및 분리
- [0358] 세포주
- [0359] 면역화 및 특이성 분석을 위해, 정상, 야생형, "wtEGFR" 유전자 또는 $\Delta 2-7$ 결실 돌연변이를 운반하는 Δ EGFR 유전자 중 어느 하나로 형질감염되거나 또는 무손상인 여러 세포주를 사용했다: 쥐 섬유아세포 세포주 NR6, NR6 Δ EGFR(Δ EGFR로 형질감염됨) 및 NR6_{wtEGFR}(wtEGFR로 형질감염됨), 사람 아교모세포종 세포주 U87MG(낮은 수준의 내인성 wtEGFR을 발현함), U87MG_{wtEGFR}(wtEGFR로 형질감염됨), U87MG Δ EGFR(Δ EGFR로 형질감염됨), 및 사람 편평세포 암종 세포주 A431(높은 수준의 wtEGFR을 발현함).
- [0360] 면역화 및 특이성 분석을 위해, 정상, 야생형, "wtEGFR" 유전자 또는 $\Delta 2-7$ 결실 돌연변이를 운반하는 Δ EGFR 유전자 중 어느 하나로 형질감염되거나 또는 무손상인 여러 세포주를 사용했다: 쥐 섬유아세포 세포주 NR6, NR6 Δ EGFR(Δ EGFR로 형질감염됨) 및 NR6_{wtEGFR}(wtEGFR로 형질감염됨), 사람 아교모세포종 세포주 U87MG(낮은 수준의 내인성 wtEGFR을 발현함), U87MG_{wtEGFR} 또는 "U87MG.wtEGFR"(wtEGFR로 형질감염됨), U87MG Δ EGFR 또는 "U87MG. $\Delta 2-7$ "(Δ EGFR로 형질감염됨), 및 사람 편평세포 암종 세포주 A431(높은 수준의 wtEGFR을 발현함). NR6, NR6 Δ EGFR 및 NR6_{wtEGFR} 세포주는 종래 개시되었다(Batra et al. (1995) Epidermal Growth Factor Ligand-independent, Unregulated, Cell-Transforming Potential of a Naturally Occurring Human Mutant EGFRvIII Gene. *Cell Growth Differ.* 6(10): 1251-1259). NR6 세포주는 정상 내인성 EGFR이 없다(Batra et al., 1995). U87MG 세포주 및 형질감염은 종래 기술되었다(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7727-7731).
- [0361] 낮은 수준의 wtEGFR을 내인적으로 발현하는 U87MG 정상세포종 세포주(Ponten, J. and Macintyre, E. H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 74, 465-86)는 de2-7 EGFR을 함유하는 레트로바이러스로 감염시켜 U87MG. $\Delta 2-7$ 세포주를 생산했다(Nishikawa et al., 1994). 형질감염된 세포주 U87MG.wtEGFR은 문헌[Nagane et al. (1996) *Cancer Res.* 56, 5079-5086]에 기술된 바와 같이 생산했다. U87MG 세포는 약 1×10^5 EGFR을 발현하는 반면, U87MG.wtEGFR 세포는 약 1×10^6 EGFR을 발현하여 유전자 증폭 시 관찰되는 상황을 모의한다. 또한, 임의의 공지된 EGFR 관련 분자를 발현하지 않는 쥐 전구-B 세포주 BaF/3도 de2-7 EGFR로 형질감염시켜 BaF/3. $\Delta 2-7$ 세포주를 수득했다(Luwor et al. (2004) The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR, *Oncogene* 23: 6095-6104). 사람 편평세포 암종 A431 세포는 ATCC(Rockville, MD)에서 입수했다. 유표피종 암종 세포주 A431은 종래 개시된 바 있다(Sato et al. (1987) Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. *Methods Enzymol.* 146, 63-81).
- [0362] 모든 세포주는 10% FCS(CSL, Melbourne, Australia); 2 mM 글루타민(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 및 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)이 보충된 GlutaMAX™(Life Technologies, Inc., Melbourne, Australia and Grand Island, NY) 보유 DMEM/F-12에서 배양했다. 또한,

U87MG, $\Delta 2-7$ 및 U87MG.wtEGFR 세포주는 400mg/ml의 제네티신(Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia) 중에서 유지되었다. 세포주는 5% CO₂의 미변형 대기 하에 37°C에서 증식시켰다.

[0363] 시약

[0364] de2-7 EGFR 독특한 연결 펩타이드는 아미노산 서열: LEEKKGNVVTDH (서열번호 13)를 보유한다. de2-7 EGFR 유래의 비오틴화된 독특한 연결 펩타이드(비오틴-LEKKKGNVVTDH (서열번호 5) 및 LEEKKGNVVTDH-비오틴(서열번호 6))은 표준 Fmoc 화학으로 합성하고, 순도(>96%)는 역상 HPLC 및 질량스펙트럼 분석으로 측정했다(Auspep, Melbourne, Australia).

[0365] 연구에 사용된 항체들

[0366] 본원의 발견들을 다른 시약들과 비교하기 위해, 추가 mAb를 본 연구에 포함시켰다. 이 시약들은 wtEGFR에 대한 mAb528(Sato et al. (1983) *Mol. Biol. Med.* 1(5), 511-529) 및 $\Delta 2-7$ EGFR 결실 돌연변이의 연결 서열에 걸쳐 있는 합성 펩타이드에 대해 생성된 DH8.3이었다. de2-7 EGFR에 특이적인 DH8.3 항체(IgG1)는 종래 개시되어 있고(Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer.* 63, 537-43, 1995), de2-7 EGFR에서 발견되는 독특한 연결 펩타이드로 마우스를 면역화한 후에 수득했다(Hills et al., 1995).

[0367] de2-7 및 야생형 EGFR을 모두 인식하는 528 항체는 종래 개시되었고(Masui et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 44, 1002-7), American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 수득한 하이브리도마(ATCC HB-8509)를 이용하여 Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research (Melbourne, Australia)에서 생산했다. 폴리클로날 항체 SC-03은 EGFR의 카르복시 말단 펩타이드에 대하여 유발된, 친화성 정제된 토끼 폴리클로날 항체이다(Santa Cruz Biotechnology Inc.).

[0368] 항체 생성

[0369] 쥐의 섬유아세포주 NR6 Δ EGFR은 면역원으로 사용했다. 마우스 하이브리도마는 BALB/c 마우스에게 보강제 중의 5×10^5 내지 2×10^6 세포를 2 내지 3주 간격으로 5회 피하 주사로 면역접종하여 수득했다. 1차 주사에는 완전 프로인트 보강제를 사용했다. 그 다음에는 불완전 프로인트 보강제(DifcoTM, Voigt Global Distribution, Lawrence, KS)를 사용했다. 면역화된 마우스 유래의 비장 세포는 마우스 골수종 세포주 SP2/0과 융합시켰다(Shulman et al. (1978) *Nature* 276:269-270). 새로 생성된 클론의 상청액은 세포주 NR6, NR6_{wtEGFR}, 및 NR6 Δ EGFR과의 반응성에 대해 혈구흡착 분석으로 선별하고, 그 다음 사람 아교모세포종 세포주 U87MG, U87MG_{wtEGFR}, 및 U87 Δ EGFR를 이용한 혈구흡착 분석으로 분석했다. 그 다음, 선택된 하이브리도마 상청액을 웨스턴 블로팅으로 검사하고, 면역조직화학법으로 추가 분석했다. 예상 반응성 패턴을 보이는 새로 생성된 mAb를 정제했다.

[0370] 5개의 하이브리도마가 확립되었고, 먼저 3개의 클론 124(IgG2a), 806 (IgG2b) 및 1133(IgG2a)을 NR6 Δ EGFR의 높은 역가(1:2500)와 로제트 혈구응집 분석에서 NR6 및 NR6_{wtEGFR} 세포의 낮은 배경을 기반으로 하여 추가 특성화하기 위해 선택했다. 4번째 클론 175(IgG2a)는 연속해서 추가 특성화하고, 이하 실시예 23에 따로 논의했다. 후속 혈구응집 분석에서, 이 항체들은 무손상 사람 아교모세포종 세포주 U87MG 및 U87MG_{wtEGFR}과 반응성을 전혀 나타내지 않았고(미희석 상청액 $\leq 10\%$), 하지만, U87MG Δ EGFR과는 강한 반응성이었고 A431과는 약한 반응성이 관찰되었다. 이에 반해, FACS 분석에서, 806은 무손상 U87MG와 무반응성이었고, U87MG Δ EGFR은 강하게 염색하고 이보다 적게 U87MG_{wtEGFR}을 염색하여, Δ EGFR 및 wtEGFR 모두에 대한 806의 결합을 시사했다(이하 참조).

[0371] 웨스턴 블롯 분석에서, mAb124, mAb806 및 mAb1133은 wtEGFR 및 Δ EGFR과의 반응성에 대해 분석했다. 세정제 용해물을 NR6 Δ EGFR, U87MG Δ EGFR 뿐 아니라 A431로부터 추출했다. 3가지 mAb 모두 wtEGFR(170 kDa) 및 Δ EGFR 단백질(140 kDa)을 염색하는, 세포 용해물과의 유사한 반응성 패턴을 나타냈다. 참조 시약으로서, wtEGFR과 반응성인 것으로 알려진 mAbR.I.(Waterfield et al. (1982) *J. Cell Biochem.* 20(2), 149-161)를, 웨스턴 블롯 분석에서 미반응성인 것으로 알려진 mAb528 대신 사용했다. mAbR.I.는 야생형 및 Δ EGFR과 반응성을 나타냈다. 새로 생성된 3가지 클론 모두 Δ EGFR과 반응성을 나타냈고, 이보다 강하지 않은 wtEGFR과의 반응성도 나타냈다. DH8.3은 U87MG Δ EGFR 및 NR6 Δ EGFR의 용해물에서 유일하게 양성이었다.

[0372] 클론 124, 806, 1133 뿐 아니라 mAb528 및 mAbDH8.3의 이중이식 종양 U87MG, U87MG Δ EGFR, 및 A431에 대한 면역조직화학 분석은 표 1에 제시했다. 모든 mAb는 이중이식편 U87MG Δ EGFR을 강하게 염색했다. mAb528만이 무손상 U87MG 이중이식편에서 약한 반응성을 나타냈다. A431 이중이식편에서 mAb528은 강한 균일한 반응성을 보였다. mAb124, mAb806 및 mAb1133은 A431의 편평세포 암종의 기저 위치 세포 대부분과 반응성을 나타냈고, 상위 세포 층 또는 각질화 성분과 반응하지 않았다. DH8.3은 A431 이중이식편에서는 음성이었다.

표 1

항체 528, DH8.3, 및 124, 806 및 1133의 면역조직화학 분석

항체	이중이식편 Δ U87MG Δ EGFR	이중이식편 A431	이중이식편 U87MG(무손상)
mAb528	양성	양성	양성 (국소 염색)
mAb124	양성	양성 (주로 기저 세포)	-
mAb806	양성	양성 (주로 기저 세포)	-
mAb1133	양성	양성 (주로 기저 세포)	-
DH8.3	양성	-	-

[0373]

[0374] 내인성 마우스 항체의 검출로 인한 간질의 미량 염색

[0375] 서열분석

[0376] mAb806, mAb124 및 mAb1133의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 서열분석하고 이의 상보성 결정 영역(CDR)을 다음과 같이 확인했다:

[0377] mAb806

[0378] mAb806 VH 쇄: 핵산 서열(서열번호 1) 및 시그널 펩타이드 보유 아미노산 서열(서열번호 2)은 각각 도 14A 및 14B(시그널 펩타이드는 도 14B의 밑줄친 부분)에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 15, 16 및 17, 각각)은 도 16에서 밑줄로 표시했다. 시그널 펩타이드 없이 mAb806 VH 쇄 아미노산 서열(서열번호 11)은 도 16에 도시했다.

[0379] mAb806 VL 쇄: 핵산 서열(서열번호 3) 및 시그널 펩타이드 보유 아미노산 서열(서열번호 4)은 각각 도 15A 및 15B(시그널 펩타이드는 도 15B의 밑줄친 부분)에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 18, 19 및 20, 각각)은 도 17에서 밑줄로 표시했다. 시그널 펩타이드 없이 mAb806 VL 쇄 아미노산 서열(서열번호 12)은 도 17에 도시했다.

[0380] mAb124

[0381] mAb124 VH 쇄: 핵산 서열(서열번호 21) 및 아미노산 서열(서열번호 22)은 각각 도 51A 및 51B에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 23, 24 및 25, 각각)은 밑줄로 표시했다.

[0382] mAb124 VL 쇄: 핵산 서열(서열번호 26) 및 아미노산 서열(서열번호 27)은 각각 도 51C 및 51D에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 28, 29 및 30, 각각)은 밑줄로 표시했다.

[0383] mAb1133

[0384] mAb1133 VH 쇄: 핵산 서열(서열번호 31) 및 아미노산 서열(서열번호 32)은 각각 도 52A 및 52B에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 33, 34 및 35, 각각)은 밑줄로 표시했다.

[0385] mAb1133 VL 쇄: 핵산 서열(서열번호 36) 및 아미노산 서열(서열번호 37)은 각각 도 52C 및 52D에 도시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(서열번호 38, 39 및 40, 각각)은 밑줄로 표시했다.

[0386] 실시예 2

[0387] FACS에 의한 세포주에 대한 항체 결합

[0388] mAb806은 먼저 본 명세서에 제시되고 이하 실시예에 기술된 바와 같이 추가 특성화하기 위해 선택했다. mAb124

및 mAb1133도 이하 실시예 26에 논의된 바와 같이 추가 특성화하기 위해 선택했고, 본원에 논의된 mAb806의 독특한 성질에 대응하는 성질이 있는 것으로 발견되었다.

[0389] mAb806의 특이성을 측정하기 위해, U87MG, U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포를 유동 활성화 세포 분류법(FACS)으로 분석했다. 간략히 설명하면, 세포를 관련 항체(10 μg/ml), 및 그 다음 플루오레세인-접합 염소 항-마우스 IgG(1:100 희석물; Calbiochem San Diego, CA, USA; Becton-Dickinson Pharmingen, San Diego, CA, US)로 종래 기술된 바와 같이(Nishikawa et al., 1994) 표지화했다. FACS 데이터는 Coulter Epics Elite ESP에서 최소 5,000회 관찰하고 윈도우용 EXPO(version 2)를 이용하여 분석했다. mAb806의 이소타입 대조군으로서 무관한 IgG2b를 포함시켰고, 528 항체는 de2-7과 wtEGFR을 모두 인식하기 때문에 포함시켰다.

[0390] 528 항체만은 wtEGFR을 발현함을 증명하는 종래 보고(Nishikawa et al, 1994)와 일관되게 모체 U87MG 세포주(도 1)를 염색할 수 있었다. mAb806 및 DH8.3은 대조군 항체와 유사한 결합 수준을 나타냈고, 이것은 이들이 야생형 수용체에 결합할 수 없다는 것을 분명하게 보여주는 것이다(도 1). U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포에 대한 이소타입 대조군 항체의 결합은 U87MG 세포에서 관찰된 것과 유사했다.

[0391] mAb806은 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포를 염색했고, 이는 mAb806이 de2-7 EGFR 및 증폭된 EGFR을 특이적으로 인식한다는 것을 시사한다(도 1). DH8.3 항체는 U87MG.△2-7 세포를 염색했고, 이것은 DH8.3 항체가 de2-7 EGFR을 특이적으로 인식한다는 것을 확인시켜 준다(도 1). 예상과 같이, 528 항체는 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포주를 모두 염색했다(도 1). 예상과 같이, 528 항체는 모세포보다 높은 강도로 U87MG.△2-7을 염색했는데, 이것은 528 항체가 상기 세포들에서 공동발현되는 야생형 수용체 및 de2-7 수용체 모두에 결합하기 때문이다(도 1). 이와 유사한 결과는, 사람 적혈구 세포(그룹 0)로 코팅된 단백질 A가 표적 세포에 출현하여 표면 결합된 IgG를 검출하는 단백질 A 혼합된 혈구흡착법에 의해 획득되었다. 모노클로날 항체 806은 U87MG.△2-7 세포와 반응성이었지만, 야생형 EGFR을 발현하는 U87MG와는 유의적인 반응성(미희석된 상청액 10% 이하)을 나타내지 않았다. 중요한 것은, mAb806이 BaF/3.△2-7 세포주에도 결합했다는 것으로, 이는 wtEGFR의 공동발현이 mAb806 반응성에 필요 사항이 아니라는 것을 입증한다(도 1).

[0392] 실시예 3

[0393] 항체 결합 분석

[0394] mAb806 및 DH8.3 항체의 특이성을 더욱 특성 규명하기 위해, 이들의 결합을 ELISA로 조사했다. 2종류의 ELISA를 사용하여 항체 특이성을 측정했다. 1차 분석에서는 플레이트를 sEGFR(10 μg/ml, 0.1 M 탄산염 완충액 pH 9.2 중)에 2시간 동안 코팅한 뒤, PBS 중의 2% 사람 혈청 알부민(HSA)로 차단시켰다. sEGFR은 재조합 세포외 도메인(야생형 EGFR의 아미노산 1-621)이고, 종래 기술된 바와 같이 생산했다(Domagala et al. (2000) Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor. *Growth Factors*. 18, 11-29). 항체는 2% HSA 함유 인산염 완충 식염수(PBS)에서 농도를 증가시키면서 3반복으로 웰에 첨가했다. 결합된 항체는 기질로서 ABTS(Sigma, Sydney, Australia)를 이용하여 양고추냉이 퍼옥시다제 접합된 양 항-마우스 IgG(Silenus, Melbourne, Australia)로 검출했고, 흡광도는 405nm에서 측정했다.

[0395] mAb806과 528 항체는 둘다 고정된 야생형 sEGFR에 대해 용량-의존적인 포화 결합 곡선을 나타냈다(도 2A). de2-7 EGFR에서 발견된 독특한 연결 펩타이드가 sEGFR 내에 함유되어 있지 않아, mAb806은 야생형 EGFR 서열 내에 위치한 에피토프에 결합되어야 한다. 528 항체의 결합은 mAb806에서 관찰되는 결합보다 낮았는데, 그 이유는 아마도 입체형태적 결정인자를 인식하기 때문인 것으로 생각된다. 예상한 것처럼, DH8.3 항체는 최고 10μg/ml의 농도에서도 야생형 sEGFR에 결합하지 않았다(도 2A). 용액 중의 sEGFR은 고정된 sEGFR에 대한 528 항체의 결합을 용량 의존적 방식으로 억제했지만, mAb806의 결합은 억제할 수 없었다(도 2B). 이것은 mAb806이 입체형태적 변화를 유도할 수 있는 과정인 ELISA 플레이트에 일단 고정되면 야생형 EGFR에만 결합할 수 있다는 것을 시사한다. 유사한 결과는 BIAcore에 의해 관찰되었는데, 여기서 mAb806은 고정된 sEGFR에 결합했지만, 고정된 mAb806은 용액 중의 sEGFR에 결합할 수 없었다(도 2C).

[0396] 95°C에서 10분 동안 가열하여 변성한 후, 용액 중의 sEGFR은 고정된 sEGFR에 대한 mAb806의 결합을 억제할 수 있었고(도 2C), 이는 mAb806이 특정 조건 하에서 야생형 EGFR에 결합할 수 있다는 것을 확인시켜준다. 흥미롭게도, 변성 sEGFR은 528 항체의 결합을 억제할 수 없었고(도 2C), 이는 이 항체가 입체형태적 에피토프를 인식한다는 것을 입증해준다. DH8.3 항체는 독특한 de2-7 EGFR 펩타이드에 대해 용량 의존적이며 포화 결합성을 나타냈다(도 2D). mAb806 및 528 항체는 DH8.3의 포화 결합을 수득하는데 사용된 농도보다 높은 농도에서도 상기 펩

타이드에 결합하지 않았는데, 이는 또한 mAb806이 상기 펩타이드 내의 에피토프 결정인자를 인식하지 못한다는 것을 시사한다.

- [0397] 2차 분석에서, 비오틴화된 de2-7 특이적 펩타이드(비오틴 LEEKKGNVVTDH (서열번호 5))는 스트렙타비딘으로 사전코팅된 ELISA 플레이트(Pierce, Rockford, Illinois)에 결합했다. 항체는 결합했고 1차 분석에서처럼 검출했다. mAb806 및 528 항체는 모두 DH8.3의 포화 결합을 수득하는데 사용된 농도보다 높은 농도에서도 상기 펩타이드에 결합하지 않았는데, 이는 또한 mAb806이 상기 펩타이드 내의 에피토프 결정인자를 인식하지 못한다는 것을 시사한다.
- [0398] mAb806이 연결 펩타이드와 상이한 에피토프를 인식한다는 것을 다시 입증하기 위해, 추가 실험을 수행했다. de2-7 펩타이드에 대해 생성된 mAb806 및 mAbL8A4를 이용한 연구에 C-말단 비오틴화된 de2-7 펩타이드(LEKKKGNVVTDH-비오틴(서열번호 6))를 이용했다(Reist et al. (1995) *Cancer Res.* 55(19), 4375-4382; Foulon et al. (2000) *Cancer Res.* 60(16), 4453-4460).
- [0399] 펩타이드 연구에 사용된 시약
- [0400] 연결 펩타이드: LEEKKGNVVTDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);
- [0401] 펩타이드 C: LEEKKGNVVTDH(K-Biot)-OH (Biosource, Camarillo, CA);
- [0402] sEGFR: 야생형 EGFR의 CHO-세포 유래의 재조합 가용성 세포외 도메인(아미노산 1-621)(LICR Melbourne);
- [0403] mAb806: 마우스 모노클로날 항체, IgG_{2b} (LICR NYB);
- [0404] mAbL8A4: 마우스 모노클로날 항체, IgG₁ (Duke University);
- [0405] IgG₁ 이소타입 대조군 mAb;
- [0406] IgG_{2b} 이소타입 대조군 mAb.
- [0407] 펩타이드 C는 스트렙타비딘 마이크로센서 칩에 350RU(+/- 30RU)의 표면 밀도로 고정시켰다. 이 펩타이드의 반응성에 대해 mAb의 연속 희석물을 시험했다. 비-비오틴화된 펩타이드를 이용한 차단 실험은 특이성 평가를 위해 수행했다.
- [0408] mAbL8A4는 낮은 항체 농도(6.25 nM)에서도 펩타이드 C와 강한 반응성을 나타냈다(도 2E). mAb806은 최고 100nM(검사된 최고 농도)의 항체 농도까지 펩타이드 C와 검출가능한 특이적 반응성을 나타내지 않았다(도 2E 및 2F). mAbL8A4는 펩타이드 C와 반응할 것으로 예상했는데, 그 이유는 이 펩타이드가 mAbL8A4 생성 시에 면역원으로 사용되었기 때문이다. 연결 펩타이드(비-비오틴화됨, 50 μ g/ml)의 첨가는 펩타이드 C와 mAbL8A4의 반응성을 완전히 차단했고, 이는 연결 펩타이드 에피토프에 대한 상기 항체의 특이성을 확인시켜준다.
- [0409] 두 번째 세트의 BIAcore 실험에서, sEGFR은 CM 마이크로센서 칩에 약 4000RU의 표면 밀도로 고정시켰다. mAb의 연속 희석물을 sEGFR과의 반응성에 대해 시험했다.
- [0410] mAb806은 변성된 sEGFR과 강한 반응성인 반면, mAbL8A4는 변성된 sEGFR과 반응하지 않았다. 변성된 sEGFR과 mAb806의 반응성은 항체 농도가 감소할수록 감소한다. 이것은 mAbL8A4가 면역원으로서 연결 펩타이드를 사용하여 생성되었고, sEGFR이 연결 펩타이드를 함유하지 않기 때문에 mAbL8A4가 sEGFR과 반응하지 않는 것으로 생각되었다.
- [0411] 도트-블롯 면역염색 실험도 수행했다. 펩타이드의 연속 희석물을 PVDF 또는 니트로셀룰로스 막 위에 0.5 μ l씩 점적했다. 막을 PBS 중의 2% BSA로 차단시키고, 그 다음 806, L8A4, DH8.3 및 대조군 항체로 탐침했다. 항체 L8A4 및 DH8.3은 막 위의 펩타이드에 결합했다(데이터는 제시하지 않음). mAb806은 L8A4가 분명한 결합을 나타내는 농도에서도 펩타이드에 결합하지 않았다(데이터 미제시). 또한, 대조군 항체는 펩타이드 결합이 음성이었다.
- [0412] mAb806은 면역블로팅 이후 세포 용해물에서 wtEGFR에 결합했다(결과 미제시). 이것은 de2-7 EGFR과 반응하되 wtEGFR과 반응하지 않은 DH8.3 항체에서 수득된 결과와는 다른 것이었다. 따라서, mAb806은 변성 후 wtEGFR을 인식할 수 있지만, 수용체가 천연 상태로 세포 표면에 존재할 때에는 인식하지 못한다.
- [0413] 실시예 4

[0414] 스캐차드 분석

[0415] U87MG, Δ2-7 세포를 이용한 스캐차드 분석은 각 항체의 상대적 친화성을 측정하기 위해 면역반응성에 대해 보정한 후 수행했다. 항체는 클로라민 T 방법으로 ¹²⁵I(Amrad, Melbourne, Australia)로 표지화하고 린드모 분석(Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods.* 72, 77-89)으로 면역반응성을 측정했다.

[0416] 모든 결합 분석은 1% HSA/PBS에서 $1-2 \times 10^6$ 생 U87MG, Δ2-7 또는 A431 세포에 대해 4℃에서 90분 동안 저속 진탕 하에 수행했다. 10ng/ml ¹²⁵I-표지된 항체의 일정 농도를 적당한 미표지 항체의 농도를 증가시키면서 사용했다. 비특이적 결합은 미표지 항체의 10,000배 과량의 존재 시에 측정되었다. ¹²⁵I-방사능표지된 mAb806 및 DH8.3 항체는 모두 모체 U87MG 세포에 결합하지 않았다. 항온처리가 끝난 후, 세포는 세척하고 결합된 ¹²⁵I-표지된 항체를 COBRA II 감마 계수기(Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA)로 계수했다.

[0417] mAb806 및 DH8.3 항체는 모두 요오드화 시 높은 면역반응성을 유지했고, 일반적으로 mAb806은 90% 이상, DH8.3 항체는 45 내지 50% 유지했다. mAb806은 de2-7 EGFR 수용체에 대한 친화성이 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 인 반면, DH8.3의 친화성은 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 로 약 10배 낮았다. 요오드화된 항체는 U87MG 모세포에는 결합하지 않았다. mAb806은 세포당 평균 2.4×10^5 결합 부위를 인식했고, DH8.3 항체는 평균 5.2×10^5 부위에 결합했다. 따라서, 항체 간에 수용체 수에도 잘 일치할 뿐만 아니라, 동일 세포주에 대해 다른 de2-7 EGFR 특이적 항체로 측정된 바와 같이 세포당 2.5×10^5 de2-7 수용체를 나타낸 종래 보고와도 잘 일치했다(Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 57, 1510-5).

[0418] 실시예 5

[0419] U87MG, Δ2-7 세포에 의한 항체의 내재화

[0420] 표적 세포에 결합한 후 항체 내재화율은 종양 표적 성질 및 치료 선택사항에 영향을 미친다. 결과적으로, 본 발명자들은 U87MG, Δ2-7 세포에 결합한 후 mAb806 및 DH8.3 항체의 내재화를 FACS로 조사했다. U87MG, Δ2-7 세포는 DMEM에서 1시간 동안 mAb806 또는 DH8.3 항체($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)와 4℃에서 항온처리했다. 세척 후, 세포는 37℃로 예비가온된 DMEM으로 옮기고 37℃에서 항온처리 후 다양한 시점에서 분취량을 취했다. 내재화는 빙냉 세척 완충액(1% HSA/PBS)으로 분취량을 즉시 세척하여 정지시켰다. 시간 과정이 끝나면 세포는 전술한 바와 같이 FACS로 염색했다. 내재화 퍼센트는 다음 식을 사용하여 다양한 시점에서의 표면 항체 염색과 시간 0에서의 염색을 비교하여 계산했다: 내재화된 항체 % = $(\text{시간}_x \text{에서의 평균 형광} - \text{배경 형광}) / (\text{시간}_0 \text{에서의 평균 형광} - \text{배경 형광}) \times 100$. 이 방법은 종래 기술된 바와 같이 내재화를 측정하는 요오드화된 항체(mAb806)를 이용한 한 분석에서 확인되었다(Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 2927-35). 여러 시점에서 내재화율의 차이는 스튜던트 t-검정으로 비교했다. 이 연구를 통해, 데이터는 유의성에 대해 스튜던트 t-검정으로 분석하고, 단 생체내 생존율 분석은 윌콕슨 분석으로 분석했다.

[0421] 두 항체는 비교적 빠른 내재화를 보여, mAb806은 10분째, DH8.3은 30분째 안정 상태 수준에 도달했다(도 3). DH8.3의 내재화는 내재화율(10분째 내재화된 DH8.3은 80.5%인데 비해 mAb806은 36.8%임, $p < 0.01$) 및 60분째 내재화된 총량(93.5% 대 30.4%, $p < 0.001$)면에서 모두 훨씬 높았다. mAb806은 수행된 4가지 분석 모두에서 20분에 비해 30분과 60분에 내재화 수준이 약간 낮게 나타났다(도 3). 이러한 결과는 또한 요오드화된 mAb806을 기반으로 한 내재화 분석을 사용하여 확인되었다(데이터는 제시되지 않음).

[0422] 실시예 6

[0423] 항체 내재화의 전자현미경 분석

[0424] 앞서 언급한 항체 간에 내재화율의 차이가 있다면, 항체 내재화 트래피킹(trafficking)의 상세한 분석을 전자현미경을 이용하여 수행했다.

- [0425] U87MG.△2-7 세포는 젤라틴 코팅된 챔버 슬라이드(Nunc, Naperville, IL)에서 80% 융합성(confluence)까지 증식시킨 후, 빙냉 DMEM으로 세척했다. 그 다음, 세포를 DMEM에서 mAb806 또는 DH8.3 항체와 4℃에서 45분 동안 항온처리했다. 세척 후, 세포를 금-접합된(20nm 입자) 항-마우스 IgG(BBInternational, Cardiff, UK)와 4℃에서 추가 30분 동안 항온처리했다. 추가 세척 후, 예비가온된 DMEM/10% PCS를 세포에 첨가하고, 1분부터 60분까지 다양한 시간 동안 37℃에서 항온배양했다. 항체 내재화는 빙냉 배지로 정지시키고, 세포를 PBS/0.1% HSA 중의 2.5% 글루타르알데하이드로 고정시킨 후, 2.5% 사산화오스뮴에서 후-고정시켰다. 일련의 등급별 아세톤을 통한 탈수 후, 샘플은 Epon/Araldite 수지에 포매하고, Reichert Ultracut-S 마이크로톰(Leica)으로 초박편으로 절단하고, 니켈 그리드 위에 수집했다. 박편은 우라닐 아세테이트 및 시트르산납으로 염색한 후, 80kV Philips CM12 투과전자현미경에서 관찰했다. 피막소(coated pit)에 함유된 금 입자의 통계 분석은 카이제곱 검사로 수행했다.
- [0426] DH8.3 항체는 주로 피막소를 통해 내재화되었지만, mAb806은 거대음세포작용에 의해 내재화되는 것으로 나타났다(도 19). 사실, mAb806과 항온처리된 세포에서 형성된 32개 피막소의 상세한 분석 결과, 이들 모두 항체를 함유하고 있지 않은 것으로 나타났다. 이에 반해, DH8.3과 항온처리된 세포의 모든 피막소 중 약 20%는 항체 양성이고, 다수가 많은 금 입자를 함유하고 있었다. 피막소에 함유된 금 입자의 총 수를 통계 분석하면, 그 차이가 매우 유의적인 것으로 발견되었다($p < 0.01$). 20 내지 30분 후, 두 항체는 형태학상 리소솜을 닮은 구조를 볼 수 있었다(도 19C). 이 구조들 내의 세포 과편의 존재 역시, 이들의 리소솜 성질과 일치했다.
- [0427] 실시예 7
- [0428] 종양 보유 누드 마우스에서 항체의 생체분포
- [0429] mAb806 및 DH8.3 항체의 생체분포는 한쪽은 U87MG 이종이식편을 함유하는 누드 마우스, 다른 쪽은 U87MG.△2-7 이종이식편을 함유하는 누드 마우스에서 비교했다. 본 연구에는 DH8.3 항체가 4 내지 24시간 사이에 종양 표적화의 최고 수준을 나타낼을 입증한 종래 보고처럼 비교적 짧은 시간 기간을 선택했다(Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43).
- [0430] 종양 이종이식편은 3×10^6 U87MG, U87MG.△2-7 또는 A431 세포를 s.c. 주사하여 누드 BALB/c 마우스에 정착시켰다. U87MG.△2-7 이종이식편에서 de2-7 EGFR 발현은 다양한 시점에서 면역조직화학으로 측정했을 때 생체분포 기간 동안 안정하게 유지되었다(데이터 미제시). A431 세포는 면역조직화학으로 측정했을 때 종양 이종이식편으로 성장한 경우 mAb806 반응성을 유지했다. U87MG 또는 A431 세포는 다른 쪽에 U87MG.△2-7 세포를 주사하기 7 내지 10일 전에 한쪽에 주사했는데, 그 이유는 de2-7 발현 이종이식편에서 빠른 성장속도가 관찰되었기 때문이다. 항체는 방사능표지하고, 전술한 바와 같이 면역반응성에 대해 평가한 뒤, 종양의 무게가 100 내지 200mg가 되었을 때 마우스의 안구 뒤 경로로 주사했다. 각 마우스는 2종의 다른 항체(항체당 2 μ g): 2 μ Ci의 125 I-표지된 mAb806 및 2 μ Ci의 131 I 표지된 DH8.3 또는 528을 투여받았다. 표시가 없다면, 5마리 마우스 그룹은 주사후 다양한 시점에서 희생시키고, 심장 천자를 통해 혈액을 수집했다. 종양, 간, 비장, 신장 및 폐는 해부하여 수득했다. 모든 조직은 칭량하고 이중채널 계수 윈도우를 사용해 125 I 및 131 I 활성을 분석했다. 데이터는 각 항체마다 주사된 용량 기준물과 비교하여 측정된 ID%/g 종양으로 표현하거나, 또는 종양 대 혈액/간 비율(즉, ID%/g 종양을 ID%/g 혈액 또는 간으로 나눈 값)로 나타냈다. 그룹간의 차이는 스튜던트 t-검정으로 분석했다. 방사능표지된 mAb806을 주사한 후, 일부 종양은 포르말린에 고정시키고, 파라핀에 포매한 뒤, 5 μ m 절편으로 절단하고, X선 필름(AGFA, Mortsel, Belgium)에 노출시켜 방사능사진촬영으로 항체 국재화를 측정했다.
- [0431] ID%/g 종양에 의하면, mAb806은 U87MG.△2-7 이종이식편에서 8시간째 18.6m/g 종양의 최고 수준에 도달했고(도 4A), 이것은 혈액을 제외한 어떤 다른 조직보다 상당히 높은 것이었다. 또한, DH8.3도 8시간째 최고 종양 수준을 보였지만, 이 수준은 mAb806에 비해서는 통계학상($p < 0.001$) 낮은 8.8 m/g 종양이었다(도 4B). 두 항체의 수준은 24시간 및 48시간째 서서히 감소했다. 125 I-표지된 mAb806을 단독 주사한 후 8시간째 수집한 U87MG.△2-7 이종이식편 조직 절편의 방사능사진촬영은 생존 종양에 항체의 국재화를 분명하게 보여준다(도 20). 두 항체 모두 U87MG 모체 이종이식편의 특이적 표적화는 나타내지 않았다(도 4A 및 4B). 종양 대 혈액/간 비율과 관련하여, mAb806은 혈액(1.3의 비) 및 간(6.1의 비)에서 24시간째 최고의 비율을 보여주었다(도 5A 및 5B). DH8.3 항체는 8시간째 혈액(0.38의 비)과 24시간째 간에서(1.5의 비) 최고의 비율을 나타냈고(도 5A 및 5B), 이 두 비율은 모두 mAb806에서 수득되는 값보다는 상당히 낮은 값이다.

- [0432] 전술한 바와 같이, 종양에서 mAb806의 수준은 8시간째 최고 수준이었다. 이 최고 수준은 많은 종양-표적화 항체에 비해 비교적 빠르지만, 유사 용량의 항체 사용 시에 주사 후 4 내지 24시간째 최고 수준을 나타내는 de2-7 EGFR 특이적 항체를 사용한 다른 연구들과 완전히 일치한다(Hills et al., 1995; Reist et al., 1997; Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 56, 4970-7). 실제, 이전 보고서들과 달리, 8시간 시점은 항체 표적화가 빠르게 최고 수준에 이를 것이라는 가정에 포함되었다. mAb806에서 관찰되는 ID%/g 종양은 표준 요오드화 기술을 사용할 때 다른 de2-7 EGFR 특이적 항체에서 보고되는 값과 유사했다(Hills et al., 1995; Huang et al., 1997; Reist et al. (1995) Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.* 55, 4375-82).
- [0433] 이러한 초기 최고값의 이유는 아마도 2가지이다. 그 하나는, 형질감염된 U87MG 세포를 비롯한 de2-7 EGFR을 발현하는 종양은 종양 이중이식편으로서 매우 빠르게 성장한다. 따라서, 본 생체분포 연구에 사용된 비교적 짧은 기간 동안에도 종양 크기는 성장이 느린 종양에 비해 ID%/g 종양이 감소될 정도(4일 동안 질량이 5 내지 10배 증가)로 증가한다. 다른 하나는, mAb806의 내재화는 DH8.3에 비해 비교적 느렸지만, 많은 다른 종양 항체/항원계에 비해 여전히 빠르다. 내재화된 항체는 빠른 단백질분해작용을 겪고, 분해 산물은 세포로부터 배출된다(Press et al. (1990) Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res.* 50, 1243-50). 이러한 내재화, 분해 및 배출 과정은 세포 내에 보유되는 요오드화된 항체의 양을 감소시킨다. 결과적으로, 내재화된 항체는 비-내재화 대응물보다 낮은 수준의 표적화를 나타낸다. 여기에 보고된 전자현미경 데이터는 내재화된 mAb806이 아마도 빠른 분해가 일어나는 리소솜으로 빠르게 수송된다는 것을 입증한다. 이러한 관찰은 세포로부터의 요오드의 빠른 방출과 일치한다.
- [0434] de2-7 EGFR에서 발견된 독특한 연결 펩타이드에 지향성인 전술한 L8A4 모노클로날 항체는 mAb806과 유사한 방식으로 작용한다(Reist et al. (1997) *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl. Med. Biol.* 24, 639-47). de2-7 EGFR로 형질감염된 U87MG 세포 사용 시, 이 항체는 유사한 내재화율(mAb806이 1시간째 30%인데 비해 1시간째 35%)을 나타냈고, de2-7 EGFR로 형질감염된 3T3 섬유아세포를 사용할 때 비슷한 생체내 표적화를 보였다(mAb806은 8시간째 18% ID/g 종양인데 비해 24시간째 24% ID/g 종양의 최고값)(Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 57, 1510-5).
- [0435] 흥미롭게도, 종양 이중이식편에 상기 항체의 생체내 보유는 N-석신이미딜 5-요오도-3-피리딘 카르복실레이트로 표지될 때 상승했다(Reist et al., 1997). 이와 같이 표지된 보결분자단은 리소솜 pH에서 양하전이어서, 상승된 세포 유지를 나타냈다(Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 56, 4970-7). 상승된 유지는 방사능면역요법용 항체를 고려할 때 매우 유용하며, 이 방법은 요오드화된 mAb806 또는 이의 단편의 유지를 향상시키는데 사용할 수 있을 것이다.
- [0436] 실시예 8
- [0437] 증폭된 EGFR을 함유하는 세포에 대한 mAb806의 결합
- [0438] mAb806이 증폭된 수용체 유전자를 함유하는 세포에서 발현된 EGFR을 인식하는지를 조사하기 위해, A431 세포에 대한 결합성을 분석했다. 전술한 바와 같이, A431 세포는 사람 편평세포 암종 세포로서, 다량의 wtEGFR을 발현한다. A431 세포에 대한 mAb806의 결합성은 FACS 분석에 의해 낮지만, 매우 재현성 있게 관찰되었다(도 6). DH8.3 세포는 A431 세포에 결합하지 않았는데, 이는 mAb806의 결합성이 소량의 de2-7 EGFR 발현의 결과가 아니라는 것을 시사한다(도 6). 예상과 같이, 항-EGFR 528 항체는 A431 세포의 강한 염색성을 보였다(도 6). 이 결과를 바탕으로, mAb806의 A431 세포에 대한 결합성을 스캐차드 분석으로 특성화했다. 요오드화된 mAb806의 결합성은 비교적 낮았지만, 스캐차드의 일정한 데이터를 얻는 것은 가능했다. 이러한 3가지 실험의 평균은 $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 친화성 값을 제공했고, 이는 세포당 2.4×10^5 수용체를 나타낸다. 따라서, 이 수용체에 대한 친화성은 de2-7 EGFR의 친화성보다 약 10배 낮았다. 더욱이, mAb806은 A431 세포의 표면에서 발견되는 EGFR 중 일부만을 인식하는 것으로 보인다. 528 항체는 약 2×10^6 수용체를 측정했고, 이는 수많은 다른 연구들과 일치하는 것이다(Santon et al. (1986) Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of

A431 cells in nude mice. *Cancer Res.* 46, 4701-5).

[0439] 이러한 결과가 A431 세포주에만 단순히 제한되는 것이 아님을 보증하기 위해, EGFR 유전자의 증폭을 나타내는 2 가지 다른 세포주에서 mAb806 반응성을 조사했다. HN5 두경부 세포주(Kwok TT and Sutherland RM (1991) Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br. J. Cancer.* 64, 251-4) 및 MDA-468 유방암 세포주(Filmus et al. (1985) MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 898-905)는 EGFR 유전자의 복수 카피를 함유하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 보고와 일치하게, 528 항체는 이 두 세포주에서 강한 염색을 나타냈다(도 21). A431 세포주와 마찬가지로, mAb806은 두 세포주를 분명하게 염색했지만, 528 항체에서 관찰되는 정도보다는 낮았다(도 21). 따라서, mAb806 결합성은 A431 세포에 단순히 제한되는 것이 아니라, EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 세포에서 일반적으로 관찰되는 것으로 보인다.

[0440] mAb806에 의한 야생형 sEGFR의 인식은 에피토프의 노출을 위해 약간의 수용체 변성을 분명히 필요로 한다. 필요한 변성 정도는, 플라스틱 표면에 야생형 sEGFR의 흡착이 ELSIA 분석에서 mAb806의 강력한 결합을 유도했을지라도, 약간뿐이었다. mAb806은 A431 세포의 표면에서 EGFR의 약 10%에만 결합했으므로, 이 서브세트의 수용체는 de2-7 EGFR 절두로 유도되는 변경과 유사한 입체형태의 변경을 보유할 것으로 생각하기 쉽다. 실제, A431 세포에서 유전자 증폭에 의해 매개되는 EGFR의 매우 높은 발현은 일부 수용체의 부정확한 프로세싱을 유발하여 입체형태의 변경을 초래하기도 한다. 흥미로운 것은, mAb806을 이용한 A431 세포 용해물의 반정량적 면역블로팅이 SDS-PAGE와 웨스턴 전이 후 대부분의 A431 EGF 수용체를 인식할 수 있는 것으로 나타났다는 점이다. 이 결과는 mAb806이 입체형태가 변경된 A431 세포 표면의 수용체 서브세트에 결합한다는 주장을 더욱 지지한다. A431 세포에서의 이러한 관찰들은 면역조직화학 데이터와 일치하여, mAb806이 EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 신경아교종에 결합한다는 것을 입증한다. mAb806 결합성은 모체 U87MG 세포에서는 절대 음성이므로, U87MG 세포 표면 상에 "변성된" 수용체 수준이 검출 수준 이하일지라도, 이 현상은 증폭된 EGFR을 함유하는 세포에 제한적이라 볼 수 있다. 하지만, 요오드화된 mAb806은 1×10^7 세포 이하를 함유하는 U87MG 세포 펠릿에 결합하지 않았기 때문에 가능성이 없어 보일 수도 있다.

[0441] 실시예 9

[0442] mAb806에 의한 A431 세포의 생체내 표적화

[0443] 두번째 생체분포 연구는 A431 종양 이종이식편을 표적화할 수 있는지를 측정하기 위해 mAb806으로 수행했다. 이 연구는 양성 대조군으로서 모든 마우스에 포함된, U87MG.△2-7 이종이식편의 mAb806에 의한 표적화에 관하여 더 많은 정보를 얻기 위해 오랜 시간 동안 수행했다. 또한, A431 이종이식편의 양성 대조군으로서, 항-EGFR 528 항체를 포함했는데, 이것은 종래 연구에서 누드 마우스에서 성장한 A431 세포에 대한 상기 항체의 낮지만 유의적인 표적화가 증명된 바 있기 때문이다(Masui et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 44, 1002-7).

[0444] 처음 48시간 동안, mAb806은 초기 실험에서 관찰된 것과 거의 동일한 표적화 성질을 나타냈다(도 4A 대비 도 7A). ID %/g 종양 식에서, U87MG.△2-7 이종이식편에 존재하는 mAb806의 수준은 24시간 후 서서히 감소했지만, 정상 조직에서 검출되는 수준보다는 항상 높게 유지되었다. A431 이종이식편에서 흡수는 비교적 낮았지만, 간, 비장, 신장 및 폐와 같은 정상 조직에서 관찰되지 않았던 처음 24시간 동안 ID%/g 종양은 약간 증가했다(도 7A). 528 항체의 흡수는 ID%/g 종양으로 표현하면 두 이종이식편에서 매우 낮았는데(도 7B), 이것은 부분적으로 혈액으로부터 이 항체의 제거율이 더 빠르기 때문이다. ¹²⁵I-표지된 mAb806을 단독 주사한 후 24시간 후 수집한 A431 이종이식편 조직 절편의 방사능사진촬영은 피사의 중심 영역이 아닌 종양 주변의 생존 종양에 대한 항체의 국제화를 분명하게 예시한다(도 23). 종양 대 혈액 비율로 표현 시, mAb806은 U87MG.△2-7 이종이식편에서 72시간째, A431 이종이식편에서 100시간째 최고값을 나타냈다(도 8A, B). mAb806의 종양 대 혈액 비율은 A431 종양 대비 1.0을 초과하지 않았지만, 전체 기간 동안 증가하여(도 8B), 조사된 다른 모든 조직보다 높았고(데이터는 미제시), 이는 낮은 표적화 수준을 시사한다.

[0445] 528 항체의 종양 대 혈액 비율은 A431 이종이식편에서는 높은 수준이 관찰되었지만 mAb806과 유사한 프로필을 보였다(도 8A, B), mAb806은 72시간째, U87MG.△2-7 이종이식편에서 7.6의 최고 종양 대 간 비율을 나타냈고, 이는 정상 조직에 비해 상기 종양에서의 우선적인 흡수를 분명하게 입증해준다(도 8C). mAb806의 다른 종양 대 기관 비율은 간에서 관찰된 값과 유사했다(데이터는 미제시). A431 이종이식편에서 mAb806의 최고 종양 대 간

비율은 100시간째 2.0이었고, 이것은 정상 조직에 비해 종양의 흡수율이 약간 우세하다는 것을 시사한다(도 8D).

[0446] 실시예 10

[0447] 치료법 연구

[0448] mAb806의 효과는 2가지 이종이식편 질병 모델에서 평가했다 - 예방적 모델 및 정착된 종양 모델.

[0449] 이종이식편 모델

[0450] 종래 보고와 일치하게(Nishikawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(16), 7727-7731), de2-7 EGFR로 형질감염된 U87MG 세포는 모 세포 및 wtEGFR 형질감염된 U87MG 세포보다 더욱 빠르게 증식했다. 따라서, 동일한 마우스에서 두 세포 종류를 성장시키는 것은 불가능했다.

[0451] PBS 100ml 중의 종양 세포(3×10^6)는 4 내지 6주령 암컷 누드 마우스(Animal Research Centre, Western Australia, Australia)의 양 옆구리로 피하 접종했다. mAb806의 치료 효능은 예방적 종양 모델과 정착된 종양 모델 모두에서 조사했다. 예방적 모델에서, 2가지 이종이식편을 각각 보유하는 5마리 마우스는 종양 세포 접종 전일부터 mAb806 또는 비히클(PBS) 1mg 또는 0.1mg을 복강내 치료받았다. 치료는 2주 동안 매주 3회씩 총 6회 용량으로 계속되었다. 정착된 모델에서는 종양이 평균 용적이 $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ (U87MG. $\Delta 2-7$), $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ (U87MG), $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ (U87MG.wtEGFR) 또는 $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ (A431 종양)에 도달했을 때 치료를 개시했다. 종양 용적(mm^3)은 (길이 x 폭²)/2의 식으로 측정했다(여기서, 길이는 가장 긴 축이고, 폭은 길이에 대해 직각에서 측정한 값이다)(Clark et al. (2000) Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 6, 3621-3628). 데이터는 각 치료 그룹마다 평균 종양 용적 \pm S.E.로 나타냈다. 통계적 분석은 각 시점마다 스튜던트 t-검정을 이용해 수행했다. 이종이식편이 약 1.5 cm^3 용적에 이르면 동물은 안락사시키고, 종양은 조직검사를 위해 절제했다. 이 연구 프로젝트는 Animal Ethics Committee of the Austin and Repatriation Medical Centre의 승인을 받았다.

[0452] 종양 이종이식편의 조직학적 검사

[0453] 이종이식편은 절제하여 이등분했다. 반쪽은 10% 포르말린/PBS에 고정시킨 뒤, 파라핀 포매시켰다. 그 다음, 4 마이크로 절편으로 절단하고, 통상적인 조직 검사를 위해 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색했다. 다른 반쪽은 Tissue Tek® OCT 화합물(Sakura Finetek, Torrance, CA)에 포매시키고, 액체 질소로 동결한 뒤, -80°C 에 보관했다. 박막(5 마이크로) 저온유지 절편을 절단하고 빙냉 아세톤에서 10분 동안 고정시킨 뒤, 추가 10분 동안 공기 건조했다. 절편은 단백질 차단 시약(Lipshaw Immunon, Pittsburgh U.S.A.)에서 10분 동안 차단시킨 뒤, 비오틴화 1차 항체(1mg/ml)와 실온(RT)에서 30분 동안 항온처리했다. 모든 항체는 ECL 단백질 비오틴화 모듈(Amersham, Baulkham Hills, Australia)을 사용해 제조업체의 지시에 따라 비오틴화했다. PBS로 세정한 후, 절편은 스트렙타비딘 양고추냉이 퍼옥시다제 복합체와 추가 30분 동안 항온처리했다(Silenus, Melbourne, Australia). 마지막에 PBS 세정한 후, 절편을 과산화수소 존재 하에 3-아미노-9-에틸카르보졸(AEC) 기질(0.1M 아세트산, 0.1M 아세트산나트륨, 0.02M AEC(Sigma Chemical Co., St Louis, MO))에 30분 동안 노출시켰다. 절편은 물로 세정하고 헤마톡실린으로 5분 동안 대비염색하고 현미경조사했다.

[0454] 예방적 모델에서 mAb806의 효과

[0455] mAb806은 예방적 이종이식편 모델에서 U87MG 및 U87MG. $\Delta 2-7$ 종양에 대한 효능에 대해서 조사했다. 항체 또는 비히클은 종양 접종 전일에 i.p. 투여하고, 2주 동안 매주 3회씩 투여했다. mAb806은 주사당 1mg 용량에서 wtEGFR을 발현하는 모체 U87MG 이종이식편의 성장에 어떠한 효과도 미치지 않았다(도 9A). 이에 반해, mAb806은 U87MG. $\Delta 2-7$ 이종이식편의 성장을 용량 의존적 방식으로 유의적으로 억제했다(도 9B). 20일째, 대조군 동물을 희생시켰을 때, 평균 종양 용적은 대조군의 경우 $1637 \pm 178.98 \text{ mm}^3$ 이었고, 주사당 0.1mg 그룹의 경우에는 통계적으로 더 작은 $526 \pm 94.74 \text{ mm}^3$ 였으며($p < 0.0001$), 1mg 주사 그룹의 경우에는 $197 \pm 42.06 \text{ mm}^3$ 이었다($p < 0.0001$). 치료 그룹은 24일째 희생시켰고, 이때 평균 종양 용적은 0.1mg 처리 그룹의 경우 $1287 \pm 243.03 \text{ mm}^3$, 1mg 그룹의 경우 $492 \pm 100.8 \text{ mm}^3$ 이었다.

[0456] 정착된 이종이식편 모델에서 mAb806의 효능

[0457] 예방적 이종이식편 모델에서 mAb806 효능이 제공되었다면, 다음으로 정착된 종양 이종이식편의 성장을 억제하는

능력을 조사했다. 항체 처리는 예방적 모델에서 기술한 바와 같지만, 단 종양이 U87MG.△2-7 이중이식편의 경우 평균 종양 용적 $65 \pm 6.42 \text{mm}^3$ 에 도달할 때, 모체 U87MG 이중이식편의 경우 $84 \pm 9.07 \text{mm}^3$ 에 도달했을 때 개시했다. 역시, mAb806은 1mg 주사 용량에서 모체 U87MG 이중이식편의 성장에 어떠한 영향도 미치지 않았다(도 10A). 이에 반해, mAb806은 U87MG.△2-7 이중이식편의 성장에 용량 의존적 방식으로 유의적으로 억제했다(도 10B). 대조군 동물을 희생시키기 하루 전인 17일째, 평균 종양 용적은 대조군의 경우 $935 \pm 215.04 \text{mm}^3$, 0.1mg 주사 그룹의 경우 $386 \pm 57.51 \text{mm}^3$ ($p < 0.01$) 및 1mg 주사 그룹의 경우 $217 \pm 58.17 \text{mm}^3$ ($p < 0.002$)이었다.

[0458] mAb806에 의해 관찰되는 성장 억제가 de2-7 EGFR을 발현하는 세포에 제한적인지를 조사하기 위해, U87MG.wtEGFR 종양 이중이식편에 대한 효능을 정착된 모델에서 조사했다. 이 세포들은 de2-7 EGFR 발현없이 EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 종양 모델로서 작용한다. mAb806 처리는 평균 종양 용적이 $73 \pm 7.5 \text{mm}^3$ 에 이르렀을 때 시작했다. mAb806은 비히클 처리된 대조군 종양에 비해 정착된 U87MG.wtEGFR 이중이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 10C). 대조군 동물을 희생시킨 날, 대조군 그룹의 평균 종양 용적은 $960 \pm 268.9 \text{mm}^3$ 이고 1mg 주사 처리된 그룹은 $468 \pm 73.38 \text{mm}^3$ 이었다($p < 0.04$).

[0459] 정착된 종양의 조직학적 및 면역조직화학적 분석

[0460] 대조군 및 mAb806-처리된 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이중이식편(각각 24일 및 42일에 수집) 간에 잠재적인 조직학적 차이를 평가하기 위해, 포르말린-고정 및 파라핀 포매된 절편을 H&E로 염색했다. mAb806으로 처리된 U87MG.wtEGFR 이중이식편(최종 치료 후 9일째 수집)과 U87MG.△2-7(최종 치료 후 3일째 수집) 유래의 절편에서 괴사 영역이 관찰되었다. 이 결과는 다수의 종양 이중이식편($n=4$)에서 일관되게 관찰되었다. 하지만, 대조군으로 처리된 이중이식편 유래의 절편에서는 mAb806 처리 시에 관찰된 동일한 괴사 영역이 보이지 않았다. mAb806 또는 대조군 처리된 U87MG 이중이식편 유래의 절편은 또한 H&E로 염색했고, 두 그룹 간에 세포 생존도는 차이를 보이지 않았고, 이것은 mAb806 결합성이 종양 이중이식편 내에서 세포 생존도/괴사 감소를 유도한다는 가설을 지지한다.

[0461] U87MG, U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이중이식편 절편의 면역조직화학적 분석은 mAb806 처리 후 de2-7 및 wtEGFR 발현 수준을 측정하기 위해 수행했다. 절편은 앞에서와 같이 24일과 42일에 수집하고, 528 또는 806 항체로 면역염색했다. 예상한 바와 같이, 528 항체는 처리된 종양 및 대조군 종양 간에 강도의 분명한 감소 없이 모든 이중이식편 절편을 염색했다. U87MG 절편의 염색은 mAb806에 의해 검출 불가능했지만, U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이중이식편 절편은 양성 염색이 관찰되었다. 대조군과 처리된 U87MG.△2-7 및 U87MG.wtEGFR 이중이식편 간에는 mAb806 염색 밀도의 차이가 없었으며, 이는 항체 처리가 de2-7 또는 wtEGFR 발현을 하향조절하지 않는다는 것을 시사한다.

[0462] mAb806을 이용한 A431 이중이식편의 처리

[0463] mAb806의 항-종양 효과가 U87MG 세포에 제한적이지 않다는 것을 입증하기 위해, 상기 항체를 A431 이중이식편을 보유한 마우스에게 투여했다. 이 세포는 증폭된 EGFR 유전자를 함유하고 세포당 약 2×10^6 수용체를 발현한다. 전술한 바와 같이, mAb806은 이러한 EGFR의 약 10%에 결합하고 A431 이중이식편을 표적화한다. mAb806은 전술한 예방적 이중이식편 모델에서 조사했을 때 A431 이중이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 11A). 13일째, 대조군 동물을 희생시켰을 때, 평균 종양 용적은 대조군에서 $1385 \pm 147.54 \text{mm}^3$ 였고, 1mg 주사 처리 그룹의 경우 $260 \pm 60.33 \text{mm}^3$ 이었다($p < 0.0001$).

[0464] 별도의 실험에서, 0.1mg mAb의 용량도 역시 예방적 모델에서 A431 이중이식편의 성장을 유의적으로 억제했다.

[0465] 예방적 A431 이중이식편 모델에서 mAb806의 효능이 제공되었다면, 정착된 종양 이중이식편의 성장을 억제하는 능력도 조사했다. 항체 처리는 예방적 모델에서 기술한 바와 같지만, 종양이 평균 종양 용적 $201 \pm 19.09 \text{mm}^3$ 에 도달할 때까지 시작하지 않았다. mAb806은 정착된 종양 이중이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 11B). 13일째, 대조군 동물이 죽었을 때, 평균 종양 용적은 대조군 그룹의 경우 $1142 \pm 120.06 \text{mm}^3$ 이고, 1mg 주사 그룹의 경우 $451 \pm 65.58 \text{mm}^3$ 이었다($p < 0.0001$).

[0466] 요약하면, 본원에 기술된 mAb806을 이용한 치료법 연구는 U87MG.△2-7 이중이식편 성장의 용량 의존적 억제를 분명하게 입증했다. 이에 반해, 모체 U87MG 이중이식편은 생체내에서 wtEGFR을 계속 발현한다는 사실에도 불구하고 억제에 전혀 관찰되지 않았다. mAb806은 이중이식편 용적을 유의적으로 감소시킬 뿐만 아니라, 종양 내에 유의적인 괴사도 유도했다. 이것은 사람 de2-7 EGFR 발현성 신경아교종 이중이식편에 대하여 생체내에서 상기 항체의 성공적인 치료학적 용도를 보여주는 최초의 보고이다.

- [0467] EGFR의 유전자 증폭은 많은 여러 종양에서 보고되었고, 신경아교종의 약 50%에서 관찰된다(Voldberg et al., 1997). 수용체 유전자 증폭에 의해 매개된 후속 EGFR 과발현이 세포내 시그널링 및 세포 성장을 증가시켜 성장을 유리하게 할 수 있는 것으로 제안되었다(Filmus et al., 1987). U87MG 세포주는 EGFR 유전자 증폭 과정을 모방하는 신경아교종 세포를 생산하기 위해 wtEGFR로 형질감염시켰다. 정착된 U87MG.wtEGFR 이종이식편의 mAb806으로의 처리는 유의적인 성장 억제를 초래했다. 따라서, mAb806은 EGFR 유전자의 증폭을 함유하는 세포에 대하여 생체내 항종양 활성을 매개한다. 흥미롭게도, U87MG.wtEGFR 이종이식편의 mAb806 억제제는 U87MG.△2-7 종양에서 관찰되는 것보다 효과가 적은 것으로 나타난다. 이것은 아마도 mAb806이 증폭된 EGFR에 대해 낮은 친화성을 나타내고, 세포 표면에서 발현된 수용체 중 적은 비율에만 결합한다는 사실을 반영한다. 하지만, U87MG.wtEGFR 이종이식편 용적에 대한 적은 효과에도 불구하고, mAb806 처리는 이러한 이종이식편 내에서 넓은 괴사 영역을 초래한다는 것을 주목해야 한다.
- [0468] mAb806이 U87MG 유래의 세포주의 억제만을 매개한다는 가능성을 배제하기 위해, A431 이종이식편에 대하여 효능을 검사했다. 이 편평세포 암종 유래의 세포주는 시험관내 및 생체내 모두에서 유지되는 유의적인 EGFR 유전자 증폭을 함유한다. A431 이종이식편의 mAb806으로의 처리는 예방적 모델 및 정착된 모델 모두에서 유의적인 성장 억제를 초래했고, 이는 mAb806의 항종양 효과가 형질감염된 U87MG 세포주에 제한적이지 않다는 것을 시사한다.
- [0469] 실시예 11
- [0470] mAb806 및 AG1478을 이용한 A431 이종이식편의 병용 요법 치료
- [0471] AG1478과 병용된 mAb806의 항종양 효과는 A431 이종이식편을 보유한 마우스에서 검사했다. AG1478(4-(3-클로로아닐리노)-6,7-디메톡시퀴나졸린)은 EGFR 키나제 대 HER2-neu 및 혈소판-유래 성장인자 수용체 키나제의 강력하고 선택적인 억제제이다(Calbiochem Cat. No. 658552). 3가지 대조군이 포함되었다: 비히클 단독 처리, 비히클 + mAb806 단독 처리 및 비히클 + AG1478 단독 처리. 결과는 도 12에 도시했다. 0.1mg mAb806은 이종이식편 투여 1일전과 이종이식편 투여 후 1, 3, 6, 8 및 10일 후에 투여했다. 400 μ g AG1478은 이종이식편 투여 후 0, 2, 4, 7, 9 및 11일 후에 투여했다.
- [0472] AG1478 및 mAb806은 각각 단독 투여했을 때, 둘 다 종양 용적의 유의적인 감소를 초래했다. 하지만, 병용 시, 종양 용적의 감소가 크게 향상되었다.
- [0473] 또한, A431 세포에 대한 mAb806 대 EGFR의 결합을 AG1478의 부재 및 존재 하에 평가했다. 세포는 무혈청 배지에 밤새 방치한 뒤, AG1478로 37℃에서 10분 동안 처리하고, PBS로 2회 세척한 다음, 1% 트리톤으로 용해하고, 용해물을 12,000g에서 10분 동안 원심분리하여 제조했다. 그 다음, 용해물은 문헌[Schooler and Wiley, Analytical Biochemistry 277, 135-142 (2000)]에 기술된 분석법의 변형으로 ELISA에 의해 806 반응성에 대해 평가했다. 플레이트는 PBS/EDTA 중의 mAb806 10 μ g/ml으로 실온에서 밤새 코팅한 뒤, 2회 세척했다. 그 다음, 플레이트는 10% 혈청 알부민/PBS로 2시간 동안 37℃에서 차단시키고 2회 세척했다. 1:20 세포 용해물을 10% 혈청 알부민/PBS에 1시간 동안 37℃에서 첨가한 뒤, 4회 세척했다. 10% 혈청 알부민/PBS 중의 항-EGFR(SC-03; Santa Cruz Biotechnology Inc.)을 실온에서 90분 동안 반응시키고, 플레이트를 4회 세척한 뒤, 10% 혈청 알부민/PBS 중의 항-토끼-HRP(Silenus 제품인 경우 1:2000)를 실온에서 90분 동안 첨가하고, 4회 세척한 뒤, 기질로서 ABTS를 이용하여 발색시켰다. mAb806 결합성은 AG1478의 양이 증가할수록 크게 증가하는 것으로 발견되었다(도 13).
- [0474] 실시예 12
- [0475] EGFR 상태에 대해 사전형별화된 사람 아교모세포종에서의 면역반응성
- [0476] 아교모세포종에서 높은 빈도의 EGFR 발현, 증폭 및 돌연변이가 제공되었다면, 이종이식편 외에 다른 종양에서 806의 특이성을 평가하기 위해 상세한 면역조직화학 연구를 수행했다. 16개 아교모세포종의 패널을 면역조직화학으로 분석했다. 이러한 패널의 16개 아교모세포종은 증폭된 야생형 EGFR 및 de2-7 EGFR 발현의 존재에 대해 RT-PCR로 사전형별화했다. 이 종양들 중 6개는 wtEGFR 전사체만을 발현했고, 10개는 wtEGFR 유전자 증폭을 보유했으며, 이들 중 5개는 야생형 EGFR 전사체만을 나타내고, 5개는 야생형 EGFR과 de2-7 유전자 전사체를 모두 나타냈다.
- [0477] 신선 동결된 조직의 5mm 절편을 조직검사 슬라이드에 적용하고 저온 아세톤에서 10분 동안 고정시켜 면역조직화학 분석을 수행했다. 결합된 1차 항체는 비오틴화된 말 항-마우스 항체로 검출한 뒤, 아비딘-비오틴-복합체 반응으로 검출했다. 발색원으로서, 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(DAB)를 사용했다. 조직에서 면역조직화학 반응성의 정도는 광학현미경으로 추정하고, 다음과 같이 25% 증분씩 면역반응성 세포의 수에 따라 등

급을 매겼다:

[0478] 국소 = 5% 미만

[0479] + = 5-25%

[0480] ++ = 25-50%

[0481] +++ = 50-75%

[0482] ++++ => 75%

[0483] 528 항체는 모든 종양에서 강한 반응성을 보인 반면, DH8.3 면역염색은 de2-7 EGFR을 발현하는 종양에 제한적이었다(표 2). 이전 FACS 및 로제팅 분석의 결과와 일치하게, mAb806은 미증폭된 EGFR 유전자로부터 wtEGFR 전사체를 발현하는 아교모세포종과 반응하지 않았다(표 2). 이러한 mAb806에 대한 반응성 패턴은 이중익식편 연구에서 관찰된 것과 유사하고, 이 역시 이 항체가 세포 표면에서 발현된 wtEGFR이 아닌 de2-7 및 증폭된 EGFR을 인식한다는 것을 시사한다.

표 2

야생형 EGFR 및 돌연변이된 de2-7 EGFR의 존재 및 이들의 증폭 상태에 대해
사전형별화된 아교모세포종에 대한 mAb 528, DH8.3 및 806의 면역반응성

증폭	de2-7 EGFR 발현	528	DH8.3	806
	무	++++	-	-
	무	++++	-	.*
	무	++++	-	-
	무	++	-	-
	무	+++	-	-
	무	++++	-	-
유	무	++++	-	++++
유	무	++++	-	+
유	무	++++	-	+++
유	무	++++	-	++++
유	무	++++	-	+.++++
유	유	++++	++++	++++
유	유	++++	++++	++++
유	유	++++	++++	++++
유	유	++++	++++	++++
유	유	++++	++	++

* 국소 염색

[0484]

[0485] 실시예 13

[0486] 정상조직에서의 EGFR 면역반응성

[0487] de2-7 EGFR이 정상 조직에서 발현되는지를 측정하기 위해, mAb806 및 DH8.3을 이용한 면역조직화학 연구를 25개 조직의 패널에서 수행했다. 어떠한 검사 조직에서도 mAb806 또는 DH8.3과의 강한 면역반응성은 없었고, 이것은 de2-7 EGFR이 정상 조직에는 없다는 것을 시사한다(표 3). mAb806에 의한 편도에 존재하는 약간의 가변적 염색은 상피의 점막 편평세포와 표피의 기저세포 층에 제한적이었다. 태반에서는 영양막 상피의 간헐적 면역염색이 관찰되었다. 흥미롭게도, wtEGFR의 높은 내인성 수준을 발현하는 두 조직, 간과 피부는 어떤 유의적인 mAb806 반응성도 나타내지 못했다. 간 샘플에서는 반응성이 전혀 관찰되지 않았고, 일정하지 않은 약한 국소 반응성만이 피부 샘플의 기저 각질세포와 편도 점막의 편평상피세포에서 간헐적(연구된 모든 샘플의 10% 이하에서)으로 검출되었으며, 이 역시 상기 항체는 세포 표면에서 발현된 wtEGFR에 임의의 유의적인 정도로 결합하지 않는다는 것을 입증하는 것이다(표 3). 모든 조직은 528 항체에 의해 관찰되는 보편적인 염색에 의해 입증되는 것처럼

wtEGFR 양성이었다(표 3).

표 3

정상 조직에서 528, DH8.3 및 806의 반응성

조직	528	DH8.3	806
식도	양성	-	-
위	양성	-	-
십이지장	양성	-	-
소장/십이지장	양성	-	-
결장	양성	-	-
간	양성	-	-
침샘 (이하선)	양성	-	-
신장	양성	-	-
방광	양성	-	-
전립선	양성	-	-
고환	양성	-	-
자궁 (경부/내막)	양성	.*	-
난관	양성	-	-
난소	양성	-	-
유방	양성	.*	-
태반	양성	-	-
말초 신경	양성	-	-
골격근	양성	-	-
갑상선	양성	-	-
림프절	양성	-	-
비장	양성	-	-
편도	양성	-	- 편평상피세포 기저층의 간헐적 약한 반응성
심장	양성	-	-
폐	양성	-	-
피부	양성	-	- 편평상피세포 기저층의 간헐적 약한 반응성

* 다양한 조직에서 약간의 간질 염색

실시예 14

다양한 종양에서의 EGFR 면역반응성

다른 종양 종류에서 de2-7 EGFR의 정도는 12가지 다른 악성종양의 패널을 사용해 조사했다. 528 항체는 흑색종 및 정상피종을 제외한 분석된 많은 종양에서 종종 균일한 염색을 나타냈다. DH8.3 면역반응성은 존재할 때 간헐적으로 국소 종양 세포에 제한적이었고, 이것은 이 검출 시스템을 사용 시, 뇌 외측 종양에서 de2-7 EGFR 발현이 존재하더라도 거의 없다는 것을 시사한다(표 4). 또한, 일부 종양에서는 DH8.3 항체에 의해 결합 조직의 다양한 미만성 염색과 혈관의 국소 염색이 존재했다(표 4). 이 염색은 사용된 항체 농도에 매우 의존적이었고, 비특이적 배경 반응성이 간주되었다. mAb806은 두경부 종양의 64%와 폐 암종의 50%에서 양성 염색을 나타냈다(표 4). 증례의 30%에서 양성인 요로 종양을 제외한 다른 곳에서는 mAb806 반응성이 거의 없었다.

두경부암 및 폐암은 DH8.3 항체에 대해 음성이기 때문에, 이들 종양에서 그 mAb에 의해 관찰되는 반응성은 EGFR 유전자 증폭과 관련이 있을 수 있다.

표 4

종양 패널에 존재하는 모노클로날 항체 528, DH8.3 및 806

종양	528	DH8.3	806
악성 흑색종 전이	0/10	0/10	0/10
방광 (이행상피암종, 편평세포암종, 선암종)	10/10 (7x++++, 2x++++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x++++, 1x++)
유선	6/10 (3x++++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
두경부암 (편평세포암종)	11/11 (1x+++ - 10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++, 3x+++ , 1x+)
폐 (편평세포암종, 선암종, 신경내분비암종)	12/12 (10x++++ - 1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x+++)
평활근육종	5/5 (4x++++, 1x+)	0/5	0/5
지방육종	5/5 (2x + 3x +++)	0/5	0/5*
활막육종	4/5* (4x +++)	0/5	0/5*
Mfn 악성 섬유성 조직구종	4/5*	0/5*	0/5*
결장 암종	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
정상피종	1/10*	1/10*	0/10
난소 (장액성-유두상)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

*국소 염색

[0493]

[0494] 실시예 15

[0495] EGFR 상태에 대해 선택되지 않은 사람 아교모세포종에서의 면역반응성

[0496] mAb806의 독특한 특이성을 확인하고 반응성을 평가하기 위해, EGFR 상태에 대해 사전선택되지 않은 46개의 아교모세포종 패널에서 528 및 DH8.3 항체와 비교했다. 528 항체는 2개(27번 및 29번)를 제외한 모든 샘플에서 강하고 균질하게 양성이었다(44/46, 95.7%). 이 두 케이스는 mAb806 및 mAbDH8.3에 대해서도 음성이었다. mAb806은 27/46(58.7%) 케이스에 양성이었다고, 이 중 22개는 종양 50% 이상에서 균질한 면역반응성을 나타냈다. DH8.3 항체는 15/46(32.6%) 아교모세포종에서 양성이었다고, 이 중 9개는 균질한 면역반응성을 보였다. 이와 같이 선택되지 않은 종양의 면역화학적 염색은 표 5에 정리했다.

[0497] 하나(35번)를 제외한 모든 케이스에 mAb806과 DH8.3은 서로 일치했다. EGFR 증폭의 존재에 대한 분자 분석은 44가지 케이스에 수행되었다(표 5). 이 중, 30가지 케이스는 종래 확립된 mAb806 면역반응성 패턴과 공동형별화되었고; 예컨대, 16개 mAb806-음성 케이스는 EGFR 증폭을 전혀 나타내지 않았고, 14개 EGFR-증폭된 케이스는 역시 mAb806 면역양성이었다. 하지만, 806 면역반응성을 나타낸 13개 케이스는 EGFR 증폭 음성이었지만, 1가지 EGFR-증폭 케이스는 mAb806 음성이었다. 이러한 증폭 음성과 806 양성인 케이스의 돌연변이 상태에 대한 추가 분석에 대해서는 이하에 설명하며, EGFR 증폭 음성이고 806에 의해 인식되는 13개 케이스 대부분에 대한 설명을 제공한다.

[0498] 이어서, RT-PCR에 의한 결실 돌연변이의 분자 분석은 41/46 케이스에 수행했다(표 5). 이 중에서, 34개 케이스는 결실 돌연변이에 특이적인 DH8.3과 공동형별화되었는데, 12개 케이스는 RT-PCR과 면역조직화학 모두에서 양성이었다고, 22개 케이스는 음성/음성이었다. 3개의 케이스(#2, #34, 및 #40)는 결실 돌연변이에 대한 DH8.3 양성/RT-PCR 음성이었다고, 3개의 케이스(#12, #18 및 #39)는 DH8.3 음성/RT-PCR 양성이었다. 종래 특이성 분석에 기초하여 예상되는 바와 같이 mAb806 면역반응성은 1개의 케이스(#35)를 제외한 모든 DH8.3 양성 조직에서 관찰되

었다.

[0499]

케이스 #3은 또한 de2-7 돌연변이의 서열을 포함하는 돌연변이(표 5에서 A2로 지칭함)를 나타냈지만, 이것은 801 염기가 상실된 고전적 de2-6 결실인 것으로 보이지 않았다(데이터는 미제시). 이 케이스는 DH8.3 반응성은 음성이었지만, 806과는 반응성을 나타냈고, 이것은 806이 다른 아마도 독특한 EGFR 돌연변이를 인식할 수 있다는 것을 시사한다.

표 5

mAb 528, 806 및 DH8.3을 이용한 46개 비선택 아교모세포종의 면역조직화학 분석

#	528	806	DH8.3	EGFR 증폭*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (검출)	음성	N	A2
4	++++	++++	음성	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	음성	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	음성	A	WT
10	++++	음성	음성	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	음성	A	5' MUT
13	++++	++++	음성	N	WT
14	++	음성	음성	Nd	nd
15	++	++	음성	N	WT
16	+	음성	음성	N	nd
17	++++	음성	음성	N	WT
18	++++	++++	음성	A	5' MUT
19	++++	++++	음성	N	WT
20	++++	음성	음성	N	WT
21	++++	++++	음성	N	WT
22	+++	음성	음성	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	음성	A	WT
25	++++	음성	음성	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5' MUT
27	음성	음성	음성	N	WT
28	+++	음성	음성	N	WT
29	음성	음성	음성	N	WT
30	++++	++++	음성	N	WT
31	++++ 부분 검출	음성	음성	N	nd

[0500]

32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	음성	++++	Δ	5' MUT
36	+++	++	+++	Δ	5' MUT
37	++++	+	+	Δ	5' MUT
38	++++	음성	음성	N	WT
39	++	음성	음성	N	5' MUT
40	++++	++++	+	Δ	WT
41	++	음성	음성	N	WT
42	++++	++++	음성	A	WT
43	++++	음성	음성	nd	nd
44	++++	음성	음성	N	WT
45	++++	음성	음성	N	WT
46	++++	음성	음성	N	nd

* N = 증폭되지 않음, A = 증폭됨,

* WT = 야생형, 5'-mut

nd = 수행되지 않음

[0501]

[0502]

806 항체 반응성은 19/27 또는 70% 이상의 케이스에서 증폭된 또는 de2-7 돌연변이 EGFR과 공동형별화되었다. 이러한 8개 케이스 중 2개는 또한 DH8.3 반응성인 것도 주목할 만하다.

[0503]

실시예 16

[0504]

두개내 신경아교종 종양의 전신 치료 및 분석

[0505]

항-ΔEGFR 모노클로날 항체, mAb806의 효능을 검사하기 위해, 두개내 ΔEGFR-과발현성 신경아교종 이종이식편을 보유한 누드 마우스를 mAb806, 이소타입 대조군 IgG 또는 PBS의 복강내 주사로 처리했다.

[0506]

사람 아교모세포종의 1차 체외이식편은 배양물에서 증폭, 재배열된 수용체의 발현을 빠르게 상실하기 때문에, 이러한 발현을 나타내는 기존 아교모세포종 세포주는 없다. 사람 종양에서 관찰되는 수준과 비슷한 발현 수준을 유지하기 위해, U87MG, LN-Z308 및 A1207(S. Aaronson 박사의 선물, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) 세포를 ΔEGFR, 키나제-결손성 ΔEGFR(DK) 또는 야생형 EGFR(wtEGFR) 바이러스로 감염시키고, 역시 종래 기술된 바와 같이 G418에 대한 내성을 부여했다(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 7727-7731).

[0507]

다양한 EGFR 대립유전자의 유사한 수준을 발현하는 집단(이 발현 수준은 25개 유전자 카피의 증폭 수준에 대략 대응한다; 사람 아교모세포종은 일반적으로 절두된 수용체의 10 내지 50개 유전자 카피의 증폭 수준을 보유한다)은 종래 기술된 바와 같이(Nishikawa et al., 1994) FACS로 선택하여, 각각 U87MG.ΔEGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308.ΔEGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207.ΔEGFR, A1207.DK, 및 A1207.wtEGFR로 명명했다. 각각 G418 함유 배지에서 유지시켰다(U87MG 세포주, 400 μg/ml; LN-Z308 및 A1207 세포주, 800 μg/ml).

[0508]

U87MG.ΔEGFR 세포(1×10^5) 또는 5×10^5 LN-Z308.ΔEGFR, A1207.ΔEGFR, U87MG, U87MG.DK, 및 U87MG.wtEGFR 세포는 5 μl PBS에서, 종래 기술된 바와 같이 누드 마우스 뇌의 우측 선조체에 이식했다(Mishima et al. (2000) A peptide derived from the non-receptor binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8484-8489). mAb806 또는 IgG2b 이소타입 대조군을 이용한 전신 치료법은 이식후 0일부터 14일까지 격일로 mAb 1μg을 100μl 용적으로 i.p. 주사하여 수행했다. 뇌내 U87MG.ΔEGFR 종양의 직접 치료법에는 10μg mAb806 또는 IgG2b 이소타입 대조군을 5μl 용적으로 종양 주사 부위에 1일째부터 5일 동안 격일로 주사했다.

[0509]

PBS 또는 이소타입 대조군 IgG로 처리된 동물은 중간 생존기간이 13일이었고, 반면 mAb806 처리된 마우스는 중간 생존기간이 최고 21일로 61.5% 증가했다($P < 0.001$; 도 24A).

- [0510] 이식 3일 후, 종양 정착 후, 마우스 처리는 또한 mAb806-처리된 동물의 중간 생존율을 대조군에 비해 46.1%(13 일로부터 19일로; $P < 0.01$) 연장시켰다(데이터 미제시).
- [0511] 이러한 mAb806의 항종양 효과가 U87MG.△EGFR 이종이식편 이상까지 확대되는지 측정하기 위해, 유사한 처리를 LN-Z308.△EGFR 및 A1207.△EGFR의 다른 신경아교종 세포 이종이식편을 보유한 동물에게 처치했다. LN-Z308.△EGFR 이종이식편을 보유한 mAb806-처리된 마우스의 중간 생존율은 대조군의 19일로부터 58일로 연장되었다($P < 0.001$; 도 24B). 놀랍게도, 8마리 mAb806-처리된 동물 중 4마리는 60일 이상 생존했다(도 24B). A1207.△EGFR 이종이식편을 보유한 동물의 중간 생존기간도 역시 대조군의 24일로부터 29일로 연장되었다($P < 0.01$; 데이터 미제시).
- [0512] mAb806 처리는 △EGFR-과발현 뇌 종양 성장을 억제한다
- [0513] U87MG.△EGFR 및 LN-Z308.△EGFR 이종이식편을 보유한 마우스는 각각 9일과 15일째 안락사시켰다. 종양 절편은 조직병리학적으로 분석하고 종양 용적을 측정했다. 동물 생존율에 대한 결과와 일치하게, mAb806 처리는 용적을 U87MG.△EGFR의 약 90% 정도 유의적으로 감소시켰고($P < 0.001$; 도 24C), LN-Z308.△EGFR은 대조군에 비해 95% 이상($P < 0.001$; 도 24D)의 이종이식편을 감소시켰다. A1207.△EGFR 종양을 보유하는 동물에서 유사한 결과가 수득되었다(65% 용적 감소, $P < 0.01$; 데이터 미제시).
- [0514] mAb806을 이용한 종양내 처리는 U87MG.△EGFR 뇌 종양을 보유하는 마우스의 생존율을 연장시킨다.
- [0515] U87MG.△EGFR 이종이식편을 치료하기 위한 mAb806의 직접 종양내 주사 효능도 측정했다. 동물에게 이식 1일 후 mAb806 또는 이소타입 대조군 IgG의 종양내 주사를 제공했다. 대조군 동물은 15일 동안 생존한 반면, mAb806 처리된 마우스는 18일 동안 생존했다($P < 0.01$; 도 24E). mAb806을 이용한 종양내 치료는 다소 효과적이었지만, 복수의 두개내 주사 및 증가된 감염 위험률의 단점을 수반했다. 따라서 향후 연구에는 전신 치료에 초점을 맞추었다.
- [0516] mAb806 처리는 U87MG 또는 U87MG.DK 두개내 이종이식편이 아닌 U87MG.wtEGFR을 보유한 마우스의 생존율을 약간 연장시킨다.
- [0517] mAb806에 의한 성장 억제가 △EGFR을 발현하는 종양에 대해 선택적인지를 측정하기 위해, U87MG, U87MG.DK(키나제 결손성 △EGFR) 및 U87MG.wtEGFR 뇌 이종이식편을 보유하는 동물을 처리했다. mAb806 처리는 낮은 수준의 내인성 야생형 EGFR(wtEGFR)을 발현하는 U87MG 종양 이식된 마우스의 생존율을 연장시키지 않았고(도 25A)(Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272, 2927-2935), 또는 낮은 수준의 내인성 wtEGFR 외에도 키나제-결손성 △EGFR을 과발현하는 U87MG/DK 이종이식편을 보유하는 동물의 생존율을 연장시키지 못했다(도 25B). mAb806 처리는 wtEGFR을 과발현하는 U87MG.wtEGFR 종양을 보유한 마우스의 생존율을 약간 연장시켰다($P < 0.05$, 중간 생존기간 23일 대 대조군 26일)(도 25C).
- [0518] mAb806 반응성은 생체내 항종양 효능과 상관성이 있다
- [0519] EGFR의 다양한 수준 또는 다른 종류를 발현하는 종양에 대한 mAb806의 다른 효과를 이해하기 위해, 다양한 종양 세포와 mAb806 반응성을 FACS 분석으로 측정했다. 염색된 세포는 Cell Quest 소프트웨어(Becton-Dickinson PharMingen)를 사용하여 FACS Calibur로 분석했다. 1차 항체로는 다음과 같은 mAb을 사용했다: mAb806, 항-EGFR mAb 클론 528 및 클론 EGFR.1. 마우스 IgG2a 또는 IgG2b는 이소타입 대조군으로 사용했다.
- [0520] 종래 보고와 일치하게(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 7727-7731), 항-EGFR mAb528은 △EGFR 및 wtEGFR을 인식했고, U87MG 세포에 비해 U87MG.△EGFR 세포에 대해 더 강한 염색성을 나타냈다(도 26A, 528).
- [0521] 이에 반해, 항체 EGFR.1은 △EGFR이 아닌 wtEGFR과 반응했는데(Nishikawara et al., 1994), 그 이유는 U87MG.△EGFR 세포가 U87MG 세포와 약한 반응성이었기 때문이다(도 26A, 패널 EGFR.1).
- [0522] 이 EGFR.1 항체는 U87MG 세포보다 U87MG.wtEGFR과 더욱 강하게 반응했는데, 그 이유는 U87MG.wtEGFR 세포가 wtEGFR을 과발현했기 때문이다(도 26A, 패널 EGFR.1). mAb806은 U87MG 세포가 아닌 U87MG.△EGFR 및 U87MG.DK 세포와 강하게 반응했지만, U87MG.wtEGFR과는 약하게 반응했는데, 이것은 mAb806이 과발현된 wtEGFR에 대해 약

한 교차활성이 있는 Δ EGFR에 대해 선택적이라는 것을 시사했다(도 26A, 패널 mAb806).

- [0523] 이러한 U87MG.wtEGFR과의 반응성 수준은 항체 처리에 의해 매개된 생존기간 연장과 정량적 및 정성적으로 유사했다(도 25C).
- [0524] 본 발명자들은 또한 면역침전에 의해 mAb806 특이성을 측정했다. 다양한 세포주에서 EGFR은 항체 mAb806, 항-EGFR mAb 클론 528(Oncogene Research Products, Boston, MA), 또는 클론 EGFR.1 (Oncogene Research Products)에 의해 면역침전되었다.
- [0525] 간략히 설명하면, 세포는 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% 나트륨 테옥시콜레이트, 10 mM 나트륨 PPi, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 2 mM Na_3VO_4 , 5 $\mu\text{g/ml}$ 류페틴, 및 5 $\mu\text{g/ml}$ 아프로티닌을 함유하는 용해 완충액으로 용해시켰다. 단백질 A- 및-G 세파로스를 첨가하기 전에 1시간 동안 4°C에서 세포 용해물과 항체를 항온처리했다. 면역침전물은 용해 완충액으로 2회 세척하고, HNTG 완충액[50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 및 10% 글리세롤]으로 1회 세척한 뒤, 전기영동하고, 니트로셀룰로스 막으로 전이시켰다.
- [0526] 전기영동 분리된 단백질의 블롯은 면역블롯(Huang et al., 1997)에서 야생형 및 Δ EGFR의 검출 시에 사용했던 항-EGFR 항체, C13(G. N. Gill 박사로부터 제공받음, University of California, San Diego, CA)으로 탐침하고, 단백질은 ECL 화학발광 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech.)을 사용하여 가시화했다. Bcl-X에 대한 항체(토끼 폴리클로날 항체; Transduction Laboratories, Lexington, KY) 및 포스포티로신에 대한 항체(4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)는 종래기술된 바와 같이 웨스턴 블롯 분석에 사용했다(Nagane et al. (1998) Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5724-5729).
- [0527] FACS 분석과 일치하게, 항체 528은 wtEGFR 및 돌연변이 수용체를 인식했고(도 26B-패널 IP: 528), 반면 항체 EGFR.1은 돌연변이 중(도 26B, 패널 IP: EGFR.1)이 아닌 wtEGFR과 반응했다. 더욱이, U87MG. Δ EGFR 및 U87MG.DK 세포에서 돌연변이 수용체의 수준은 U87MG.wtEGFR 세포(도 26B, 패널 IP: 528)에서의 wtEGFR의 수준과 비슷하다.
- [0528] 하지만, 항체 mAb806은 U87MG 세포 유래의 검출불가능한 양 및 U87MG. Δ EGFR 및 U87MG.DK 세포로부터 다량의 돌연변이 수용체를 침전시키는데 비해 U87MG.wtEGFR 세포 용해물로부터 소량의 wtEGFR만을 침전시킬 수 있었다(도 26B, 패널 IP:mAb806). 종합해보면, 이 데이터는 mAb806이 세포 표면에서 과발현될 때에만 wtEGFR의 소량에도 존재하는 Δ EGFR의 에피토프를 인식한다는 것을 시사한다(이하 mAb806 에피토프에 대한 언급과 추가 설명을 참조한다).
- [0529] mAb806 처리는 Δ EGFR 자기인산화를 감소시키고 U87MG. Δ EGFR 뇌종양에서 Bcl-X_L 발현을 하향조절한다.
- [0530] 다음으로, mAb806에 의한 성장 억제의 기초를 이루는 기전을 조사했다. Δ EGFR의 구성적 활성 키나제 활성 및 카르복시 말단의 자기인산화는 생물학적 기능에 필수적인 것이기 때문에(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7727-7731; Huang et al., 1997; Nagane et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56, 5079-5086; Nagane et al. (2001) Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 162 (Suppl.1), S17-S21), Δ EGFR 인산화 상태를 처리된 동물과 대조군 동물의 종양에서 측정했다. 도 27A에 도시한 바와 같이, mAb806 처리는 mAb806-처리된 이종이식편에서 수용체 수준이 약간만 감소했을지라도, Δ EGFR 자기인산화를 급감시켰다. 본 발명자들은 종래 수용체 자기인산화가 Δ EGFR-과발현 종양의 아포토시스를 감소시키는데 주요 역할을 하는 항아포토시스 유전자, Bcl-X_L의 상향조절을 유발한다는 것을 밝힌 바 있다(Nagane et al., 1996; Nagane et al., 2001). 따라서, Bcl-X_L 발현에 미치는 mAb806 처리 효과를 다음으로 측정했다. mAb806-처리된 동물 유래의 Δ EGFR 종양은 사실상 감소된 수준의 Bcl-X_L을 나타낸다(도 27A).
- [0531] mAb806 처리는 U87MG. Δ EGFR 종양에서 성장과 혈관형성을 감소시키고 아포토시스를 증가시킨다
- [0532] mAb806 처리에 의해 유발되는 생체내 억제 및 수용체 시그널링에 미치는 이의 생화학적 효과에 비추어, 본 발명

자들은 대조군 또는 처리된 마우스의 종양 증식률을 측정했다. mAb806-처리된 종양의 Ki-67 염색에 의해 측정되는 증식 지수는 대조군 종양에 비해 유의적으로 낮았다($P < 0.001$; 도 28).

[0533] 간략히 설명하면, 종양의 혈관형성을 평가하기 위해, 염화아연 함유 용액에 고정시키고, 파라핀 포매한 뒤, 절편화하고, 모노클로날 래트 항-마우스 CD31 항체(Becton-Dickinson PharMingen; 1:200)로 면역염색했다. 종양 세포 증식의 평가는 포르말린-고정된 파라핀-포매된 종양 조직에서 Ki-67 면역조직화학으로 수행했다. 파라핀 제거 및 재수화 후, 조직 절편은 내인성 퍼옥시다제를 반응정지시키기 위해 메탄올 중의 3% 과산화수소와 항원 처리했다. 이 절편은 염소 혈청으로 30분 동안 차단시키고 1차 항체와 4℃에서 밤새 항온처리했다. 그 다음, 절편을 PBS로 세척하고, 비오틴화된 2차 항체와 30분 동안 항온처리했다. PBS로 수회 세척한 후, 산물은 발색원으로서 디아미노벤지딘과 함께 스트렙타비딘 양고추냉이 퍼옥시다제로 가시화하고, 헤마톡실린으로 대비염색했다. 증식의 척도로서, Ki-67 표지화 지수는 고배율(3400) 필드에서 표지된 핵:총 핵의 비율로서 측정되었다.

[0534] 각 케이스마다 체계적인 무작위 표본채취로 약 2000개의 핵을 계수했다. 대식세포 및 NK 세포 염색을 위해, 완충된 4% 파라포름알데하이드 용액으로 고정시킨 동결된 절편을 비오틴화된 mAbF4/80(Serotec, Raleigh, NC) 및 폴리클로날 토끼 항-아시알로 GM1 항체(Dako Chemicals, Richmond, VA)로 각각 면역염색했다. 혈관형성은 전산화된 분석으로 혈관 면적으로서 정량분석했다. 이 목적을 위해, 절편은 항-CD31로 면역염색하고, 대비염색 없이 전산화된 이미지 분석 시스템으로 분석했다. MVA는 종래 기술된 바와 같이 CCD 컬러 카메라로 3200 배율로 절편의 디지털 이미지를 캡처하여 측정했다(Mishima et al., 2000). 그 다음, 이미지는 Image Pro Plus version 4.0 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)로 분석하고, MVA는 각 절편의 총 염색 양을 측정하여 수득했다. 각 슬라이드마다 4개의 필드가 평가되었다. 이 값은 각 필드 당 총 면적의 비율로서 나타났다. 결과는 각 실험마다 적어도 2명의 관찰자(K.M., H-J. S. H.)에 의해 확인되었다.

[0535] 또한, 종양 조직의 아포토시스 세포는 종래 기술된 바와 같이 TUNEL 방법으로 검출했다(Mishima et al., 2000). TUNEL-양성 세포는 X400에서 계수했다. 아포토시스 지수는 각 필드마다 아포토시스 세포 수:총 세포 수의 비율로서 계산했다. TUNEL 염색을 통한 아포토시스 지수의 분석은 대조군 종양에 비해 mAb806 처리된 종양에서의 아포토시스 세포 수의 유의적인 증가를 입증했다($P < 0.001$; 도 28).

[0536] 또한, 종양 혈관신생 정도는 CD31에 대해 대조군 표본과 처리된 표본 유래의 종양을 면역염색하여 분석했다. 종양 혈관신생을 정량분석하기 위해, 미세혈관 면적(MVA)은 전산화된 이미지 분석으로 측정했다. mAb806-처리된 종양은 대조군 종양보다 30% 적은 MVA를 나타냈다($P < 0.001$; 도 28).

[0537] 수용체와 항체 간에 상호작용이 염증 반응을 유발할 수 있는지를 이해하기 위해, 종양 절편을 대식세포 마커, F4/80 및 NK 세포 마커, 아시알로 GM1로 염색했다. 대식세포는 종양 기질 전반에서 확인되었고, 특히 mAb806-처리된-U87MG.△EGFR-종양 주변에 축적되어 있었다(도 28). 본 발명자들은 종양 내 및 종양 주위에 침윤된 NK 세포를 거의 관찰할 수 없었고, mAb806 처리된 종양 및 이소타입-대조군 종양 간에 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다(데이터는 미제시).

[0538] 실시예 17

[0539] mAb806 및 mAb528의 병용 면역요법

[0540] 본원에 기술된 실험은 본 발명에 따른 항체의 효능을 측정하기 위해 설계한 생체내 연구를 설명한 것이다.

[0541] 4 내지 6주령의 암컷 누드 마우스는 실험 동물로 사용했다. 마우스 양 옆구리 각각에 3×10^6 종양 세포를 피하 접종했다.

[0542] 동물은 위에서 설명한 U87M.D2-7, U87MG.DK 또는 A431 세포 중 어느 하나를 접종받았다. 치료는 종양이 충분한 크기로 성장했을 때 시작했다.

[0543] 그 다음, 마우스는 (i) 인산염 완충 식염수, (ii) mAb806(0.5mg/주사), (iii) mAb528(0.5mg/주사), 또는 (iv) 두 mAb의 배합물 중 어느 하나를 주사받았다. "(iv)"에서, 다른 그룹의 마우스는 각 mAb 0.5mg/주사 또는 각 mAb 0.25mg/주사를 맞았다.

[0544] 조사된 마우스의 제1 그룹은 U87MG.D2-7 주사를 맞은 그룹이었다. 치료 프로토콜은 접종 9일 후 시작했고, 2주 동안 주당 3회 지속했다(즉, 세포 주사 후 9일, 11일, 13일, 16일, 18일 및 20일에 접종되었다). 처리 프로토콜을 개시 시, 평균 종양 직경은 115mm³였다. 각 그룹은 각각 두 종양을 보유한 마우스 50마리를 포함했다.

[0545] 항체 배합물(각각 0.5mg/주사)을 투여받은 마우스 그룹 내에는 3개의 완전한 퇴행이 존재했다. 어떤 다른 그룹

에서는 어떠한 퇴행도 없었다. 도 18A는 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

- [0546] 제2 그룹의 마우스에게 주사된 물질은 동일하되, 병용 요법에 포함된 각 항체의 양은 주사당 0.25mg이었다. 이 주사를 세포 접종 후 10일, 12일, 14일, 17일, 19일 및 21일째 제공했다. 치료 시작 시, 평균 종양 크기는 114 mm³이었다. 결과는 도 18B에 제시했다.
- [0547] 제3 그룹의 마우스에게는 U87MG.DK를 접종했다. 치료 주사는 세포 접종 후 18일부터 시작하여 20일, 22일, 25일, 27일 및 29일에 지속했다. 치료 시작 시 평균 종양 크기는 107mm³였다. 도 18C는 결과를 정리한 것이다. 치료 주사는 제1 그룹에서와 동일했다.
- [0548] 마지막으로, 제4 그룹의 마우스는 A431 세포를 접종받은 마우스로, 접종 후 8일, 10일, 12일 및 14일째 그룹 I 및 III에서와 같이 주사를 맞았다. 시작 시, 평균 종양 크기는 71mm³였다. 결과는 도 18D에 제시했다.
- [0549] 결과는 병용 항체 요법이 종양을 감소시키는데 있어서 상승적 효과를 나타낸다는 것을 시사했다. 도 18A 참조. 유사한 효과는 도 18B에서처럼 낮은 용량에서도 관찰되었고, 이것은 효과가 단순히 용량 수준 때문은 아니라는 것을 시사한다.
- [0550] 병용 요법은 M87MG.DK의 성장을 억제하지 않았고(도 18C), 이것은 항체 면역 기능이 도 18A 및 18B에서 관찰되는 감소 원인은 아니라는 것을 시사한다.
- [0551] 도 18D에서 관찰되듯이, 병용 요법은 또한 A431 종양에서도 상승 효능을 나타냈고, 4가지 용량이 60% 완전 반응을 초래한다는 것도 주목되어야 한다. 이 데이터는 mAb806에 의해 인식되는 EGFR 분자가 528에 의해 억제되는 것과 기능적으로 다르다는 것을 시사한다.
- [0552] 실시예 18
- [0553] 종양 이종이식편 성장의 mAb806 억제
- [0554] 본원에서 논하고, 본 실시예에서 추가 입증 및 논의되는 것처럼, mAb806은 야생형 EGFR이 아닌 de2-7 또는 증폭된 EGFR을 발현하는 종양 이종이식편의 성장을 억제하는 것으로 예상치않게 발견되었다.
- [0555] 세포주 및 항체는 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조했다. mAb806의 특이성을 측정하기 위해, U87MG, U87MG.D2-7, 및 U87MG.wtEGFR 세포에 대한 결합성을 FACS로 분석했다. 간략히 설명하면, 배양된 모 U87MG 세포주 및 형질 감염된 U87MG 세포주는 528, 806 및 DH8.3 항체를 이용하여 야생형 및 de2-7EGFR 발현에 대해 분석했다. 세포(1.3 × 10⁶)는 적당한 항체 또는 이소타입-부합된 음성 대조군 5 μg/ml와 1% HSA 함유 PBS에서 4℃ 하에 30분 동안 항온처리했다. PBS/1% HSA로 3회 세척한 후, 세포는 FTTC-커플링된 염소 항-마우스 항체(1:100 희석; Calbiochem, San Diego, CA)와 4℃에서 추가 30분 동안 항온처리했다. 3회 연속 세척한 후, 세포를 Epics Elite ESP(Beckman Coulter, Hialeah, FL)에서 최소 20,000개 결과를 관찰하여 분석하고 원도우용 EXPO(버전 2)로 분석했다. 무관한 IgG2b(사람 항원 A33에 지향성인 mAb 100-310)는 mAb806에 대해 이소타입 대조군으로서 포함되었고, de2-7 및 wtEGFR을 모두 인식하기 때문에 528 항체도 포함시켰다.
- [0556] 528 항체만이 모 U87MG 세포주를 염색할 수 있었고(도 29), 이것은 이 세포들이 wtEGFR을 발현한다는 것을 입증하는 종래 보고와 일치했다(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7727-7731). mAb806은 대조군 항체와 유사한 결합 수준을 나타냈고, 이것은 wtEGFR에 결합할 수 없다는 것을 분명하게 입증하는 것이다(도 29). U87MG.D2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포주에 대한 이소타입 대조군 항체의 결합은 U87MG 세포에서 관찰된 것과 유사했다. mAb806은 U87MG.D2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포를 염색했고, 이것은 mAb806이 de2-7 EGFR 및 과발현된 EGFR의 서브세트를 특이적으로 인식한다는 것을 시사한다(도 29). 예상한 바와 같이, 528 항체는 U87MG.D2-7 및 U87MG.wtEGFR 세포주를 모두 염색했다(도 29). U87MG.wtEGFR 세포를 염색하는 528 항체의 강도는 mAb806보다 훨씬 높았고, 이것은 mAb806만이 과발현된 EGFR의 일부를 인식한다는 것을 시사한다. U87MG.wtEGFR 세포에서 관찰되는 mAb806 반응성은 wtEGFR.3을 과발현하는 다른 세포주인 A431 세포에 의해 수득되는 것과 유사하다.
- [0557] U87MG.D2-7 및 A431 세포를 사용하여, 각 세포주에 대한 mAb806의 상대적 친화성 및 결합 부위를 측정하기 위해 스캐차드 분석을 수행했다. mAb806은 de2-7EGFR에 대한 친화성이 1.1x10⁹ M⁻¹ 이었고, 실시예 4에서 지정한 바와 같이 평균(3회 독립 실험) 2.4x10⁵ 결합 부위/세포를 인식했다. 이에 반해, A431 세포에서 wtEGFR에 대한 mAb806의 친화성은 실시예 8에서 지정한 바와 같이 겨우 9.5x10⁷ M⁻¹이었다. 흥미롭게도, mAb806은 A431 표면에

서 2.3×10^5 결합 부위를 인식했는데, 이것은 이들 세포에서 발견된 EGFR의 보고된 수보다 약 10배 낮은 수였다. A431 세포의 표면에 존재하는 EGFR의 수를 확인하기 위해, ^{125}I -표지된 528 항체를 이용하여 스캐차드 분석을 수행했다. 예상한 바와 같이, 이 항체는 A431 세포 표면에서 약 2×10^6 부위에 결합했다. 따라서, mAb806은 A431 세포의 표면에 존재하는 EGFR 수용체의 일부에만 결합하는 것으로 보인다. 중요하게도, ^{125}I -표지된 mAb806은 세포수가 1×10^7 으로 증가했을지라도 모체의 U87MG 세포에는 전혀 결합하지 않았다.

[0558] mAb806 반응성은 mAb806, sc-03(EGFR의 COOH-말단 도메인에 특이적인 시판 폴리클로날 항체) 및 IgG2b 이소타입 대조군을 사용하여 ^{35}S -표지화한 후 면역침전에 의해 다양한 세포주에서 추가 특성화했다. 간단히 설명하면, 세포는 5% 투석된 FCS가 보충된 메티오닌/시스테인 무함유 DMEM에서 Tran ^{35}S -표지(ICN Biomedicals, Irvine, CA) 100 mCi/ml와 16시간 동안 표지시켰다. PBS로 세척한 후, 세포를 용해 완충액(1% Triton X-100, 30mM HEPES, 15mM NaCl, 500 μM 4-(2-아미노에틸)벤젠설포닐플루오라이드(AEBSF), 150nM 아프로타닌, 1 μM E-64 프로테아제 억제제, 0.5mM EDTA 및 1 μM 류페틴, pH 7.4)에서 4°C 하에 1시간 동안 방치했다. 용해물은 12,000g에서 10분 동안 원심분리하여 정화하고, 그 다음 적당한 항체 5 μg 과 4°C에서 30분 동안 항온처리한 후, 단백질 A-세파로스를 첨가했다. 면역침전물은 용해 완충액으로 3회 세척하고, SDS 샘플 완충액과 혼합한 뒤, 4-20% Tris/글리신 겔을 사용하여 겔 전기영동하여 분리한 다음, 건조시키고 X선 필름에 노출시켰다.

[0559] sc-03 항체는 U87MG.Δ2-7 세포로부터 3개의 밴드를 면역침전시켰고; 이중선은 이들 세포에서 관찰되는 2개의 de2-7 EGFR 밴드에 대응하고, 고분자량 밴드는 wtEGFR에 대응한다(도 22 및 30). 이에 반해, mAb806은 2개의 de2-7 EGFR 밴드를 면역침전시켰고, wtEGFR은 전혀 존재하지 않았다. U87MG.wtEGFR 및 A431 세포에서 관찰되는 패턴은 본질적으로 동일했다. sc-03 항체는 A431 세포 유래의 wtEGFR에 대응하는 단일 밴드를 면역침전시켰다(도 22 및 30). 또한, mAb806은 U87MG.wtEGFR 및 A431 세포 모두에서 유래하는 wtEGFR에 대응하는 단일 밴드를 면역침전시켰다(도 22 및 30). FACS 및 스캐차드 데이터와 일치하게, mAb806에 의해 면역침전된 EGFR의 양은 세포 표면에 존재하는 총 EGFR보다 실질적으로 적었다. mAb806 및 sc-03이 유사한 양의 de2-7 EGFR을 면역침전한다면, 이 수용체를 발현하는 세포에서 mAb806 항체는 EGFR의 일부만을 인식한다는 개념을 지지한다. mAb806과 528 항체 간에 비교는 동일한 패턴의 반응성을 보여주었다(데이터는 미제시). 무관한 IgG2b(mAb806의 이소타입 대조군)는 어떤 세포주 유래의 EGFR도 면역침전시키지 않았다(도 22 및 30). 동일한 조건을 사용할 때, mAb806은 모체의 U87MG 세포 유래의 EGFR을 면역침전시키지 않았다(데이터 미제시).

[0560] mAb806은 또한 예방적 이종이식편 모델에서 U87MG 및 U87MG.Δ2-7 종양에 대한 효능에 대해 검사했다. 항체 또는 비히클은 종양 접종 전날에 i.p. 투여하고 2주 동안 주당 3회 투여했다. 1 mg/주사의 용량에서, mAb806은 wtEGFR을 발현하는 모 U87MG 이종이식편의 성장에 어떠한 영향도 없었다(도 9A). 이에 반해, mAb806은 U87MG.Δ2-7 이종이식편의 성장을 용량-의존적 방식으로 상당히 억제했다(도 9B). 종양 접종 20일 후, 대조군 동물을 희생시켰을 때, 평균 종양 용적은 대조군의 경우 $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ 이었고, 0.1 mg/주사 그룹의 경우 상당히 더 작은 $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ 이었고($P < 0.0001$), 1 mg/주사 그룹의 경우 $200 \pm 42 \text{ mm}^3$ 이었다($P < 0.0001$). 처리 그룹은 24일째에 희생시켰고, 이때 평균 종양 용적은 0.1 mg 처리 그룹의 경우 $1300 \pm 240 \text{ mm}^3$ 이었고, 1 mg 그룹의 경우 $500 \pm 100 \text{ mm}^3$ 이었다($P < 0.005$).

[0561] 예방적 이종이식편 모델에서의 mAb806의 효능이 주어지면, 정착된 종양 이종이식편의 성장을 억제하는 이의 능력을 검사했다. 항체 처리는 예방적 모델에서 기술한 바와 같았고, 단, 종양의 평균 종양 용적이 U87MG.Δ2-7 이종이식편의 경우 65 mm^3 (이식 후 10일)에 이르고 모 U87MG 이종이식편의 경우 84 mm^3 (이식 후 19일)에 이르렀을 때 항체 처리를 시작했다(실시에 10 참조). 마찬가지로, mAb806은 1 mg/주사의 용량에서도 모 U87MG 이종이식편의 성장에 어떠한 영향도 없었다(도 10A). 이에 반해, mAb806은 U87MG.Δ2-7 이종이식편의 성장을 용량-의존적 방식으로 상당히 억제했다(도 10B). 17일째에, 대조군 동물을 희생시키기 1일 전에, 평균 종양 용적은 대조군 그룹의 경우 $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ 이었고 0.1 mg/주사 그룹의 경우 $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ 이었고($P < 0.01$), 1 mg/주사 그룹의 경우 $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ 이었다($P < 0.002$). U87MG.Δ2-7 이종이식편을 IgG2b 이소타입 대조군으로 처리하여도 종양 성장에 어떠한 영향도 없었다(데이터 미제시).

[0562] 또한, mAb806에 의해 관찰된 성장 억제가 de2-7 EGFR을 발현하는 세포에 제한적인지를 조사하기 위해, 정착된 모델에서 U87MG.wtEGFR 이종이식편에 대한 효능도 조사했다. 이 세포들은 de2-7 EGFR 발현 없이 EGFR 유전자의

증폭을 함유하는 종양 모델로 작용한다. mAb806 처리는 평균 종양 용적이 73mm³에 이르면(이식 후 22일) 시작했다. mAb806은 비히클로 처리된 대조군 종양과 비교했을 때 확립된 U87MG.wtEGFR 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 10C). 대조군 동물을 희생시킨 날, 대조군의 평균 종양 용적은 1000 ± 300mm³이고, 1mg/주사로 처리된 그룹은 500 ± 80mm³이었다(P<0.04).

[0563] mAb806 처리 및 대조군 U87MG.Δ2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 간에 잠재적 조직학적 차이를 평가하기 위해, 포르말린-고정된, 파라핀-포매된 절편을 H&E로 염색했다(도 31). mAb806 처리된 U87MG.Δ2-7 이종이식편(mAb806-처리된 이종이식편은 종양 접종 후 24일 후에 수집하고, 비히클 처리된 이종이식편은 18일째 수집했다) 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편(mAb806 이종이식편은 종양 접종 후 42일 후에 수집하고, 비히클 처리된 이종이식편은 37일째 수집했다; 도 31) 유래의 절편에서는 괴사 영역이 관찰되었다. 이 결과는 다수의 종양 이종이식편(각 세포주마다 n=4)에서 일관되게 관찰되었다. 하지만, 비히클로 처리된 U87MG.Δ2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 유래의 절편(n=5)은 mAb806 처리 후 관찰된 동일한 괴사 영역을 나타내지 않았다(도 31). 또한, 동일한 시점에 분리한 비히클 및 mAb-처리된 이종이식편은 종양 괴사에서 이러한 차이를 나타냈다(데이터 미제시). 따라서, 관찰된 괴사의 증가는 mAb806-처리된 이종이식편에 사용된 더 긴 성장 기간에 의해 일어나지 않았다. 또한, mAb806-처리된 U87MG 이종이식편 유래의 절편은 H&E에 의해서도 염색되었고, 어떤 괴사 영역도 나타내지 않았으며(데이터 미제시), 이것은 mAb806 결합이 세포 생존도의 감소를 유도하여 종양 이종이식편 내에 증가된 괴사를 초래한다는 가설을 지지한다.

[0564] U87MG, U87MG.Δ2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 절편의 면역조직화학 분석은 mAb806 처리 후 de2-7 및 wtEGFR 발현 수준을 측정하기 위해 수행했다(도 32). 예상한 바와 같이, 528 항체는 처리된 종양과 대조군 종양 간에 분명한 염색 강도의 감소 없이 모든 이종이식편 절편을 염색했다(도 32). U87MG 절편의 염색은 mAb806에 의해 검출할 수 없었고; 하지만, U87MG.Δ2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 절편의 양성 염색은 관찰되었다(도 32). 대조군과 처리된 U87MG.Δ2-7 및 U87MG.wtEGFR 이종이식편 간에 mAb806 염색 강도는 차이가 없었는데, 이는 항체 처리가 mAb806 반응성이 없는 변형 클론의 선택을 유도하지는 못한다는 것을 시사한다.

[0565] mAb806의 항종양 효과가 U87MG 세포에 제한적이지 않음을 입증하기 위해, 항체는 A431 이종이식편 함유 마우스에 투여했다. 이 세포들은 증폭된 EGFR 유전자를 함유하고 약 2x10⁶ 수용체/세포를 발현한다. 본 발명자들은 종래 mAb806이 이러한 EGFR의 약 10%에 결합하고 A431 이종이식편을 표적화한다고 보고한 바 있다(Garcia et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas. *Cancer Res.* 53, 3217-3220). mAb806은 종래 기술된 예방적 이종이식편 모델에서 조사했을 때 A431 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 11A). 13일째, 대조군 동물을 희생시켰을 때, 평균 종양 용적은 비히클-처리된 그룹에서는 1400±150mm³이고, 1 mg/주사 처리 그룹에서는 260±60mm³이었다(P<0.001). 별도의 실험에서, mAb 0.1mg의 용량도 역시 예방적 모델에서 A431 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(P < 0.05) (데이터 미제시) (실시에 10 참조).

[0566] 예방적 A431 이종이식편 모델에서 mAb806의 효능이 제공되면, 정착된 종양 이종이식편의 성장을 억제하는 능력도 조사했다. 항체 처리는 예방적 모델에서 기술된 바와 같고, 단 종양이 평균 종양 용적 200 ± 20mm³에 이를 때까지 시작하지 않았다. mAb806은 정착된 A431 이종이식편의 성장을 유의적으로 억제했다(도 11B). 13일째, 대조군 동물을 희생시킨 날, 평균 종양 용적은 대조군의 경우 1100±100mm³이고, 1mg/주사 그룹의 경우 450±70mm³였다(P<0.0001).

[0567] 실시에 19

[0568] 키메라 806 항체의 작제, 발현 및 분석

[0569] 카메라 항체는 예컨대 마우스, 래트 또는 다른 종의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 사람 중쇄 및 경쇄 영역에 결합된 분자의 한 클래스이다. 키메라 항체는 재조합 생산된다. 키메라 항체의 1가지 장점은 이 항체가 이종항원 효과, 즉 비-사람 항체(예컨대, 마우스, 래트 및 다른 종)의 고유 면역원성을 감소시킬 수 있다는 점이다. 또한, 재조합 제조된 키메라 항체는 종종, 특히 높은 수준의 발현 백터를 이용할 때 다량으로 생산될 수 있다.

[0570] 높은 수준의 생산 시, 가장 널리 사용되는 포유동물 발현계는 디하이드로폴레이트 리덕타제 결손성("dhfr-") 중국 햄스터 난소 세포에 의해 제공되는 유전자 증폭 절차를 이용하는 것이다. 이 계는 당업자에게 잘 알려져 있다. 이 계는 디하이드로폴레이트의 테트라하이드로폴레이트로의 변환을 촉진하는 DHFR 효소를 암호화하는 디하이드로폴레이트 리덕타제 "dhfr" 유전자를 기반으로 한다. 높은 생산을 달성하기 위해, dhfr-CHO 세포는 원하는 단백질을 암호화하는 유전자와 함께 기능성 DHFR 유전자를 함유하는 발현 백터로 형질감염시킨다. 이 경우에,

원하는 단백질은 재조합 항체 중쇄 및/또는 경쇄이다.

- [0571] 경쟁적 DHFR 억제제 메토틱세이트(MTX)의 양을 증가시키면, 재조합 세포는 dhfr 유전자를 증폭시켜 내성을 발생시킨다. 표준 케이스에서, 사용된 증폭 단위는 dhfr 유전자 크기보다 훨씬 크며, 결과적으로 항체 중쇄가 공동증폭된다.
- [0572] 항체 쇠와 같은 단백질의 대량 생산이 필요한 경우, 발현 수준과 이용되는 세포의 안정성은 모두 중요하다. 장기 배양 시, 재조합 CHO 세포 집단은 하나의 모체 클론에서 유래할지라도 증폭 동안 특이적 항체 생산성 면에서 동질성을 상실한다.
- [0573] 키메라 항체의 재조합 발현에 사용하기 위해 바이스스트론성 발현 벡터를 제조했다. 이 바이스스트론성 발현 벡터는 "내부 리보솜 진입 부위" 또는 "IRES"를 이용한다. 키메라 항-EGFR을 생산하기 위한 이러한 작제물에서, 면역글로불린 쇠와 선택성 마커 cDNA는 IRES를 통해 연결된다. IRES는 세포의 트랜스-작용성 인자의 도움으로 mRNA에서 내부 개시인자 코돈에 작은 리보솜 서브유닛을 동원하는 시스-작용성 인자이다. IRES는 진핵생물 세포에서 폴리스스트론성 전사 단위로부터 2중 이상의 단백질의 발현을 촉진한다. 선택성 마커 유전자가 캡 의존적 방식으로 해독되는 바이스스트론성 발현 벡터, 및 IRES 의존적 방식의 당해 유전자의 사용은 다양한 실험 방법에 적용했다. IRES 인자는 세포 형질전환, 유전자전이성 동물의 생산, 재조합 단백질 생산, 유전자 요법, 유전자 트래핑 및 유전자 표적화를 위해 벡터에 성공적으로 혼입되었다.
- [0574] 키메라 항체 806(ch806) 작제 개요
- [0575] 키메라 806 항체는 모체 쥐 하이브리도마 유래의 806 항체의 VH 및 VL 쇠를 표준 분자생물학 기술로 클로닝하여 생산했다. 그 다음, VH 및 VL 쇠는 pREN 포유동물 발현 벡터에 클로닝했고, 이의 구성은 서열번호 7과 서열번호 8에 제시했고, 증폭 및 발현을 위해 CHO 세포(DHFR-/-ve)에 형질감염시켰다. 간략히 설명하면, 트립신처리 후, 4×10^6 CHO 세포를 표준 조건 하에 전기천공을 사용하여 각 LC 및 HC 발현 벡터 $10 \mu\text{g}$ 으로 공동형질감염시켰다. 실온에서 10분 휴식 기간 후, 세포를 15ml 배지(첨가제와 함께 10% 소 태아 혈청, 하이포잔틴/티미딘 보충)에 첨가하고 $15 \times 10 \text{ cm}$ 세포 배양 페트리디쉬로 이동시켰다. 그 다음, 플레이트를 정상 조건 하에 항온배양기에 2일 동안 방치했다.
- [0576] 이 시점에, 젠타마이신, 5nM 메토틱세이트의 첨가, 소 태아 혈청의 투석된 소 태아 혈청으로의 교체, 및 하이포잔틴/티미딘 제거를 시작으로 배지로부터 LC 및 HC 모두로 성공적으로 형질감염된 클론을 선택했다. 형질감염 후 17일째, 선택 조건 하에 성장한 개별 클론을 채취하고, 키메라 806 항체의 발현에 대해 선별했다. 선별을 위해 ELISA를 이용했고, 이것은 ELISA 플레이트를 변성된 가용성 EGF 수용체(변성된 EGFR은 806 결합을 허용하는 것으로 알려져 있다)로 코팅하는 것으로 이루어졌다. 이 분석은 개별 클론들의 생산 수준의 선별 및 선별되는 항체의 기능성을 선별한다. 모든 클론은 기능성 ch806을 생산하는 것으로 관찰되었고, 최고의 생산자를 취하고 증폭을 위해 증대시켰다. 생산되는 ch806의 수준을 증폭시키기 위해, 최고 생산 클론을 더 높은 메토틱세이트 농도(100nM 대 5nM) 하에 재선택했다. 이것은 전술한 절차를 이용하여 수행했다.
- [0577] 그 다음, 100nM MTX에서 성장하는 클론은 생산 수준의 측정, 혈청 탈피 및 세포 बैं킹을 위해 Biological Production Facility, Ludwig Institute(Melbourne, Australia)로 넘겼다. 세포주는 회전병에서 약 10mg/리터를 안정하게 생산하는 것으로 관찰되었다.
- [0578] pREN ch806 LC neo 벡터의 핵산 서열은 서열번호 7에 제시했다. pREN ch806 HD DHFR 벡터의 핵산 서열은 서열번호 8에 제시했다.
- [0579] 도 33은 IRES를 이용하는 벡터 pREN-HC 및 pREN-LC를 도시한 것이다. pREN 바이스스트론성 벡터 시스템은 본원에 참고인용되는 2002년 2월 13일자 출원된 공동-계류중인 미국 특허 출원 60/355,838에 기술 및 개시되어 있다.
- [0580] ch806은 쥐의 모체 항체와 동일한 결합 특이성을 키메라 806이 나타낸다는 것을 입증하기 위해 FACS 분석으로 평가했다. 분석은 야생형 세포(U87MG 모 세포), EGF 수용체를 과발현하는 세포(A431 세포 및 UA87.wtEGFR 세포) 및 UA87.Δ2-7 세포를 사용하여 수행했다(데이터는 미제시). mAb806 및 ch806의 유사한 결합 특이성은 EGFR을 과발현하는 세포와 de2-7 EGFR을 발현하는 세포를 사용하여 수득했다. 야생형 세포에서는 어떠한 결합도 관찰되지 않았다. U87MGde2-7 세포 사용 시, 방사능표지된 ch806의 결합 친화성은 $6.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 인 것으로 나타났다(데이터 미제시).

- [0581] ch806 항체의 생체분포 분석은 U87MG-de2-7 이종이식편 종양을 보유한 BALB/c 누드마우스에서 수행했고, 결과는 도 34에 제시했다. 마우스에게 5 μ g의 방사능표지된 항체를 주사하고, 8시간, 24시간, 48시간 및 74시간째 각 시점마다 4마리씩 희생시켰다. 기관을 수집하고, 칭량한 뒤, 방사능활성을 감마 계수기로 측정했다. ¹²⁵I-표지된 ch806은, 74시간 동안 높은 종양 흡수 및 누적 종양 잔류를 보유하는 ¹¹¹In-표지된 ch806에 비해, 종양에 대한 감소된 표적화를 나타낸다. 74시간째, ¹¹¹In-표지된 항체는 약 30% ID/g 조직 및 종양 대 혈액 비 4.0을 나타낸다(도 35). ¹¹¹In-표지된 ch806은 간, 비장 및 신장에서 약간 비특이적 잔류를 나타낸다. 이것은, 이 동위원소의 사용 시에 일반적인 것으로, 시간이 지날수록 감소하고, 이는 이 결합이 ch806에 비특이적이며 ¹¹¹In 결합 때문이라는 것을 지지한다.
- [0582] 키메라 항체 ch806은 정작된 종양 모델에서 치료 효능에 대해 평가했다. PBS 100 μ l 중의 3x10⁶ U87MG. Δ 2-7세포를 4 내지 6 주령의 암컷 누드 마우스(Animal Research Center, Western Australia, Australia)의 양 옆구리에 피하 접종했다. mAb806은 양성 대조군으로 포함되었다. 결과는 도 36에 제시했다. 처리는 종양이 평균 용적이 50mm³에 이르렀을 때 시작했고, 제시된 날짜에 총 5회 주사로 복강내 제공되는 ch806 또는 mAb806 1mg으로 이루어졌다. 종양 용적(mm³)은 (길이x폭²)/2의 식으로 측정했다(여기서, 길이는 최장 축이고, 폭은 길이에 대해 직각에서 측정했다). 데이터는 각 처리군마다 평균 종양 용적 +/- S.E.로 나타냈다. ch806 및 mAb806은 U87MG. Δ 2-7 이종이식편에 대하여 거의 동일한 항-종양 활성을 나타냈다.
- [0583] Ch806 면역 작용인자 기능 분석
- [0584] 재료 및 방법
- [0585] 항체 및 세포주
- [0586] 쥐 항-de2-7 EGFR 모노클로날 mAb806, 키메라 항체 ch806(IgG₁) 및 대조군 이소타입 부합된 키메라 항-G250 모노클로날 항체 cG250은 Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research(Melbourne, Australia)에서 준비했다. 보체-의존적 세포독성(CDC) 및 항체-의존적 세포-세포독성(ADCC) 분석은 표적 세포로서 U87MG.de2-7 및 A431 세포를 이용했다. 종래 기술된 U87MG.de2-7 세포주는 de2-7EGFR을 함유하는 레트로바이러스로 감염된 사람 정상세포종 세포주이다(Nishikawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 91, 7727-31). 사람 편평상피암종 A431 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 구입했다. 모든 세포주는 10% 열불활성화된 FCS(CSL, Melbourne, Australia), 100 유닛/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 Glutamax(Life Technologies, Melbourne, Australia) 보유 DMEM/F-12에서 배양했다. 레트로바이러스 형질감염된 U87de2-7 세포에 대한 선택을 유지하기 위해, 400 μ g/ml의 G418을 배지에 첨가했다.
- [0587] 사람 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 작용인자 세포의 제조
- [0588] PBMC는 건강한 지원자의 공여체 혈액으로부터 분리했다. 헤파리처리된 전체 혈액을 Ficoll-Hypaque(ICN Biomedical Inc., Ohio, USA)에서의 밀도 원심분리에 의해 분별화했다. PBMC 분획을 수집하고, 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민 보충되고 5% 열불활성화된 FCS를 함유하는 RPMI⁺ 1640으로 3회 세척했다.
- [0589] 표적 세포의 제조
- [0590] CDC 및 ADCC 분석은 종래 공개된 방법의 변형으로 수행했다(Nelson, D. L. et al. (1991) *In: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. D. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober (eds.), Current Protocols in Immunology*, pp. 7.27.1. New York: Greene Publishing Wiley Interscience). 간략히 설명하면, 5x10⁶ 표적 U87MG.de2-7 및 A431 세포를 1x10⁶ 세포당 50 μ Ci ⁵¹Cr(Geneworks, Adelaide, Australia)로 표지화하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 항온처리했다. 그 다음, 세포를 PBS(0.05M, pH 7.4)로 3회 세척하고, 4번째는 배양 배지로 세척했다. 표지된 세포의 분취량(1x10⁴ 세포/50 μ l)을 96웰 미세역가 플레이트(NUNC, Roskilde, Denmark)의 각 웰에 첨가했다.
- [0591] CDC 분석
- [0592] 50 μ l 표지된 표적 세포에, 50 μ l ch806 또는 이소타입 대조군 항체 cG250을 농도 범위 0.00315 - 10 μ g/ml에서 3

반복으로 첨가하고 얼음 상에서 5분 동안 항온처리했다. 그 다음, 1:3 최종 희석물의 혈청을 만들기 위해 새로 제조한 건강한 공여체 보체(혈청) 50 μ l를 첨가했다. 미세역가 플레이트는 37℃에서 4시간 동안 항온처리했다. 원심분리 후, 상청액 중의 방출된 ⁵¹Cr을 계수했다(Cobra II 자동 감마 계수기, Canberra Packard, Melbourne, Australia). 특이적 용해율은 실험적 ⁵¹Cr 방출, 총(50 μ l 표적 세포 + 100 μ l 10% Tween 20) 및 자발적(50 μ l 표적 세포 + 100 μ l 배지) 방출로부터 계산했다.

[0593] ADCC 분석

[0594] 건강한 공여체 PBMC에 의해 수행되는 ch806-매개의 ADCC는 2회의 4시간 ⁵¹Cr 방출 분석으로 측정했다. 1차 분석에서, 표지된 표적 세포는 작용인자 세포와 함께 96웰 "U" 바닥 마이크로플레이트(NUNC, Roskilde, Denmark)에 작용인자/표적(E:T) 세포 비 50:1 하에 평판배양했다. ADCC 활성 측정을 위해 0.00315 - 10 μ g/ml(최종 농도)의 검사 항체 및 대조군 항체를 각 웰에 3반복으로 첨가했다. 2차 ADCC 분석에서, ch806의 ADCC 활성은 1 μ g/ml의 일정한 검사 항체 농도 하에 일정 범위의 작용인자:표적 세포 비에서 모체 쥐 mAb806과 비교했다. 두 분석 모두, 미세역가 플레이트는 37℃에서 4시간 동안 항온처리한 뒤, 50 μ l 상청액을 각 웰로부터 수집하고 방출된 ⁵¹Cr을 감마 계수기(Cobra II 자동 감마 계수기, Canberra Packard, Melbourne, Australia)로 측정했다. 분석에 포함된 대조군으로 자발적 방출(배지 단독) 및 총 방출(10% Tween20/PBS)에 대해 보정했다. 동일한 서브클래스 항체를 이용한 적당한 대조군을 나란히 실험했다.

[0595] 세포 용해율(세포독성)은 다음 식에 따라 계산했다:

$$\text{세포독성 (\%)} = \frac{\text{샘플 계수} - \text{자발적 방출}}{\text{총 방출} - \text{자발적 방출}} \times 100$$

[0596]

[0597] 세포독성(%)은 항체 농도(μ g/ml)에 대하여 플로팅했다.

[0598] 결과

[0599] CDC 분석 결과는 도 37에 제시했다. 최소 CDC 활성은 이소타입 대조군 cG250에서 관찰되는 것과 비슷한 CDC를 보유한 최고 10 μ g/ml ch806의 존재 하에 관찰되었다.

[0600] E:T 비율 50:1에서 표적 U87MG.de2-7 및 A431 세포에 대한 ch806 매개의 ADCC는 도 38에 제시했다. 효과적인 ch806 특이적 세포독성은 표적 U87MG.de2-7 세포에 대해 나타났지만, 최소 ADCC는 A431 세포 상의 ch806에 의해 매개되었다. 달성된 세포독성 수준은 두 세포 집단에 존재하는 ch806 결합 부위의 수를 반영한다. 표적 U87MG.de2-7 세포는 ch806에 의해 특이적으로 인식되는 약 1×10^6 de2-7EGFR을 발현하는 반면, A431 세포에서 발현되는 1×10^6 야생형 EGFR 분자의 한 서브세트만이 ch806에 의해 인식된다(상기 실시예 참조).

[0601] 추가 ADCC 분석은 표적 U87MG.de2-7 세포에 존재하는 1 μ g/ml ch806에 의해 매개되는 ADCC와 1 μ g/ml 모체 쥐 mAb806에 의해 매개되는 ADCC를 비교하기 위해 수행했다. 결과는 도 39에 제시했다. mAb806의 키메라화는 E:T 비율 25:1 및 50:1에서 실시할 때, 모체 쥐 mAb에 의해 달성된 ADCC를 30% 이상의 세포독성으로 현저히 향상시켰다.

[0602] 모체 쥐 mAb806 면역 작용인자 기능의 결핍은 키메라화 후 현저하게 향상되었다. ch806은 양호한 ADCC를 매개하지만, 최소의 CDC 활성을 매개한다.

[0603] 실시예 20

[0604] 키메라 항체 ch806에 대한 항-유전자형 항체의 제조

[0605] mAb806 또는 ch806의 임상 평가를 보조하기 위해, 항체의 혈청 약동학을 모니터링하고 마우스-사람 키메라 항체에 대한 임의의 면역 반응을 정량분석하기 위해 실험실 분석을 필요로 한다. 마우스 모노클로날 항-유전자형 항체(항-ids)를 제조하고 환자 혈청 샘플에서 ch806을 측정하기 위한 ELISA 시약으로서 적합한지에 대해 특성화하고, 사람 항-키메라 항체 면역 반응 분석에서 양성 대조군으로 사용한다. 이 항-유전자형 항체는 또한 환자 중에서 자연적인 항-EGFR 항체 반응을 생성하여 치료 또는 예방적 백신으로 유용하게 사용되기도 한다.

[0606] 항-유전자형 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(Chatterjee et al., 2001; Uemura et al., 1994; Steffens et al., 1997; Safa and Foon, 2001; Brown and Ling, 1988).

- [0607] 간단히 설명하면, 마우스 모노클로날 항-유전자형 항체(항-ids)를 다음과 같이 제조했다. ch806으로 면역고하된 마우스의 비장세포를 SP2/0-AG14 형질세포종 세포와 융합시키고, 항체 생산 하이브리도마를 ch806에 대한 특이적 결합 및 항원에 대한 경쟁적 결합에 대해 ELISA를 통해 선택했다(도 40). 먼저 25개의 하이브리도마를 선택했고, ch806, mAb806에 대한 특이적 결합을 나타내고 ch806 또는 mAb806 항원 결합 활성을 중화시킬 수 있는 항체를 분리하는, LMH-11, -12, -13 및 -14로 지칭되는 4가지를 선택했다(도 41). ch806/mAb806 유전자형 또는 CDR 영역의 인식은 정제된 폴리클로날 사람 IgG와의 교차반응성의 결여에 의해 증명되었다.
- [0608] 혈청 샘플에서 ch806의 측정을 돕는 쉽게 입수할 수 있는 제조항원 de2-7 EGFR의 부재 하에, 임상 샘플의 ch806을 측정하기 위한 민감한 특이적 ELISA의 개발에 806 가변 영역에 동시 결합하는 신규 항-유전자형 ch806 항체의 능력을 이용했다(도 42). 포획을 위해 LMH-12를 이용하고 검출을 위해 비오틴화된-LMH-12를 이용하여, 확인된 ELISA는 검출 한계 3ng/ml 하에 혈청의 ch806(2 μ g/ml-1.6ng/ml)을 측정하는데 매우 재현성이 있는 결합 곡선을 입증했다(n=12; 1-100ng/ml, 분산계수 <25%; 100ng/ml-5 μ g/ml, 분산계수 <15%). 배경 결합은 검사된 3명의 건강한 공여체 혈청에서 분명하지 않았고, 이소타입 대조군 hu3S193에서는 무시할 수 있는 정도의 결합이 관찰되었다. 하이브리도마는 높은 수준의 항체 LMH-12를 생산하고, 임상 샘플에서 임의의 면역 반응을 정량하고 ch806을 측정할 수 있도록 대량 생산을 계획한다(Brown and Ling, 1988).
- [0609] 결과
- [0610] 마우스 면역화 및 면역전 및 면역후 혈청 샘플의 하이브리도마 클론 선택 면역반응성은 고역가 마우스 항-ch806 및 항-huIgG mAb의 발생을 시사했다. huIgG가 아닌 ch806에 결합한 항체를 생산하는 25종의 하이브리도마가 먼저 선택되었다. 이 하이브리도마 중 일부의 결합 특성은 도 42A 및 42B에 제시했다. 이러한 항-ch806 하이브리도마 중 높은 친화성 결합을 나타내는 4가지(클론 3E3, SB8, 9D6 및 4D8)를 이어서 한계 희석에 의해 단세포로부터 클론 증대하도록 하고, LMH(Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma)-11, -12, -13 및 -14로 각각 지칭했다(도 42).
- [0611] 선택된 항-유전자형 항체의 결합 활성 및 차단 활성
- [0612] 항-ch806 항체가 2종의 ch806 항체에 동시에 결합하는 능력은 혈청 ch806 수준을 측정하는 ELISA의 시약으로서 사용하기에 바람직한 특징이다. 클론 하이브리도마 LMH-11, -12, -13 및 -14는 동시 결합성을 나타냈다(테이터 미제시).
- [0613] 클론 증대 후, 하이브리도마 배양 상청액은 sEGFR621과 ch806 또는 mAb806 항원 결합 활성을 중화시키는 능력에 대해 ELISA로 조사했다. 결과는 sEGFR 코팅된 플레이트에 대한 ch806 및 쥐 mAb806 결합이 모두 용액내에서 차단되어 항-유전자형 mAb LMH-11, -12, -13 및 -14의 길항제 활성을 입증했다(LMH-11, -12, -13의 경우 도 41).
- [0614] 회전병에서 대량 배양 후, 확립된 하이브리도마 클론, LMH-11, -12, -13 및 -14의 결합 특이성은 ELISA로 증명했다. LMH-11 내지 -14 항체는 마우스 모노클로날 항체 이소타입화 키트에 의해 이소타입 IgG1 κ 로 확인되었다.
- [0615] 임상 혈청 샘플 중의 ch806 약동학 ELISA 분석 개발
- [0616] 혈청 샘플 중의 ch806의 측정을 돕기 위해, 806 가변 영역에 동시에 결합하는 항-유전자형 ch806 항체의 능력은 임상 샘플에서 ch806의 민감하고 특이적인 ELISA 분석의 개발에 이용했다. 3가지 정제된 클론 LMH-11, -12 및 -13(각각 도 49B 및 49C)을 혈청 중의 결합된 ch806을 포획한 뒤 검출하는 능력에 대해 비교했다. 포획에 대해서는 LMH-12(10 μ g/ml)를 사용하고 검출에 대해서는 비오틴화된 LMH-12를 사용하여 나타낸 결과는 혈청 중의 ch806에 대해 최고의 감도를 나타냈고(3ng/ml), 배경 결합은 무시할 정도였다.
- [0617] 포획과 검출을 위해, 각각 1 μ g/ml 항-유전자형 LMH-12 및 1 μ g/ml 비오틴화된 LMH-12를 사용한 최적의 약동학 ELISA 조건을 확립한 후, 이 방법의 유효성을 확인했다. 3가지 다른 ELISA를 이소타입 대조군 hu3S193과 1% BSA/배지 또는 3명의 건강한 공여체 유래의 공여체 혈청 중의 ch806을 측정하기 위해 4반복으로 수행했다. 확인 결과는 도 43에 제시했고, 이는 3ng/ml 검출 한계로 혈청 중의 ch806(2 μ g/ml 내지 1.6 ng/ml)을 측정하기에 매우 재현성 있는 결합 곡선임을 증명했다(n=12; 1-100ng/ml, 분산 계수 <25%; 100 ng/ml - 5 μ g/ml, 분산 계수 <15%). 검사된 어떠한 3가지 혈청도 배경 결합은 확인되지 않았고, 이소타입 대조군 hu3S193에 의해 무시할 정도의 결합이 관찰되었다.
- [0618] 실시예 21
- [0619] 탄수화물 구조와 항체 인식의 평가

- [0620] EGFR, 즉 증폭 EGFR 및 de2-7 EGFR이 mAb806 항체에 의해 결합 및 인식되는데 있어서 탄수화물 구조의 역할을 추가로 평가하기 위해 실험을 수행했다.
- [0621] 탄수화물 구조가 mAb806 에피토프에 직접 수반되는지 측정하기 위해, CHO 세포에서 발현된 재조합 sEGFR을 PNGase F로 처리하여 N-결합된 글리코실화를 제거했다. 처리 후, 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, 막으로 전이시킨 뒤, mAb806으로 면역블로팅했다(도 44). 예상한 바와 같이, 탈글리코실화된 sEGFR은 SDS-PAGE에서 보다 빠르게 진행했고, 이것은 탄수화물이 성공적으로 제거되었음을 시사한다. mAb806 항체는 탈글리코실화된 물질에 분명하게 결합했고, 이는 항체 에피토프가 본래 펩타이드이며 오로지 글리코실화 에피토프인 것은 아니라는 것을 입증한다.
- [0622] ³⁵S로 대사적으로 표지된 세포주로부터 제조된 용해물은 EGFR 지향성인 여러 항체에 의해 면역침전되었다(도 45). 예상한 것처럼, 528 항체는 U87MG.Δ2-7 세포로부터 3개의 밴드를 면역침전시켰는데, 상위 밴드는 야생형(wt) EGFR에 대응하고, 하위 2개의 밴드는 de2-7 EGFR에 대응한다. 이러한 2개의 de2-7 EGFR 밴드는 종래 보고된 바 있고, 차등 글리코실화를 나타내는 것으로 생각된다(Chu et al. (1997) *Biochem. J.* Jun 15; 324 (Pt 3): 885-861). 이에 반해, mAb806은 오로지 2개의 de2-7 EGFR 밴드를 면역침전시켰고, 야생형 수용체는 과노출 후에도 전혀 존재하지 않았다(데이터 미제시). 흥미롭게도, mAb806은 528 항체에 비해, 하위 de2-7 EGFR 밴드와 증가된 상대적 반응성을 나타냈으나, 상위 밴드와는 감소된 반응성을 나타냈다. EGFR의 C-말단 도메인에 지향성인 시판 토끼 폴리클로날 항체인 SC-03 항체는, 이 항체에 의해 면역침전된 수용체의 총량이 상당히 적더라도, 528 항체에 의해 관찰되는 것과 같은 3개의 EGFR 밴드를 면역침전시켰다. mAb806의 대조군으로서 무관한 IgG2b 항체를 사용할 때 관찰되는 밴드는 없었다(실시예 18 참조).
- [0623] 528 항체는 U87MG.wtEGFR 세포로부터 야생형 수용체에 대응하는 단일 밴드를 면역침전시켰다(도 45). 또한, mAb806은 이 세포들로부터 단일 밴드를 면역침전시켰지만, 이 EGFR 밴드는 분명히 528 반응성 수용체보다 더 빠르게 이동했다. SC-03 항체는 U87MG.wtEGFR 세포로부터 두 EGFR 반응성 밴드를 면역침전시켰고, 이것은 mAb806과 528이 이 세포의 전세포 용해물에 존재하는 여러 형태의 EGFR을 인식한다는 추가 확인시켜준다.
- [0624] U87MG.wtEGFR 세포에서 관찰되는 것처럼, 528 항체는 A431 세포로부터 단일 EGFR 밴드를 면역침전시켰다(도 45). 528 반응성 EGFR 밴드는 이러한 저농도 겔(6%)에서 매우 넓었고, 이것은 아마도 수용체 글리코실화의 다양성을 반영한다. 또한, mAb806과 면역침전된 후에도 단일 EGFR 밴드가 관찰되었다. 이 EGFR 밴드는 528 전체 넓은 반응성 밴드보다 상당히 빠르게 이동하지 않았지만, 넓은 528 밴드의 침단에 재현성 있는 방식으로 위치해 있었다. U87MG.Δ2-7 세포 용해물과 달리, A431 용해물로부터 mAb806에 의해 면역침전된 EGFR의 총 양은 528 항체에 의해서보다 훨씬 적었고, 이는 mAb806이 상기 세포들의 표면에 존재하는 EGFR의 일부만을 인식함을 보여주는 당해의 스캐차드 데이터와 일치하는 결과이다(실시예 4 참조). SC-03에 의한 면역침전은 528 항체에서와 같이 넓은 단일 EGFR 밴드를 산출했다. 유사한 결과는 HN5 세포에 의해서도 수득되었다(데이터 미제시). 종합해보면, 이 데이터는 mAb806이 더 빠르게 이동하는 EGFR 종과 우선적으로 반응한다는 것을 시사하며, 이것은 수용체의 여러 글리코실화된 형태를 나타낼 수 있다.
- [0625] 수용체 프로세싱의 어떤 단계에서 mAb806 반응성이 나타나는지를 측정하기 위해, 펄스/체이스(pulse/chase) 실험을 수행했다. A431 및 U87MG.Δ2-7 세포에 ³⁵S 메티오닌/시스테인으로 5분 동안 펄스를 가하고, mAb806 또는 528과 면역침전 전에 다양한 시간 동안 37℃에서 항온처리했다(도 46). A431 세포에서 528 항체와의 면역침전 패턴은 EGFR에 특이적인 입체형태 의존적 항체에 전형적인 것이었다. 0분(즉, 펄스 5분 후)에 소량의 수용체가 면역침전했고, 표지된 EGFR의 양은 각 시점마다 증가했다. 또한, 수용체의 분자량도 시간이 경과함에 따라 함께 증가했다. 이에 반해, mAb806 반응성 EGFR 물질은 0분째 높은 수준으로 존재했고, 20분째 최고점이었으며, 그 다음 각 시점마다 감소했다. 따라서, mAb806은 초기 프로세싱 단계에서 발견되는 EGFR의 형태를 우선적으로 인식하는 것으로 보인다.
- [0626] 펄스-표지된 U87MG.Δ2-7 세포에서 관찰되는 항체 반응성은 더욱 복잡했다. 0분째 528 항체에 의한 면역침전은 하위 de2-7 EGFR 밴드의 소량이 표지되었음을 나타냈다(도 46). 528 반응성 de2-7 EGFR 하위 밴드의 양은 시간이 경과함에 따라 증가했고, 60분째 최고이고, 2시간 및 4시간째 서서히 감소했다. de2-7 EGFR의 표지된 상위 밴드는 60분까지 유의적인 양이 검출되지 않았고, 그 이후에는 마지막 시점까지 계속 증가했다. 이것은 분명히 상위 de2-7 EGFR이 수용체의 더욱 성숙한 형태라는 것을 시사한다. 또한, mAb806 반응성은 시간 경과 연구 동안 변화했지만, mAb806은 de2-7 EGFR의 하위 밴드를 우선적으로 침전시켰다. 실제로, 표지화 후 4시간까지 mAb806 상위 밴드의 유의적인 수준은 관찰되지 않았다.

- [0627] 상기 실험은 mAb806이 de2-7 및 wtEGFR의 더욱 미성숙한 글리코실화 형태와 우선적으로 반응한다는 것을 시사한다. 이 가능성은 ³⁵S 메티오닌/시스테인으로 방사 표지된 여러 세포주 유래의 EGFR을 면역침전시킨 뒤, 수득되는 침전물을 엔도글리코시다제 H(엔도 H) 분해시켜 검사했다. 이 효소는 복합 탄수화물(즉, 성숙 글리코실화)은 그대로 두면서 단백질로부터 고 만노스 형 탄수화물(즉, 미성숙 글리코실화)을 우선적으로 제거한다. 표지된 U87MG.Δ2-7 세포 용해물의 528, mAb806 및 SC-03에 의한 면역침전 및 엔도 H에 의한 분해는 유사한 결과를 제공했다(도 47).
- [0628] 예상한 바와 같이, 하위 de2-7 EGFR 밴드는 엔도 H 분해에 충분히 민감해서, 엔도 H 분해 후 SDS-PAGE에서 더 빠르게 이동했고, 이것은 이 밴드가 de2-7 EGFR의 고 만노스 형태를 나타낸다는 것을 입증한다. 상위 de2-7 EGFR 밴드는 엔도 H 분해에 본질적으로 내성이어서, 엔도 H 분해 후에도 매우 약간의 이동 차이만을 보여주었고, 이것은 탄수화물 구조의 대부분이 복합 형태인 것을 시사한다. 효소 분해 후 상위 밴드의 분자량의 적지만 재현성이 있는 감소는 상위 de2-7 EGFR 밴드에 존재하는 탄수화물이 주로 복합 형태이지만, 일부 고 만노스 구조를 보유한다는 것을 시사한다. 흥미롭게도, 이 세포들은 또한 528 면역침전 후 분명하게 볼 수 있는 내인성 wtEGFR을 소량 발현한다. 또한, 엔도 H 분해 후 야생형 수용체의 분자량은 적지만, 분명히 감소했고, 이것 역시 고 만노스 구조를 함유한다는 것을 시사한다.
- [0629] 면역침전된 wtEGFR의 엔도 H 분해에 대한 민감성은 U87MG.wtEGFR 및 A431 세포 모두에서 유사했다(도 47). 528 항체에 의해 침전된 물질의 대부분은 엔도 H 효소에 내성이었지만, 이 물질의 소량은 고 만노스 형태였다. 다시 한번 엔도 H 분해 후 wtEGFR의 분자량이 약간 감소했고, 이것은 약간의 고 만노스 구조를 함유한다는 것을 시사한다. SC-03 항체를 이용한 결과는 528 항체와 유사했다. 이에 반해, mAb806에 의해 침전된 EGFR의 대부분은 U87MG.wtEGFR 및 A431 세포 모두에서 엔도 H에 민감했고, 이것은 mAb806이 EGFR의 고 만노스 형태를 우선적으로 인식한다는 것을 확인시켜준다. HN-5 세포에서도 유사한 결과가 수득되었는데, mAb806에 의해 침전된 물질의 대부분은 엔도 H 분해에 민감했지만, mAb528 및 SC-03에 의해 침전된 물질의 대부분은 엔도 H 분해에 내성이었다(데이터 미제시).
- [0630] A431 세포주의 세포 표면 요오드화는 ¹²⁵I로 수행한 뒤, 806 항체와 면역침전시켰다. 표면 요오드화의 프로토콜은 다음과 같다: 세포 용해, 면역침전, 엔도 H 분해, SDS PAGE 및 방사능사진촬영은 전술한 바와 같다. 표지화를 위해, 세포는 10% FCS 보유 배지에서 성장시키고, EDTA로 탈착시킨 뒤, PBS로 2회 세척하고, 그 다음 PBS 400 μ l에 재현탁시켰다(약 $2-3 \times 10^6$ 세포). 여기에, ¹²⁵I(100mCi/ml 스톱) 15 μ l, 소 락토퍼옥시다제(1mg/ml) 스톱 100 μ l, H₂O₂(0.1% 스톱) 10 μ l를 첨가하고, 5분 동안 항온처리했다. 추가 10 μ l H₂O₂를 첨가하고, 추가 3분 동안 계속 항온처리했다. 그 다음, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 1% 트리톤으로 용해시켰다. 락토퍼옥시다제로 A431 세포주의 세포 표면 요오드화 후, 806 항체에 의한 면역침전은 전술한 전세포 용해물과 유사하게 A431 세포의 세포 표면에 결합된 806에 의해 인식되는 EGFR의 주요 형태가 엔도 H 분해에 민감하다는 것을 보여주었다(도 48). 이것은 A431 세포의 세포 표면에서 806에 의해 결합된 EGFR의 형태가 엔도H 민감 형태여서, 고 만노스 형이라는 것을 확인시켜준다.
- [0631] 실시예 22
- [0632] 사람화된(베니어링된) 항체 806
- [0633] A. hu806 작제
- [0634] 사람화된 806 항체(hu806)의 발현 벡터를 작제했다. 이 벡터는 8C65AAG(11891bp; 서열번호 41)로 명명했고, 단일 GS 프로모터-유도성 유전자 발현 카세트에 전체 길이의 hu806의 양 유전자를 함유하도록 설계했다(도 53 및 54).
- [0635] 중쇄 가변(VH) 및 불변(CH) 영역(각각 서열번호 42 및 43)은 도 55A에 제시했고, VH 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(각각 서열번호 44, 45 및 46)은 밑줄을 그어 표시했다.
- [0636] 경쇄 가변(VL) 및 불변(CL) 영역(각각 서열번호 47 및 48)은 도 55B에 제시했고, VL 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(각각 서열번호 49, 50 및 51)은 밑줄을 그어 표시했다.
- [0637] 사람화된 806 항체 작제물을 얻기 위해, 베니어링(v) 기술(Daugherty et al. (1991) Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. *Nucleic Acids Res.* 19(9), 2471-6; 미국 특허

허 6,797,492, Daugherty; Padlan, E.A. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 28(4-5), 489-98; 유럽 특허 519596, Padlan et al.)을 이용했다. 리간드-결합 성질을 보존하면서 806 항체 가변 도메인의 면역원성을 최소화하기 위해, 사람 항체에서 보통 발견되는 것과 다른 골격 영역 내의 표면-노출 잔기의 교체를 수행했다. 이를 수행하기 위해, 마우스 모노클로날 항체(mAb) 806의 VL 및 VH 쇄는 유전자-합성 및 오버래핑 PCR 프라이머 기술로 재조작했다. CL(카파)쇄는 동일한 방식으로 어셈블리했다. 무손상 결합 부위의 보존을 증명하기 위해, vVL 및 vVH는 scFv 형식에서도 발현되었고, 이것은 표면 플라즈몬 공명(SPR) 분석에 의해 측정되는 바와 같이 재조합 EGF 수용체(EGFR) 세포의 도메인(ECD)에 대해, 그리고 806 항원성 에피토프를 함유하는 합성 펩타이드에 대해 양호한 결합성을 ELISA로 입증했다.

[0638] v806VL 및 v806VH는 코돈-최적화 카파-LC 및 새로 디자인된 코돈- 및 스플라이스-부위 최적화된 사람 IgG1 중쇄 불변 영역을 사용하여 전체 길이 사람 IgG1 상황에 유전자조작하여 NS0 및 CHO 세포계에서 안정한 유전자 발현을 달성했다. 이 발현계는 론자 바이올로지스(LONZA Biologics)에 의해 제공되는 바와 같은, pEE12.4 및 pEE6.4 중쇄 및 경쇄 발현 벡터를 이용하는 론자 GS 발현계를 기반으로 한다.

[0639] 8C65AAG 벡터의 일시적 발현에 의해 수득된 hu806 항체 산물(도 55)은 SPR에서 재조합 EGFR-ECD와 반응성이었고, ELISA에서 합성 EGFR 806 펩타이드 에피토프와 반응성이었다. 8C65AAG 벡터는 안정한 GF-NS0 hu806 세포주를 제조하기 위해 LICR Affiliate Christoph Renner(취리히 대학)로 옮기고, GS-CHO hu806 세포주의 제조를 위해 LICR(멜버른 센터)로 옮겼다.

[0640] hu806 항체 유전자의 삭제, 증폭 및 클로닝을 위한 전략

[0641] 베니어링 및 코돈 최적화

[0642] 항체 베니어링은 HAMA(사람 항-마우스 항체) 반응을 역행하는 것을 목적으로 하는 사람화 전략이다. 마우스 mAb는 환자의 면역계에 의해 "이종" 항원으로 간주되고, 1회 투여시에도 면역 반응이 유도되어 이 환자들에 추가 시약의 사용을 방해한다. mAb806 베니어링 과정의 제1 단계에서, mAb806의 VL 및 VH 쇄의 아미노산 서열을 분석하고, mAb806 단백질 서열의 각 아미노산 잔기를 표면 노출에 대해 등급화했다(도 56 및 57). 항체 분자의 외측에 존재하는 아미노산들만이 가능한 변형에 대해 고려되었는데, 그 이유는 이들이 항체 인식에 노출될 수 있는 유일한 것이기 때문이다. BLAST를 사용하여, mAb806 단백질 서열을 3가지 사람 항체 서열(VH36germ, CAD26810 및 AAA37941)과 비교했다. mAb806 표면 잔기가 사람 항체 서열의 컨센서스와 부합하지 않는 경우, 이 잔기는 컨센서스 서열로 변화되도록 확인했다. VL의 처음 12개 아미노산은 베니어링으로 처리되었고; ch806의 VH 쇄의 14개 아미노산도 베니어링으로 처리되었다(도 56 및 도 57).

[0643] 코돈 최적화는 항체 발현에 사용된 계의 코돈 편향을 기반으로 하여 항체 또는 다른 단백질의 이종 발현을 향상시키기 위한 수단이다. hu806 생성의 목표 중 하나는 이 항체의 발현 수준을 향상시키기 위해 코돈 최적화를 이용하는 것이었다. 이 발현계는 론자 바이올로지스에서 제공하는 바와 같은 pEE12.4 및 pEE6.4 HC 및 LC 발현 벡터 및 생산 세포로서 NS0 및/또는 CHO 세포를 이용하는 론자 GS 발현계를 기반으로 한다. 따라서, 주어진 아미노산에 대해 사용할 코돈에 대한 결정은 이 코돈이 NS0/CHO 발현계에 유리한 것인지 아닌지를 고찰하여 수행했다.

[0644] PCR에 의한 806 DNA 서열의 삭제 및 증폭

[0645] hu806 항체의 가변성 중쇄(VH) 및 가변성 경쇄(VL) 영역의 베니어링된, 코돈 최적화된 형태의 서열은 다음과 같은 방식으로 합성했다: 각 영역(VH 또는 VL)을 위해, 8-10개 올리고뉴클레오타이드를 오버래핑 센스 및 안티센스 프라이머로서 디자인했다. 이 올리고는 시그널 서열, 암호화 서열, 인트론을 포함하는 전체 hu806 VH 또는 VL 서열을 커버하도록 서로 중첩시킬 수 있고, 5' 말단에 HindIII 부위와 3' 말단에 3' BamHI 부위를 포함한다. 이 올리고뉴클레오타이드 맵은 도 56B 및 57B에 제시했고, 프라이머 세부사항은 이하에 제공한다.

[0646] 간략히 설명하면, hu806 VH 또는 VL은 다음과 같이 PCR로 어셈블리했다: 먼저, v806hc- 또는 v806lc-올리고 1,2,3,4, 올리고 5,6 및 올리고 7,8,9,10을 3가지 다른 반응에서 배합했다. 각 인접 올리고의 분취량(50pmol) 및 각 내부 올리고 5pmol은 뉴클레아제 무함유 물 48μl 및 2x HotStar Taq Master Mix(Qiagen) 25μl를 함유하는 50μl PCR 반응물에 첨가했다. 가열 순환 프로그램은 다음과 같다: 95°C, 15"; [94°C, 30"; 58°C, 30"; 72°C, 30"]x20 사이클; 72°C, 10"; 4°C. 이 3단 반응의 산물은 겔 전기영동으로 분리한 후 절제했다. 그 다음, 이들을 염 컬럼(Qiagen-Qiaspin Minipreps)으로 정제하여 배합했다. 이 산물은 프라이머 1 및 10을 이용해 PCR로 추가 증폭시켰다. 2번째 반응의 산물은 HindIII 및 BamHI의 제한효소 부위를 포함하여 발현 플라스미드에 삽입할 수

있다.

hu806 V-영역을 PCR 합성하는데 사용한 올리고뉴클레오타이드:

v806 VH:	서열번호
v806hc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACCTGGCGCATTC 52
v806hc -2:	CCCTTCCTCCTCACTGGGATTTGGCAGCCCCTACCTGTGGCGGTGCT 53
v806hc -3:	ACCAGAAAGAGAATGCGCCAGGTCCAATCC 54
v806hc -4:	CCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTCACCATCGAAGCCAGTCAAG 55
v806hc -5:	GGGGCTTCCATCCACTCCTGTGTCTTCTCTAC 56
v806hc -6:	GACTCGGCTTGACAAGCCCAGGTCCACTCTCTTGGAGCTGCACCTGGCT 57
v806hc -7:	GTGGACACCTGTAGAGAAGACACAGGAGTGG 58
v806hc -8:	GGGCTTGTCAAGCCGAGTCAAACCTTGTCCCTAACATGTACTGTGTCCG 59
v806hc -9:	GATACTCTATCTCATCAGATTTTGGCTGGAATTGG 60
v806hc -10:	CCCAGAGTATGATATGTAGCCCATCCATTCTAAACCTTTCCTGTGGC 61
	TGCCTTATCCAAATCCACGCAAAATCTGATG
	GGGCTACATATCATACTCTGGGAACACCAGATATCAACCCTCTCTGAAA
	AGCCGGATCACAATCACTAGGGACACGTCG
	GCAATATATGTTGTGTGTCTGGGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG
	GAAGAAGCTGGCTCTTCGACGTGTCCCTAGTGATTG
	CCAGACACAGCAACATATTACTGCGTAACCGCTGGCAGAGGCTTCCCC
	TATTGGGGACAGGGCACCCCTAGTGACAGTGAGC
	CACGGATCCATCTTACCGCTGCTCACTGCTACTAGGGTG

v806 VL:	서열번호
v806lc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG 62
v806lc 2:	CTGGGATTTGGCAGCCCCTACCTGTTGCGGTGCTACAAGAAACAGTA 63
v806lc 3:	TTCTCCAAGTCCAATCCATGGTGGCGGCAAG 64
v806lc 4:	GGGGCTGCCAAATCCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTGACCATC 65
v806lc 5:	GAAGCCAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCC 66
v806lc 6:	CATGCTGGATGGACTCTGAGTCATCTGAATATCACTGTGAACACCTGTA 67
v806lc 7:	GAGAAGACACAGGAGTGGATGGAAGCCC 68
v806lc 8:	CTCAGAGTCCATCCAGCATGTCTAGTCTCCGTGGGAGATAGGGTGACGA 69
v806lc 9:	TAACCTGTCAATCAAGCCAAGACATCAACTCC 70
v806lc 10:	GTTCCGTGATAGATTAGTCCTTTGAAGGACTTACCAGGCTTCTGTGGA 71
	GCCATCCAATATTGGAGTTGATGTCTTGGCTTG
	CAAAGGACTAATCTATCACGGAACAACTTGGACGACGCGGTGCCATC
	GAGATTTTCAGGGTCTGGCAGCGGGACCGACTATAC
	GTGCTGGACGACAGTATGTGGCAAAGTCTTCTGGCTCTAAGCTAGA
	GATGGTCAGTGTATAGTCGGTCCCGCTG
	CATACTACTGCGTCCAGCACGCTCAGTTCGCCCTGGACATTCGGCGGCGG
	CACAAAAGTGGAAATCAAACGTGAGTAGGG
	CTCGGATCCCTACTCACGTTTGATTTC

hu806 CL:

불변 카파 경쇄(CL)의 코돈-최적화된 형태는 가변 영역에 사용된 것과 유사한 방식으로 제조했다. 하지만, 초기 PCR 단계는 올리고 VK1cons-1, 2, 3, 4; 및 5, 6, 7, 8을 이용하는 2가지 예비 산물만을 작제했다. 또한, 이 산물의 인접 제한효소 부위는 플라스미드 삽입 전에 BamHI 및 NotI이었다.

hu806 CL-영역을 PCR 합성하는데 사용한 올리고뉴클레오타이드:

VK1cons-1:	서열번호
VK1cons-1:	GACGGATCCTTCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACG 72
VK1cons-2:	GGAGCTGCGACGGTTCCTGAGGAAAGAAAGCAACAGGATGGTGTAA 73
VK1cons-3:	GTAACAATGGCCACGTCATCCGACCCCCTC 74
VK1cons-4:	GGAAACCTGCGACGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCATCCGACGAGC 75
VK1cons-5:	AACTGAAAGTCAGGCACAGCCTCCGTGGTG 76
VK1cons-6:	GTGCGTTGTCCACTTTCCACTGGACTTTGGCCTCTCTTGGGTAAGTT 77
VK1cons-7:	ATTAAGGAGGCACACCGAGGCTGTGC 78
VK1cons-8:	GTGGAAAAGTGGACAACGCACTACAGAGCGGGAAGTCTCAGGAAAGCG 79
	TGACAGAGCAGGACTCAAAAGATTCAACATACAGCC
	CTTACAGGCATATACCTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTTGACAGTGTG
	AGGGTAGAAGATAGGCTGTATGTTGAATCTTTGAGTC
	GCACAAGGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATCAGGAGTCTCAGAGCCC
	TGTCACTAAAAGTTTAAATAGAG
	CCTGCGGCCGCTTATCAGCATTCGCTCTATTAAGTCTTTGGTGAGAG
	GG

hu806 CH:

IgG1 불변 중쇄(CH) 유전자의 합성, 사람화된 형태(서열번호 80)는 GeneArt(Regensburg, Germany)에서 구입했다. 이 유전자는 CHO/NSO 세포에서 발현에 대해 코돈 최적화했다. 이 유전자 서열의 세부사항, 제한 부위 등도 58에 제시했다.

발현 플라스미드의 작제

일시적 형질감염 및 예비 검사를 위해, 전술한 방식으로 제조한 hu806 VH 및 VL 서열은 일반적인 불변 영역을

함유하는 발현 벡터에 연결시켰다. LICR Affiliate Christoph Renner(취리히 대학, 스위스)에게서 제공받은 이 벡터는 pEAK8 HC(일반적인 CH 함유) 및 a33-xm-1c(일반적인 CL 함유)로 알려져 있다. 벡터는 CIP의 존재 하에 BamHI 및 HindIII를 이용해 분해한 뒤, hu806 VH 및 VL을 대응 벡터에 연결시켰다. 수득되는 플라스미드는 Top10 화학적 컴피턴트 이.콜라이(Invitrogen)의 형질전환에 제조업자의 지침에 따라 사용했다. 형질전환된 이.콜라이는 LB+애플리핀 플레이트에 도말하고, 내성 클론을 제한효소 분해 및 PCR로 선별했다. 일반적으로, 이 방식에서 검출된 8개의 양성 클론이 분리될 수 있고, 추가 증폭시켰다. 이 콜로니로부터 정제한 DNA는 자동 DNA 서열결정으로 분석했다.

[0655] 이 불변 영역의 코돈-최적화된 형태는 BamHI 및 NotI를 이용한 제한효소 분해 및 연결로 상기 작제물에 첨가했다. 이 형질전환체는 전술한 바와 같이 선택하고, 서열결정한 뒤, 분석했다. 전체 길이의 항체쇄가 론자 GS계에 연결되기 전에, 가변 영역 및 불변 영역 서열 사이의 BamHI 부위를, 한 경우에는 BamHI으로 분해하여 파괴하고, DNA 폴리머라제로 채운 뒤, 평활말단 연결시켰다.

[0656] 그 다음, hu806(VH+CH) 또는 hu806(VL+CL)을 함유하는 제한 단편은 NotI과 이어서 HindIII로 분해했다. 이 분해는 NotI 부위에 평활 말단을 만들도록 설계했고, 다음과 같은 방식으로 연속해서 수행했다. 먼저, 플라스미드는 NotI로 분해했다. 완전 분해된(단일 절단) 플라스미드를 1% 아가로스 겔을 이용한 전기영동으로 분리했다. 그 다음, 산물을 절제하고, 염 컬럼에서 정제한 뒤, DNA 폴리머라제를 이용해 증진했다. 이 반응의 산물은 염 컬럼 정제된 다음, HindIII으로 분해했다. 그 다음, 이 산물(hu806(VH+CH)의 경우 약 1.3Kb, hu806(VL+CL)의 경우 약 0.8Kb)을 겔 전기영동으로 분리하고, 절제한 뒤, 정제했다.

[0657] 벡터 pEE12.4 및 pEE6.4(Lonza Biologics plc, Slough, UK)는 각각 HindIII 및 PmlI로 분해했다. hu806(VH+CH)은 pEE12.4에 연결시켜, pEE12.4-hu806H를 만들고, hu806(VL+CL)은 pEE6.4에 연결시켜 pEE6.4-hu806L을 만들었다.

[0658] 선별 후, hu806 중쇄 및 경쇄 서열을 모두 함유하는 조합된 이중 유전자 론자 플라스미드가 제조되었다. 간략히 설명하면, pEE12.4-hu806H 및 pEE6.4-hu806L 벡터를 NotI 및 SalI 제한효소로 분해했다. 그 다음, GS 전사 단위 및 hCMV-MIE 프로모터와, hu806 중쇄 또는 경쇄 발현 카세트를 함유하는 최종 단편을 분리하고, 함께 연결시켰다. 그 결과 수득되는 "조합된" 론자 플라스미드(8C65AAG라 명명)는 HEK 293계에서 단일-플라스미드 일시적 형질감염 및 NS0 및 CHO계에서 안정한 형질감염에 사용했다. 플라스미드 맵은 도 53에 도시했다.

[0659] 작제물에 대한 변형

[0660] 베니어링된 hu806 Hc 및 hu806Lc의 확인된 전체 아미노산 서열은 각각 도 59와 도 60에 mAb806과 비교하여 제시했다. 부록에서 hu806 서열 옆에는 별표(*)가 표시되어 있고, 이는 최초 베니어링 변화를 나타내며, 번호 (1-8)은 본원에 기술된 변형 번호 1 내지 8번을 의미한다.

[0661] 도 60과 관련하여, 참조 파일(mAb806 LC)은 91번 위치에 정확한 티로신(Y)이 아닌 히스티딘(H)을 부정확하게 나타내며, 이것이 변형 #1의 대상이다. 도 60에 포함된 수정되지 않은 원본 파일 서열은 위치 91에서 hu806에 이루어진 필수 변형을 예시하기 위한 것이다.

[0662] hu806 cDNA 서열은 최초 작제 및 서열결정 단계 후 많은 변형이 이루어졌다. 이러한 변형을 만드는 이유는 다음과 같은 이유를 포함한다: 서열 변형 목적을 위해 4개의 제한 효소 부위를 도입하기 위해, PCR 동안 서열에 도입된 2개의 아미노산 오류를 수정하기 위해, 최초 mAb806 문서화 시에 나타난 한 아미노산의 오류를 수정하기 위해, 그리고 추가 베니어링 변형체를 유효하게 하기 위한 4개의 추가 아미노산 변화를 조작하기 위해. 다음과 같은 변형의 8 단계가 수행되었다:

[0663] 1. hu806 VL: CDR3 H91Y

[0664] 최초 올리고뉴클레오타이드가 부정확하게 만들어진 문서는 mAb806 VL 서열의 CDR3에서 위치 91번이 CAC(히스티딘, H)이라고 제시했다. TAC(티로신, Y; 특허 WO 02/092771)의 정확한 서열을 만들기 위해 부위-지시된 돌연변이 유발을 사용했다. 결과적으로 나타나는 이 위치의 아미노산 서열 변화는 CVQHAQF(서열번호 84)에서 CVQYAQF(서열번호 85)로의 변화였다. 최종 DNA와 해독된 단백질 서열은 ch806과 비교하여 도 61에 제시했다.

[0665] hu806 VL 영역의 히스티딘을 티로신으로 변형시키기 위한 센스 프라이머(PDV1; 40량체)

[0666] 5'-CCACATACTACTGCGTCCAGTACGCTCAGTTCCTGGAC-3' (서열번호 86)

- [0667] hu806 VL 영역의 히스티딘을 티로신으로 변형시키기 위한 안티센스 프라이머(PDV2; 20량체)
- [0668] 5'-CTGGACGCAGTAGTATGTGG-3' (서열번호 87)
- [0669] 2. hu806 중쇄: 제한효소 부위 DraIII 및 FseI의 첨가
- [0670] 제한효소 부위는 hu806 VH 및 VL 영역 주위의 인트론에 첨가했다. 이러한 제한효소 부위(pREN 벡터계의 고유한 부위, LICR)는 발현 카세트에 대한 변형을 제조하는 방법이 용이하도록 설계했다. 초기 시그널 영역을 포함하지 않는 hu806 VH 서열은 DraIII 부위를 단일 분해하여 제거하거나 삽입할 수 있다. 또한, FseI는 최초 서열로부터 BamHI의 기능을 이행하면서 불변 영역을 절단해내기 위해 NotI(pREN계) 또는 EcoRI(Lonza 계)과 함께 사용될 수 있다.
- [0671] 이러한 변형은 2단계 PCR 과정으로 달성했다. 그 다음, 산물은 HindIII과 BglIII로 분해했다. 그 다음, HindIII과 BamHI으로 분해된, 코돈-최적화된 불변 영역을 함유하는 pREN 벡터에 연결시켰다. 이 재연결 과정은 BamHI 부위를 파괴했다.
- [0672] 제1 DraIII 부위 상류의 가변 영역에 대한 센스 프라이머(806 중쇄 DraIII Up; 26량체)
- [0673] 5'-GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG-3' (서열번호 88)
- [0674] DraIII 부위 I을 첨가하는 안티센스 프라이머(806 중쇄 DraIII Down; 28량체)
- [0675] 5'-CACTGGGTGACTGGCTTCGATGGTGACC-3' (서열번호 89)
- [0676] 두 DraIII 부위 사이의 HC 가변 영역에 대한 센스 프라이머(806 중쇄 DraIII-FseI Up; 49량체)
- [0677] 5'-GGTCACCATCGAAGCCAGTCACCCAGTGAAGGGGGCTTCCATCCACTCC-3' (서열번호 90)
- [0678] DraIII 부위 II 및 FseI 부위를 첨가하는 안티센스 프라이머(806 중쇄 DraIII-FseI Down; 44량체)
- [0679] 5'-CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATCTTACCGCTGCTCAC-3' (서열번호 91)
- [0680] 3. hu806 경쇄: 제한효소 부위 RsrII 및 PacI의 첨가
- [0681] hu806 경쇄를 위해, 첨가된 제한효소 부위는 중쇄에서 DraIII과 같은 기능을 하는 RsrII, 및 FseI의 기능과 일치하는 PacI이었다.
- [0682] 제1 RsrII 부위의 상류 가변 영역을 위한 센스 프라이머(806 경쇄 RsrII Up; 22량체)
- [0683] 5'-GAGAAGCTTGCCGCCACCATGG-3' (서열번호 92)
- [0684] RsrII 부위 I을 첨가하는 안티센스 프라이머(806 경쇄 RsrII Down; 25량체)
- [0685] 5'-CGGTCCGCCCCCTTGACTGGCTTCG-3' (서열번호 93)
- [0686] 두 RsrII 부위 사이의 LC 가변 영역을 위한 센스 프라이머(806 경쇄 RsrII-PacI Up; 45량체)
- [0687] 5'-CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC-3' (서열번호 94)
- [0688] RsrII 부위 II, 및 PacI 부위를 첨가하는 안티센스 프라이머(806 경쇄 RsrII-PacI Down; 50량체)
- [0689] 5'-CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCAGTTTTG-3' (서열번호 95)
- [0690] 4. hu806 VH: 재베니어링 P85A
- [0691] VH 아미노산 81-87에서 모체 mAb806의 단백질 서열은 SVTIEDT (서열번호 96)이다. 베니어링 과정의 일부로서, 위치 84와 85의 이소류신과 글루탐산을 알라닌-프롤린으로 변화시켜 SVTAPDT로 만들었다(서열번호 97; 도 56). 추가 분석을 통해, 이 케이스에서 알라닌이 프롤린보다 더 우수한 선택이었던 것으로 결정되었다. 부위-지시된

돌연변이유발을 사용하여 이하에 기재된 프라이머로 2차 변화(SVTAADT, 서열번호 98)을 수득했다. 최종 DNA와 해독된 단백질 서열은 도 62에 제시했다.

[0692] 센스 프라이머(Fx3; 49량체)
5'-CTGCAGCTGAACTCCGTTACAGCCGCAGACACAGCAACATATTACTGCG-3'
(서열번호 99)

[0693]
[0694] 안티센스 프라이머(Fx4; 49량체)
5'-CGCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGCGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG-3'
(서열번호 100)

[0695]
[0696] 5. hu806 VH: 추가 베니어링

[0697] hu806 중쇄 가변 영역 서열은 초기 베니어링 후 3가지 돌연변이, 즉 T70S, S76N 및 Q81K를 추가로 수행했다. 위치 76에서 세린에서 아스파라긴으로의 변화는 mAb806 분자의 초기 서열로의 정확한 복귀를 나타냈다. 이 서열들이 마우스 항체에서는 발견되지 않고 사람 항체에서 발견되는 잔기를 나타내기 때문에 골격에 추가 변화를 포함시켰다. 따라서, 단백질 서열 TRDTSKSQFFLQ(서열번호 101)는 SRDTSKNQFFLK(서열번호 102)로 베니어링되었다. 최종 DNA 및 해독된 단백질 서열은 mAb806과 비교하여 도 62에 제시했다.

[0698] HC 가변 영역 5' PCR 단편의 센스 프라이머(hu806HCfx2-5p-U; 49량체)
5'-GGTCACCATCGAAGCCAGTCACCCAGTGAAGGGGCTTCCATCCACTCC-3'
(서열번호 103)

[0699]
[0700] 처음 2개의 변화를 첨가하는 5' PCR 단편용 안티센스 프라이머(hu806HCfx2-5p-D; 45량체)
5'-GATTCTTCGACGTGTCCCTTGAGATTGTGATCCGGCTTTTCAGAG-3'
(서열번호 104)

[0701]
[0702] 모든 변화를 첨가하는, 3' PCR 단편용 센스 프라이머(hu806HCfx2-3p-U; 55량체)
5'-CAAGGGACACGTGCGAAGAATCAGTTCTCCTGAACTGAACTCCGTTACAGCCGC-3'
(서열번호 105)

[0703]
[0704] HC 가변 영역 3' PCR 단편용 안티센스 프라이머(hu806HCfx2-3p-D; 44량체)
5'-CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATCTTACCGCTGCTCAC-3'
(서열번호 106)

[0705]
[0706] 6. hu806 VL: E79Q 베니어링

[0707] 이것은 수행된 유일한 작제후 VL 베니어링 변형이다. 79번 위치에서 서열 SSLEPE(서열번호 107)를 SSLQPE(서열번호 108)로 수정하기 위해 부위 지시된 돌연변이유발을 이용했다. 최종 DNA 및 해독된 단백질 서열은 ch806과 비교하여 도 61에 제시했다.

[0708] LC 가변 영역 5' PCR 단편용 센스 프라이머(hu806LC-5p-U; 45량체)
5'-CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC-3'
(서열번호 109)

[0709]
[0710] 의도한 돌연변이를 첨가하는, 5' PCR 단편용 안티센스 프라이머(hu806LC-5p-D; 34량체)
5'-CTCTGGTTGTAAGCTAGAGATGGTCAGTGTATAG-3' (서열번호 110)

[0711]
[0712] 의도한 돌연변이를 첨가하는 LC 가변 영역 3' PCR 단편용 센스 프라이머(hu806LC-3p-U; 45량체)
5'-CCATCTCTAGCTTACAACCAGAGGACTTTGCCACATACTACTGCG-3'
(서열번호 111)

[0713]

- [0714] LC 가변 영역 3' PCR 단편용 안티센스 프라이머(hu806LC-3p-D; 50량체)
5'- CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCAGTTTTG -3'
(서열번호 112)
- [0715]
- [0716] 7. hu806 경쇄: 카파 불변 영역 스플라이스-연접 변형
- [0717] 이 점 돌연변이는 카파 불변 영역의 코돈-최적화된 형태의 스플라이싱 시에 오류를 수정하는데 필요했다. 이 변화 전에, VYACEVTH(서열번호 113)으로 시작해서 이 분자의 끝까지 계속되는 아미노산 쇄의 부분은 최종 항체에 포함되지 않을 것이다(도 60).
- [0718] LC 불변 카파 5' PCR 단편용 센스 프라이머(F1; 21량체)
5'- GGCGGCACAAAACCTGGAAATC -3' (서열번호 114)
- [0719]
- [0720] 수정을 첨가하는 LC 불변 카파 5' PCR 단편용 안티센스 프라이머(F2; 59량체)
5' - GATGAGTTACTTCACAGGCATATACTTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTTGACAGTGTC - 3'
(서열번호 115)
- [0721]
- [0722] 수정을 첨가하는 LC 불변 카파 3' PCR 단편용 센스 프라이머(F3; 26량체)
5'- AGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATC -3' (서열번호 116)
- [0723]
- [0724] LC 불변 카파 3' PCR 단편용 안티센스 프라이머(F4; 17량체)
5' - GCCACGATGCGTCCGGC - 3' (서열번호 117)
- [0725]
- [0726] 8. hu806 VH : N60Q
- [0727] 작제의 초기 단계에서 항체 806에 수행된 베니어링 변화 외에, VH CDR2의 위치 60번에 있는 아스파라긴을 이번에는 글루타민으로 변화시켰다. N-글리코실화는 구성 N X S/T(여기서, X는 임의의 아미노산이다)을 따른다. 위치 60의 아미노산 서열은 이 구성을 따라 N P S였다. 하지만, N-글리코실화를 위한 X 위치에서 프롤린(본 실시예에서처럼)이나 시스테인이 발견되는 경우는 드물다. 일정하지 않은 글리코실화가 항체의 반응성에 변화를 초래할 수 있다는 것은 문제였다. 따라서, 아스파라긴을 제거하고, 이와 가장 근연성이 있는 아미노산인 글루타민으로 교체하여, 이 부위가 글리코실화될 임의의 잠재성을 제거했다(도 59 및 도 62).
- [0728] 베니어링된 hu806 항체 8C65AAG 작제물의 결합
- [0729] 초기 항원 결합 확인을 위해 소량의 hu806을 제조할 수 있도록 최종 플라스미드 8C65AAG를 이용한 293FT 세포의 일시적 형질감염을 수행했다. 여러 소량의 반복된 일시적 형질감염 유래의 배양 상청액을 수집해서, 농축하고, 단백질-A 크로마토그래피 단계를 이용하여 hu806 항체를 수집했다. 정량적 huIgG1 ELISA로 측정했을 때 약 1 내지 2 μ g의 hu806 항체가 수득되었고, 재조합 EGFR-ECD에 대한 결합에 대해 Biacore로 항체를 분석했다(도 63). 세포 배양 배지로부터 소 면역글로불린이 hu806과 공동정제되었고, 총 IgG의 주요 분획을 나타냈으며, 이는 hu806 결합의 정량적 평가를 제한한다.
- [0730] 서열분석 프라이머
- [0731] RenVecUPSTREAM: 센스 프라이머는 피크8 및 a33xm 벡터에 존재하는 가변 영역의 상류부터 서열분석을 시작한다.
5'- GCACTTGATGTAATTCTCCTTGG -3' (서열번호 118)
- [0732]
- [0733] RenVecDwnstrmHC: 안티센스 프라이머는 피크8 중쇄 플라스미드에 존재하는 가변 영역의 하류부터 서열분석을 시작한다. 코돈 최적화되지 않은 HC 불변 영역 내에서 어닐링한다.
5'- GAAGTAGTCCTTGACCAGG -3' (서열번호 119)
- [0734]
- [0735] RenVecDwnstrmLC: 안티센스 프라이머는 a33-xm-1c 경쇄 플라스미드에 존재하는 가변 영역의 하류부터 서열분석을 시작한다. 코돈 최적화되지 않은 LC 불변 영역 내에서 어닐링한다.

- [0736] 5'-GAAGATGAAGACAGATGGTGCAG-3' (서열번호 120)
- [0737] Upstrm Lonza: 센스 프라이머는 론자 벡터 pEE12.4 및 pEE 6.4에서 가변 영역의 상류부터 서열분석을 시작한다. 이것은 조합된 플라스미드 내에 중복 영역이기 때문에 조합된 론자와 함께 사용될 수 없다.
- [0738] 5'-CGGTGGAGGGCAGTGTAGTC-3' (서열번호 121)
- [0739] Dnstrm 6-4: 안티센스 프라이머는 론자 벡터 pEE6.4 내의 불변 영역의 하류부터 서열분석을 시작한다.
- [0740] 5'-GTGATGCTATTGCTTTATTG-3' (서열번호 122)
- [0741] Dnstrm 12-4: 안티센스 프라이머는 론자 벡터 pEE12.4 내의 불변 영역의 하류부터 서열분석을 시작한다.
- [0742] 5'-CATACCTACCAGTTCTGCGCC-3' (서열번호 123)
- [0743] Cod-Opt LC const E: 센스 프라이머, 코돈 최적화된 경쇄 v-카과 불변 영역 내부
- [0744] 5'-CCATCCTGTTTGCTTCTTCC-3' (서열번호 124)
- [0745] Cod-Opt LC const F: 안티센스 프라이머, 코돈 최적화된 경쇄 v-카과 불변 영역(vk) 내부
- [0746] 5'-GACAGGGCTGCTGAGTC-3' (서열번호 125)
- [0747] 806HCspec: 806 HC 가변 영역의 베니어링된 형태에 고유한, 내부 존재하는 센스 프라이머.
- [0748] 5'-GTGCAGCTCCAAGAGAGTGAC-3' (서열번호 126)
- [0749] 806LCspec: 806 LC 가변 영역의 베니어링된 형태에 고유한, 내부 존재하는 센스 프라이머.
- [0750] 5'-CAGAGTCCATCCAGCATGTC-3' (서열번호 127)
- [0751] IgG1 hu806을 암호화하는 플라스미드 8C65AAG의 서열과 주식의 진뱅크 형식화된 텍스트 문서는 도 64에 제시했다.
- [0752] 도 53은 벡터 NTI(Invitrogen)를 사용하여 제조했다.
- [0753] 도 59-62는 벡터 NTI AlignX를 사용하여 제조했다.
- [0754] 고찰
- [0755] 806 항-EGF 수용체 항체의 베니어링은 포유동물 CHO 또는 NS0 세포에서의 발현을 위해 제시한 바와 같이 코돈 최적화 시, VH 쇄(도 59 및 도 62)에 14개 아미노산의 돌연변이와 VL 쇄(도 60 및 도 61)에 12개 아미노산의 변화를 수반했다. 8C65AAG로 지칭한 최종 이중 유전자 벡터의 서열을 확인하고, 암호화 서열과 해독을 점검했다. 제조한 EGFR 세포외 도메인에 대한 결합은 일시 발현된 hu806 산물을 사용하여 Biacore 분석으로 확인했다.
- [0756] 무손상 hu806 항체를 높은 수준으로 생산하는 안정한 단일 클론은 론자가 권장하는 바와 같은 글루타민-무함유 배지에서 선택했다. 안정한 클론은 무혈청 배양물을 얻기 위해 점차 혈청 없이 배양했다.
- [0757] B. hu806의 시험관내 및 생체내 특성화
- [0758] 높은 생산성의 안정한 GS-CHO hu806 형질감염체 14D8, 15B2 및 40A10과 GS-NS0 hu806 형질감염체 36을 발달시켜 소량 배양물을 예비 hu806 산물 정제 및 특성화할 수 있도록 조사했다. 결과는 유사한 이화학적 성질을 나타냈다. 따라서, 최고 생산성 형질감염체(GS-CHO hu806 40A10)를 가지고 대량(15L) 교반 탱크 배양을 수행했고, 정제한 산물을 U87MG.de-7 및 A431 이중이식편 모델에서 추가 시험관내 특성화 및 생체내 치료법 연구를 수행했다.
- [0759] 방법론 및 결과
- [0760] 생산 및 하류 프로세싱:
- [0761] 소량 생산
- [0762] 진탕 플라스크 실험은 100ml 세포 배양물 용적을 담은 E500 진탕 플라스크로 수행했다. 도 76은 배양 동안 4가

지 형질감염체의 세포 생존도 및 항체 생산성 차트를 나타낸 것이다. 산물 농도는 코팅 항체로서 806 항-유전자형 항체 LMH-12(Liu et al. (2003) Generation of anti-idiotypic antibodies for application in clinical immunotherapy laboratory analyses. *Hybrid Hybridomics*. 22(4), 219-28)와 표준물로서 ch806 임상 로트: J06024를 사용하여 ELISA로 평가했다. 수거물의 물질은 원심분리하고, 상청액은 0.2 μ m 여과한 뒤, 항체를 단백질-A 크로마토그래피로 친화성 정제했다.

[0763] 대량 생산

[0764] hu806 후보 클론 40A10을 발현하는 CHO-K1SV 형질감염 세포주는 기본 배지로서 CD-CHO(Invitrogen)/25 μ M L-메티오닌 선풍시민(MSX; Sigma)/GS 보충물(Sigma)을 사용하여 16일 동안 글루코스 샷 공급 하에 15L 교반 탱크 생물반응기에서 배양했다. 도 76C는 15L 교반 탱크 생물반응기에서의 세포 성장 및 체적 생산을 나타낸다. 최종 수율은 ELISA에서 58mg/L씩 14.7L였다.

[0765] 수거 물질은 원심분리하고 상청액은 0.2 μ m 여과한 뒤, Pall Centrimate 농축기의 2x30K 막을 이용하여 2L로 농축했다. 분취량(4x500ml)은 이어서 250ml 단백질 A 컬럼에 적용하고, 200mM NaCl을 함유하는 50mM 시트르산염 pH 4.5로 용출했다. 4회 실험으로부터 용출된 항체는 모아서, 농축하고, PBS, pH 7.4로 투석했다.

[0766] 소량 배양 및 대량 배양 시의 hu806 산물은 OD A280nm로 정량분석했다. rProtein-A로부터 회수한 항체 샘플은 크기 배제 크로마토그래피(SEC)(소량, 도 77; 대량, 도 78), 환원 및 비환원 조건 하의 4-20% 트리스-글리신 SDS-PAGE(도 79-81)로 평가하고, 등전점 전기영동은 Ampholine PAG 플레이트에서 Amersham Multiphor II 전기영동 시스템(pH 3.5-9.5)으로 제조업체의 지시에 따라 수행했다(도 82).

[0767] 단백질-A 친화성 정제된 hu806 항체는 대칭적인 단백질 피크를 나타냈고 ch806 임상 참조 물질과 동일한 SEC 용출 프로필을 나타냈다. SDS-PAGE 겔 프로필은 면역글로불린과 일치했다. IEF 패턴은 단백질 서열에 대해 계산된 pI인 8.4와 일치하는 8.66 내지 8.82 범위의 pI를 가진 3개의 이소폼을 나타냈다.

[0768] 결합 분석

[0769] FACS 분석

[0770] OD A280nm으로 각 샘플에서 측정된 항체 농도의 평가 값은 선암종 세포주 A431 세포(EGFR 유전자 증폭 함유)의 FACS 분석에 이용했다. 본 발명자들은 mAb806이 wtEGFR-특이적 mAb528에 비해 A431 종양 세포에서 발현된 약 2×10^6 wtEGFR의 약 10%에 결합한다는 것을 관찰한 바 있다(Johns et al. (2002) Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int. J. Cancer*. 98(3), 398-408). 세포를 4가지 hu806 샘플 중 하나, 무관한 IgG2b 항체 또는 양성 대조군 ch806으로 염색했고; 각각 20 μ g/ml의 농도에서 평가했다. 2차 항체만의 대조군도 포함시켰다(염소 항 hu-IgG(Fc 특이적) FITC 접합된). 복합 FACS 결합곡선은 도 83에 제시했고, 모든 작제물의 동등한 염색을 나타내고 있다.

[0771] 대량 배양에 의해 생산된 hu806 40A10 샘플의 세포 결합 특성은 또한 변형 EGFRvIII 수용체(Johns et al., 2002)를 발현하는 U87MG.de2-7 신경아교종 세포뿐 아니라 A431에 결합하는지에 대해 FACS로 평가했다. 2반복 분석의 대표적인 결과는 각각 도 84와 도 85에 제시했다. 대조군으로는 표시된 바와 같이 무관한 IgG2b 항체(음영 표시된 히스토그램), ch806 또는 528(야생형 및 de2-7 EGFR 모두에 결합한다)을 포함했다.

[0772] ch806 및 hu806 항체는 A431 및 U87MG.de2-7 세포주를 유사하게 염색했고, 이것은 mAb806이 de2-7 EGFR 및 과발현된 EGFR의 서브세트를 특이적으로 인식한다는 본 발명자들의 종래 관찰을 지지한다(Luwor et al. (2001) Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res*. 61(14), 5355-61). 예상한 것처럼, 528 항체는 U87MG.de2-7 및 A431 세포주를 모두 염색했다(도 84 및 85).

[0773] 세포 결합 분석

[0774] 방사능면역결합체의 항원 결합능은 증폭된 EGFR 유전자를 발현하는 A431 유표피종 암종 세포 및 U87MG.de2-7 신경아교종 세포주를 사용하여 세포 흡착 분석으로 평가했다(Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*. 72(1), 77-89).

[0775] hu806 및 ch806 방사능결합체의 면역반응성 분석은 과잉 항원의 존재 하에 항원 발현 세포에 대한 결합을 통해

측정했다. ^{125}I -hu806 및 ^{125}I -ch806의 U87MG.de2-6 세포 결합성 결과는 세포 농도 범위 20×10^6 내지 0.03×10^6 세포/샘플에서 도 86A에 제시했다. ^{125}I -hu806 및 ^{125}I -ch806의 A431 세포 결합성의 결과는 세포 농도 범위 200×10^6 내지 0.39×10^6 세포/샘플에서 도 86B에 제시했다.

[0776] 결합 상수(K_a)를 계산하기 위해 스캐차드 분석을 이용했다(Lindmo et al., 1984). 소량(20ng)의 표지된 항체 단독의 결합성을 미표지된 과량의 항체의 존재 하에 결합성과 비교했다. 면역반응성 분석은 종래 기술된 바와 같이 유리의 반응성 항체의 양을 계산하는데 감안했고(Clarke et al. (2000) In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. *Cancer Res.* 60(17), 4804-11), 특이적 결합성(nM; 총 항체 x 결합율%)은 특이적 결합/반응성 유리 항체에 대하여 그래프로 도시했다(도 87 및 88). 결합 상수는 선의 음의 기울기로부터 측정했다.

[0777] U87MG.de2-7 세포에 존재하는 EGFRvIII에 결합하는 ^{125}I -hu806에 대한 결합 친화성은 $1.18 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 인 것으로 측정되었다. ^{125}I -ch806에 대한 K_a 는 $1.06 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이었다. 이러한 관찰은 ^{111}In 및 ^{125}I -ch806에 대한 K_a 값이 모체 쥐 mAb806의 K_a 값 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 과 매우 비슷한 각각 $1.36 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 및 $1.90 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이라는 보고된 결과와 일치한다(Panousis et al. (2005) Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. *Br. J. Cancer.* 92(6), 1069-77).

[0778] A431 세포에 대한 스캐차드 분석은 이들 세포에 존재하는 소량의 EGFR에 대한 두 806 작제물의 높은 친화성 결합을 입증했다. ^{125}I -ch806에 대한 K_a 는 $0.61 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이었고, ^{125}I -hu806에 대한 K_a 는 $0.28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이었다.

[0779] 바이오센서 분석

[0780] 바이오센서 분석은 카르복시메틸텍스트란-코팅된 센서 칩(CM5)을 사용하여 BIAcore 2000 바이오센서에서 수행했다. 이 칩은 표준 아민 커플링 화학에 따라, 806 에피토프 펩타이드로 채널 3에서 유도체화되었다(EGFR 아미노산 287-302; 서열번호 14; 미국 특허 출원 11/060,646(2005.2.17) 참조; 미국 임시 특허출원번호 60/546,602(2004.2.20); 및 미국 임시특허출원번호 60/584,623(2004.7.1) 참조, 각 명세서에는 전문이 참고인용된다). 채널 2는 시스템 적합성 측정에 사용된 대조군 항원으로 유도체화되었다. 채널 1은 굴절률 효과를 보정하기 위한 블랭크 대조군 채널로서 사용했고, 에탄올아민으로 유도체화했다. hu806 샘플은 HBS 완충액(10 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 3.4 mM di-Na-EDTA; 0.005 % Tween-20)에 희석했고, 50nM, 100nM, 150nM, 200 nM, 250 nM 및 300 nM을 함유하는 분취량($120 \mu\text{l}$)을 센서 칩 표면에 $30 \mu\text{l}$ /분의 유속으로 주입했다. 주입 단계 후, 해리는 칩 표면에 HBS 완충액을 600초 동안 유동시켜 모니터링했다. 결합된 항체는 용출시키고, 칩 표면은 샘플 사이마다 10mM 수산화나트륨 용액 $20 \mu\text{l}$ 를 주입하여 재생시켰다. 양성 대조군 ch806도 포함시켰다. 결합 파라미터는 BIAevaluation 소프트웨어의 평형 결합 모델을 사용하여 측정했다. 도 89는 수득되는 센서그램을 나타낸다.

[0781] 용량 의존적 결합은 hu806과 양성 대조군 ch806을 가지고 채널 3에서 관찰했다. 시스템 적합성은 대조군 채널 2에 대한 적당한 모노클로날 항체의 용량 의존적 결합을 통해 확인했다. hu806(또는 ch806)과 대조군 항체 간에는 교차 반응성이 관찰되지 않았다. 분석 결과, 겉보기 $K_D(1/K_a)$ 가 hu806의 경우 37 nM이고 ch806의 경우 94nM인 것으로 측정되었다.

[0782] 항체 의존적 세포 세포독성 분석

[0783] ADCC 분석은 표적 A431 선암종 세포 및 새로 분리한 건강한 공여체 말초 혈액 단핵 작용인자 세포와 정제된 hu806 항체 40A10 제조물을 사용하여 수행했다. 간략히 설명하면, 모든 분석은 1) 다양한 작용인자 대 표적 세포 비율(E:T = 0.78:1 내지 100:1)에서 각 항체 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 2) 각 항체의 농도 범위($3.15 \text{ ng}/\text{ml}$ - $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)에서 E:T = 50:1 하에 3반복으로 수행했다. 항체 이소타입에 대한 대조군, 자발적 세포독성 및 전체 세포독성도 3반복으로 포함시켰고, 특이적 세포독성에 대한 계산은 종래 기술된 바와 같이 수행했다(Panousis et al., 2005). 결과는 도 90에 제시했다.

[0784] hu806은 키메라성 ch806 IgG1보다 우수한 ADCC 활성을 일정하게 입증했다. 제시된 대표적 실험에서, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 hu806은 ch806 5% 세포독성에 비해 30% 세포독성의 ADCC를 초래했다.

- [0785] 생체내 806 치료법 연구
- [0786] hu806의 치료 효능은 BALB/c 누드 마우스에 정착된 A431 선암종 또는 U87MG-de2-7 신경아교종 이종이식편을 사용하여 조사했다. 이종이식편을 정착시키기 위해, 1×10^6 A431 선암종 세포 또는 1×10^6 U87MG.de2-7 신경아교종 세포를 PBS 100 μ l 중에서 우측 및 좌측 서혜부 유두선 내로 마우스에게 피하 주사했다. 종양 용적(TV)은 [(길이 x 폭²)/2]의 식으로 계산했고, 여기서 길이는 최장축이고, 폭은 길이에 대해 직각에서 측정했다. 초기 실험에서, 정착된 A431 또는 U87MG.de2-7 이종이식편을 보유한 5마리 BALB/c 누드마우스(n=10 종양/그룹) 그룹은 1mg hu806 또는 1mg ch806 항체 또는 PBS 비히클 대조군으로 IP 주사로 치료 받았다. 치료법은 A431에 대해서는 6, 8, 11, 13, 15 및 18일에, U87MG.de2-7 세포에 대해서는 4, 6, 8, 11, 13 및 15일에 각각 처치했다. 종양 부하의 윤리적 고려로 인해 실험이 종료될 때까지의 평균 \pm SEM 종양 용적은 A431 이종이식편에 대해서는 도 91에 25일까지 제시하고, U87MG.de2-7 이종이식편에 대해서는 도 92에 31일까지 제시했다.
- [0787] hu806을 이용한 생체내 치료법 평가는 PBS 비히클 대조군에 비해 A431 이종이식편 성장의 현저한 감소를 나타냈다. hu806에 대해 관찰된 A431 이종이식편 성장 곡선은 ch806 처리 그룹과 매우 비슷했다. 정착된 U87MG.de2-7 이종이식편에서, PBS 대조군은 20일째 안락사시켰다. hu806 치료법은 PBS 대조군에 비해 20일까지는 종양 성장의 현저한 감소를 나타냈고(P<0.001), 20일 후에도 ch806 그룹과 유사한 종양 성장 지체를 지속시켰다.
- [0788] 고찰
- [0789] 단백질-A 친화성 정제된 hu806 항체는 ch806 임상 참조 물질과 동일한 SEC 용출 프로필을 나타냈고, SDS-PAGE 겔 프로필은 면역글로불린과 일치했다. IEF 패턴은 예상 pI 8.4와 일치했다.
- [0790] 스캐차드 세포 결합 및 바이오센서 에피토프 결합 분석을 통해 hu806 항체는 ch806 항체와 매우 비슷한 결합 곡선과 친화성 파라미터를 증명했다. EGFRvIII 및 과발현된 야생형 EGFR에 대한 hu806 및 ch806의 결합 친화성은 유사하고 낮은 나노몰 범위이다. FACS 분석을 통한 세포 결합은 이러한 관찰을 지지했다.
- [0791] 또한, hu806은 표적항원 양성 A431 세포에서 ch806 작제물보다 현저히 향상된 ADCC를 나타낸다.
- [0792] hu806을 이용한 생체내 치료 평가는 ch806 치료 그룹과 매우 비슷한 A431 이종이식편 성장의 현저한 감소를 나타냈다. 정착된 U87MG.de2-7 이종이식편에서, hu806 치료법은 20일경 PBS 대조군에 비해 종양 성장의 유의적인 감소를 나타냈고, 20일 후 ch806 그룹과 유사한 종양 성장 지체를 지속했다.
- [0793] 실시예 23
- [0794] 모노클로날 항체 175
- [0795] 실시예 1에서 논한 바와 같이, 클론 175(IgG2a)를 추가 특성화하기 위해 선택했다.
- [0796] a. 재료 및 방법
- [0797] 세포주
- [0798] Δ 2-7EGFR 형질감염된 U87MG. Δ 207(Huang et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2927-2935) 및 A431 세포주(Ullrich et al. (1984) *Nature*. 309, 418-425)는 종래 개시되어 있다. 호르몬-비의존적 전립선 세포주 DU145(Mickey et al. (1977) *Cancer Res.* 37, 4049-4058)는 ATCC(atcc.org)에서 입수했다.
- [0799] 모든 세포주는 10% FCS (CSL, Melbourne), 2 mM 글루타민(Sigma Chemical Co, St. Louis), 및 페니실린/스트렙타비딘(Life Technologies, Grand Island)을 함유하는 DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY)에서 생육시켰다. 또한, U87MG. Δ 2-7 세포주는 400mg/ml 제네티신(Life Technologies, Inc, Grand Island) 중에서 생육시켰다. BaF/3(Palacios et al. (1984) *Nature*. 309, 126-131) 및 다른 EGF 수용체를 발현하는 BaF/3 세포주(Walker et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22387-22398)는 IL-3 급원으로서 10% 소 태아 혈청(GIBCO BRL) 및 10% WEHI-3B 조정 배지(Ymer et al. (1985) *Nature*. 19-25:317, 255-258)가 보충된 RPMI 1640 (GIBCO BRL)에서 통상적으로 생육시켰다. 모든 세포주는 공기/CO₂ (95%-5%) 대기 중에서 37°C 하에 성장했다.
- [0800] 항체 및 펩타이드
- [0801] mAb806 및 mAb175는 Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) 뉴욕 본소에서 제조하고, Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne)에서 생산 및 정제했다. 면역원으로

서 쥐 섬유아세포주 NR6 Δ EGFR을 사용했다. 마우스 하이브리도마는 BALB/c 마우스를 보강제 중의 5x10⁵ 내지 2x10⁶ 세포로 2 내지 3주 간격으로 5회 피하 면역화시켜 생산했다. 1차 주사에는 완전 프로인트 보강제를 사용했다. 그 후, 불완전 프로인트 보강제(Difco)를 사용했다. 면역화된 마우스의 비장 세포는 마우스 골수종 세포주 SP2/0와 융합시켰다. 새로 제조된 클론의 상청액을 세포주 NR6, NR6_{wt}EGFR, NR6 Δ EGFR과의 반응성에 대해 혈구흡착 분석으로 분석하고, 그 후 사람 아교모세포종 세포주 U87MG, U87MG_{wt}EGFR, 및 U87MG Δ EGFR과 혈구흡착 분석으로 분석했다.

[0802] 무손상 mAb(50mg)는 PBS에서 1:20의 비율의 활성화된 파파인으로 37℃에서 2-3 시간 동안 분해하고, 파파인은 요오도아세트아미드로 불활성화시켰다. 그 다음, 분해물을 20mM 인산나트륨 완충액 pH 8.0에서 단백질-A 세파로스(Amersham) 컬럼을 통해 통과시키고, 관류물을 모노-S 컬럼(Amersham)을 사용해 양이온 교환으로 추가 정제했다. 그 다음, 단백질을 10,000 MWCO 원심분리 농축기(Millipore)로 농축시켰다. Fab-펩타이드 복합체를 위해, 동결건조된 펩타이드의 물 과량을 Fab에 직접 첨가하고 결정화 실험을 셋업하기 전에 4℃에서 2시간 동안 항온 처리했다.

[0803] 포유동물 세포에서 발현된 EGFR 단편을 이용한 mAb175의 매핑

[0804] 상기 단편들로 형질감염하기 전날에 사람 293T 배아-신장 섬유아세포를 배지 2ml를 함유하는 6웰 조직 배양 플레이트에 8x10⁵/웰로 접종했다. 세포를 리포펙타민 2000(Invitrogen)과 복합체화된 플라스미드 DNA 3 내지 4μg으로 제조업자의 지시에 따라 형질감염시켰다. 형질감염 후 24 내지 48시간 후에, 세포 배양물은 흡인하고, 세포 단층을 용해 완충액(1 % Triton X-100, 10% 글리세롤, 150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EGTA 및 완전 프로테아제 억제제 혼합물(Roche)) 250μl에서 용해시켰다. 세포 용해물의 분취량(10-15μl)을 1.5% β-머캅토에탄올을 함유하는 SDS 샘플 완충액과 혼합하고, 100℃에서 5분 동안 가열하여 변성시킨 뒤, 10% NuPAGE Bis-Tris 폴리아크릴아미드 겔(Invitrogen)에서 전기영동했다. 그 다음, 샘플을 니트로셀룰로스 막으로 전기이동시키고, TBST 완충액(10mM 트리스-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl 및 0.1% Tween-20)에서 세정하고, 2.5% 탈지분유를 함유하는 TBST에서 실온 하에 30분 동안 차단시켰다. 막을 차단 완충액 중의 mAb175 0.5 μg/ml와 4℃에서 밤새 항온처리했다. 비교 막을 mAb 9B11(1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts)로 밤새 탐침하여 c-myc 에피토프를 검출했다. 막을 TBST로 세척하고, 1:5000 희석률로 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 토끼 항-마우스 IgG(Biorad)를 함유하는 차단 완충액에서 실온 하에 2시간 동안 항온처리했다. 그 다음, 블롯을 TBST로 세척하고, 웨스턴 피코 화학발광 기질(Western Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, Illinois))과 항온처리한 후 방사능사진촬영 필름을 사용하여 발색시켰다.

[0805] 포유동물 세포 및 효모에서 발현된 EGFR 단편을 이용한 mAb175의 매핑

[0806] 잔기 274, 282, 290 및 298에서 시작하고 아미노산 501에서 모두 종결되고 성장 호르몬에 융합된, 일련의 오버래핑 c-myc-태그화된 EGFR 외부도메인 단편은 종래 개시된 바 있다(Johns et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384). 효모 세포 표면에서 EGFR 단백질의 발현은 종래 기술된 바와 같이 수행했다(Johns et al., 2004).

[0807] 간략히 설명하면, 형질전환된 콜로니는 효모 질소 염기, 카제인 가수분해물, 텍스트로스 및 인산염 완충액 pH 7.4를 함유하는 최소 배지에서 진탕판 위에서 OD₆₀₀이 5 내지 6에 이를 때까지 약 1일 동안 30℃에서 증식시켰다. 그 다음, 효모 세포를 갈락토스를 함유하는 최소 배지로 옮겨 단백질 발현을 유도하고, 30℃에서 24시간 동안 진탕 배양했다. 그 다음, 배양물은 분석할 때까지 4℃에서 보관했다. c-myc 모노클로날 항체 9E10을 함유하는 미가공 복수액은 Covance(Richmond, CA)에서 입수했다. 1x10⁶ 효모 세포는 빙냉 FACS 완충액(1mg/ml BSA 함유 PBS)으로 세척하고, 최종 용적 50μl에서 항-c-myc 복수액(1:50 희석률) 또는 사람 EGFR 모노클로날 항체(10μg/ml)와 4℃에서 1시간 동안 항온처리했다. 그 다음, 세포는 빙냉 FACS 완충액으로 세척하고, 최종 용적 50μl에서 피코에리트린-표지된 항-마우스 IgG(1:25 희석률)과 4℃에서 1시간 동안 빛 차단 하에 항온 처리했다. 효모 세포를 빙냉 FACS 완충액으로 세척한 후 형광 데이터는 Coulter Epics XL 유세포분석기(Beckman-Coulter)로 취득하고, WinMDI 세포분석 소프트웨어(J. Trotter, Scripps University)로 분석했다. 선형 에피토프 대 입체형태적 에피토프를 측정하기 위해, 효모 세포를 80℃에서 30분 동안 가열하고, 항체 표지화 전에 얼음에서 20분 동안 냉각했다. 표 7에 열거한 일련의 EGFR 돌연변이체는 종래 개시된 것이다(Johns et al., 2004).

[0808] 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)

[0809] BIAcore 3000은 모든 실험에 사용했다. 추정상의 mAb806 에피토프를 함유하는 펩타이드를 5 μ l/분의 유속 하에 아민, 티올 또는 Pms 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 위에 고정시켰다(Wade et al. (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317). mAb806 및 mAb175는 센서 표면 위로 5 μ l/분의 유속으로 25℃에서 통과시켰다. 표면은 실험 사이에 10mM HCl을 10 μ l/분의 유속으로 주입하여 재생시켰다.

[0810] 면역침전 및 웨스턴 블로팅

[0811] 세포는 용해 완충액(1% Triton X-100, 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM 4-(2-아미노에틸)벤젠설포닐플루오라이드, 150 nM 아프로티닌, 1 mM E-64 프로테아제 억제제, 0.5 mM EDTA, 및 1 mM 류페틴, pH 7.4)으로 20분 동안 용해하고, 14,000 $\times g$ 에서 30분 동안 원심분리하여 정화하고, 최종 농도가 5 μ g/ml인 관련 항체로 60분 동안 면역침전시키고, 세파로스-A 비드로 밤새 포획했다. 그 다음, 샘플은 2X NuPAGE SDS 샘플 완충액(Invitrogen)으로 용출시키고, NuPAGE 겔(3-8% 또는 4-12%)에서 분리하고, Immobilon-P 전이막(Millipore)으로 전기이동시킨 뒤 관련 항체로 탐침한 후, 화학발광 방사능사진촬영으로 검출했다.

[0812] 면역조직화학

[0813] 동결 절편은 5 μ g/ml mAb175 또는 무관한 이소타입 대조군으로 실온에서 60분 동안 염색했다. 결합된 항체는 Dako Envision+ HRP 검출 시스템을 제조업자의 지침에 따라 사용하여 검출했다. 절편은 마지막에 물로 세정하고, 헤마톡실린으로 대비염색하고 검경했다.

[0814] 이종이식편 모델

[0815] PBS 100 μ l 중의 U87MG, Δ -7 세포(3×10^6)를 4 내지 6주령의 암컷 Balb/c 누드마우스(Animal Research Centre, Perth, Australia)의 양 옆구리로 피하 접종했다. 모든 연구는 종래 보고된 바와 같은(Perera et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 6390-6399) 정착된 종양 모델을 사용하여 수행했다. 종양이 적당한 도면 범례에 표시된 평균 용적에 도달하면 즉시 치료를 개시했다. 종양 용적(mm³)은 (길이 \times 폭²)/2의 식으로 측정했고, 여기서 길이는 최장축이고, 폭은 직각 측정값이다. 데이터는 각 처리 그룹마다 평균 종양 용적 \pm SE로 표현했다. 모든 데이터는 유의성에 대해 일측 스튜던트 t 검정으로 분석하고, 여기서 p<0.05는 통계적 유의값으로 간주했다. 본 연구 프로젝트는 오스틴 병원의 동물 윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0816] EGFR 돌연변이 작제물을 발현하는 안정한 세포주의 제조 및 특성화

[0817] wtEGFR의 돌연변이는 부위 지시된 돌연변이유발 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용해 제조했다. 각 돌연변이유발의 주형은 사람 EGFR cDNA(등록번호 x00588) (Ullrich et al. (1984) *Nature*. 309, 418-425)였다. 각 작제물의 자동 뉴클레오타이드 서열분석은 EGFR 돌연변이의 완전성을 확인하기 위해 수행했다. 야생형 및 돌연변이(C173A/C281A) EGFR은 전기천공으로 BaF/3 세포에 형질감염시켰다.

[0818] 돌연변이 EGFR을 발현하는 안정한 세포주는 네오마이신-함유 배지에서 선택하여 수득했다. 최종선택 후, 각 세포주로부터 mRNA를 분리하고, 역전사한 뒤, EGFR 서열을 PCR로 증폭시켰다. 발현된 EGFR의 모든 돌연변이는 PCR 산물을 서열분석하여 확인했다. EGFR 발현 수준은 PBS, 5% FCS, 5mM EDTA에서 10 μ g/ml의 항-EGFR 항체 mAb528(Masui et al. (1984) *Cancer Res.* 44, 1002-1007; Gill et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7755-7760)과 Alexa 488-표지된 항-마우스 Ig(1:400 최종 희석률)을 이용하여 FACStar(Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ)에서 FACS 분석하여 측정했다. 배경 형광은 세포를 무관한 클래스-부합된 1차 항체와 항온 처리하여 측정했다. 모든 세포는 통상적으로 RPMI, 10% FCS, 10% WEHI3B 조정 배지 및 1.5 mg/ml G418에서 계대배양했다.

[0819] 돌연변이 EGFR의 EGF-의존적 활성화

[0820] wtEGFR 또는 C271A/C283A-EGFR을 발현하는 세포는 세척하고 혈청 또는 IL-3 없는 배지에서 3시간 동안 항온처리했다. 세포를 원심분리로 수집하고, EGF(100ng/ml) 함유 배지 또는 동량의 PBS에 재현탁시켰다. 15분 후 세포를 수집하고, 펠릿화한 뒤, p-머캅토포탄올을 함유하는 SDS/PAGE 샘플 완충액에서 직접 용해했다. 샘플은 NuPAGE 4-12% 구배 겔에서 분리하고, Immobilon PVDF 막으로 이동시킨 뒤, 항-포스포티로신(4G10, Upstate Biotechnology) 또는 항-EGFR 항체(mAb806, LICR에서 생산)로 탐침했다. 반응성 밴드는 화학발광으로 검출했다.

[0821] 세포 증식에 미치는 EGF 및 항체의 효과

- [0822] 대수기 단계로 증식하는 세포를 수거하고 PBS로 2회 세척하여 잔류 IL-3을 제거했다. 세포를 RPMI 1640 + 10% FCS에 재현탁시키고 96웰 플레이트에 담체와 함께 또는 증가 농도의 EGF와 함께 10^5 세포/웰로 접종했다. 적당한 경우, 배양물에 고정된 농도의 mAb528 또는 mAb806($2\mu\text{g}/\text{well}$)도 첨가했다. 증식은 MTT 분석을 사용하여 측정했다(van de Loosdrecht et al. (1994) *J. Immunol. Methods*. 174, 311-320).
- [0823] 입체형태-특이적 항체와의 반응성
- [0824] 세포는 원심분리로 수집하고 대조군 또는 시험 항체(모두 FACS 완충액 중에 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 얼음에서 40분 동안, FACS 완충액으로 세척), 그 다음 Alexa 488-표지된 항-마우스 Ig(1:400 최종 희석률, 얼음에서 20분)으로 염색했다. 세포를 빙냉 FACS 완충액으로 세척하고, 원심분리로 수집하고, FACScan 상에서 분석했고; 피크 형광 채널 및 중간 형광은 각 샘플마다 Cell Quest(Becton and Dickinson)의 통계적 도구를 사용하여 측정했다. 배경(음성 대조군) 형광은 모든 측정값에서 감산했다. 중간 형광 값은 피크 형태 및 형광 강도를 가장 대표하는 것으로서 선택했고, mAb806 대 mAb528 결합 비율을 유도하는데 사용했다.
- [0825] Fab175, 및 Fab806, Fab-펩타이드 복합체의 결정 구조 측정 및 용액 중의 806 펩타이드 에피토프의 NMR 구조
- [0826] 구조는 Fab806에 대해 $R=0.225/R_{\text{free}}=0.289$ 및 Fab806:펩타이드에 대해 $R=0.226/R_{\text{free}}=0.279$; Fab806에 대해 $R=0.210/R_{\text{free}}=0.305$ 및 Fab806:펩타이드에 대해 $R=0.203/R_{\text{free}}=0.257$ 로 수렴된 분자 교체 및 정제로 측정했다.
- [0827] 천연 806 Fab의 결정은 $10\text{mg}/\text{ml}$ Fab 및 0.1M 아세트산나트륨 완충액 pH 4.6, 6-8% PEG6000 및 15-20% 이소프로판올을 함유하는 저장소를 사용하여 현적 증기 확산으로 성장시켰다. 데이터 수집을 위해 결정은 0.1M 아세트산나트륨 완충액 pH 4.6, 10% PEG6000, 15-20% 이소프로판올 및 10% 글리세롤을 함유하는 동결방지 용액으로 이동시켰다. 그 다음, 결정은 나일론 루프에 마운팅하고 액체 질소로 직접 급속 동결시켰다.
- [0828] 806 Fab-펩타이드 복합체의 결정은 $10\text{mg}/\text{ml}$ Fab-펩타이드 복합체 및 0.2M 아세트산암모늄, 16-18% PEG 5000 모노메틸에테르를 함유하는 저장소를 사용하여 현적 증기 확산으로 성장시켰다. 데이터 수집을 위해 결정은 25% 글리세롤이 보충된 저장액으로 이루어진 동결방지 용액으로 이동시켰다. 그 다음, 결정은 나일론 루프에 마운팅하고 액체 질소로 직접 급속 동결시켰다.
- [0829] 175 Fab-펩타이드 복합체의 결정은 먼저 Topaz 결정화 시스템(Fluidigm, San Francisco)을 사용해 자유 계면 확산으로 성장시켰다. 마이크로결정을 유사 조건 0.1M Bis-tris 프로판 완충액, 0.2M 아세트산암모늄 및 18% PEG 10,000과 $7\text{mg}/\text{ml}$ Fab를 사용하여 현적 증기 확산으로 성장시켰다. 그 다음, 마이크로결정은 0.15ml 포름산나트륨과 15% PEG1500 내로 스트리킹 접종하여 증가시켜 작은 판형 결정을 수득했다. 데이터 수집을 위해 결정은 25% 글리세롤이 보충된 저장액으로 이루어진 동결방지 용액으로 이동시켰다. 그 다음, 결정은 나일론 루프 위에 마운팅하고 액체 질소로 직접 급속 동결시켰다.
- [0830] 806 Fab 및 175 Fab 복합체 결정에 대한 회절 데이터는 AXCO 광학기가 장착된 Rigaku 마이크로맥스-007 발생기 상의 R-Axis IV 검출기를 사용해 사내에서 수집하고, 그 다음, 이 데이터를 CrystalClear로 처리했다. 806 Fab-펩타이드 복합체 데이터는 ADSC Quantum315 CCD 검출기에서 빔광선 X29(Brookhaven National Laboratory)로 수집하고, 이 데이터는 HKL2000(Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Academic Press (New York))으로 처리했다 (데이터 수집 통계값은 표 9에 제시했다). 천연 806 Fab는 Fab 구조의 좌표 2E8을 이용해 프로그램 MOLREP(Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025)을 사용하여 분자 교체로 해석하고, 구조의 정제는 REFMAC5(Murshudov et al. (1997) *Acta crystallographica* 53, 240-255)로 수행하고 모델 구축은 Coot(Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta crystallographica* 60, 2126-2132)로 수행했다.
- [0831] 806-펩타이드 및 175 Fab-펩타이드 구조는 모두 806 Fab 구조의 좌표를 이용하여 프로그램 MOLREP을 사용해 분자 교체로 해석했고, 정제 및 재구축은 REFMAC5, 및 COOT 및 O로 다시 수행했다. 최종 구조의 확인은 PROCHECK(Laskowski et al. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291) 및 WHATCHECK(Hoof et al. (1996) *Nature* 381, 272)로 수행했다.
- [0832] NMR 연구
- [0833] NMR 연구를 위해, ^{15}N -표지된 펩타이드를 페어리 등에 의해 종래 기술된 방법(Fairlie et al. (2002) *Protein expression and purification* 26, 171-178)을 사용하되, 단 이.콜라이를 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 보충된 나이드하르트 최소 배

지(Neidhardt et al. (1974) *Journal of bacteriology* 119, 736-747)에서 증식시키는 방법으로 SHP2의 SH2 도메인에 융합체로서 재조합 생산했다. 펩타이드는 CNBr을 사용해 융합 파트너로부터 절단해내고, 역상 HPLC로 정제하고, 그 동일성은 MALDI-TOF 질량분광분석법 및 N-말단 서열분석으로 확인했다. 806 항체-결합 서열 내의 메티오닌 잔기는 펩타이드 자체 내에서가 아닌 융합 파트너로부터 절단이 이루어질 수 있도록 류신으로 변이시켰다.

[0834] NMR 연구에 사용한 샘플은 5% $^2\text{H}_2\text{O}$, 70 mM NaCl 및 50mM NaPO_4 , pH 6.8 함유 H_2O 용액에 제조했다. 모든 스펙트럼은 저온탐침을 사용하여 Bruker Avance500 분광계에서 298K 하에 획득했다. m806 Fab의 부재 하에 펩타이드의 연속 지정은 표준 2D TOCSY 및 NOESY뿐만 아니라 ^{15}N -편집된 TOCSY 및 NOESY 스펙트럼을 사용하여 확립시켰다. 펩타이드와 Fab806 간의 상호작용은 Fab806의 존재 및 부재 하에 펩타이드의 ^{15}N HSQC 스펙트럼을 모니터링하여 조사했다. Fab806 존재 하에 펩타이드의 ^{15}N HSQC 스펙트럼의 분광 섭동은 현존 용액 조건 하에 펩타이드가 Fab806에 결합할 수 있다는 것을 분명하게 시사한다. 복합체 형태에서 펩타이드의 상세한 입체형태는 측정되지 않았다. mAb806 펩타이드에 대한 무작위 코일 화학적 이동 값으로부터 편차는 도 93에 제시했다.

[0835] 환자 내 chAb806 종양의 생체분포

[0836] 생체내 mAb806의 종양 특이성을 입증하기 위해, 키메라 형태(ch806)를 유전자조작하여 cGMP 조건 하에 생산했다 (Panousis et al. (2005) *Br. J. Cancer*. 92, 1069-1077). I기 최초임상(first-in-man) 시험은 806 양성 종양을 보유한 환자에서 ch806의 안전성, 생체분포 및 면역 반응을 평가하기 위해 수행했고, 안전성, 생체분포 및 약동학 결과는 종래 보고된 바 있다(Scott et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4071-4076). 환자의 정상 조직(즉, 간)과 비교하여 종양에 ch806의 특이성을 밝히기 위해, 종양 및 간에서의 ch806의 정량적 흡수는 5-7mCi(200-280 MBq) ^{111}In -ch806 주사 후 1주 동안 수득한 전신 감마 카메라 이미지로부터 ^{111}In -ch806의 주사 용량(ID)의 %를 계산하여 수행했다. 간 및 종양 선량측정 계산은 각 환자 개인의 관심 영역에 기초하여 수행했다. ^{111}In -ch806 주입 이미지 데이터세트는 배경과 감쇠에 대해 보정하여 활성 누적량을 계산할 수 있었다. 선량측정 계산은 주사 후 1주 동안 종양과 간에 존재하는 ^{111}In -ch806의 농도를 도출해내기 위해 수행했다.

[0837] b. 서열분석

[0838] mAb175의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)를 서열분석하고, 이의 상보성 결정 영역(CDR)을 다음과 같이 확인했다:

[0839] mAb175 VH 채: 핵산(서열번호 128) 및 아미노산(서열번호 129) 서열은 각각도 74A 및 74B에 제시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(각각 서열번호 130, 131 및 132)은 도 74B에 밀줄친 부분이다.

[0840] mAb175 VL 채: 핵산(서열번호 133) 및 아미노산(서열번호 134) 서열은 각각도 75A 및 75B에 제시했다. 상보성 결정 영역 CDR1, CDR2 및 CDR3(각각 서열번호 135, 136 및 137)은 도 75B에 밀줄친 부분이다.

[0841] mAb175의 서열 데이터는 세포주가 클론이 아니기 때문에 서열 및 결정 구조 데이터를 기반으로 하고, 따라서, 세포주로부터 다수의 서열의 수득되었다. 전술한 mAb175의 서열은 결정 구조로 확인했고, 표준 서열 데이터만을 기반으로 한 종래 서열과 VL채 CDR1 및 CDR2 각각에서 단일 아미노산이 상이했다. 또한, 최종 서열 및 결정 구조 데이터를 기반으로 mAb175의 다른 이소타입(특이한 IgG2a 이소타입)도 수득했다.

[0842] mAb175 특이성

[0843] 예비 결합 연구는 mAb175가 mAb806과 유사한, EGFR에 대한 특이성을 나타낸다는 것을 시사했다. mAb806(IgG2b) 및 mAb175(IgG2a)의 CDR 영역에서, 아미노산 서열은 거의 동일하고, 각각 한 아미노산만이 차이가 났다(도 65; 이하 실시예 26 참조). 이러한 차이는 모두 측쇄의 전하 및 크기를 보존하는 차이이다. 이 항체들은 분명히 독립적으로 발생했다.

[0844] c. 실험

[0845] 면역조직화학 실험 세트는 mAb175 결합의 특이성을 분석하기 위해 수행했다. mAb175는 EGFR을 과발현하는 A431 이종이식편의 절편(도 66A) 및 $\Delta 2$ -7EGFR을 발현하는 U87MG. $\Delta 2$ -7 신경아교종 이종이식편의 절편(도 66A)을 염색한다. 이에 반해, mAb175는 U87MG 이종이식편 절편을 염색하지 않는다. U87MG 세포주는 단지 야생형 EGFR을 적당한 수준으로 발현하고(도 66A), EGFR 자가분비 루프는 검출불가능했다. 가장 중요한 것은, mAb175가 정상

사람 간 절편에는 결합하지 않는다는 것이다(도 66B). 따라서, mAb175는 mAb806과 동일한 특이성을 나타내는 것으로 보이고, 즉 과발현 및 절두형 사람 EGFR은 검출하지만, 적당한 수준으로 발현된 wtEGFR은 검출하지 못한다.

[0846] mAb175 에피토프의 확인

[0847] 또한, mAb175는 아미노산 6-273이 결실된 $\Delta 2$ -7EGFR 및 EGFR₁₋₅₀₁에 결합하기 때문에, mAb175 에피토프는 잔기 274-501 내에 포함되어 있어야 한다. mAb806의 에피토프를 측정할 때, 본 발명자들은 사람 GH의 카르복시 말단에 융합되고 모두 아미노산 501에서 끝나는 일련의 c-myc-태그화된 EGFR 단편을 발현시켰다(Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342, 539-550; Johns et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384).

[0848] 또한, mAb175는 웨스턴 블롯에서 274-501 단편 및 282-501 EGFR 단편과 반응했지만, 아미노산 290 또는 298에서 시작하는 단편은 검출하지 못했다(도 73). 모든 GH-EGFR 융합 단백질의 존재는 c-myc 항체 9E10을 사용하여 확인했다(도 73). 따라서, mAb175 에피토프의 중요한 결정인자는 아미노산 290 부근에 위치한다. 마지막으로, mAb806 에피토프 결실된($\Delta 287$ -302) 274-501 EGFR 단편은 mAb175 결합에 대해 음성이었고(도 73), 이것은 이 영역이 마찬가지로 대부분의 mAb175 결합을 결정한다는 것을 시사한다.

[0849] mAb175 에피토프를 더욱 특성화하기 위해 2번째 접근법을 사용했다. EGFR의 세포외 도메인을 포위하는 단편을 효모 표면에서 발현시키고 유세포분석을 이용해 간접 면역형광으로 mAb175 결합을 검사했다. mAb175는 $\Delta 2$ -7 EGFR의 세포외 도메인에 대응하는 효모 단편 273-621을 인식했지만, 단편 1-176, 1-294, 294-543 또는 475-621은 인식하지 못했다(도 67A 및 도 67B). 따라서, mAb175 에피토프의 적어도 일부는 아미노산 274-294 사이의 영역 내에 함유되어 있어야 하고, 이것은 EGFR 단편을 이용한 면역블로팅 데이터와 일치한다. mAb175는 273-621의 변성된 단편에 결합하기 때문에(도 67C), 에피토프는 본래 선형이어야 한다(도 73). mAb806과 mAb175는 EGFR의 유사한 영역과 입체형태를 인식하는 것이 분명하다.

[0850] 표면 플라즈몬 공명(BIAcore)을 사용하여, EGFR 펩타이드(₂₈₇CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂; 서열번호 138))에 대한 mAb175의 결합을 조사했다. EGFR₂₈₇₋₃₀₂는 아민, 티올-디설파이드 교환 또는 Pms-Ser 커플링 화학을 이용하여 바이오센서 표면에 고정시켰다. 후자의 방법은 N-말단 시스테인을 통해 배타적으로 펩타이드를 고정시킨다(Wade et al. (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317).

[0851] mAb175는 모든 배향에서 EGFR₂₈₇₋₃₀₂에 결합했다(표 6). EGFR₂₈₇₋₃₀₂에 대한 mAb175의 친화성은 Pms-세린의 경우 35nM부터 아민 커플링의 경우 154nM까지의 범위였다. 모든 경우에, EGFR₂₈₇₋₃₀₂에 대한 mAb175의 결합 친화성은 mAb806에 대해 수득되는 것보다 낮았다(표 6). 또한, 본 발명자들은 EGFR의 2가지 다른 세포외 단편에 대한 mAb175의 친화성도 측정했다. mAb175는 펩타이드를 사용해 수득되는 것과 유사한 친화성으로 1-501 단편에 결합했다(16nM 대 35nM)(표 6). 예상한 바와 같이, 속박된 입체형태를 형성할 수 있는 1-621 전체 길이의 세포외 도메인에 대한 mAb175의 친화성은 훨씬 낮았다(188nM). mAb806과 mAb175가 EGFR₂₈₇₋₃₀₂에 대해 친화성이 유사할지라도, mAb175는 EGFR의 세포외 도메인에 대해 더 높은 친화성을 나타내는 것으로 보인다(표 6). 분명한 것은, mAb175 에피토프가 EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 내에 함유되고, mAb806과 같이 EGFR의 세포외 도메인에 대한 결합 친화성이 입체형태에 의존적이라는 것이다.

표 6

EGFR 에피토프에 대한 mAb806 및 mAb175 결합의 항체 친화성에 대한 BIAcore 측정

EGFR 단편	mAb175의 K _D (nM)	mAb806의 K _D (nM)
287-302 (Pms-Ser 커플링)	35	16
287-302 (티올 커플링)	143	84
287-302 (아민 커플링)	154	85
1-501 (속박 형태를 형성할 수 없음)	16	34
1-621 (속박 형태를 형성할 수 있음)	188	389

[0852]

[0853] 효모 표면에서 발현된 273-621 EGFR 단편의 돌연변이체 패널(Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342, 539-550; Johns et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384)을 사용하여 mAb175 에피토프의 정밀 구조를 특성화했

다. mAb175 및 mAb806은 돌연변이체에 대해 거의 동일한 반응성 패턴을 보였다(표 7). 287-302 디설파이드 결합의 파괴는 항체가 C287의 모든 돌연변이체 및 C302의 전부는 아니지만 일부 돌연변이체에 결합했을 때 에피토프 반응성에 단지 중간 정도의 영향을 미쳤다(표 7). mAb175 결합에 중요한 아미노산은 E293, G298, V299, R300 및 C302를 포함한다(표 7). mAb175는 돌연변이 V299 및 D297에 대해 약간 더 민감성을 나타냈지만, mAb806은 이들 부위의 일부 돌연변이체에 대해 감소된 결합성을 나타냈다(표 7). 다시, mAb175 에피토프는 mAb806에 의해 인식되는 에피토프와 본질적으로 동일한 것으로 보인다.

표 7

효소에서 EGFR 에피토프 287-302 돌연변이의 발현 및 mAb806과 mAb175에 대한 결합 점수

EGFR 돌연변이체	mAb806 결합	mAb175 결합
C287A	+	+
C287G	+	+
C287R	+	+
C287S	+	+
C287W	+	+
C287Y	+	+
G288A	++	++
A289K	++	++
D290A	++	++
S291A	++	++
Y292A	++	++
E293A	+	+
E293D	+	+
E293G	+	+
E293K	-	-
M294A	++	++
E295A	++	++
E296A	++	++
D297A	++	+ 접촉 중
D297Y	+	+
G298A	+	+
G298D	-	-
G298S	-	-
V299A	++	+ 접촉 중
V299D	-	-
V299K	++	+ 접촉 중
R300A	++	++
R300C	+	+
R300P	-	-
K301A	++	++
K301E	+	+
C302A	-	-
C302F	+	+
C302G	-	-
C302R	+	+
C302S	-	-
C302Y	+	+

[0854]

[0855] △2-7EGFR 또는 EGFR 자가분비 루프에 의해 자극된 종양 이종이식편에 대한 mAb175의 효능

[0856] U87MG, △2-7 신경아교종 이종이식편에 대한 mAb806 및 mAb175의 생체내 항종양 활성을 조사했다. 이종이식편은 항체 치료(표시한 날에 2주 동안 주당 3회)를 개시하기 전 6일 동안 정착시켰다. 이 때, 평균 종양 용적은 100 mm³였다(도 68A). mAb175 치료는 비히클 또는 mAb806 치료에 비해 전반적인 종양 성장 속도를 감소시켰고, 대조군이 윤리적 이유로 인해 희생되었을 때 접촉 후 19일째 매우 유의적이었다(대조군에 대해 P<0.0001 및 mAb806에 대해 P<0.002). 이때 평균 종양 용적은 비히클, mAb806 및 mAb175 처리 군에서 각각 1530, 300 및 100mm³였고(도 68A), 이것은 △2-7 EGFR을 발현하는 이종이식편에 대한 mAb175의 항종양 활성을 확인시켜준다.

[0857] U87MG 세포는 세포당 약 1×10^5 EGFR을 발현할지라도, mAb806은 어떠한 표면 EGFR도 인식할 수 없고, 당연히 U87MG 생체내 성장을 억제하지 않는다. 더욱이, 이 세포들은 어떠한 EGFR 리간드로 공동발현하지 않는다. EGFR

에피토프가 일시적으로 노출되고 이에 따라 EGFR 자가분비 루프를 함유하는 세포에서 mAb7806 및 mAb175에 의해 인식될 수 있는지에 관해 연구를 수행했다. 전립선 세포주 DU145는 U87MG 세포에서 관찰되는 것과 유사한 수준으로 wtEGFR을 발현하지만, U87MG 세포와 달리 DU145 세포는 TGF- α 유전자의 증폭을 함유하여 EGFR/TGF- α 자가분비 루프를 나타낸다. FACS 분석에 의해 측정되는 바와 같이 mAb175 및 mAb806은 DU145 세포에 결합하고(도 68B), 이 세포로부터 추출된 EGFR의 소량을 면역침전시킬 수 있다(도 68C). 두 기술은 모두 mAb175의 우수한 결합을 나타냈지만, L2 도메인에 결합하는 mAb528과 비교했을 때 mAb175 및 mAb806은 이 세포의 표면에 존재하는 EGFR의 서브세트에만 결합한다(도 68B 및 도 68C). 이와 유사한 관찰은 제2 전립선 세포주(LnCap); (데이터 미제시) 및 결장 세포주(LIM1215)에서도 관찰되었고, 이 두 세포주도 역시 EGFR 자가분비 루프를 함유한다(Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) *Mol Cell Biol.* 3, 1235-1243; Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) *Mol Cell Biol.* 11, 4005-4014). 분명한 것은, mAb806과 mAb175가 자가분비 자극 루프의 존재 하에 세포에 존재하는 EGFR의 소량만을 인식할 수 있다는 것이다.

[0858] mAb175 및 mAb806은 U87MG 세포보다 DU145 세포에서 발현된 EGFR에 더욱 효과적으로 결합하기 때문에, 누드 마우스에서 성장한 DU145 이종이식편에서 상기 항체들의 항종양 활성을 분석하는 연구를 수행했다. 이종이식편은 치료를 개시(표시한 날에 3주 동안 주당 3회)하기 전 18일 동안 정착시켰다. 이때, 평균 종양 용적은 90mm³였다(도 68D). mAb175 및 mAb806은 모두 DU145 이종이식편의 성장을 억제했다. 대조군은 67일에 희생시켰고, 평균 종양 용적은 mAb806 및 mAb175 그룹의 경우 각각 605 및 815mm³(각각 $p < 0.007$ 및 0.02)인데 비해 1145mm³였다(도 68D).

[0859] mAb806 및 mAb175의 Fab 단편과 접촉하고 있는 EGFR₂₈₇₋₃₀₂의 3D 구조

[0860] mAb806 및 mAb175가 전부는 아니더라도 일부 입체형태 중의 EGFR을 인식할 수 있는 방식의 분자 세부사항을 이해하기 위해, 두 항체의 Fab 단편의 결정 구조를 산화된 EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 에피토프와 복합체일 때(각각 2.0 및 1.59 Å 해상도, 도 69A 및 69B) 및 단독으로(각각 2.3Å 및 2.8Å 해상도) 측정했다. 두 경우, 유리 및 복합체화된 Fab 구조는 본질적으로 동일했고, 펩타이드 및 항체 CDR 루프의 입체형태가 잘 밝혀졌다(도 69). 이 에피토프는 β -리본 구조를 채택하고, 이 리본의 한쪽 가장자리는 항원-결합 부위의 중심에 매립된 Fab 및 V299쪽을 향해 있다(도 69C-E). 이 항체들은 훨씬 긴 폴리펩타이드에 결합하는 것과 일관되게, 에피토프의 양 말단은 용매에 노출되어 있다.

[0861] 에피토프에 접촉해 있는 20개 항체 잔기 중, mAb806과 mAb175 간에는 단 2개의 치환이 존재한다(도 65). mAb175 접촉 잔기는 다음과 같다: 경쇄 S30, S31, N32, Y49, H50, Y91, F94, W96 및 중쇄 D32, Y33, A34, Y51, S53, Y54, S55, N57, R59, A99, G100, R101; mAb806 접촉 잔기는 동일한데, 단 경쇄에서 N30 및 중쇄에서 F33의 서열 차이가 존재했다. EGFR₂₈₇₋₃₀₂는 펩타이드 잔기 293-302 사이에 밀접한 접촉을 통해 Fab에 결합하고, 이 접촉의 대부분은 잔기 297과 302 사이에서 이루어진다. EGFR₂₉₈₋₃₀₂ 및 Fab의 주요 쇠 원자 간에 유일한 수소 결합은 잔기 300과 302에 존재한다(도 69F). 에피토프 서열에 대한 인식은 잔기 E293(Fab의 H50 및 R101에), D297(Y51 및 N57에), R300(D32에) 및 K301(Y51 및 W96에 물 분자를 통해)에 대한 측쇄 수소 결합을 통해 일어난다. 소수성 접촉은 G298, V299 및 C302에서 이루어진다.

[0862] 293 및 302 사이의 에피토프 주쇄의 입체형태는 Fab806 및 Fab175 결정에서 본질적으로 동일하다(rms 편차 = 0.4Å, 이 잔기들에 존재하는 C α 원자에 대해). 디설파이드 결합에 의해 제한적일지라도, 펩타이드의 N-말단(287-292)은 어떠한 항체 구조에서도 유의적인 접촉을 하지 않으며, 이 영역의 입체형태는 다르다. 하지만, Fab806 복합체에서 이 분절은 다소 불규칙하게 보인다. 더욱 흥미로운 것은 이 항체들과 접촉해 있는 EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 펩타이드의 입체형태가 속박 또는 비속박된 EGFR 구조의 골격에서 관찰되는 EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 입체형태와 상당히 밀접하게 관련되어 있다는 것이다(Li et al., 2005; Garrett et al., 2002). Fab175 복합체 유래의 EGFR₂₈₇₋₃₀₂에서, C α 위치에서의 rms 편차는 각각 0.66 및 0.75Å이다(도 69).

[0863] mAb806과 mAb175에 의한 EGFR의 인식을 더 자세히 조사하기 위해, ¹⁵N-표지된 산화된 펩타이드 EGFR₂₈₇₋₃₀₂의 입체 형태를 용액 중에서, 유리 상태에서 및 806 Fab의 존재 하에 NMR 분광분석으로 조사했다(재료 및 방법 참조). 유리 펩타이드의 경우, 공명은 지정하여 무작위 코일과 비교했다. 본질적으로, 유리 펩타이드는 무작위 코일 구조를 채택했고, 천연 EGFR에서 관찰되는 베타 리본 구조는 없었다(Garrett et al. (2002) *Cell* 20;110, 763-773).

[0864] Fab의 첨가 시, 공명 이동이 관찰되었다. 하지만, Fab 첨가 및 성공적인 복합체 결정화 시 유의적인 선 확장으로 인한 약한 시그널 때문에, Fab806-에피토프 복합체의 용액 구조는 더 이상 추적하지 않았다. 하지만 분명히, 상기 펩타이드가 mAb806(또는 mAb175)의 Fab 단편에 결합할 때, Fab는 천연 수용체의 펩타이드에 부합하는 펩타이드의 입체형태를 선택하거나 유도하는 것으로 보인다.

[0865] mAb806 및 mAb175가 EGFR의 일부 입체형태만을 인식하는 이유를 연구하기 위해, mAb175의 Fab 단편을 EGFR₂₈₇₋₃₀₂를 중첩시켜 EGFR의 세포외 도메인(속박 및 비속박된 단량체) 위에 도킹했다. $\Delta 2-7$ 유사 단편의 경우에는 수용체와 유의적인 입체 충돌이 없었다. 비속박 형태에서는 매립된 Fab의 실질적으로 더욱 접근가능한 표면적이 존재했다(속박된 형태에서 550 \AA^2 에 비해 920 \AA^2). 따라서, 이 항원은 효모 발현 돌연변이체에 의해 시사되었던 바처럼 항체의 비-CDR 영역과 추가 접촉을 이룰 수 있다(Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342, 539-550). 이와 반대로, Fab 위에 전체 EGFR 세포외도메인의 도킹 시에는, 에피토프(잔기 187-286) 전에 선행하고 Fab의 중심을 통해 진행되는 CR1 도메인의 일부와 실질적인 공간 오버랩이 존재한다(도 69D 및 69E). 따라서, CR1 도메인은 속박 또는 비속박 입체형태에서 본질적으로 동일한 구조이므로, mAb806 또는 mAb175는 어떠한 EGFR 형태에도 결합할 수 없을 것이다. 분명한 것은, 공지된 어느 한 입체형태의 wtEGFR에서 CR1 도메인에 대한 에피토프의 배향과 에피토프 결합을 허용하는 배향 사이에 차이가 있어야 한다는 점이다. CR1 도메인 조사는 EGFR₂₈₇₋₃₀₂을 선행하는 디설파이드 결합(271-283)이 에피토프에 대한 접근을 차단하는 폴리펩타이드를 속박한다는 것을 나타냈고; 항체에 대한 직접 결합에 수반되지는 않지만, 이 디설파이드 결합의 파괴는 mAb175 또는 mAb806이 이 에피토프에 접근할 수 있도록 CR1 도메인의 부분적인 언폴딩을 허용하는 것이라 생각할 수도 있다.

[0866] EGFR 271-283 디설파이드 결합의 파괴는 mAb806 결합을 증가시킨다.

[0867] 단백질 중의 디설파이드 결합은 구조 경직성을 증가시키나, 일부 세포 표면 수용체, 특히 사이토킨 및 성장인자에 대한 수용체에서는 디설파이드 결합의 일시적 파괴 및 디설파이드 교환이 수용체의 기능을 조절할 수 있다(Hogg, P. J. (2003) *Trends in biochemical sciences* 28, 210-214). 이것은 mAb806과 mAb175가 이의 결합 부위에 접근할 수 있는 1가지 기전이므로, 에피토프의 접근성 증가는 위치 271과 283에 있는 시스테인 잔기 중 어느 하나 또는 둘 모두를 알라닌 잔기(C271A/C283A)로 돌연변이시켜 시도했다. 전체 길이 C271A-, C283A- 또는 C271A/C283A-EGFR을 발현할 수 있는 벡터는 IL-3 의존적 Ba/F3 세포주에 형질감염시켰다. wtEGFR과 동등한 수준으로 C271A- 및 C271A/C283A-EGFR 돌연변이체를 발현하는 안정한 Ba/F3 클론을 선택했다(도 70A). 높은 수준의 돌연변이 C283A-EGFR을 발현하는 Ba/F3 세포는 관찰되지 않았다. 전술한 바와 같이, wtEGFR은 mAb806과 반응성이 불량하지만, 돌연변이 수용체는 mAb528, mAb806 및 항-FLAG 항체와 똑같이 강하게 반응했고, 이것은 상기 수용체가 세포 표면에서 발현되고 정확하게 폴딩되고, 이러한 경우에 mAb806의 에피토프는 완전하게 접근가능하다는 것을 시사한다. mAb806이 wtEGFR보다 더욱 효과적으로 C271A/C283A 돌연변이체를 인식하는지를 확인하기 위해 mAb806 결합 대 mAb528 결합의 비를 측정했다. 야생형 및 C271A/C283A EGFR은 모두 N-말단 FLAG-태그화되어 있기 때문에, M2 항체에 대한 mAb806 및 mAb528 결합의 비율도 측정했다. 종래 보고된 바와 같이, mAb806은 Ba/F3 세포의 표면에서 발현된 총 wtEGFR의 소량만을 인식했다(mAb806/528 결합 비율은 0.08이다)(표 8). 이에 반해, mAb806은 세포 표면에서 발현된 사실상 모든 C271A/C283A 돌연변이 EGFR을 인식했다(mAb806/528 결합 비율은 1.01이다)(도 70A 및 표 8).

표 8

야생형 또는 C271A/C283A EGFR을 발현하는 세포와 mAb806의 반응성

세포주	항체 결합 비율		
	mAb 528/M2	mAb806/M2	mAb806/mAb 528
wtEGFR-FLAG	1.37	0.11	0.08
wt-EGFR	-	-	0.07
C271/283*	1.08 ± 0.10	1.09 ± 0.38	1.01 ± 0.13

*4개의 독립 클론들의 평균값

[0868]

[0869] 두 시스테인의 돌연변이는 EGF 결합 또는 수용체 기능을 손상시키지 않았다. C271A/C283A EGFR 돌연변이체를 발현하는 BaF3 세포는 EGF의 존재 하에 증식한다(도 70B). C271A/C283A 돌연변이를 발현하는 세포에서 EGF의 용량

반응 곡선의 좌측 이동은 재현성있게 관찰되었고, 이것은 리간드에 대한 더 높은 친화성 또는 돌연변이 수용체에 대한 증강된 시그널링 가능성을 시사한다. 웨스턴 블로팅 분석은 C271A/C283A 돌연변이체가 wtEGFR과 유사한 수준으로 발현되고 EGF 자극에 대한 반응으로 티로신 인산화된다는 것을 확인시켜주었다(도 70C). 다른 세포주에서의 종래 연구와 일관되게, mAb806은 wtEGFR을 발현하는 Ba/F3 세포의 시험관내 EGF-유도 증식에 어떠한 영향도 미치지 않은 반면, mAb528을 차단하는 리간드는 이 세포의 EGF-유도 증식을 완전하게 억제한다(도 70D, 왼쪽 패널). 이에 반해, mAb806은 C271A/C283A 돌연변이체를 발현하는 BaF3 세포에서 EGF-유도 증식을 전적으로 제거했다(도 70D, 오른쪽 패널). 271-283 시스테인 루프가 파괴되면, mAb806은 더욱 효과적으로 결합할 뿐만 아니라, 일단 결합하면, mAb806은 리간드 유도 증식을 방해한다.

표 9

데이터 수집 및 정제 통계학

데이터 수집

	806 (천연)	806 (펩타이드)	175 (천연)	175 (펩타이드)
공간 그룹 셀 크기 (Å)	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
<i>A</i>	140.37	35.92	36.37	83.17
<i>B</i>	74.62	83.16	94.80	69.26
<i>C</i>	83.87	72.21 $\beta=92.43$	108.90	71.47
급원	사내	BNL X29	사내	사내
파장 (Å)	1.542	1.1	1.542	1.542
해상도 범위 (Å)	29.7-2.2 (2.27-2.20)	50-2.0 (2.07-2.0)	50-2.8 (2.87-2.8)	14.18-1.59 (1.65-1.59)
<i>R</i> _{merge} (%)	6.4 (26.7)	6.6 (28.2)		8.6 (30.0)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	12.2 (3.2)	22 (3.15)		10.2 (2.2)
완전성 (%)	98.3 (91.3)	96.6 (79.2)	98.4 (90.5)	78.8 (11.8) 1.89 Å에서 98.1
총 반사	156497	98374		205401
고유 반사	44905	27692	9171	43879

정제

해상도 범위 (Å)	20-2.3	72.17-2.00	50-2.6	14.18-1.6
반사	37397	26284	9171	41611
<i>R</i> _{cryst}	0.225	0.226	0.210	0.203
<i>R</i> _{free}	0.289	0.279	0.305	0.257
단백질 원자	6580	3294	3276	3390
용매 원자	208	199	46	247
r.m.s.d 결합 길이 (Å)	0.022	0.007	0.015	0.014
r.m.s.d 결합 각도 (°)	1.70	1.12	1.77	1.48
평균 B-인자 (Å ²)	40.3	33.6	37.5	20.7
전반적 이방성 B-인자 (Å ²) B11	-1.52	2.42	0.20	1.13

[0870]

[0871] 고찰

[0872] EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 에피토프를 이용한 구조 연구는 mAb806과 mAb175가 모두 wtEGFR 구조에서 동일한 3D-구조 모티프를 인식했음을 보여주며, 이것은 이 주쇄 입체형태가 Δ 2-7EGFR에서도 나타나고 노출되어 있다는 것을 시사한다. 하지만, 중요한 것은, 이 구조들에서 에피토프의 배향이 관련 아미노산에 대한 항체 접근을 방해할 수 있다는 것이다. 이것은 mAb806이 생리학적 수준에서 세포 표면에 노출된 wtEGFR에 결합하지 않는다는 실험 관찰과 일관성이 있다.

[0873] EGFR_{C271A/C283A} 돌연변이체를 이용한 결과는 CR1 도메인이 개방되어 mAb806과 mAb175가 상기 돌연변이 수용체에 화학량론적으로 결합하도록 할 수 있다는 것을 시사한다. 이 돌연변이 수용체는 EGF 자극에 전적으로 반응적이기 때문에 천연 입체형태를 채택하고 있을 수 있으나, wtEGFR과 달리, mAb806에 의해 전적으로 억제된다. 디설파이드 결합이 파괴된 EGFR의 미스폴딩된 형태가 암세포의 표면에 존재한다면, 데이터는 세포 시그널링을 개시할 수 있고 mAb806 또는 mAb175에 의해 억제되어야 한다는 것을 분명하게 보여준다.

[0874] 이 데이터의 다른 설명은 리간드 활성화 동안, 수용체의 구조적 재배열이 에피토프 부근에 국소적 언폴딩을 유도할 수 있고, 이로써 수용체는 결합을 허용하는 입체형태를 채택할 수 있다는 것이다. 결정 구조에서, 에피토프

프는 EGFR 세포외도메인의 물리적 중심 부근에 위치하고, 에피토프에 대한 접근이 폴딩된 CR1 도메인과 EGFR 세포외도메인의 4차 구조에 의해 차단된다. 속박 및 비속박 입체형태에서, CR1 도메인의 보존성은 L1:리간드:L2 도메인(비속박) 또는 L2:CR2 도메인(속박)과의 추가 상호작용에 의해 안정된다. 하지만, 에피토프 영역은 세포외도메인에서 발견되는 최고의 열 파라미터 중 일부를 보유하고; mAb806/175 에피토프는 구조적으로 불안정하다. 수용체 활성화 동안, 수용체가 속박 입체형태와 비속박 입체형태 간에 전이를 겪고 있을 때, mAb806과 mAb175는 에피토프에 접근할 수 있다. 따라서, 분자 수준에서, 이러한 기전은 mAb806과 mAb175의 정상 세포에 대한 무시해도 좋은 결합 및 과발현 및/또는 활성화된 EGFR을 보유하는 종양 세포에 대한 실질적으로 높은 결합 수준에 기여할 수 있다.

[0875]

실시예 24

[0876]

모노클로날 항체 124 및 1133

[0877]

상기 실시예 1에서 논한 바와 같이, mAb124 및 mAb1133은 mAb806과 동시에 제조되었고, 본원에서 논한 mAb806의 독특한 성질과 유사한 성질, 특히 과발현된 야생형 EGFR의 특이성을 나타내는 것으로 발견되었다.

[0878]

초기 선별은 뉴욕에서 수행했다(Jungbluth et al. (2003) A Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over-Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor *PNAS*. 100, 639-644). ELISA 경쟁 평가 및 Biacore 분석은 mAb124 및/또는 mAb1133이 mAb806 또는 대안적인 EGFR 결정인자와 동일한 에피토프를 인식하는지를 측정하기 위해 수행했다.

[0879]

FACS 분석

[0880]

U87MG, $\Delta 2-7$, A431 및 HN5 세포에 대한 항체 결합은 FACS로 평가했다. 항체는 모두 de2-7 EGFR에의 강한 결합성과 과발현된 야생형 EGFR에의 낮은 결합성을 보유하는 mAb806과 유사한 특이성을 나타냈다.

[0881]

경쟁 ELISA

[0882]

124 및 1133 항체가 mAb806 에피토프와 경쟁하는지를 측정하기 위해 일련의 경쟁 ELISA를 수행했다. 간단히 설명하면, EGFR의 변성된 가용성 도메인(sEGFR)을 ELISA 플레이트에 코팅했다. 그 다음, 플레이트를 따라 비표지된 124 또는 1133 항체를 농도를 증가시키며 첨가했다. 세척 후, 각 웰에 비오틴화된 mAb806을 첨가하여 sEGFR에 결합할 수 있는지를 측정했다. 결합된 mAb806의 검출은 스트렙타비딘-접합된 HRP를 사용하여 수행했다. 항체가 mAb806과 동일한(또는 오버래핑) 에피토프에 결합한다면, mAb806 결합은 예상되지 않는다.

[0883]

결과는 표 10에 정리했다. mAb124 및 mAb1133에 대해 농도 의존적 억제성 결합 효과가 관찰되었고, 즉 mAb806 결합은 비표지된 항체의 농도가 감소할수록 증가했고, 이것은 124 및 1133 항체가 mAb806과 동일한 에피토프 또는 근접한 것을 인식할 수 있다는 것을 시사한다.

표 10

sEGFR에 대한 mAb124 및 mAb1133 경쟁 ELISA 결합 정리

비표지된 차단 항체	비오틴-표지된 806의 결합
124	없음
1133	없음
806 (억제 대조군)	없음
무관련 IgG2b	++++

[0884]

[0885]

FACS 분석: 세포 결합 경쟁

[0886]

U87MG, $\Delta 2-7$ 세포를 비표지된 항체 124, 1133과 예비항온처리했다. 양성 대조군 806과 이소타입 대조군도 본 분석에 포함시켰다. 세포를 세척한 뒤, Alexa488-접합된 mAb806으로 염색하고, 806 결합 수준을 FACS로 측정했다.

[0887]

결과는 표 11에 정리했다. 124 및 1133 항체는 세포 표면에 대한 mAb806 결합을 차단하여 mAb806과 동일한 에피토프 또는 근접한 것의 인식을 시사했다.

표 11

FACS 분석: U87MG.△2-7 세포 결합 경쟁

비표지된 차단 항체	Alexa488-표지된 806의 억제
124	+++
1133	+++
806	++++
IgG2b 대조군	없음

[0888]

[0889]

BIAcore 분석: mAb806 펩타이드 에피토프에 대한 결합

[0890]

mAb806 에피토프를 함유하는 EGFR 아미노산 서열₂₈₇CGADSYEMEDGVRKC₃₀₂(서열번호 14)을 펩타이드로 합성하여, 바이오센서 칩 위에 고정시켰다. 이 펩타이드에 대한 항체 124, 1133 및 806(200nM)의 결합을 측정했다. 수득되는 최대 결합 공명 단위(RU)를 표 12에 정리했다. 124, 1133은 상기 펩타이드에의 분명한 결합성을 나타냈고, 이는 806 펩타이드 에피토프의 인식을 확인시켜준다.

표 12

BIAcore 분석: mAb806 펩타이드 에피토프에 대한 최대 결합

항체	mAb806 펩타이드에 대한 결합 (RU)
806	1100
124	1000
1133	800

[0891]

[0892]

고찰

[0893]

본 실시예에 예시한 바와 같이, mAb124 및 mAb1133은 mAb806에 의해 인식되는 EGFR 펩타이드에 결합하고 EGFR의 세포외 도메인 및 de2-7 EGFR을 발현하는 세포에 대한 mAb806의 결합을 차단한다. 따라서, 이 3가지 항체는 EGFR 상의 동일한 결정인자를 인식한다.

[0894]

실시예 25

[0895]

ch806의 임상 검사

[0896]

다양한 종류의 종양을 보유한 환자의 종양 표적화/생체분포/약동학 분석에서 ch806의 생체내 특이성을 조사하기 위해 임상 연구를 디자인했다.

[0897]

1. 재료 및 방법

[0898]

실험 디자인

[0899]

본 최초임상 시험은 개방 표지, 용량 상승식 I기 연구이다. 1차 목적은 806 항원을 발현하는 진행성 종양 환자에서 ch806의 1회 주입에 의한 안전성을 평가하는 것이었다. 2차 연구 목적은 ¹¹¹In-ch806의 생체분포, 약동학 및 종양 흡수를 측정하고; ch806에 대한 환자의 면역 반응을 측정하며; ch806의 임상 활성의 초기 증거를 평가하는 것이었다. 본 연구에서 선택한 1회 용량은 종양에서 발현된 EGFR에 대한 ch806의 생체내 특이성을 최적으로 평가하기 위한 것이었다. 본 프로토콜은 연구 개시 전에 Austin Hospital의 Human Research and Ethics Committee의 승인을 받았다. 본 실험은 Australian Therapeutic Goods Administration Clinical Trials Exemption (CTX) 방식 하에 수행했다. 모든 환자는 서면 동의서를 제출했다.

[0900]

적격성 기준은 다음을 포함했다: 보관된 종양 샘플의 발색성 원위치 하이브리드화 또는 면역조직화학을 기반으로 한 806 항원 발현 양성인 진행성 또는 전이성 종양(종양은 보관된 종양 샘플의 면역조직화학 평가가 806 발현 양성인 모든 세포를 나타낸다면 806 양성으로 정의되었다, 하기 참조); 조직학적 또는 세포학적으로 증명된 악성종양; 적어도 하나의 병변이 ≥2cm인 CT 스캔 상의 측정가능한 질환; 카노프스키 수행 스케일(KPS) ≥ 70; 적당한 혈액학적, 간 및 신장 기능; 연령 > 18세; 및 동의서 제공 가능 여부. 배제 기준은 다음을 포함했다: 활

성 중추신경계 전이(적절히 치료되고 안정하지 않은 경우); 연구 시작하기 4주 전 안에 화학요법, 면역요법, 생물요법 또는 방사선요법; 항체 노출 전[사람 항-키메라성 항체(HACA)의 증거가 없는 경우]; 이전 암 치료법의 효과로부터 완전한 회복 실패; 전신 코르티코스테로이드 또는 면역억제성 제제의 동시 사용; 비조절된 감염 또는 다른 중대한 질환; 임신 또는 수유; 의학적으로 허용되는 피임 수단을 사용하지 않아 임신 가능성이 있는 여성.

[0901] 환자는 인듐-111(^{111}In , 200-280 MBq; 5-7mCi) 표지된 ch806 트래이스의 단일 주입액을 일반 식염수/5% 사람 혈청 알부민에서 60분 동안 정맥내 주입하여 제공받았다. 계획된 용량 상승 의도 환자들은 4가지 용량 수준, 5, 10, 20 및 40 mg/m² 중 하나에 등록했다. 이 용량들은 종양에서 발현된 EGFR에 대한 ch806의 특이성을 평가하고, 임의의 정상 조직 구획이 생체내에서 ch806에 결합하는지(및 약동학 또는 생체분포에 영향을 미치는지) 측정하기 위해 선택했다. 생체분포, 약동학 및 면역 반응은 모든 환자에서 평가했다.

[0902] 생체분포 및 종양 흡수율을 평가하기 위한 전신 감마 카메라 이미징은 ^{111}In -ch806 주입 후 0일, 1일, 2일 또는 3일, 4일 또는 5일, 및 6일 또는 7일에 수행했다. 이들 시점과 추가 14일(± 2 일) 및 21일(± 2 일)에 약동학을 위한 혈액 샘플을 수득했다. HACA 수준을 평가하기 위한 혈액 샘플은 기준선 및 30일까지 매주 수득했다. 독성 평가는 각 연구 방문 시에 수행했다. 물리적 조사 및 통상의 혈액학 및 생화학적 조사는 연구 마지막(30일)까지 매주 수행했다. 재등급하는 30일에 수행했다.

[0903] 용량 상승 기준

[0904] 각 용량 수준에서 첫 환자는 임의의 추가 환자를 등록하기 전에 4주 동안 관찰했다. 처음 2명의 환자 중 임의의 환자에서 ch806을 주입한 4주 내에 용량 제한 독성(DLT)이 관찰되지 않았다면, 4명의 환자를 그 다음 가장 높은 투여량 층에 등록시킨다. 환자 2명인 임의의 코호트 내의 한 환자가 1차 용량으로부터 4주 내에 DLT를 경험했다면, 추가 4명의 환자(최대 6명)을 그 투여량 수준에 등록시켰다. 임의의 용량 수준에서 6명의 환자 중 1명 이하의 환자가 \geq 등급 3 독성을 경험했다면, 후속 환자들은 그 다음 용량 수준에 등록했다.

[0905] DLT는 부작용에 대한 NCI 일반 용어 기준(CTCAE v3.0)에서 정의하는 바와 같이 등급 3 비혈액학적 독성 또는 등급 4 혈액학적 독성으로 정의했다. 최대 허용 용량(MTD)은 6명 중 2명 이상의 환자가 DLT를 경험하는 용량 이하의 ch806 용량으로서 정의했다.

[0906] Ch806의 방사능표지화

[0907] 임상 등급 ch806은 Biological Production Facility of the Ludwig Institute for Cancer Research(Melbourne, Australia)에서 생산했다. 항체 ch806은 종래 기술된 방법(Scott et al. (2000) *Cancer Res* 60, 3254-3261; Scott et al. (2001) *J. Clin. Oncol.* 19(19), 3976-3987)에 따라 이중작용기성 금속 이온 킬레이트 CHX-A"-DTPA를 통해 ^{111}In (MDS Nordion, Kanata, Canada)으로 표지화했다.

[0908] 감마 카메라 이미징화

[0909] ^{111}In -ch806 생체분포의 전신 이미지는 모든 환자 중에서 ^{111}In -ch806 주입 후 0일째 및 주입 후 7일까지 적어도 추가 3회 수득했다. 또한, 공지된 종양을 가진 신체 영역의 단일 광자 방출 전산화 단층촬영법(SPECT) 이미지도 이 기간 동안 적어도 1회 수득했다. 모든 감마 카메라 이미지는 듀얼헤드 감마 카메라(Picker International, Cleveland, OH)로 촬영했다.

[0910] 약동학

[0911] 약동학 분석용 혈액은 0일 - ^{111}In -ch806 주입 전; 그 다음 ^{111}In -ch806 주입 후 5분, 60분, 2시간 및 4시간 후 1일, 2 또는 3일, 4 또는 5일 및 6 또는 7일째 수집했다. ch806 단백질의 약동학을 위한 추가 혈액도 14일(± 2 일) 및 21일(± 2 일) 및 30일(± 2 일)에 수득했다.

[0912] 혈청 샘플은 2반복으로 분취하고, 적당한 ^{111}In 표준물과 함께 감마 섬광 계수기(Packard Instruments, Melbourne, Australia)에서 계수했다. 혈청의 결과는 리터당 주사 용량%(ID%/L)로 나타났다. 각 주입 후 환자 혈청의 ch806 단백질 수준의 측정은 사람 혈청에 존재하는 ch806 단백질의 면역화학적 측정에 확인된 프로토콜을 사용하여 수행했다⁴⁰. 혈청 샘플에 존재하는 ch806의 정량 한계는 70ng/ml였다. 모든 샘플은 3반복으로 분석하고 적어도 1:2의 계수로 희석했다. ch806의 측정된 혈청 수준은 $\mu\text{g/ml}$ 로서 나타났다.

- [0913] 약동학 계산은 주입 후 혈청 ^{111}In -ch806 측정으로 수행하고, ELISA는 곡선 적합 프로그램(WinNonlin Pro Node 5.0.1, Pharsight Co., Mountain View, CA)을 사용하여 환자 혈청 ch806 단백질 수준을 측정했다. 평가 값은 다음과 같은 파라미터들에 대해 측정했다: $T_{1/2\alpha}$ 및 $T_{1/2\beta}$ (소인의 초기 및 말기 단계의 반감기); V_1 , 중심 구획의 용적; C_{\max} (최대 혈청 농도); AUC(무한 시간에 외삽된 혈청 농도 곡선 아래의 면적); 및 CL(총 혈청 제거율).
- [0914] 전신 제거율 및 종양과 기관의 ^{111}In -ch806 선량측정
- [0915] 전신 및 정상 기관(간, 폐, 신장 및 비장) 선량측정 계산은 각 개개의 환자의 ^{111}In -ch806 주입 이미지 데이터세트에서 관심 영역에 기초하여 수행하여, 최종 선량측정 결과를 위해 OLINDA를 이용한 누적 활성 계산 및 분석을 수행했다(Stabin et al. (2005) *J. Nucl. Med.* 46(6), 1023-1027). 관심 영역은 또한 ^{111}In -ch806 이미지 데이터세트에서 각 시점에 적당한 종양에 대해 정의하고, 배경 및 감쇠에 대해 보정하고, 선량측정 계산은 종양/gm 중의 ^{111}In -ch806의 농도를 도출하기 위해 수행했다(Scott et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(13), 4810-4817). 이것을 주사된 mg ch806 단백질 용량을 기초로 한 ch806 μg /종양 조직 gm으로 변환시켰다.
- [0916] HACA 분석
- [0917] HACA 평가를 위한 혈액 샘플은 ch806 주입 전에 채취하고, 그 다음 ch806 주입 후 30일까지 매주 채취했다. 샘플을 ELISA 및 BIAcore2000 기구를 이용한 표면 플라즈몬 공명 기술로 종래 기술된 바와 같이 분석했다(Scott et al., 2005; Liu et al. (2003) *Hybrid Hybridomics* 22(4), 219-28; Ritter et al. (2001) *Cancer Res.* 61(18), 685-6859).
- [0918] 면역조직화학 방법
- [0919] 본 실험에서 각 환자 유래의 포르말린-고정 및 파라핀 포매된 종양 조직은 다음과 같이 면역염색했다: 간단히 설명하면, 파라핀 포매된 조직 4 μm 절편을 SuperFrost® Plus 슬라이드(Menzel-Glaser, Germany) 위에 마운팅하고, 탈파라핀화한 뒤, 재수화한 뒤, 표적 회수 용액(pH 6.0)(10분; Dako, Glostrup, Denmark)에 마이크로웨이브 항원 회수를 수행했다. 그 다음, 절편을 3% H₂O₂로 10분 동안 처리하고, 내인성 퍼옥시다제를 제거한 뒤, 실온에서 m806 항체(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 적당한 농도의 이소타입-부합된 음성 대조군 항체(IgG2b; Chemicon, Temecula, CA)와 60분 동안 항온처리했다. 항체 결합성은 PowerVision Kit(ImmunoVision Technologies, Brisbane, CA)를 사용하여 검출했다. 면역염색을 가시화하기 위해, 절편을 발색원 3-아미노-9-에틸카르바졸(0.4%, Sigma Chemical Co. MO, USA)과 10분 동안 항온처리하고, 메이어의 헤마톡실린으로 대비염색했다. 면역염색 절차의 음성 대조군은 1차 항체를 제외시켜 준비했다. 결과는 양성 종양 세포 염색 백분율로 나타났다.
- [0920] 발색원성 원위치 하이브리드화 방법
- [0921] 본 실험에서 각 환자의 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 종양 조직은 절편화한 뒤, SpotFrost® Plus 슬라이드에 마운팅하고, 탈파라핀화하고 재수화한 뒤, SpotLight® Tissue Pre-treatment Kit(Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA)로 예비처리했다. 그 다음, 절편은 SpotLight® EGFR DNA 탐침으로 도포하고, 95°C에서 10분 동안 변성시킨 뒤, 37°C에서 밤새 항온처리했다. 하이브리드화 후, 슬라이드는 0.5 X SSC로 세척했다. 탐침의 검출은 SpotLight® CISH™ Polymer Detection Kit를 사용하여 수행했다. 암세포의 >25% 에서 ≥ 5 개 개별 시그널 또는 시그널의 클러스터를 나타내는 절편은 m806 반응성과 상관성이 있는 EGFR 유전자의 증폭을 나타내는 것으로 간주했다.
- [0922] 2. 결과
- [0923] 환자
- [0924] 8명의 환자(여성 1명 및 남성 7명; 평균 연령 61세(44-75세 범위))로 본 실험을 완료했다(표 13). 치료 이력 전에 1차 종양 부위 및 연구 시작시 질병 부위를 또한 표 13에 제시했다. 8명 환자 모두는 보관된 종양에서 806 항원 양성을 나타냈다(표 13).
- [0925] 모든 환자는 포함 기준을 만족시켰고, 환자 8(원발성 뇌 종양 보유) 외에, 모든 환자는 연구 진입시 전이 질환을 나타냈다. 표적 병변으로 분류된 질환 부위는 다음과 같다: 폐(5명), 뇌(1명), 림프절(1명), 성대위(1명). 전이 질환의 다른 부위(비표적 병변)는 다음과 같다: 신장위 덩이, 뼈 및 림프절(표 13). 중간 카노프스키 수행 상태는 90(80-100 범위)이었다.

표 13

환자 특성

환자 번호	용량 수준 (mg/m ²)	연령 (세)	성별	KPS (%)	원발성 종양 부위	양성 세포의 IHC (%)	이전 치료법	연구 진입시의 질병 부위	ch806에 대한 종양 반응
1	5	71	M	10	NSCLC	50-75	RT	폐, 부신	PD
8	5	44	M	90	역형성 성상세포종	>75*	수술, RT, CT	뇌	SD
2	10	49	F	80	SCC 항문	<10	Chemo, RT	LN, 폐, 뼈	SD
3	10	75	M	90	NSCLC	50-75	수술 RT	폐	SD
4	20	52	M	100	결장	<10†	수술, CT	폐, LN	PD
5	20	65	M	80	중피종	>75	RT, CT	폐	SD
6	40	59	M	80	SCC 성대	>75	수술, RT, CT	연조직	SD
7	40	71	M	90	SCC 피부	50-75	수술, CT	폐, LN	PD

약어: F = 여성; M = 남성; NSCLC = 비소세포 폐암종; SCC = 편평상피세포 암종; RT = 방사선요법; CT = 화학요법; LN = 림프절; PD = 진행성 질환; SD = 안정성 질환, * de2-7 EGFR 발현 양성, † EGFR 유전자 증폭 양성

[0926]

[0927] 부작용 및 HACA

[0928] ch806과 관련된 부작용은 표 14와 15에 열거했다. 주입 관련 부작용은 관찰되지 않았다. DLT는 없었고, 따라서 MTD는 도달되지 않았다. 연구자의 의견으로 ch806에 기인할 수 있는 주요 독성은 다음과 같다: 일시적 가려움, 경미한 오심, 피로/무기력, 및 혈청 ALP 및 GGT 수준에 미칠 수 있는 효과. 환자 5에서 GGT 수준의 CTC 2 등급 상승이 관찰되었지만, 이는 기준선 배경이 1 등급 상승했기 때문이며, 본래 일시적이었다. 3가지 심각한 부작용 (SAE)이 보고되었지만, ch806에 기인하는 것은 없었다. 종합해보면, ch806은 안전하고 모든 용량 수준에서 일반적으로 예측할 수 있고 처리할 수 있는 미량의 독성이 관찰되어 충분한 허용성이었다. 추가 용량 상승은 수행하지 않았는데, 그 이유는 본 실험에 이용할 수 있는 cGMP ch806의 제한된 양 때문이다.

[0929] ch806에 대한 양성 면역 반응(ELISA 및 BIAcore 방법론 모두와 일치)은 환자 8명 중 1명에서만 관찰되었다(환자 1).

표 14

ch806과 관련된 부작용 발생

부작용	용량 수준 (mg/m ²)*				각 사건의 총 에피소드 수
	5	10	20	40	
어지러움	0	0	0	1	1
피로	0	0	1	0	1
무기력	0	0	0	1	1
식욕 감퇴	0	0	0	1	1
오심	0	1	0	1	2
가려움	1	0	0	0	1
ALP - 상승	0	0	1	0	1
GGT - 상승	0	0	1	0	1
합계	1	1	3	4	9

*숫자는 각 용량 수준에서 임의의 사건의 에피소드 수를 나타낸다.

[0930]

표 15

연구 제제 관련 부작용의 분포

용량 수준 (mg/m ²)	최대 CTC 등급 독성*			
	1 = 경미	2 = 중간	3 = 심각	4 = 생명 위협
5	1	0	0	0
10	1	0	0	0
20	2	1	0	0
40	4	0	0	0
합계	8	1	0	0

* 환자 수

[0931]

[0932]

ch806의 방사능표지화

[0933]

실험 동안 투여된 ¹¹¹In-ch806은 총 8회 주입이다. ¹¹¹In-ch806의 평균(±SD) 방사능화학 순도 및 면역반응성은 각각 99.3±0.1% 및 77.4±7.0%인 것으로 측정되었다.

[0934]

ch806의 생체분포

[0935]

모든 용량 수준에서 환자 중의 ¹¹¹In-ch806 생체분포의 초기 패턴은 혈액 풀(pool) 활성과 일치했고, 시간이 경과할수록 점차 제거되었다. 주사 후 1주 동안, 간 및 비장에서의 ¹¹¹In-ch806의 흡수는 망상내피계를 통한 ¹¹¹In-킬레이트 대사산물의 정상적인 제거와 일치했다. ¹¹¹In-ch806의 특이적 국재화는 폐(환자 1, 3, 4, 5 및 7), 복부(환자 1 및 2), 목 오른쪽 성대위 영역(환자 6)에 위치한 표적 병변을 비롯한 모든 환자의 표적 병변(≥2cm)에서 모든 용량 수준에서 관찰되었다(도 94). 뇌 종양(환자 8)에서 ¹¹¹In-ch806의 높은 흡수율도 증명되었다(도 95). 중요한 것은 종양에서 ¹¹¹In-ch806의 흡수가 806 항원 발현 수준에 의존적이지 않다는 것이다. 예를 들어, 환자 4는 보관된 종양에서 806 활성에 대한 IHC 조사 결과 <10% 양성에도 불구하고, 양 폐 표적 병변에 의한 높은 흡수를 입증했다(도 96). 환자 4의 표적 병변에서 ¹¹¹In-ch806의 높은 흡수 정도는, 보관된 샘플 면역조직화학에서 806 항원 염색 시 종양 세포의 50-75%가 양성인 환자 3에서 관찰된 것과 비슷했다(도 96).

[0936]

약동학

[0937]

¹¹¹In-ch806의 1회 주입에 대한 개개인의 환자 약동학 파라미터 T_{1/2α} 및 T_{1/2β}, V₁, C_{max}, AUC 및 CL은 표 16에 제시했다. Kruskal-Wallis 순위 총합 검사는 알파 및 베타 반감기, V₁ 및 제거율에 적용했다. 용량 수준 간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(P>0.05).

[0938]

수집된 집단 ELISA 데이터에 대한 약동학 곡선 적합은 도 97에 제시했다. 평균 ± SD 약동학 파라미터는 T_{1/2α} 29.16±21.12시간, T_{1/2β} 172.40±90.85시간, V₁ 2984.59±91.91 ml 및 CL 19.44±4.05 ml/hr였다. 측정된 피크 및 골의 ch806 혈청 농도(C_{max} 및 C_{min}) 데이터는 각 환자마다 표 17에 제시했다. 예상한 바와 같이, C_{max} 및 C_{min}은 각 용량 수준과 선형 관계가 관찰되었다. ch806 ELISA 약동학 데이터에서 측정된 평균±SD 값은 ¹¹¹In-ch806 약동학 데이터에서 수득되는 값과 잘 일치했다(표 16).

표 16

각 용량 수준에서 및 모든 용량 수준에 걸친 $^{111}\text{In-CHX-A''-DTPA-ch806}$ 에 대한
평균 \pm SD 약동학 파라미터 평가 값

용량 수준	$T_{1/2\alpha}$ (hr)		$T_{1/2\beta}$ (hr)		V1 (mL)		CL (mL/hr)		AUC (hr*mg/mL)	
(mg/m ²)	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
5	10.91	3.4	183.9	110.2	2963.06	493.23	21.97	16.59	541.17	371.75
10	11.75	4.4	124.5	9.25	3060.29	721.70	28.58	8.60	566.79	26.39
20	9.34	8.3	125.3	73.66	2902.06	1064.77	30.98	21.65	1438.12	957.18
40	8.95	3.2	133.9	10.79	4742.42	169.10	37.99	6.47	2269.04	381.68
ALL	10.24	1.32	141.90	28.30	3416.96	886.04	29.88	6.61		

[0939]

표 17

ELISA 분석으로 측정된 혈청 ch806 Cmax 및 Cmin 수준

환자 번호	용량 수준 (MG/M ²)	C _{max} [*] (μG/ML)	C _{min} [*] (μG/ML)
1	5	1.38 ± 0.02	0.10 ± 0.05†
8	5	1.52 ± 0.17	0.96 ± 0.08
2	10	5.92 ± 0.11	1.50 ± 0.01
3	10	6.27 ± 0.45	1.83 ± 0.20
4	20	12.25 ± 0.66	4.05 ± 0.05
5	20	11.22 ± 0.77	1.58 ± 0.04
6	40	27.76 ± 2.10	6.90 ± 0.38
7	40	32.32 ± 0.84	6.80 ± 0.13

*C_{max} = 주사 후 60분; C_{min} = 7일 † 8일 혈청 수준

[0940]

[0941] $^{111}\text{In-ch806}$ 의 선량측정

[0942] 전신 제거율은 모든 용량 수준에 걸쳐 모든 환자에서 유사했고, $T_{1/2}$ 생물학적(평균 \pm SD) 값은 948.6 ± 378.6 시간이었다. 물리적 반감기가 비교적 짧아서, 생물학적 반감기의 계산은 유효 반감기의 작은 변화에 매우 민감했다. 용량 수준 간에 전신 제거율은 통계적으로 유의적인 차이가 없었다[Kruskal-Wallis 순위 총합 검사: P값 = 0.54] (도 98).

[0943] 정상 기관(간, 폐, 신장 및 비장)으로부터 $^{111}\text{In-ch806}$ 의 제거율은 용량 수준 간에 차이가 없었고, 평균 $T_{1/2}$ 유효 값은 각각 78.3, 48.6, 69.7 및 66.2시간이었다. 이러한 정상 기관 간에 제거율은 통계적으로 유의적인 차이가 없었다. 특히, 간 제거율은 용량 수준 간에 어떠한 차이도 나타내지 않았고(도 98), 이것은 간에는 ch806에 대한 포화성 항원 구획이 없다는 것을 시사한다.

[0944] 종양 선량측정 분석은 환자 6명에서 완료했다. 환자 1 및 2는 심장 혈액 풀에 근접한 표적 병변을 보유하거나, 일부 이미지 획득 동안 움직여서, 정확한 분석을 방지했다. $^{111}\text{In-ch806}$ 의 측정된 최고 흡수율은 주입 후 5 내지 7일 후에 나타났고, 종양 조직 g당 $5.2\text{--}13.7 \times 10^{-3}$ % 주입 용량 범위였다.

[0945] 임상적 활성 평가

[0946] 1개월 연구 기간의 마지막에, 환자 5명은 안정한 질환을 보유하고, 환자 3명은 진행성 질환을 보유하는 것으로 발견되었다(표 13). 흥미로운 것은, 환자 1명(환자 7, 40mg/m^2 용량 수준)은 연구 기간 동안 촉진가능한 귀 림프절의 일시적 수축을 나타내는 임상적 증거를 나타냈고(미세바늘 흡인 시에 전이성 SCC인 것으로 증명됨), 이것은 ch806의 가능한 생물학적 활성을 시사한다. 하지만, 이 환자는 연구 종료 시, RECIST에 의해 진행성 질환을 확인시켜주었다.

[0947] 추가 데이터

[0948] 8명의 환자(여성 1명 및 남성 7명; 평균 연령 61세(범위44-75))는 보고된 바와 같이 본 단계 1 실험을 완료했다

((Scott et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4071-4076). 모든 환자는 포함 기준을 충족했고, 환자 8(원발성 뇌 종양 보유)을 제외한 모든 환자는 연구 진입 시에 전이성 질환을 보유했다. 종양에 의한 Ab 흡수는 모든 환자에서 관찰되었고, mAb806의 키메라화된 형태인 ^{111}In -ch806은 종양에서 즉각적이고 높은 수준의 흡수를 입증했다(도 71). 정상 기관(간, 폐, 신장 및 비장)으로부터 ^{111}In -ch806의 제거율은 용량 수준 간에 차이가 없었다(Scott et al., 2007). 특히, 간 제거율은 용량 수준 간에 차이가 없었는데, 이것은 간에는 ch806에 대한 포화성 항원 구획이 없음을 시사한다. 총 간 흡수율은 주입 직후 최대 $14.45 \pm 2.43\% \text{ID}$ 였고, 72시간 경에는 $8.45 \pm 1.63\%$, 주입 후 1주 경에는 $3.18 \pm 0.87\% \text{ID}$ 로 감소했다. 이것은 주입 후 3일 동안 간에서 $30\% \text{ID}$ 이상에 도달하는 것으로 관찰된 wtEGFR(예: 225)에 대한 항체 흡수율과 현저히 대조적이다(Divgi et al.(1991) *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 97-104). ^{111}In -ch806의 측정된 피크 종양 흡수율은 주입 후 5 내지 7일 후에 나타났다. 환자 1 및 3에서 정량적 종양 흡수율의 계산은 심장 혈액 풀에 표적 병변의 근접성 및 환자 움직임으로 인해 정확하게 수행할 수 없었다. 종양에서 피크 ch806 흡수율은 종양 조직 g당 5.21 내지 $13.73 \times 10^{-3} \% \text{ID}$ 범위였다. 종양 내 실제 ch806 농도의 계산은 (평균 \pm SD)의 최고값, $0.85 \pm 0.0\mu\text{g/g}(5\text{mg/m}^2)$, $0.92 \pm 0.0\mu\text{g/g}(10\text{mg/m}^2)$, $3.80 \pm 1.10\mu\text{g/g}(20\text{mg/m}^2)$ 및 $7.05 \pm 1.40\mu\text{g/g}(40\text{mg/m}^2)$ 을 나타냈다.

[0949] 고찰

[0950] 본 실시예에서 설명한 바와 같이, 본 연구는 EGFR의 과발현 형태, 돌연변이 형태 또는 리간드 활성화된 형태에서 노출되었을 때만 에피토프에 대하여 키메라 항체의 생체분포 및 종양 표적화가 나타난다는 최초의 보고이다. ch806은 모든 환자에서 종양 부위의 우수한 표적화를 나타냈고, 정상 조직 흡수의 증거 및 유의적인 독성은 전혀 없었다. 이러한 ch806의 시험관내 및 생체내 특성은 EGFR을 표적화하는 다른 모든 항체와 구별된다.

[0951] 최고 40mg/m^2 용량에서, ch806은 충분히 허용성이었고, DLT는 관찰되지 않았고 MTD는 도달되지 않았다. ch806에 기인할 것으로 생각되는 주요 독성은 일시적 가려움, 경미한 오심, 피로/무기력, 및 혈청 ALP 및 GGT 수준에 미치는 가능한 효과였다. 이 환자의 악성종양의 진행 성질은 이 질환이 또한 상기 부작용에 대한 기여 인자였을 수 있다는 것을 의미한다. 연구 약물과 관련이 있을 것으로 생각되는 부작용은 모두 경미했고, 대부분 자기-제한적이었으며, 따라서 어떤 능동적인 치료도 필요로 하지 않았다. 중요한 것은, 최고 용량 수준에서도 모든 환자에서 피부 발진 또는 위장관 장애가 전혀 관찰되지 않았다는 점이다. 이러한 단일 용량 연구에서 ch806의 우수한 허용성은 반복 용량 실험에서 다음 검사 단계를 정당화한다.

[0952] 모든 환자에서 ch806의 생체분포는 혈액 풀 활성의 점차적인 제거를 나타냈고, 정상 조직에 의한 ^{111}In -ch806의 분명한 흡수를 나타내지 않았다. 또한, ch806의 우수한 종양 흡수는 폐, 림프절, 및 부신 전이, 및 중피종과 신경아교종을 비롯한 모든 환자에서 분명했다. 이것은 모든 용량 수준에서 관찰되었는데, 예컨대 wtEGFR에 대한 다른 항체들에 의한 종양 내 흡수를 가시화하는데 필요한 용량의 1/10 내지 1/20인 5mg/m^2 (연구된 최저 용량)에서도 관찰되었다³³. wtEGFR에 대한 항체에 비해 이러한 ch806의 흡수 차이는 항원 싱크로서 작용하는 wtEGFR로 인한 실질적인 정상 조직(간 및 피부) 흡수에 기인할 수 있다³³. 또한, ^{111}In -ch806의 국재화는 보관된 종양 샘플의 면역조직화학에 의해 평가된 806의 낮은 발현을 보유하는 환자에서도 높았다(도 96). 신경아교종에서 ^{111}In -ch806의 흡수는 특히 인상적이었고(도 97), 전신 또는 심지어 국소 주입 후 뇌종양의 항체 표적화에 대한 임의의 공지된 데이터와 비슷했다. 이 데이터는 광범위한 종양에 의해 발현된 EGFR에 대한 ch806의 독특한 선택성을 지지하고, 사람의 정상 조직에서는 이 항체의 흡수성 결여를 확인시켜준다.

[0953] 약동학 분석은 ch806이 1주보다 긴 최종 반감기를 보유하고 ^{111}In -ch806 혈청 제거율이 용량 의존성이 없음을 보여주었다. 또한, $1\mu\text{g/ml}$ 이상의 골 혈청 농도를 달성하는 10mg/m^2 이상의 용량 수준과, AUC, Cmax 및 Cmin에 대해 선형 관계가 관찰되었다. V1, C1, T $\frac{1}{2}\alpha$ 및 T $\frac{1}{2}\beta$ 값은 용량 수준 간에 일관되었고, 전형적인 IgG1 사람 항체와 일치했다(Scott et al., 2005; Steffens et al. (1997) *J. Clin. Oncol* 15, 1529-1537; Scott et al. (2001) *J. Clin. Oncol.* 19(19), 3976-3987). 또한, ELISA ch806 계산을 ^{111}In -ch806 측정과 비교했을 때 ch806의 제거율이 더 느린 것으로 측정되었다. 이 차이는 연구한 소수의 환자에 의해 설명될 수 있는 것으로, ch806 ELISA를 위한 더 긴 샘플링 시점은 이 값이 진정한 ch806 제거율을 더욱 대표한다는 것을 지지할 것이다. ch806의 약동학 값은 지금까지 보고된 다른 키메라 항체와 비슷하고(Steffens et al., 1997; Scott et al., 2001); ch806의 주간 용량투여 스케줄을 지지한다.

[0954] 정량적 선량측정 및 약동학적 결과는 본 실험에서 평가된 용량 수준에서 ch806에 대해 포화가능한 정상 조직 구

획은 없다는 것을 시사한다. 중요한 것은, 약동학 및 전신과 간 기관 제거율에 대한 용량 의존성의 결여가 wtEGFR에 대한 항체의 보고된 모든 연구(Baselga J. and Artega C.L. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23, 2445-2449; Divgi et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 83(2), 97-104; Baselga J (2001) *Eur. J. Cancer* 37 Suppl. 4, S16-22; Gibson et al. (2006) *Clin. Colorectal Cancer* 6(1), 29-31; Rowinsky et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22, 3003-3015; Tan et al. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(21), 6517-6522)와 현저한 대조를 이루며, 이것은 사람에서 ch806의 종양 특이성과 정상 조직 결합의 결여를 지지한다. 이러한 관찰은 종양에서 EGFR을 선택적으로 표적화하고 다른 EGFR 항체 및 키나제 억제제(특히 피부)의 정상 독성을 피하고(Lacouture AE (2006) *Nature Rev. Cancer* 6, 803-812; Adams G.P. and Weiner L.M. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(9), 1147-1157), 더 큰 치료 효과를 잠재적으로 달성하는 ch806(또는 사람화된 형태)의 잠재성에 대한 흥미로운 증거를 제공한다. 더욱이, 페이로드(payload) 전달(종양 세포에서 mAb806의 고속 내재화로 인한) 및 조합된 독성이 최소화될 수 있는 EGFR 항체 및 티로신 키나제 억제제와 같은 여타 생물학적 물질과의 병용 치료의 가능성은 본 실험의 데이터에 의해 강력하게 지지된다. 본 연구는 종양에 특이적인 EGFR 상의 에피토프를 표적화하는 능력의 분명한 증거를 제공하며, 나아가 독특한 본 접근법을 암 치료법으로 사용하기 위한 임상 개발이 진행중이다.

[0955] 실시예 26

[0956] 서열 비교

[0957] 각 mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, 및 hu806의 VH 채 및 VL 채 CDR을 여기에 제시하여 비교한다.

표 18

쥐 항체 이소타입 및 CDR 서열 비교 (캐뻛)¹

A. 가변 경쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (서열번호 18)	HGTNLDD (서열번호 19)	VQYAQFPWT (서열번호 20)
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (서열번호 28)	HGTNLDD (서열번호 29)	VQYQGFPWT (서열번호 30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG (서열번호 135)	HGTNLED (서열번호 136)	VQYQGFPWT (서열번호 137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (서열번호 38)	HGTNLDD (서열번호 39)	VQYQGFPWT (서열번호 40)

B. 가변 중쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	SDFAWN (서열번호 15)	YISYSGNTRYNPSLKS (서열번호 16)	VTAGRGFPY (서열번호 17)
124 (IgG2a)	SDYAWN (서열번호 23)	YISYSANTRYNPSLKS (서열번호 24)	ATAGRGFPY (서열번호 25)
175 (IgG2a)	SDYAWN (서열번호 130)	YISYSANTRYNPSLKS (서열번호 131)	ATAGRGFPY (서열번호 132)
1133 (IgG2a)	SDYAWN (서열번호 33)	YISYSGNTRYNPSLRS (서열번호 34)	ATAGRGFPY (서열번호 35)

¹ mAb806 CDR 서열과의 차이는 밑줄친 부분이다.

[0958]

[0959] 상기 제시한 각 항체 이소타입의 CDR은 캐뻛(Kabat) 분석을 기반으로 한다. 당업자에게는 분명한 것처럼, CDR은 캐뻛과 초티아의 복합 정의와 같은 다른 분석에 기초해서도 정의될 수 있다. 예를 들어, 캐뻛과 초티아의 복합 정의를 상기 이소타입에 적용하면, 각 이소타입의 VL 채 CDR과 VH 채 CDR의 서열은 표 19에 제시한 바와 같다.

표 19

쥐 항체 이소타입 및 CDR 서열 비교(복합 캐뻛 및 초티아 정의)¹

A. 가변 경쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (서열번호 18) ²	HGTNLDD (서열번호 139) ²	VQYAQFPWT (서열번호 20) ²
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (서열번호 28)	HGTNLDD (서열번호 140)	VQYQFPWT (서열번호 30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG (서열번호 135)	HGTNLED (서열번호 141)	VQYQFPWT (서열번호 137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (서열번호 38)	HGTNLDD (서열번호 142)	VQYQFPWT (서열번호 40)

B. 가변 중쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	GYSITSDFAWN (서열번호 143) ³	GYISYSGNTRYNP SLKS (서열번호 144) ³	VTAGRGFPY (서열번호 17) ³
124 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (서열번호 145)	GYISYANTRYNP SLKS (서열번호 146)	ΔTAGRGFPY (서열번호 25)
175 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (서열번호 147)	GYISYANTRYNP SLKS (서열번호 148)	ΔTAGRGFPY (서열번호 132)
1133 (IgG2a)	GYSITSDYAWN (서열번호 149)	GYISYSGNTRYNP SLRS (서열번호 150)	ΔTAGRGFPY (서열번호 35)

¹ mAb806 CDR 서열과의 차이는 밑줄친 부분이다.

² 공동-계류중인 미국 특허출원번호 10/145,598(미국 특허 7,589,180)의 도 17 참조

³ 공동-계류중인 미국 특허출원번호 10/145,598(미국 특허 7,589,180)의 도 16 참조

[0960]

표 20

mAb806 및 hu806 CDR 서열 비교(캐뻛)¹

A. 가변 경쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	HSSQDINSNIG (서열번호 18)	HGTNLDD (서열번호 19)	VQYAQFPWT (서열번호 20)
hu806	HSSQDINSNIG (서열번호 49)	HGTNLDD (서열번호 50)	VQYAQFPWT (서열번호 51)

B. 가변 중쇄

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	SDFAWN (서열번호 15)	YISYSGNTRYNP SLKS (서열번호 16)	VTAGRGFPY (서열번호 17)
hu806	SDFAWN (서열번호 44)	YISYSGNTRYQPSLKS (서열번호 45)	VTAGRGFPY (서열번호 46)

¹ mAb806 CDR 서열과의 차이는 밑줄친 부분이다.

[0961]

[0962]

앞에서 밝힌 바와 같이, mAb806, mAb175, mAb124 및 mAb1133 이소타입의 CDR 서열은 에피토프 인식을 위해 상동성 단백질 폴딩을 유발할 것으로 생각되는 고도의 보존적 아미노산 변화를 제외하고는 동일하다. 이 데이터는 상기 실시예에 제공된 결합 및 다른 데이터와 함께, 이러한 이소타입과 hu806이 mAb806에 대해 앞에서 논한 바와 같은 독특한 성질을 나타내고(예컨대, EGFR의 과발현, 돌연변이 또는 리간드 활성화된 형태에만 결합하기 위해 접근할 수 있는 EGFR 상의 에피토프에 결합하여, 정상 조직 중의 wtEGFR이 아닌 종양 발현 EGFR에 대한 독특한 특이성을 초래한다) 독특한 가변 영역 서열의 항체, 특히 다양한 CDR 서열의 항체가 동일한 특성 및 결합능을 보유한다는 것을 입증하는 밀접하게 관련된 패밀리 구성원 변형체라는 것을 보여준다.

[0963]

참고문헌

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86,3778-3781.

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1605-1611.

Arteaga, C. I. and Baselga, J. (2004) *Cancer Cell.* 5, 525-531.

Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors." *J. Neurooncol.*, 35 : 259-273,1997.

Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. "Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor a." *Cancer Res.*, 52 : 3335-3339, 1992.

Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. "Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin." *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 904-14.

Baselga, J. (2006) *Science.* 312, 1175-1178.

Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23,2445-2459.

Baselga, J. Clinical trials of Herceptin (R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37 : 1824,2001.

Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin

[0964]

against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts.” *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.

Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. “Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies.” *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda), 85: 1327-1333, 1993.

Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtneess, B., Bos, M., D’Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. “Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin.” *J. Clin. Oncol.* 18 : 904, 2000.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., and Norton, L. “Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-pl85HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer.” *J. Clin. Oncol.*, 14 : 737-744, 1996.

Batra SK, Castellino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. “Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene.” *Cell Growth Differ.* 1995; 6: 1251-9.

Bernier, J. (2006) *Expert. Rev Anticancer Ther.* 6, 1539-1552.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy." *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(1) : 63-9. *Biol. Cell.* 13,4029-4044.

Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 15024-15029.

Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., et al. “Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase I trial.” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22 : 225-230, 1992.

Brown, G. and N. Ling (1988). *Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach.* D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. x., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) *Mol. Cell.* 12,541-552.

Chao, G., Cochran, I. R., and Wittrup, K. D. (2004) *J. Mol. Biol.* 342,539-550.

Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 1330-1333.

Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. x., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., DelUley, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) *Nature* 421, 756-760.

Clarke, K., et al., ”In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice.” *Cancer Res*, 2000. 60(17): p. 4804-11.

[0965]

Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. "Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy." *Clin. Cancer Res.*, 6 : 3621-3628, 2000.

Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30392-30399.

Daugherty BL, DeMartino JA, Law MF, Kawka DW, Singer II, Mark GE. "Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins." *Nucleic Acids Res.* 1991 19(9):2471-6.

de Larco, J. E. and Todaro, G. J. (1978) *J. Cell. Physiol.* 94, 335-342.

de Larco, J. E., Reynolds, R., Carlberg, K., Engle, C., and Todaro, G. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255,3685-3690.

den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In : P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition, pp. 2424 31. London: Academic Press, 1998.

DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. "A new era for radiolabeled antibodies in cancer?" *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11: 563-9.

Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., et al. "Phase I and imaging trial of indium 11-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma." *J. Natl. Cancer Inst.*, 83 : 97-104,1991.

Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor." *Growth Factors.* 18 : 11-29, 2000.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000). "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." *Growth Factors* 18 (1):11-29.

Safa, M. M. and K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." *Semin. Oncol.* 28 (1) : 68-92.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. "Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 4309-13.

Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. (1991) *Cancer Res.* 51,2164-2172.

Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta crystallographica* 60, 2126-2132.

[0966]

- Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. "A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas." *Neurosurgery* (Baltimore), 39 : 478-483, 1996.
- Fairlie, W. D., Ubaldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. I., Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) *Protein expression and purification* 26, 171-178.
- Fan, Z., and Mendelsohn, J. "Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies." *Curr. Opin. Oncol.*, 10 : 67-73, 1998.
- Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." *Cancer Res.*, 53 : 4637-4642, 1993.
- Fan, Z., Masui, H., Altas, I., and Mendelsohn, J. "Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res.*, 53: 4322-4328, 1993.
- Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. "Expression of activated-epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogenactivated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens." *Neurosurgery* (Baltimore), 45 : 1442-1453, 1999.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) *Mol. Cell* 11, 507-517.
- Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. "Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/deEGFR) expressed in cancer cells." *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5375-83.
- Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. "MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 128: 898-905.
- Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. "Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants." *Mol. Cell. Biol.*, 7 : 251-257, 1987.
- Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) *Journal of Cell Biology* 129,1543-1558.
- Gan H.K., Walker F., Burgess A.W., Rigopoulos A., Scott A.M. and Johns T.G. "The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 Increases the Formation of Inactive Untethered EGFR Dimers: Implications For Combination Therapy With Monoclonal Antibody 806." *J. Biol. Chem.* (2007);282(5):2840-50.
- Garcia de Palazzo, I.E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas." *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.

[0967]

- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) *Cell*, 110, 763-773.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) *Mol. Cell*, 11, 495-505.
- Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C., and Mendelsohn, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7755-7760.
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1311-8.
- Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Twardy, D. J. "Levels of TGP-a and BOFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 32CE, 1998.
- Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. "Monoclonal antibody therapy for solid tumors." *Cancer Treat. Rev.*, 26 : 269-286, 2000.
- Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. "The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor ligand complex." *J. Biol. Chem.* 265:22082-5, 1990.
- Halaisch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. P., and Ohnuma, T. "Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA." *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.
- Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. "Tyrophostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors." *Cancer Res.* 56:3859-3861, 1996.
- Harari, D., and Yarden, Y. "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." *Oncogene*, 19 : 6102-6114, 2000.
- Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. "Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody." *Int. J. Cancer* 1995; 63: 537-43.
- Hogg, P. J. (2003) *Trends in biochemical sciences* 28, 210-214.
- Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:195-217., 195-217.
- Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* 381,272.
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2927-35.

Humphrey, P. A., Wong, A. I., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. "Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma" (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.

Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Caveness WK, Scott AM and Furnari FB. "The efficacy of EGFR-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status and heterodimerization." *Clin. Cancer Res.* (2007);13(6): 1911-1925.

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, H-J. Su Huang, Caveness WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, Gullick WJ, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "Novel monoclonal antibody specific for the DE2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene." *Int. J. Cancer* (2002) 98: 398-408

Johns, T.G., Adams, T.E., Cochran, J.R., Hall, N.E., Hoyne, P.A., Olsen, M.J., Kim, Y.S., Rothacker, J., Nice, E.C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Ward, C.W., Burgess, A.W., Wittrup, K.D., and Scott, A.M. "Identification of the Epitope for the EGFR-Specific Monoclonal Antibody 806 Reveals that it Preferentially Recognizes an Untethered Form of the Receptor." *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30375-30384

Johns, T.G., et al., "Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene." *Int. J. Cancer*, 2002. 98(3): p. 398-408.

Johns, T.G., Luwor, R.B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A.A., Perera, R.M., Old, L.J., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Scott, A.M. "Anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478." *PNAS* (2003) 100: 15871-15876

Johns, T.G., Mellman I., Cartwright G.A., Ritter G., Old L.J., Burgess A. W. and Scott A.M. "The anti-tumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor." *FASEB J.* (2005) 19(7):780-2.

Jorissen, R. N., Walker, F. W., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling." *Exp. Cell Res.* 284,31-53.2003.

Jungbluth, A.A., Stockert, E., Huang, H-J.S., Collins, VP, Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns T.G., Scott A..M., Gullick W.J., Ritter, G., Cohen L., Cavaness W.K., Old, L.J. A "Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over- Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor." *PNAS* (2003) 100: 639- 644.

Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. "Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 163 cases." *J. Clin. Pathol.*, 52,-574-580, 1999.

Kwok TT, Sutherland RM. "Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors." *Br. J. Cancer* 1991; 64: 251-4.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.

Lee F.T., Mountain A.J., O'Keefe G.J., Sagona J., Rigopoulos A., Smyth F.E., Govindan S.V., Goldenberg D.M., Old L.J. and Scott A.M. "ImmunoPET detection of xenografts expressing de2-7 EGFR using Iodine-124 labelled ch806 via residualising ligand IMPR4." *J. Nucl. Med.* (2006) 47 (5) suppl 1: 429P.

Li D., Ji H., Zaghlul S., McNamara K., Liang M.C., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L.R., Padera R.F., Scott A.M., Jungbluth, A.A., Cavenee W.K., Old L.J., Demetri G.D., Wong KK. "Therapeutic anti-EGFR antibody 806 generates responses in murine de novo EGFR mutant-dependent lung carcinomas." *J. Clin. Invest.* (2007); 117(2): 346-352.

Lindmo, T., et al., "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess." *J. Immunol. Methods*, 1984. 72(1): p. 77-89.

Liu, Z., Panousis, C., Smyth, F.E., Murphy, R., Wirth, V., Cartwright, G., Johns, T.G., and Scott, A.M. "Generation of Anti-Idiotypic Antibodies for Application in Clinical Immunotherapy Laboratory Analyses." *Hybridoma and Hybridomics*, (2003) 22 (4): 219- 228.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "Monoclonal Antibody 806 Inhibits the Growth of Tumor Xenografts Expressing Either the DE2-7 or Amplified Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) but not Wild-Type EGFR." *Cancer Research* (2001) 61: 5355-5361.

Luwor, R.B., Zhu, H-J., Walker, F., Vitali A.A., Perera, R.M., Burgess, A.W., Scott, A.M. and Johns, T.G. "The Tumor Specific de2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) confers Increased survival in BaF/3 Cells Via a PI-3 Kinase Dependent Mechanism." *Oncogene* (2004) 23: 6095-6104

MacDonald, A., Chisholm, G. D., and Habib, F. K. (1990) *Br. J Cancer.* 62,579-584.

Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. "Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res.*, 44 : 1002-1007, 1984.

Mellinghoff, I. K., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13,378-381.

Mendelsohn, J. "Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*" 3:2703-2707,1997.

Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977) *Cancer Res.* 37,4049-4058.

Mineo C, Gill GN, Anderson RG. "Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae." *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 30636-43.

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji X, Suvarna P, Voland JR, Old LJ, H-J. Su Huang, Cavenee WK. "Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic

[0970]

Administration of Monoclonal Antibody (mAb) 806, a Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor.” *Cancer Research* (2001) 61: 5349-5354.

Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. “Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*.” *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40 : 519,1999.

Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. “A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 : 8484-8489, 2000.

Moscattello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. “Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors.” *Cancer Res.*, 55 : 5536-5539,1995.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta crystallographica* 53, 240-255.

Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. “A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis.” *Cancer Res.* 56 : 5079-86,1996.

Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. “Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 : 5724-5729, 1998.

Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. “Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications.” *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1):S17-S21, 2001.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974) *Journal of bacteriology* 119, 736-747.

Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7727-7731, 1994.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, I. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* 20; 110, 775-787.

Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. “Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor.” *Br. J. Cancer* 1996; 73: 1366-72.

Olapade-Olaopa, E. O., Moscattello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. “Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer.” *Br. J. Cancer.* 82 : 186-94, 2000.

Old, L. J. “Immunotherapy for cancer.” *Sci. Am.*, 275 : 102-109,1996.

[0971]

- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." *Academic Press* (New York).
- Padlan EA. "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties." *Mol. Immunol.* 1991 28(4-5):489-98.
- Padlan et al., EP 519596, Merck/NIH
- Palacios, R, Henson, G., Steinmetz, M., and McKeam, J. P. (1984) *Nature*. 309, 126-131.
- Panousis, C., Rayzman, V.M., Johns, T.G., Renner C., Liu Z., Cartwright, G., Lee F-T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F.E., Brechbiel, M.W., Burgess, A.W., Old, L.J. and Scott, A.M. "Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR." *Br. J. Cancer* (2005) 92:1069-1077.
- PCT Patent WO02092771, 2002.
- Perera R.M., Narita Y., Furnari, F.B., Luwor, R.B., Burgess, A.W., Old, L.J., Cavenec, W.K., Scott, A.M. and Johns, T.G. "A novel EGFR antibody that displays synergistic anti-tumor activity when combined with conventional EGFR therapeutics." *Clinical Cancer Research* (2005) 11: 6390-6399.
- Perera R.M., Zoncu R., Johns T.G., Pypaert M., Lee F.T., Mellman I., Old L.J., Toomre D.K., and Scott A.M. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody." *Neoplasia*. (2007); 9(12):1099-110
- Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., et al. "Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852." *J. Clin. Oncol.*, 12 : 730-739, 1994.
- Pietras, R. J., Pegam, M. D-, Finn, R-S., Maneval, D. A., and Slmon, D. J. "Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs." *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.
- Ponten J, Macintyre EH. "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1968 ; 74: 465-86.
- Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. "Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores." *Cancer Res.* 50 : 1243-50,1990.
- Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. "In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent." *Nucl. Med. Biol.* 1997; 24 : 639-47.
- Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-

[0972]

cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts.” *Cancer Res.*, 55 : 4375-4382, 1995.

Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. “Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate.” *Cancer Res.* 57: 1510-5, 1997.

Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. “*In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent.” *Nucl. Med. Biol.* 24 : 639-47, 1997.

Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. “Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate.” *Cancer Res.* 56 : 4970-7, 1996.

Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. “Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects.” *Cancer Res.*, 47: 3692-3696, 1987.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. “Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19 : 183-232, 1995.

Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., : Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D., “Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.

Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. “Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice.” *Cancer Res.* 46 : 4701-5, 1986.

Sato, J. D., Le, A. D., and Kawamoto, T. “Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors.” *Methods Enzymol.* 146 : 63-81, 1987.

Schlessinger, J. (2002) *Cell* 20; 110,669-672.

Scott A.M., Gill S. S., Lee F., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T., Chappell B., Papenfuss A., Old L.J. “A Phase I single dose escalation trial of ch806 in patients with advanced tumors expressing the 806 antigen.” *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 24, No. 18S (June 20 Supplement), (2006): 13028.

Scott A.M., Lee FT., Tebbutt N., Herbertson R., Gill S.S., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T.H., Chappell B., Papenfuss A.T., Poon A.M.T., Hopkins W., Smyth F.E., MacGregor D., Cher L.M., Jungbluth A.A., Ritter, G., Brechbiel M.W., Murphy R., Burgess AW, Hoffman E.W., Johns T.J., Old L.J. “A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2007) 104 (10): 4071-6. Epub 2007 February 28.

[0973]

- Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.
- Seymour L. "Novel anti-cancer agents in development : exciting prospects and new challenges." *Cancer Treat. Rev.* 1999; 25: 301-12.
- Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) *Mol. Cell Bio.* 11,4005-4014.
- Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 1235-1243.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* (Wash. DC). 244 : 707-712,1989.
- Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12) : 60-70,1999.
- Sok, J. c., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. I., Freilino, M. I., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., and Grandis, J. R. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12,5064-5073.
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002) *J. Biol.. Chem.* 277,46265-46272.
- Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. "Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer." *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 111 : 633-43,1994.
- Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 8602-8606, 1990.
- Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. "Epidermal growth factor receptor in enhances tumorigenicity in human breast cancer." *Cancer Res.*, 60 : 3081-3087, 2000.
- Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. "Inhibitory effect of antiepidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer." *Cancer* (Phila.), 77 : 1639-1645, 1996.
- Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) *Nature* 264, 26-31.
- Trail, P. A., and Bianchi, A. B. "Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer." *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.
- Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994)."Internal image anti-idiotypic antibodies related to renal-cell carcinoma-associated antigen G250." *Int. J. Cancer* 56 (4): 609-14.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and. (1984) *Nature.* 309,418-425.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025.

[0974]

- van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994) *J. Immunol. Methods*. 174,311-320.
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials." *Ann. Oncol.*, 8 : 1197-1206,1997.
- Wade, J. D., Hojo, K., Kawasaki, K., Johns, T. G., Catimel, B., Rothacker, J., and Nice, E. C. (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.
- Waksal, H. W. "Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer." *Cancer Metastasis Rev.*, 18 : 427-436, 1999.
- Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R. N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. I., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) *J. Biol. Chem.* 79, 22387-22398.
- Weiner, L. M. "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer." *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12) : 41-50,1999.
- Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., and Boethius, J. "Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma." *Cancer Immunol. Immunother.*, 44 : 157-164,1997.
- Whitson K.B., Red M.L., Whitson S.R., McCoy A., Vitali A.A., Walker F., Johns T.G., Beth A.H. and Staros J.A. "Functional Effects of Selective Glycosylation at Asn-579 of the Epidermal Growth Factor Receptor." *Biochemistry* (2005) 44: 14920-14931
- Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches." *Cancer Metastasis Rev.*, 18 : 451-464, 1999.
- Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., et al. "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas." *Cancer Res.*55 : 3140-3148, 1995.
- Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. "Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII." *Cancer Res.* 57 : 4130-40, 1997.
- Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bier, D. D. "The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target." *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 2965-2969,1992.

[0975]

- Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. "Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors." *Mol. Cell Biol.* 1988; 8:1816-20.
- Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. "A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors." *Jpn. J. Cancer Res.* 1990; 81 : 773-9.
- Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987) *Biochemistry.* 26, 1443-1451.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
- Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z. R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A. E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N. E., Pages, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13(11):4029-44.
- Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. I., Hapel, A. J., Campbell, H. D., and Young, I. G. (1985) *Nature.* 19-25;317,255-258.
- Zhang, x., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) *Cell.* 125, 1137-1149.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, & Yokoyama S (2003) *Mol. Cell.* 12:541-552.
- Ferguson KM (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37, 353-373.
- Mendelsohn J & Baselga J (2006) *Semin. Oncol.* 33, 369-385.
- Herbst RS, Kim ES, & Harari PM (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 719-732.
- Lynch DH & Yang XD (2002) *Semin. Oncol.* 29, 47-50.
- Baselga J & Arteaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23, 2445-2459.
- Burgess AW (2008) *Growth Factors* 26, 263-274.
- Milano G, Spano JP, & Leyland-Jones B (2008) *Br. J. Cancer* 99, 1-5.
- Solomon BM & Jatoi A (2008) *Curr. Oncol. Rep.* 10, 304-308.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, & Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7727-7731.
- Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, & Bigner DD (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.
- Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) *Int. J. Cancer.* 98, 398-408.
- Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 639-644.

[0976]

- Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunderson TH, Chappell B, et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4071-4076.
- Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15871-15876.
- Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, Ahlqvist M, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, et al. (2005) *Clin. Cancer. Res.* 11, 6390-6399.
- Johns TG, Adams TE, Cochran JR, Hall NE, Hoyne PA, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, Walker F, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384.
- Walker F, Orchard SG, Jorissen RN, Hall NE, Zhang HH, Hoyne PA, Adams TE, Johns TG, Ward C, Garrett TP, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22387-22398.
- Sivasubramanian A, Chao G, Pressler HM, Wittrup KD, & Gray JJ (2006) *Structure* 14, 401-414.
- Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, & Scott AM (2001) *Cancer Res.* 61, 5355-5361.
- Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, & Dodd JG (1993) *Mol. Cell Biochem.* 126, 151-158.
- Sizeland AM & Burgess AW (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4005-4014.
- Chao G, Cochran JR, & Wittrup KD (2004) *J. Mol Biol.* 342, 539-550.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. (2002) *Cell* 110, 763-773.
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, & Ferguson KM (2005) *Cancer Cell.* 7, 301-311.
- Hogg PJ (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 210-214.
- Li S, Kussie P, & Ferguson KM (2008) *Structure* 16, 216-227.
- Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knochel T, & Ferguson KM (2008) *Cancer Cell* 13, 365-373.
- Sandler AB (2006) *Oncology* (Williston Park) 20, 35-40.
- Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, Hale LP, Small C, Dranoff G, Friedman AH, et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7503-7508.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, & Schlessinger J (1984) *Nature.* 309, 418-425.
- Walker F, Hibbs ML, Zhang HH, Gonez LJ, & Burgess AW (1998) *Growth Factors* 16, 53-67.
- Wade JD, Hojo K, Kawasaki K, Johns TG, Catimel B, Rothacker J, & Nice EC (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.

[0977]

- Vagin AA & Isupov MN (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1451-1456.
- Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, & Lemmon MA (2003) *Mol. Cell* 11, 507-517.
- Rettig WJ, Old LJ (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:481-511.
- Van den Eynde BJ, Scott AM (1998) in *Encyclopedia of Immunology*, eds Roitt DPJ, Roitt IM (Academic Press: London), pp 2424-2431.
- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. (1997) *Blood* 90(6):2188-2195.
- Baselga J, Arteaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23:2445-2449.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997) *Ann. Oncol.* 8(12): 1197-206.
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, et al. (1996) *J. Clin. Oncol.* 14:737-744.
- Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, Sakamoto J, Cohen A, Sigurdson ER, Kemeny N, et al. (1990) *J. Clin. Oncol.* 8(11):1894-906.
- Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon J, Hannah A, U P, Rigopolous A, Sturrock S, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817.
- Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Oosterhof GO, Witjes JA, Koenders EB, Oyen WJ, Buijs WC, Debruyne FM, Corstens FH, et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1529-1537.
- Scott AM, Geleick D, Rubira M, Clarke K, Nice EC, Smyth FE, Stockert E, Richards EC, Carr FJ, Harris WJ, et al. (2000) *Cancer Res* 60:3254-3261.
- Scott AM, Lee F-T, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, et al. (2001) *J. Clin. Oncol.* 19(19):3976-3987.
- Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ (1994) *J. Clin. Oncol.* 12:1193-1203.
- Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1639-47.
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87(21):8602-8606.
- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6899-6903.

[0978]

- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16):7727-7731.
- Hills D, Rowlinson-Busza D, Gullick WJ (1995) *Int. J. Cancer* 63(4):537-543.
- Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA (2003) *Lancet Oncol.* 4(7):397-406.
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) *Clin. Cancer Res.* 1(11):1311-1318.
- Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(11):4207-4211.
- Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtneess B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K, et al. (2000) *J. Clin. Oncol.* 18(4):904-914.
- Graeven U, Kremer B, Sudhoff T, Kiling B, Rojo F, Weber D, Tillner J, Unal C, Schmiegell W (2006) *Br. J. Cancer* 94(9):1293-1299.
- Ramos TC, Figueredo J, Catala M, Gonzales S, Selva JC, Cruz TM, Toldeo C, Silva S, Pestano Y, Ramos M, et al. (2006) *Cancer Biol. Ther.* 5(4):375-379.
- Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) *Int. J. Cancer* 98(3):398-408.
- Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TG, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(2): 639-644.
- Johns TG, Adams TE, Wittrup KD, Hall NE, Hoyne PA, Cochrane JR, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384.
- Johns TG, Mellman I, Cartwright GA, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2005) *FASEB J.* 19(7):780-782.
- Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2001) *Cancer Res.* 61(14): p. 5355-5361.
- Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(26):15871-15876.
- Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvana P, Volland JR, Old LJ, et al. (2001) *Cancer Res.* 61(14):5349-5354.
- Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Tavernasi ML, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, Old LJ, Cavenee WK, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(17):6390-6399.
- Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee F-T, Wang D, Kypridis A, Smyth FE, et al. (2005) *Br. J. Cancer.* 92(6):1069-1077.
- Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM, et al. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* 83(2):97-104.
- Baselga J (2001) *Eur. J. Cancer* 37 Suppl 4:S16-22.
- Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A (2006) *Clin. Colorectal Cancer* 6(1):29-31.
- Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:3003-3015.
- Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, Doroshow JH, Polpin EA, Goodin S, Mauro D, Rubin EH (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(21): 6517-6522.
- Lacouture AE (2006) *Nature Rev. Cancer.* 6:803-812.
- Adams GP, Weiner LM (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(9): 1147-1157.
- Liu Z, Panousis C, Smyth FE, Murphy R, Wirth V, Cartwright G, Johns TG, Scott AM (2003) *Hybrid Hybridomics* 22(4):219-28.
- Stabin MG, Sparks RB, Crowe E (2005) *J. Nucl. Med.* 46(6):1023-1027.
- Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, Richards EC, Old LJ, Welt S (2001) *Cancer Res.* 61(18):685-6859.

본 발명은 본 발명의 취지 또는 본질적인 특성에서 벗어나지 않고서 다른 형태로 구현되거나 다른 방식으로 수행될 수 있다. 따라서, 본원은 모든 관점에서 예시적이며 제한적이지 않은 것으로 간주되어야 하고, 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 제시되며, 동등한 의미와 범위에 속하는 모든 변화는 본 발명에 포함되는 것으로

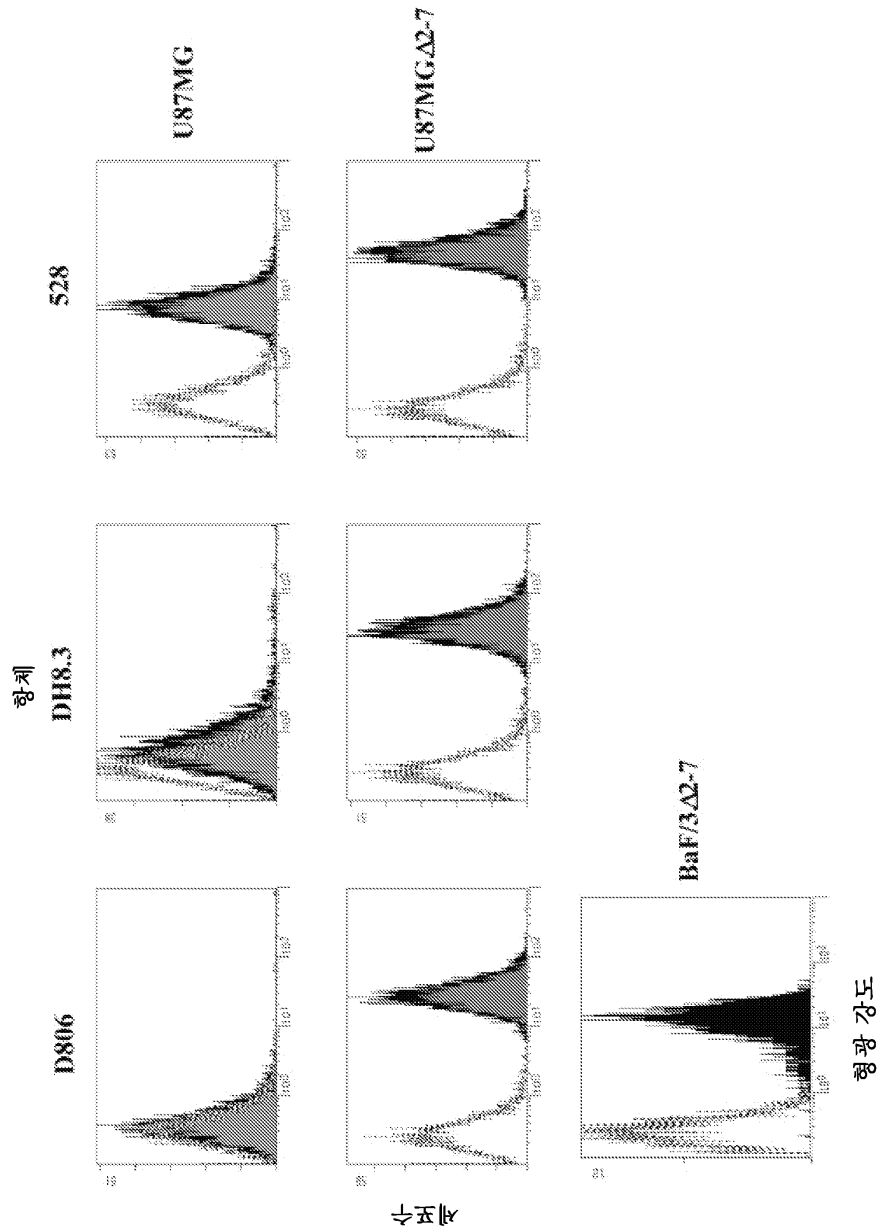
간주한다.

[0982]

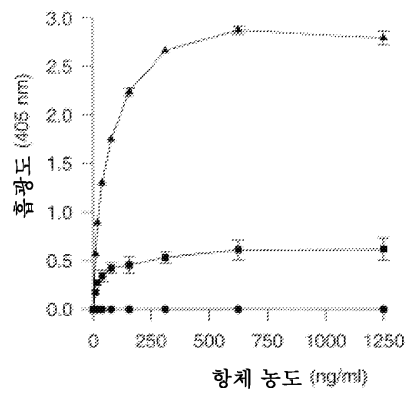
본 명세서를 통해 다양한 참고문헌이 인용되었고, 상기 참고문헌 목록에 제시되었으며, 이들은 각각 전문이 본원에 참고인용된다.

도면

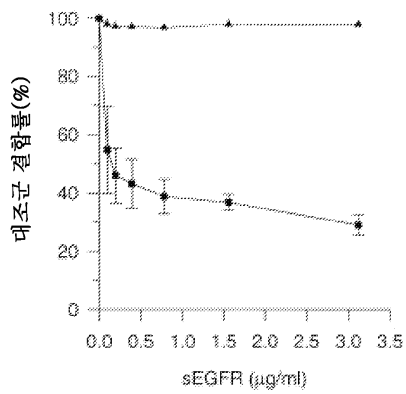
도면1



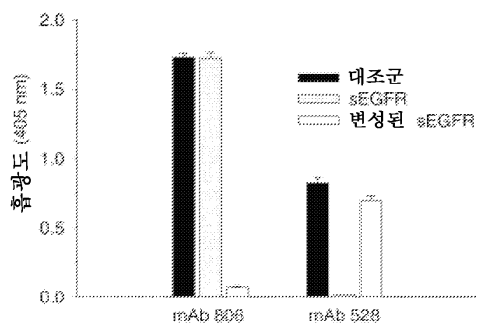
도면2a



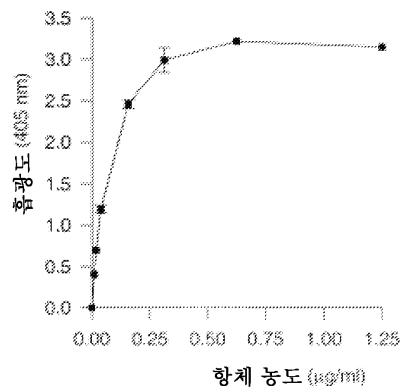
도면2b



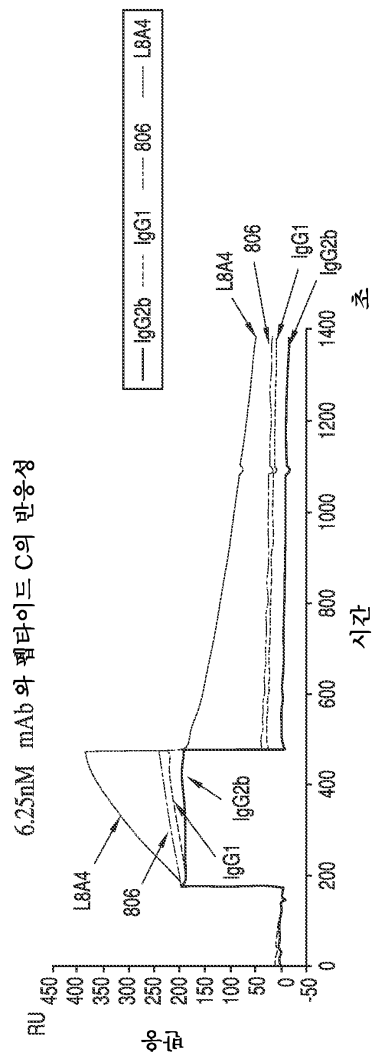
도면2c



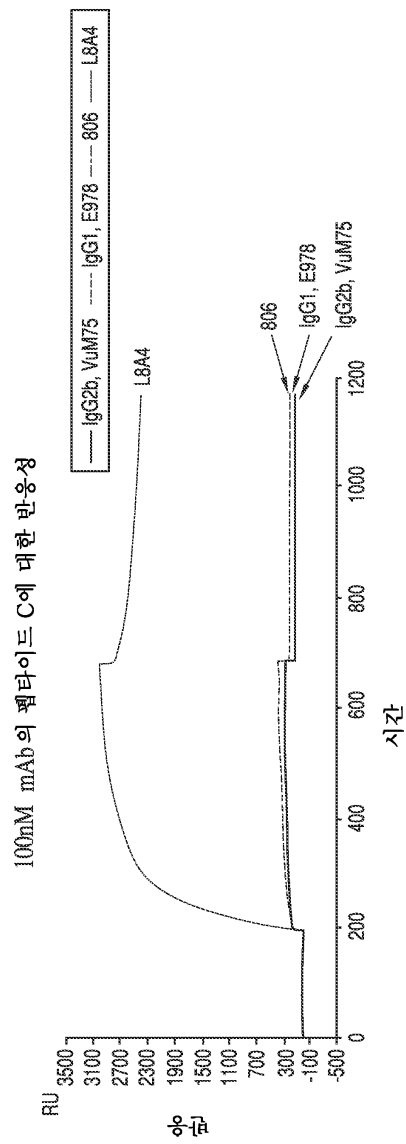
도면2d



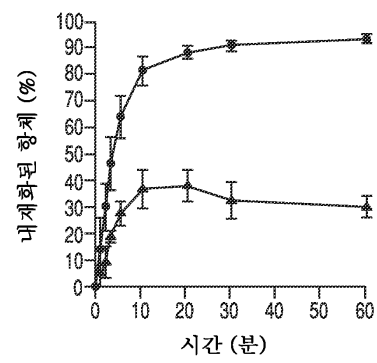
도면2e



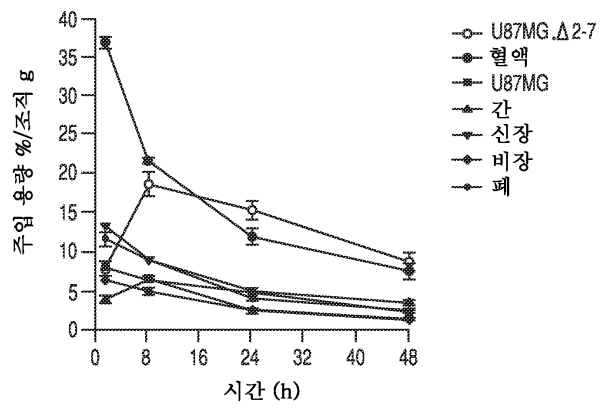
도면2f



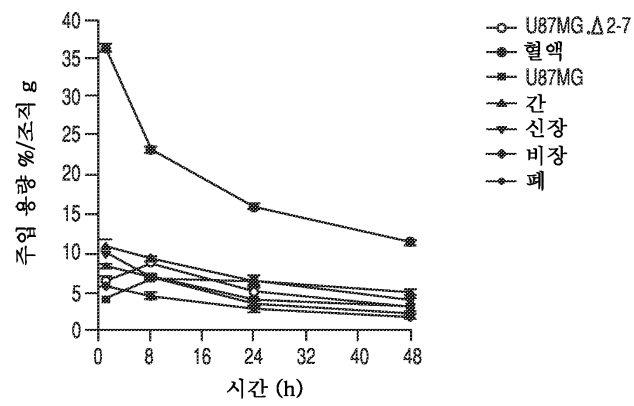
도면3



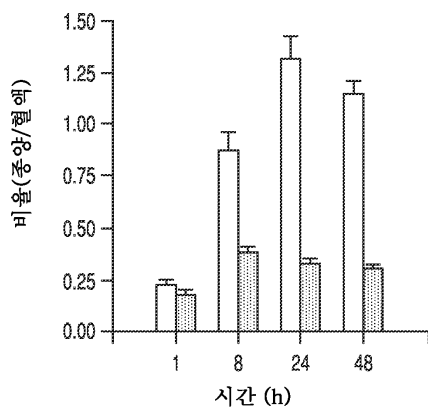
도면4a



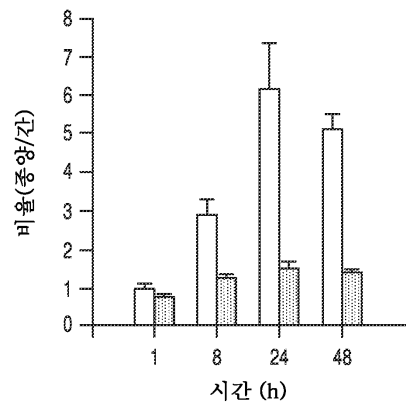
도면4b



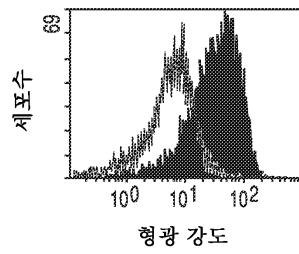
도면5a



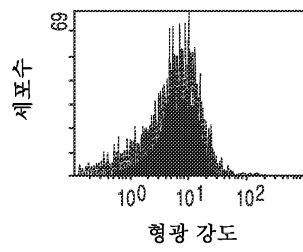
도면5b



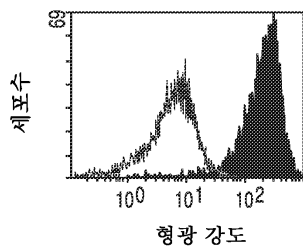
도면6a



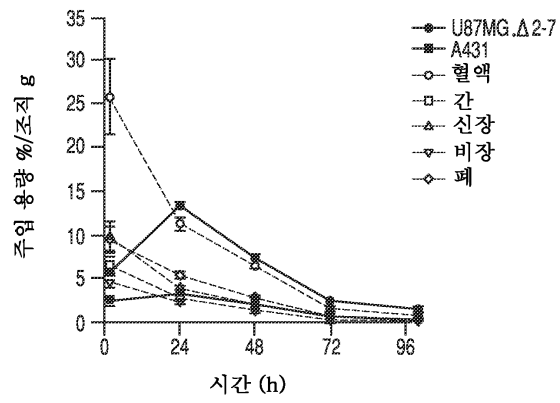
도면6b



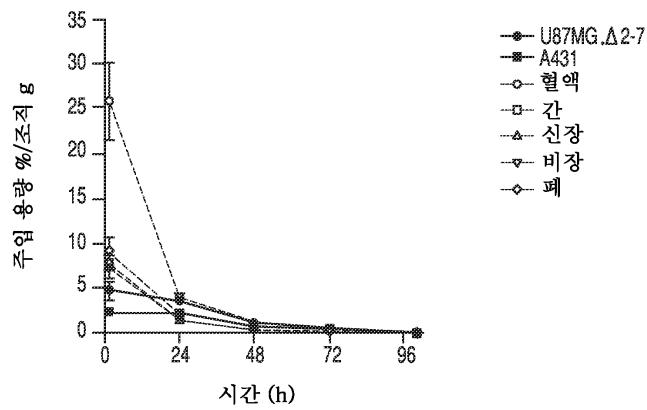
도면6c



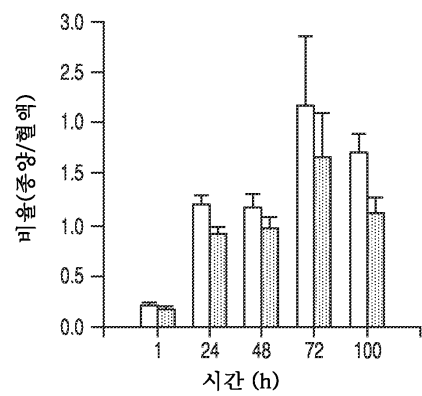
도면7a



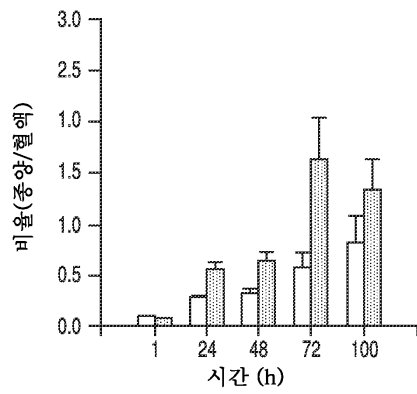
도면7b



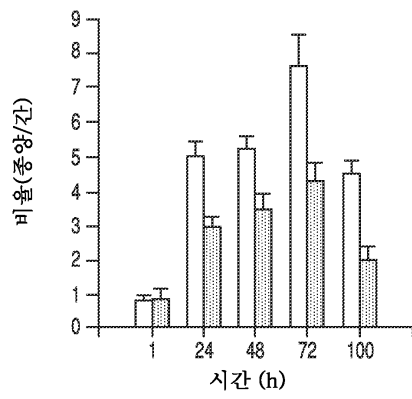
도면8a



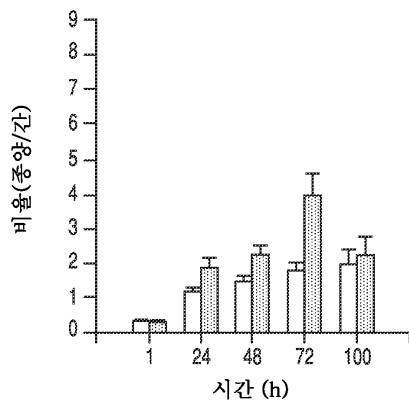
도면8b



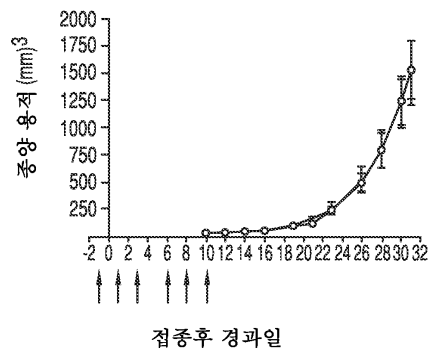
도면8c



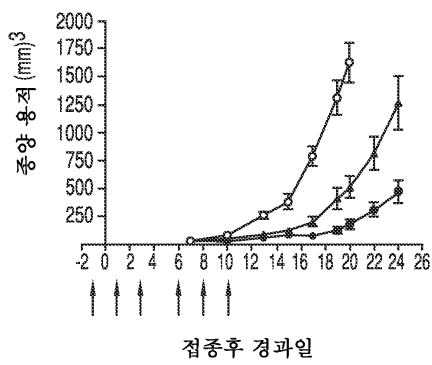
도면8d



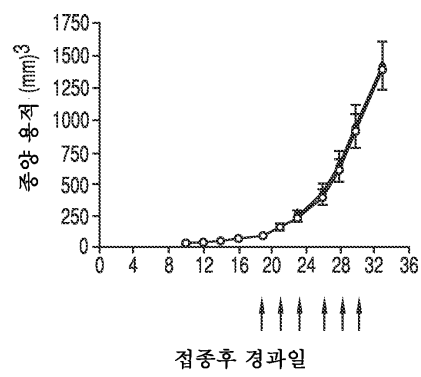
도면9a



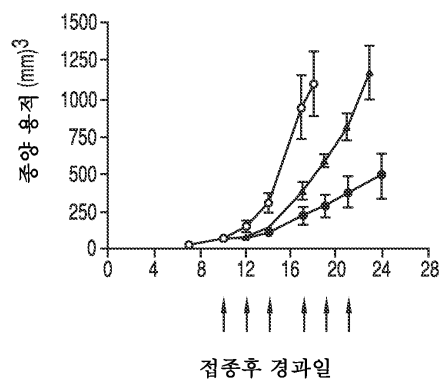
도면9b



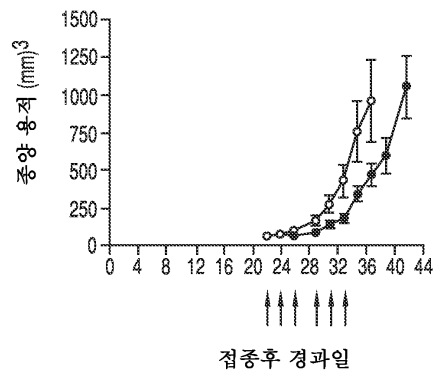
도면10a



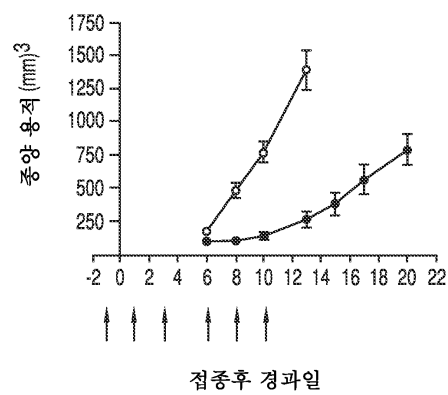
도면10b



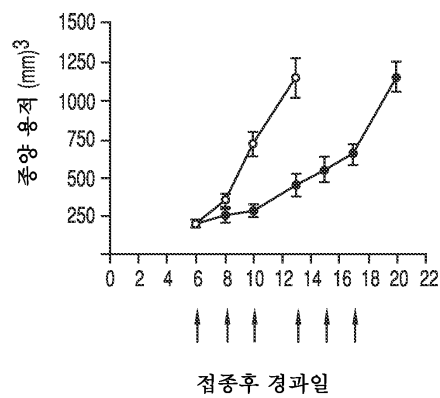
도면10c



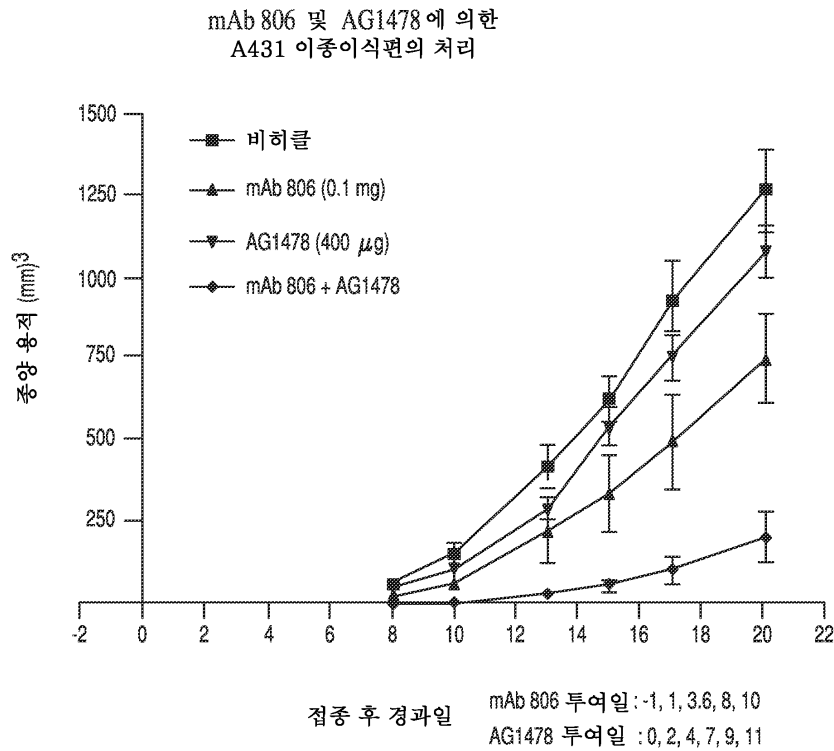
도면11a



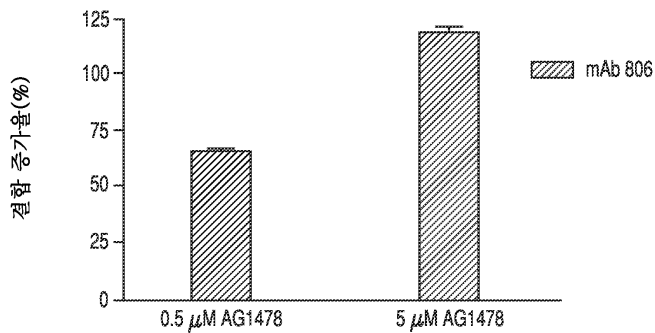
도면11b



도면12



도면13



도면14a

mAb806 VH 쇠(시그널 펩타이드 포함): 핵산 및 아미노산 서열

핵산

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCCTGGTGTCTGTCTGATG
TGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCA
CCTGCACTGTCAGTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAAGTGGATCCGGC
AGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACT
AGGTACAACCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAAC
CAATTCTTCTGCTGAGTTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGT
GTAACGGCGGGACGCGGGTTTCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
GCA (서열번호 1)

도면14b

mAb806 VH 채(시그널 펩타이드 포함) : 핵산 및 아미노산 서열

아미노산

MRVLILLWLFTAFPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWRQFP

시그널 펩타이드

GNKLEWMGYISYSGNTRYNP SLKSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG

FPYWGQGLVTVSA (서열번호 2)

도면15a

mAb806 VL 채(시그널 펩타이드 포함) : 핵산 및 아미노산 서열

핵산 서열

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCAATCTTGTTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAGAT
GTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAG
TCAGCATCATTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGC
AGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTGGACGAT
GAAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATC
AGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTT
CCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT (서열번호 3)

도면15b

mAb806 VL 채(시그널 펩타이드 포함) : 핵산 및 아미노산 서열

아미노산 서열

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSI TCHSSQDINSNIGWLQGRP

시그널 펩타이드

GKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSESEDFADYYCVQYAQFPWTFGG

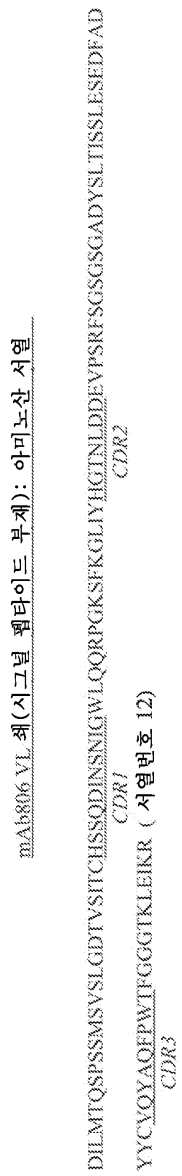
GTKLEIKR (서열번호 4)

도면16

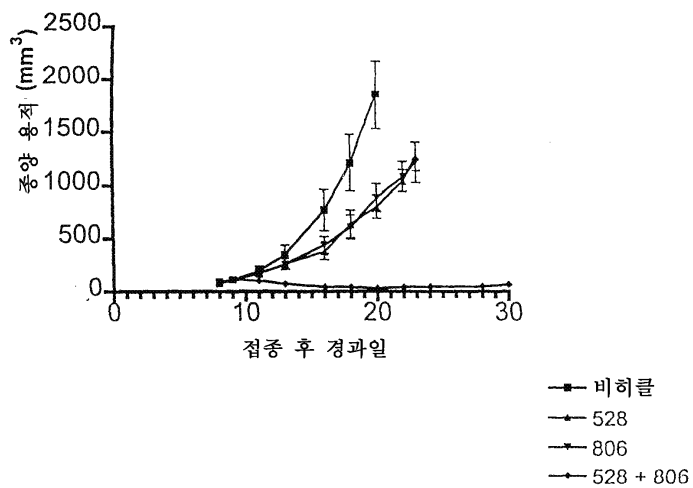
mAb806 HL 세포(시그널 펩타이드 부재) : 아피노산 서열

DVQLQESGSPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQPGNKLEWAMGYISYGNTRYNPSPSKSRISITRTDTSKNQFFLQLN
CDR1
 SVTIEDTATYYCYTAGRGEPYWGQGTLLVYSA (서열번호 11)
CDR3

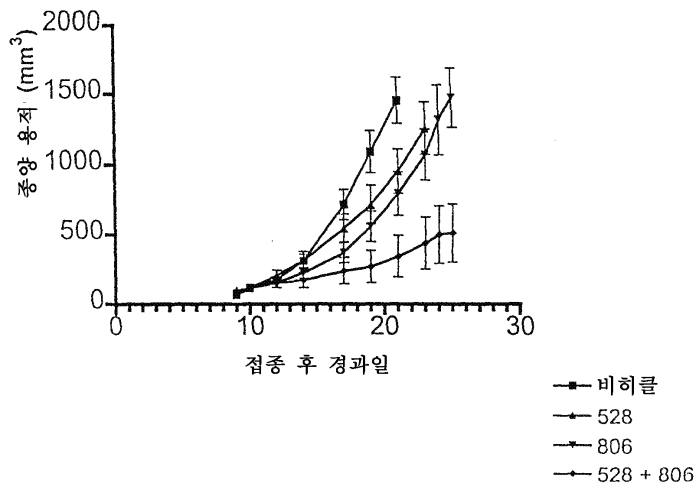
도면17



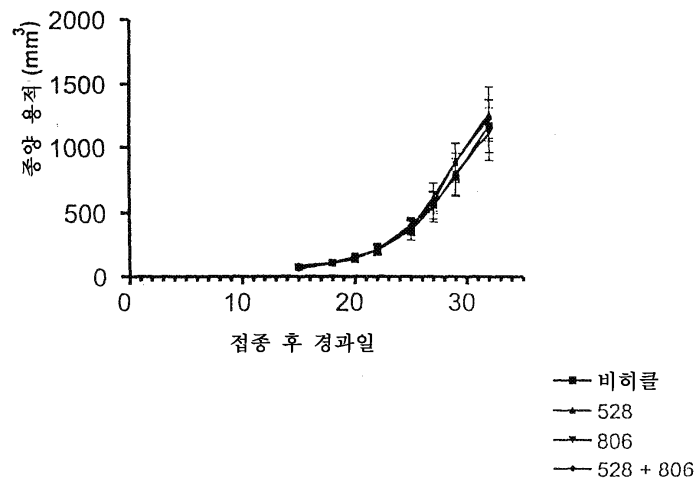
도면18a



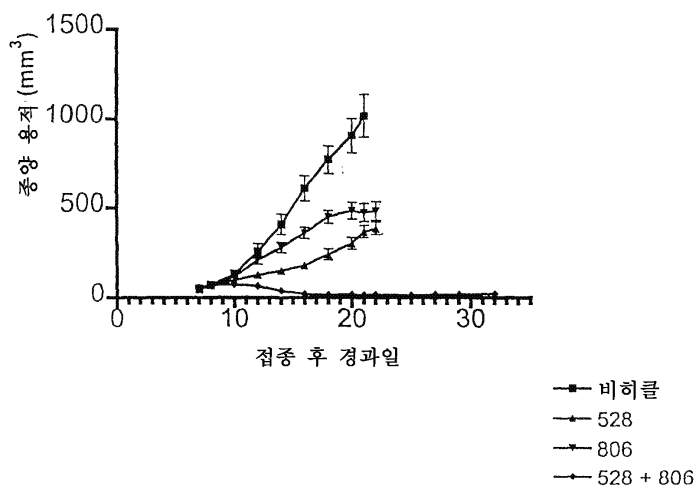
도면18b



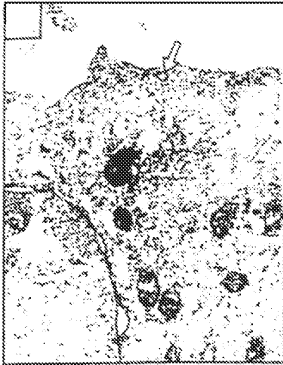
도면18c



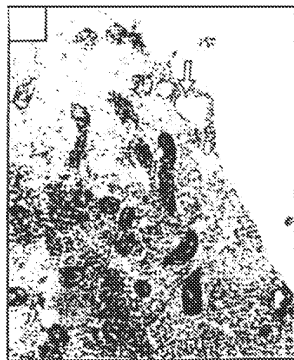
도면18d



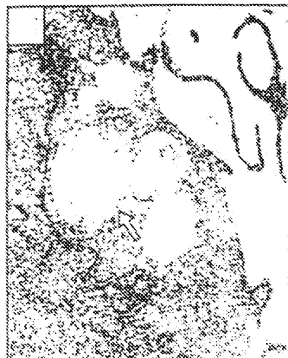
도면19a



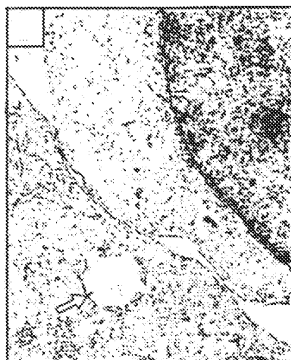
도면19b



도면19c



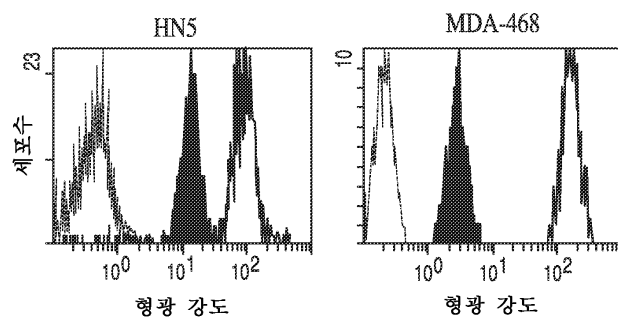
도면19d



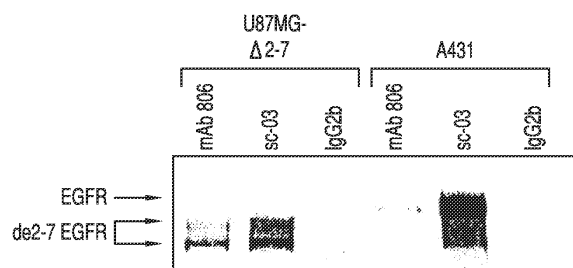
도면20



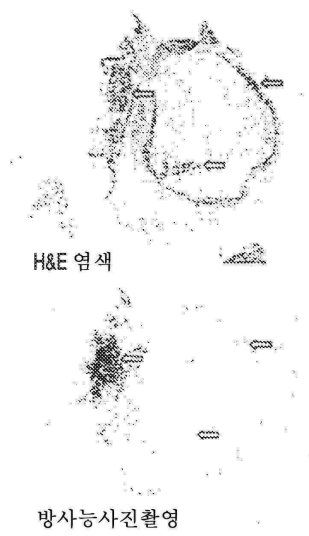
도면21



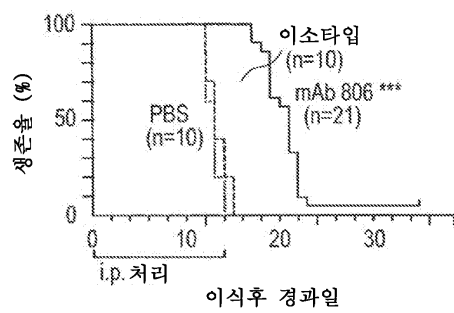
도면22



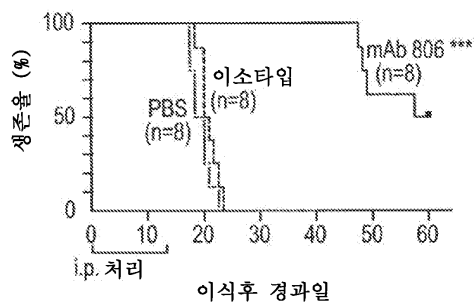
도면23



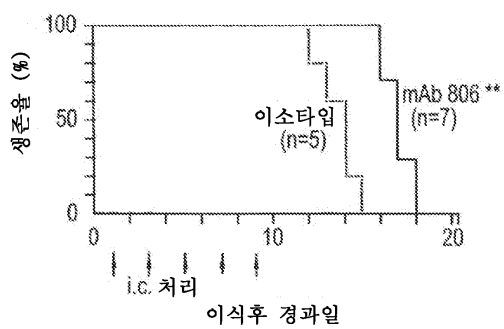
도면24a



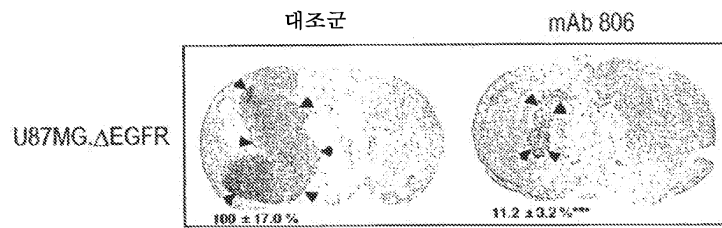
도면24b



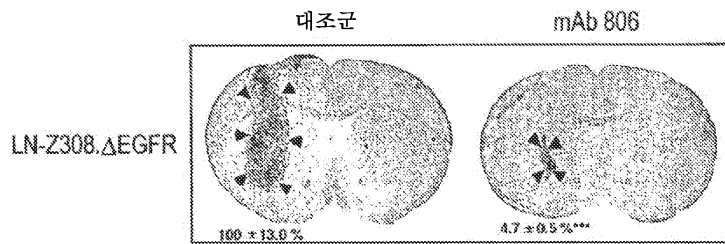
도면24e



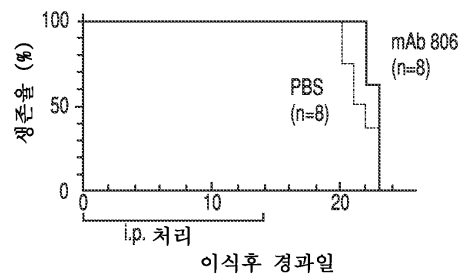
도면24c



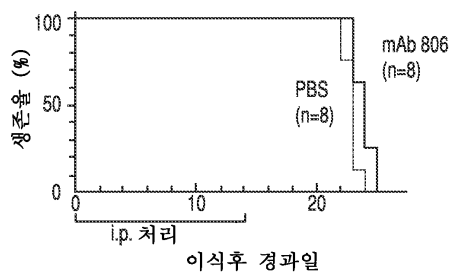
도면24d



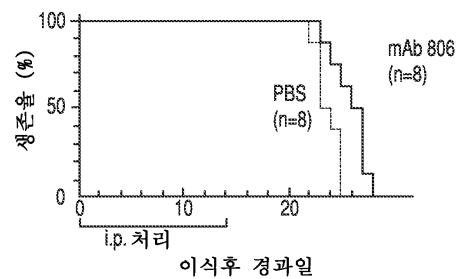
도면25a



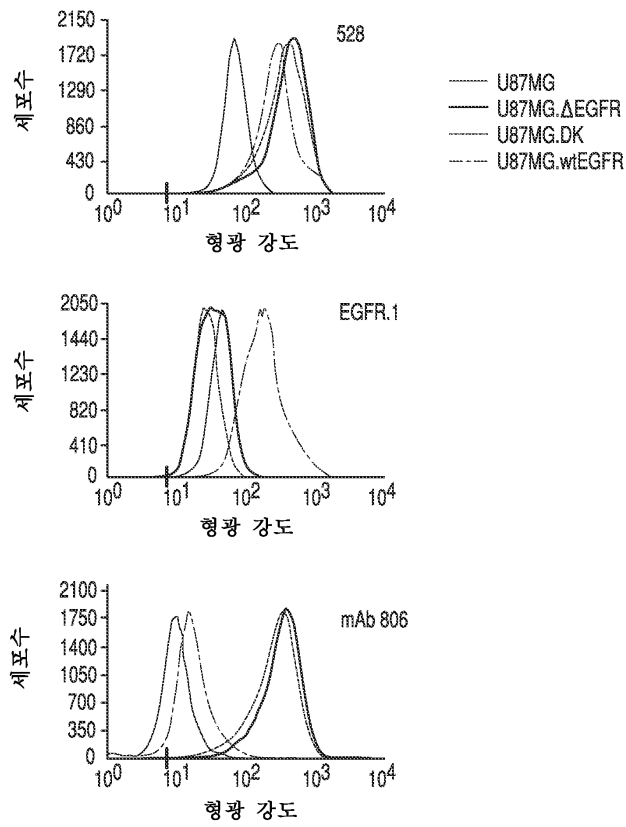
도면25b



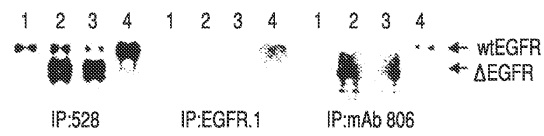
도면25c



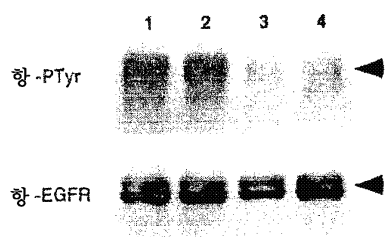
도면26a



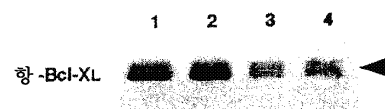
도면26b



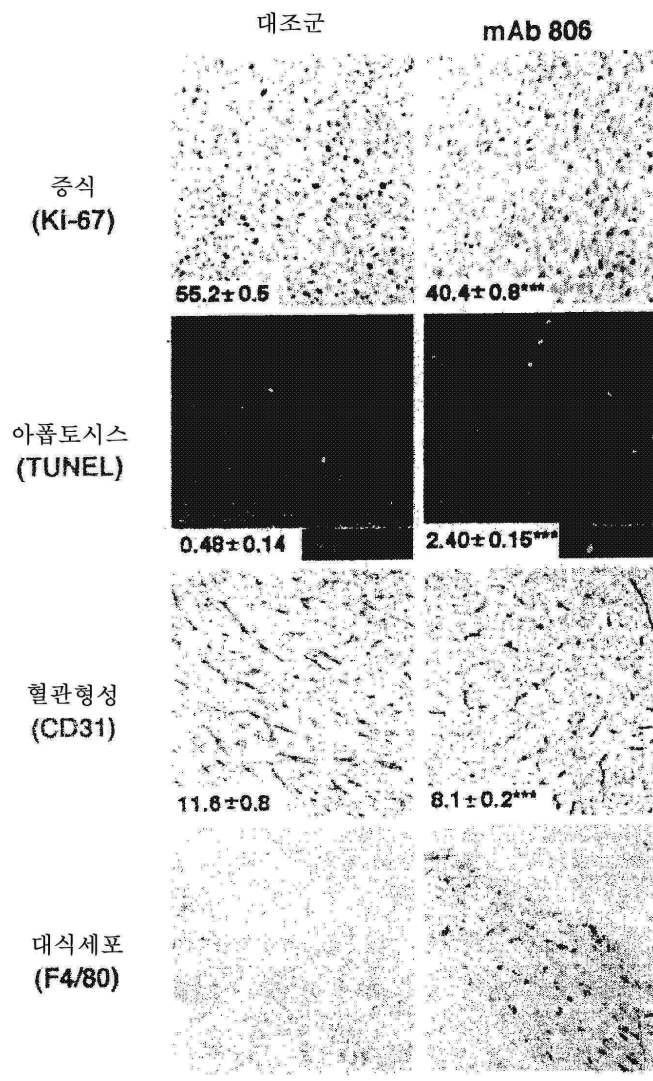
도면27a



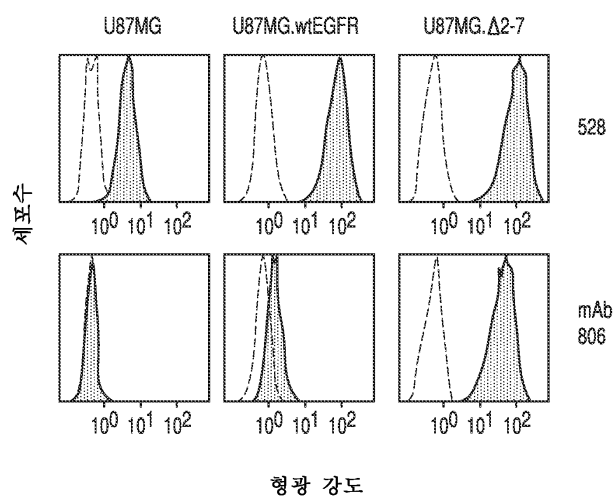
도면27b



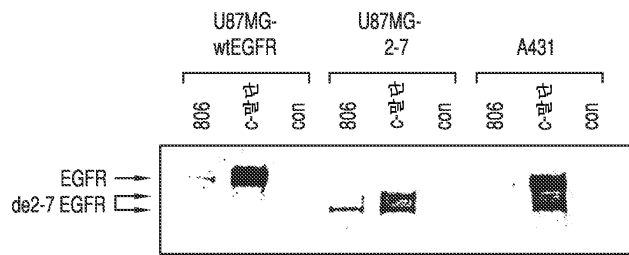
도면28



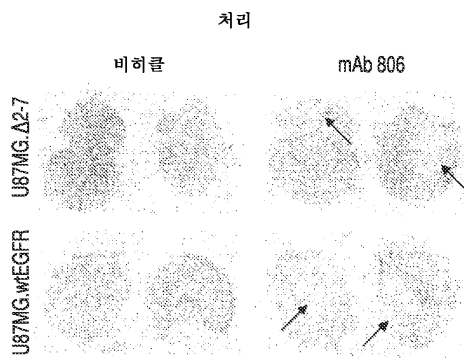
도면29



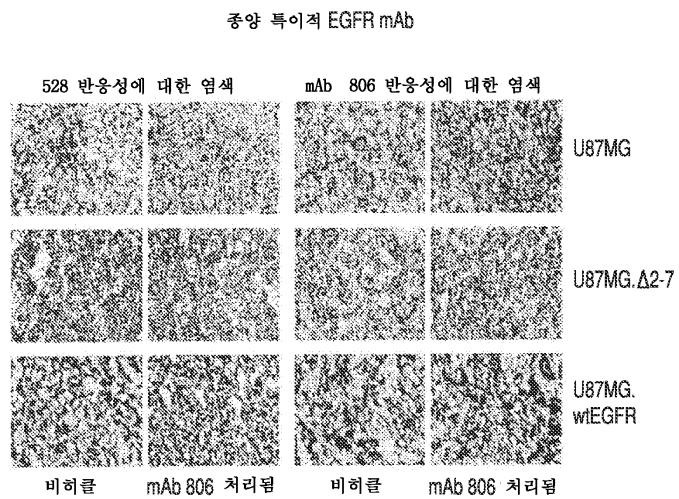
도면30



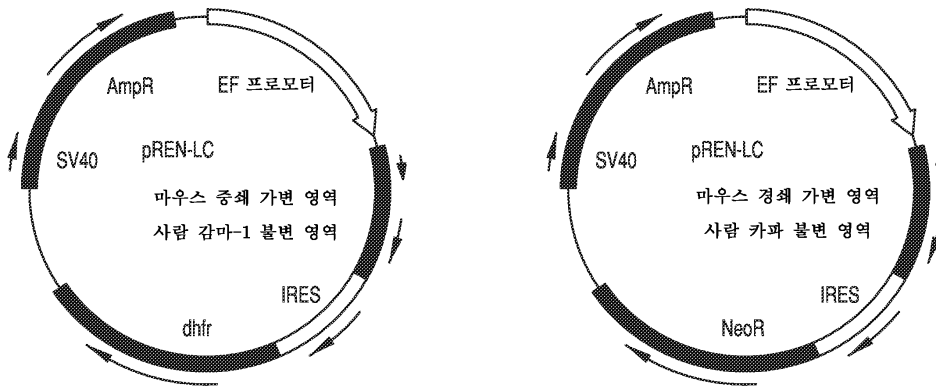
도면31



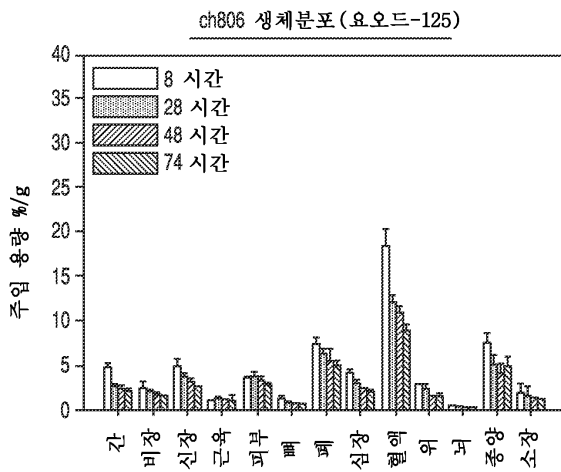
도면32



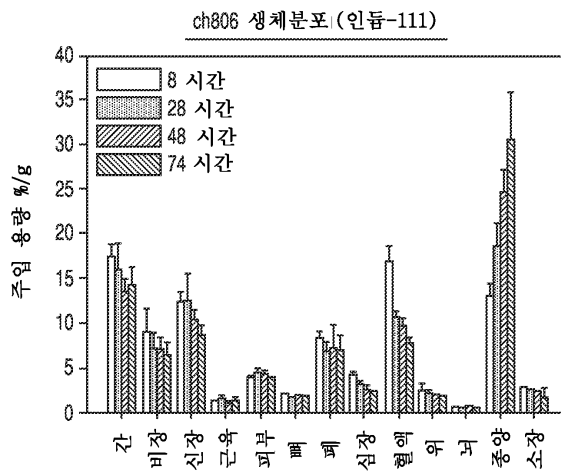
도면33



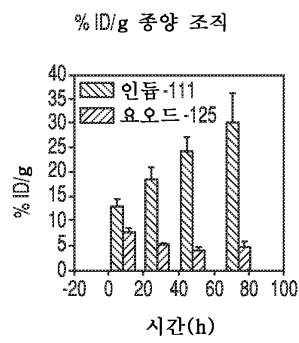
도면34a



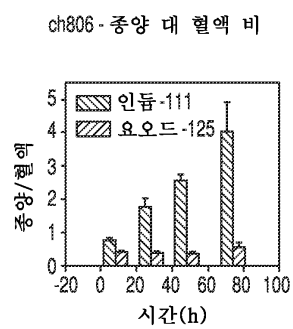
도면34b



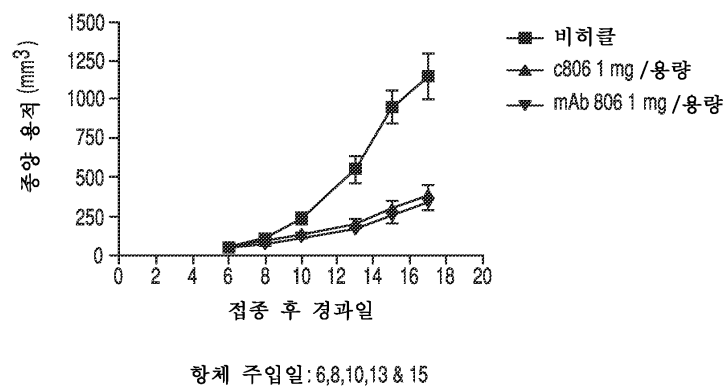
도면35a



도면35b

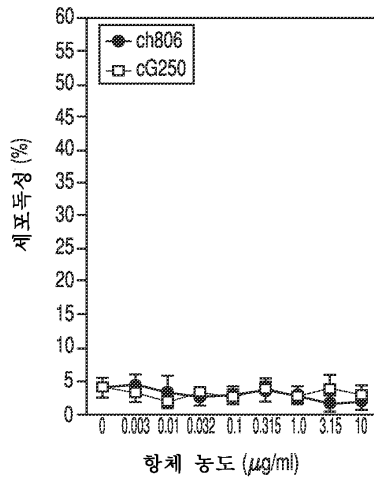


도면36

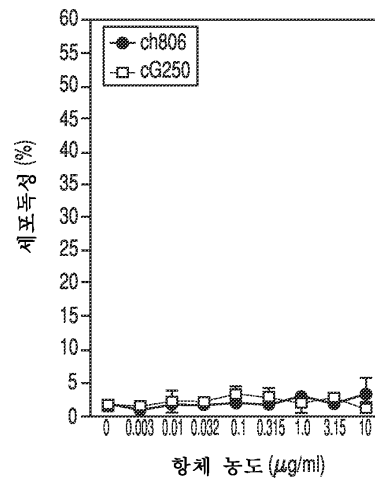


도면37

표적 U87MG.de2-7 세포에 대한 ch806 CDC 활성



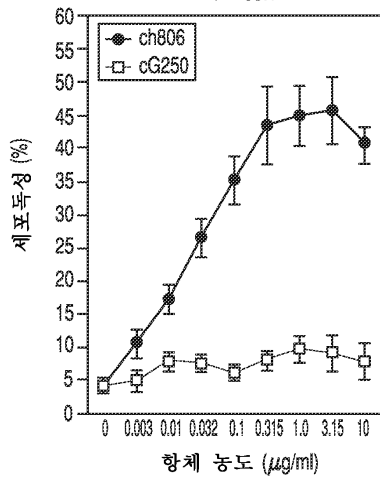
표적 A431 세포에 대한 ch806 CDC 활성



도면38

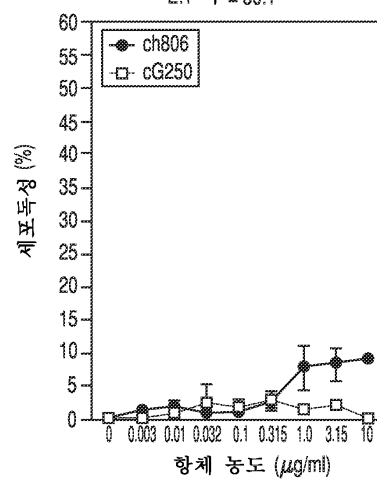
표적 U87MG.de2-7 세포에 대한 ch806 매개의 ADCC

E:T 비 = 50:1



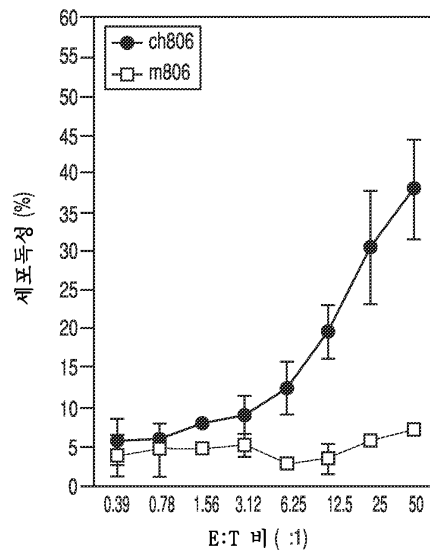
표적 A431 세포에 대한 ch806 매개의 ADCC

E:T 비 = 50:1

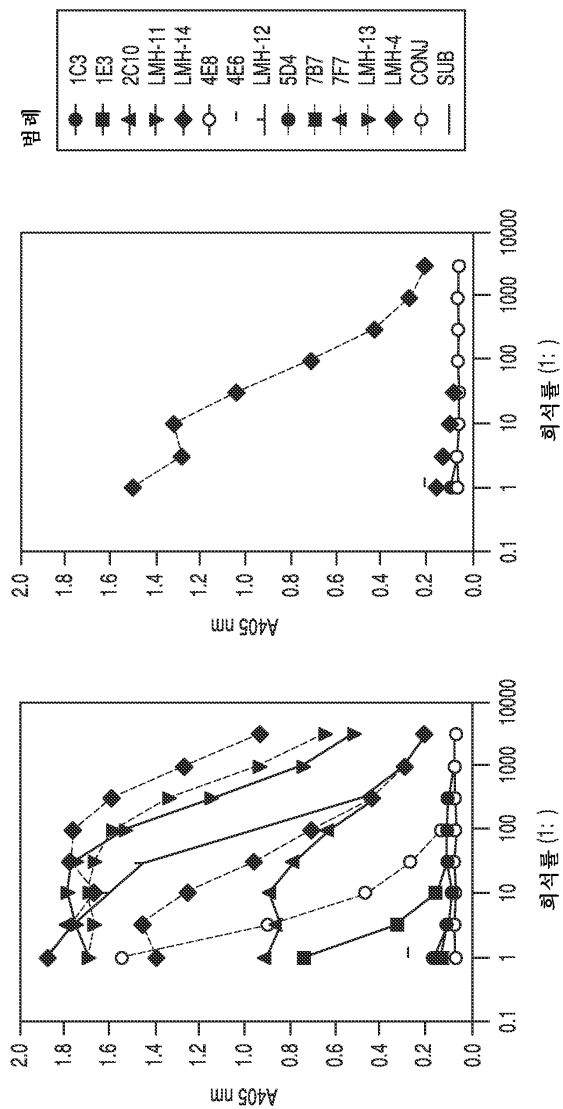


도면39

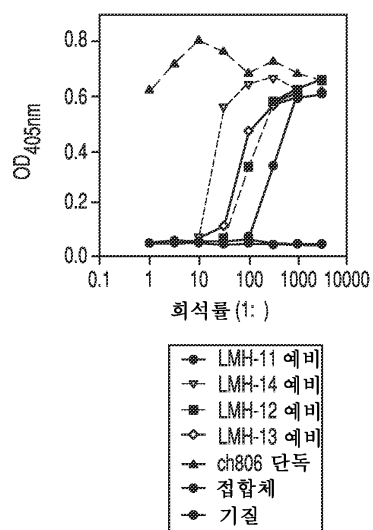
여러 E:T 비 하에 U87MG.de2.7 세포에 대한
1 μ g/ml ch806 매개의 ADCC



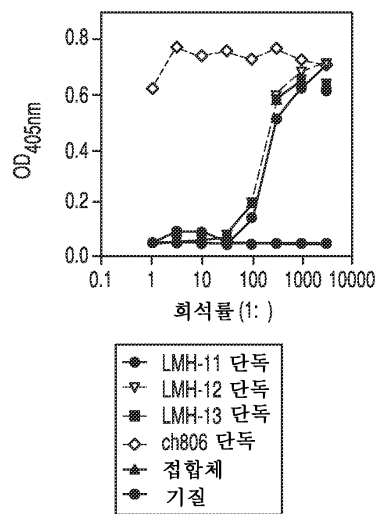
도면40



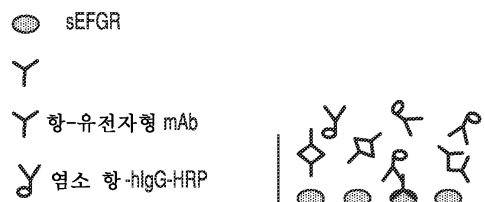
도면41a



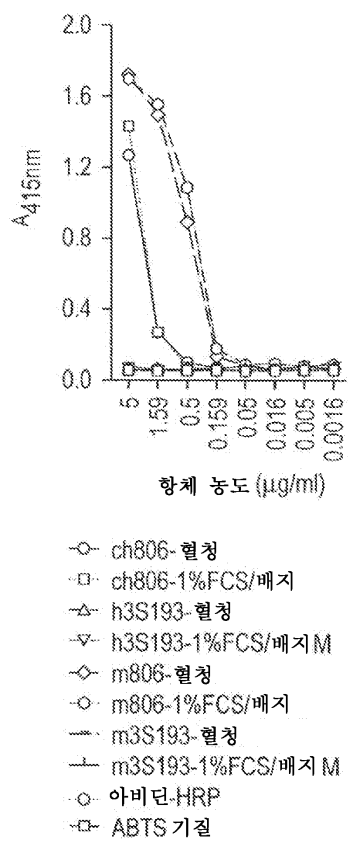
도면41b



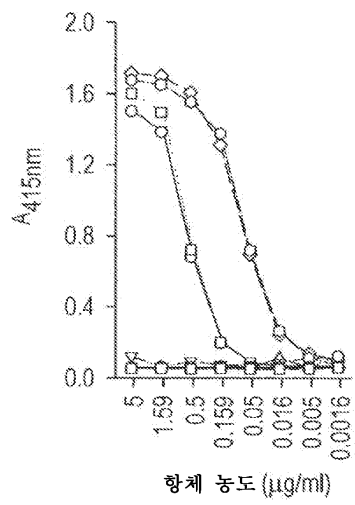
도면41c



도면42a

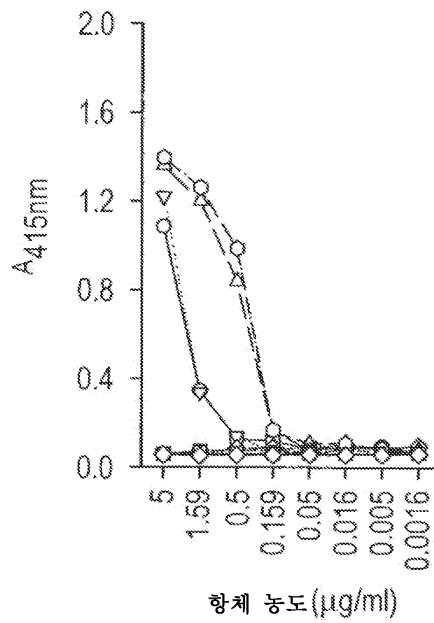


도면42b



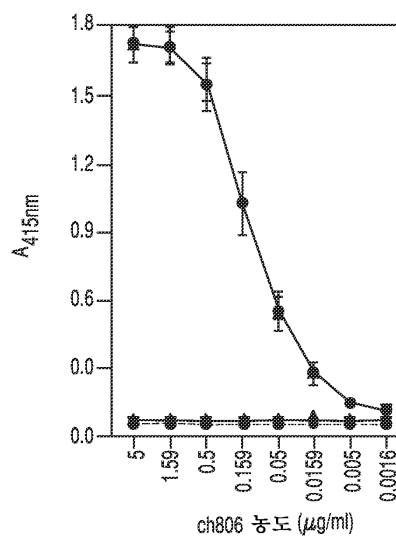
- ch806-혈청
- ch806-1%FCS/매지
- △ h3S193-혈청
- ▽ h3S193-1%FCS/매지 M
- ◇ m806-혈청
- m806-1%FCS/매지
- m3S193-혈청
- └ m3S193-1%FCS/매지 M
- 아비딘-HRP
- ABTS 기질

도면42c

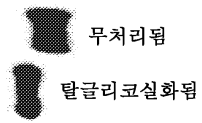


- ch806-혈청
- ch806-1%FCS/배지
- △ h3S193-혈청
- ▽ h3S193-1%FCS/배지 M
- ◇ m806-혈청
- ◇ m806-1%FCS/배지
- m3S193-혈청
- m3S193-1%FCS/배지 M
- 아비딘-HRP
- ABTS 기질

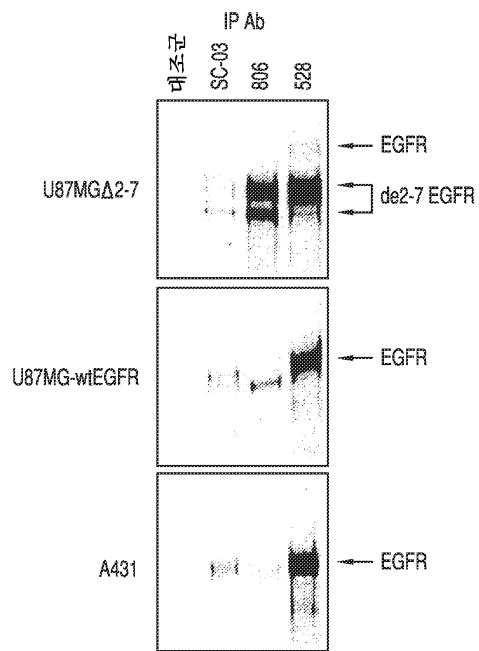
도면43



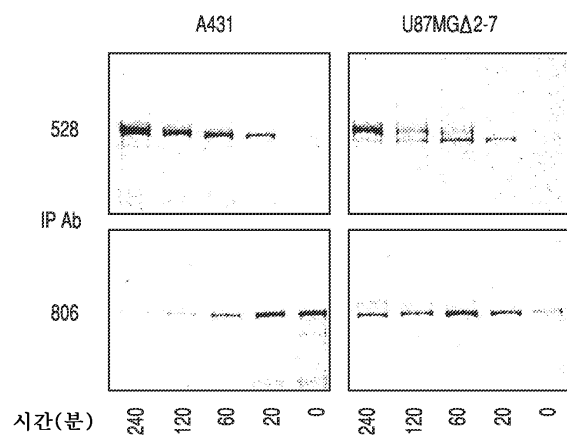
도면44



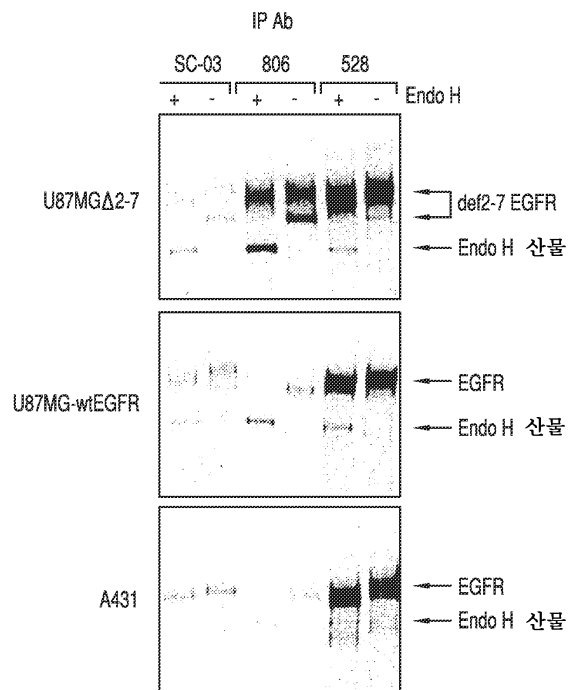
도면45



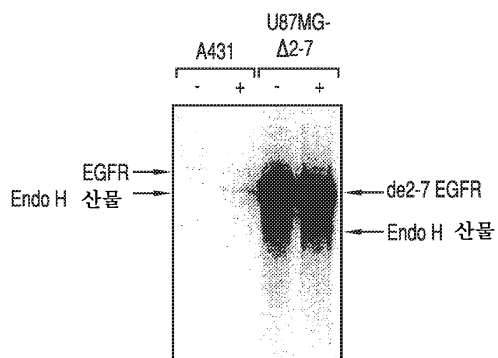
도면46



도면47



도면48



도면49a

서열번호 7

pREN ch806 LC Neo 벡터

Xho I

1 CTCTGAGAGCGGGGCAGTGTAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC

51 ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT
EcoRI EF1α 프로모터

101 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCGTGAGGCTCCGGT

151 GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG

201 GGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTTAA

251 ACTGGGAAAGTGATGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCCAGGGTGGG

301 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAA

351 CGGGTTTGCGCCGAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGC

401 CTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACG

451 CCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTG

501 GGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCT

551 TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCGCCGCGTGCGAATCTGGTG

601 GCACCTTCGCGCCTGTCTCGTGCTTTGCGATAAGTCTCTAGCCATTAA

651 ATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA

701 AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTGGGGCGCGGG

751 CGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTGGCGAGGCGGGGCC

801 TGCAGCGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG

851 CCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGATCGCCCCGCCCTGGGC

901 GGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC

951 TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA

1001 GAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC

도면49b

```

1051 AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACC
1101 TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAG
1151 GGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGT
1201 TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGT
1251 AGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT
      MluI      HindIII      PmeI
1301 TTTCTTCCATTTACAGGTGTACGCGTCTCGGGAAGCTTTAGTTTAAACGCC
1351 GCCACCATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCACTTCTTGTTGCTTTGGTTT
      M V S T A Q F L A F L L L W F
1401 CCAGGTGCAAGATGTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCT
      P G A R C D I L M T Q S P S S M S
1451 GTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATT
      V S L G D I V S I T C H S S Q D I
1501 AACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGC
      N S N I G W L Q Q R P G K S F K G
1551 CTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCAGT
      L I Y H G I N L D D E V P S R F S
1601 GGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCT
      G S G S G A D Y S L T I S S L E S
1651 GAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGCATGCTCAGTTTCCGTGGACG
      E D F A D Y Y C V Q H A Q F P W T
      BamHI
1701 TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGTGAGTGGATCCATCTGGG
      F G G G T K L E I K R
1751 ATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATGCGCAA
1801 CAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAACACCATCCTGTTTGCTTCTT
1851 TCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCA
      T V A A P
1876 TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
      S V F I F P P S D E Q L K S G T A
1926 CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC

```

도면49c

S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

1976 AGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTG
W K V D N A L Q S G N S Q E S V

2026 ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC
T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

2076 GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T

2126 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
H Q G L S S P V T K S F N R G E
Nhe/Xba

2176 TGTGAGCTAGAATACTAACTAAGCTAGCAACGGTTTCCCTCTAGCGG
C *

2226 GATCAATTCCGCCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAA

2276 TAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTC

2326 TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCA

2376 TTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAAT

2426 GTCGTGAAGGAAGCAGTTCCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTC

2476 TGTAGCGACCCCTTTGACAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCC

2526 TCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAA

2576 CCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGAAAGAGTCAAATGGCT

2626 CTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC

2676 ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACGTGTGTT

2751 TAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTT

2801 TTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTTGAACAAGATGGATTGCACG

2851 CAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA

2901 CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCA

2951 GGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG

도면49d

3001 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTT
 3051 CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACCTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
 3101 GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTC
 3151 CTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
 3201 CTTGATCCGGCTACCTGCCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA
 3251 GCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG
 3301 ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAG
 3351 GCGCGCATGCCCCAGCGGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTG
 3401 CTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACT
 3451 GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
 3501 CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGT
 3551 GCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC
 3601 TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGATCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 3651 CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGG
 3701 GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
 3751 CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTT
 3801 TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTA
 3851 AATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
 3901 CCCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCT
 3951 GATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
 4001 GACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTTA
 4051 TAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
 4101 ACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGT
 4151 GGCACPTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATATTTGTTATTTTTC

도면49e

4201 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAT
 4251 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG
 4301 TCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTACTGTTTTTGCTCAC
 4351 CCAGAAACCGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
 4401 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
 4451 TTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTA
 4501 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTG
 4551 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG
 4601 AAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
 4651 ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
 4701 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAA
 4751 CTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
 4801 GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCT
 4851 ATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
 4901 GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG
 4951 GCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
 5001 CGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 5051 TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
 5101 ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCA
 5151 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTA
 5201 AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT
 5251 TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAA
 5301 AGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCACGTAATCTGCTGCTTGCAAA

도면49f

5351 CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTAC
 5401 CAACTCTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAT
 5451 ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
 5501 AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTG
 5551 CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA
 5601 CCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCC
 5651 CAGCTTGGAGCGAAGCAGCTTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC
 5701 TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
 5751 GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG
 5801 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG
 5851 AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC
 5901 GCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGC
 5951 TCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
 6001 CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGC
 6051 AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCC
 6101 TCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCTTAATGCAGGTATCACGAGGCCCTTT
 6151 CGTCTTCAC

도면50a

서열번호 8 pREN 806 HC DHFR 벡터

Xho I
CTCGAGAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC

2 ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT

02 EcoRI EF1α 프로모터
GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCGTGAGGCTCCGGT

52 GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGG

02 GGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAA

52 ACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGG

02 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAA

52 CGGGTTTGCCCGCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGC

02 CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACG

52 CCCCTGGGTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTG

02 GGTGGGAGAGTTGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCT

52 TGAGTTGAGGCCGTGGCCTGGGCGCTGGGCGCGCGTGCGAATCTGTTG

02 GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA

52 ATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTTGGCAAGATAGTCTTGTA

02 AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTGGTTTGGGGCCGCGG

52 CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCC

02 TGCGAGCCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG

52 CCTGCTCTGGTGCTTGGCCTCGCGCCGCGGTATCGCCCCGCCCTGGGC

02 GGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGC

52 TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA

002 GAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC

도면50b

```

1052 AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCCTCCAGGCACC
1102 TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAG
1152 GGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGT
1202 TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTGCCCCTTTTTG
1251 AGTTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT
      MluI      HindIII      PmeI
1302 TTTCTTCCATTTCAGGTGTACGCGTCTCGGGAAGCTTTAGTTTAAACGCC
1352 GCCACCATGAGAGTGTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCCTTCCTGGT
      M R V L I L L W L F T A F P G
1401 GTCCTGTCTGATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCT
      V L S D V Q L Q E S G P S L V K P
1451 TCTCAGACTCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGT
      S Q T L S L T C T V T G Y S I T S
1501 GATTTTGCCTGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGG
      D F A W N W I R Q P P G N K L E W
1551 ATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAA
      M G Y I S Y S G N T R Y N P S L K
1601 AGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCTTCTGCGAG
      S R I S I T R D T S K N Q F F L Q
1651 TTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCG
      L N S V T I E D T A T Y Y C V T A
1701 GGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGAAGTCTGGTCACTGTCTCTGCA
      G R G F P Y W G Q G T L V T V S A
      BamHI
1751 CAGTGAGTGGATCCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTC

1801 CCACACCGCGGTCACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGC
      S T K G
1851 CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
p s v f p l a p s s k s t s g g t

```

도면50c

1901 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
A A L G C L V K D Y F P E P V T V

1951 TGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGGCT
s w n s g a l t s g v h t f p a

2001 GTCCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
v l q s s g l y s l s s v y s v p

2051 CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
S S S L G T Q T Y I C N V N H K P

2101 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
S N T K V D K K V E P K S C D K

2151 ACTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTC
T H T C P P C P A P E L L G G P S

2201 AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGA
V F L F P P K P K D T L M I S R T

2251 CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACCTGAGCCACGAAGACCGTGAG
P E V T C V V V D V S H E D P E

2301 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAACGCCAAGAC
V K F N W Y V D G V E V H N A K T

2351 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L

2401 TCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
T V L H Q D W L N G K E Y K C K

2451 GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC
V S N K A L P A P I E K T I S K A

2501 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGG
K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E

2551 AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
E M T K N Q V S L T C L V K G F

2601 TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

2651 CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC

도면50d

N Y K T T P P V L D S D G S F F L

2701 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
Y S K L T V D K S R W Q Q G N V

2751 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
Nhe/Xba

2801 GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGAACTAATAAGCTAGC
S L S L S P G K *

2851 AACGGTTTCCCTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCCCCTAACGTTAC

2901 TGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT

2951 TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGGC

3001 CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGG

3051 AATGCAAGGTCTGTTGAATGTCTGGAAGGAGCAGTTCTCTGGAAGCTT

3101 CTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCC

3151 CCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC

3201 ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG

3251 TGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG

3301 GATGCCCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTG

3351 CACATGCTTTACGTGTGTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCTAGGCCCCC

3401 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTT

3451 CGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGCCAAAATATGGGGATTGGCAA

3501 GAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCC

3551 AAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATT

3601 ATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAA

3651 GGACAGAATTAATGGTTCGATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACC

3701 ACCACGAGGAGCTCATTTCTTGCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGAC

3751 TTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTC

도면50e

```

3801 GGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAG
3851 ACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTC
3901 CAGAAATTGATTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTC
3951 CTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTA
4001 CGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTCC
                                     평활 발단
Sali/Sali
4051 TAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGTCGATCGAC
4101 CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
4151 GCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
4201 GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT
4251 AGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTCTCGCCACGTTGCGCG
4301 GCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
4351 AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
4401 ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGA
4451 GTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCA
4501 ACCCTATCTCGGTCTATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGG
4551 TTAATAAATGAGCTGATTTAACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
4601 TTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
4651 CCTATATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
4701 AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
4751 GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTT
4801 GCCTTACTGTTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
4851 GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAG
4901 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGACGTTTCCAATGATGA

```


도면50f

4951 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCC
5001 GGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
5051 TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAA
5101 GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC
5151 TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
5201 CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
5251 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATG
5301 GCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
5351 CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC
5401 TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
5451 GCGGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGG
5501 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTA
5551 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG
5601 CATTTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
5651 AAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
5701 ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
5751 GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCA
5801 CGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTG
5851 TTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA
5901 GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGC
5951 CACCACCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAAT
6001 CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGT
6051 TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACG

도면50g

6101 GGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
6151 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA
6201 GAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
6251 ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCTGG
6301 GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
6351 GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCCTG
6401 GCCTTTTGTGCGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGA
6451 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC
6501 GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
6551 CGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
6601 CAGGTATCACGAGGCCCTTTCTGCTCTCAC

도면51a

mAb124 VH 프레임: 해산 및 아미노산 서열

해산 서열

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCT
 ACTCAATCACCAGTGAATGCTGGAACTGGATCCGGCAGTTCCAGGAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
 GTTACAGTGCTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCATT
 CTTCTGCAGTTGAAATTCGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGGACCGCGGTTTCCTTAC
 TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (서열번호 21)

도면51b

<p><u>mAb124 VH 채: 해산 및 아미노산 서열</u></p>	<p><u>아미노산 서열</u></p>
<p>DVQLQESGPSLVKPSQSLTCTVTGYSTSDYAWNWIRQPGNKLEWMGYISYSANTRYNPSTKSRISITRDTSKNQFFLQL</p>	
	<p><u>CDR1</u></p>
	<p><u>CDR2</u></p>
<p>NSVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGLTVTSA (서열번호 22)</p>	
	<p><u>CDR3</u></p>

도면51c

mAb124 VL 채: 헤산 및 아미노산 서열

헤산 서열

GACATCCTGATGACCCCAATCTCCATCCTCCATGTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCACTTGCCATTCAAGTCA
GGACATTAAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAAGGAAATCATTAAAGGCTGATCTATCATGGAAACCAA
CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAA
TCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA
TCAAACGG (서열번호 26)

도면51d

mAb124 VL 쇄: 헤산 및 아미노산 서열

아미노산 서열

DILMTQSPSSMSLSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQQKPKSFKGLIYHGTNLDGVPSPFSGSGGADYSLTSSLESEDFVD
CDR2

CDR1

YYCVQYGGQFPWTFGGGTKLEIKR (서열번호 27)
CDR3

도면52a

mAb1133 VH 세: 해산 및 아미노산 서열

해산 서열

GATGTGCAGCTTCAGGGGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCT
 ACTCAATCACCCAGTGATTATGCTGGAACCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
 GCTACAGTGGTAACACTAGATACAAACCATCTCTCAGAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAAGAACCAATT
 CTTCTGCAGTTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGACGCGGATTTCCTTAC
 TGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (서열번호 31)

도면52b

<p>mAb1133 VH 채: <u>해산 및 아미노산 서열</u></p>	<p><u>아미노산 서열</u></p>
	<p>DVQLQSGPSLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWIQPGNKLEWMGYISYSGNTRYNP^{CDR1}SLRSRISITRDTSKNQFFLQL^{CDR2}</p> <p>NSVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGTLLVTVSA (서열번호 32)^{CDR3}</p>

도면52c

mAb1133 VL 채: 해산 및 아미노산 서열

해산 서열

GACATCCTGATGACCCCAATCTCCATCCTCCATGTGTGTCTCTGGGAGACACAGTCAACATCATTGCCATTCAAGTC
AGGACATTAAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACAGGGAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAAACCA
ACTTGGACGATGGAGTTCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGA
ATCTGAGGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTCCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATCAAAC (서열번호 36)

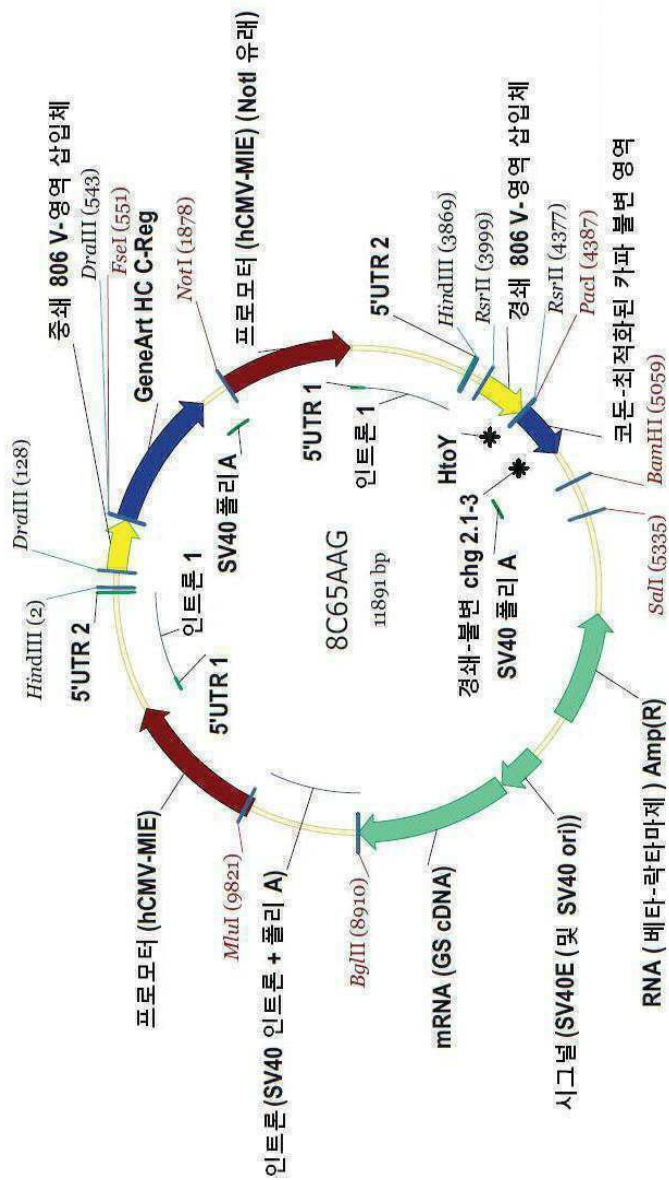
도면52d

mAb1133 VL 채: 해산 및 아미노산 서열

아미노산 서열

DILMTQSPSSMSVSLGDTVNITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSPKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGGADYSLTISSLESEDF
CDR1
 DYYCVQYGOFPWTIFGGGKLEIKR (서열번호 37)
CDR3

도면53



도면54a

41	Head	M D W T W N I L F L V A A A T	
1		AAGTTGGG TCACCTGGA TTGAGAGT GACAGTGA TGGAGAGT GCTAAGGGG TCACCAATTC CAGTACAGAG GAGAGGATCG	
		TTGACAGGC GGTGGAGTT TACTGAGG GGTGAGAG AGAGAGAG AGAGAGAG AGAGAGAG AGAGAGAG AGAGAGAG AGAGAGAG	
42	Tail		G V H S Q V Q L Q E S G
101		AAGGTACCA TGAAGCCAG TCATXAGTG AAGGGGTT CATTCATC CATTCATC TCTATGCT TCAATGAG TCAATGAG TCAATGAG	
		TTGAGTGGT AGCTTGCTC AGTGGTCA TTCCCGAA GTTATGAG GACAGAGAG AGATGAG AGATGAG AGATGAG AGATGAG AGATGAG	
201		G P G L V K P S Q I L S L I C I V S G Y S I S S D F A W N W I R Q P	
301		P P G K G L E W M G Y I S Y S G N I N Y Q P S L K S R I I S K D I	
401		S K N Q F F L K L N S V I A A D I A I Y Y C V I A G R G F P Y W G Q	
42	Head		
501		Q G T I V T V S S	
		ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT ATGAGAGT	
601		TTCTCTTC AG	
701		K D Y F P E P V I V S W N S G A L I S S V H I F P A V L Q S S S L Y	
801		S L S S V V I V P S S S L G I Q I Y I C N V N H K P S R I K V D K K	
901		K V E P K S C D K I H I C P C P A P E L L G G P S V F L F P K P P	

도면54b

43	P	K	D	Y	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D
1001																																	
1101																																	
1201																																	
1301																																	
1401																																	
1501																																	
43	K	-																															
1601																																	
1701																																	
1801																																	
1901																																	
2001																																	
2101																																	
2201																																	

도면54c

2301	TGTTGCAATT GATTATTGAC TACTATTATTA TACTATACAA TTACGGGTC ATTAGTCAT AGCCATATA TGGAGTTGG CATTACATA CTTATGGGAA AAACTGTAA CTAATACTG ATCAATAATT ALCATTAGT AAGCTTCAG TATACAGTA TUGGTAATY ACTUAGGCG GAACTGATY GATTCGCATY
2401	ATGCTCCGCG TGGCTATCG CCAAGGACG CCGCGGATY GAGCTAATA AAGAGTAH TTGGCAATY AAGCAATA GAGCAATTC ATGACGTC TACGGGCG ACCGACTGCG GGGTTCCTG GGGGGGTAA TGGGATTA TACTGGATAC AAGGATTA TTGGGTTAT CCGTAAGY TAACTGCGAT
2501	ATGGTGGAG TATTGATY AATCTGCGA CTTGGCAITA CATGAGTT AGATATGCG AAGTACGCG CTAATGAG CTAATGAGG TAACTGGCGC TACCACTCC ATAAATGCA TTTCAGGGGT GAACGCTAT TTAGTACCA TATATACG TGTATCGGG GATATACG AGTTACTCG ATTACTCGG
2601	GGTGGCATY ATGACGTA TGGACCTTA TGGACCTTA CTAATGCTA GATATATAC GATATATAC GATATATAC GATATATAC GATATATAC CGGACCTTA TACGGGATY ATCTGGGATY ACCCTAAG GATACCTY GATATATAC GATATATAC GATATATAC GATATATAC GATATATAC
2701	AGATACGA TGGGCTGCA TACGCTTG ACCTGAGG ATTACGAT CTTACGCTA TGGGCTGCA TGGGCTGCA TGGGCTGCA TGGGCTGCA TCACTGATY ACCGCACT ATGCTAAG TTAGGCTG TTAGGCTG TTAGGCTG TTAGGCTG TTAGGCTG TTAGGCTG TTAGGCTG
2801	GGATTTTCA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA AATGCTGTA CTGCAATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY TTAGGATY
2901	CGGCAATCG CTTGAGAG CCAATGCG TGTATTGAG TCCATAGAG AATGCTGCA GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG GGATTCAG GAGCTTCG GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3001	GGATTCGCG TGTGCTG GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG CCTAGGCGG ACCTTCG CTAATGCTA CCACTATAG AATGCTG GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG
3101	TATACGCG CCACTATAG AATGCTG GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG ATGCTGCG GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG
3201	TTTCCATAG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG AAGGTAATY ATTGCTAT GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3301	TTTCCATAG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG AAGGTAATY ATTGCTAT GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3401	GGATTCGCG TGTGCTG GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG CCTAGGCGG ACCTTCG CTAATGCTA CCACTATAG AATGCTG GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG
3501	TTTCCATAG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG AAGGTAATY ATTGCTAT GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3601	TTTCCATAG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG AAGGTAATY ATTGCTAT GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG
3701	GGATTCGCG TGTGCTG GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG CCTAGGCGG ACCTTCG CTAATGCTA CCACTATAG AATGCTG GATACGCG TCCGCTGCT GGAACGCG ATGAGAGCG
3801	TTTCCATAG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG TATGCTG AAGGTAATY ATTGCTAT GATAGTGG ACAATGCG AGGATCTTC TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG TGTGCTG

도면54e

4901 CATAAATGA ATGCAATGCT TGTGTTAAC TTGTTTATG CAGTTAAAT TGGTTACAA TAACCAATA GCTACGAAA TTTCACAAAT AAGCAATTTT
GTATTTTACT TACGTTACAA AGCAATATG AACAAATATG GTGAAATAT ACCATATGTT ATTGCTTAT GTTAGTGTTT AAGTGTTTAA TTTCATAAAA
5001 TTTCATGCA TTCTATTTG GTTTTGCCA AACTATCAA TGTATCTAT CATCTATTA TCTCTAGC CGAGACATC GTGGCGGCA TCGCGGCGC
AAGTCAGCT AAGATCAACA CCAACAGGT TTGATAGT ATAGATAAT GTAGATGCT AGAGATGCT GCTGCTAG CACGCTGCT AGTGCGGCG
5101 CACAGTGG GTTGCTGGC CTATATGCG CACATACG CATGGGAG ATGGCTG CACATCGG CTGATGAG CTGTTTGG CTGTTGATG
GTTCACGC CACGACCG GTATATGCG GCTATGCT TACCTCTG TACGACGC GAGTATGCG GACATGCG GACAAACC GATCCATAC
5201 GTGGAGGC CCGTGCGCG GAGCTGTC GCGGATCT GTTGCTGCT AACTTCCT GTGGGCGG TGTATAGG GTTATGCA CTGCTGCT
CACCTCTGG GGCACGCGC CCGTACAC CCGGATAG ACGTATAG CGGCTCGC ACGATTCG CAGTTCAT GATGACCG
5301 GCTTCCTAT GAGATGCG CAAAGGAG ACGTACG TGGGGCG TGTCTGCT TTTCATAG GCTGCGCC CCGACAGC ATCAAAAA
CGAGATTA GTTCCTAGC GTATTCCT TCGCATGCT ACGCGCTG AACACGCA AAAAGTAT GAGGGGCG GCACTGCTG TAGTGTTT
5401 TCGACCTTA AGTCAGGT GCGACACCG GACAGACTA TAAATATCG AAGCTTTC CCGTGAGC TCGCTGCG GTCTCTGT TCGGCCGCG
AGTTCGAT TCACTGCA CCGCTTGG CTGCTGAT ATTCTATG TCGCAAGG GCGACTTGC AGAGACAG CAGAGACA AGCTGAGC
5501 CCGTTAGC GATCTGTC GCTCTGTC CTTCTGGA GGTGAGCT TTCTATAC TCACTGTA GGTATGCT TCGGTAG TCGGTATG GCTCTGCT
GGGATGCT CATGAGAG GCGAGAGAG GAGCGCTT GCGACGCA AAGATATG AATCGACT CCAATGCT CCAATGCT CAGAGACA AGCTGAGC
5601 CCAAGTGG CTGTGAGC GATCCCGG TTCACTGCA GCGTGGCG TTATCGGT ACTATGCT TCGTCCAC CCGTACAC AGACTATC
GCTTCGCG GACACAGT CTGGGCGC AAGTGGCT GCGACGCG AATAGCAT TATACACA ACTCAGTG GCGCATCT GCGCATCT TCGTAAAG
5701 GCGCTGCA GAGGCTGCT GACAGAGT TCGAGAGC AGTATGCT GCGTCTG CAGTCTG AGATCTG AATGCTG CAGTACCG CTACCTAGA
CGGTACCT GGTGCTGCT CATCTGCTA ATGCTGCG TCGATATC GCGTATG TCGAGACTA GCGCTGCT TCGTGGCG GATGAGCT
5801 AGACAGTAT TTGATGCT GCGCTGCT AAGCTGTA CTTCTGGA AAGATGCT AGCTGCT CCGTACAC AGCTGCT GTACGCTG
TCTGCTAT ACCATGAG GAGAGGCT TTGCTGAT GAGAGCTT TCTACCA GCGAGACT GCGCTGCT TCGTGGCG CCAAGCTAC
5901 GTTTTCT TTGAGAGC GAGATGCG GAGAAAAA AGATGCTA GATATCTT TGAATG TCGGTGCT GCGCTGCT GAGAGAG
CAAAAAA AAGTCTGCT GCTATGCG GCTCTTCT TCTAGAGT CTCTAGCA ACTGAGAG ATCCGAGA CTGCGTCT
6001 CCGCTGAA GAGATGCT TATGAGAT ATCAAGAG ATCTGCT AATGCTT AATTAATA TGAATTTA AATCACTA AATATAT
GATGCTAT CCGTACAC AGTATCTAA TATGCTGCT TCGAGTGA TCGAGAAA TTATTTT ACTTAAAT TATGATAT TTCAATATA
6101 GAGTAACT GTTCAGAG ATATAGAG TATATGCT TATGCTGCT AGGACTAT CAGAGCAT TGTATTT GTTATCT AGTCTGCA CTGCTGCT
CTATTTGAA CCGATGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT AATGCTGCT
6201 TGTAGTAT TATGAGAG GAGCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT CAGTCTGCT
ACATCTAT GTGCTGCT CCGCTGCT GAGAGAGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT
6301 CCGCAGCT GAGAGAGCT AGCGAGAG TGTCTGCT ACTTATGCT CTTCTGCT TCTATAT TGTCTGCT AGCTGCT AATGCTGCT
GCTGCTGCT CTTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT TGTCTGCT
6401 CAGTATAT GTTCTGCT CTTCTGCT AATGCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT GAGTCTGCT
GCTATATAT CAGAGCTT GAGAGAG TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT TATGCTGCT

도면54f

6501 CAAGCGAGT TACTGATCC CCCAGTTGT UCAAAAAGC GGTATGTCU TTGCTGCTC CGATCTTCT CAGAGTAAG TTGCTGCGG TGTATCACT
GTTCCTTCA ATGCTACTAGG GGTATACACA CTTTTTTCG CCAATCGAG AAGCAGGAG GCTTAGACAG GTTTCATTC AACGCGCTC ACAATATGA
6601 CATGCTATG CGAGCTAGC ATAATCTCT TACTGTCATG CATTCTGTA GATCGCTTC TGTACAGTGT CAGTACATAA CGATGCTATT CTGAGATAG
GTACCAATAG CATTGCTAGG ATATGAGGA ATGCTGATC ATAGGCAAT CTAGCAAGG ACATGACCA CTATGAGATT CTTAGATTA GATCTATATC
6701 TGTATCGGC GACCGAGTG GTCTTGCCG GGTCAATAC GGGATAATC UGSCCAAT AGGAGAACT TAAATGCT CATCATGCA AAACCTCTT
ACATAGCGG CTGCTCAAC GAGAACGCG CCGCTATAG CCGCTATAG GCGCTGTA TCGCTGTA ATTTCAGA GTAGTAACCT TTTCAGAA
6801 CCGGCGHAA ACTGCAAG ATCTAGCC TGTGAGAC CAGTGTATG TATCTACU GATGACAA CTATCTTA GATATTA CTATCTATG
GSCCGCTT TGAATTCG TGAATTCG ACACTCTAG TACATCTAG TACATCTAG CAGTGTATG TATCTACU GATGACAA CTATCTTA GATATTA CTATCTATG
6901 CGTCTGAG TGGGAAAG CAGGAGGCA AAATGCGCA ABAGAGGA TAAAGGAGC ACGATATG TGAATCTA TACTTCTCT TTTCATAT
GCAAGGCC ACTGCTTT GTCTCTCT TTAGCGCT TTTCCTCT TCCCTGAG TCCCTGAG TCCCTGAG TCCCTGAG TCCCTGAG TCCCTGAG
7001 TATGAGCA TTATCAGG TTATGCTC ATGAGGAT CATATCTA AGCTTTTG AAAATGAC AATAGGCT TCGGAGCA TTTCCTGAA
ATACTGTT AATATGCT AATATGCT AATATGCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7101 AATGCGCC TATCTGCTA GATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7201 TGTATGCT CCGCTGAG GAGGAGCC CTGAGAGG TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
AGCTATCA GCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG CCGCTGAG
7301 AGCTATCA GAGGAGCC TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7401 CAGGAGCA GAGGAGCC TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
GCTGCTCT CTCTATCT TCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7501 ATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7601 TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
AAAAATTA ATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7701 GCTGCTCT CCGCTGAG GAGGAGCC CTGAGAGG TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
CGAGGCGG TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7801 TGAATGCT CAGGAGCT ATATCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
ATCTCTCT GCTGCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
7901 TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
AATGAGCA CTTATGCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
8001 GAGGAGCT CAGGAGCT GCTGCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
GCTGCTCT GCTGCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
8101 GGTGAGCA CAGGAGCT GCTGCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA
CCACTGCT GCTGCTCT TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA TATCTGCTA

도면54g

8201 CCGAAGGTC CGATATATG TGTGTGGGC GCAGACAAG CCTATGSCAG GGATATGCTG GAGGCTACT ACCGCGCTG CTTSATGCT GGGGTCAAGA
GGGTTCCAG GCATATGAC ACCACACCG CATTGTGTC CCTATAGCA CTCGAGTGA TGGCTGGAC GAACATAGCA CCGAGTTCT
8301 TTACGGAC AAATGCTGAG GATAGCGTG CCGAGTGGG ACTCAATA GAGGCTGTG AGGATATCG CATGGAGAT CATCTGGG TGGCCTGTT
AATGCTTG TTATGACTG CATAGGACG GGGTACCGT TGGTTTAT CTTGGACAC TTCTTAGCG GTACCTCTTA GTAGACGC ACCGCGAAA
8401 CATCTTGAT CGATATGAG AGACTTGG GATATAGCA ACCTTGACC CCGATGCTT TCGTGGAC TGGATGGTG CAGCTGCTA TACATCTTT
GTAGACCTA CTCATAGC TTGTGAACC CCAATATCG TCGATGGTA GGTTCGGTA AGGACTTGC ACCTTACAC GTCTGACGT ATGCTGAAA
8501 AGACCAAGG CATTGCGGA GAGATGCTT CIGAGACAA TGGAGGGGC TATGAGAAA CTAGAGACG GGCACGGTA CCGATCTGA GCTAGGATC
TGTGTGTC GTTAGGCTT CATTACCA GACTGTGCT GAGTCTGCG CATCTTTT GATCTGTG CCGTGGCAT GGTATAGT CCGATGTAG
8601 CAGAGGGG CCGACAAAT GCGGCTGTC TGCCTGCTT CAGACACG TCGACATTA ACATCTTC TGTCTGTC CCNATUNA GUGGAGAT
GGTCTCTC GACTCTGTA CCGGACACG ACTGACCAA GTTGGTAC TTTGAGCTT AGGTTTAT TCGTGAAG AGGATAGCT CAGCTGCTA
8701 CGATATGCG GAGCTGTGCG GTTAGGACG GAGGTTAC TTTGAGCTT GGTGCTGCT TGGATATG GAGCTTGG CATGACGA AGGCTGCT
GGGTAGGG GCTTACACG CCGTCTCTT CTTTCAAG AACTTCTG CCGCGGGAG ACCTTARA CTGGGAAC GTGCTGCT TCGGTAGG
8801 CGCATGCG TTGCAATGA GATGGGAC GAGGCTGCG AATCAAAA CTAATGAG TTGATGAT CTGAGCTT TGTACTTA TCGCATCG
GGGTAGCG AGATTTACT CTAGCGCTG CTGCGGAGG TTAATTTT GTTAATCTG AACTTACTA GACTCGGA AGNCAAT AGGTGGGGC
8901 CCGCAGAG ATCTTGCA AGGACCTTA CTTCTGTGT GTGACAAAT TGGACAACT ACTTACAG ATTNAAGT CTAGGTAA TATAATTT
GGGCTCTC TAGAACCT TCTTGGAT GAAGACCA CACTGATA ACTGTTTA TGAATCTC TAAATCTA GATTCATT AATTTTAA
9001 TTAGCTAT ATCTGTAA ACCTGAT CTAACTTT GATCTTAA TATCTAGC TATGAGCTC AGATGGGA CCGCTGCG ATCTCTTA
ATTCACATA TTACCAAT TGTAGCTAA GATTACAA CACATTAAT CTAGGTGAG ATCTTAC TACTTACT CCGTACAC TTACGAAAT
9101 ATTAGGAAA CGGTTTGG TCGAAGAAA TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG
TACTCTTT GGCACACG AGCTCTCTT AGGTAGCT ACTTACTC CAGACGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG TCGATGAG
9201 AGAAGGCG AGGCTTGG CTTGCAAT GCTAATTT TGTAGTAT TGTAGTAT TGTAGTAT TGTAGTAT TGTAGTAT TGTAGTAT
TCTCTGGG TTCTGAGG GAGCTTAA CATTCAAA ACTTACTC GGCACACG ATATCTTA GAGCAGCA ACGATATG GTGTGTTT
9301 GAAAAGCT CACTCTTA CAGAAAT ATTGAAAT ATTCTGAC CTTATATG AGGATAGA GTATATTA TAACTAGC TTTTCTTA
CTTTTCTG CAGCATAA GTCTTCTT TACTTCTT TACTGATG GATATCTA TCGTATCT CCGTATCT CAGATGAG AATAGAT
9401 CTTCCACAG GATAGTGG TGTGCTTA ATACTATG TCAAAATG TGTACTTAA CTTTCTT TGTAAAGG GTTATAGG AATATCTT
GAGGTGTC GTATCTAG AATGATAT TATCTAGC AGTTTAC ATAGGAT CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT
9501 GTATGTC TTCTAGAG ATCATATCA GCTATGCG CCGATAGC TAACTATG CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT
CAATACAG AATGATCT TACTATAG TACTATAG CCGATAGC TAACTATG CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT CAGAAAT
9601 TAAATGAT GCAATGTC TGTATCTT GTTATGCA GCTATAGC GTTATAGC AATCAAT AATCAAT AATCAAT AATCAAT
ATTTACTA GGTATGAC AATATGTA CAAATAGT CAAATAGT CAAATAGT CAAATAGT CAAATAGT CAAATAGT CAAATAGT
9701 TCACTGAT CTAGTGTGG TTGCTCAA CACATCAAG TACTATCA TGTCTGAG TGTCTGAG TGTCTGAG TGTCTGAG TGTCTGAG
ATGACGTA GATACACG AATAGTTT AATAGTAT AATAGTAT AATAGTAT AATAGTAT AATAGTAT AATAGTAT AATAGTAT

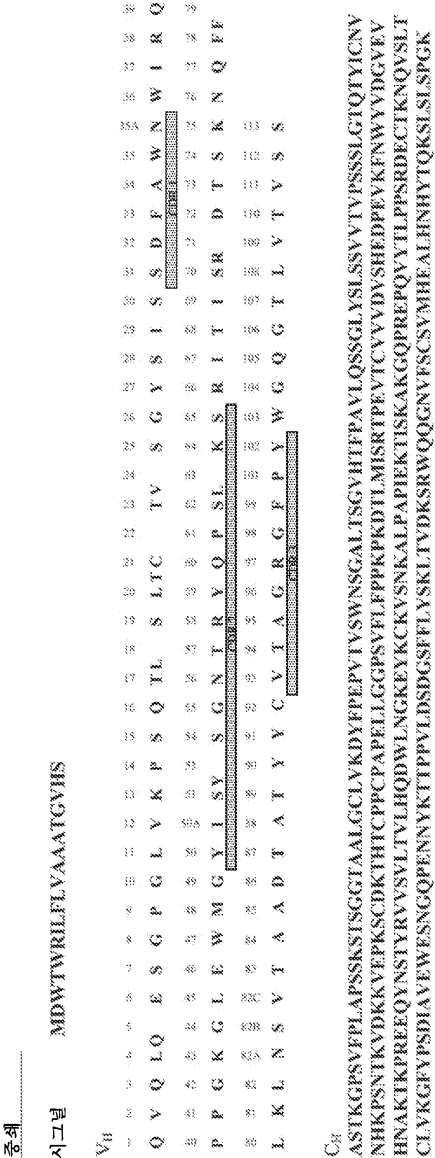
도면54h

9801	ATGTGCTTT GTCCGAATATTCCTGCTTTGCA GATTTCGTG GCGACTATAA TTCATGUCG GCGATAGCG TGTTHATCG GCTATAGSAT GCGATATATG
9901	TACACACAA CAGCTTTAT GCGGAACAT TTAACACAG CGCTGATAT AGATACAGC CCTATACCC AATATATAG GCTATCTTA CCGTATAC
1001	CAAAATGCA TATTCGAAA TATGACAT TGAATAGTG GTCATGATG GTTCTGCTG AGCATATAG TCAATTTTC CAATAGCAT TTTHGCGCAT
10101	CTTTTAGCT ATAACTTTT ATACCTATA ACTTTACG CGCTACACT CAAACACAA TTTACTATG CGGTAAAGG GTTTTACTA AATACCCGTA
10201	ACGGATATC TCGCATAGC GGTATATAG TTATAGGCGG ATGCGATAG AGCATTTGG GATTCGTGT GTCGAAATA TCGCATTTG
10301	TGCGATATG ACCGTATAG CCAATATAG AATGCGCCC TACGCTATG TCTGACACC ACTGACCGG CATACACAA CAGCTTTAT AGCTCAGAG
10401	GATATGTC ACACGATA TCGCATATA TCGCATATA AGGACATC AAGCTATAG ATGCGCATG CATATGATC TATATGATC ATCAATATG
10501	CTATATCAC TGCTGCTAT ACTCGCAT AGCGCTATC TCGCTGTAT TCGATGCTG TACGCTATC GTATAGTAG ATATGTAAT TACTTTATC
10601	GCGATATCG ATATATCA TTGCTATAT ACCTAATAT AAGCAATATA TCGATTTAG TTATATGCA TACGCTATC GTATATGTA TATATATTA
10701	GCTCATGTC CACATTAGC GGCATATGCA CATGATAT TACTATGTA TTATATGTA TCAATTTAGG GGTATTTAT TCAATGCTA TATATGAT
10801	CGGATACAG GTTGTATAG CGGTACACT GTACTATATA ACTGATCAT ATATGATAT GTTATATGCC CGATATACA AGTATCGGT ATATAGCTA
10901	TGCGCTTAC ATAACTTAG GTAAATGCC CGCTGCGTG ATGCGCCAC GATGCGCC CATGTCGC ATATATGCG TATATCTG ATACAACTT ATATTCGG
11001	AGCGCAATG TATGATAG CATTATCGC GCGACCGAC TGCGCGTTC GATGTCGC AGCTATGCG GTATATCTG ATATATCTG ATACAACTT ATATTCGG
11101	AATAGGACT TTCATTTAG GTCATTTAG GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA
11201	TTATCTTCA AAGTATAG CATTATCTA CTTATATAT GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA
11301	CAGCTATG AGTATATG GCGCTATG CATTATCTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA
11401	CTGATTTAC TGCATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC GGTATTTAC
11501	AATGATCA CTACGCTAA ACCTCATAT GTATATCTG AATATCTG AATATCTG AATATCTG AATATCTG AATATCTG AATATCTG AATATCTG
11601	TTGCTTTG CAGTATAT AAGGATAT TCAATAT GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA
11701	AACTATACC GTGCTTTAG TTGCTTTAG AGTTTATCA GATTTTAT GATTTTAT GATTTTAT GATTTTAT GATTTTAT GATTTTAT GATTTTAT
11801	ATAGACAG CTGCTTTAG GATGCTAG AGGCTGGA GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG
11901	TATGCTCT GATCAATCA CTGCTGATC TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG TATGCTAG
12001	CTGCTGATC GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG
12101	CTATATGTT TTGCTTTG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG
12201	GATATACA AATGCTAG CAGTATAT GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA GGTATTTA
12301	CTGCTGATC ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT ATGCTGAT
12401	GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG
12501	CTGCTGATC GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG GATGCTAG

도면54i

11491 TTAAATATA GTTGGATCT CACACGAAI CTCGGTAGG TTTCCGAGC AAGGCTCTT CTCGGTAGG GGGGAGGTT CTACATCGA GCGCTCTCC
 AATTGTAT GACGCTAGA GTTGGGTTA GAGGCTAGC ACAGGCTCG TACCGAGAA GAGGCTAGC CCGCTCGAA GATGTAGGT CCGAGACAGG
 11501 CATGCTTCA GUNCTCATG GTCCTTGGC AAGCTTTTC TCTTAGATT AGAGGAGAA CTTAGGACA GCACTATGC CAGTATGCC AATGTGXXHC
 GTACGAGGT CBTGATGAC CAGTGAGCG TATGTTGCG TAAATGATT GGGHAGCG AGGATTGTA CCTTCGCTI GATTCCTGT TGGATGATT AGGAGATGG CAGAGAAE
 11601 ACGAGGCTT GGGHTAGCG TATGTTGCG TAAATGATT GGGHAGCG AGGATTGTA CCTTCGCTI GATTCCTGT TGGATGATT AGGAGATGG CAGAGAAE
 TTTCCGCGA CCGCTTCC ATACAGAC TTTACTCGA GCGCTTGGC GAGCTTGGC GACTGGTAA ACTTCTGAA TTTCTTCCG GTCTTCTCT
 11701 TGAGGAGC TAAATGTTG TTTTGHATA AATATGAG GATATCGG TTAGGTTT GTTAAAGGNS GAGGAGATG TACTTGAGC AGTACTGTT
 AGCTGCTCG ACTACAGAC AATATAT TCTAGTCTC CATGAGGAC AACGAGCA CATTCGAC CTCGCTTAC ATCAGATCG TATGAGCAA
 11801 GCTGCGGCG GCGGACAG AATATAG TCAAGACA ACAGATTI CTTTCATG GCTTTTCT GAGTACAG TCTTACAG C
 GAGGAGCG CCGTGGTC TGTATTCG ATGTGTTT AGTATAC CAGATAGC CCGATGGC AGGACTTG C

도면55a



도면55b

경쇄		시그널		MDWTWRILELVAAATGVHS	
V _L					
1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42
43	44	45	46	47	48
49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66
67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84
85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96
97	98	99	100	101	102
103	104	105	106	107	108
109	110	111	112	113	114
115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126
127	128	129	130	131	132
133	134	135	136	137	138
139	140	141	142	143	144
145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156
157	158	159	160	161	162
163	164	165	166	167	168
169	170	171	172	173	174
175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186
187	188	189	190	191	192
193	194	195	196	197	198
199	200	201	202	203	204
205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216
217	218	219	220	221	222
223	224	225	226	227	228
229	230	231	232	233	234
235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246
247	248	249	250	251	252
253	254	255	256	257	258
259	260	261	262	263	264
265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276
277	278	279	280	281	282
283	284	285	286	287	288
289	290	291	292	293	294
295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306
307	308	309	310	311	312
313	314	315	316	317	318
319	320	321	322	323	324
325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336
337	338	339	340	341	342
343	344	345	346	347	348
349	350	351	352	353	354
355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366
367	368	369	370	371	372
373	374	375	376	377	378
379	380	381	382	383	384
385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396
397	398	399	400	401	402
403	404	405	406	407	408
409	410	411	412	413	414
415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426
427	428	429	430	431	432
433	434	435	436	437	438
439	440	441	442	443	444
445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456
457	458	459	460	461	462
463	464	465	466	467	468
469	470	471	472	473	474
475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486
487	488	489	490	491	492
493	494	495	496	497	498
499	500	501	502	503	504
505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516
517	518	519	520	521	522
523	524	525	526	527	528
529	530	531	532	533	534
535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546
547	548	549	550	551	552
553	554	555	556	557	558
559	560	561	562	563	564
565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576
577	578	579	580	581	582
583	584	585	586	587	588
589	590	591	592	593	594
595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606
607	608	609	610	611	612
613	614	615	616	617	618
619	620	621	622	623	624
625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636
637	638	639	640	641	642
643	644	645	646	647	648
649	650	651	652	653	654
655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666
667	668	669	670	671	672
673	674	675	676	677	678
679	680	681	682	683	684
685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696
697	698	699	700	701	702
703	704	705	706	707	708
709	710	711	712	713	714
715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726
727	728	729	730	731	732
733	734	735	736	737	738
739	740	741	742	743	744
745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756
757	758	759	760	761	762
763	764	765	766	767	768
769	770	771	772	773	774
775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786
787	788	789	790	791	792
793	794	795	796	797	798
799	800	801	802	803	804
805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816
817	818	819	820	821	822
823	824	825	826	827	828
829	830	831	832	833	834
835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846
847	848	849	850	851	852
853	854	855	856	857	858
859	860	861	862	863	864
865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876
877	878	879	880	881	882
883	884	885	886	887	888
889	890	891	892	893	894
895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906
907	908	909	910	911	912
913	914	915	916	917	918
919	920	921	922	923	924
925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936
937	938	939	940	941	942
943	944	945	946	947	948
949	950	951	952	953	954
955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966
967	968	969	970	971	972
973	974	975	976	977	978
979	980	981	982	983	984
985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996
997	998	999	1000	1001	1002
1003	1004	1005	1006	1007	1008
1009	1010	1011	1012	1013	1014
1015	1016	1017	1018	1019	1020
1021	1022	1023	1024	1025	1026
1027	1028	1029	1030	1031	1032
1033	1034	1035	1036	1037	1038
1039	1040	1041	1042	1043	1044
1045	1046	1047	1048	1049	1050
1051	1052	1053	1054	1055	1056
1057	1058	1059	1060	1061	1062
1063	1064	1065	1066	1067	1068
1069	1070	1071	1072	1073	1074
1075	1076	1077	1078	1079	1080
1081	1082	1083	1084	1085	1086
1087	1088	1089	1090	1091	1092
1093	1094	1095	1096	1097	1098
1099	1100	1101	1102	1103	1104
1105	1106	1107	1108	1109	1110
1111	1112	1113	1114	1115	1116
1117	1118	1119	1120	1121	1122
1123	1124	1125	1126	1127	1128
1129	1130	1131	1132	1133	1134
1135	1136	1137	1138	1139	1140
1141	1142	1143	1144	1145	1146
1147	1148	1149	1150	1151	1152
1153	1154	1155	1156	1157	1158
1159	1160	1161	1162	1163	1164
1165	1166	1167	1168	1169	1170
1171	1172	1173	1174	1175	1176
1177	1178	1179	1180	1181	1182
1183	1184	1185	1186	1187	1188
1189	1190	1191	1192	1193	1194
1195	1196	1197	1198	1199	1200
1201	1202	1203	1204	1205	1206
1207	1208	1209	1210	1211	1212
1213	1214	1215	1216	1217	1218
1219	1220	1221	1222	1223	1224
1225	1226	1227	1228	1229	1230
1231	1232	1233	1234	1235	1236
1237	1238	1239	1240	1241	1242
1243	1244	1245	1246	1247	1248
1249	1250	1251	1252	1253	1254
1255	1256	1257	1258	1259	1260
1261	1262	1263	1264	1265	1266
1267	1268	1269	1270	1271	1272
1273	1274	1275	1276	1277	1278
1279	1280	1281	1282	1283	1284
1285	1286	1287	1288	1289	1290
1291	1292	1293	1294	1295	1296
1297	1298	1299	1300	1301	1302
1303	1304	1305	1306	1307	1308
1309	1310	1311	1312	1313	1314
1315	1316	1317	1318	1319	1320
1321	1322	1323	1324	1325	1326
1327	1328	1329	1330	1331	1332
1333	1334	1335	1336	1337	1338
1339	1340	1341	1342	1343	1344
1345	1346	1347	1348	1349	1350
1351	1352	1353	1354	1355	1356
1357	1358	1359	1360	1361	1362
1363	1364	1365	1366	1367</	

도면56a

mab	806	VH의 메니아를 위한 표면-노출된 잔기의 펩
mab	806	중쇄 각 서브그룹 VH-I (사람 서브그룹 II와 상동성)
mab	806	DVQLQSCPSIAVKPSCQLTLCITCVTSISDFAANNWIRQFPCKLEHGYSISYCNTRYNPESIKSRISITPDTSKNOFTOLN E H D S S D S S D K Y S Y H S N S Y Y Q Y V T SK F Q AAA37941 CA026810
핀세서스	Q	A G L SF S P KA I LG M LT K V R S F Q
변화하는 잔기	Q	G S S S P KG
	Q	DVQLQSCPGIIVKPSQTLTLCITCVTSISDFAANNWIRQFPCKLEHGYSISYCNTRYNPESIKSRISITPDTSKNOFTOLN

도면56b

```

*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
SVTIEDTATYYC---VTAGRGFFY---WGQGLTVTSA
S
VH36
AAA37941
CAD26810
T   G   ARIYYGSSYVWFAY
T   S   ACRSYGRTEYIEDE
T   S
핀세서스
PV   AR
AA
SE
변화하는
장기
AP
SVTAPDTATYYC---VTAGRGFFY---WGQGLTVTSS
S

```

약어 : CDR 은 적색으로 표시; * 표면 노출 잔기 (많은 * 는 더 많은 표면 노출을 나타낸다)
N, 잠재적 글리코실화 부위

도면56c

배너어령된 806 VH를 디자인하기 위한 초기 올리고뉴클레오타이드 오버랩 템

[illegible]

양어: 소문자 = 올리고에 부가; 대문자 = 올리고로부터 제거. 이것은 오버랩의 Tm을 증가시키기 위해 수행했다. 올리고근 V-영역을 형성하는데 사용했다.

도면57a

mAb 806 V_L의 배리어링을 위한 표면-노출된 잔기의 험

mAb 806	경쇄 각 카파 서브그룹 (사람 카파 서브그룹 I과 상동성)									
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
mAb 806	D	I	L	M	T	Q	S	P	S	M
CF9qem	A	G	S							
CAB46157	A	G	S							
AAS01772	Q	V	A	V	R	T	E	A	G	S
핀센서스	Q	L	A	V	R	T		Y	K	A
변화하는 잔기	Q	L	A	V	R	T		Y	K	A
	D	I	M	T	Q	S	P	S	M	

도면57b

[illegible]

도면58a

```

          DraIII  FseI          BstNI          ApaI          SacII
1  AAGATGGCACCACCGTGGCCGGCTCTGCGCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1  TTCTACCGTGTGGCACCAGCGGAGACGCGGACCGGGTCGAGACAGGGTGTGGCGCCAG

          ApaI          BstNI
61 ACATGGCACCTTTTCTCTCCAGCTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTGGCCCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61 TGTACCGTGGAAAAGAGAAGGTCGGAGGTGGTTCCTGGGTCGCACAAGGGGGACCGGG
   A S T K G P S V F P L A P

          BstNI          BstNI
121 CAGCAGCAAGAGCACCAGCGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121 GTCGTCTGTTCTCGTGGTTCGCGCGCGTGTGCGCGGGACCCGACGACCACTTCTCTGATGAA
   S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F

181 CCCCAGCCCGTACCGTGAAGTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181 GGGGCTCGGGCACTGGCACTCGACCTTGTGCGCTCGGGACTGGAGGCCGACGTGTGGAA
   P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F

          PstI          BstEII
241 CCCCCTGCTGTGACAGCAGCGGCTGTACAGCTGAGCAGCGTGGTGAACCGTCCCCAG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241 GGGGCGGCACGACGCTCTCGTGGCGGACATGTGCGACTCGTGCACCACTGGCACGGGTC
   P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S

          BstNI
301 CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
301 GTCTGCGGACCCGTGGTCTGGATGTAGACGTTGCACCTGGTGTTCGGGTCGTTGTGGTT
   S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K

          BspMI
361 GGTGGACAAGAAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACCTGCCCCCTGCCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361 CCACCTGTTCTTCCACCTCGGGTTCGACGCTGTTCTGGGTGPGGACGGGGGGACGGG
   V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P

421 AGCCCCAGAGCTGCTGGCGGACCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAGCCAAGGACAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
421 TCGGGTCTCGACGACCCGCTGGGAGGCACAAGGACAAGGGGGGTTCGGGTTCTGTG
   A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T

          BstEII          BspMI
481 CCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
481 GGACTACTAGTCGTCTGGGGCTCCACTGGACGCACCACCACCTGCACCTGGTGTCTCT
   L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D

```

도면58b

```

541 CCCAGAGTGAAGTTCAMTTGTTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAGCCAAAGACCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGTCTCCACCTTCAGCTTAACCATACACCTGGCCGCACCTCCACGTGTTGGGTTCTGTT
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
601 GCCCAGAGAGAGCAGTACAAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGTCTCTTCTCGTCACTTTGTGTGGATGTCCCAACACAGGCACGACTGGCAGGACGT
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
BstNI BstNI
661 CCAGGACTGGCTGACCGGCAAGGAATACAAATGCAAGGTCTCCAACAAGGCGCTGCCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTGACCGACCTTCCCGTTCCTTATGTTTACGTTCCAGAGGTGTTTCCGGGACGGTCC
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
BstNI
721 CCCCATCGAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGCTAGCTTTTCTGCTAGCTCTTCCGGTTCCCGGTGCGGTGCCCTCGGGGTCCACATGCG
P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
BstI BstNI
781 CCTGCCCCCTCCCGGGAGCGAGTGCACCAAGAACCAGTGTCTCCCTGACCTGTCTGGTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACGGGGGAGGGCCCTGCTCACGTGGTTCTTGGTCCACAGGACTGGACAGGCCACTT
L P P S R D E C T K N Q V S L T C L V K
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
841 GGGCTTCTACCCAGCGACATCCCGGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGAAGATGGGTCGCTGTAGCGGCACCTCACCTCTCGTTGCCGCTCGGGCTCTGTT
G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
901 CTACAGACCAACCCCGCCAGTGTGACAGCGAGCGGCGAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GATGTTCTGGTGGGGGCTCACGACCTGTCCTGCCCTCGAAGAAGGACATGTCTCGGA
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
BspMI PvuII
961 GACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGCAACGTGTTCAAGTGCAGCGTCATGCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGGCACCTTTCTCTCCACCGTGTCCCGTTCACCAAGTCGACGTCCCACTACGTGCT
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1021 GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGCCCTGAGCCTGTCCCGGCAAGTGATGACG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGGGACCTGTTGGTGAAGTGGGTCTTCTCGGACTCGGACAGGGGGCCGTTCACACTGCG
A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * *
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
EagI EcoRI BclI
1081 AGCGCGCGGTGGCGACGACCGAATTCAATGATCATAAACAGCCATAAC (서열번호 80)
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGCGGGCACGCTGCTGGCTTAAGTAACTAGTATTASTCGGTATGG

```

도면59

8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(1) 1	10	20	30	40	50	60	70	80
m806 V _H	(1)								
	(1)	MDWTWRILFLVAAATGVHSGVQLQESGGLVKPSPQTLSTCTVTSYISDFAMNWRQFPGNKLEWMGYIISYSGNTRYN							
	(81) 81	90	100	110	120	130	140	150	160
m806 V _H	(62)	PSLKRISITRDTSKNQFFLQINSVTIETATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVVSA							
8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(81)	PSLKRITISRDTSKNQFFLQINSVTAAATATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVVSA							
m806 V _H	(161) 161	170	180	190	200	210	220	230	240
8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(161)	GCLVKDYFPEEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSIGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDK							
m806 V _H	(241) 241	250	260	270	280	290	300	310	320
8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(241)	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV							
m806 V _H	(321) 321	330	340	350	360	370	380	390	400
8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(321)	YSVLTPLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSRDECTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE							
m806 V _H	(401) 401	410	420	430	440	450	465		
8C65AAG v806 시그널 + V _H + C _H	(401)	ENGQPFENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK							

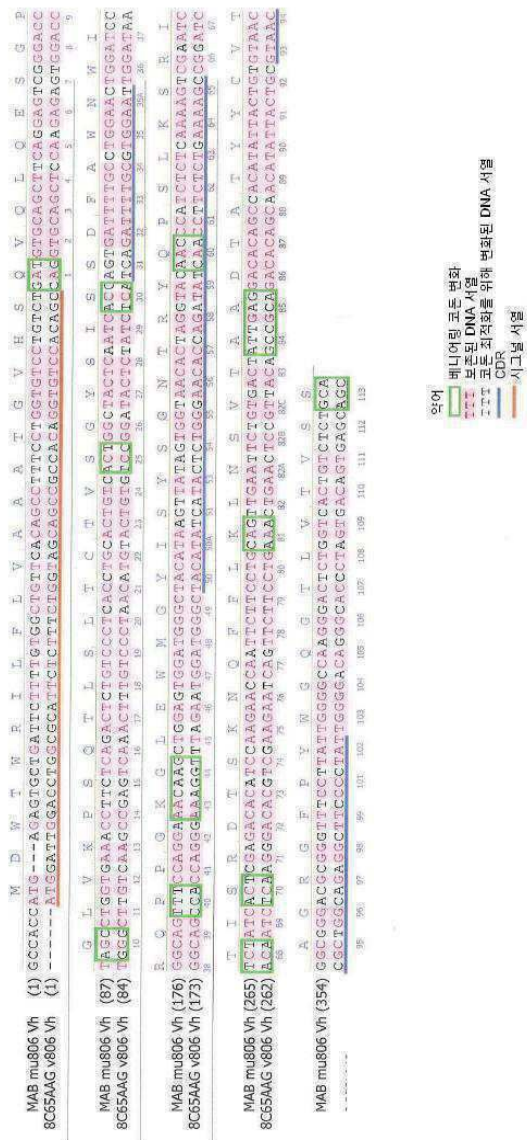
* 케니어링 AA 번호

도면60

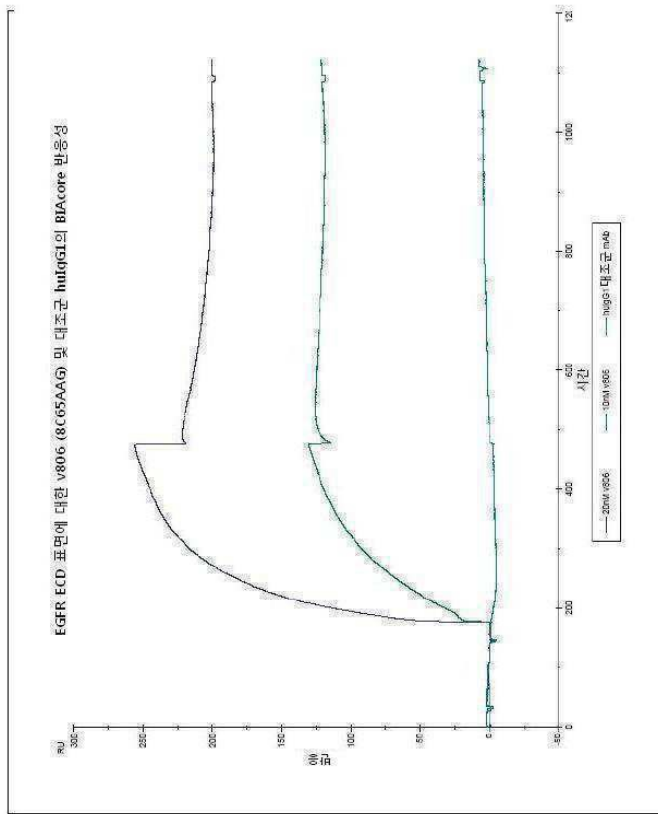
	(1) 1	10	20	30	40	50	63
		-----	-----	-----	-----	-----	-----
m806 VL			DI	LTQSPSSMSVSL	EDTVS	ITCHSSQDINSNIGWLQQR	FGKSF
r2vk1 v806 시그널 + VL + CL			MDWTWRI	LFVAAATGVHSDI	QMTQSPSSMSVSGDRVT	ITCHSSQDINSNIGWLQQR	FGKSF
8C65AAG v806 시그널 + VL + CL			MDWTWRI	LFVAAATGVHSDI	QMTQSPSSMSVSGDRVT	ITCHSSQDINSNIGWLQQR	FGKSF
							*
	(64) 64	70	80	90	100	110	126
m806 VL			KGLIYHGTNLDDE	VFESRFGSGSGGADYSLTISSE	EDFADYCVQHAQFP	WTFGGGKLEIK	
r2vk1 v806 시그널 + VL + CL			KGLIYHGTNLDDE	VFESRFGSGSGGADYSLTISSE	EDFADYCVQHAQFP	WTFGGGKLEIK	
8C65AAG v806 시그널 + VL + CL			KGLIYHGTNLDDE	VFESRFGSGSGGADYSLTISSE	EDFADYCVQHAQFP	WTFGGGKLEIK	
							*
	(127) 127	140	150	160	170	189	
m806 VL			RTVAAPS	VFI	PPPS	DEQLKSGTASVVCULNNFY	YPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTQDSKD
r2vk1 v806 시그널 + VL + CL			RTVAAPS	VFI	PPPS	DEQLKSGTASVVCULNNFY	YPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTQDSKD
8C65AAG v806 시그널 + VL + CL			RTVAAPS	VFI	PPPS	DEQLKSGTASVVCULNNFY	YPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTQDSKD
							*
	(190) 190	200	210	220	233		
m806 VL			STYSLSS	TLTTSKADYERHK	-----		
r2vk1 v806 시그널 + VL + CL			STYSLSS	TLTTSKADYERHK	-----		
8C65AAG v806 시그널 + VL + CL			STYSLSS	TLTTSKADYERHK	-----		
							*
							* 배너머릴 AA 범위

[illegible]

도면62



도면63



Biacore 측정값으로서, 재조합 EGFR-ECD에 대한 일시적 결합염체 293 세포 유래의 정제된 hu806 항체의 결합을 나타낸다. 정제된 대조군 사람 IgG1 항체에 의해서는 EGFR-ECD에 대한 결합이 전혀 관찰되지 않았다.

도면64a

```

LOCUS
8C65AAG 11891 bp DNA circular 27-NOV-2006
DEFINITION veneered 806 HC variable region, GeneArt human HC constant
region, veneered LC variable region, cod-opt LC constant region, combined in
large Lonza Vector.
SOURCE
ORGANISM
COMMENT This file is created by Vector NTI
http://www.invitrogen.com/
COMMENT VNTDATE|418148572|
COMMENT VNTDBDATE|428174363|
COMMENT LSOWNER|
COMMENT VNTNAME|8C65AAG|
COMMENT VNTAUTHORNAME|Anne Murray|
COMMENT VNTAUTHORTEL|646 888-2342|
COMMENT VNTAUTHORFAX|646 422-0492|
COMMENT VNTAUTHOREML|murrayal@mskcc.org|
COMMENT VNTAUTHORAD1|Ludwig Inst. at Memorial Sloan Kettering Cancer Center|
COMMENT VNTAUTHORAD2|1275 York Ave.|
COMMENT VNTAUTHORAD3|New York, NY 10021 |
COMMENT VNTAUTHORAD4|USA|
COMMENT VNTREPLTYPE|Plasmid
COMMENT Vector_NTI_Display_Data_(Do_Not_Edit!)
COMMENT (SXF
COMMENT {CGexDoc "8C65AAG" 0 11891
COMMENT (CDBMol 0 0 1 6558 1 0 0 1 0 "" "" 0 0 0 0 (CobList) (CobList)
(CobList)
COMMENT (CobList) -1 ""
COMMENT (CDocSetData 1 1 0 0 0 0 "MAIN" 1 1 1 1 0 0 1 1 1 0 10 10 40 50 0
1 0
COMMENT (CHomObj 0 0 0 3 75) (CWordArray) (CWordArray)
COMMENT (CStringList "BamHI" "BglII" "DraIII" "FseI" "HindIII" "MluI"
"NotI"
"PacI" "RsrII" "SalI") (CStringList "atg" "gtg")
COMMENT (CStringList "taa" "tga" "tag") (CobList) 1 "{(0,1),2}" 0 0 "" 0
4294967295 0 1 0 0 0 0 1 "MAIN" 0 0 30 0
COMMENT (CProteinMotifSearchObject 100 10 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0))
COMMENT (CMolPar 1 0 0 0 0 1 11891 0 0 0 0 0 0 0 0) (CStringList)
(CCStringList)
COMMENT (CobList) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3
7)
COMMENT (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7)
COMMENT (CobList #0=(CRSite (CStringList) "BamHI" "ggatcc" 2 0 1 5059 0 0
"")
#1=(CRSite (CStringList) "BglII" "agatct" 2 0 1 8910 0 0 "")
#2=(CRSite (CStringList) "DraIII" "cacnngtg" 7 0 2 128 0 543 0 0
"")
#3=(CRSite (CStringList) "FseI" "ggccggcc" 7 0 1 551 0 0 "")
#4=(CRSite (CStringList) "HindIII" "aagctt" 2 0 2 2 0 3869 0 0
"")
#5=(CRSite (CStringList) "MluI" "acgcgt" 2 0 1 9821 0 0 "")
#6=(CRSite (CStringList) "NotI" "cgggccgc" 3 0 1 1878 0 0 "")
#7=(CRSite (CStringList) "PacI" "ttaattaa" 6 0 1 4387 0 0 "")
#8=(CRSite (CStringList) "RsrII" "cggwccg" 3 0 2 3999 0 4377 0 0
"")

```

도면64b

```

COMMENT      #9=(CRSite (CStringList) "SalI" "gtcgac" 2 0 1 5335 0 0 ""))
COMMENT      (CobList
COMMENT      #10=(CFSignal (CobList) "GeneArt HC C-Reg" 2 0 0 553 1643 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #11=(CFSignal (CobList) "SV40 polyA" 25 0 0 1644 1875 0
COMMENT      (CStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #12=(CFSignal (CobList) "Signal (SV40E (and SV40 ori))" 21 0 0
7356 7699
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #13=(CFSignal (CobList) "RNA (beta-lactamase) Amp(R)" 53 0 1 6121
6981 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #14=(CFSignal (CobList) "mRNA (GS cDNA)" 54 0 0 7707 8906 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #15=(CFSignal (CobList) "Promoter (hCMV-MIE)" 30 0 0 9784 10926 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #16=(CFSignal (CobList) "Intron (SV40 intron + poly A)" 15 0 0
8909 9760
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #17=(CFSignal (CobList) "5'UTR_1" 52 0 0 10927 11047 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #18=(CFSignal (CobList) "Intron_1" 15 0 0 11048 11874 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #19=(CFSignal (CobList) "5'UTR_2" 52 0 0 11875 11891 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #20=(CFSignal (CobList) "Heavy Chain 806 V-Region Insert" 45 0 0
128 542
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #21=(CFSignal (CobList) "HtoV" 23 0 0 4315 4315 0 (CStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #22=(CFSignal (CobList) "Light-Const. chg 2.1-3" 23 0 0 4716 4716
0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #23=(CFSignal (CobList) "Light-Chain 806 V-Region insert" 45 0 0
3999
COMMENT      4376 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #24=(CFSignal (CobList) "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" 30 0 0
1884
COMMENT      2902 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #25=(CFSignal (CobList) "5'UTR_2" 52 0 0 3851 3867 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #26=(CFSignal (CobList) "Intron_1" 15 0 0 3024 3850 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #27=(CFSignal (CobList) "5'UTR_1" 52 0 0 2903 3023 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #28=(CFSignal (CobList) "SV40 poly A" 25 0 0 4827 5063 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #29=(CFSignal (CobList) "Codon-Optimized Kappa Constant Region" 2

```


도면64c

```

0 0
COMMENT      4390 4800 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
(CobList)
COMMENT      (CobList) (CobList) (CobList) (CobList) (CobList)
COMMENT      (CobList) (CobList) (CobList) (CobList) (CobList)
COMMENT      (CobList) (CobList) (CobList) (CobList) (CobList)
COMMENT      #30=(CGroupPar {CParagraph 0 (0 0) 1 2 0 0 180}
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #31=(CRefLinePar
COMMENT      (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 1 233) "8C65AAG"
2) 5 ""
COMMENT      0 4)
COMMENT      #32=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar {CParagraph 1 (0 0) 1 1 0 0 178}
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #33=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "DNA Plasmid '8C65AAG'" 1)
COMMENT      #34=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "veneered 806 HC variable region, GeneArt human
HC constant region, veneered LC variable region, cod-opt LC constant region,
combined in large Lonza Vector"
COMMENT      1)
COMMENT      #35=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "Currently local object. Original author: Anne"
1)
COMMENT      #36=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "Created: 08/07/06 04:22PM" 1)
COMMENT      #37=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "Last Modified: 11/27/06 05:19PM" 1)
COMMENT      #38=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "length: 11891 bp" 1)
COMMENT      #39=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "storage type: Basic" 1)
COMMENT      #40=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "form: Circular" 1))) "General Description"
COMMENT      #41=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar {CParagraph 2 (0 0) 1 1 0 0 178}
COMMENT      (CObjectList))
COMMENT      "Standard Fields")
COMMENT      #42=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar {CParagraph 5 (0 0) 1 1 0 0 178}
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #43=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT      "Anne" 1)))
COMMENT      "Original Author")
COMMENT      #44=(CRefLinePar
COMMENT      (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 0 233) "Comments"
2) 1 ""
COMMENT      0 0)
COMMENT      #45=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar {CParagraph 8 (0 0) 1 2 0 0 178}
COMMENT      (CObjectList))
COMMENT      "Annotations")
COMMENT      #46=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar {CParagraph 12 (6 0) 1 1 0 0 178}
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #47=(CFolderPar

```

도면64d

```

COMMENT      (CGroupPar (CParagraph 2 (7 2 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #48=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 553 (3 #10# 0) 1 2 2 0 194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #49=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 553 End: 1643" 1)
COMMENT      #50=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "GeneArt human HC C-Reg" 1)))
COMMENT      "GeneArt HC C-Reg")
COMMENT      #51=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 4390 (3 #29# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #52=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 4390 End: 4800" 1)))
COMMENT      "Codon-Optimized Kappa Constant
Region"))))
COMMENT      "C-Region (2 total)")
COMMENT      #53=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar (CParagraph 15 (7 15 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #54=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3024 (3 #26# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #55=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3024 End: 3850" 1)
COMMENT      #56=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "intron" 1))) "Intron_1")
COMMENT      #57=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 8909 (3 #16# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #58=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 8909 End: 9760" 1)
COMMENT      #59=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "SV40 intron + poly A" 1)))
COMMENT      "Intron (SV40 intron + poly A)")
COMMENT      #60=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 11048 (3 #18# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #61=(CLinePar

```

도면64e

```

COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 11048 End: 11874" 1)
COMMENT                                #62=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "intron" 1))) "Intron_1" )))
COMMENT                                "Intron (3 total)"))
COMMENT                                #63=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 21 {7 21 0} 1 1 1 0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #64=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 7356 {3 #12# 0} 1 2 2 0
COMMENT                                194)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #65=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 7356 End: 7699" 1)
COMMENT                                #66=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "SV40E (and SV40 ori)" 1)))
COMMENT                                "Signal {SV40E (and SV40 ori)}" )))
COMMENT                                "Misc. Feature (1 total)"))
COMMENT                                #67=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 23 {7 23 0} 1 1 1 0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #68=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 4315 {3 #21# 0} 1 2 2 0
COMMENT                                194)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #69=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 4315 End: 4315" 1)
COMMENT                                #70=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Histidine-to-Tyrosine change in
the 806 Light-Chain variable CDR3 region"
COMMENT                                1))) "HtoY"
COMMENT                                #71=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 4716 {3 #22# 0} 1 2 2 0
COMMENT                                194)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #72=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 4716 End: 4716" 1)
COMMENT                                #73=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Light-chain c-region change 2.1-
3" 1)))
COMMENT                                "Light-Const. chg 2.1-3" )))
COMMENT                                "Modified Base (2 total)"))
COMMENT                                #74=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 25 {7 25 0} 1 1 1 0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #75=(CFolderPar

```

도면64f

```

COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     {CParagraph 1644 (3 #11# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #76={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Start: 1644 End: 1875" 1}))
COMMENT                                     "SV40 polyA")
COMMENT #77={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     {CParagraph 4827 (3 #28# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #78={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Start: 4827 End: 5063" 1)
COMMENT                                     #79={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "SV40 poly A" 1})) "SV40 poly
A" )))
COMMENT                                     "PolyA Signal {2 total}")
COMMENT #80={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar {CParagraph 30 (7 30 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #81={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     {CParagraph 1884 (3 #24# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #82={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Start: 1884 End: 2902" 1)
COMMENT                                     #83={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
1) ))
COMMENT                                     "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
COMMENT #84={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     {CParagraph 9784 (3 #15# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #85={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "Start: 9784 End: 10926" 1)
COMMENT                                     #86={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                     "hCMV-MIE promoter" 1}))
COMMENT                                     "Promoter (hCMV-MIE)" )))
COMMENT                                     "Promoter Prokaryotic {2 total}")
COMMENT #87={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar {CParagraph 45 (7 45 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #88={CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     {CParagraph 128 (3 #20# 0) 1 2 2 0 194)

```

도면64g

```

COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #89=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 128 End: 542 " 1)))
COMMENT                                "Heavy Chain 806 V-Region Insert")
COMMENT                                #90=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 3999 {3 #23# 0} 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #91=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 3999 End: 4376" 1)))
COMMENT                                "Light-Chain 806 V-Region insert"))
COMMENT                                "V-Region (2 total) ")
COMMENT                                #92=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 52 {7 52 0} 1 1 1 0 178)
COMMENT                                {ObjectList
COMMENT                                #93=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 2903 {3 #27# 0} 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #94=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 2903 End: 3023" 1)
COMMENT                                #95=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                1))) "5'UTR_1")
COMMENT                                #96=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 3851 {3 #25# 0} 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #97=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 3851 End: 3867" 1)
COMMENT                                #98=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                1))) "5'UTR_2")
COMMENT                                #99=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 10927 {3 #17# 0} 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #100=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 10927 End: 11047" 1)
COMMENT                                #101=(CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {0 0} 1 2 3 0 180)
COMMENT                                1))) "5'UTR_1")
COMMENT                                #102=(CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar

```

도면64h

```

COMMENT                                     (CParagraph 11875 (3 #19# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #103=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 11875 End: 11891" 1)
COMMENT                                     #104=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "5'UT" 1))) "5'UTR_2"))))
COMMENT                                     "5' UTR (4 total)"))
COMMENT                                     #105=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 53 (7 53 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #106=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 6121 (3 #13# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #107=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 6121 End: 6981
{Complementary}"
COMMENT                                     1)
COMMENT                                     #108=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "beta-lactamase" 1)))
COMMENT                                     "RNA (beta-lactamase) Amp(R)"))))
COMMENT                                     "RNA - Misc. (1 total)"))
COMMENT                                     #109=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 54 (7 54 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #110=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 7707 (3 #14# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #111=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 7707 End: 8906" 1)
COMMENT                                     #112=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "GS cDNA" 1))) "mRNA (GS
cDNA)"))))
COMMENT                                     "mRNA (1 total)")) "Feature Map")
COMMENT                                     #113=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 13 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #114=(CRSFolderPar

```


도면64i

```

COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 37104496 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #115={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #0# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #116={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #0# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 5059 " 1)}})) "BamHI: 1
site")
COMMENT                                1 5 "GGATCC" "CCTAGG")
COMMENT                                #117={CRSFolderPar
COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 37104336 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #118={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #1# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #119={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #1# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 8910 " 1)}})) "BglIII: 1
site")
COMMENT                                1 5 "AGATCT" "TCTAGA")
COMMENT                                #120={CRSFolderPar
COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 18147408 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #121={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #2# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #122={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #2# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 128 " 1)
COMMENT                                #123={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #2# 2} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N2: 543 " 1)}})) "DraIII: 2
sites")
COMMENT                                6 3 "CACNNNGTG" "GTGNNNCAC")
COMMENT                                #124={CRSFolderPar
COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 37104736 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #125={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #3# 0} 1 2 2 0
180)

```

도면64j

```

COMMENT                                     {CObjectList
COMMENT                                     #126={CLinePar
COMMENT                                     {CParagraph 0 (1 #3# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                     " N1: 551 " 1)}})) "FseI: 1
site") 6
COMMENT                                     2 "GGCCGGCC" "CCGGCCGG")
COMMENT #127={CRSFolgerPar
COMMENT {CFolderPar
COMMENT {CGroupPar {CParagraph 37104576 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #128={CGroupPar
COMMENT {CParagraph 0 (10 #4# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #129={CLinePar
COMMENT {CParagraph 0 (1 #4# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT " N1: 2 " 1)
COMMENT #130={CLinePar
COMMENT {CParagraph 0 (1 #4# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT " N2: 3869 " 1)}}))
COMMENT "HindIII: 2 sites") 1 5 "AAGCTT" "TTCGAA")
COMMENT #131={CRSFolgerPar
COMMENT {CFolderPar
COMMENT {CGroupPar {CParagraph 27521208 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #132={CGroupPar
COMMENT {CParagraph 0 (10 #5# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #133={CLinePar
COMMENT {CParagraph 0 (1 #5# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT " N1: 9821 " 1)}})) "MluI: 1
site")
COMMENT 1 5 "ACGCGT" "TGCACA")
COMMENT #134={CRSFolgerPar
COMMENT {CFolderPar
COMMENT {CGroupPar {CParagraph 37104976 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #135={CGroupPar
COMMENT {CParagraph 0 (10 #6# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT {CObjectList
COMMENT #136={CLinePar
COMMENT {CParagraph 0 (1 #6# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT " N1: 1878 " 1)}})) "NotI: 1
site")
COMMENT 2 6 "GCGGCCGC" "CGCCGGCG")
COMMENT #137={CRSFolgerPar

```

도면64k

```

COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 37104816 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #138={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #7# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #139={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #7# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 4387 " 1}})) "PacI: 1
site")
COMMENT                                5 3 "TTAATTAA" "AATTAAAT")
COMMENT                                #140={CRSFolderPar
COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 37104256 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #141={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #8# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #142={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #8# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 3999 " 1)
COMMENT                                #143={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #8# 2} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N2: 4377 " 1}})) "RsrII: 2
sites")
COMMENT                                2 5 "CGGWCCG" "GCCWGGC")
COMMENT                                #144={CRSFolderPar
COMMENT                                {CFolderPar
COMMENT                                {CGroupPar {CParagraph 18147328 {8 0} 1 1 1
0 178)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #145={CGroupPar
COMMENT                                {CParagraph 0 {10 #9# 0} 1 2 2 0
180)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #146={CLinePar
COMMENT                                {CParagraph 0 {1 #9# 1} 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 5335 " 1}})) "SalI: 1
site")
COMMENT                                1 5 "GTCGAC" "CAGCTG"))
COMMENT                                "Restriction/Methylation Map"))))
COMMENT                                {CMapView
COMMENT                                {CStyleSheet
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #147={CWidgetStyle "RSite Label" 1 {LOGPEN 0 0 13408563} 1 0 1
COMMENT                                {LOGFONT 0 0 0 400 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia"} 0.555556
0 1 5
COMMENT                                "@N {@S}" 0)

```

도면641

```

COMMENT      #148=(CWidgetStyle "Signal Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.666667 0
1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #149=(CWidgetStyle "Molecule Label 2" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
0 1 16
COMMENT      "@L bp" 0)
COMMENT      #150=(CWidgetStyle "Molecule Label 1" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Verdana") 0.833333
0 1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #151=(CWidgetStyle "Shape 3" 1 (LOGPEN 0 0 3355545) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 6724095 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #152=(CWidgetStyle "Shape 1" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 10079334 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #153=(CWidgetStyle "Axis" 1 (LOGPEN 0 0 10079436) 2 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 13434879 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 10 1 0 0 0))
COMMENT      #154=(CWidgetStyle "Line 2" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 8 0 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #155=(CWidgetStyle "RSite" 1 (LOGPEN 0 0 10053171) 8 0 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #156=(CWidgetStyle "Short Signal" 1 (LOGPEN 0 0 13395507) 10 0
0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #157=(CWidgetStyle "Uniq RSite Label" 1 (LOGPEN 0 0 153) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
128 1
COMMENT      5 "@N (@S)" 0)
COMMENT      #158=(CWidgetStyle "Vanilla" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 16777215 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 18 "Times New Roman")
0.8 0
COMMENT      1 2 "?" 0)
COMMENT      #159=(CWidgetStyle "Mark 1" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 2 7 48 2 2 "Windings") 0.7 0 1
2 "2"
COMMENT      0)
COMMENT      #160=(CWidgetStyle "Motif Label" 1 (LOGPEN 0 0 16744512) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.611111
8388608
COMMENT      1 65535 "@N (@H)" 0)
COMMENT      #161=(CWidgetStyle "Fragment Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 49 "Courier New") 1.05
0 1 48
COMMENT      "@F bp (molecule @L bp)" 0)
COMMENT      #162=(CWidgetStyle "Fragment Label 1" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.91 0 1 1
COMMENT      "Fragment of @N" 0)
COMMENT      #163=(CWidgetStyle "Shape 4" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 2 8388608 5) 0 0 0)
COMMENT      #164=(CWidgetStyle "Shape 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 0
COMMENT      0 0)
COMMENT      #165=(CWidgetStyle "Shape 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0 0
0) 0 0

```

도면64m

```

COMMENT      0)
COMMENT      #166=(CWidgetStyle "ORF" 1 (LOGPEN 0 0 16384) 8 0 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 7 0.2 3.41182 2.86186 0.609808))
COMMENT      #167=(CWidgetStyle "Line 4" 1 (LOGPEN 0 0 32768) 8 0 0 0 0)
COMMENT      #168=(CWidgetStyle "Line 3" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 8 0 0 0 0)
COMMENT      #169=(CWidgetStyle "Line 1" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0 0 0 0)
COMMENT      #170=(CWidgetStyle "Short Promoter" 1 (LOGPEN 0 0 128) 6 0 0 0
0)
COMMENT      #171=(CWidgetStyle "Motif" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT      #172=(CWidgetStyle "Line 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 8 0 0 0 0)
COMMENT      #173=(CWidgetStyle "Void" 0 0 0 0 0)
COMMENT      #174=(CWidgetStyle "General Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT      1 3 "@T @N " 0)
COMMENT      #175=(CWidgetStyle "Position" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT      #176=(CWidgetStyle "Annotation" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT      0 0)
COMMENT      #177=(CWidgetStyle "Position Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0
1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #178=(CWidgetStyle "Range" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 16777215 0) 0 0 0)
COMMENT      #179=(CWidgetStyle "Range Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #180=(CWidgetStyle "ORF Label" 1 (LOGPEN 0 0 49216) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
COMMENT      0.611111 0 1 65535 "@N" 0)
COMMENT      #181=(CWidgetStyle "CDS Label" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.555556
255 1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #182=(CWidgetStyle "Shape 5" 1 (LOGPEN 0 0 0) 3 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 16777113 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #183=(CWidgetStyle "CDS" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 2 39423
3) 0 0
COMMENT      1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #184=(CWidgetStyle "Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.944444
8388608
COMMENT      1 1 "@N" 0)
COMMENT      #185=(CWidgetStyle "Label 3" 1 (LOGPEN 0 0 8421376) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 700 255 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.833333
255 1
COMMENT      5 "@N (@S)" 0)
COMMENT      #186=(CWidgetStyle "Label 4" 1 (LOGPEN 0 0 8437824) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.722222 0
1 5

```

도면64n

```

COMMENT      "@N {ES}" 0)
COMMENT      #187=(CWidgetStyle "Shape 6" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 3394713 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT      #188=(CWidgetStyle "Shape 7" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT      #189=(CWidgetStyle "Shape 8" 1 (LOGPEN 0 0 52275) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT      #190=(CWidgetStyle "Shape 9" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 10040064 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0))
COMMENT      0.164644 1.74233 0.164644 2.53336
COMMENT      (2 (CShapeMapEntry 0 "Shape 9" 1 "Signal Label") 45
COMMENT      (CShapeMapEntry 0 "Shape 8" 1 "Signal Label") 70
COMMENT      (CShapeMapEntry 0 "Unique RSite" 1 "Uniq RSite Label") 67
COMMENT      (CShapeMapEntry 0 "ORF" 0 "ORF Label")) 40.0378 40.0378 39 39
0.1
COMMENT      -11891) 1 0 1 1 1
COMMENT      (mapper: 26.6862 -31.9823 39 39 0.01 10 14 11891 11891 1 0 0)
COMMENT      #191=(CGroupWidget {CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 Nil -317 100)
COMMENT      {CObjectList
COMMENT      #192=(CGroupWidget {CWidget 1 {0 0} 1 2 0 0 Nil -639 100)
COMMENT      {CObjectList
COMMENT      #193=(CAXis
COMMENT      {CWideLine
COMMENT      (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #153# 37106252 0)
COMMENT      (LOGPEN 0 0 10079436) 2 (LOGBRUSH 0 13434879
0) 1
COMMENT      6.27471 6.27271 1 0.0214037) 0.0527557)
COMMENT      #194=(CLabel
COMMENT      (CWidget 1001 {0 0} 1 2 0 0 #150# 28370780
100)
COMMENT      (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 41 15 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34
"Verdana")
COMMENT      2.53336 0.833333 0 "8C65AAG" "@N" 1 0 0.5 0 -
6.206
COMMENT      3.84615 1.07692 Nil)
COMMENT      #195=(CLabel {CWidget 1002 {0 0} 1 2 0 0 #149# 0
100)
COMMENT      (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18
"Georgia")
COMMENT      2.53336 0.555556 0 "11891 bp" "@L bp" 16 0 -
0.8 0
COMMENT      -7.47268 2.30769 0.692308 Nil))
COMMENT      #196=(CGroupWidget {CWidget 10 {6 0} 1 2 0 0 Nil 393219
100)
COMMENT      {CObjectList

```

도면64o

```

COMMENT
COMMENT
COMMENT
COMMENT
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
0) 1
COMMENT
0)
COMMENT
#199=(CLabel
COMMENT
37745700 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
COMMENT
COMMENT
COMMENT
#200=(CWideArrow
COMMENT
COMMENT
COMMENT
393235
COMMENT
COMMENT
3.95774 1
COMMENT
COMMENT
COMMENT
COMMENT
28396148 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
COMMENT
Region" "@N"
COMMENT
#200#))
COMMENT
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
COMMENT
18088384
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088512 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT

#197=(CGroupWidget
(CWidget 2 (7 2 0) 1 2 0 0 Nil -108 100)
(CObjectList
#198=(CWideArrow
(CWideLine
(CWidget 0 {3 #10# 0} 1 2 0 0 #190# 0
(LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0 10040064
5.40641 5.98197 1 0.082322) 0.8 1.8
#199=(CLabel
(CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0
"GeneArt HC C-Reg" "@N" 1 0 0 -15.0455
8.30913 6.28205 0.846154 #198#)
#200=(CWideArrow
(CWideLine
(CWidget 0 {3 #29# 0} 1 2 0 0 #190#
100) (LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGBRUSH 0 10040064 0) 1 3.74091
0.082322) 0.8 1.8 0)
#201=(CLabel
(CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0
"Codon-Optimized Kappa Constant
1 0 0 -11.1884 24.776 14.4872 0.846154
(CObjectList))
#202=(CGroupWidget
(CWidget 15 {7 15 0} 1 2 0 0 Nil 18088376
(CObjectList
#203=(CLine
(CWidget 0 {3 #16# 0} 1 2 0 0 #169#
100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
1.12422 1.5737)
#204=(CLabel
(CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0

```


도면64p

```

COMMENT                                     "Intron (SV40 intron + poly A)" "@N" 1
0 0
COMMENT                                     13.1146 8.30913 9.74359 0.846154
#203#)
COMMENT                                     #205=(CLine
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #18# 0} 1 2 0 0 #169# -
1215 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
0.00896848
COMMENT                                     0.445258)
COMMENT                                     #206=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
27471448 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                     1 0 0 14.7731 3.24241 2.74359 0.846154
#205#)
COMMENT                                     #207=(CLine
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #26# 0} 1 2 0 0 #169#
268634520
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
COMMENT                                     4.24209 4.67838)
COMMENT                                     #208=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
37615420 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                     1 0 0 -7.95233 14.6425 2.74359
0.846154 #207#))
COMMENT                                     {CObjectList})
COMMENT                                     #209=(CGroupWidget
COMMENT                                     {CWidget 21 {7 21 0} 1 2 0 0 Nil 327685 100)
COMMENT                                     {CObjectList
COMMENT                                     #210=(CWideArrow
COMMENT                                     (CWideLine
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #12# 0} 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                     (LOGBRUSH 0 10078334 0) 1 2.21152
2.393 1
COMMENT                                     0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                     #211=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                     "Signal (SV40E {and SV40 ori})" "@N" 1
0 0

```

도면64q

```

COMMENT                                     8.88505 12.1092 10.0513 0.846154
#210#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #212={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 23 {7 23 0} 1 2 0 0 Nil 27986056
100)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #213={CShape
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #21# 0} 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                     3.9973 0.7 2)
COMMENT                                     #214={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
37029036 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "HtoY"
"@N" 1 0
COMMENT                                     0 -5.40373 20.9759 1.64103 0.846154
#213#)
COMMENT                                     #215={CShape
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #22# 0} 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                     3.78575 0.7 2)
COMMENT                                     #216={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
18088616 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                     "Light-Const. chg 2.1-3" "@N" 1 0 0 -
7.491
COMMENT                                     26.0426 7.64103 0.846154 #215#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #217={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 25 {7 25 0} 1 2 0 0 Nil -736 100)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #218={CLine
COMMENT                                     (CWidget 0 {3 #11# 0} 1 2 0 0 #167#
18088376
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.835356
5.28402
COMMENT                                     5.40641)
COMMENT                                     #219={CLabel (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
polyA"

```

도면64r

```

COMMENT                                "@N" 1 0 0 -12.2962 9.57581 3.79487
0.846154
COMMENT                                #218#)
COMMENT                                #220=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #28# 0) 1 2 0 0 #167#
18088384
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.670712
3.60216
COMMENT                                3.72719)
COMMENT                                #221=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37126836 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
poly A"
COMMENT                                "@N" 1 0 0 -5.16093 27.3093 4.02564
0.846154
COMMENT                                #220#)) (CObjectList))
COMMENT                                #222=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 30 (7 30 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #223=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #15# 0) 1 2 0 0 #164#
28358516
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                0.509093 1.11209 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                #224=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Promoter (hCMV-MIE)" "@N" 1 0 0
14.3466
COMMENT                                5.77577 7.25641 0.846154 #223#)
COMMENT                                #225=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #24# 0) 1 2 0 0 #164#
196625
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                4.74221 5.27979 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                #226=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37176452 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34

```

도면64s

```

COMMENT          "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT          "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" "@N"
1 0 0
COMMENT          -14.5466 12.1092 11.1795 0.846154
#225#))
COMMENT          (CObjectList))
COMMENT          #227={CGroupWidget
COMMENT          {CWidget 45 {7 45 0} 1 2 0 0 Nil -1015 100}
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #228={CWideArrow
COMMENT          (CWideLine
COMMENT          (CWidget 0 {3 #20# 0} 1 2 0 0 #189#
37110564
COMMENT          100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 5.98725
6.20619 1
COMMENT          0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT          #229={CLabel (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT          (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT          "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT          "Heavy Chain 806 V-Region Insert" "@N"
1 0 0
COMMENT          -19.2693 4.50909 11.2564 0.846154
#228#)
COMMENT          #230={CWideArrow
COMMENT          (CWideLine
COMMENT          (CWidget 0 {3 #23# 0} 1 2 0 0 #189#
37186028
COMMENT          100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 3.96459
4.16401 1
COMMENT          0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT          #231={CLabel
COMMENT          (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT          (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT          "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT          "Light-Chain 806 V-Region insert" "@N"
1 0 0
COMMENT          -10.3851 19.7092 11.0256 0.846154
#230#))
COMMENT          (CObjectList))
COMMENT          #232={CGroupWidget
COMMENT          (CWidget 52 {7 52 0} 1 2 0 0 Nil 18088352
100)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #233={CLine
COMMENT          (CWidget 0 {3 #17# 0} 1 2 0 0 #154#
37060948
COMMENT          100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356
COMMENT          0.445258 0.509093)

```

도면64t

```

COMMENT
COMMENT
18088512 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#233#)
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
1.9
COMMENT
0.082322 1)
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088528 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#235#)
COMMENT
COMMENT
100)
COMMENT
0.082322
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088600 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1
COMMENT
#237#)
COMMENT
COMMENT
268634520
COMMENT
4.67838
COMMENT
4.74221)
COMMENT
COMMENT
COMMENT
18088684 100)
COMMENT
COMMENT
34
COMMENT
"@N" 1

#234=(CLabel
(CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"
0 0 13.5592 4.50909 2.61538 0.846154
#235=(CScratch
(CWidget 0 (3 #19# 0) 1 2 0 0 #154# 0
(LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 0.00896848
0.082322 1)
#236=(CLabel
(CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"
0 0 15.7121 1.97573 2.61538 0.846154
#237=(CScratch
(CWidget 0 (3 #25# 0) 1 2 0 0 #154# 0
(LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 4.24209 1.9
1)
#238=(CLabel
(CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"
0 0 -6.94704 15.9092 2.61538 0.846154
#239=(Cline
(CWidget 0 (3 #27# 0) 1 2 0 0 #154#
100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356
4.74221)
#240=(CLabel
(CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
(LOGPEN 0 0 0) 1
(LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"

```

도면64u

```

COMMENT                                0 0 -8.96711 13.3758 2.61538 0.846154
#239#))
COMMENT                                {ObjectList}}
COMMENT                                #241={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 53 {7 53 0} 1 2 0 0 Nil 18088360
COMMENT                                100)
COMMENT                                {ObjectList
COMMENT                                #242={CWideArrow
COMMENT                                {CWideLine
COMMENT                                {CWidget 0 {3 #13# 0} 1 2 0 0 #152# 0
COMMENT                                100)
COMMENT                                {LOGPEN 0 0 6723840} 1
COMMENT                                {LOGBRUSH 0 10079334 0} 1 2.59031
3.04453 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 1)
COMMENT                                #243={CLabel
COMMENT                                {CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
18088592 100)
COMMENT                                {LOGPEN 0 0 0} 1
COMMENT                                {LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "RNA {beta-lactamase} Amp(R)" "@N" 1 0
0
COMMENT                                6.3624 13.3758 9.74359 0.846154
#242#))
COMMENT                                {ObjectList}}
COMMENT                                #244={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 54 {7 54 0} 1 2 0 0 Nil 268634520
COMMENT                                100)
COMMENT                                {ObjectList
COMMENT                                #245={CWideArrow
COMMENT                                {CWideLine
COMMENT                                {CWidget 0 {3 #14# 0} 1 2 0 0 #152# 0
COMMENT                                100)
COMMENT                                {LOGPEN 0 0 6723840} 1
COMMENT                                {LOGBRUSH 0 10079334 0} 1 1.57476
2.20783 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                #246={CLabel
COMMENT                                {CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #148#
18088520 100)
COMMENT                                {LOGPEN 0 0 0} 1
COMMENT                                {LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "mRNA {GS
cDNA)"
COMMENT                                "@N" 1 0 0 8.63373 10.8425 5.76923
0.846154
COMMENT                                #245#)) {ObjectList}} {ObjectList}}
COMMENT                                #247={CGroupWidget {CWidget 11 {8 0} 1 2 0 0 Nil -1088
COMMENT                                100)
COMMENT                                {ObjectList
COMMENT                                #248={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 1 {10 #0# 0} 1 2 0 0 Nil -1227 100)
COMMENT                                {ObjectList

```

도면64v

```

COMMENT                                #249={CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #0# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322
COMMENT                                1)
COMMENT                                #250={CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
0 100)
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
COMMENT                                18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Bam}HI {5059}" "@N {eS}" 5 0 0 -
4.92823
COMMENT                                28.576 4.07692 0.692308 #249#))
{CObjectList))
COMMENT                                #251={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 1 (10 #1# 0) 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #252={CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #1# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.57318 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #253={CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
0 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Bgl}II {8910}" "@N {eS}" 5 0 0
8.917
COMMENT                                9.57581 3.41026 0.692308 #252#))
COMMENT                                {CObjectList))
COMMENT                                #254={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 1 (10 #3# 0) 1 2 0 0 Nil -320 100)
COMMENT                                {CObjectList
COMMENT                                #255={CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #155# 669
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98303 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #256={CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
18146168 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Fse}I {551}" "@N {eS}" 5 0 0 -
14.4711
COMMENT                                7.04245 2.64103 0.692308 #255#))
COMMENT                                {CObjectList))
COMMENT                                #257={CGroupWidget
COMMENT                                {CWidget 1 (10 #5# 0) 1 2 0 0 Nil 1368 100)
COMMENT                                {CObjectList

```


도면64w

```

COMMENT                                     #258={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 (1 #5# 1) 1 2 0 0 #155#
1170 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.09257 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #259={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37574220 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                     "{\\i Mlu}I {9821}" "@N (@S)" 5 0 0
11.05
COMMENT                                     7.04245 3.25641 0.692308 #258#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #260={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 1 (10 #6# 0) 1 2 0 0 Nil -739 100)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #261={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 (1 #6# 1) 1 2 0 0 #155# 898
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.28296 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #262={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37173948 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                     "{\\i Not}I {1878}" "@N (@S)" 5 0 0 ~
11.7199
COMMENT                                     10.8425 3.17949 0.692308 #261#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #263={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 1 (10 #7# 0) 1 2 0 0 Nil 27987292
100)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #264={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 (1 #7# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.95932 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #265={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37188964 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                     "{\\i Pac}I {4387}" "@N (@S)" 5 0 0 -
6.086
COMMENT                                     23.5093 3.33333 0.692308 #264#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #266={CGroupWidget

```

도면64x

```

COMMENT                                     (CWidget 1 {10 #9# 0} 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                                     {CObjectList
COMMENT                                     #267={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 {1 #9# 1} 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.45919 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #268={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #157#
18088352 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                     "{\\i Sai}I {5335}" "@N {8S}" 5 0 0 -
3.73591
COMMENT                                     29.8427 2.94872 0.692308 #267#))
COMMENT                                     {CObjectList})
COMMENT                                     #269={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 2 {10 #2# 0} 1 2 0 0 Nil -181 100)
COMMENT                                     {CObjectList
COMMENT                                     #270={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 {1 #2# 1} 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.20619 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #271={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147# 393229
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Dra}III {128}" "@N {8S}" 5 0 0 -
15.8185
COMMENT                                     3.24241 3.41026 0.692308 #270#)
COMMENT                                     #272={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 2 {1 #2# 2} 1 2 0 0 #155# 508
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98725 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #273={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147# 945
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Dra}III {543}" "@N {8S}" 5 0 0 -
14.9124
COMMENT                                     5.77577 3.48718 0.692308 #272#))
COMMENT                                     {CObjectList})
COMMENT                                     #274={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 2 {10 #4# 0} 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                                     {CObjectList

```

도면64y

```

COMMENT                                     #275={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 {1 #4# 1} 1 2 0 0 #155#
1393 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.27266 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #276={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147#
37174492 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Hin}dIII (2)" "@N (S)" 5 0 0 -
15.9515
COMMENT                                     1.97573 3.10256 0.692308 #275#)
COMMENT                                     #277={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 2 {1 #4# 2} 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 4.23259 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #278={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147#
28387876 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Hin}dIII (3869)" "@N (S)" 5 0 0
COMMENT                                     -7.71376 17.1759 4.23077 0.692308
#277#))
COMMENT                                     (CObjectList))
COMMENT                                     #279={CGroupWidget
COMMENT                                     (CWidget 2 {10 #8# 0} 1 2 0 0 Nil 1 100)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #280={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 1 {1 #8# 1} 1 2 0 0 #155#
37028212
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1
COMMENT                                     0.082322 1)
4.16401 1.9
COMMENT                                     #281={CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147#
28372436 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Rsr}II (3999)" "@N (S)" 5 0 0 -
7.08453
COMMENT                                     18.4426 3.5641 0.692308 #280#)
COMMENT                                     #282={CScratch
COMMENT                                     (CWidget 2 {1 #8# 2} 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.96459 1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #283={CLabel

```

도면64z

```

COMMENT                                     (CWidget 0 {0 0} 1 2 0 0 #147#
28374716 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "{\\i Rsr}II {4377}" "@N (@S)" 5 0 0 -
6.14723
COMMENT                                     22.2426 3.41026 0.692308 #282#))
COMMENT                                     (CObjectList))) (CObjectList))
COMMENT                                     #284=(CGroupWidget (CWidget 14 {16 0} 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                                     (CObjectList) (CObjectList))
COMMENT                                     #285=(CGroupWidget (CWidget 12 {0 0} 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                                     (CObjectList) (CObjectList))) (CObjectList)))
COMMENT                                     (CSeqView 10 10 {CObjectList} {CObList} 1 {CObList}) {CObList})
1095072823
COMMENT                                     (CStringList) 1145656400 2084918081 {CObList}))
FEATURES                                     Location/Qualifiers
    C_region                               553..1643
                                           /vntifkey="2"
                                           /label=GeneArt\HC\C-Reg
                                           /note="GeneArt human HC C-Reg"
    polyA_signal                           1644..1875
                                           /vntifkey="25"
                                           /label=SV40\polyA
    misc_feature                           7356..7699
                                           /vntifkey="21"
                                           /label=Signal\{SV40E\{and\SV40\ori}}
                                           /note="SV40E {and SV40 ori}"
    misc_RNA                              complement(6121..6981)
                                           /vntifkey="53"
                                           /label=RNA\{beta-lactamase}\Amp(R)
                                           /note="beta-lactamase"
    mRNA                                  7707..8906
                                           /vntifkey="54"
                                           /label=mRNA\{GS\cDNA}
                                           /note="GS cDNA"
    promoter                              9784..10926
                                           /vntifkey="30"
                                           /label=Promoter\{hCMV-MIE}
                                           /note="hCMV-MIE promoter"
    intron                                8909..9760
                                           /vntifkey="15"
                                           /label=Intron\{SV40\intron\+\polyA}
                                           /note="SV40 intron + poly A"
    5'UTR                                  10927..11047
                                           /vntifkey="52"
                                           /label=5'UTR_1
                                           /note="5'UT"
    intron                                11048..11874
                                           /vntifkey="15"
                                           /label=Intron_1
                                           /note="intron"
    5'UTR                                  11875..11891

```

도면64za

```

                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_2
                /note="5'UT"
V_region        128..542
                /vntifkey="45"
                /label=Heavy\Chain\806\V-Region\Insert
modified_base    4315..4315
                /vntifkey="23"
                /label=HtoY
                /note="Histidine-to-Tyrosine change in the 806 Light-Chain
variable CDR3 region"
modified_base    4716..4716
                /vntifkey="23"
                /label=Light-Const.\chg\2.1-3
                /note="Light-chain c-region change 2.1-3"
V_region        3999..4376
                /vntifkey="45"
                /label=Light-Chain\806\V-Region\insert
promoter        1884..2902
                /vntifkey="30"
                /label=Promoter\{hCMV-MIE}\{from\NotI}
                /note="Promoter {hCMV-MIE} {from NotI}"
5'UTR          3851..3867
                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_2
                /note="5'UT"
intron          3024..3850
                /vntifkey="15"
                /label=Intron_1
                /note="intron"
5'UTR          2903..3023
                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_1
                /note="5'UT"
polyA_signal    4827..5063
                /vntifkey="25"
                /label=SV40\poly\A
                /note="SV40 poly A"
C_region        4390..4800
                /vntifkey="2"
                /label=Codon-Optimized\Kappa\Constant\Region
BASE COUNT      3000 a      3039 c      2868 g      2984 t
ORIGIN
1  aagcttgccg ccaccatgga ttggacctgg cgcattctct ttctggtagc agccggccaca
61  ggtaaggggc tgccaaalcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag
121  tcacccagtg aaggggggctt ccattccactc ctgtgtcttc totacagggtg tccacagcca
181  ggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaaactt tgtccctaac
241  atgtactgtg tccggatact ctatctcctc agattttgcg tggatttga taaggcagcc
301  accaggga aaagttagaat ggatgggcta catatcatac ttggggaaca ccagatatca
361  accttctctg aaaagccgga tcacaatctc aagggaacac tcgaagaatc agttcttctt
421  gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgcgtaa ccgtggcag
481  aggtttcccc tattggggac agggcaccct agtgacagtg agcagcggta agatggcaca
541  ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac accgcggta catggcacct
601  ttctcttccc agcctccacc aaggccccca gcgtgttccc cctggccccc agcagcaaga
661  gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gcctggtaga ggactacttc cccgagcccg
721  tgaccgtgag ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgcctgctc

```

도면64zb

```

781 tgcagagcag cggcctgtac agcctgagca gctgtgtgac cgtgccagc agcagcctgg
841 gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga
901 aggtggagcc caagagctgc gacaagacc aocctgccc cccctgccc gcccagagc
961 tgcctgggagg accctcctgc ttccctgtcc ccccacagcc caaggacacc ctgatgatca
1021 gcaggagccc cgaggtgacc tgcgtgtgtg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga
1081 agttcaattg gtatgtggac ggcgtggagg tgcaacaagc caagaaccaag cccagagaag
1141 agcagtacaa cagcacctac aggggtgtgt cctgtgtgac cgtgtgtgac caggactggc
1201 tgaacggcaa ggaatacaaa tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatogaaa
1261 agaccatcag caaggccaaag ggcacgccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccctt
1321 cccgggacga gtgcaccaag aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggttctacc
1381 ccagcgacat cgcctggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca
1441 cccccccagt gctggacagc gacggcagct tcttccctga cagcaagctg accgtggaca
1501 agagcagggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca
1561 aocactacac ccagaagagc ctgagcctgt cccccggcaa gtgtgacga cggcgccgtg
1621 cggacgagcc aattcattga tcataatcag ccataccaca ttgttagagg ttttaottgc
1681 tttaaaaaac ctccacaccc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt
1741 tgttaacttg tttattgacg cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatgt
1801 cacaataaaa gcattttttt cactgtatlc tagttgttgt ttgtccaaac tcattcaatgt
1861 atcttatcat gtctggcggc cgcctgatat tgaataatag gcattatgaa aatgtcggcg
1921 atgtgagttt ctgtgttaact gatatcgcca tttttccaaa agtgattttt gggcatacgc
1981 gatattctgc gatagcgtt atatcgttta cgggggatgg cgtatagcga ctttgtgtac
2041 ttgggcgatt ctgtgtgtgc caaatatcgc agtttccgata taggtgacag acgatatgag
2101 gctatatcgc cgtatagagc gacatcaagc tggcacatgg ccaatgcata tcgatctata
2161 cattgaatca ataltggcca ttgacatalt taltcatttg ttatatagca taaatcaata
2221 ttggctattg gccattgcat acgttgtatc catatcataa tatgtacatt tatattggtc
2281 catgtccaac attacggcca tgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaataaa
2341 ttacgggggt attagtctcat agcccatata tggagttccg cgttacaata cttacggtta
2401 alggcccgcc ttgctgacgc ccaacgcagc cccgccalll gacglcaala atgacglatg
2461 ttcccatagt aacggcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttaccgt
2521 aaactgcca ctgtggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtaogccc cctattgacg
2581 tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt atgccagta catgacctta tgggaotttc
2641 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tgcctattac catggtgatg cggttttggc
2701 agtacatcaa tgggcgttga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca
2761 ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgtg
2821 acaactccgc cccattgacg caaatgggag gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa
2881 gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagagc ccatccacgc tgttttgacc
2941 tccatagaag acacgggac cgalccagcc tccgoggcgg ggaacggtag attggaacgc
3001 ggattccccc tgccaagagt gacgtaaagta ccgcccatag agtctatagg cccaccccct
3061 tggcttctta tgcattgctat actgtttttg gcttggggtc tatcaccccc cgttctctca
3121 tgttataggt gatggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgacctt tattgaccac
3181 tcccctattg gtgacgatac ttccattac taatccataa catggctctt tgcacaaact
3241 ctctttattg gctatatgco aatacactgt ccttcagaga ctgacaogga ctctgtattt
3301 ttacaggatg ggttctcatt tattattttac aaattccat atacaacacc accgtcccca
3361 gtgcccgcag tttttattaa acataacgtg ggaatctcac gcgaatctcg ggtacgtgtt
3421 cgggacatgg gctcttctcc ggttagcggc gagcttctac atccgagccc tgcctccatg
3481 cctccagcga ctcatggtcg ctccggcagct ccttgcctct aacagtgagg gccagactta
3541 ggcacagcac gatgccacac accaccagtg tgcgcacaa ggcctggcgy gtaggggatg
3601 tgtctgaaaa tgaactcggg gagcgggctt gcacccctga cgcattttga agacttaagg
3661 cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag ttgttgtgtt ctgataagag tcagaggtaa
3721 ctcccgttgc ggtgtctgta acggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctctgtgtg
3781 ccgcccgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttctct tccatgggtc
3841 ttttctgcag tcacgtctct tgacacgaag cttgcgcga ccatggattg gacttggaga
3901 atactgttct ttgtagcagc cgcaacaggt aaggggctgc caaatccag ttagggaggaa
3961 gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca agggggcgga ccgcttccat ccaactcctg
4021 gtcttctcta cagggttcta cagtgataat cagatgactc agagtccatc cagcatgtca
4081 gtctccgtgg gagataggtg gacgataacc tgtcattcaa gccaaagcat caactccaat

```

도면64zc

```

4141 attggatggc tccaacagaa gccctggaag tccctcaaa gactaatcta tcaoggaaca
4201 aacttggagc acggcggtgc atcgagattt tcaggggtctg gcagcgggac cgaactataca
4261 ctgacctctt ctactttaca accagaggac ttgtccacat actactgctt ccagtacgct
4321 cagttccccc ggacattlogg cggcggcaca aaactggaaa tcaaacgtga gtagcgggtcc
4381 gtttaattaaa gatcctttcta aactctgagg gggctggatg acgtggccat tgttacttta
4441 acaccatcct gtttgcttct ttcttcagga accgtcgag ctccctccgt gttcaacttc
4501 ccccatcccg acgagcaact gaagtccagg acagcctccg tgggtgtgct ccttaataac
4561 ttttacccaa gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca acgcactaca gagcgggaac
4621 totcaggaaa cgttgacaga gcaggactca aaagattcaa catacagctt atctttctacc
4681 ctgacactgt caaaagctga ttatgaaaag cacaagtat atgctctga agtaactcat
4741 cagggactca gcagccctgt cactaaaagt tttaatagag gcgaatgctg ataaagcggcc
4801 gtgcggacga ccgaattcat tgatcataat cagccatacc acattttgtag aggttttact
4861 tgcttttaaa aaocctccac acctccccc gaacctgaaa cataaatga atgcaattgt
4921 tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcaltacaaa
4981 tttcacaaat aaagcatttt ttctactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa
5041 tgtatcttat catgtcttga tccctctacg cggacgcctc gtggccggca tccccggcgc
5101 cacaggctcg gtttctggcg cctatatcgc cgcactcacc gatggggaag atcgggctcg
5161 ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg
5221 gggactgttg gggccactct ccttgcatcg accatttctt gcggcgccgg tgcctaacgg
5281 cctcaacctc ctactgggct gcttctaat gcaggagtgc cataagggag agcgtcgacc
5341 tcggggccgc ttgtcggcgt ttttccatag gctccggccc cctgacgagc atcacaaaaa
5401 tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc
5461 ccttggaaag tccctgtgtc gctctcctgt tccgaacctg ccgcttaacc gatacctgtc
5521 cgcctttctc ccttcgggaa cgttgggcgt ttctcatagc tcaacgtgta ggtatctcag
5581 ttccggtgtg ctgcttccgt ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccc ttccagccga
5641 ccgctgcgcg ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagc acgacttctc
5701 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag cgggtgtctc
5761 agagtctctg aagtggtlgc ctactacgg ctactactga agaacagtat ttggtatctg
5821 cgcctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagtgtgt agctcttgat ccggcaaaaa
5881 aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa
5941 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tccggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa
6001 ctccagttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcttttt
6061 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat ggtlaaactt ggtctgacag
6121 ttaccaatgc ttaattcagt aggcacctat ctacgcgctc tgtctatttc gttcatccat
6181 agttgcctga ctcccgctcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc
6241 cagtgtctga atgataccgc gagaccacgc ctccaccggc ccagatttat cagcaataaa
6301 ccagccagcc ggaaggggcg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca
6361 gtctattaat tgttcggcgg aagctagagt aagtagttcg ccagttataa gtttgcgcaa
6421 cgttgttgct attgctacag gcctcgttgt gtcacgctcg tcttttggtg ttggttcatt
6481 cagctccggt tcccaacgat caagcgaggt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaaagc
6541 ggttagctcc ttoggtcttc cgalcgttgt cagaagtaag ttggcccgag tgttatcact
6601 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtctat ccattccgta gatgcttttc
6661 tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcat ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg
6721 ctcttgcggc gcgtcaatac gggataatac cgcgcacat agcagaactt taaaagtgtc
6781 catcattgga aaacgtttct cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc
6841 cagttcgtat taacccacto gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag
6901 cgtttctggg tgcagaaaaa caggaaaggca aaatgcgcga aaaaagggaa taaggcgac
6961 acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg
7021 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaaataac aaatagggtt
7081 tccgcgcaca ttccccgaa aagtgcaacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac
7141 attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgcgg cccccatcgt
7201 tcgtaatgtt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggctca
7261 ccttcgggtg ggcctttctg cgtttataag gagacacttt atgtttaaga aggtttgtaa
7321 attccttgcg gctttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaatgtgtgt cagtttaggtt
7381 gtggaaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtalgca aagcatgcat ctcaatttagt
7441 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccacagcag cagaagtatg caaagcaatg

```


도면64zd

```

7501 atctcaatta gtcagcaacc atagtcocgc cccaaactcc gcccatcccg cccclaaactc
7561 cgcocagttc cgcocattct ccgcccacg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg
7621 ccgaggccgc ctccgcctct gagctattcc agaagtagtg agggaggttt tttggaggcc
7681 taggtctttt caaaaaagcta gcttggggcc accgctcaga gcaccttcca ccatggccac
7741 ctccagcaagt tcccacttga acaaaaacat caagcaaatg tactttgtgc tgcgccaggg
7801 tgagaaaagc caagccatgt atacttgggt tgatggtagt ggagaaggac tggcctgcaa
7861 aaccgcgacc ctggactgtg agcccaagtg tctgaagag ttacotgagt ggaattttga
7921 tggctctagt acccttccgt ctgagggcct caacagtac atgtatctca gccctgttgc
7981 catgttttcg gaccctctcc gcagagatcc caacaagctg gtgttctgtg aagttttcaa
8041 gtacacccgg aagcctgcag agaccaattt aaggcactcg tgtaaacgga taatggacat
8101 ggtgagcaac cagcacccct ggtttgggat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga
8161 tgggacccct tttgtttggc cttccaatgg ctttccctgg ccccaaggct cgtattactg
8221 tgggtgtggc gcagacaaag cctatggcag ggtatctgtg gaggctcact accgcgcctg
8281 ctgtatgctt ggggtcaaga ttacaggaac aaatgcttag gtcactcctg cccagtggga
8341 actocaaata ggaacctgtg aaggaalcgc catgggagat catctctggg tggcccgttt
8401 catcttgcac cagataltgt aagacttttg ggtaatagca acctttgacc ccaagcccat
8461 tccctgggaac tggaaatggg caggctgcca taccacattt agcaccaagg ccatgcggga
8521 ggagaatcgt ctgaagcaca tccaggaggg catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccgcta
8581 ccaacttcga gccatcagat ccaagggggg ccttgacaaat gccctgtgtc tgactgggtt
8641 ccacgaacgc cccacacatc acgacttttc tgcgtgtgtc gccaatcgca gtgccagcat
8701 ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa gaaagggttac tttgaagacc gcggcccttc
8761 tgcacattgt gaccctcttg cagtgcaga agccatcctc cgcacatgcc ttctcaatga
8821 gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctlaattagac tttgagtgtt cttcagcctt
8881 tccatgttca tcccaaccgc cccacagagc atctttgtga aggaacctta cttctgtgtg
8941 gtgacataat tggacaaaat accacagag atttaagct ctaaggtaaa tataaaattt
9001 ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaaac
9061 tatgggaact atgaatggga gcagtgtgtt aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc
9121 tcagaagaaa tgcactctag tgalgalgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct
9181 ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggacttct cttcagaatt gctaagtttt
9241 ttgagtcact ctgtgtttag taatagaact cttgtttgtt ttgtatttta caccacaaag
9301 gaaaaagctg cactgctata caagaaaaat atggaaaaat attctgtaac cttataaagt
9361 aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctcacacagc gcataagtg
9421 tctgtctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg
9481 gtttaataagg aatatttgat gtagtagtgc ttgactagag atcataatca gccatccac
9541 attgttagag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac cctccctga acctgaaca
9601 taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttatttga gcttataatg gttacaaata
9661 aagcaatagc atcaaaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgttgg
9721 tttgtccaaa ctcacaaatg tatcttatca tgtctggatc tagcttctg tcaaggacgg
9781 tgactgcagt gaataataaa atgtgtgttt gtcggaataa cgcgttttga gattttctgt
9841 gccgactaaa ttcatgtcgc gcgactgtgg tgtttatcgc cgtatagagt ggcatattg
9901 gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt
9961 aactgatato gccatttttc caaaagtgtt ttttgggcat acgcatatc tggcagatag
10021 gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgacttttg tgaactgggc gattctgtgt
10081 gtcgcaaaaa tgcagtttcc gatataaggt acagacgata tgggctata tgcgcgatag
10141 aggcgacatc aagctggcac atggccaatg calatcgatc tatacattga atcaatattg
10201 gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaaat aatattgggt attggccatt
10261 gcatacgttg tatccatato ataatatgta cttttatatt ggctcattgc caacattacc
10321 gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatatgaa tcaattacgg ggtcattagt
10381 tcatagccca tatattgggt tccggtttac ataatctacg gtaaatggcc cgcctggctg
10441 accgcccacg acccccgcgc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgoc
10501 aatagggaat ttccattgac gtcattgggt ggagtattta cgttaaaact cccacttggt
10561 agtacatcaa gttatccata tgcacagtac gccccctatt gcggtcaatg acggtaaatg
10621 gccgcctcgg cattatgcgc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat
10681 ctacgtatta ttcactcgta ttaccattgt gatgcgggtt tggcagtaca tcaatggcgg
10741 tggatagcgg tttagactac ggggatttcc aagtcctccac cccattgacy tcaatgggag
10801 tttgtttttg caccaaaaat aacgggactt tccaaaatgt cgtaaacact ccgcocccatt

```

도면64ze

```

10861 gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggcttat ataagcagag ctogtttagt
10921 gaaccgtcag atcgcttgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg
10981 ggaaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcatttga acgcggaatt cccgtgccaa
11041 gagtgcagta agtaccgctc atagagtcta tagggccacc ccttggcctt cttatgcagt
11101 ctatactgtt tttggcttgg ggtctatata ccccgcttcc ctcatgttat aggtgatggt
11161 atagcttagc ctatagggtg gggttattga ccaattattg ccactccctt attgtgacg
11221 atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggctata
11281 tgccaatata ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct
11341 cttttattat ttacaaatto acatatacaa caccaccgtc cccagtgcgc gcagttttta
11401 ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctccgggtac tgttccggac atgggctctt
11461 ctccggttagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg
11521 gtcgctccgc agtcccttgc tccaaacagt ggaggccaga cttaggccaca gcacgatgcc
11581 caccaccacc agtgtgcgcg acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaaatgagc
11641 cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaaactt aaggcagcgg cagaagaaga
11701 tgcaggcagc tgaattgttg tgttctgata agagtccagg gtaactcccg ttgcgggtgt
11761 gttaacgggt gagggcagtg tagtctgagc agtaactggt gctgcgcgcg gcgccaccag
11821 acataatago tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtctttttt gcagtcacccg
11881 tccattgacac g

```

//

도면65

경쇄

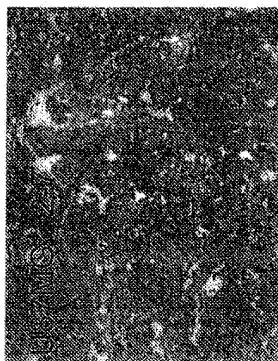
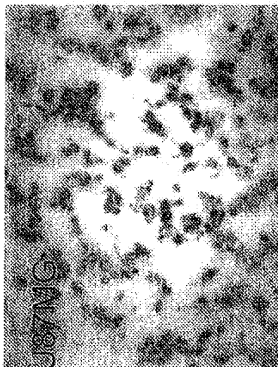
CDR1-806 23HSSQDINSNIG
 CDR1-175 23HSSQDISSNIG
 CDR2-806 49YHGTNLDD
 CDR2-175 49YHGTNLED
 CDR3-806 69VQYQFPWT
 CDR3-175 69VQYQFPWT

중쇄

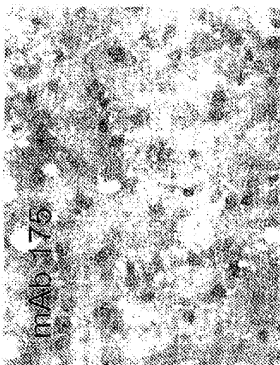
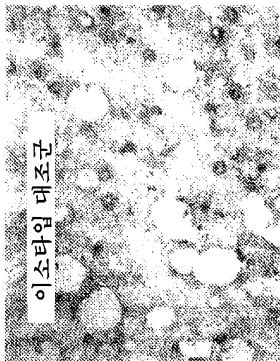
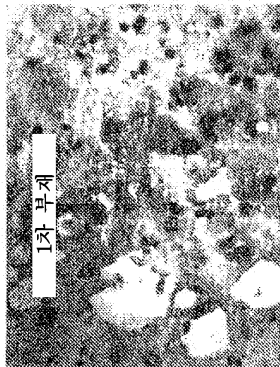
CDR1-806 31SDFAWN
 CDR1-175 31SDYAWN
 CDR2-806 51YISYSGNTRYNPSLKS
 CDR2-175 51YISYSANTRYNPSLKS
 CDR3-806 97VTAGRGFPY
 CDR3-175 97ATAGRGFPY

제 1 잔기 번호가 주어진다.
 밑줄은 EGFR287-302에 접촉하는 잔기를 나타낸다.

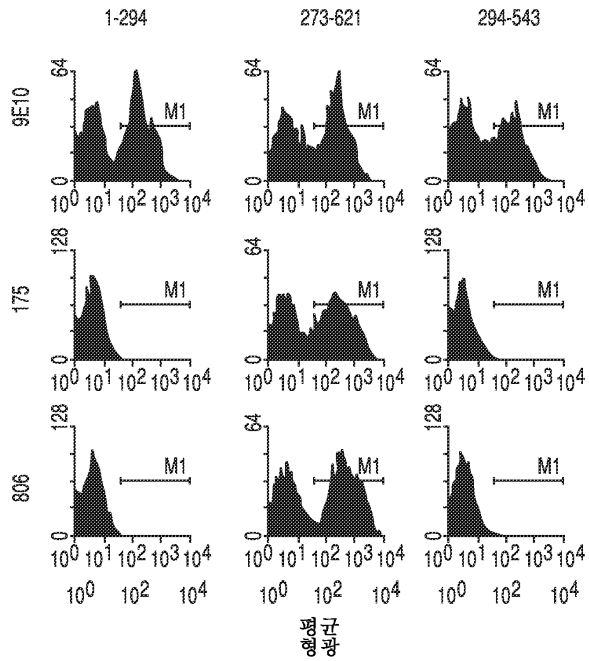
도면66a



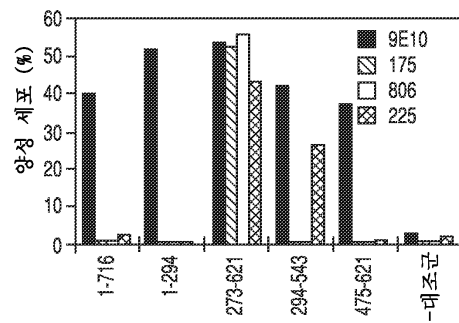
도면66b



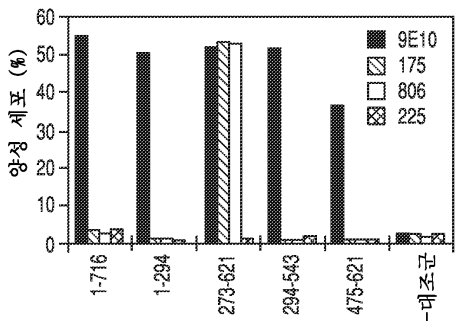
도면67a



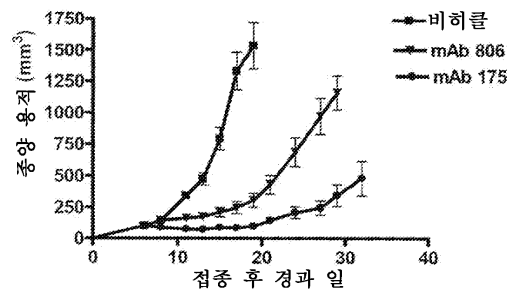
도면67b



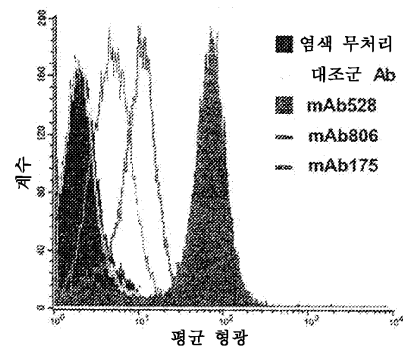
도면67c



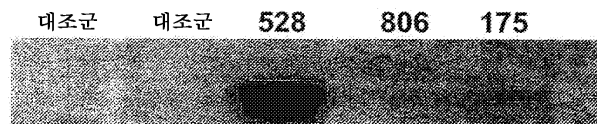
도면68a



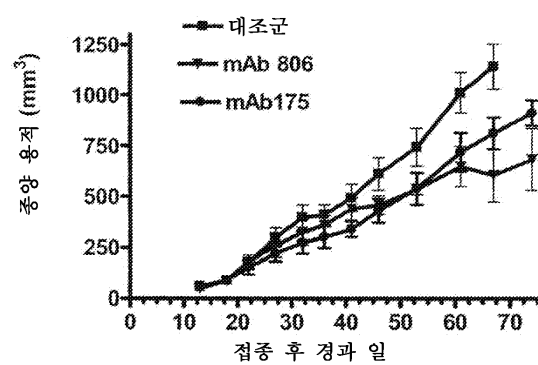
도면68b



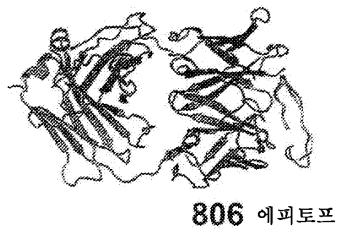
도면68c



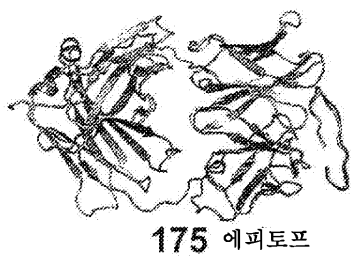
도면68d



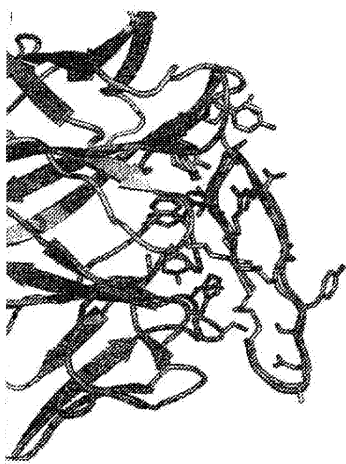
도면69a



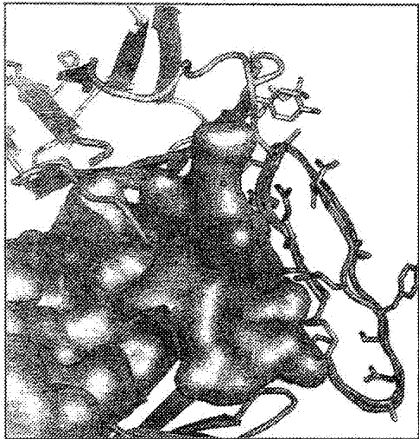
도면69b



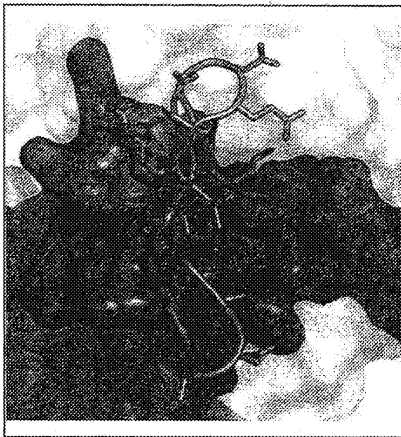
도면69c



도면69d



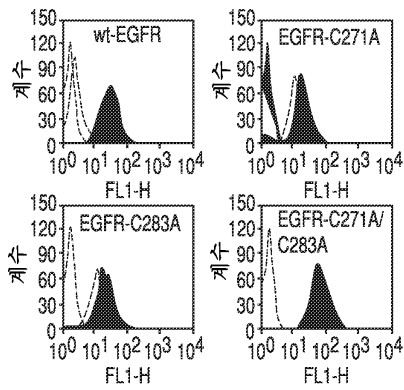
도면69e



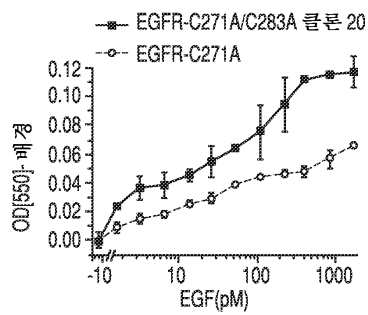
도면69f



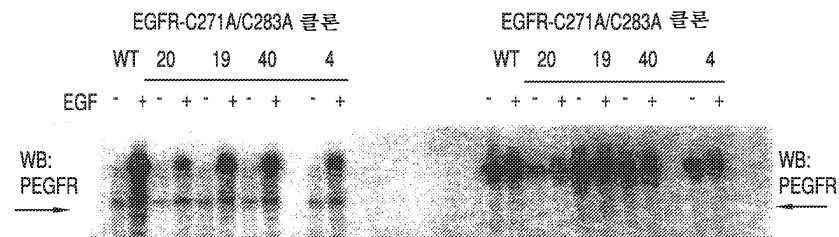
도면70a



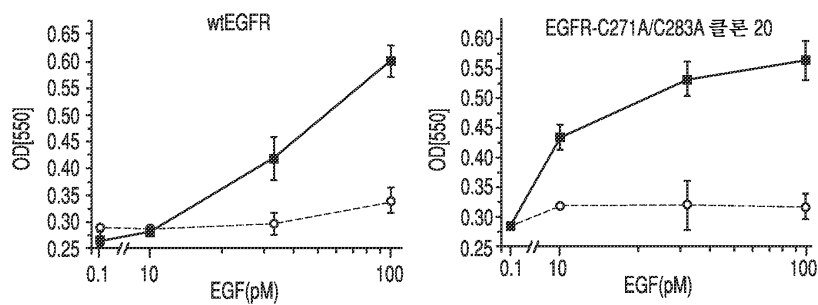
도면70b



도면70c



도면70d



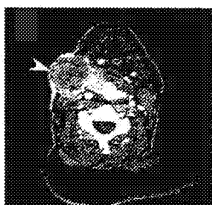
도면71a



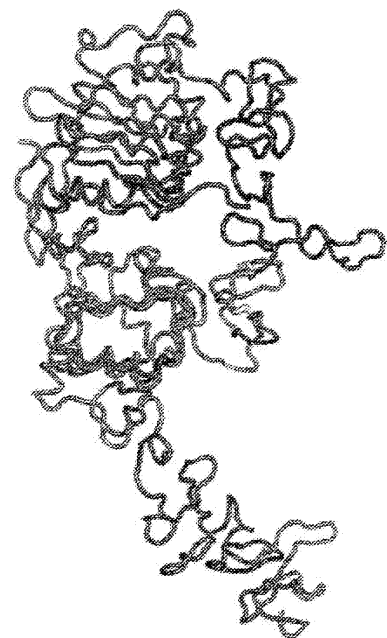
도면71b



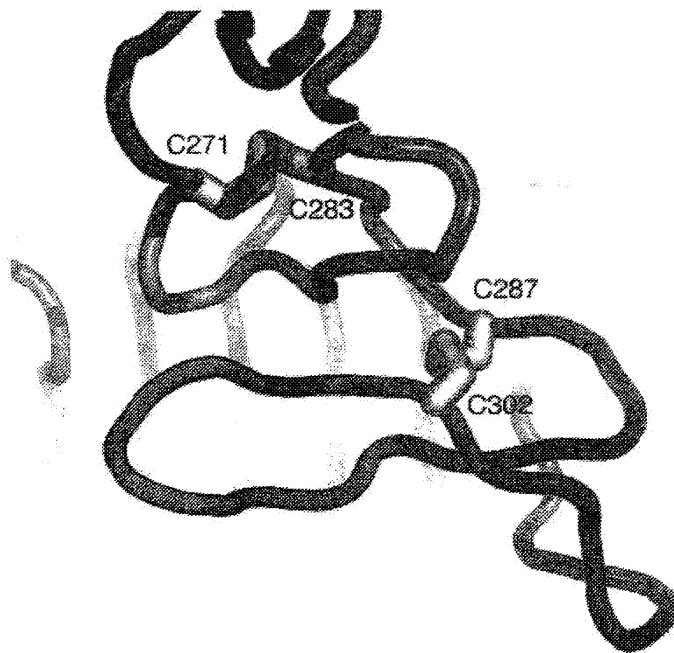
도면71c



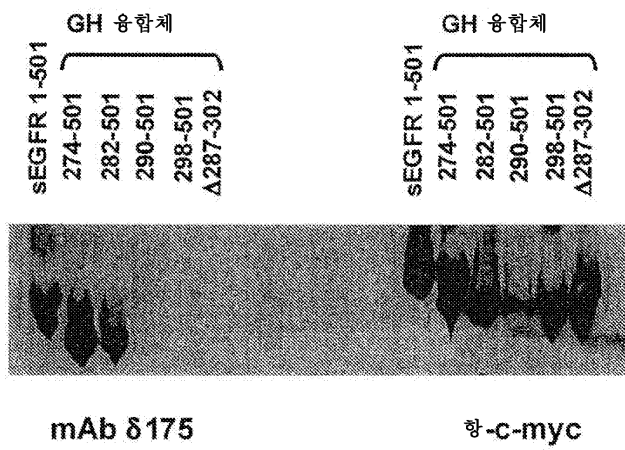
도면72a



도면72b



도면73



도면74a

mAb175 VH 쇠: 해산 및 아미노산 서열

해산 서열

TTAGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTAGCCTGGTGGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGGCACTGTCACTGGCTA
CTCAATCACCAGTGACTATGCCTGGAACCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTACAGTGCTAACACTAGGTACAAACCCATCTCTCAAAAGTCGAACTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATTTC
TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGGCGGGACGGGGGTTTCCTTACT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCC (서열번호 128)

도면74b

mAb175 VH 채: 해산 및 아미노산 서열

아미노산 서열

LVKLQESGPSLVKPSQSLTCTVTGYTSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYISYANTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLN
CDR1
 SVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGLTVTSA (서열번호 129)
CDR3
CDR2

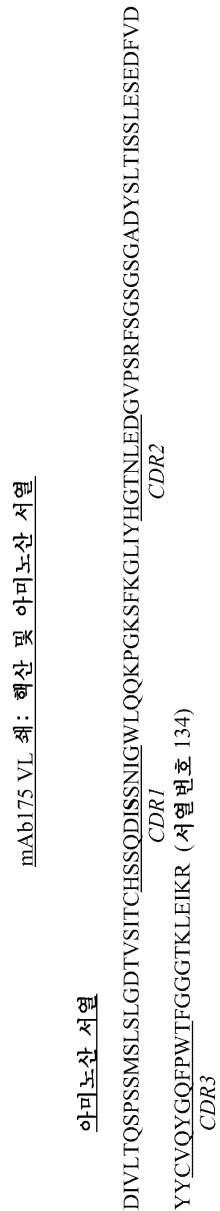
도면75a

mAb175 VL쇄: 헤산 및 아미노산 서열

헤산 서열

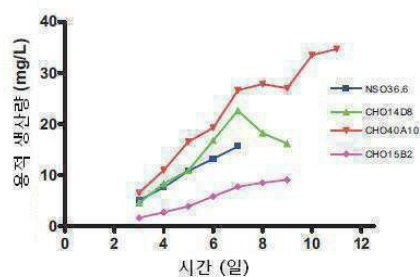
GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCACATTGGCCATTCAAGTCA
GGACATTAAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAATCATTTAAGGGCTGATCTATCATGGAACCAA
CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTACCATCAGCAGCCTGGAA
TCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCCAACCAAGCTGGAAA
TCAAACGG (서열번호 133)

도면75b



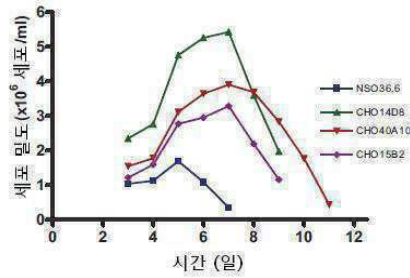
도면76a

소량(100mL) 진탕 플라스크 배양물에 존재하는 GS-CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NS0(36) hu806 형질감염체의 용적 생산량 농도 및 B) 생세포 농도. 생산량 농도는 코팅 항체로서 806 항-유전자형과 표준물로서 ch806 임상 로트: J06024를 이용하여 ELISA로 측정했다.



도면76b

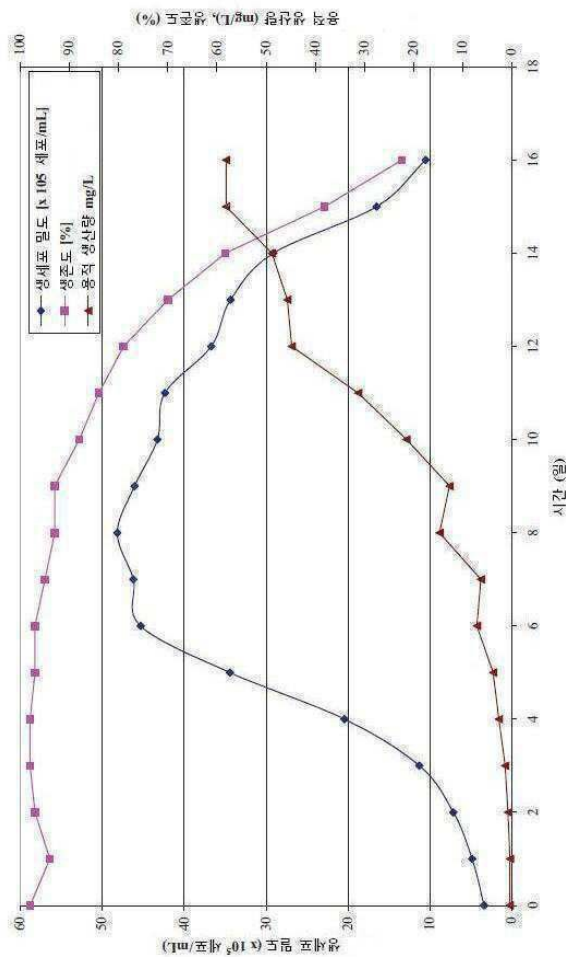
소량(100mL) 진탕 플라스크 배양물에 존재하는 GS-CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NS0(36) hu806 형질감염체의 용적 생산량 농도 및 B) 생세포 농도. 생산량 농도는 코팅 항체로서 806 항-유전자형과 표준물질로서 ch806 임상 로트: J06024를 이용하여 ELISA로 측정했다.



도면76c

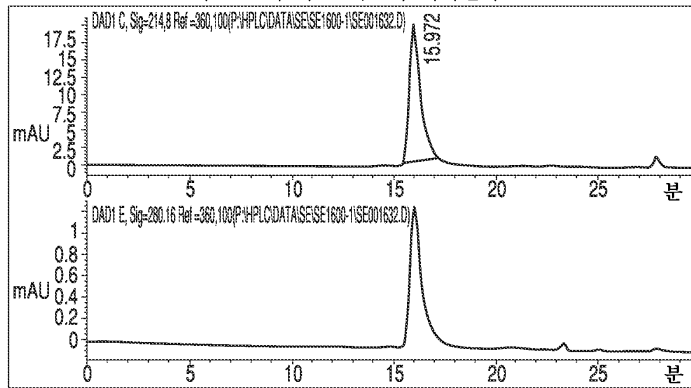
15L 교반 탱크 생물반응기 중의 GS-CHO 40A10 형질감염체 세포 증식 및 용적 생산량. 생세포 밀도(◆) 10⁵ 세포/mL, 세포 생존도(■) 및 생산량(▲) mg/L

15L 교반 탱크 생물반응기 중의 세포 성장 및 용적 생산량



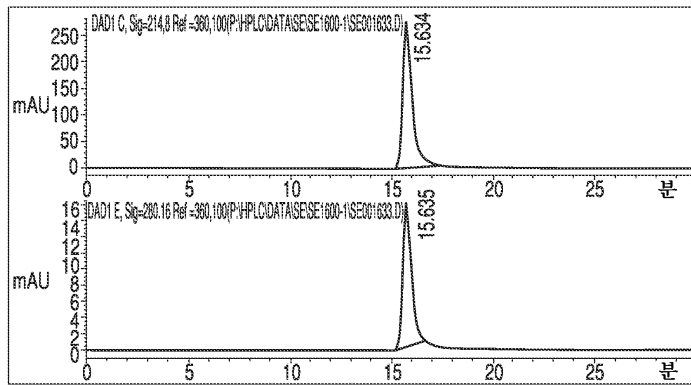
도면77a

소량 배양물에서 생산된 단백질 A-정제된 hu806 항체 작제물 및 대조군 ch806 및 mAb806의 크기 배제 크로마토그래피(Biosep SEC-S3000) 분석. A214nm에서의 크로마토그램은 상단 패널에, A280nm에서의 크로마토그램은 각 도면의 하단 패널에 제시한다.



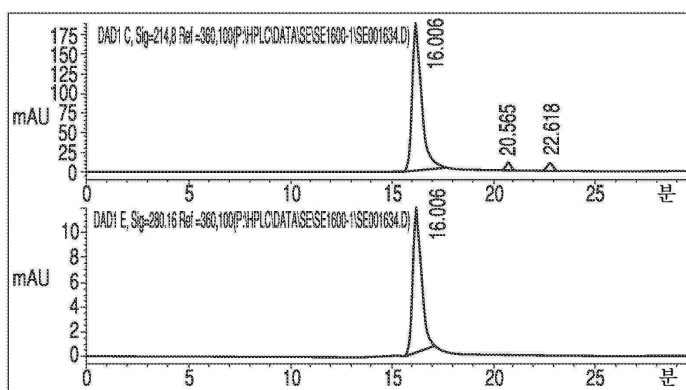
A) 대조군 ch806, 로트 J06024

도면77b



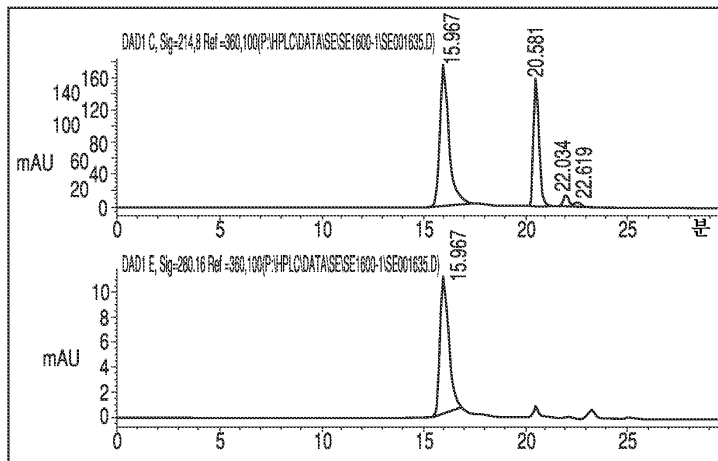
B) 대조군 mAb806

도면77c



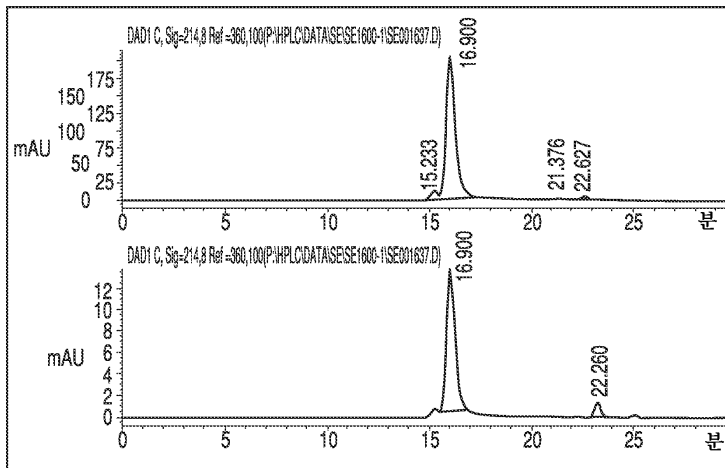
C) 정제된 GS-CHO hu806 14D8 형질감염체 산물

도면77d



D): 정제된 GS-CHO hu806 15B2 형질감염체 산물

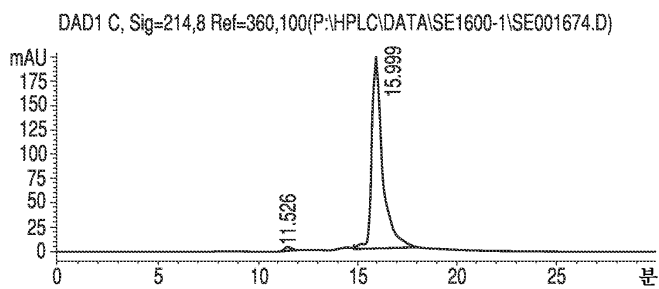
도면77e



E): 정제된 GS-NSO hu806 36 형질감염체 산물

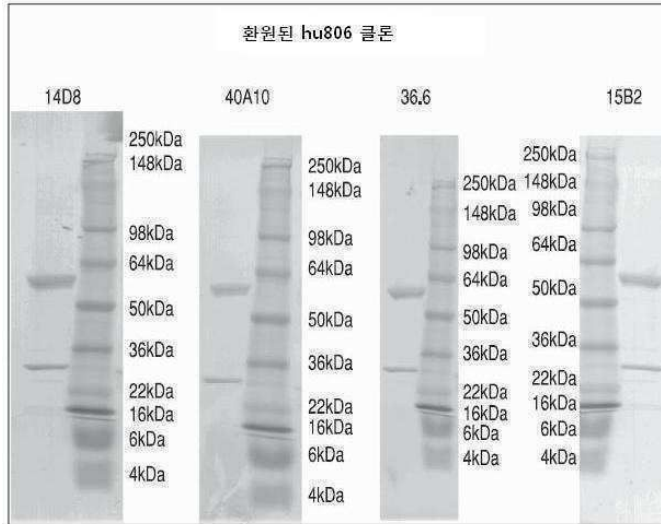
도면78

대량 생산 및 단백질 A 정제 후, 단백질 A-정제된 hu806 항체 작제물 40A10의 크기 배제 크로마토그래피(Biosep SEC-S3000) 분석. A214nm에서의 크로마토그램은 98.8% 순도 및 1.2% 응집물 존재를 나타낸다.



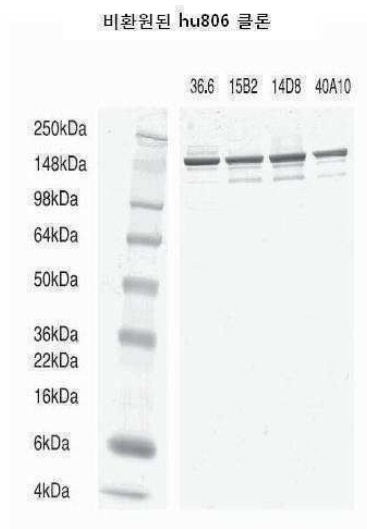
도면79

예비주조된 4-20% 트리스/글리신 겔(Novex, USA 제품)을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여, 정제된 형질감염체 hu806 제조물(5 μ g) GS CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NSO(36) hu806을 환원 조건 하에 분석했다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.



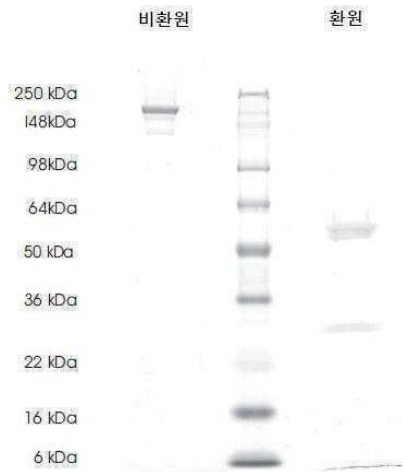
도면80

예비주조된 4-20% 트리스/글리신 겔을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여, 정제된 형질감염체 hu806 제조물(5 μ g) GS CHO(14D8, 15B2 및 40A10) 및 GS-NSO(36)을 비환원 조건 하에 분석했다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.



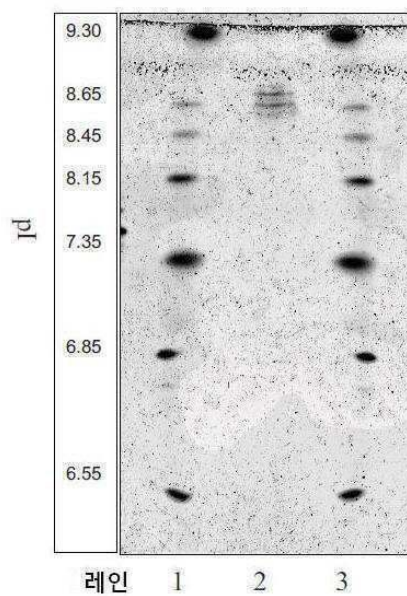
도면81

예비주조된 4-20% 트리스/글리신 겔을 표준 SDS-PAGE 조건 하에 사용하여, 대량 생산 후 정제된 형질감염체 hu806 GS CHO 40A10(5 μ g)을 분석했다. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다.



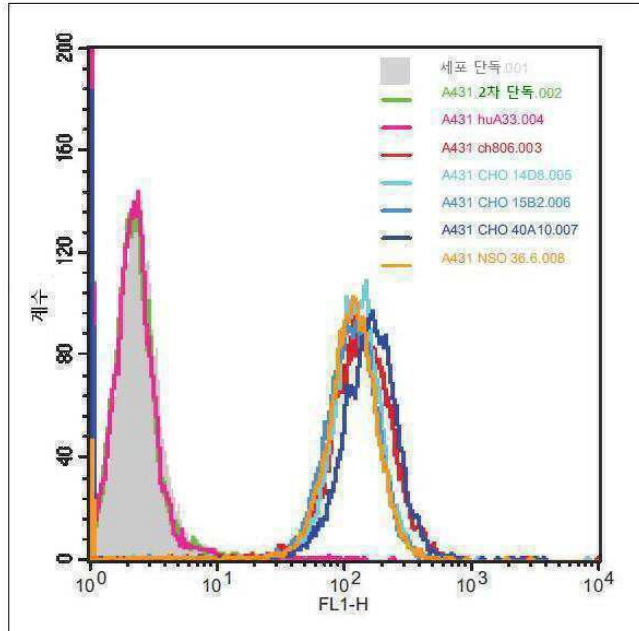
도면82

15L 생산 후, 정제된 형질감염체 hu806 GS CHO 40A10(5 μ g)의 등전초점 겔 분석. 단백질은 쿠마시 블루 염색으로 검출했다. 레인 1, pI 마커; 레인 2, hu806(3가지 이소폼, pI 8.66 내지 8.82); 레인 3, pI 마커



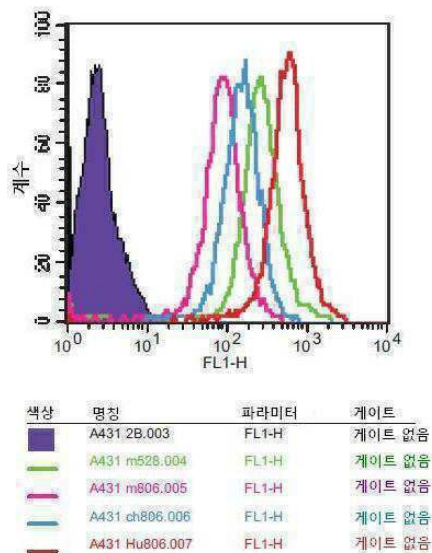
도면83

A431 세포에 대한 결합: 단백질-A 정제된 hu806 항체 제조물(20 $\mu\text{g/ml}$) 및 이소타입 대조군 huA33(20 $\mu\text{g/ml}$)의 유세포측정 분석.
대조군은 2차 항체 단독(녹색) 및 ch806(적색)을 포함한다.
hu806 작제물은 소량 배양으로 생산했다.



도면84

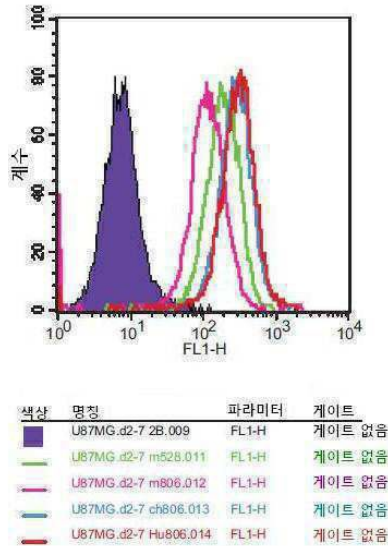
A431 세포에 대한 결합: 세포 표면 위의 야생형 EGFR의 약 10%에 결합하는 정제된 mAb806, ch806 및 hu806 40A10 항체 제조물(20 $\mu\text{g/ml}$), 528(야생형 및 de2-7 EGFR에 결합) 및 제시된 바와 같은 무관한 대조군 항체(20 $\mu\text{g/ml}$)의 유세포측정 분석.



도면85

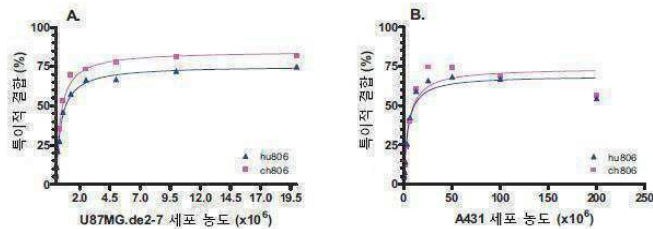
U87MG.de2-7 신경아교종 세포에 대한 결합.

정제된 mAb806, ch806 및 hu806 40A10 항체 제조물(20 μ g/ml) 및 528 항-EGFR 및 무관련 대조군 항체(20 μ g/ml)의 유세포분석 분석.



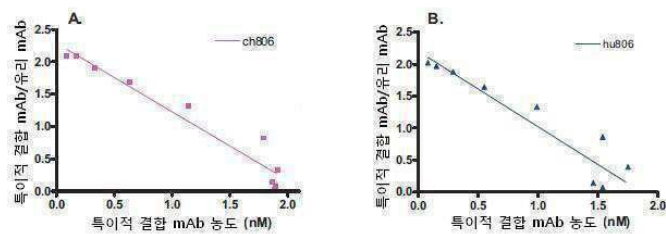
도면86

A) U87MG.de2-7 신경아교종 세포 및 B) A431 암종 세포에 대한 125 I-방사능표지된 806 항체 작성물의 특이적 결합.

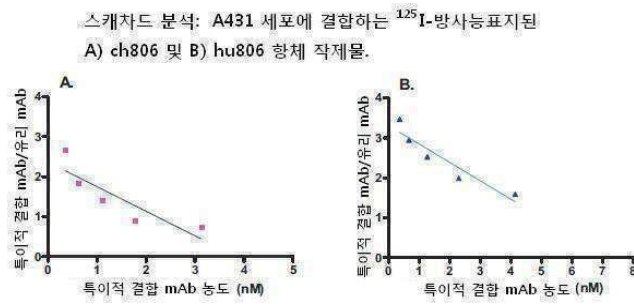


도면87

스캐치드 분석: U87MG.de2-7 세포에 결합하는 125 I-방사능표지된 A) ch806 및 B) hu806 항체 작성물.

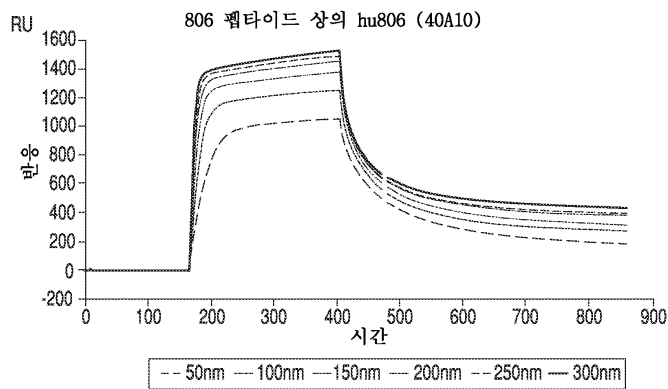


도면88



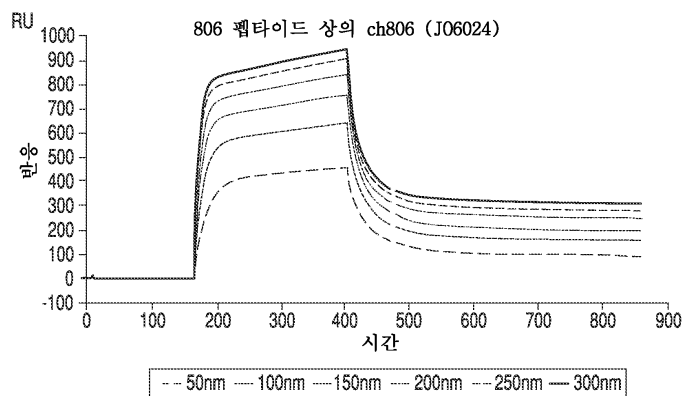
도면89a

50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM 및 300nM로 증가하는 농도의 고정된 펩타이드 위로 통과하는 A) hu806 및 B) ch806의 287-302 EGFR 806 펩타이드 에피토프에 대한 결합의 BIAcore 분석



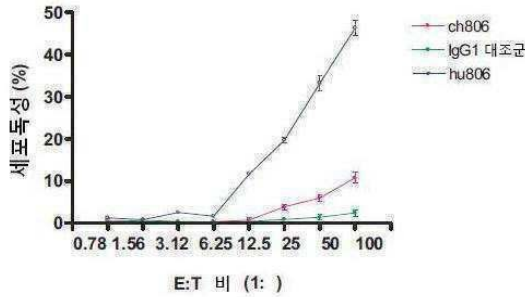
도면89b

50nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM 및 300nM로 증가하는 농도의 고정된 펩타이드 위로 통과하는 A) hu806 및 B) ch806의 287-302 EGFR 806 펩타이드 에피토프에 대한 결합의 BIAcore 분석



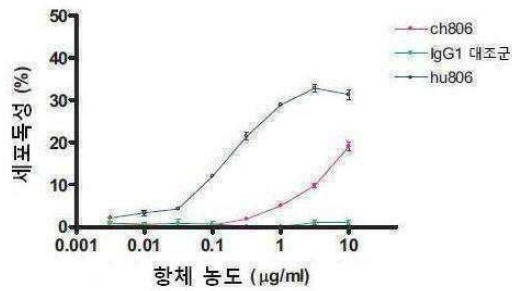
도면90a

A) 다양한 작용인자 대 표적 세포 비(E:T = 0.78:1 내지 100:1)에서 각 항체 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$;
 B) 각 항체의 농도 범위(3.15ng/ml-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 E:T = 50:1
 하에 측정된 표적 A431 세포에 미치는 ch806- 및 hu806- 매개의 항체 의존적 세포 세포독성



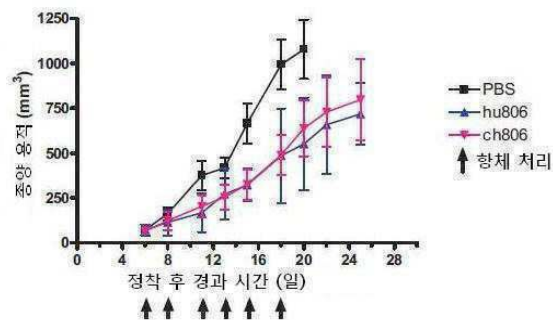
도면90b

A) 다양한 작용인자 대 표적 세포 비(E:T = 0.78:1 내지 100:1)에서 각 항체 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$;
 B) 각 항체의 농도 범위(3.15ng/ml-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 E:T = 50:1
 하에 측정된 표적 A431 세포에 미치는 ch806- 및 hu806- 매개의 항체 의존적 세포 세포독성



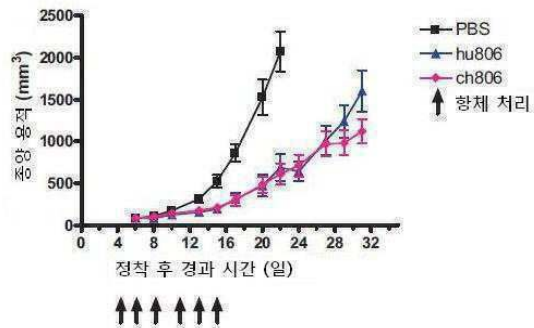
도면91

BALB/c 누드 마우스에 정착된 A431 이종이식편의 처리.
 제시된 바와 같이(화살표) 5마리 마우스 그룹에게 2주 항체 치료법 동안 6 × 1 mg 용량을 투여함.
 연구 종료일까지 평균 ± SEM 중앙 용적이 제시됨.

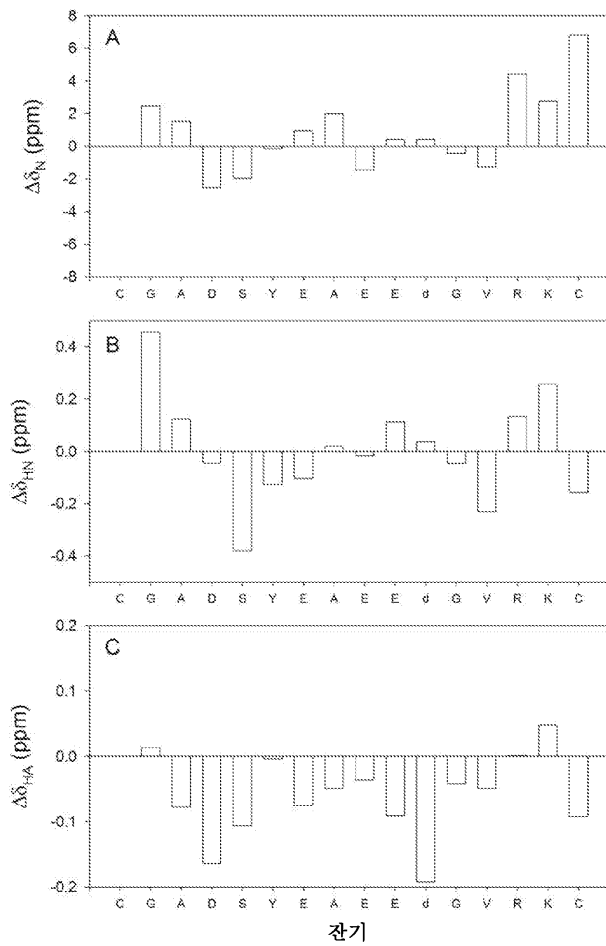


도면92

BALB/c 누드 마우스에 정착된 U87MG.de2-7 이종이식편의 처리.
제시된 바와 같이(화살표) 5마리 마우스 그룹에게 2주 항체 치료법 동안 6×1 mg 용량을 투여함.
연구 종료일까지 평균 \pm SEM 종양 용적이 제시됨.



도면93



도면94a



도면94b



도면94c



도면94d



도면94e



도면94f



도면95a



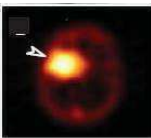
도면95b



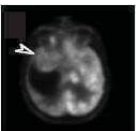
도면95c



도면95d



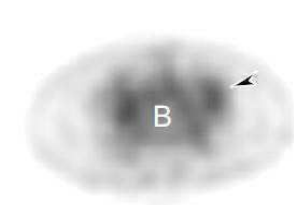
도면95e



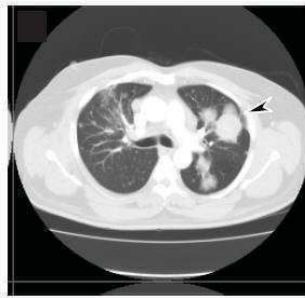
도면95f



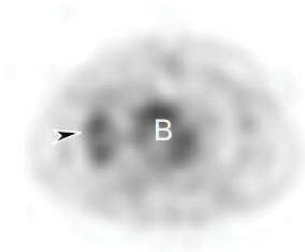
도면96a



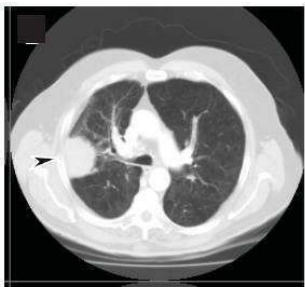
도면96b



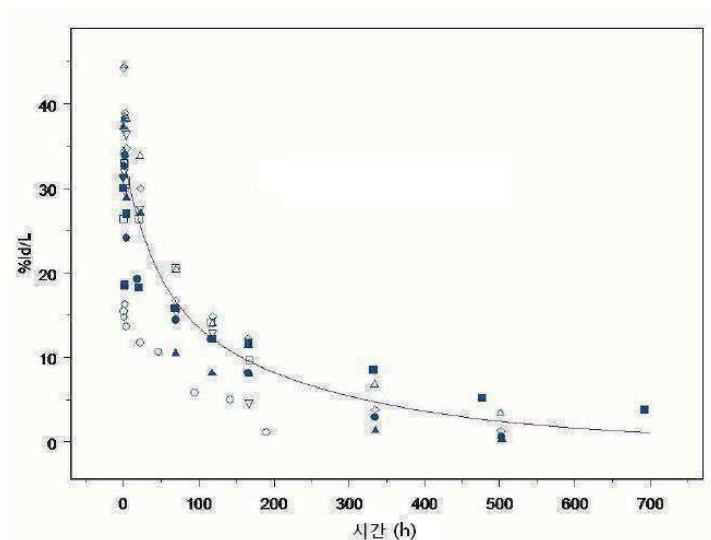
도면96c



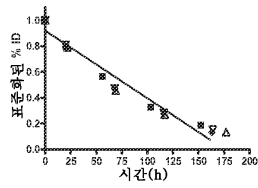
도면96d



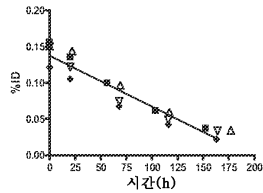
도면97



도면98a



도면98b



서열 목록

<110> Ludwig Institute for Cancer Research Ltd.

<120> Specific binding proteins and uses thereof

<130> 9662W002

<150> US 12/388,504

<151> 2009-02-18

<160> 195

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 402

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtgtcct gtctgatgtg 60

cagcttcagg agtcgggacc tagcctgggtg aaacctttctc agtctctgtc cctcacctgc 120

actgtcactg gctactcaat caccagtgat ttgcctgga actggatccg gcagtttcca 180

ggaaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagtg gtaacactag gtacaacca 240

tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300

ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360

tttccttatt ggggccaagg gactctgggtc actgtctctg ca 402

<210> 2

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

35 40 45

Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ala

130

<210> 3

<211> 384

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atggtgtcca cagctcagtt ccttgcatc ttgttgcttt gggttccagg tgcaaatgt 60

gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120

atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180

gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300

gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgtcagtt ttccgtggac gticggtgga 360

ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Trp Phe Pro

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

65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala
100 105 110
Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> biotinylated at position 1

<400> 5

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His

1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> biotinylated at position 13

<400> 6

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His

1 5 10

<210> 7

<211> 6149

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 7

ctcgagagcg ggcaagtgc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60

ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgttgtgt ggagattgtg agcggataac 120

aatttcacac agaattcgtg aggcctccgt gccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc 180

acagtccccg agaagtggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240

cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg 300

ggagaacgt atataagtc agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc 360

gccagaacac aggtaaagtc cgtgtgtgtt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420

ggccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccttgctg cagtacgtga ttcttgatcc 480

cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccttc 540

gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg 600

gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg 660

acctgctcgc acgtttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca 720

cactggtatt tcggtttttt gggccgcggg cggcgacggg gccctgctg cccagcgcac 780

atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgc gccaccgaga atcgacggg gtagtctca 840

agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgcgccg tgtatcgccc cgccctgggc 900

ggcaaggctg gcccgtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc tccccggccc 960

tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggagg gtgagtcacc 1020

cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta 1080

ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140

ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200

taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc 1260

ttggttcatt ctcaagctc agacagtgg tcaaagttt tttcttccat ttcaggtgta	1320
cgctctcgg gaagcttttag tttaaacgcc gccacatgg tgtccacagc tcagttcctt	1380
gcattcttgt tgctttgggt tccaggtgca agatgtgaca tctgatgac ccaatctcca	1440
tctccatgt ctgtatctct gggagacaca gtcagcatca cttgccattc aagtcaggac	1500
attaacagta atataggggt gttgcagcag agaccaggga aatcatttaa gggcctgac	1560
tatcatgga ccaacttga cgatgaagt ccatcaaggt tcagtggcag tggatctgga	1620
gccgattatt ctctcaccat cagcagcctg gaatctgaag atttgcaga ctattactgt	1680
gtacagcatg ctcagtttcc gtggacgttc ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacgg	1740
gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gttttctgtc tgtccctaac atgccctgtg	1800
attatgcga aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaacacc atcctgtttg	1860
cttctttcct caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttccgcc atctgatgag	1920
cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgt tgctgtctga ataacttcta tcccagagag	1980
gccaaagtac agtgggaagt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc	2040
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa	2100
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg	2160
cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttgagcta gaactaacta actaagctag	2220
caacggtttc cctctagcgg gatcaattcc gcccccccc cctaacttta ctggccgaag	2280
ccgcttggaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgtta tttccacca tattgccgtc	2340
ttttggcaat gtgagggcc ggaacactgg cctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg	2400
tctttccct ctgcctaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc	2460
tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttcaggc agcggaaccc	2520
cccactggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccact gtataagata cacctgcaaa	2580
ggcggcacia cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaattggt	2640
ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg	2700
atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacgtgtgt tagtcagagt taaaaaacgt	2760
ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgata atacatggt	2820
tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggcgcttgg gtggagagc tattcggcta	2880
tgactgggca caacagacia tcggctgtc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca	2940
ggggcgcccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga	3000

cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcggt ccttgcgcag ctgtgctcga 3060
 cgttgcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccg ggcaggatct 3120
 cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 3180
 gctgcatacg ctigatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga 3240
 gcgagcacgt actcggaatg aagccgggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 3300
 tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggtcaag gcgcgcatgc ccgacggcga 3360
 ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgccig cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg 3420

 cttttctgga ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc 3480
 gttagctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggtgacc gcttcctcgt 3540
 gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga 3600
 gttctctga gtcgatcgac ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga tcgcccttc 3660
 caacagtgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgcg 3720
 gcgggtgtgg tggttacgc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcggccgct 3780
 cctttcgctt tcttccttc ctttctcgcc acgttcgccc gctttcccg tcaagctcta 3840

 aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctcga ccccaaaaa 3900
 cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg ccacgcccct gatagacgt ttttcgcctt 3960
 tgacgttga gtccacgttc tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 4020
 accctatctc ggtctattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 4080
 agctgattta acaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgtta caatttaggt 4140
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatatattg tttattttc taaatacatt 4200
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaa 4260

 ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 4320
 gccttactgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 4380
 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtgaagatc cttgagagtt 4440
 ttcgccccga agaactttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcg 4500
 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 4560
 atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatat tacggatggc atgacagtaa 4620
 gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga 4680

 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatggg gatcatgtaa 4740
 ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 4800
 ccacgatgcc ttagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attactggc gaactactta 4860

ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 4920

ttctgcgtc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc 4980

gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 5040

ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga 5100

taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgcagacca agtttactca tatatacttt 5160

agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5220

atctcatgac caaaatccct taacgtgagt ttctgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 5280

aaaagatcaa aggatgttct tgagatcctt tttttctgca cgtaatctgc tgccttcaaa 5340

caaaaaacca ccgtaccag cgggtggtttg ttgcccggat caagagctac caactctttt 5400

tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 5460

gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 5520

ctgtttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag 5580

acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggtgaacg gggggttctg gcacacagcc 5640

cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag 5700

cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac 5760

aggagagcgc acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 5820

gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 5880

atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcttg gccttttgct ggccttttgc 5940

tcacatgttc tttcctgctg tateccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 6000

gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga 6060

agcgggaagag cgcccaatc gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg 6120

caggtatcac gaggcctttt cgtcttcac 6149

<210> 8

<211> 6625

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 8

ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60

ccaggtttta cactttatgc tcccggctcg tatgttgtgt ggagattgtg agcggataac 120

aatttcacac agaattcgtg aggcctccgt gcccgtcagt gggcagagcg cacatgcccc 180

acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240
cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccittttcc cgagggtggg 300
ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgaa cgggtttgcc 360
gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420
ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccttgctg cagtacgtga ttcttgatcc 480
cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgttaag gagccccctc 540

gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg 600
gcaccttcgc gccgtgtcgc ctgctttcga taagtctcta gccatttaaa atttttgatg 660
acctgctgcg acgtttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcgggcc aagatctgca 720
cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac 780
atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga atcgacggg gtagtctca 840
agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgcgcccg tgtatcgccc cgccctgggc 900
ggcaaggctg gcccgtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc 960

tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc 1020
cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc agccgtcgct tcatgtgact ccacggagta 1080
ccgggcgcgc tccaggcacc tcgattagt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140
ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200
taggccagct tggcacttga tgtaattctc ctgtgaattt gccctttttg agtttggatc 1260
ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgta 1320
cgcgtctcgg gaagctttag tttaaagcc gccacatga gagtgtgat tcttttgttg 1380

ctgttcacag cttttctgg tgctctgtct gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc 1440
ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc 1500
agtgattttg cctggaactg gatccggcag ttccaggaa acaagctgga gtggatgggc 1560
tacataagtt atagtggtaa cactaggtac aacctatctc tcaaaagtgc aatctctatc 1620
actcgagaca catccaagaa ccaattcttc ctgcagtga attctgtgac tattgaggac 1680
acagccacat attacttgt aacggcggga cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact 1740
ctggtcactg tctctgcaca gtgagtggat cctctgcgcc tgggcccagc tctgtccac 1800

accgcggtca catggcacca cctctcttgc agcctccacc aagggcccat cggctttccc 1860
cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctggtcaa 1920
ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt 1980
gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac 2040

cgtagccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag	2100
caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc	2160
accgtgcccc gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc ttctctttcc ccccaaaacc	2220
caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag	2280
ccacgaagac cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac ggctgaggagg tgcataacgc	2340
caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtctctac	2400
cgctctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc	2460
cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca	2520
ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg	2580
cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc	2640
ggagaacaac tacaagacca cgctccccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta	2700
cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt	2760
gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa	2820
atgagctaga aactaactaa gctagcaacg gtttccctct agcgggatca attccgcccc	2880
ccccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata	2940
tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg	3000
tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt ccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt	3060
tgaatgtcgt gaaggaagca gttctcttgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag	3120
cgacctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc	3180
cacgtgtata agataccct gcaaaggcgg cacaaccca gtgccacgtt gtgagttgga	3240
tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg	3300
cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacgt	3360
gtgttttagt gaggttaaaa aacgtctagg ccccccgaac cacggggacg tggttttcct	3420
ttgaaaaaca cgataatacc atggttcgac cattgaactg catcgtcgcc gtgtcccaaa	3480
atatggggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc gctcaggaac gagttcaagt	3540
acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tggaaggtaa acagaatctg gtgattatgg	3600
gtaggaaaac ctggttctcc attcttgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaatg	3660
gttcgatata gtctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc	3720
caaaagtttg gatgatgcct taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga	3780
catggttttg atagtcggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca	3840

cctcagactc tttgtgacaa ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttccaga	3900
aattgatttg gggaaatata aacttctccc agaataccca ggcgctcctc ctgaggcca	3960
ggaggaaaaa ggcatcaagt ataagtttga agtctacgag aagaaagact aacaggaaga	4020
tgctttcaag ttctctgctc ccctcctaaa gctatgcatt tttataagac catgggactt	4080
ttgctggctc atcgacctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac	4140
agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg	4200
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt	4260
tcgctttctt ccttctcttt ctgccacgt tcgccggtt tccccgtcaa gctctaaatc	4320
gggggctccc ttiagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg	4380
attagggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcctttgac	4440
gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc	4500
tatctcggtc tatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct	4560
gatttaacaa aatttaacgc gaattttaac aaaatatata cgcttacaat ttaggtggca	4620
cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tattgttta ttttctaaa tacattcaaa	4680
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa	4740
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtgc cttattccc ttttttgcgg cattttgcct	4800
tactgttttt gctcaccagc aaacgttgtt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg	4860
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggc aagatccttg agagttttcg	4920
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt	4980
atcccgatct gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga	5040
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatattacg gatggcatga cagtaagaga	5100
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac	5160
gatcgaggga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg	5220
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac	5280
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct	5340
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct	5400
gcgctcgccc cttccggctg gctggtttat tctgataaaa tctggagccg gtgagcgtgg	5460
gtctcgggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccttcccgtc tcgtagtatt	5520
ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaat agacagatcg ctgagatagg	5580

tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat 5640
 tgatttaaaa cticattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct 5700
 catgacaaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 5760
 gatcaaagga tgttcttgag atcctttttt tctgcacgta atctgctgct tgcaaacaaa 5820
 aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg 5880
 aaggtaactg gcttcagcag agcgagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag 5940
 ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaactctg 6000

ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta ccgggttgga ctcaagacga 6060
 tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 6120
 ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 6180
 acgcttccc aaggagagaaa ggccgacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 6240
 gagcgcacga gggagcttcc aggggggaaac gcctggatc tttatagtcc tgcgggttt 6300
 cgccacctct gacttgagcg tcatgttttg tgatgctcgt caggggggcg gacccatgg 6360
 aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc ttttgcac 6420

atgttctttc ctgcgttacc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 6480
 gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gagcgagcg agtcagttag cgaggaagcg 6540
 gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc ccgcgcggtt ggccgattca ttaatgcagg 6600
 tatcacgagg ccctttcgtc ttcac 6625

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 9

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

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

Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
 35 40 45

Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
 50 55 60

Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65 70 75 80

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

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
100 105 110

Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 10

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 10

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
1 5 10 15

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

20	25	30	
Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr			
35	40	45	
Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu			
50	55	60	
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro			
65	70	75	80
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln			
85	90	95	
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr			
100	105	110	
Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
115	120	125	
Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
130	135	140	
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
145	150	155	160
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
165	170	175	
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
180	185	190	
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Tyr Ser Val Pro Ser Ser Ser			
195	200	205	
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
210	215	220	
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
225	230	235	240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
245	250	255	
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
260	265	270	

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

275 280 285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

340 345 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

405 410 415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

1 5 10 15

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

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

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

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

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

100 105

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 13

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His

1 5 10

<

210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 14

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ser Asp Phe Ala Trp Asn

1 5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 21

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180

aacctatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
cgcggtttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 26

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 26

gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn

20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 28

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30

Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 31

gatgtgcagc ttcaggggtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60

acctgcactg tctactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag 120

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagct acagtggtaa cactagatac 180

aacctatctc tcagaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240

ctgcagttag attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300

cgcggatttc cttactgggg ccaagggact ctggctactg tctctgca 348

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Asp Val Gln Leu Gln Gly Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 35

<211>

> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 36

<211> 322

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 36

gacatcctga tgacccaatc tccatcctcc atgtctgtgt ctctgggaga cacagtcaac 60

atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120

gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240

gaggattttg cagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaatcaa ac 322

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Asn Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn

20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile

35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 38

<

211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 39

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 41

<211> 11891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 41

aagcttgccg ccacatgga ttggacctgg cgcattctct ttctggtagc agccgccaca	60
ggtaaggggc tgccaaatcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag	120
tcacccagtg aagggggctt ccatccactc ctgtgtcttc tctacagtg tccacagcca	180
gggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaactt tgtccctaac	240
atgtactgtg tccggatact ctatctcatc agattttgcg tggaattgga taaggcagcc	300
accagggaaa ggtttagaat ggatgggcta catatcatac tctgggaaca ccagatatca	360
accttctctg aaaagccgga tcacaatctc aaggacacg tcgaagaatc agttcttcct	420
gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgcgtaa ccgctggcag	480
aggcttcccc tattggggac agggcaccct agtgacagtg agcagcggta agatggcaca	540
ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtccac accgcggtca catggcacct	600
tttctcttc agcctccacc aagggcccca gcgtgttccc cctggccccc agcagcaaga	660
gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccc	720
tgaccgtgag ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc	780
tcgagagcag cggcctgtac agcctgagca gcgtgggtgac cgtgcccagc agcagcctgg	840
gcaccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga	900
aggtggagcc caagagctgc gacaagacc acacctgccc cccctgccca gcccagagc	960
tgctggggcg accctccgtg ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca	1020
gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga	1080
agttcaattg gtatgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag	1140
agcagtacaa cagcacctac aggggtgggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc	1200

tgaacggcaa ggaatacaaa tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaaa	1260
agaccatcag caaggccaag ggccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccct	1320
cccggaacga gtgcaccaag aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc	1380
ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca	1440
ccccccagt gctggacagc gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca	1500
agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca	1560
accactacac ccagaagagc ctgagcctgt ccccggaac gtgatgacga cgcggccgtg	1620
cggacgaccg aattcattga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc	1680
tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt	1740
tgtaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt	1800
cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgttgt ttgtccaaac tcatcaatgt	1860
atcttatcat gtctggcggc cgccgatat tgaaaatag gcatattgaa aatgtcgccg	1920
atgtgagttt ctgtgtaact gatatcgcca tttttccaaa agtgattttt gggcatacgc	1980
gatatctggc gatagcgctt atatcgttta cgggggatgg cgatagacga ctttggtgac	2040
ttgggcgatt ctgtgtgtcg caaatatcgc agtttcgata taggtgacag acgatatgag	2100
gctatatcgc cgatagagcg gacatcaagc tggcacatgg ccaatgcata tcgatctata	2160
cattgaatca atattggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata	2220
ttggctattg gccattgcac acgttgtatc catatcataa tatgtacatt tatattggct	2280
catgtccaac attaccgcca tgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa	2340
ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagtccg cgttacataa cttacggtaa	2400
atggcccgcc tggtgacgc ccacaacgacc ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg	2460
ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt	2520
aaactgcccc ctggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg	2580
tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta tgggactttc	2640
ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc	2700
agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca	2760
ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaac ggactttcca aaatgtcgta	2820
acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa	2880
gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc	2940

tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc	3000
ggattcccc tgccaagagt gacgtaagta ccgcctatag agtctatagg cccaccccct	3060
tggtcttcta tgcatgctat actgtttttg gcttggggtc tatacacccc cgcttcctca	3120
tgttataggt gatggtatag cttagcctat aggtgtgggt tattgacat tattgaccac	3180
tcccctattg gtgacgatac ttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact	3240
ctctttattg gctatatgcc aatacactgt ccttcagaga ctgacacgga ctctgtattt	3300
ttacaggatg gggctctcatt tattattttac aaattcacat atacaacacc accgtcccca	3360
gtgcccgcag tttttattaa acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt	3420
ccggacatgg gcctttctcc ggtagcggcg gagctttctac atccgagccc tgctcccatg	3480
cctccagcga ctcatggctg ctgcgcagct ccttgctcct aacagtggag gccagactta	3540
ggcacagcac gatgcccacc accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggtatg	3600
tgtctgaaaa tgagctcggg gagcgggctt gcaccgctga cgcatttgga agacttaagg	3660
cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag ttgttgtgtt ctgataagag tcagaggtaa	3720
ctcccgttgc ggtgctgtta acgggtggagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcggtgctg	3780
ccgcgcgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttcctt tccatgggtc	3840
ttttctgcag tcaccgtcct tgacacgaag ctgcccga ccatggattg gacttggaga	3900
atactgtttc ttgtagcagc cgcaacaggt aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa	3960
gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca agggggcgga ccgcttccat ccactcctgt	4020
gtcttctcta caggtgttca cagtgatatt cagatgactc agagtccatc cagcatgtca	4080
gtctccgtgg gagatagggg gacgataacc tgcattcaa gccaaagacat caactccaat	4140
attggatggc tccaacagaa gcctggtaag tccttcaaag gactaatcta tcacggaaca	4200
aacttggacg acggcgtgcc atcgagattt tcagggtctg gcagcgggac cgactataca	4260
ctgaccatct ctagcttaca accagaggac ttgcccacat actactgcgt ccagtacgct	4320
cagttcccct ggacattcgg cggcggcaca aaactggaaa tcaaactgta gtagcggtec	4380
gttaattaaa gatccttcta aactctgagg gggtcggatg acgtggccat tgttacttaa	4440
acaccatcct gtttgcttct ttctcagga accgtcgcag ctccctccgt gttcatcttc	4500
cccccatccg acgagcaact gaagtcaggc acagcctccg ttggtgtcct ccttaataac	4560
ttttaccaa gagaggccaa agtccagtgg aaagtggaca acgcactaca gagcgggaac	4620
tctcaggaaa gcgtgacaga gcaggactca aaagattcaa catacagcct atcttctacc	4680
ctgacactgt caaaagctga ttatgaaaag cacaaagtat atgcctgtga agtaactcat	4740
cagggactca gcagccctgt cactaaaagt tttaatagag gcgaatgctg ataagcggcc	4800

gtgcggacga ccgaattcat tgatcataat cagccataacc acattttag aggttttact	4860
tgctttaaaa aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt	4920
tgttgtaac ttgtttatg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa	4980
tttcacaaat aaagcatttt ttctactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa	5040
tgatatcttat catgtctgga tectctacgc cggacgcac gtggccggca tcaccggcgc	5100
cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg	5160
ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg	5220
gggactgttg ggcgccatct ccttgcacgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg	5280
cctcaacctt ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgacc	5340
tcgggcccgc ttgctggcgt tttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa	5400
tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc	5460
ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttacg gatacctgtc	5520
cgctttctc cttcgggaa gcgtggcgt ttctcatagc tcacgtgta ggtatctcag	5580
ttcgggttag gtcgttcgt ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga	5640
ccgtgcgc ttatccggt actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgactatc	5700
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac	5760
agagtcttg aagtgtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg	5820
cgctctgctg aagccagtt ccttcggaaa aagagtggg agctcttgat ccggcaaaca	5880
aaccaccgt ggtagcgtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaa	5940
aggatctcaa gaagatcct tgatctttc tacgggtct gacgctcagt ggaacgaaa	6000
ctcacgttaa gggattttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatccttt	6060
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaacta aagtatatat gagtaacct ggtctgacag	6120
ttaccaatgc ttaatcagt aggacatat ctacgcatc tgtctatttc gttcatccat	6180
agttgcctga ctccccgtg ttagataaac tacgatacgg gagggcttac catctggccc	6240
cagtctgca atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat cagcaataaa	6300
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca	6360
gtctattaat ttttgccggg aagctagagt aagtagtgc ccagtaata gtttgcgcaa	6420
cgttgttgcc attgctacag gcatcgtgt gtcacgctc tcgtttggta tggcttcatt	6480
cagctccgt tcccaacgat caagcgagt tacatgatcc ccatgttgt gcaaaaaagc	6540
ggttagctcc ttccgtctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tttatcact	6600
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgctttc	6660

tgtagctggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg	6720
ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt	6780
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc	6840
cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatcttta ctttcaccag	6900
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaggca aatgccgca aaaaaggga taaggcgac	6960
acggaaatgt tgaatactca tactcttctt tttcaatat tattgaagca tttatcagg	7020
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt	7080
tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac	7140
attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgcgg cacccatcgt	7200
tcgtaatgtt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggtca	7260
ccttcgggtg gccctttctg cgtttataag gagacacttt atgtttaaga aggttggtaa	7320
attccttgcg gctttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaatgtgtgt cagttagggt	7380
gtggaaagtc ccaggtctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt	7440
cagcaaccag gtgtggaaa tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc	7500
atctcaatta gtcagcaacc atagtccgc ccctaactcc gcccatccg ccctaactc	7560
cgcccagttc cgccattct cgcgccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg	7620
ccgaggccgc ctggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc	7680
taggcttttg caaaaagcta gcttggggcc accgctcaga gcaccttcca ccatggccac	7740
ctcagcaagt tccacttga acaaaaacat caagcaaatg tacttgtgcc tgccccagg	7800
tgagaaagtc caagccatgt atatctgggt tgatggact ggagaaggac tgcgctgcaa	7860
aaccgcacc ctggactgtg agcccaagtg tgtagaagag ttacctgagt ggaattttga	7920
tggtcttagt acctttcagt ctgagggtc caacagtac atgtatctca gccctgttc	7980
catgtttcgg gaccccttcc gcagagatcc caacaagctg gtgttctgtg aagttttcaa	8040
gtacaaccgg aagcctgcag agaccaattt aaggcactcg tgtaaacgga taatggacat	8100
ggtgagcaac cagcaccctt ggtttggaat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga	8160
tgggcaccct tttggttggc cttccaatgg ctttctggg cccaaggtc cgtattactg	8220
tgggtgtggc gcagacaaag cctatggcag ggatatctg gaggtcact accgcgcctg	8280
cttgtatgct ggggtcaaga ttacaggaac aatgctgag gtcatgcctg ccagtgggga	8340
actcaaata ggacctgtg aaggaatccg catgggagat catctctggg tggcccgttt	8400

catcttgcac cgagtatgtg aagactttgg ggtaaatagca accittgacc ccaagcccat	8460
tcctgggaac tggaatgggtg caggctgccca taccaacttt agcaccaagg ccatgcggga	8520
ggagaatggt ctgaagcaca tcgaggaggc catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggta	8580
ccacattcga gcctacgac ccaagggggg cctggacaat gcccggtgtc tgactgggtt	8640
ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc tgctggtgtc gccaatcgca gtgccagcat	8700
ccgcatcccc cggactgtcg gccaggagaa gaaaggttac tttgaagacc gcggccctc	8760
tgccaattgt gacccctttg cagtgcacaga agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga	8820
gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac tttgagtgtat cttgagcctt	8880
tcctagtcca tcccaccccg cccagagag atctttgtga aggaacctta cttctgtggt	8940
gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt	9000
tttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc	9060
tatggaaactg atgaatggga gcagtgggtg aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc	9120
tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgtcg actctcaaca ttctactcct	9180
ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt	9240
ttgagtcacg ctgtgtttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta caccacaaag	9300
gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac ctttataagt	9360
aggcataaca gttataatca taacatactg tttttctta ctccacacag gcatagagtg	9420
tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg	9480
gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca gccataccac	9540
attttagtag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac ctccccctga acctgaaaca	9600
taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata	9660
aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg	9720
tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc tagcttcgtg tcaaggacgg	9780
tgactgcagt gaataataaa atgtgtgttt gtccgaaata cgcgttttga gattttctgc	9840
gccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagtgg tgtttatcgc cgatagagat ggcgatattg	9900
gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcataat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt	9960
aactgatatc gccatttttc caaaagtgat ttttgggcat acgcgatatc tggcgatagc	10020
gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgactttgg tgacttgggc gattctgtgt	10080
gtcgcaaata tcgcagtttc gatataagggt acagacgata tgaggctata tcgccgatag	10140
aggcgacatc aagctggcac atggccaatg catatcgatc tatacattga atcaatattg	10200
gccattagcc atattattca ttgggtatat agcataaatc aatattggct attggccatt	10260

gcatacgttg tatccatatac ataatatgia catttatatt ggctcatgtc caacattacc 10320
gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt 10380
tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg 10440
accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc 10500

aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg cccacttggc 10560
agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg 10620
gccccctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcaagtacat 10680
ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg 10740
tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag 10800
tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt 10860
gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggctctat ataagcagag ctcgtttagt 10920

gaaccgtcag atcgccctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg 10980
ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgccaa 11040
gagtgcagta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc ccttggctt cttatgcatg 11100
ctatactgtt ttggcttgg ggtctataca ccccccttc ctcatgttat aggtgatggt 11160
atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccactccct attggtgacg 11220
atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggtata 11280
tgccaatata ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct 11340

catttatatt ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgcc gcagttttta 11400
ttaaacataa cgigggatct ccacgcgaat ctcggtgacg tgttccggac atgggctctt 11460
ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gcctgtctcc catgcctcca gcgactcatg 11520
gtcgtcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc 11580
caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct 11640
cggggagcgg gcttgaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga 11700
tgcaggcagc tgagttgttg tgttctgata agagtcagag gtaactccg ttgcggtgct 11760

gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag 11820
acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg 11880
tccttgacac g 11891

<210> 42

<211> 135

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 42

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile

35 40 45

Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 43

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Cys Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 44

Ser Asp Phe Ala Trp Asn

1 5

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 45

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 46

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 47

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 47

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val

20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile

35 40 45

Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys

50 55 60

Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln

100 105 110

Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 48

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

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

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 49

His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 50

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 51

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 52

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 52

gagaagcttg ccgccacat ggattggacc tggcgcatc 40

<210> 53

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 53

cccttcctcc tcaactgggat ttggcagccc cttacctgtg gcgctgcta ccagaaagag 60

aatgcgccag gtccaatcc 79

<210> 54

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 54

cccagtgagg aggaagggat cgaaggcac catcgaagcc agtcaagggg gcttccatcc 60

actcctgtgt cttctctac 79

<210> 55

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 55

gactcggett gacaagccca ggtccactct cttggagctg cacctggctg tggacacctg 60

tagagaagac acaggagtgg 80

<210> 56

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 56

gggcttgta agccgagta aactttgtcc ctaacatgta ctgtgtccgg atactctatc 60

tcatcagatt ttgcgtggaa ttgg 84

<210> 57

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 57

cccagagtat gatagttagc ccatccattc taaacctttc cctggtggct gccttatcca 60

attccacgca aaatctgatg 80

<210> 58

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 58

gggctacata tcatactctg ggaacaccag atatcaacc tctctgaaaa gccggatcac 60

aatcactagg gacacgtcg 79

<210> 59

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 59

gcagtaatat gttgctgtgt ctggggctgt aacggagttc agctgcagga agaactggct 60

cttcgacgtg tccctagtga ttg 83

<210> 60

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 60
ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag 60
ggcaccctag tgacagtgag c 81
<210> 61
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 61
cacggatcca tcttaccgct gctcactgtc actagggtg 39
<210> 62
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 62
gagaagcttg ccgccacat ggattg 26
<210> 63
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 63
ctgggatttg gcagcccctt acctgttgcg gctgctacaa gaaacagtat tctccaagtc 60
caatccatgg tggcggcaag 80
<210> 64
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 64
ggggctgcca aatcccagtg aggaggaagg gatcgaaggt gaccatcgaa gccagtcaag 60
ggggcttcca tccactcc 78

<210> 65
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 65
 catgctggat ggactctgag tcatctgaat atcactgtga acacctgtag agaagacaca 60
 ggagtggatg gaagccc 77
 <210> 66
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 66
 ctacagatcc atccagcatg tcagtctccg tgggagatag ggtgacgata acctgtcatt 60
 caagccaaga catcaactcc 80
 <210> 67
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 67
 gtccgtgat agattagtc tttgaaggac ttaccaggct tctgttggag ccatccaata 60
 ttggagttga tgtcttggct tg 82
 <210> 68
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > synthetic oligonucleotide
 <400> 68
 caaaggacta atctatcacg gaacaaactt ggacgacggc gtgccatcga gattttcagg 60
 gtctggcagc gggaccgact atac 84
 <210> 69

<211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 69
 gtgctggacg cagtagtatg tggcaaagtc ttctggctct aagctagaga tggtcagtgt 60
 atagtcgggc ccgctg 76
 <210> 70
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 70
 catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg 60
 aaatcaaacg tgagtaggg 79
 <210> 71
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 71
 ctcgatccc tactcacgtt tgatttcc 28
 <210> 72
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 72
 gacggatcct tctaaactct gagggggtcg gatgacg 37
 <210> 73
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 73

ggagctgcga cggttcctga ggaaagaagc aaacaggatg gtgtttaagt aacaatggcc 60

acgtcatccg accccctc 78

<210> 74

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 74

ggaaccgtcg cagctccctc cgtgttcac ttcccccat ccgacgagca actgaagtca 60

ggcacagcct ccgtggtg 78

<210> 75

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 75

gtgcgtgtgc cactttccac tggactttgg cctctcttgg gtaaaagta ttaaggaggc 60

acaccacgga ggctgtgc 78

<210> 76

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 76

gtggaaagtg gacaacgcac tacagagcgg gaactctcag gaaagcgtga cagagcagga 60

ctcaaaagat tcaacataca gcc 83

<210> 77

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 77
cttcacaggc atataccttg tgcttttcat aatcagcttt tgacagtgtc agggtagaag 60
ataggctgta tgttgaatct tttgagtc 88
<210> 78
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 78
gcacaaggta tatgcctgtg aagtaactca tcagggactc agcagccctg tcactaaaag 60

ttttaataga g 71
<210> 79
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic oligonucleotide
<400> 79
cctgcggccg cttatcagca ttgcctcta ttaaaacttt tggtagagg g 51
<210> 80
<211> 1128
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 80
aagatggcac accgtggccg gcctctgcgc ctgggcccag ctctgtccca caccgcggtc 60
acatggcacc ttttctcttc cagcctccac caagggcccc agcgtgttcc ccctggcccc 120

cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgcttggtga aggactactt 180
ccccgagccc gtgacctga gctggaacag cggagccctg acctccggcg tgacacacctt 240
ccccgccgtg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc agcgttggtga ccgtgcccag 300
cagcagcctg ggcaccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagcca gcaacaccaa 360
ggtggacaag aaggtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc ccccctgccc 420
agccccagag ctgctgggcg gaccctccgt gtctctgttc cccccaagc ccaaggacac 480

cctgatgatac agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtgggtg gtggacgtga gccacgagga 540

cccagaggtg aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa 600

gcccagagaa gagcagtaca acagcaccta cagggtgggtg tccgtgctga ccgtgctgca 660

ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa atgcaaggtc tccaacaagg ccctgccagc 720

ccccatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac 780

cctgcccccc tcccgggacg agtgcaccaa gaaccaggtg tccctgacct gtctggtgaa 840

gggtttctac ccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa 900

ctacaagacc accccccagc tgctggacag cgacggcagc ttcttctgt acagcaagct 960

gaccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga 1020

ggccctgcac aaccactaca ccagaagag cctgagcctg tcccccgca agtgcagcgc 1080

acgcggccgt gcggacgacc gaattcattg atcataatca gccatacc 1128

<210> 81

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 81

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile

35 40 45

Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys

 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Cys Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 82
 <211> 209
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 82
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
 20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
 35 40 45
 Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys

 50 55 60
 Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser

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

115 120 125
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205
 Lys

<210> 83

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 83

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

20 25 30
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
 35 40 45
 Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
 50 55 60
 Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln

[illegible]

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

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

145 150 155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

210 215

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

Cys Val Gln His Ala Gln Phe

1 5

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe

1 5

<210> 86

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 86

ccacatacta ctgcgtccag tacgctcagt tcccctggac 40

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 87

ctggacgcag tagtatgtgg 20

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 88

gagaagcttg ccgccaccat ggattg 26

<210> 89

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 89

cactgggtga ctggcttcga tggtagacc 28

<210> 90

<211> 49

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 90
 ggtcaccatc gaagccagtc acccagtga gggggcttcc atccactcc 49
 <210> 91
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 91
 ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgetgc tcac 44
 <210> 92
 <211> 22

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 92
 gagaagcttg ccgccacat gg 22
 <210> 93
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 93
 cggctcgcgc ccttgactgg cttcg 25
 <210> 94
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 94
 cgaagccagt caagggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45

<210> 95

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 95

ccaagatctt taattaacgg accgctactc acgtttgatt tccagttttg

50

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr

1 5

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 97

Ser Val Thr Ala Pro Asp Thr

1 5

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 98

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

1 5

<210> 99

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer
 <400> 99
 ctgcagctga actccgttac agccgcagac acagcaacat attactgcg 49
 <210> 100
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 100
 cgcagtaata tgttgctgtg tctgcggctg taacggagtt cagctgcag 49
 <210> 101

 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 101
 Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Phe Leu Gln
 1 5 10
 <210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 102
 Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
 1 5 10
 <210> 103
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 103
 ggtcaccatc gaagccagtc acccagtga gggggcttcc atccactcc 49

<210> 104
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 104
 gattcttcga cgtgtccctt gagattgtga tccggctttt cagag 45
 <210> 105
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 105
 caaggacac gtcgaagaat cagttcttcc tgaaactgaa ctccgttaca gccgc 55
 <210> 106
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 106
 ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgtgc tcac 44
 <210> 107
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 107
 Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 1 5
 <210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 108

Ser Ser Leu Gln Pro Glu

1 5

<210> 109

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 109

cgaagccagt caagggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45

<210> 110

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 110

ctctggttgt aagctagaga tggtcagtgt atag 34

<210> 111

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 111

ccatctctag cttacaacca gaggactttg ccacatacta ctgcg 45

<210> 112

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 112

ccaagatctt taattaacgg accgtactc acgtttgatt tccagttttg 50

<210> 113

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 113

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

1 5

<210> 114

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 114

ggcggcacaa aactggaaat c 21

<210> 115

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 115

gatgagttac ttcacaggca tatactttgt gcttttcata atcagctttt gacagtgtc 59

<210> 116

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 116

agtatatgcc tgtgaagtaa ctcata 26

<210> 117

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic primer

<400> 117

gccacgatgc gtccggc 17

<210> 118
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 118
 gcacttgatg taattctcct tgg 23

<210> 119
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 119
 gaagtagtcc ttgaccagg 19

<210> 120
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 120
 gaagatgaag acagatggtg cag 23

<210> 121
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer
 <400> 121
 cggtaggagg cagtgtagtc 20

<210> 122
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic primer

<400> 122	
gtgatgctat tgctttatTT g	21
<210> 123	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic primer	
<400> 123	
catacctacc agttctgcgc c	21
<210> 124	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic primer	
<400> 124	
ccatcctggt tgcttctttc c	21
<210> 125	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic primer	
<400> 125	
gacagggctg ctgagtc	17
<210> 126	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic primer	
<400> 126	
gtgcagctcc aagagagtgg ac	22
<210> 127	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic primer

<400> 127

cagagtccat ccagcatgtc 20

<210> 128

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 128

ttagtcaagc tgcaggagtc tggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
acctgcactg tctactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180
aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
cgcggttttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca 360

ccc 363

<210> 129

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Val Ser Ala
 115

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

<210> 131

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 131

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

1 5 10 15

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 133

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 133

gacattgtgc tgacceagtc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60

atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120

gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180

aggttcagtgc gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 134

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ile

20 25 30

Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr

35 40 45

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 136

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 137

Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 138

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 138

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys

1 5 10 15

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 139

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 140

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 141

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 142

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 142

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 143

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Phe Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 144

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

1 5 10 15

Ser

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 145

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 146

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 146

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 147

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 148

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 149

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5 10

<210> 150

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 150

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg

1 5 10 15

Ser

<210> 151

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is an amino acid residue having an uncharged polar R group

<400> 151

His Ser Ser Gln Asp Ile Xaa Ser Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is an amino acid residue having a charged polar R group

<400> 152

His Gly Thr Asn Leu Xaa Asp

1 5

<210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa is selected from the group consisting of Ala, Gly, and an
 amino acid residue which is conservatively substituted for Ala or
 Gly
 <400> 153
 Val Gln Tyr Xaa Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 154
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

 <223> Xaa is selected from the group consisting of Phe, Tyr, and an
 amino acid residue which is conservatively substituted for Phe or
 Tyr
 <400> 154
 Ser Asp Xaa Ala Trp Asn
 1 5
 <210> 155
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa is an amino acid residue having an uncharged polar R group

<400> 155

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 156

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from the group consisting of Gly, Ala, and an amino acid residue which is conservatively substituted for Gly or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is selected from the group consisting of Gly, Ala, and an amino acid residue which is conservatively substituted for Gly or

Ala

<400> 156

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

1 5 10 15

<210> 157

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is a basic amino acid residue

<400> 157

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Xaa Ser

1 5 10 15

<210> 158

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is selected from the group consisting of Val, Ala, and an amino acid residue which is conservatively substituted for Val or Ala

<400> 158

Xaa Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr

1 5

<210> 159

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is an amino acid residue having an uncharged polar R group

<400> 159

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 160

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 160

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Trp Phe Pro

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser

20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
50 55 60

Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65 70 75 80

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

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
100 105 110

Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 161

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic vector

<400> 161

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45

Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ala

130

<210> 162

<211> 11891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid

<400> 162

ttcgaacggc ggtggtagct aacctggacc gcgtaagaga aagaccatcg tcggcgggtgt 60

ccattccccg acggttttagg gtcactcttc ctccctagc ttccagtggg agcttcgggc 120

agtgggtcac ttccccgaa ggtaggtgag gacacagaag agatgtccac aggtgtcggg 180

ccacgtcgag gttctctcac ctggaccgga acagttcggc tcagtttgaa acagggattg 240

tacatgacac aggcctatga gatagagtag tctaaaacgc accttaacct attccgtcgg 300

tggctcccttt ccaaattcta cctacccgat gtatagtagt agacccttgt ggtctatagt 360

tggaagagac ttttcggcct agtgtagtag ttccctgtgc agcttcttag tcaagaagga 420

ctttgacttg aggcaatgtc ggcgtctgtg tcgttgtata atgacgcatt ggcgaccgtc 480

tccgaagggg ataacccttg tcccgtggga tcaactgtcac tcgtcgccat tctaccgtgt 540

ggcaccggcc ggagacgcgg acccggtcg agacagggtg tggcgccagt gtaccgtgga 600

aaagagaagg tcggaggtag ttcccggggt cgcacaaggg ggaccggggg tcgtcgttct 660

cgtggtcgcc gccgtgtcgg cgggaccgga cggaccactt cctgatgaag gggctcgggc 720

actggcactc gacctgtcgc cctcgggact ggaggccgca cgtgtggaag gggcggcacg 780

acgtctcgtc gccggacatg tcggactcgt cgcaccactg gcacgggtcg tcgtcggacc 840

cgtgggtctg gatgtagacg ttgcacttgg tgttcgggtc gttgtggttc cacctgttct 900

tccacctcgg gtctcgcagc ctgttctggg tgtggacggg ggggacgggt cggggtctcg 960

acgacccgcc tgggaggcac aaggacaagg gggggttcgg gttcctgtgg gactactagt 1020

cgctcggggg gtcaccactg acgcaccacc acctgcactc ggtgtcctcg ggtctccact 1080

tcaagttaac catacacttg ccgcacctcc acgtgttcg gttctggttc gggctctctc 1140

tcgtcatgtt gtcgtggatg tcccaccaca ggcacgactg gcacgacgtg gtcctgaccg 1200

acttgccgtt ccttatgttt acgttccaga ggttggttccg ggacgggtcgg gggtagcttt	1260
tctggtagtc gttccggttc ccggtcgggt ccctcggggg ccacatgtgg gacgggggga	1320
gggccctgct cacttggttc ttgggccaca gggactggac agaccacttc ccgaagatgg	1380
ggtcgtgta gcggcacctc accctctcgt tgccgggtcgg gctcttggt atgttctggt	1440
gggggggtca cgacctgctg ctgccgtcga agaaggacat gtcgttcgac tggcacctgt	1500
tctcgtccac cgtcgtcccg ttgcacaagt cgacgtcgca ctacgtgctc cgggacgtgt	1560
tggatgatgt ggtcttctcg gactcggaca gggggccgtt cactactgct gcgccggcac	1620
gcctgctggc ttaagtaact agtattagtc ggtatggtgt aaacatctcc aaaatgaacg	1680
aaattttttg gaggggtgtg aggggggactt ggactttgta ttttacttac gtaacaaca	1740
acaattgaac aaataacgtc gaatattacc aatgtttatt tcgttatcgt agtgtttaaa	1800
gtgtttatct cgtaaaaaaa gtgacgtaag atcaacacca aacaggtttg agtagttaca	1860
tagaatagta cagaccgccc gcggctataa acttttatac cgtataactt ttacagcggc	1920
tacactcaaa gacacattga ctatagcggg aaaaagggtt tcactaaaaa cccgtatgcg	1980
ctatagaccg ctatcgcgaa tatagcaaat gccccctacc gctatctgct gaaaccactg	2040
aaccgcctaa gacacacagc gtttatagcg tcaaagctat atccactgtc tgctatactc	2100
cgatatagcg gctatctccg ctgtagtctg accgtgtacc ggttacgtat agctagatat	2160
gtaacttagt tataaccggt aatcggtata ataagtaacc aatatatcgt atttagttat	2220
aaccgataac cggtaacgta tgcaacatag gtatagtatt atacatgtaa atataaccga	2280
gtacagggtt taatggcggg acaactgtaa ctaataactg atcaataatt atcattagtt	2340
aatgccccag taatcaagta tcgggtatat acctcaaggc gcaatgtatt gaatgccatt	2400
taccgggcgg accgactggc ggggttgctgg gggcgggtaa ctgcagttat tactgcatac	2460
aagggtatca ttgcggttat ccctgaaagg taactgcagt taccacctc ataaatgcca	2520
tttgacgggt gaaccgtcat gtagttcaca tagtatacgg ttcatgcggg ggataactgc	2580
agttactgcc atttaccggg cggaccgtaa tacgggtcat gtactggaat accctgaaag	2640
gatgaaccgt catgtagatg cataatcagt agcgataatg gtaccactac gccaaaaccg	2700
tcatgtagtt accgcacct atcgccaaac tgagtcccc taaagggtca gaggtggggt	2760
aactgcagtt accctcaaac aaaaccgtgg ttttagttgc cctgaaaggt ttacagcat	2820
tgttgaggcg gggtaactgc gtttaccgc catccgcaca tgccaccctc cagatatatt	2880
cgtctcgagc aaatcacttg gcagtctagc ggacctctgc ggtaggtgcg acaaaactgg	2940

aggtaatcttc tgtggccctg gctaggtcgg aggcgccggc ccttgccacg taaccttgcg	3000
cctaaggggc acggtttctca ctgcattcat ggcggatata tcagatatcc gggtagggga	3060
accgaagaat acgtacgata tgacaaaaac cgaacccagc atatgtgggg gcgaaggagt	3120
acaatatcca ctaccatata gaatcggata tccacacca ataactggta ataactggtg	3180
aggggataac cactgctatg aaaggtaatg attaggtatt gtaccgagaa acggtgttga	3240
gagaaataac cgatatacgg ttatgtgaca ggaagtctct gactgtgcct gagacataaa	3300
aatgtcctac ccagagtaa ataataaatg ttttaagtga tatgttgtgg tggcaggggt	3360
cacgggcgtc aaaaataatt tgtattgcac cctagagggt cgcttagagc ccatgcacaa	3420
ggcctgtacc cgagaagagg ccatcgccgc ctccaagatg taggctcggg acgagggtac	3480
ggaggtcgct gactaccagc gagccgtcga ggaacgagga ttgtcacctc cggcttgaat	3540
ccgtgtcgtg ctacgggtgg tggtaggtcac acggcgtgtt ccggcaccgc catccatac	3600
acagactttt actcgagccc ctgcgccgaa cgtggcgact gcgtaaacct tctgaattcc	3660
gtcgccgtct tcttctacgt ccgtcgactc aacaacacaa gactattctc agtctccatt	3720
gagggcaacg ccacgacaat tgccacctcc cgtcacatca gactcgtcat gagcaacgac	3780
ggcgcgcgcg gtggtctgta ttatcgactg tctgattgtc tgacaaggaa aggtaccag	3840
aaaagacgtc agtggcagga actgtgcttc gaacggcggg ggtacctaac ctgaacctct	3900
tatgacaaag aacatcgctg gcgttgtcca tccccgacg gtttagggtc actcctcctt	3960
ccctagcttc cactggtagc ttcggtcagt tccccgcct ggcaaggta ggtgaggaca	4020
cagaagagat gtccacaagt gtcactataa gtctactgag tctcaggtag gtcgtacagt	4080
cagaggcacc ctctatccca ctgctattgg acagtaagtt cggttctgta gttgaggtta	4140
taacctaccg aggttgtctt cggaccattc aggaagtctc ctgattagat agtgccttgt	4200
ttgaacctgc tgccgcacgg tagctctaaa agtcccagac cgtcgccctg gctgatatgt	4260
gactggtaga gatcgaatgt tggctctctg aaacgggtga tgatgacga ggtcatgcga	4320
gtcaagggga cctgtaagcc gccgccgtgt tttagacctt agtttgact catcgccagg	4380
caattaatct ctaggaagat ttgagactcc cccagcctac tgcaccgga acaatgaatt	4440
tgtggtagga caaacgaaga aaggagtcct tggcagcgtc gagggaggca caagtagaag	4500
gggggtaggc tgcctgtga cttcagtcgc tgcggaggc accacacgga ggaattattg	4560
aaaatgggtt ctctccggtt tcaggtcacc ttccacctgt tgcgtgatgt ctgcacctg	4620
agagtccttt cgcactgtct cgtcctgagt ttcttaagtt gtatgtcgga tagaagatgg	4680

gactgtgaca gttttcgact aatacttttc gtgtttcata tacggacact tcattgagta	4740
gtccctgagt cgtcgggaca gtgattttca aaattatctc cgcttacgac tattcgccgg	4800
cacgcctgct ggcttaagta actagtatta gtcggtatgg tgtaaacatc tccaaaatga	4860
acgaaatfff ttggagggtg tggaggggga ctggacttt gtattttact tacgttaaca	4920
acaacaattg aacaataac gtcgaatatt accaatgttt atttcgttat cgtagtgttt	4980
aaagtgttta tttcgtaaaa aaagtgcgt aagatcaaca ccaaacaggt ttgagtagtt	5040
acatagaata gtacagacct aggagatgcg gcctgcgtag caccggccgt agtggccgcg	5100
gtgtccacgc caacgaccgc ggatatagcg gctgtagtgg ctacccttc tagcccgagc	5160
ggatgaagccc gactactcgc gaacaaagcc gcaccatac caccgtccgg ggcaccggcc	5220
ccctgacaac ccgcggtaga ggaacgtacg tggttaaggaa cgccgccgcc acgagtggcc	5280
ggagtggat gatgaccga cgaaggatta cgtcctcagc gtattccctc tcgcagctgg	5340
agcccgccgc aacgaccga aaaaggtatc cgaggcgggg ggactgctcg tagtgttttt	5400
agctgcgagt tcagtctcca ccgctttggg ctgtcctgat atttctatgg tccgcaaagg	5460
gggaccttcg agggagcacg cgagaggaca aggctgggac ggcaatggc ctatggacag	5520
gcggaaagag ggaagccctt cgcaccgca aagagtatcg agtgcgacat ccatagagtc	5580
aagccacatc cagcaagcga ggttcgacc gacacacgtg cttggggggc aagtcgggct	5640
ggcgacgcgg aataggccat tgatagcaga actcaggttg ggccattctg tgctgaatag	5700
cggtgaccgt cgtcggtagc cattgtccta atcgtctcgc tccatacatc cgccacgatg	5760
tctcaagaac ttcaccaccg gattgatgcc gatgtgatct tcttgcata aaccatagac	5820
gcgagacgac ttcggtcaat ggaagccctt tttcaacca tcgagaacta ggccgtttgt	5880
ttggtggcga ccatcgccac caaaaaaaca aacgttcgtc gtctaatacg cgtctttttt	5940
tcttagagtt ctctaggaa actagaaaag atgccccaga ctgcgagtca cttgctttt	6000
gagtgaatt ccctaaaacc agtactctaa tagtttttcc tagaagtgga tctaggaaaa	6060
tttaatffff acttcaaaat ttagttagat ttcataata ctcatttgaa ccagactgtc	6120
aatggttacg aattagtac tccgtggata gactcgctag acagataaag caagtaggta	6180
tcaacggact gaggggcagc acatctattg atgctatgcc ctcccgaatg gtagaccggg	6240
gtcacgacgt tactatggcg ctctgggtgc gactggccga ggtctaaata gtcgttattt	6300
ggtcggtcgg ccttcccgc tcgctcttc accaggacgt tgaaataggc ggaggtaggt	6360
cagataatta acaacggccc ttcgatctca ttcataaagc ggtcaattat caaacgcgtt	6420
gcaacaacgg taacgatgtc cgtagcacca cagtgcgagc agcaaaccat accgaagtaa	6480
gtcaggccca aggttgcta gttccgctca atgtactagg gggtacaaca cgttttttcg	6540

ccaatcgagg aagccaggag gctagcaaca gtcttcattc aaccggcgtc acaatagtga 6600
 glaccaatac cgtcgtgacg tattaagaga atgacagtac ggtaggcatt ctacgaaaag 6660
 acactgacca ctcatgagtt gggttcagtaa gactcttata acatacgccg ctgggtcaac 6720
 gagaacgggc cgcagttatg ccctattatg gcgcgggtga tcgtcttgaa attttcacga 6780

gtagtaacct ttgcaagaa gccccgcttt tgagagtcc tagaatggcg acaactctag 6840
 gtcaagctac attgggtgag cacgtgggtt gactagaagt cgtagaaaat gaaagtggtc 6900
 gcaaagacc actcgttttt gtccttccgt ttacggcgt ttttccctt attcccgtg 6960
 tgcctttaca acttatgagt atgagaagga aaaagttata ataacttcgt aaatagtccc 7020
 aataacagag tactcgcta tgtataaact tacataaatc tttttattg tttatcccca 7080
 aggcgcgtgt aaaggggctt ttcacgggtg actgcagatt ctttggtaat aatagtactg 7140
 taattggata tttttatccg catagtgtc cgggactacc gagaaacgcc gtgggtagca 7200

agcattacaa ggcaccgtgg ctctgttgg gagttctctt ttacattagt gtgaccgagt 7260
 ggaagccac ccggaagac gcaaatattc ctctgtgaaa tacaattct tccaaccatt 7320
 taaggaacgc cgaaacgcg gggttcgact aggcgcacac cttacacaca gtcaatccca 7380
 cacctttcag gggtcaggg gggtcgtccgt cttcatcgt ttcgtacgta gagttaatca 7440
 gtcttggtc cacaccttc aggggtccga ggggtcgtcc gtcttcatac gtttcgtacg 7500
 tagagttaat cagtcgttgg tatcagggcg gggattgagg cgggtagggc ggggattgag 7560
 gcgggtcaag gcgggtaaga ggcggggtac cgactgatta aaaaaataa atacgtctcc 7620

ggctccggcg gagccggaga ctcgataagg tcttcatcac tctccgaaa aaacctccgg 7680
 atccgaaaac gtttttcgat cgaaccccg tggcgagtct cgtggaaggt ggtaccggtg 7740
 gtagtcgtta aggtgaaact tgtttttgta gttcgtttac atgaacacgg acggggtccc 7800
 actctttcag gttcgttaca tatagacca actacatga cctcttctg acgcgacgtt 7860
 ttgggcgtgg gacctgacac tcgggttcac acatcttctc aatggactca ccttaaaact 7920
 accgagatca tggaagta gactcccgag gttgtcactg tacatagagt cgggacaacg 7980
 gtacaaagcc ctggggaagg cgtctctagg gttgttcgac cacaagacac ttcaaaagtt 8040

catgttggcc ttcggacgtc tctggttaaa ttcctgagc acatttcct attacctgta 8100
 ccaactgttg gtcgtgggga ccaaacctta ccttgtctc atatgagact acccttgtct 8160
 acccgtggga aaaccaaccg gaaggttacc gaaaggaccc ggggttcag gcataatgac 8220
 accacaccg cgtctgttcc ggataccgtc cctatagcac ctccgagtga tggcgcggac 8280
 gaacatacga cccagttct aatgtccttg tttacgactc cagtacggac gggtcaccct 8340
 tgaggtttat cctgggacac ttccttaggc gtaccctcta gtagagacc accgggcaaa 8400

gtagaacgta gtcatacac ttctgaaacc ccattatcgt tggaaactgg ggttcgggta	8460
aggacccttg accttaccac gtccgacggt atggttgaaa tcgtgggtcc ggtacgccct	8520
cctcttacca gacttcgtgt agctcctccg gtagctcttt gattcgttcg ccgtggccat	8580
ggtgtaagct cggatgctag ggttcccccc ggacctgtta cgggcaccag actgacccaa	8640
ggtgctttgc aggttgtagt tgctgaaaag acgaccacag cggttagcgt cacggtcgta	8700
ggcgtaaggg gectgacagc cggtcctctt ctttccaatg aaacttctgg cgccggggag	8760
acggttaaca ctggggaaac gtcactgtct tcggtagcag gcgtgtacgg aagagttact	8820
ctgaccgctg ctcggaagg ttatgttttt gattaatctg aaactcacta gaactcggaa	8880
aggatcaagt agggtagggc ggggtctctc tagaaacact tccttggaat gaagacacca	8940
cactgtatta acctgtttga tggatgtctc taaatttcga gattccattt atattttaaa	9000
aattcacata ttacacaatt tgatgactaa gattaacaaa cacataaaat ctaaggttgg	9060
ataccttgac tacttacct cgtcaccacc ttacggaaat tactcctttt ggacaaaacg	9120
agtctctttt acggtagatc actactactc cgatgacgac tgagagtgtg aagatgagga	9180
ggttttttct tctctttcca tcttctgggg ttcttgaaag gaagtcttaa cgattcaaaa	9240
aactcagtag gacacaaatc attatcttga gaacgaacga aacgataaat gtggtgtttc	9300
ctttttcgac gtgacgatat gttcttttaa taccttttta taagacattg gaaatattca	9360
tccgtattgt caatattagt attgtatgac aaaaaagaat gaggtgtgtc cgtatctcac	9420
agacgataat tattgatagc agtttttaac acatggaaat cgaaaaatta aacatttccc	9480
caattattcc ttataaacta catatcacgg aactgatctc tagtattagt cggtatggtg	9540
taaacatctc caaatgaac gaaatttttt ggagggtgtg gagggggact tggactttgt	9600
attttactta cgtaacaac aacaattgaa caaataacgt cgaatattac caatgtttat	9660
ttcgttatcg tagtgtttaa agtgttttat tcgtaaaaaa agtgacgtaa gatcaacacc	9720
aaacaggttt gagtagttac atagaatagi acagacctag atcgaagcac agttcctgcc	9780
actgacgtca cttattattt tacacacaaa caggctttat gcgcaaaact ctaaagacag	9840
cggctgattt aagtacagcg cgctatcacc acaaatagcg gctatctcta ccgctataac	9900
ctttttagct ataaactttt ataccgtata acttttacag cggctacact caaagacaca	9960
ttgactatag cggtaaaaaa gttttcacta aaaacccgta tgcgctatag accgctatcg	10020
cgaatatagc aaatgcccc tacgctatc tgctgaaacc actgaaccg ctaagacaca	10080
cagcgtttat agcgtcaaag ctatatccac tgtctgctat actccgatat agcggctatc	10140

tccgctgtag ttcgaccgtg taccggttac gtatagctag atatgtaact tagttataac	10200
cggtaatcgg tataataagt aaccaatata tcgtatttag ttataaccga taaccggtaa	10260
cgtatgcaac ataggtatag tattatacat gtaaataataa ccgagtacag gttgtaatgg	10320
cgggtacaact gtaactaata actgatcaat aattatcatt agttaatgcc ccagtaatca	10380
agtatcgggt atataccica aggcgcaatg tattgaatgc catttaccgg gcggaccgac	10440
tggcgggttg ctgggggcgg gtaactgcag ttattactgc atacaagggt atcattgcgg	10500
ttatccctga aaggtaactg cagtiacca cctcataaat gccatttgac gggngaaccg	10560
tcatgtagtt cacatagtat acggttcatt cgggggataa ctgcagttac tgccatttac	10620
cgggcggacc gtaatacggg tcatgtactg gaataccctg aaaggatgaa ccgtcatgta	10680
gatgcataat cagtagcgat aatggtacca ctacgcaaaa accgtcatgt agttaccgc	10740
acctatcgcc aaactgagtg cccctaagg ttcagagggt gggtaactgc agttaccctc	10800
aaacaaaacc gtggttttag ttgccctgaa aggttttaca gcattgttga ggccgggtaa	10860
ctgcgtttac ccgccatccg cacatgccac cctccagata tattcgtctc gagcaaatca	10920
cttggcagtc tagcggacct ctgcggtagg tgcgacaaaa ctggaggat ctctctgtggc	10980
cctggctagg tcggaggcgc cggcccttgc cacgtaacct tgcgcctaag gggcacggtt	11040
ctcactgcat tcatggcgga tatctcagat atccgggtgg gggaaccgaa gaatacgtac	11100
gatatgacaa aaaccgaacc ccagatatgt gggggcgaag gagtacaata tccactacca	11160
tatcgaatcg gatatccaca cccaataact ggtaataact ggtgagggga taaccactgc	11220
tatgaaagggt aatgattagg tattgtaccg agaaacgggt ttgagagaaa taaccgatat	11280
acggttatgt gacaggaagt ctctgactgt gcctgagaca taaaaatgtc ctacccaga	11340
gtaaataata aatgtttaag tgtatatgtt gtggtggcag gggtcacggg cgtcaaaaat	11400
aatttgtatt gcaccctaga ggtgcgctta gagcccatgc acaaggcctg tacccgagaa	11460
gaggccatcg ccgcctcgaa gatgtaggct cgggacgagg gtacggagggt cgctgagtac	11520
cagcgagccg tcgaggaacg aggattgtca cctccggtct gaatccgtgt cgtgctacgg	11580
gtggtgggtg tcacacggcg tgttcggca ccgccatccc atacacagac ttttactcga	11640
gcccctcgcc cgaacgtggc gactgcgtaa accttctgaa ttccgtcgcc gtcttcttct	11700
acgtccgtcg actcaacaac acaagactat tctcagtcct cattgagggc aacgccacga	11760
caattgccac ctcccgtcac atcagactcg tcatgagcaa cgacggcgcg cgcggtggtc	11820
tgtattatcg actgtctgat tgtctgacaa ggaaagggtac ccagaaaaga cgtcagtggc	11880
aggaactgtg c	11891

<210> 163

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 163

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 164

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<

400> 164

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 165

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

synthetic

<400> 165

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 166

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 166

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn

20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile

35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 167

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 167

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 168

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 168

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Phe

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 169

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 169

acctaacctg gaccgcgtaa gaaaaagacc atcgctggcg gtgtccattc cccgacggtt 60
 tagggtcact cctccttccc 80

<210> 170

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 170

atcccagtga ggaggaaggg atcgaaggtc accatcgaag ccagtcaagg gggttccat 60
 ccactcctgt gtcttctcta c 81

<210> 171

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 171

ggtgaggaca cagaagagat gtccacaggt gtcggtccac gtcgaggttc tctcacctgg 60
 acccgaacag ttcggtcag 80

<210> 172

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 172

tgggcttgtc aagccgagtc aaactttgtc cctaacatgt actgtgtccg gatactctat 60

ctcatcagat tttgcgtgga attgg 85

<210> 173

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 173

gagtagtcta aaacgcacct taacctattc cgtcgggtgt ccctttccaa atcttaccta 60

cccgatgtat agtatgagac cc 82

<210> 174

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 174

gggctacata tcatactctg ggaacaccag atatcaacc tctctgaaaa gccggtcac 60

aatcactagg gacacgtcga 80

<210> 175

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 175

gttagtgatc cctgtgcagc ttctcgggtca agaaggacgt cgacttgagg caatgtcggg 60

gtctgtgtcg ttgtataatg acg 83

<210> 176

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 176

ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag 60
ggcacctag tgacagttag ca 82

<210> 177

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 177

gtgggatcac tgcactcgt cgccattcta cctaggcac 39

<210> 178

<211> 1128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 178

ttctaccgtg tggcaccggc cggagacgcg gacccgggtc gagacagggt gtggcgccag 60
tgtaccgtgg aaaagagaag gtcggagggt gtccccgggg tcgcacaagg gggaccgggg 120
gtcgtcgttc tcgtggtcgc cgccgtgtcg gcgggacccg acggaccact tcctgatgaa 180

ggggctcggg cactggcact cgacctgtc gcctcgggac tggaggccgc acgtgtggaa 240
ggggcgccac gacgtctcgt cgccggacat gtcggactcg tcgcaccact ggcacgggtc 300
gtcgtcggac ccgtgggtct ggatgtagac gttgcacttg gtgttcgggt cgttgtgtgt 360
ccacctgttc ttccacctcg ggttctcgac gctgttctgg gtgtggacgg gggggacggg 420
tcggggtctc gacgaccgc ctgggaggca caaggacaag ggggggttcg ggttcctgtg 480
ggactactag tcgtcctggg gggtccactg gacgcaccac cactgcact cgggtctcct 540
gggtctccac ttcaagttaa ccatacact gccgcacctc cactgtttgc ggttctgtgt 600

cgggtctctt ctctcatgt tgcgtggat gtcccaccac aggcacgact ggcacgacgt 660
ggtctgacc gacttgccgt tccttatgtt tacgttccag aggttggtcc gggacggtcg 720
ggggtagctt ttctggtagt cgttccggtt cccggtcggg gccctcgggg tccacatgtg 780
ggacgggggg agggccctgc tcacgtggtt cttggtccac agggactgga cagaccactt 840

cccgaagatg gggtcgctgt agcggcacct caccctctcg ttgccggtcg ggctcttgtt 900
gatgttctgg tggggggggtc acgacctgtc gctgccgtcg aagaaggaca tgcgttcga 960
ctggcacctg ttctcgtcca ccgtcgtccc gttgcacaag tcgacgtcgc actacgtgct 1020

ccgggacgtg ttggtgatgt gggctcttctc ggactcggac agggggccgt tcactactgc 1080
tgcgccggca cgctcgtgg cttaagtaac tagtattagt cggtatgg 1128

<210> 179

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 179

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn

20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala Gln Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 180

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 180

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

1 5 10 15

Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 181

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 181

gaacggcggg ggtacctaac ctgaacctct tatgacaaag aacatcgctg gcgttggtcca 60

ttccccgacg gtttagggtc 80

<210> 182

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 182

aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca 60

agggggcttc catcactcc 80

<210> 183

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 183

tccccgaag gtaggtgagg acacagaaga gatgtccaca agtgtcacta taagtctact 60

gagtctcagg taggtcgtac 80

<210> 184

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 184

gttcggttct gtagttgagg ttataaccta ccgaggttgt cttcggacca ttcaggaagt 60

ttcctgatta gatagtcct tg 82

<210> 185

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 185

gaccgtgcc ctggctgata tgtgactggt agagatcgaa tctcggctctt ctgaaacggt 60

gtatgatgac gcaggtcgtg 80

<210> 186

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 186

catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg 60

aatcaaacg ttagtaggga 80

<210>

> 187

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 187

ccttttagttt gcactcatcc ctaggctc

28

<210> 188

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 188

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val

20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile

35 40 45

Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys

50 55 60

Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln

100 105 110

Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Val Tyr Pro

145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gly
 195 200 205
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln His Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 189

<211> 704

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 189

atggtgtcca cagctcagtt ccttgcatc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt	60
gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc	120
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca	180
gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca	240
aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct	300
gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgtcagtt ttccgtggac gttcgggtgga	360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccccca	420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag	540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttg	704

<210> 190

<211> 702

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 190

atggattgga ctggagaat actgtttctt gtagcagccg caacaggtgt tcacagtgt	60
attcagatga ctcagagtcc atccagcatg tcagtctccg tgggagatag ggtgacgata	120

acctgtcatt caagccaaga catcaactcc aatattggat ggctccaaca gaagcctggt 180
aagtccttca aaggactaat ctatcacgga acaaacttgg acgacggcgt gccatcgaga 240
ttttcagggt ctggcagcgg gaccgactat aactgacca tctctagctt acaaccagag 300
gactttgcc aatactactg cgtccagtac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc 360

acaaaactgg aaatcaaagc aaccgtcgca gctccctccg tgttcattctt cccccatcc 420
gacgagcaac tgaagtcagg cacagcctcc gtggtgtgcc tccttaataa cttttaccca 480
agagaggcca aagtcagtg gaaagtggac aacgcactac agagcgggaa ctctcaggaa 540
agcgtgacag agcaggactc aaaagattca acatacagcc tatcttctac cctgacactg 600
tcaaaagctg attatgaaa gcacaaagta tatgcctgtg aagtaactca tcagggactc 660
agcagccctg tcactaaaag ttttaataga ggcaatgct ga 702

<210> 191

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 191

gccacatga gagtgtgat tcttttgtgg ctgttcacag ctttctctgg tgtcctgtct 60
gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc 120
acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgattttg cctggaactg gatccggcag 180
tttccaggaa acaagctgga gtggatgggc tacataagtt atagtggtaa cactaggtac 240
aaccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 300
ctgcagttga attctgtgac tattgaggac acagccacat attactgtgt aacggcggga 360
cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 408

<210> 192

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 192

atggattgga cctggcgcgt tctctttctg gtagcagccg ccacaggtgt ccacagccag 60
gtgcagctcc aagagagtgg acctgggctt gtcaagccga gtcaaacttt gtcctaaca 120
tgtactgtgt ccggatactc tatctcatca gattttgcgt ggaattggat aaggcagcca 180

ccagggaag gtttagaatg gatgggctac atatcatact ctgggaacac cagatatcaa 240
 ccttctctga aaagccgat cacaatctca agggacacgt cgaagaatca gttcttcctg 300
 aaactgaact ccgttacagc cgcagacaca gcaacatatt actgcgtaac cgctggcaga 360

ggcttccctt attggggaca gggcaccccta gtgacagtga gcagc 405

<210> 193

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 193

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp

1 5

<210> 194

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 194

Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp

1 5

<210> 195

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 195

Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr

1 5