



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0043128
(43) 공개일자 2016년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7008809(분할)

(22) 출원일자(국제) 2008년06월03일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2009-7025300

원출원일자(국제) 2008년06월03일

심사청구일자 2013년06월03일

(85) 번역문제출일자 2016년04월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/007000

(87) 국제공개번호 WO 2008/150525

국제공개일자 2008년12월11일

(30) 우선권주장

60/933,072 2007년06월04일 미국(US)

60/994,646 2007년09월20일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 임크.

미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 별명자

시에벨, 크리스천, 더블유.

미국 94707 캘리포니아주 베클리 포틀랜드 애비뉴
1543

유, 얀

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 블리스 스
트리트 1160

(74) 대리인

양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

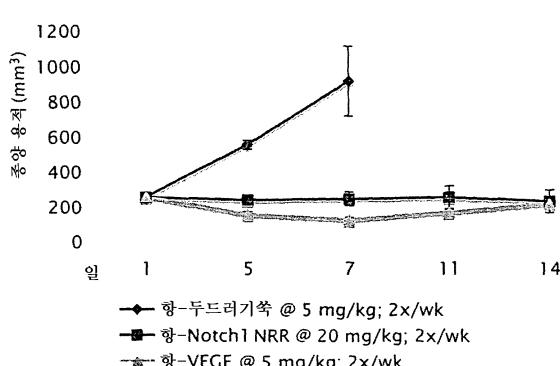
(54) 발명의 명칭 항-NOTCH1 NRR 항체 및 그것을 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은 항-Notch1 NRR 항체, 이들 항체를 포함하는 조성물, 및 이들 항체를 이용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도15a

HM7 이종이식의 효능



(52) CPC특허분류

C07K 16/18 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2316/95 (2013.01)
C07K 2316/96 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에 투여함을 포함하는, 개체에서 증가된 Notch1 신호전달 또는 발현과 관련된 질환을 치료하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-Notch1 음성적 조절 영역 (NRR) 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

Notch 수용체 패밀리는 성게 및 인간 만큼 다양한 생물체에서 발달에 영향을 주는 신호를 전달하는, 진화적으로 보존된 막횡단 수용체의 군이다. Notch 수용체 및 그의 델타(Delta) 및 세라트(Serrate)(포유동물에서는 재기드(Jagged)라고도 알려져 있음) 리간드 패밀리는 모두 상피세포 성장 인자 (EGF)-유사 반복부를 함유하는 거대한 세포외 도메인을 갖는 막횡단 단백질이다. Notch 파라로그(paralogue)의 수는 종마다 차이가 있다. 예를 들어, 포유동물에는 네가지 Notch 수용체 (Notch1-Notch4), 캐노해브디티스 엘레간스 (*Caenorhabditis elegans*)에는 두가지 Notch 수용체 (LIN-12 및 GLP-1), 및 드로소필라 멜라노가스터 (*Drosophila melanogaster*)에는 한가지 Notch 수용체 (Notch)가 존재한다. Notch 수용체는 막횡단 도메인에 대해 외부인 부위 S1에서 퓨린-유사 프로테아제에 의해 세포 표면으로 운반되는 동안 단백질분해 처리되어, 세포외 Notch (ECN) 서브유닛 및 Notch 막횡단 서브유닛 (NTM)를 생성시킨다. 이를 두가지 서브유닛은 비공유적으로 회합된 상태로 남아있으며, 성숙한 혜테로이량체 세포-표면 수용체를 구성한다. Notch1 ECN 서브유닛은 36 N-말단 EGF-유사 반복부에 이어서, S1 부위 앞쪽에 3개의 일렬로 반복된 Lin 12/Notch 반복부 (LNR) 모듈을 함유한다. 각각의 LNR 모듈은 3개의 디슬피드 결합 및 일군의 보존된 산성 및 극성 잔기 (칼슘 이온과 배위결합하는 것으로 예상됨)를 함유한다. EGF 반복 영역내에는 활성화 리간드에 대한 결합 부위가 존재한다. Notch 수용체의 특이적 도메인을 포함하는 LNR 모듈은 리간드-유도된 활성화 이전에 Notch를 휴지(resting) 형태로 유지하는데 관여한다. Notch1 NTM은 세포외 영역 (S2 절단 부위를 보유함), 막횡단 세그먼트 (S3 절단 부위를 보유함), 및 거대 세포내 부분 (RAM 도메인, 안키린 반복부, 트랜스활성화 도메인 및 카르복시-말단 PEST 서열을 포함함)을 포함한다. ECN 및 NTM 서브유닛의 안정한 회합은 ECN의 카르복시 말단부 (HD-C라고 함) 및 NTM의 세포외 아미노 말단부 (HD-N이라고 함)를 포함하는 이종이합체 도메인 (HD)에 의존한다. ECN 서브유닛에 대한 Notch 리간드의 결합은 조절된 막내 단백질분해를 통해 일어나는 두가지 연속적 단백질분해 절단과정을 개시한다. S2 부위에서의 메탈로프로테아제에 의한 제1 절단에 의해, Notch 막횡단 서브유닛은 원형질막의 내부 리플릿(leaflet)에 가까운 S3 부위에서의 제2 절단에 대해 민감해진다. 프레세닐린 및 니카스트린을 함유하는 멀티단백질 복합체에 의해 촉매되는 S3 부위 절단은 Notch 막횡단 서브유닛의 세포내 부위를 자유롭게 하여 그가 핵으로 이동하여 표적 유전자의 전사를 활성화하게끔 한다.

[0003]

인간에서 재기드 및 델타-유사 군의 다섯가지 Notch 리간드 (재기드1 (세라트1이라고도 함), 재기드2 (세라트2라고도 함), 델타-유사1 (DLL1이라고도 함), 델타-유사3 (DLL3이라고도 함), 및 델타-유사4 (DLL4라고도 함))가 확인되었다. 각각의 리간드는 Notch 결합에 필수적인 보존된 N-말단의 델타, 세라트, LAG-2 (DSL) 모티프를 갖는 1회-통과 막횡단 단백질이다. DSL 모티프에 대해 C-말단에 있는 일련의 EGF-유사 모듈은 막에 걸쳐있는 (membrane-spanning) 세그먼트의 앞쪽에 있다. Notch 수용체와 달리, 리간드는 C-말단에서 70-215개의 아미노 산으로 이루어진 짧은 세포질 테일(tail)을 갖는다. 또한, 다른 유형의 리간드가 보고되었다 (예를 들어, DNER, NB3, 및 F3/콘택틴(Contactin)).

[0004]

Notch 경로는 날벌레 및 척추동물에서 신경발생에 영향을 주는 것들을 비롯한 다양한 발달 및 생리학적 프로세스 동안 기능한다. 일반적으로, Notch 신호전달은 측부(lateral) 억제, 계통 결정, 및 세포군들 사이의 경계 확립에 관여한다 (예를 들어, 문헌 [Bray, Molecular Cell Biology 7:678-679, 2006] 참조). 암 및 신경퇴행

성 장애를 비롯한 다양한 인간 질환은 Notch 수용체 또는 그의 리간드를 코딩하는 유전자에서의 돌연변이로부터 발생하는 것으로 나타났다 (예를 들어, 문헌 [Nam et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 6:501-509, 2002] 참조). 억제되지 않은 Notch 신호전달과 악성종양 사이의 관계는, 구성적으로 활성인 말단절단된 인간 Notch1 변이체를 생성시키는 빈발성 t(7;9)(q34;q34.3) 염색체 전좌가 인간 급성 림프아구성 백혈병 (T-ALL)의 서브세트에서 확인되었을 때, 처음으로 인식되었다. 마우스 모델에서, Notch1 신호전달은 T 세포 발생에 필수적이며, 게다가 Notch1-매개된 신호는 B 세포 발생 대신 T 세포 발생을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 또한, 마우스 모델에서, 발생 동안 과도한 Notch 신호전달은 T 세포 종양형성을 초래한다.

[0005] 게다가, Notch 수용체는 광범위한 인간 암 및 종양-유래의 세포주에서 발현되며, 인간 배아 줄기 세포에서 신경 발달을 촉진한다. 예를 들어, Notch는 인간 자궁경부내 신생물 병소 및 인간 신세포 암종 세포에서 고도로 발현된다. 폭넓게 다양한 인간 질환에서의 Notch 신호전달의 관련을 감안하면, 치료제로 개발하기에 최적인 임상적 기여를 갖는 Notch 신호전달을 조절하는 약제가 지속적으로 필요하다는 것은 분명하다. 본원에 기재된 본 발명은 이러한 요구를 충족시키며 다른 이점도 제공한다.

[0006] 특허출원 및 간행물을 비롯하여 본원에 인용된 모든 문헌들은 그의 전체내용이 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0007] <발명의 요약>

[0008] 본 발명은 부분적으로 다양한 Notch1 음성적 조절 영역 (NRR) 결합체 (예를 들면, 항체 및 그의 단편)의 확인을 기초로 한다. Notch1 NRR은 중요하고 이로운 치료 표적을 제시하며, 본 발명은 Notch1 NRR에 결합하는 것을 기초로 하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 Notch1 NRR 결합체는 본원에 기재된 바와 같이 Notch1 신호전달 경로의 발현 및/또는 활성과 관련된 병리학적 증상을 표적화하는데 사용하기 위한 중요한 치료제 및 진단제를 제공한다. 따라서, 본 발명은 Notch1 NRR 결합과 관련된 방법, 조성물, 키트 및 제품을 제공한다.

[0009] 본 발명은 Notch1 NRR에 결합하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 Notch1 NRR에 결합하는 단리된 항체를 특징으로 한다. 특정 측면에서, 본 발명은 1×10^{-7} 이상의 Kd로 Notch1 NRR와 결합하는 단리된 항-Notch1 NRR 항체를 특징으로 한다. 바람직한 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 항체는 1×10^{-8} 이상의 Kd로 또는 1×10^{-9} 이상의 Kd로 Notch1 NRR와 결합한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 단리된 항-Notch1 NRR 항체를 제공하는데, 여기서 항체의 전장 IgG 형태는 인간 및 마우스 Notch1 NRR과 1×10^{-7} 이상의 Kd로 결합한다. 당업계에 잘 확립된 바와 같이, 수용체에 대한 리간드의 결합 친화도는 임의의 다양한 분석법을 이용해서 결정할 수 있으며, 다양한 정량적 수치 측면에서 표현될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화도는 Kd 값으로 표현되며, (예를 들어, 최소화된 결합활성 효과를 갖는) 고유의 결합 친화도를 반영한다. 일반적으로 바람직하게는, 결합 친화도는 시험관내의 세포-무함유 또는 세포-관련 환경에서 측정된다. 예를 들어, 비아코어 (Biacore), 방사성면역분석법 (RIA), 및 ELISA 등과 같이 본원에 기재된 것들을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 다수의 분석법을 이용해서 결합 친화도 측정치를 얻을 수 있다.

[0010] 한 측면에서, 본 발명은

[0011] (a) (i) RASQDVSTAVA (서열 7)인 서열 A1-A11을 포함하는 HVR-L1,

[0012] (ii) SASFLYS (서열 8)인 서열 B1-B7을 포함하는 HVR-L2,

[0013] (iii) QQSYTTPPT (서열 9)인 서열 C1-C9를 포함하는 HVR-L3,

[0014] (iv) GFTFSSYWIH (서열 1)인 서열 D1-D10을 포함하는 HVR-H1,

[0015] (v) ARINPSNGSTNYADSVKG (서열 2)인 서열 E1-E18을 포함하는 HVR-H2, 및

[0016] (vi) ARGSGFRWVMDY (서열 6)인 서열 F1-F14를 포함하는 HVR-H3으로부터 선택된 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이상의 과가변 영역 (HVR) 서열; 및

[0017] (b) 서열 1-12에 나타낸 서열 중 적어도 하나의 잔기의 변형을 포함하는 서열을 갖는 적어도 하나의 변이체 HVR

[0018] 을 포함하는 단리된 항-Notch1 NRR 항체를 특징으로 한다.

[0019] 변형은 바람직하게는 치환, 삽입, 또는 결실이다.

- [0020] 바람직한 실시양태, HVR-L3 변이체는 다음의 위치의 임의의 조합에서 1-4 (1, 2, 3, 또는 4)개의 치환을 포함한다: C3 (S 또는 F), C4 (Y 또는 F), C5 (T 또는 S), 및 C8 (P 또는 A 또는 S). 또다른 바람직한 실시양태, HVR-H2 변이체는 다음 위치의 임의의 조합에서 1-4 (1, 2, 3 또는 4)개의 치환을 포함한다: E6 (S 또는 P 또는 A); E8 (G 또는 R); E10 (T 또는 A 또는 N); 및 E11 (N 또는 H 또는 Q 또는 R).
- [0021] 또다른 측면에서, 본 발명은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 HVR을 포함하는 단리된 항-Notch1 NRR 항체를 특징으로 하는데, 여기서 각각의 HVR은 서열 1-12로부터 선택된 서열을 포함하거나, 이러한 서열로 이루어지거나 또는 그러한 서열로 본질적으로 이루어지며, 서열 7은 HVR-L1에 대응하고, 서열 8은 HVR-L2에 대응하고, 서열 9, 10, 11, 또는 12는 HVR-L3에 대응하고, 서열 1은 HVR-H1에 대응하고, 서열 2, 3, 4, 또는 5는 HVR-H2에 대응하며, 서열 6은 HVR-H3에 대응한다.
- [0022] 한 측면에서, 본 발명은 서열 1의 서열을 포함하는 HVR-H1 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 2, 3, 4, 또는 5의 서열을 포함하는 HVR-H2 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 6의 서열을 포함하는 HVR-H3 영역을 포함하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 서열 10, 11, 또는 12의 서열을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0023] 한 측면에서, 본 발명은 하기 중 적어도 하나, 적어도 둘, 적어도 셋, 또는 네개 전부를 포함하는 항체를 제공한다:
- (i) 서열 1의 서열을 포함하는 HVR-H1 서열;
- (ii) 서열 2, 3, 4, 또는 5의 서열을 포함하는 HVR-H2 서열;
- [0026] 서열 6의 서열을 포함하는 HVR-H3 서열;
- [0027] 서열 10, 11 또는 12의 서열을 포함하는 HVR-L3 서열.
- [0028] 바람직한 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 이들은 각각 차례로 서열 7, 8, 9, 1, 2, 6을 함유한다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 이들은 각각 차례로 서열 7, 8, 10, 1, 3, 6을 포함한다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 이들은 각각 차례로 서열 7, 8, 11, 1, 4, 6을 포함한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 항체는 HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, 및 HVR-H3을 포함하고, 이들은 각각 차례로 서열 7, 8, 12, 1, 5, 6을 포함한다.
- [0029] 서열 1-12의 아미노산 서열은 도 1에 나타낸 바와 같이 개별적인 HVR (즉, H1, H2 또는 H3)에 대하여 넘버링되어 있으며, 넘버링은 아래에 기술하는 바와 같이 카바트(Kabat) 넘버링 시스템과 일치한다.
- [0030] 하나의 특정 측면에서, 본 발명은 Notch1 신호전달을 억제, 감소, 및/또는 차단하는 단리된 항-Notch1 NRR 항체를 제공한다. 본 발명의 항체의 몇몇 실시양태는 하기 서열 53에 나타낸 바와 같이 인간화된 4D5 항체 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (또한, 미국 특허 제6,407,213 호 및 리(Lee) 등의 문헌 [J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에 언급되어 있음)의 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0031] 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열 53) (HVR 잔기에는 밑줄이 그어져 있음)
- [0032] 한 실시양태에서, huMAb4D5-8 경쇄 가변 도메인 서열은 위치 30, 66, 및 91 (상기에서 각각 볼드체/이탤릭체로 나타낸 Asn, Arg, 및 His) 중 하나 이상에서 변형된다. 특정 실시양태에서, 변형된 huMAb4D5-8 서열은 위치 30에서 Ser, 위치 66에서 Gly 및/또는 위치 91에서 Ser를 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 하기 서열 54에 나타낸 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다:
- 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (서열 54) (HVR 잔기에는 밑줄이 그어져 있음)

[0034] huMAb4D5-8에 대해 치환된 잔기는 볼드체/이탤릭체로 나타낸다.

[0035] 본 발명의 항체는 임의의 적합한 프레임워크 가변 도메인 서열을 포함할 수 있는데, 단 Notch1 NRR에 대한 결합 활성을 실질적으로 유지된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73, 및/또는 78에서 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나, 위치 73은 T이고/거나 위치 78은 A이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (또한, 미국 특허 제6,407,213호 및 동 제5,821,337호, 및 리(Lee) 등의 문헌 [J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에 언급되어 있음)의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간 κI 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 이들 항체는 미국 특허 제6,407,213호 및 동 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 huMAb4D5-8의 경쇄 HVR 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (또한, 미국 특허 제6,407,213호 및 동 제5,821,337호, 및 리(Lee) 등의 문헌 [J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093]에 언급되어 있음)의 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0036] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 및/또는 37의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 2, 및/또는 6이다. 또다른 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 및/또는 37의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 3, 및/또는 6이다. 또다른 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 및/또는 37의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 4, 및/또는 6이다. 또다른 실시양태에서, 프레임워크 서열은 서열 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 및/또는 37의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 5, 및/또는 6이다.

[0037] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38, 39, 40, 및/또는 41의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 9이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38, 39, 40, 및/또는 41의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 10이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 프레임워크 서열은 서열 38, 39, 40, 및/또는 41의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 11이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 38, 39, 40, 및/또는 41의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 12이다.

[0038] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 44, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 2, 및/또는 6이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 44, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 3, 및/또는 6이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 44, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 4, 및/또는 6이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 44, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 5, 및/또는 6이다.

[0039] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 17, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 9이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 17, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 10이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 17, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 11이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 17, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2, 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 12이다.

[0040] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43,

47, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 2, 및/또는 6이다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 47, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 3, 및/또는 6이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 47, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 4, 및/또는 6이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 중쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 42, 43, 47, 및/또는 45의 서열을 포함하고, HVR H1, H2, 및 H3 서열은 각각 서열 1, 5, 및/또는 6이다.

[0041] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 47, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 9이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 47, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 10이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 47, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 11이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 경쇄 가변 도메인을 포함하는데, 여기서 프레임워크 서열은 서열 15, 16, 47, 및/또는 18의 서열을 포함하고, HVR L1, L2 및 L3 서열은 각각 서열 7, 8, 및/또는 12이다.

[0042] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 목적하는 표적 결합 친화도를 얻도록 친화도 성숙된다. 한 예에서, 본 발명의 친화도 성숙 항체는 아미노산 위치 H53, H55, H57, H58, L91, 및 L96 중 하나 이상에서의 치환을 포함한다. 한 예에서, 본 발명의 친화도 성숙 항체는 하기 치환들 중 하나 이상을 포함한다: (a) 중쇄에서, S53P, S53A, G55R, T57A, T57N, N58H, N58Q, 및 N58R 또는 (b) 경쇄에서, S91F, P96A, 및 P96S.

[0043] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 58의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 58의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 60의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 60의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 62의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 62의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명의 항체는 서열 64의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 서열 64의 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0044] 한 측면에서, 본 발명은 Notch1 NRR에 결합하는데 있어서 상기 언급된 임의의 항체와 경쟁하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 Notch1 NRR 상에서 상기 언급된 임의의 항체와 동일 또는 유사한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

[0045] 당업계에 공지되어 있고 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같이, 항체의 과가변 영역을 서술하는 아미노산 위치/경계는 당업계에 공지된 다양한 정의 및 상황에 따라 달라질 수 있다 (이하 기술됨). 가변 도메인내의 일부 위치는 이들 위치가 하나의 기준 상황에서는 과가변 영역내에 위치하는 것으로 고려될 수 있지만 다른 기준 상황에서는 과가변 영역 바깥에 위치하는 것으로 고려될 수 있다는 점에서 하이브리드 과가변 위치로 고려될 수 있다. 이들 위치들 중 하나 이상은 연장된 과가변 영역에서 찾을 수도 있다 (이하에 추가로 정의됨).

[0046] 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 다른 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 친화도 성숙 항체, 인간화 항체, 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, 또는 scFv이다.

[0047] 한 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 예를 들어 이종의 비-인간, 인간, 또는 인간화 서열 (예를 들어, 프레임워크 및/또는 불변 도메인 서열)에 이식된 비-인간 공여자로부터의 항원 결합 서열을 포함하는 항체이다. 한 실시양태에서, 비-인간 공여자는 마우스이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 서열은 예를 들어 돌연변이유발법 (예를 들어, 파아지 디스플레이 스크리닝 등)에 의해 얻을 수 있는 합성 서열이다. 특정 실시양태에서, 본

발명의 키메라 항체는 뮤린(murine) V 영역 및 인간 C 영역을 갖는다. 한 실시양태에서, 뮤린 경쇄 V 영역은 인간 카파 경쇄에 융합된다. 또다른 실시양태에서, 뮤린 중쇄 V 영역은 인간 IgG1 C 영역에 융합된다.

[0048] 본 발명의 인간화 항체는 프레임워크 영역 (FR)에서 아미노산 치환을 갖는 것들 및 이식된 CDR에서 변화를 갖는 친화도 성숙 변이체를 포함한다. CDR 또는 FR에서의 치환된 아미노산은 공여자 또는 수용자 항체에 존재하는 것들로 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 증진된 CDC 및/또는 ADCC 기능 및 B-세포 사멸을 비롯한 개선된 효과기 기능을 초래하는 Fc 영역내의 아미노산 잔기 변화를 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 항체는 안정성을 개선시키는 특정 변화를 갖는 것들을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 감소된 효과기 기능, 예를 들어 감소된 CDC 및/또는 ADCC 기능 및/또는 감소된 B-세포 사멸을 초래하는 Fc 영역내의 아미노산 잔기 변화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 자연 살 (NK) 세포 상의 인간 Fc 수용체 및/또는 인간 보체 인자 C1q에 대한 감소된 결합 (예를 들면, 그에 대한 결합 부재)를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 Fc γ RI, Fc γ RIIA, 및/또는 Fc γ RIIIA에 대한 감소된 결합 (예를 들면, 그에 대한 결합 부재)를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG 군 (예를 들어, IgG1 또는 IgG4)에 속하며, E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, 및/또는 P329 (EU 인덱스에 따른 넘버링)에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 돌연변이 L234A/L235A 또는 D265A/N297A를 포함한다.

[0049] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 제공된 임의의 항원 결합 서열을 포함하는 항-Notch1 NRR 폴리펩티드를 제공하며, 항-Notch1 NRR 폴리펩티드는 Notch1 NRR, 예를 들어 인간 또는 마우스 Notch1 NRR에 특이적으로 결합한다.

[0050] 본 발명의 항체는 Notch1 NRR에 결합하며 (예를 들면, 그에 특이적으로 결합함), 일부 실시양태에서 Notch1 신호전달 및/또는 생물학적으로 관련된 임의의 Notch1 및/또는 Notch1 리간드 생물학적 경로의 파괴, 및/또는 종양, 세포 증식성 장애 또는 암의 치료 및/또는 예방; 및/또는 Notch1 발현 및/또는 활성 (예를 들면, 증가된 Notch1 발현 및/또는 활성)과 관련된 장애의 치료 또는 예방 중 하나 이상 측면을 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, Notch1 NRR 항체는 Notch1 NRR (예를 들어, 인간 또는 마우스 Notch1 NRR)로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 Notch1와 1×10^{-7} 이상의 Kd로 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 생체내 및/또는 시험관내에서 Notch1 활성을 감소, 억제, 및/또는 차단한다.

[0051] 한 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내(intraocular) 혈관신생 질환이다.

[0052] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용가능하다.

[0053] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다.

[0054] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0055] 또다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 핵산 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용가능하다.

[0056] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 벡터는 임의의 유형의 것, 예를 들어 재조합 벡터, 예컨대 발현 벡터일 수 있다. 임의의 다양한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이(*E. coli*)이다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예컨대 차이니스 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary; CHO) 세포이다.

[0057] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 항-Notch1 NRR 항체 (본원에 정의된 바와 같이 전장 항체 및 그의 단편을 포함함)를 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 적합한 숙주 세포에서 발현시키고 상기 항체를 회수하는 것을 포함하는, 상기 항-Notch1 NRR 항체의 제조 방법을 제공한다.

[0058] 한 측면에서, 본 발명은 용기; 및 용기내에 함유된 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 하나 이상의 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체를 포함하는 것인 제품을 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본 발명의 핵산을

포함한다. 또다른 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시양태에서 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제품은 조성물 (예를 들어, 항체)를 개체에게 투여하기 위한 지침 (예를 들면, 본원에 기재된 임의의 방법에 대한 지침)을 추가로 포함한다.

[0059] 또다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 완충액을 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 완충액은 제약상 허용가능하다. 한 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 일부 실시양태에서 제약상 허용가능한 담체를 추가로 포함한다. 또다른 실시양태에서, 키트는 조성물 (예를 들어, 항체)을 개체에게 투여하기 위한 지침을 추가로 포함한다.

[0060] 또다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0061] 한 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에서 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0062] 또다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 발현 백터의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0063] 또다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0064] 또다른 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 제품의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0065] 한 측면에서, 본 발명은 장애, 예를 들면 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 치유 및/또는 예방 처치를 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 키트의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 장애는 신경병증 또는 신경퇴행성 질환이다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 장애는 혈관신생과 관련된 병리학적 증상이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.

[0066] 본 발명은 Notch1의 발현 및/또는 신호전달, 예를 들면 증가 또는 감소된 발현 및/또는 신호전달 또는 원치않는 발현 및/또는 신호전달과 관련된 장애를 조절하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0067] 본 발명은 또한 활성화된 Notch1 수용체와 관련된 장애를 조절하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 장애는 Notch1 아미노산 서열에서의 전좌(translocation) 또는 활성화 돌연변이와 관련될 수 있다. 활성화된 Notch1 수용체와 관련된 예시적인 장애로는 T-세포 급성 텁프아구성 백혈병 (T-ALL)를 들 수 있다.

[0068] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 Notch1의 증가된 발현 및/또는 활성화된 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애는 Notch1 활성화 돌연변이를 포함한다.

- [0069] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 세포 (예를 들면, 암 또는 종양 세포)를 사멸시키는 방법을 제공한다.
- [0070] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 종양 또는 암의 성장을 감소, 억제, 차단 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0071] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 혈관신생을 감소, 억제, 차단 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0072] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 혈관신생과 관련된 병리학적 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 혈관신생 질환이다.
- [0073] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 신경병증 또는 신경퇴행성 질환을 치료 또는 예방하거나, 또는 액손(axon)의 연결해제 및/또는 탈수초(demyelination)를 일으키는 손상된 신경 세포 또는 장애를 회복시키는 방법을 제공한다.
- [0074] 한 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 뉴런의 발생, 증식, 유지 또는 재생을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0075] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 목적하는 면역 반응을 나타내는 항원을 항-Notch1 NRR 항체와 함께 투여한다. 다른 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 항-Notch1 NRR 아고니스트(agonist) 항체를 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공하는데, 이 방법에서는 조성무릉(개체에게 투여하여 항-Notch1 NRR 아고니스트 항체가 항원에 의한 면역 세포 (예를 들면, T 세포)의 프라이밍(priming) 동안 또는 직후에 개체의 면역 세포 (예를 들면, T 세포)에 제시되도록 함으로써 면역 반응을 증진시키나다. 일부 실시양태에서, 항원은 암의 항원이다.
- [0076] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 아고니스트 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 조직 재생 및/또는 회복, 예를 들면 골격 또는 심장근 또는 뼈의 재생을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0077] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 아고니스트 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 항원에 대한 면역 반응을 감소, 억제, 차단 또는 예방하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 면역 반응은 비정상적 T 세포 발생 또는 조절로 인한 면역학적 장애이다.
- [0078] 또다른 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 아고니스트 항체를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 장애는 자가면역 당뇨병, 다발성 경화증, 이식 거부반응, 또는 류마티스 관절염이다.
- [0079] 본 발명의 방법을 이용해서 임의의 적합한 병리학적 증상에 영향을 줄 수 있다. 예시적인 장애는 본원에 기재되어 있으며, 소세포 폐암, 뇌암 (예를 들어, 신경모세포종 또는 수막종), 피부암 (예를 들어, 흑색종, 기저 세포 암종, 또는 편평 세포 암종), 유방 암종, 위 암, 결장직장 암 (CRC), 간세포 암종, 자궁경부 암, 폐암, 췌장암, 전립선 암, 및 혈액 악성종양 (예를 들어, T-세포 급성 림프아구성 백혈병 (T-ALL), B-세포 급성 림프아구성 백혈병 (B-ALL), 급성 골수 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 및 다발성 골수종)으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 들 수 있다.
- [0080] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 암 세포이다. 예를 들어, 암 세포는 유방 암 세포, 결장직장 암 세포, 폐암 세포, 유두 암종 세포, 결장 암 세포, 췌장 암 세포, 난소 암 세포, 자궁경부 암 세포, 중추 신경계 암 세포, 골육종 세포, 신장 암종 세포, 간세포 암종 세포, 방광 암 세포, 위 암종 세포, 두부 및 경부 편평 암종 세포, 흑색종 세포, 백혈병 세포, 및 결장 선종 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 과증식성(hyperproliferative) 및/또는 과형성(hyperplastic) 세포이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 형성이상(dysplastic) 세포이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화되는 세포는 전이성 세포이다.
- [0081] 본 발명의 방법은 추가의 처리 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 방법은 표적화된 세포 및/또는 조직 (예를 들어, 암 세포)이 방사선 처리 또는 화학요법제에 노출되는 단계를 추가로 포함한다.

[0082]

한 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 유효량의 또 다른 치료제 (예를 들면, 항-혈관신생제, 또 다른 항체, 화학요법제, 세포독성제, 면역억제제, 전구약물, 시토카인, 세포독성 방사선요법제, 코르티코스테로이드, 항-구토제, 암 백신, 진통제 또는 성장 억제제)와 함께 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 항-Notch1 NRR 항체를 항암제 또는 항-혈관형성제와 함께 사용하여 다양한 신생물 또는 비-신생물 증상을 치료한다. 특정 예에서, 항-Notch1 NRR 항체는 타목시펜, 레트로졸, 엑스메스탄, 아나스트로졸, 이리노테칸, 세툭시맙, 풀베스트란트, 비노렐빈, 엘로티닙, 베바시주맙, 빙크리스틴, 이마티닙, 소라페닙, 라파티닙, 또는 트라스투주맙과 함께 사용된다.

[0083]

항-Notch1 NRR 항체는 이러한 목적에 효과적인 다른 치료제와 동일한 조성물내에서 또는 별도의 조성물로서 연속적으로 또는 함께 투여될 수 있다. 항-Notch1 NRR 항체 및 다른 치료제 (예를 들어, 항암제)의 투여는 동시에, 예를 들어 단일 조성물로서 또는 2개 이상의 다른 조성물로서 동일한 또는 상이한 투여 경로를 이용해서 수행될 수 있다. 별법으로 또는 또한, 투여는 임의의 순서로 순차적으로 수행될 수 있다. 별법으로 또는 또한, 단계는 임의의 순서로 순차적인 것과 동시적인 것의 조합으로 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 둘 이상의 조성물의 투여 사이에는 수분 내지 수일, 내지 수주, 내지 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다. 예를 들어, 항암제를 우선 투여하고, 이후에 항-Notch1 NRR 항체를 투여할 수 있다. 그러나, 항-Notch1 NRR 항체를 동시에 투여하거나 먼저 투여하는 것이 또한 고려된다. 특정 실시양태에서, 둘 이상의 조성물의 투여 사이에는 수분 내지 수일, 내지 수주, 내지 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다.

[0084]

특정 측면에서, 본 발명은 유효량의 항-Notch1 NRR 항체 및/또는 혈관신생 억제제(들) 및 하나 이상 화학요법제를 투여함으로써 장애 (예를 들면, 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애)를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조합 치료 방법에는 다양한 화학요법제가 사용될 수 있다. 고려되는 예시적이며 비제한적인 화학요법제 목록은 본원에서 "정의" 부분에서 제공된다. 항-Notch1 NRR 항체 및 화학요법제의 투여는 동시에, 예를 들어 단일 조성물로서 또는 둘 이상의 다른 조성물로서 동일한 또는 상이한 투여 경로를 이용해서 수행될 수 있다. 별법으로 또는 또한, 투여는 임의의 순서로 순차적으로 수행될 수 있다. 별법으로 또는 또한, 단계는 임의의 순서로 순차적인 것과 동시적인 것의 조합으로 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 둘 이상의 조성물의 투여 사이에는 수분 내지 수일, 내지 수주, 내지 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다. 예를 들어, 화학요법제를 우선 투여하고, 이후에 항-Notch1 NRR 항체를 투여할 수 있다. 그러나, 항-Notch1 NRR 항체를 동시에 투여하거나 먼저 투여하는 것이 또한 고려된다. 따라서, 한 측면에서 본 발명은 항-Notch1 NRR 항체를 투여한 다음 화학요법제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 둘 이상의 조성물의 투여 사이에는 수분 내지 수일, 내지 수주, 내지 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다.

[0085]

또 다른 측면에서, 본 발명은 샘플에서 Notch1-항-Notch1 NRR 항체 복합체를 검출하는 것을 포함하는, Notch1 검출 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "검출"은 대조군에 대한 언급이 있거나 없는 정성적 및/또는 정량적 검출 (수준 측정)을 포함한다.

[0086]

또 다른 측면에서, 본 발명은 Notch1 발현 및/또는 활성과 관련된 장애를 갖거나 또는 그러한 장애를 갖는 것으로 의심되는 개체로부터의 생물학적 샘플에서 Notch1-항-Notch1 NRR 항체 복합체를 검출하는 것을 포함하는, 상기 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, Notch1 발현은 증가된 발현 또는 비정상적 발현이다. 일부 실시양태에서, 장애는 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애이다.

[0087]

또 다른 측면에서, 본 발명은 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애에 걸린 개체에게 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여함으로써 상기 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 추가로 여기서 Notch1 발현 및/또는 Notch1 리간드 발현은 항-Notch1 NRR 항체의 투여 이전, 투여 동안 또는 투여 이후에 개체의 생물학적 샘플내에서 검출된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애의 생물학적 샘플이다. 일부 실시양태에서, Notch1 과-발현은 항-Notch1 NRR 항체의 투여 이전, 투여 동안 및/또는 투여 이후에 검출된다. 일부 실시양태에서, Notch1 리간드 발현은 항-Notch1 NRR 항체의 투여 이전, 투여 동안 및/또는 투여 이후에 검출된다. 발현은 항-Notch1 NRR 항체의 투여 이전; 투여 동안; 투여 이후; 투여 이전 및 투여 동안; 투여 이전 및 투여 이후; 투여 동안 및 투여 이후; 또는 투여 이전, 투여 동안 및 투여 이후에 검출될 수 있다.

[0088]

또 다른 측면에서, 본 발명은 암, 종양, 및/또는 세포 증식성 장애에 걸린 개체에게 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여함으로써 상기 개체를 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 암, 종양, 및/또는 세포 장애 또는 간 장애의 생물학적 샘플은 Notch1 또는 Notch1 리간드를 발현시킨다.

[0089]

또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 개체의 생물학적 샘플에서 존재하는 경우 Notch1 발현 또는 Notch1 리간드 발현을 검출하는 단계; 및 (b) 단계 (a) 이후에, 단계 (a)에서 검출된 Notch1 또는 Notch1 리간드 발현을 기초로

개체에 대한 치료를 선택하는 단계를 포함하는, 개체에 대한 치료를 선택하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 개체의 생물학적 샘플내에서 기준 값 또는 대조군 샘플에 비해 증가된 Notch1 또는 Notch1 리간드 발현이 검출된다. 일부 실시양태에서, 개체의 생물학적 샘플내에서 기준 값 또는 대조군 샘플에 비해 감소된 Notch1 또는 Notch1 리간드 발현이 검출된다. 일부 실시양태에서, Notch1 또는 Notch1 리간드 발현이 검출되고, 항-Notch1 항체를 이용한 치료가 선택된다. 일부 실시양태에서, 개체는 종양, 암, 및/또는 세포 증식성 장애를 갖는다.

[0090] 검출을 포함하는 일부 실시양태에서, Notch1의 발현은 Notch1 유전자 결실, 유전자 증폭, 및/또는 유전자 돌연변이의 검출을 포함한다. 검출을 포함하는 일부 실시양태에서, Notch1 리간드의 발현은 Notch1 유전자 결실, 유전자 증폭, 및/또는 유전자 돌연변이의 검출을 포함한다.

[0091] 생물학적 샘플은 본원에서 예를 들어 생물학적 샘플의 정의에서 기술된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 혈청 또는 종양의 생물학적 샘플이다.

[0092] Notch1 및/또는 Notch1 리간드 (예를 들어, 재기드1, 재기드2, 엘타-유사1, 엘타-유사3, 및/또는 엘타-유사4) 발현의 검출을 포함하는 실시양태에서, Notch1 및/또는 Notch1 리간드 폴리뉴클레오티드 발현, 및/또는 Notch1 및/또는 Notch1 리간드 폴리펩티드 발현이 검출될 수 있다. Notch1 및/또는 Notch1 리간드 발현의 검출을 포함하는 일부 실시양태에서, Notch1 및/또는 Notch1 리간드 mRNA 발현이 검출된다. 다른 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 약제 및/또는 항-Notch1 리간드 약제를 사용해서 Notch1 및/또는 Notch1 리간드 폴리펩티드 발현을 검출한다. 일부 실시양태에서, 항체를 사용해서 Notch1 및/또는 Notch1 리간드 폴리펩티드 발현을 검출한다. 모노클로날 및/또는 폴리클로날 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 친화도-성숙된 항체, 인간화 항체, 및/또는 항체 단편을 비롯한 임의의 적합한 항체가 검출 및/또는 진단을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-Notch1 NRR 항체는 검출을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, Notch1 및/또는 Notch1 리간드 폴리펩티드 발현은 면역조직화학 ("IHC")을 이용해서 검출한다. 일부 실시양태에서, Notch1 발현은 IHC 분석법을 이용해서 2 이상으로 스코어링한다.

[0093] Notch1 및/또는 Notch1 리간드 발현의 검출을 포함하는 일부 실시양태에서, Notch1 및/또는 Notch1 리간드 발현의 존재 및/또는 부재 및/또는 수준이 검출될 수 있다. Notch1 및/또는 Notch1 리간드 발현은 증가될 수 있다. Notch1 및/또는 Notch1 리간드 발현의 부재는 유의하지 않거나 또는 사소한 수준을 포함하는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 시험 생물학적 샘플내의 Notch1 발현은 대조군 생물학적 샘플에 대해 관찰된 것 (또는 대조군 또는 기준 발현 수준)보다 더 높다. 일부 실시양태에서, Notch1 발현은 대조군 생물학적 샘플보다 시험 생물학적 샘플에서 적어도 약 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 75-배, 100-배, 150-배 또는 그보다 더 높다. 일부 실시양태에서, Notch1 폴리펩티드 발현은 면역조직화학 ("IHC") 분석법에서 염색 강도에 있어서 2이상 또는 그보다 높은 스코어로 결정된다. 일부 실시양태에서, Notch1 폴리펩티드 발현은 IHC 분석법에서 염색 강도에 있어서 1이상 또는 그보다 높은 스코어로, 또는 3이상 또는 그보다 높은 스코어로 결정된다. 일부 실시양태에서, 시험 생물학적 샘플내의 Notch1 발현은 대조군 생물학적 샘플 (또는 대조군 발현 수준)에 대해 관찰된 것보다 더 낮다.

[0094] 또다른 측면에서, 본 발명은 검출가능한 표지를 포함하는 본원에 기재된 임의의 항-Notch1 NRR 항체를 제공한다.

[0095] 또다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-Notch1 NRR 항체와 Notch1의 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 생체내 또는 시험관내 복합체이다. 일부 실시양태에서, 복합체는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 항체는 검출가능하게 표지된다.

도면의 간단한 설명

[0096] 도 1A 및 1B는 항-Notch1 NRR 항체의 중쇄 및 경쇄 HVR 루프 서열을 도시한다. 이 도면들은 중쇄 HVR 서열 H1, H2, 및 H3과, 경쇄 HVR 서열 L1, L2, 및 L3을 나타낸다. 서열 넘버링은 다음과 같다: 항체 A (HVR-H1은 서열 1; HVR-H2는 서열 2; HVR-H3은 서열 6; HVR-L1은 서열 7; HVR-L2는 서열 8; HVR-L3은 서열 9임); 항체 A-1 (HVR-H1은 서열 1; HVR-H2는 서열 3; HVR-H3은 서열 6; HVR-L1은 서열 7; HVR-L2는 서열 8; HVR-L3은 서열 10임); 항체 A-2 (HVR-H1은 서열 1; HVR-H2는 서열 4; HVR-H3은 서열 6; HVR-L1은 서열 7; HVR-L2는 서열 8; HVR-L3은 서열 11임); 및 항체 A-3 (HVR-H1은 서열 1; HVR-H2는 서열 5; HVR-H3은 서열 6; HVR-L1은 서열 7; HVR-L2는 서열 8; HVR-L3은 서열 12임). 아미노산 위치는 이하에서 기재하는 바와 같이 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링한다.

도 2는 항체 A, A-1, A-2, 및 A-3 (서열 58 내지 65)의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한다.

도 3A, 3B, 및 4는 하기와 같은 서열 식별자로 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 도시한다:

가변 중쇄 (VH) 컨센서스 프레임워크 (도 3A, 3B)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 19)

인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 과가변 영역 (서열 20-22)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 23)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 과가변 영역 (서열 24-26)

인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된

인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 27)

인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 과가변 영역 (서열 28-30)

인간 VH 수용자 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 31)

인간 VH 수용자 프레임워크 마이너스 확장된 과가변 영역 (서열 32-33)

인간 VH 수용자 2 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 34)

인간 VH 수용자 2 프레임워크 마이너스 확장된 과가변 영역 (서열 35-37)

가변 경쇄 (VL) 컨센서스 프레임워크 (도 4)

인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 (서열 38)

인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 (서열 39)

인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 (서열 40)

인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 (서열 41)

도 5는 huMAb4D5-8 경쇄 (서열 15-18) 및 중쇄 (서열 42-45)의 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위첨자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 6은 huMAb4D5-8 경쇄 (서열 15, 16, 18, 및 46) 및 중쇄 (서열 42, 43, 45, 및 47)의 변형된/변이체 프레임워크 영역 서열을 도시한다. 위첨자/볼드체의 숫자는 카바트에 따른 아미노산 위치를 나타낸다.

도 7은 루시퍼라제 리포터 유전자를 이용하여 측정한, 항체 A가 강력한 Notch1 억제제임을 보여주는 그래프이다. 각 컬럼 A-L에서, 수용 세포는 NIH-3T3-Notch1였다. A에서 리간드 세포는 NIH-3T3-Parental이었고, B-L에서 리간드 세포는 NIH-3T3-Jag1였다. A, B 및 K에는 어떤 항체나 화합물 E (감마-세크레타제 억제제)도 첨가하지 않았고; C에는 이소형 대조군 항체를 400 ng/ml 첨가하였고; D에는 항체 A를 16 ng/ml; E에는 항체 A를 80 ng/ml; F에는 항체 A를 400 ng/ml; G에는 항체 A를 2000 ng/ml; H에는 항체 A를 400 ng/ml; I에는 항체 A를 400 ng/ml 첨가하였고; J에는 이소형 대조군 항체를 400 ng/ml 첨가하였고; K에는 0.01% DMSO를 첨가하였고; L에는 화합물 E를 0.01% DMSO 중의 1 μ M로 첨가하였다. H에는 Notch1 NRR 단백질을 5 μ g/ml (100 μ l) 첨가하였고; I에는 BSA (소 혈청 알부민) 단백질을 6.5 μ g/ml (100 μ l) 첨가하였고; J에는 Notch1 NRR 단백질을 5 μ g/ml (100 μ l) 첨가하였고; A 내지 G, K, 및 L에는 어떤 단백질도 첨가하지 않았다.

도 8은 루시퍼라제 리포터 분석을 이용하여 측정한, 항체 A, A-1, A-2 및 A-3이 Notch1을 억제함을 보여주는 그래프이다. 검정색 막대는 모 항체인 항체 A를 이용하여 얻은 결과를 나타내고, 다른 막대들은 항체 A-1 (수평 줄무늬), 항체 A-2 (회색 음영), 및 항체 A-3 (사선 줄무늬)를 이용하여 얻은 결과를 보여준다. 항체 80 ng/ml에서 볼 수 있는 바와 같이, 항체 A-1 및 A-2는 모 항체 A에 비해 Notch1 신호를 더욱 강력하게 차단하는 것으로 나타났다. 그래프의 X 축은 항체 농도 (ng/ml)를 나타내고, 그래프의 Y 축은 반딧불이/레닐라속(renilla) 루시퍼라제 빛광을 나타낸다.

도 9는 항체 A가 Notch 신호전달의 활성화에 의해 유발된 마우스 C2C12 근세포 분화에 대한 차단을 완화시키는

것을 보여주는 그래프이다. A 내지 F에서, 배지는 분화 배지이다. A에서는 마우스 C2C12 근모세포를 NIH-3T3 재기드1 리간드-발현 세포와 공동 배양하지 않은 반면에, B 내지 F에서는 마우스 C2C12 근모세포를 NIH-3T3 재기드1 리간드 세포와 공동 배양하였다. 세포에 가한 항체/처리는 다음과 같다: A 및 B에 대해서는 없음, C에 대해서는 이소형 대조군, D에 대해서는 항체 A 200 ng/ml, E에 대해서는 DMSO, 및 F에 대해서는 화합물 E 1 μ M.

도 10A 내지 10F는 MHC/알렉사[®] 488 (MHC/Alexa[®] 488) (윗 줄) 또는 DAPI (4',6'-디아미디노-2-페닐인돌 히드로클로라이드; 아랫줄)로 염색된 마우스 C2C12 근세포의 사진을 보여준다. A 내지 F에서, 배지는 분화 배지이다. A에서는 마우스 C2C12 근모세포를 NIH-3T3 재기드1 리간드-발현 세포와 공동 배양하지 않은 반면에, B 내지 F에서는 마우스 C2C12 근모세포를 NIH-3T3 재기드1 리간드-발현 세포와 공동 배양하였다. 세포에 가한 항체/처리는 다음과 같다: A 및 B에 대해서는 없음, C에 대해서는 이소형 대조군, D에 대해서는 항체 A 200 ng/ml, E에 대해서는 DMSO, 및 F에 대해서는 화합물 E 1 μ M.

도 11A 내지 11D는 인간 및 마우스 Notch1 아미노산 서열 (서열 56 및 57)을 정렬한 것이다. 인간과 뮤린 Notch1 단백질의 완전한 서열을 정렬하는데 SIM 정렬기 (ExPASy 웹사이트에서 입수가능)를 사용하였다. 디폴트 매개변수는 캡 시작 벌점을 12, 확장 벌점을 4로 하고, BLOSUM62를 비교 행렬로 선택하였다. 단백질 도메인은 밀줄로 표시 및 표지하였다. 신호 웨티드, 막횡단 및 EGF 도메인 경계는 Expasy.org에서의 인간 Notch1에 대한 결과를 기초로 하였고; LNR 경계는 문헌 [Vardar et al., Biochemistry, 42:7061-7067, 2003]을 기초로 하였으며; HD-N 및 HD-C 경계는 문헌 [Malecki et al., Mol. Cell Biol. 26:4642-4651, 2006]을 기초로 하였다. 음성적 조절 영역 (NRR)은 LNR_A에서 시작하여 HD-C 이후에 끝나는 서열에 해당한다. Notch1 NRR 항체를 생성하는데 사용되는 면역원 서열은 윗줄에 해치선으로 나타내었고, 이는 EGF 반복 34-36에 더하여 NRR을 포함한다. 약자: 아미노산은 단일 인용 부호로 나타내었고; TM은 막횡단; EGF는 상피세포 성장 인자 반복; LNR은 Lin12-Notch 반복; HD-N은 S1 절단 부위의 아미노 말단면에 대한 이종이합체 도메인; HD-C는 S1 절단 부위의 카르복실 말단면에 대한 이종이합체 도메인; S1은 퓨린 프로테아제의 S1 절단 부위; S2는 ADAM 프로테아제 (A 디스인테그린 및 메탈로프로테아제 과)의 S2 절단 부위를 말한다.

도 12A 내지 12C는 항체 A (도 12A), 항체 A-1 (도 12B), 및 항체 A-2 (도 12C)에 대한 에피토프 맵핑 실험의 결과를 보여주는 그래프이다.

도 13은 항-Notch1-NRR 항체가 야생형 및 돌연변이 Notch1 수용체의 신호전달을 억제함을 보여주는 그래프이다. 짙은 검정색 막대는 2000 ng/ml의 대조군 항체를 이용하여 얻은 결과를 나타내고; 거친 점으로 표시된 막대는 80 ng/ml의 항체 A를 이용하여 얻은 결과를 나타내고; 미세한 줄무늬로 표시된 막대는 400 ng/ml의 항체 A를 이용하여 얻은 결과를 나타내고; 거친 줄무늬로 표시된 막대는 2000 ng/ml의 항체 A를 이용하여 얻은 결과를 나타내고; 미세한 점으로 표시된 막대는 DMSO (화합물 E에 대한 비허블)를 이용하여 얻은 결과를 나타낸다. 각 조건에 대한 결과는 8개의 복제물에 대하여 측정한 후, 표준 편차를 나타내는 오차 막대와 함께 평균값으로 나타내었다.

도 14A는 항-Notch1 NRR 및 항-D114 처리가 HUVEC (인간 제대 정맥 내피 세포) 세포 발아 분석에서 혈관 발아 및 길이를 상당히 증가시키는 것을 보여주는 연속 사진이다. 결과는 대조군으로서 PBS (인산 완충 염수)를 처리한 세포 또는 항-Notch1 NRR 항체 A 또는 A-2를 처리한 세포에 대해 나타낸다.

도 14B는 각막낭 분석을 이용한, 혈관화 및 혈관신생에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 보여주는 연속 사진이다. 항-Notch1 NRR 처리 (항체 A-2)는 혈관 네트워크 밀도를 현저하게 증가시켰다.

도 14C는 각막 분석에서 혈관을 통한 흐름에 대한 항-D114 및 항-Notch1 NRR 처리의 효과를 보여주는 연속 사진이다. 항-D114 및 항-Notch1 NRR 처리된 혈관 둘 모두를 통한 관류는 제한되었다.

도 14D는 혈관신생의 마우스 망막 모델에서 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 보여주는 연속 사진이다. 항-Notch1 NRR 항체 처리 (항체 A-2)는 혈관 밀도를 증가시켰고 극도의 발아 현상을 야기하였다.

도 14E는 혈관신생의 마우스 망막 모델에서, 항-Notch1 NRR 처리 (항체 A-2)가 세포 증식에 있어서의 증가와 일치하여 핵의 수를 증가시키는 것을 보여주는 연속 사진이다.

도 15A는 생체내 마우스 모델에서 종양 성장에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 보여주는 그래프이다. 항-Notch1 NRR 항체 A-2의 처리는 종양 성장을 저지하였다.

도 15B는 생체내 마우스 모델에서 다양한 투여량의 항-Notch1 NRR 항체 A-2가 종양 성장을 저지시키고 늦추는

것을 보여주는 그래프이다.

도 15C는 생체내 마우스 모델에서 항-Notch1 NRR 항체 A-2가 종양 용적을 감소시키는 것을 보여주는 그래프이다.

도 15D는 생체내 마우스 모델에서 항-Notch1 NRR 항체 A-2가 투여량 의존적인 방식으로 체중을 감소시킴을 보여주는 그래프이다.

도 15E는 면역결핍 마우스 (Balb-C Nu/Nu)의 혈청에서 시간의 경과에 따른 항-Notch1 NRR 항체 A-2의 소실을 보여주는 그래프이다.

도 16A 및 16B는 대조군 항체 (비히클) 또는 항-Notch1 NRR 항체 A-2를 10 mg/kg의 농도로 처리한 마우스의 소장 (도 16A) 또는 대장 (도 16B)으로부터의 창자샘 및 용모의 예를 보여주는 연속 사진이다.

도 17은 항-Notch1 NRR 항체 및 감마-세크레타제 억제제가 특정 암 세포주의 생존 능력을 감소시키는 것을 보여주는 그래프이다. 항-Notch1 NRR 항체 A-2 및 감마-세크레타제 억제제 N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르 (DAPT) 및 화합물 E (CmpE)를 사용하였다. 암 세포주는 x-축에 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097]

본 발명은, 예를 들면 Notch의 발현 및/또는 활성, 예컨대 증가된 발현 및/또는 활성 또는 바람직하지 않은 발현 및/또는 활성과 연관된 질환 상태의 치료 또는 예방에 유용한 항-Notch1 NRR 항체를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애를 치료하는데 사용된다.

[0098]

다른 측면에서, 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체는 Notch1의 검출 및/또는 단리, 예컨대 여러 조직 및 세포 유형에서의 Notch1의 검출에 사용되는 시약으로서의 유용성이 발견되었다.

[0099]

본 발명은 또한 항-Notch1 NRR 항체의 제조 방법, 및 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0100]

일반적 기술

[0101]

본원에서 기재되거나 언급되는 기술 및 절차는 일반적으로 당업자가 잘 이해하고 있으며, 흔히 이들에 의해 통상적인 방법, 예를 들어 다음 문헌에 기재된 바와 같은 널리 이용되는 방법을 이용하여 적용된다: [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); 연재물 METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))].

[0102]

정의

[0103]

"단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료적 사용을 방해하는 물질로, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법에 의해 측정시 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE (나트륨 도데실 슬레이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동)에 의해 균질해질 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포내 그 자리에서의 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정체 단계에 의해 제조될 것이다.

[0104]

"단리된" 핵산 분자는 핵산의 천연 공급원에서 그와 통상적으로 회합되는 1종 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 그가 자연에서 발견되는 형태 또는 설정과 다른 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재할 때의 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 예를 들어 핵산 분자가 천연 세포의 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재하는 경우, 통상적으로 핵산 (예를 들면, 항체 코딩 핵산)을 발현하는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0105]

용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 네버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 네버링" 및 그의

변형은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에서 항체 편집물 (compilation)의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 상기 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 그에 대한 삽입에 해당되는 보다 적은 아미노산 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 뒤에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따른 잔기 52a)을 포함하고, 중쇄 FR 잔기 82 뒤에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 정렬시켜 주어진 항체에 대해 결정할 수 있다.

[0106] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은 당업자가 특정 수치값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서, 2개의 수치값 (예를 들어, 하나는 본 발명의 항체와 관련이 있고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관됨) 사이의 차이를 생물학적 및/또는 통계학적 유의성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 간주할 만큼 상기 2개의 값 사이에 충분히 높은 정도의 유사성이 있다는 것을 나타낸다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서, 바람직하게는 약 50% 미만, 바람직하게는 약 40% 미만, 바람직하게는 약 30% 미만, 바람직하게는 약 20% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만이다.

[0107] "결합 친화도"는 일반적으로 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않으면, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합쌍의 멤버 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 나타낸다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)에 의해 나타낼 수 있다. 바람직하게는, Kd는 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-9} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , 또는 심지어 1×10^{-10} 이거나 또는 이보다 더 강하다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함한 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 측정할 수 있다. 저-친화도 항체는 일반적으로 항원에 느리게 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고-친화도 항체는 일반적으로 항원에 보다 빠르게 결합하고 보다 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 임의의 방법이 본 발명의 목적을 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 실시양태를 아래에 기재한다.

[0108] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 비표지된 항원의 연속 적정물의 존재하에 (¹²⁵I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후에 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 분석에서 기재되는 바와 같이 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293 :865-881]), 관심있는 항체의 Fab 형태 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 분석 (RIA)에 의해 측정된다. 분석 조건을 확립하기 위해, 미세적정 플레이트 (다이넥스 (Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중 5 μ g/ml의 포획 항-Fab 항체 (카펠 랩스 (Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 2 내지 5시간 동안 실온 (약 23°C)에서 차단하였다. 비흡착 플레이트 (Nunc #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [¹²⁵I]-항원을 관심있는 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심있는 Fab를 밤새 인큐베이션하지만, 평형에 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물은 실온에서 (예를 들어, 1시간 동안) 인큐베이션하기 위해 포획 플레이트로 옮긴다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중 0.1% Tween-20으로 8회 세척한다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μ l/웰의 섬광제 (scintillant) (MicroScint-20; 팩커드 (Packard))를 첨가하고, 플레이트를 텁카운트(Topcount) 감마 계수기 (팩커드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 경쟁적 결합 분석에서 사용하기 위해 선택한다. 다른 실시양태에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어(BIAcore) TM-2000 또는 비아코어TM-3000 (비아코어, 인크. (BIAcore, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재))을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 μ g/ml (약 0.2 μ M)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μ l/분의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 1M 에탄올아민을 주입하여 반응하지 않은 기를 차단한다. 역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μ l/분의 유속으로 25°C에서 0.05% Tween 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센소그램을 동시 피팅

함으로써 간단한 일대일 랭그뛰어 (Langmuir) 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881] 참조). 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼츠 (Aviv Instruments)) 또는 적색 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (씨모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정시 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0109]

본 발명에 따른 "온-레이트" 또는 "회합율" 또는 "회합 속도" 또는 " k_{on} "은 또한 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25°C에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크., 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하는 상기 기재된 바와 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술로 측정할 수 있다. 간단히 설명하면, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어, 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)을 사용하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)으로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 주입한다. 항원 주입 후에, 1M 에탄올아민을 주입하여 반응하지 않은 기를 차단한다. 역학적 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속으로 25°C에서 0.05% Tween 20이 포함된 PBS (PBST) 내에서 주입한다. 회합율 (k_{on}) 및 해리율 (k_{off})은 회합 및 해리 센소그램을 동시에 피팅함으로써 간단한 일대일 랭그뛰어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 k_{off}/k_{on} 비로 계산한다 (예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881] 참조). 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 을 초과하면, 바람직하게는 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도분석기 (아비브 인스트루먼츠) 또는 교반 큐벳을 갖는 8000-시리즈 SLM-Aminco 분광광도계 (씨모스펙트로닉)에서 측정시 증가하는 농도의 항원의 존재 하에 PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 이용하여 결정할 수 있다.

[0110]

본원에 사용된 용어 "벡터"는 그가 연결되어 있는 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 나타낸다. 어느 한 종류의 벡터는 그 내부에 추가의 DNA 세그먼트가 라이케이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 의미하는 "플라스미드"이다. 다른 종류의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 종류의 벡터는 바이러스 벡터이고, 여기서 추가의 DNA 세그먼트는 바이러스 계놈 내로 라이케이션될 수 있다. 특정 벡터는 그가 도입되는 숙주 세포 내에서 자동 복제될 수 있다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 계놈 내로 통합될 수 있고, 그에 의해 숙주 계놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 그들이 작동적으로 연결되어 있는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간략하게 "재조합 벡터")로 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 플라스미드 형태로도 존재한다. 플라스미드는 벡터의 가장 흔히 사용되는 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0111]

"폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 나타내고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그들의 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에는 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 합성 후에, 예컨대 표지와의 접합에 의해 변형될 수 있다. 다른 종류의 변형은 예를 들어 1 종 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 "캡 (cap)" 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예를 들어 하전되지 않은 연결기 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전된 연결기 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형, 펜던트(pendant) 모이어티, 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-라이신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (intercalator) (예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)을 갖는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성

금속, 봉소, 산화 금속 등)을 함유하는 것, 알킬레이터 (alkylator)를 함유하는 것, 변형 연결기 (예를 들어, 알파 아노머 (anomeric) 핵산 등)를 갖는 것 뿐만 아니라, 폴리뉴클레오티드(들)의 변형되지 않은 형태를 포함한다. 또한, 당 내에 보통 존재하는 임의의 히드록실기는 예를 들어 포스포네이트기, 포스페이트기에 의해 교체될 수 있거나, 표준 보호기로 보호될 수 있거나, 추가의 뉴클레오티드에 대해 추가의 연결기를 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 고체 또는 반-고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 1 내지 20개 탄소 원자를 갖는 유기 캡핑 (capping)기 모이어티 또는 아민으로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α -아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 라이속스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵톨로스, 비환식 유사체 및 염기성 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드 등을 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결기는 대체 연결기로 교체될 수 있다. 이들 대체 연결기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결기를 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알킬임)로 교체되는 실시양태를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 기재는 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0112] 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 반드시는 아니지만, 일반적으로 길이가 뉴클레오티드 약 200개 미만으로 짧은, 일반적으로 단일가닥의, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적 의미를 갖는 것이 아니다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동등하고 충분히 적용가능하다.

[0113] 웨티드 또는 폴리웨티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 특정 웨티드 또는 폴리웨티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성 부분으로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 비율을 결정하는 목적을 위한 정렬은 당업계의 기술 범위 내에 속하는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 달성을 위한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 비율값 (%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다 (ALIGN-2에 대한 컴퓨터 소스 코드 (source code)는 아래 표 A에 제공되어 있음). ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨텍, 인크. 소유로서, 소스 코드는 미국 저작권 (U.S. Copyright Office, 미국 위성턴 디. 씨. 20559)에 사용자 서류로 제출되어 미국 저작권 TXU510087하에 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 제넨텍, 인크. (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재)로부터 공개적으로 입수가능하거나 소스 코드 (예를 들면, WO 2007/001851에 제공된 것)로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 운영 체제, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용하기 위해 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변경되지 않는다.

[0114] 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 A의 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 서열 B와의 또는 서열 B에 대응하는 아미노산 서열 동일성% (별법으로 주어진 아미노산 서열 B에 대해, 서열 B와 또는 서열 B에 대응하여 특정 아미노산 서열 동일성%를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0115] $100 \times X/Y$

[0116] 상기 식에서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않을 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성%는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.

[0117] 바람직하게는, 둘 이상의 아미노산 서열이 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 동일하다. 보다 바람직하게는, 둘 이상의 아미노산 서열이 적어도 95%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100% 동일하다. 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 아미노산 서열 동일성% 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 바로 앞의 문단에서 기재한 바와 같이 얻는다.

- [0118] 본원에 사용된 용어 "Notch1"은 구체적으로 또는 문맥상 달리 지시되지 않는다면, 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성) Notch1 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "천연 서열"은 특히 자연 발생 말단절단된 형태 (예를 들면, 세포외 도메인 서열 또는 막횡단 서브유닛 서열), 자연 발생 변이체 형태 (예를 들면, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 자연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 용어 "야생형 Notch1"은 일반적으로 자연 발생 Notch1 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "야생형 Notch1 서열"은 일반적으로 자연 발생 Notch1에서 발견되는 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0119] 본원에 사용된 용어 "Notch1 리간드"는 구체적으로 또는 문맥상 달리 지시되지 않는다면, 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성) Notch1 리간드 (예를 들면, 재기드1, 재기드2, 엘타-유사1, 엘타-유사3 및/또는 엘타-유사4) 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "천연 서열"은 특히 자연 발생 말단절단된 형태 (예를 들면, 세포외 도메인 서열 또는 막횡단 서브유닛 서열), 자연 발생 변이체 형태 (예를 들면, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 자연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 용어 "야생형 Notch1 리간드"는 일반적으로 자연 발생 Notch1 리간드 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 용어 "야생형 Notch1 리간드 서열"은 일반적으로 자연 발생 Notch1 리간드에서 발견되는 아미노산 서열을 나타낸다.
- [0120] 본원에 사용된 용어 "Notch1 NRR"은 구체적으로 또는 문맥상 달리 지시되지 않는다면, 3 LNR 모듈과 막횡단 도메인을 향해 신장된 LNR 모듈에 대한 카르복시-말단 아미노산 서열, 예를 들면 인간 Notch1 아미노산 서열 (서열 56)의 아미노산 구성원 약 1446 내지 약 1735 및 마우스 Notch1 아미노산 서열 (서열 57)의 아미노산 구성원 약 1446 내지 약 1725로 이루어진 Notch1의 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성) 폴리펩티드 영역을 나타낸다. 용어 "천연 서열"은 특히 자연 발생 말단절단된 형태, 자연 발생 변이체 형태 (예를 들면, 다르게 스플라이싱된 형태) 및 자연-발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 용어 "야생형 Notch1 NRR"은 일반적으로 자연 발생 Notch1 NRR의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. 몇몇 실시양태에서, Notch1 NRR은 서열 56의 아미노산 1446 내지 1735 또는 서열 57의 아미노산 1446 내지 1725를 함유하는 폴리펩티드이다. 몇몇 실시양태에서, Notch1 NRR은 Notch1, 예를 들면 S1, S2 및/또는 S3 부위(들)에서 처리된 Notch1 또는 처리되지 않은 Notch1에 함유된다. 몇몇 실시양태에서, Notch1 NRR은 Notch1 NRR 아미노산 서열의 둘 이상의 비-공유결합에 의해 연결된 단편을 함유하며, 예를 들면 서열 56의 아미노산 1446 내지 1664를 함유하는 단편은 서열 56의 아미노산 1665 내지 1735를 함유하는 단편에 비-공유결합에 의해 연결되어 있다. 다른 실시양태에서, 서열 57의 아미노산 1446 내지 1654를 함유하는 단편은 서열 57의 아미노산 1655 내지 1725를 함유하는 단편에 비-공유결합에 의해 연결되어 있다.
- [0121] 본원에 사용된 용어 "증가된 Notch1 신호전달"은, 예를 들면 본원에서 실시예 5 및 6에 기재된 루시퍼라제 분석을 이용하여, 동일한 조건하의 대조군에서 관찰된 Notch1 신호전달의 수준 보다 적어도 2배 높게 증가된 Notch1 신호전달을 나타낸다. 바람직하게는, Notch1 신호전달의 증가는 대조군에서 관찰된 수준 보다 적어도 3배, 4배, 5배 또는 심지어 10배 (또는 그 이상) 높은 수준이다.
- [0122] 본원에 사용된 용어 "감소된 Notch1 신호전달"은, 예를 들면 본원에서 실시예 5 및 6에 기재된 루시퍼라제 분석을 이용하여, 동일한 조건하의 대조군에서 관찰된 Notch1 신호전달의 수준 보다 적어도 2배 적게 감소된 Notch1 신호전달을 나타낸다. 바람직하게는, Notch1 신호전달의 감소는 대조군에서 관찰된 수준 보다 적어도 3배, 4배, 5배 또는 심지어 10배 (또는 그 이상) 적은 수준이다.
- [0123] 용어 "Notch1 활성화 돌연변이" 및 "Notch1 신호전달을 활성화시키는 돌연변이"는 상응하는 Notch1 야생형 아미노산 서열로부터의 Notch1 신호전달에 비해 증가된 Notch1 신호전달을 야기하는 Notch1 야생형 아미노산 서열에 대한 하나 이상 아미노산의 삽입, 하나 이상 아미노산의 결실 또는 하나 이상 아미노산의 치환, 또는 상응하는 Notch1 야생형 핵산 서열을 함유하는 세포에서의 Notch1 신호전달에 비해 돌연변이 핵산 서열을 함유하는 세포에서 증가된 Notch1 신호전달을 야기하는 Notch1 야생형 핵산 서열에 대한 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 전위 또는 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환을 나타낸다. 활성화 돌연변이를 함유하는 Notch1 수용체로부터의 Notch1 신호전달은 리간드 의존성이거나 또는 리간드 독립성일 수 있다.
- [0124] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 넓은 의미에서 상호교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재되어 있음)을 포함할 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.
- [0125] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 항체들 사이에서 크게 상이함을 나타내고, 그의 특정 항원에

대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 가변성은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 과가변 영역 (HVR)으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중된다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 루프 연결부를 형성하고 일부 경우에 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, 주로 베타-시트 형태를 취하는 4개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각각의 쇄 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 쇄의 CDR과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, 상이한 효과기 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 독성에서 항체의 참여를 나타낸다.

[0126] 항체를 파파인 분해시키면 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (상기 명칭은 쉽게 결정화하는 그의 능력을 반영한다)을 생성시킨다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다.

[0127] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이중쇄 Fv종에서, 상기 영역은 강하게 비-공유결합에 의해 회합된 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv (scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 이중쇄 Fv종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커로 공유결합에 의해 연결될 수 있다. 상기 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 규정한다. 통합적으로, 6개의 CDR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화도이지만 항원을 인식하여 결합하는 능력을 갖는다.

[0128] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 여러 개의 잔기가 부가된다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0129] 임의의 척추동물종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불리는 2개의 명백하게 구분되는 유형 중 하나로 분류될 수 있다.

[0130] 이뮤노글로불린은 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스로 분류될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5가지 주요 클래스, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 잘 알려져 있다. "항체 단편"은 바람직하게는 무손상 항체 내에 존재할 때 그 부분과 정상적으로 연관된 기능의 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부를 보유하는, 무손상 항체의 일부만을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은 무손상 항체 내에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 연관된 1종 이상의 생물학적 기능, 예를 들어 FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합을 보유한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암 (arm)을 포함할 수 있다.

[0131] 본원에 사용된 용어 "과가변 영역", "HVR" 또는 "HV"는 서열에서 과가변이고/하거나 구조상 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 과가변 영역; 즉 VH 내에 3개 (H1, H2, H3), 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 많은 과가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성에 기초하고, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 코티아는 대신 구조 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM 과가변 영역은 카바트 CDR과 코티아 구조 루프 사이의 절충안을 나타내고,

옥스포드 몰레큘라 (Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된다. "접촉" 과가변 영역은 이 용가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 상기 과가변 영역의 잔기를 아래에 기재한다.

- [0132] 루프 카바트 AbM 코티아 접촉
----- ----- ----- ----- -----
- [0134] L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36
- [0135] L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55
- [0136] L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96
- [0137] H1 H31-H35B H26-H35B H26-H32 H30-H35B
- [0138] (카바트 넘버링)
- [0139] H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35
- [0140] (코티아 넘버링)
- [0141] H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58
- [0142] H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101
- [0143] 과가변 영역은 하기와 같은 "확장된 과가변 영역"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 이들 각각의 정의에 대해 [Kabat et al., 상기 문현]에 따라 넘버링된다.
- [0144] "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본원에서 규정되는 과가변 영역 잔기 이외의 다른 가변 도메인 잔기이다.
- [0145] 비인간 (예를 들면, 뮤런) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 이뮤노글로불린에서 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수혜자의 과가변 영역의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및/또는 능력을 갖는 비인간종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 과가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수혜자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수혜자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 보다 개선하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 통상적으로는 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 과가변 루프에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 인간화 항체는 또한 임의로 적어도 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 통상적으로는 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역을 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문현 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)] 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)])을 참조한다. 또한, 검토 문현 [Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998)]; [Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)] 및 여기에 인용된 참조문현을 참조한다.
- [0146] "키메라" 항체 (이뮤노글로불린)는 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 중쇄 및/또는 경쇄의 일부를 가지는 한편, 나머지 쇄(들)은 다른 종에서 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 뿐만 아니라 (목적하는 생물학적 활성을 보이는 한) 상기 항체의 단편 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이다 (미국 특허 4,816,567; 및 문현 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)]). 본원에 사용된 인간화 항체는 키메라 항체의 서브세트이다.
- [0147] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 상기 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는 폴리펩티드 링커를 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 더 포함한다. scFv에 대한 검토를 위해, 문현 [Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0148] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 결정된 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 혼산,

지질, 합텐 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 바람직하게는, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

[0149] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내고, 상기 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 (VH-VL) 내의 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 쇄의 상보성 도메인과 페어링하여 2개의 항원 결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)])에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0150] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의는 특히 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 제외한다.

[0151] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 그의 하나 이상의 HVR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 [Barbas et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al., Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)] 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)])에 기재되어 있다.

[0152] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 나타내고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0153] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후에 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 나타낸다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 목적하는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특히 5,500,362 또는 5,821,337 또는 미국 특히 6,737,056 (Presta)에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 상기 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 별법으로, 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0154] "인간 효과기 세포"는 1종 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII을 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하며, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 천연 공급원, 예를 들면 혈액으로부터 단리할 수 있다.

[0155] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고, Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체 (이들 수용체의 대립 유전자 변이체 및 다르게 스플라이싱된 (spliced) 형태 포함)를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 유사한 아미노산 서열 (주로 그의 세포질 도메인이 상이함)을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)] 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토하였다. 앞으로 확인될 것을 비롯하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 또한 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하고 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]), 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. WO 00/42072 (Presta)에는 FcR에 대한 결합이 개선 또는 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특히 공개공

보의 내용은 특히 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조).

- [0156] FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, Ghetie 1997, Hinton 2004 참조). 생체내 인간 FcRn에 대한 결합 및 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 (transgenic) 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 Fc 변이체 폴리펩티드가 투여된 영장류에서 분석될 수 있다.
- [0157] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에서의 표적 세포의 용해를 나타낸다. 전통적인 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 (적절한 서브클래스의) 항체에 결합하여 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다.
- [0158] 변형된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖고 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개공보의 내용은 특히 본원에 참고로 포함된다 (또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)] 참조).
- [0159] 용어 "Fc 영역-포함 폴리펩티드"는 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드, 예컨대 항체 또는 이뮤노어드헤신을 나타낸다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어 폴리펩티드의 정제 동안 또는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 K447 잔기를 갖는 폴리펩티드, 모든 K447 잔기가 제거된 폴리펩티드, 또는 K447 잔기를 갖는 폴리펩티드와 K447 잔기를 갖지 않는 폴리펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0160] "차단" 항체 또는 "길항체" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항체 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 경우에 따라, 생물학적 활성은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 감소된다.
- [0161] 본원에서 사용되는 "효능제 항체"는 관심있는 폴리펩티드의 기능적 활성 중 적어도 하나를 모방하는 항체이다.
- [0162] 본원의 목적을 위해 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 이미 존재하는 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 이미 존재하는 아미노산 변화가 존재할 경우, 바람직하게는 5 이하, 바람직하게는 4 이하, 또는 3 이하의 이미 존재하는 아미노산 변화가 존재한다. 이미 존재하는 아미노산 변화가 VH에 존재할 경우, 바람직하게는 상기 변화는 위치 71H, 73H 및 78H 중 3개, 2개 또는 1개의 위치에서만 발생하고; 예를 들어, 상기 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크의 서열은 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 동일하다.
- [0163] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시에 가장 흔하게 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 선택된다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우, 하위군은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0164] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:
- [0165] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (서열 43)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 44)-H3-WGQGTLTVVSS (서열 45).
- [0166] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 얻은 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 다음 서열의 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:
- [0167] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 15)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (서열 16)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYC (서

열 17)-L3-FGQGTKVEIK (서열 18).

[0168] "장애" 또는 "질환"은 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 증상이다. 이 것은 포유동물이 문제의 장애에 걸리기 쉽게 하는 병리학적 증상을 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비제한적인 예는 악성 및 양성 종양, 암종, 아세포종 및 육종을 포함한다.

[0169] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 일정 정도의 비정상적인 세포 증식과 연관된 장애를 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0170] 본원에서 사용되는 "종양"은 악성이든 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식, 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 언급된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0171] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 나타내거나 기재한다. 암의 예는 암종, 럼프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특별한 예는 편평 세포 암, 소세포(small-cell) 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종, 복막암, 간세포의 암, 위장암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간의 암종, 위암, 흑색종, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다. 혈관신생의 조절곤란은 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 많은 장애를 야기할 수 있다. 이러한 장애는 비-신생물 상태와 신생물 상태를 둘다 포함한다. 신생물은 상기 기재한 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 비-신생물 장애는 원치않는 또는 이상(aberrant) 비대증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 건선 플라크, 유육종증, 아테롬성 동맥경화증, 아테롬성 플라크, 당뇨병성 및 다른 증식성 망막증, 예를 들어 미숙 망막증, 수정체후 섬유증증증, 신혈관 녹내장, 노화-관련 황반 변성, 당뇨성 황반 부종, 각막 혈관신생, 각막 이식 혈관신생, 각막 이식 거부, 망막/맥락막 혈관신생, 앞방각 혈관신생 (피부홍조), 안구 신혈관 질환, 혈관 재발협착증, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종증, 섬유성혈관종, 갑상선 비대증 (그레이브스병 포함), 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 폐혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 출중/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련이 있는 것), 활막 염증, RA에서의 판누스 형성, 골화 근육염, 비후성 뼈 형성, 골관절염 (OA), 난치성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 제3강 유체 질환(3rd spacing of fluid diseases) (췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 섬유종, 조산, 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 케양성 대장염), 신장 동종이계이식 거부, 염증성 장 질환, 신 증후군, 원치않는 또는 이상 조직 질량 증가 (비-암), 혈우병성 관절, 비후성 반흔, 체모 성장의 억제, 오슬러-웨버 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증증증, 경피증, 트라코마, 혈관 접착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 심낭 삼출 (예를 들어, 심낭염과 관련이 있는 것) 및 흉막 삼출을 포함하지만 이에 제한되지 않는다

[0172] 용어 "신경퇴행성 질환" 및 "신경퇴행성 장애"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 뉴론의 퇴행 및/또는 기능장애의 병리를 수반하는 모든 장애, 예를 들어 (제한되지 않음) 말초 신경병증; 운동뉴론 장애, 예컨대 근위축성 측삭경화증 (ALS, 루게릭병), 벨 마비 및 척수 근 위축증 또는 마비를 수반하는 다양한 상태; 및 기타 인간 신경퇴행성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질, 다발성 경화증, 헌팅تون 무도병, 다운 증후군, 신경 농 및 메니에르병을 포함한다.

[0173] "말초 신경병증"은 말초 신경에 영향을 주는 신경퇴행성 장애로, 가장 흔하게는 운동, 감각, 감각운동 또는 자율 기능장애 중 하나 또는 이들의 조합으로 나타난다. 말초 신경병증은 예를 들어 유전적일 수도 있고, 전신 질환으로 인한 것일 수도 있으며, 또는 독성 작용제, 예를 들어 신경독성 약물, 예를 들어 항-신생물제, 또는 산업적 또는 환경적 오염물질에 의해 유도될 수도 있다.

[0174] "말초 감각 신경병증"은 말초 감각 뉴론의 퇴행을 특징으로 하고, 특발성일 수 있으며, 예를 들어 당뇨병 (당뇨병성 신경병증), 암에서의 세포증식억제 약물 요법 (예를 들어, 빈크리스틴, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 3'-아지도-3'-데옥시티미딘 또는 턱산, 예를 들어 파클리탁셀 [탁솔(TAXOL)[®], 미국 뉴저지주 프린스턴 소재의 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)] 및 독세탁셀 [탁소테레(TAXOTERE)[®], 프랑스 앤토니 소재의 롱-프랑 로라(Rhone-Poulenc Rorer)]과 같은 화학요법제 처치), 알콜중독, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS) 또는 유전적 소인으로 인해 발생할 수 있다. 유전적인 말초 신경병증은 예를 들어 레프술병, 크라베병, 이염 백질이영양증, 파브리병, 데제린-소타스 증후군, 무베타지단백혈증 및 샤르코-마리-투쓰 (CMT,

Charcot-Marie-Tooth)병 (또한 비골 근 위축증 또는 유전성 운동 감각 신경병증 (HMSN)이라고도 공지되어 있음)을 포함한다. 말초 신경병증의 대부분의 유형은 수개월 또는 수년의 기간에 걸쳐서 서서히 발병한다. 임상적 관행에서는 이러한 신경병증을 만성이라 일컫는다. 때때로, 말초 신경병증은 수일의 기간에 걸쳐 신속하게 발병하며, 급성이라 일컫는다. 말초 신경병증은 통상적으로 감각 신경과 운동 신경에 함께 영향을 주어서 혼합 감각 및 운동 신경병증을 야기하지만, 순수한 감각 및 순수한 운동 신경병증도 공지되어 있다.

[0175] 본원에서 사용된 바와 같이, "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직에 대한 면역 반응을 수반하는 병리를 갖는 임의의 장애를 나타낸다. 자가면역 질환은 류마티스 관절염 (RA), 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 염증성 장 질환, 복강 질환, 알러지성 비염, 알러지성 두드러기, 크론병, 히르쉬스프룽병, 그레이브스병, 애디슨병, 길랑-바레 증후군, 하시모토병, 알러지성 안내 염증 질환, 강직성 척추염, 아토피성 피부염, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 베체트병, 코간 증후군, 접촉 피부염, 쿠싱 증후군, 피부근염, 진성 당뇨병, 원관상 홍반성 루푸스, 루푸스 신염, 호산구성 근막염, 결절 홍반, 박탈성 피부염, 국소 또는 분절 사구체경화증, 거대 세포 동맥염, 통풍, 통풍성 관절염, 손 습진, 헤노호-숀라인 자반병(Henoch-Schonlein purpura), 임신 포진, 다모증, 특발성 각막-공막염, 특발성 혈소판감소성 자반병, 염증성 피부병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 근염, 골관절염, 궤장염, 천포창양 임신, 심상성 천포창, 치주염; 결절성 다발동맥염, 류마티스성 다발성근육통, 음낭 소양증, 소양증/염증, 건선, 건선성 관절염, 폐 히스토플라스마증, 재발성 다발연골염, 장미증, 유육종증, 경피증, 패혈성 쇼크 증후군, 어깨 전염 또는 유흘낭염, 쇼그렌 증후군, 스틸병, 스위트병, 전신 홍반성 루푸스, 전신 경화증, 다카야스 동맥염, 측두 동맥염, 독성 표피 피사용해, 이식 거부반응, 결핵, 제1형 당뇨병, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염 및 베게너 육아종증을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0176] 본원에서 사용된 바와 같이, "면역 장애"는 개체에서 면역계의 비정상적 발생 또는 조절을 수반하는 병리를 갖는 임의의 장애를 나타낸다. 바람직하게는, 면역 장애는 비정상적 T 세포 발생 또는 조절을 수반한다.

[0177] "약제"는 해당 장애 또는 그의 증상, 또는 부작용을 치료하기 위한 활성 약물이다.

[0178] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료"는 치료할 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키고자 시도하는 임상적 개입을 나타내고, 임상 병리의 예방을 위해 또는 임상 병리학적 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리적 결과의 감소, 전이의 예방, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 호전, 및 차도가 있거나 개선된 예후를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발병을 자연시키는데 사용된다.

[0179] "개체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소), 경주용 동물, 애완 동물 (예를 들어, 고양이, 개 및 말), 영장류, 마우스 및 래트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0180] 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 사육 동물 및 가축 및 동물원의 동물, 경주용 동물, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 비롯하여 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 나타낸다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0181] "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 양을 나타낸다.

[0182] 본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 "치료상 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 물질/분자, 효능제 또는 길항제가 개체에서 원하는 반응을 유발하는 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 또한, 치료상 유효량은 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 임의의 독성 또는 유해한 효과를 치료상 유익한 효과가 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 예방 결과를 달성하는데 효과적인 양을 나타낸다. 예방 용량은 질환 이전 또는 질환의 보다 초기 단계에서 개체에 사용되기 때문에, 예방 유효량은 전형적으로 치료상 유효량보다 적을 것이지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0183] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 인터칼레이팅제, 효소 및 그의 단편, 예를 들어 뉴클레오티드 분해 효소, 항생제, 및 독소, 예를 들어 소분자(small molecule) 독소, 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 예컨대 그의 단편 및/

또는 변이체, 및 하기 개시하는 다양한 항-종양 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포독성제는 뒤에서 기재한다. 살종양제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

[0184]

"화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어 티오태파 및 시톡산(CYTOXAN)[®] 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라하이드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)[®]); 베타-라파콘; 라파콜; 콜히친; 부틸린산; 캄포테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)[®]), CPT-11 (이로노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)[®]), 아세틸캄토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비겔레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토파이신 (특히, 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 에류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디와인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 및 또한 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디와인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캑티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닉티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®] 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예를 들어 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-미캡토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 암시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스유리딘; 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-부신 작용제(anti-adrenal), 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (미국 오레곤주 유진 소재의 제이에이치에스 내추럴 프로덕츠 (JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)[®], 필데신(FILDESIN)[®]); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔[®] 파클리탁셀 (미국 뉴저지주 프린스톤 소재의 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지), 크레모포르-무함유(Cremophor-free) 아브락산(ABRAXANE)TM, 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (미국 일리노이주 샤움버그 소재의 아메리칸 파마슈티칼 파트너스(American Pharmaceutical Partners)) 및 탁소테레[®] 독세탁셀 (프랑스 안토니 소재의 롱-프랑 로라); 클로람부실; 켐시타빈 (겜자르(GEMZAR)[®]); 6-티오구아닌; 미캡토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)[®]); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)[®]); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)[®]); 노반트론; 에다트락세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소미라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈

(크셀로다(XELODA)[®]); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 및 또한 2종 이상의 상기 물질의 조합물, 예를 들어 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 플래드니솔론의 조합 요법의 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보빈과 조합한 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™)을 사용한 치료법의 약어)를 포함한다.

[0185]

또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진시킬 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하고, 종종 전신 또는 신체 전체 치료의 형태로 사용되는 항-호르몬제가 포함된다. 이것은 호르몬 자체일 수 있다. 이의 예는 항-에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조정자 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어, 놀바덱스(NOLVADEX)[®] 타목시펜), 에비스타(EVISTA)[®] 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)[®] 토레미펜; 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향조절제 (ERD); 난소를 저해하거나 기능을 차단하는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예를 들어 루프론(LUPRON)[®] 및 엘리가드(ELIGARD)[®] 류프롤리드 아세테이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트립테렐린; 다른 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)[®] 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)[®] 액세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)[®] 보로졸, 페마라(FEMARA)[®] 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)[®] 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 상기 화학요법제의 정의에는 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)[®] 또는 오스탁(OSTAC)[®]), 디드로칼(DIDROCAL)[®] 에티드로네이트, NE-58095, 조메타(ZOMETA)[®] 콜레드론산/콜레드로네이트, 포사막스(FOSAMAX)[®] 알렌드로네이트, 아레디아(AREDIA)[®] 파미드로네이트, 스켈리드(SKELID)[®] 텔루드로네이트 또는 악토넬(ACTONEL)[®] 리세드로네이트; 및 또한 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예를 들어 테라토페(THERATOPE)[®] 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)[®] 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)[®] 백신 및 박시드(VAXID)[®] 백신; 루르토테칸(LURTOTECAN)[®] 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)[®] rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (GW572016이라고도 공지된 ErbB-2 및 EGFR 이중 터로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0186]

"성장 억제제"는 본원에서 사용시에 세포 (예를 들어, Notch1을 발현하는 세포)의 성장을 시험관내 또는 생체내 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포 (예를 들어, Notch1을 발현하는 세포)의 비율(%)을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 시기에) 차단하는 작용제, 예를 들어 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상의 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 이러한 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프래드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C는 S기 정지로까지 이어진다. 추가의 정보는 무라카미(Murakami) 등이 영문 제목 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"로 하여 기재한 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1] (WB Saunders: Philadelphia, 1995)], 특히 제13면에서 찾을 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘다 주목에서 유도된 항암 약물이다. 유럽 주목에서 유도된 도세탁셀 (탁소테레[®], 롱-프랑 로라)은 파클리탁셀 (탁솔[®], 브리스톨-마이어스 스퀴브)의 반-합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세소관의 조립을 촉진시키고, 탈중합을 억제함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포의 유사분열을 억제한다.

[0187]

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

[0188]

용어 "항-신생물 조성물"은 하나 이상의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암 치료에 유용한 조성물을 나타낸다. 치료제 (항암제. 본원에서는 "항-신생물제"라고 지칭되기도 함)의 예를 들어

화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에서 사용되는 작용제, 항-혈관신생제, 세포자멸제, 항-튜불린 작용제, 독소, 및 암 치료를 위한 기타 작용제, 예컨대 항-VEGF 중화 항체, VEGF 길항제, 항-HER-2, 항-CD20, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제, 예를로티닙, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토카인, ErbB2, ErbB3, ErbB4 또는 VEGF 수용체(들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF) 및/또는 줄기 세포 인자 (SCF)에 대한 수용체 티로신 키나제의 억제제 (예를 들어, 이마티닙 메실레이트 (글리벡(Gleevec)[®], 노파르티스(Novartis))), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성 및 유기 화학적 작용제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0189] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "전구약물"은 모 약물에 비해 종양 세포에 덜 세포독성인 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 나타내고, 효소에 의해 활성화되거나 전환되어 보다 활성인 모 형태가 될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 본 발명의 전구약물은 포스페이트-함유 전구약물, 티오포스페이트-함유 전구약물, 술페이트-함유 전구약물, 펩티드-함유 전구약물, D-아미노산-개질된 전구약물, 글리코실화된 전구약물, 베타-락탐-함유 전구약물, 임의로 치환된 폐녹시아세트아미드-함유 전구약물 또는 임의로 치환된 폐닐아세트아미드-함유 전구약물, 5-플루오로시토신, 및 보다 활성의 세포독성 유리 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로유리딘 전구약물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용되는 전구약물 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예는 상기한 화학요법제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0190] "항-혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 혈관형성(vasculogenesis) 또는 바람직하지 못한 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 억제하는 적은 분자량의 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체 또는 그의 접합체 또는 융합 단백질을 나타낸다. 예를 들어, 항-혈관신생제는 상기한 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어 VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체에 대한 항체, VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706)이다. 항-혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오스타틴, 엔도스타틴 등도 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991)], [Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003)] (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항-혈관신생 요법을 기재한 표 3), [Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999)], [Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003)] (예를 들어, 항-혈관신생 인자를 기재한 표 2) 및 [Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)] (예를 들어, 임상 시험에 사용되는 항-혈관신생제를 기재한 표 1)을 참조한다.

[0191] "생물학적 샘플" ("샘플" 또는 "조직 또는 세포 샘플"이라 바꿔 지칭될 수 있음)은 개체로부터 수득한 다양한 유형의 샘플을 포함하고, 진단 또는 모니터링 검정에 사용할 수 있다. 상기 정의는 생물학적 기원의 혈액 및 다른 액체 샘플, 고체 조직 샘플, 예컨대 생검 표본 또는 조직 배양물 또는 그로부터 유래된 세포 및 그의 자손을 포함한다. 상기 정의는 또한 획득 후에 시약을 처리하거나, 가용화하거나, 특정 성분, 예컨대 단백질 또는 폴리뉴클레오티드를 풍부하게 하거나, 또는 절편화를 목적으로 반-고체 또는 고체 매트릭스 중에 매립하는 것과 같은 임의의 방법으로 조작된 샘플을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 임상 샘플을 포함하고, 또한 배양 중인 세포, 세포 상등액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생물학적 유체 및 조직 샘플도 포함한다. 생물학적 샘플의 공급원은 신선하고/하거나 동결되고/되거나 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인액으로부터 얻은 고체 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분; 뇌 척수액, 양수, 복수액 또는 간질액과 같은 체액; 임신 또는 개체의 발생 중 임의의 시점으로부터의 세포일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 생물학적 샘플은 원발성 또는 전이성 종양으로부터 수득된다. 생물학적 샘플은 자연계에서는 조직과 천연적으로 혼합되지 않는 화합물, 예를 들어 보존제, 항-응고제, 완충제, 고정제, 영양분, 항생제 등을 함유할 수 있다.

[0192] 본원에서의 목적상, 조직 샘플의 "절편"은 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예를 들어 조직 샘플로부터 절단한 조직 또는 세포의 얇은 슬라이스를 의미한다. 조직 샘플의 다수의 절편을 취하여 본 발명에 따른 분석에 사용할 수 있음이 이해된다. 몇몇 실시양태에서, 조직 샘플의 동일 절편을 형태적 및 분자적 수준 둘다에서 분석하거나, 단백질과 핵산 둘다에 대하여 분석한다.

[0193] 표현 "표지"는 본원에서 사용되는 경우에 시약, 예컨대 혁산 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되거나 융합된 화합물 또는 조성물을 나타내고, 그와 접합되거나 융합된 시약의 겸출을 용이하게 한다. 표지는

그 자체가 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변경을 촉매할 수도 있다.

[0194] Notch1 수용체 및 활성화 돌연변이

Notch 수용체는 세포 표면으로 수송되는 동안에 막횡단 도메인 외부의 약 70개 아미노산인 부위 S1에서 퓨린-유사 프로테아제에 의해 단백질분해 프로세싱되어 세포외 Notch (ECN) 서브유닛 및 Notch 막횡단 서브유닛 (NTM)을 생성한다. 이들 2개의 서브유닛은 비-공유결합으로 결합된 채로 유지되어 성숙한 이종이량체성 세포 표면 수용체를 구성한다. Notch1 ECN 서브유닛은 36개의 N-말단 EGF-유사 반복부 및 그 뒤에 일렬로 반복되는 3개의 LNR 모듈 (LNR_A, LNR_B 및 LNR_C)을 함유한다. 각각의 LNR 모듈은 3개의 디솔피드 결합 및 칼슘 이온을 배우한다고 예상되는 일군의 보존된 산성 및 극성 잔기를 함유한다. EGF 반복부 영역 내에는 활성화 리간드를 위한 결합 부위가 있다. LNR 모듈은 Notch를 리간드-유도된 활성화 이전에 휴지기 형태로 유지하는데 관여한다. Notch1 NTM은 세포외 영역, 막횡단 세그먼트 및 RAM (RBP J κ 결합 분자) 도메인, 안키린 반복부, 전사활성화 도메인 및 카르복시-말단 PEST 서열을 포함하는 커다란 세포내 부분을 포함한다. ECN 및 NTM 서브유닛의 안정적인 결합은, ECN의 카르복시-말단 종결부 (HD-C라 지칭함) 및 NTM의 세포외 아미노 말단 종결부 (HD-N이라 지칭함)를 포함하는 이종이량체화 도메인 (HD)에 의존적이다. Notch 리간드가 ECN 서브유닛에 결합하면 조절된 막내 단백질분해를 통해 일어나는 2개의 연속적인 단백질분해 절단이 개시된다. 절단 부위 S2 (NTM에 위치함)에서 메탈로프로테아제에 의해 일어나는 첫번째 절단으로, 상기 Notch 막횡단 서브유닛은 원형질막의 내엽에 근접한 절단 부위 S3에서의 두번째 절단에 감수성이 된다. 부위 S3 절단은 프레세닐린 및 니카스트린을 함유하는 다단백질 복합체에 의해 촉매되며, Notch 막횡단 서브유닛의 세포내 부분 (또한 세포내 Notch, "ICN"라 지칭되기도 함)을 유리시켜서 이것이 핵으로 전위되게 하여 표적 유전자의 전사를 활성화시킨다.

[0196] 도 11A 내지 도 11D는 인간 (서열 56) 및 마우스 (서열 57) Notch1 아미노산 서열 사이의 정렬을 보여준다. 신호 펩티드는 서열 56 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 1 내지 18에 걸쳐 있고, EGF 반복부 (EGF1 내지 EGF36)는 서열 56 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 20 내지 1426에 걸쳐 있고, LNR_A는 서열 56 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 1446 내지 1489에 걸쳐 있고, LNR_B는 서열 56 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 1490 내지 1527에 걸쳐 있고, LNR_C는 서열 56 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 1528 내지 1562에 걸쳐 있고, HD-N은 서열 56에서 대략적으로 아미노산 1563 내지 1664 또는 서열 57에서는 아미노산 1563 내지 1654에 걸쳐 있고, HD-C는 서열 56에서 대략적으로 아미노산 1665 내지 1733 또는 서열 57에서는 아미노산 1655 내지 1723에 걸쳐 있으며, PEST 도메인은 서열 56에서 대략적으로 아미노산 2484 내지 2555 또는 서열 57에서 대략적으로 아미노산 2459 내지 2530에 걸쳐 있다. HD 도메인은 HD-N 및 HD-C를 포함하고, 서열 56에서 대략적으로 아미노산 1563 내지 1733 또는 서열 57에서는 아미노산 1563 내지 1723에 걸쳐 있다. S1 절단 부위는 서열 56의 아미노산 1664와 1665 사이, 및 서열 57의 아미노산 1654와 1655 사이이다. S2 절단 부위는 서열 56의 아미노산 1720과 1721 사이, 및 서열 57의 아미노산 1710과 1711 사이이다. 막횡단 부분은 서열 56에서 대략적으로 아미노산 1736 내지 1747 및 서열 57에서 대략적으로 아미노산 1726 내지 1737에 걸쳐 있다.

[0197] Notch1 신호전달에 영향을 주는 여러가지 유형의 Notch1 돌연변이가 확인되어 특징규명된 바 있다. Notch1 신호전달을 활성화시키는 Notch1 돌연변이는 2가지의 일반적 부류에 속한다 - 즉, 리간드-독립성 및 리간드-의존성 활성화 돌연변이. 추가로, 일부의 리간드-독립성 활성화 돌연변이는 그림에도 불구하고 여전히 리간드에 반응성이다. Notch1 신호전달을 활성화시키는 돌연변이는 T-ALL과 관련이 있었다 ([Weng et al., Science 306:269-271, 2004], [Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26:4642-4651, 2006]). 특히, T-ALL과 관련이 있는 Notch1 활성화 돌연변이는 HD 영역 및 PEST 도메인에서 확인되었다. 추가로, 전위는 이상 Notch1 신호전달을 야기할 수 있다. 예를 들어, Notch1은 (7;9)(q34;q34.3) 염색체 전위에서의 파트너 유전자로서 발견되었다. 이러한 전위는 T-ALL의 희귀 서브세트에서 발견되고, Notch1 유전자의 3' 말단부를 T-세포 수용체 β 프로모터/인핸서에 융합시킨다 [Weng et al., Science 306:269-271, 2004].

[0198] 리간드 결합이 없을 때 신호를 전달하지만 리간드 결합에 대한 반응 능력은 보유하는 리간드-독립성 돌연변이의 예는 Notch1의 HD 영역에서의 돌연변이이다. 인간 Notch1의 HD-N 영역에서의 활성화 돌연변이는 예를 들어 L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P 및 I1617T/N을 포함한다. 인간 Notch1의 HD-C 영역에서의 활성화 돌연변이의 예는 V1677D, L1679P, I1681N, A1702P, I1719T, 및 S2 절단 부위에서의 삽입 (ARLGSLNIPYKIEA; 서열 52) (P12 삽입)을 포함한다. L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, L1601P, I1617T/N, V1677D, L1679P, I1681N, A1702P 및 I1719T 돌연변이 및 P12 삽입은 S2 및 S3 절단 증가를 야기하고, 상기 Notch1 신호전달은 야생형 Notch1 수용체의 신호전달보다 강하다.

- [0199] Notch1 활성화 돌연변이의 서브세트는 이종이량체 안정성을 감소시킨다 - 이것들은 ECN 영역 및 NTM의 상호작용을 약화시킨다. 인간 Notch1에서 이종이량체 안정성을 감소시키는 돌연변이의 예는 L1575P, V1577E, F1593S, L1594P, L1597H, R1599P, I1617T, I1617N, I1681N, A1702P 및 I1719T를 포함한다. P12 삽입은 내인성 HD-C 도메인을 S2 절단 부위로부터 멀리 위치이동시킨다고 예상되는 직접적인 중복에 의해 일어나고, S2 부위가 메탈로프로테아제에 접근하는 것을 증진시킬 수 있다 [Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26:4642-4651, 2006].
- [0200] 리간드-의존적인 Notch1 활성화 돌연변이의 예는 PEST 도메인에서의 돌연변이, 예컨대 리딩 프레임(reading frame)에서의 쉬프트(shift)를 유도하는 삽입 또는 결실 또는 조기 중지 코돈을 생성하는 점 돌연변이를 포함한다. 억제성 PEST 도메인의 제거는 ICN의 반감기를 증가시킨다고 여겨진다. PEST 도메인에서의 돌연변이의 예는 인간 Notch1 아미노산 서열 (서열 57)의 아미노산 2473에서 시작되는 카르복시 말단 결실인 DelPEST이다. PEST 도메인에서의 다른 돌연변이는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Weng et al. (Science 306:269-271, 2004)]에 기재되어 있다.
- [0201] **본 발명의 조성물 및 이의 제조 방법**
- [0202] 본 발명은 항-Notch1 NRR 항체, 및 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 조성물은 Notch1 NRR에 결합하는 하나 이상의 항체 및/또는 Notch1 NRR에 결합하는 하나 이상의 항체를 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 예컨대 완충제를 비롯한 제약상 허용되는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 이것은 당업계에 공지되어 있다.
- [0203] 본 발명은 또한 단리된 항체 및 폴리뉴클레오티드 실시양태를 포함한다. 본 발명은 또한 실질적으로 순수한 항체 및 폴리뉴클레오티드 실시양태를 포함한다.
- [0204] 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체는 바람직하게는 모노클로날이다. 또한, 본원에서 제공되는 항-Notch1 NRR 항체의 Fab, Fab', Fab'-SH 및 F(ab')₂ 단편도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 항체 단편은 통상의 수단, 예컨대 효소적 소화로 생성될 수도 있고, 또는 재조합 기술로 생성될 수도 있다. 이러한 항체 단편은 키메라일 수도 있고 인간화될 수도 있다. 이들 단편은 하기하는 진단 및 치료 목적에 유용하다.
- [0205] 모노클로날 항체는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 수득되는데, 즉 상기 집단에 포함된 개개의 항체들은 소량 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체들의 혼합물이 아닌 것으로서 나타낸다.
- [0206] 본 발명의 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수도 있고, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 제4,816,567호)로 제조할 수도 있다.
- [0207] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예를 들어 햄스터를 면역화하여, 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유발한다. Notch1 NRR에 대한 항체는 일반적으로 Notch1 NRR 및 아주반트를 여러회 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사하여 동물에서 생성된다. Notch1 NRR은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있고, 상기 방법 중 일부는 본원에 추가로 기재되어 있다. 예를 들어, 인간 및 마우스 Notch1 NRR의 재조합 생성을 뒤에서 기재한다. 한 실시양태에서, 동물을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 부분에 융합된 Notch1 NRR로 면역화한다. 바람직한 실시양태에서, 동물을 Notch1 NRR-IgG1 융합 단백질로 면역화한다. 일반적으로는, 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노마이콜레이트 (TDM) (미국 몬타나주 해밀턴 소재의 리비 이뮤노켐. 리씨치, 잉크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.))를 사용하여 동물을 Notch1 NRR의 면역원성 접합체 또는 유도체에 대하여 면역화하고, 상기 용액을 여러 부위에서 피내 주사한다. 2주 후, 상기 동물을 부스팅(boosting)한다. 7일 내지 14일 후에 상기 동물에서 채혈을 수행하고, 혈청을 항-Notch1 NRR 역가에 대해 검정한다. 역가가 안정한 수준에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다.
- [0208] 별법으로, 림프구를 시험관내 면역화시킬 수 있다. 이후, 적합한 융합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜서 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).
- [0209] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포를 적합한 배양 배지, 바람직하게는 미용합 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 상기 모 골수종 세포에 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HPGRT 또는 HPRT)가 결핍된 경우에는 상기 하

이브리도마의 배양 배지가 전형적으로 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함 (HAT 배지)할 것이고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 저해한다.

- [0210] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 세포이다. 이것들 중에서도 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 솔크 인스티튜트 켈 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)에서 구할 수 있는 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 미국 메릴랜드주 로크빌 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)에서 구할 수 있는 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포에서 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생성과 관련하여 기재되기도 했다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)], [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0211] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 Notch1 NRR에 대한 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전법 또는 시험관내 결합 검정법, 예를 들어 방사성면역검정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA)으로 결정한다.
- [0212] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐처드(Scatchard) 분석으로 결정할 수 있다.
- [0213] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 동정한 후에는 클론을 제한 회석 절차를 통해 서브클로닝하고 표준 방법 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]으로 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수도 있다.
- [0214] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.
- [0215] 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체를 조합 라이브러리로 제조하여 원하는 활성(들)을 갖는 합성 항체 클론을 스크리닝할 수 있다. 원칙적으로, 합성 항체 클론은 파지 외피 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 선별된다. 이러한 파지 라이브러리는 원하는 항원에 대한 친화도 크로마토그래피로 패닝(panning)된다. 원하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은 항원에 흡착되고, 이에 따라 라이브러리 내의 비-결합 클론으로부터 분리된다. 이어서, 결합 클론을 항원으로부터 용출시키고, 추가 주기의 항원 흡착/용출에 의해 더욱 풍부하게 할 수 있다. 본 발명의 임의의 항-Notch1 NRR 항체는, 적합한 항원 스크리닝 절차를 디자인하여 관심 파지 클론을 선별한 후에 관심 파지 클론으로부터의 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항-Notch1 NRR 항체 클론을 구축함으로써 수득할 수 있다.
- [0216] 항체의 항원-결합 도메인은 3개의 과가변 루프 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 모두 제공하는 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (각각 경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH)에서 하나씩)으로부터 형성된다. 가변 도메인은 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 단일-쇄 Fv (scFv) 단편 (여기서, VH 및 VL은 짧은 가요성 웨პ티드를 통해 공유 연결됨) 또는 Fab 단편 (여기서, 이를 각각은 불변 도메인에 융합되고 비-공유 상호작용함)으로서 파지에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 통칭하여 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"이라 지칭된다.
- [0217] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 따로 클로닝되고 파지 라이브러리 내에서 무작위로 재조합될 수 있고, 이후에 이것을 항원-결합 클론에 대해 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고친화도 항체를 제공한다. 별법으로, 문헌 [Griffiths et al., EMBO J., 12:725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이, 나이브(naive) 레퍼토리를 클로닝하여 임의의 면역화 없이 광범위한 범위의 비-자가 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 최종적으로, 나이브 라이브러리는 또한 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)])에 기재된 바와 같이 줄

기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트를 클로닝하고 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여 고도로 가변적인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성함으로써 합성적으로 제조될 수도 있다.

[0218] 필라멘트상 파지는 소량의 외피 단백질 pIII와의 융합을 통해 항체 단편을 디스플레이하는데 사용된다. 항체 단편은 단일-쇄 Fv 단편 (여기서, 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL 도메인은 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일 폴리펩티드 쇄 상에서 연결됨) 또는 Fab 단편 (여기서, 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의 쇄는 pIII에 융합되고, 다른 쇄는 박테리아 숙주 세포 주변세포질(periplasm)로 분비되어 여기서 야생형 외피 단백질의 일부를 Fab-외피 단백질 구조의 조립체가 대체함으로써 파지 표면 상에 디스플레이됨)으로서 디스플레이될 수 있다.

[0219] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수확한 면역 세포로부터 수득된다. 항-Notch1 NRR 클론에 유리하게 편향된 라이브러리를 원하는 경우에는 개체를 Notch1 NRR로 면역화하여 항체 반응을 생성하고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포 또는 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 회수하여 라이브러리를 구축한다. 바람직한 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 보유하는 (또한, 기능적 내인성 항체 생성 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-Notch1 NRR 항체 반응을 생성하여 Notch1 NRR 면역화가 Notch1 NRR에 대한 인간 항체를 생성하는 B 세포를 유도하도록 함으로써 수득된다. 인간 항체-생성 트랜스제닉 마우스의 생성은 뒤에서 기재한다.

[0220] 항-Notch1 NRR 반응성 세포 집단을 더욱 풍부하게 하는 것은, 예를 들어 Notch1 NRR 친화도 크로마토그래피를 사용하거나 플루오로크롬-표지된 Notch1 NRR에 대한 세포의 흡착 후에 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리를 통해서 Notch1 NRR-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 달성할 수 있다.

[0221] 별법으로, 면역화되지 않은 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL의 사용은 가능한 항체 레퍼토리를 보다 양호하게 제시하게 하고, 또한 Notch1 NRR이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축을 포함하는 라이브러리의 경우에는, 개체로부터 줄기 세포를 수확하여 재배열되지 않은 항체 유전자 세그먼트를 코딩하는 핵산을 제공한다. 관심 면역 세포는 다양한 동물 종, 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 토끼, 늑대, 개, 고양이, 돼지, 소, 말 및 조류 종 등으로부터 얻을 수 있다.

[0222] 관심 세포로부터 항체 가변 유전자 세그먼트 (VH 및 VL 세그먼트를 포함함)를 코딩하는 핵산을 회수하고 증폭시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우에, 원하는 DNA는 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 후에 문헌 [Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같이 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써 얻을 수 있다. 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, V 유전자는 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역방향 프라이머 및 J-세그먼트 내에 기반을 두는 정방향 프라이머를 사용하여 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그러나, cDNA로부터 증폭시키기 위해서는, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., *Biotechnol.*, 9:88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 엑손에 기반을 둘 수 있고, 정방향 프라이머는 문헌 [Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86:5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역 내에 기반을 둘 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 동의성(degeneracy)을 혼입시킬 수 있다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]의 방법 또는 문헌 [Orum et al., *Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이 각각의 V-유전자 부류로 표적화된 PCR 프라이머를 사용하여 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시켜서 라이브러리 다양성을 최대화한다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해서, 희귀 제한 부위를 PCR 프라이머 내에 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단부에서의 태그로서 도입할 수도 있고 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용한 추가의 PCR 증폭에 의해 도입할 수도 있다.

[0223] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리는 V 유전자 세그먼트로부터 시험관내 유도될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 세그먼트는 클로닝 및 서열결정 (문헌 [Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992)])

에 보고됨)되고 맵핑 (문헌 [Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3:88-94 (1993)]에 보고됨)되었으며, 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 이들 클로닝된 세그먼트 (H1 및 H2 루프의 주요 형태를 모두 포함함)를 사용하여 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성할 수 있다. 문헌 [Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이, 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 모든 서열 다양성을 갖는 VH 레퍼토리가 제조될 수도 있다. 인간 V_k 및 V_λ 세그먼트가 클로닝 및 서열결정 (문헌 [Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993)]에 보고됨)되었으며, 이것을 사용하여 합성 경쇄 레퍼토리를 제조할 수 있다. 소정 범위의 VH 및 VL 폴드, 및 L3 및 H3 길이에 기반을 둔 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭 후에 배선 V-유전자 세그먼트는 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내 재배열될 수 있다.

[0224]

항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 여러가지 방법으로 함께 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 여러 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., *Gene*, 128:119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 Fab 단편의 2-쇄 특성을 활용하여 이. 콜라이 형질전환 효율에 의해 부과되는 라이브러리 크기에 대한 한계를 극복한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리는 따로 클로닝되어, 하나는 파지미드 내로 클로닝되고 다른 하나는 파지 벡터 내로 클로닝된다. 이어서, 상기 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염으로 조합하여, 각각의 세포가 상이한 조합물을 함유하고 라이브러리의 크기는 존재하는 세포의 수 (약 10^{12} 개 클론)에 의해서만 제한되게 한다. 2가지 벡터 둘다 생체내 재조합 신호를 함유하여, VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘 (replicon) 상으로 재조합되고, 파지 비리온 내로 함께 패키징된다. 이러한 대형 라이브러리는 양호한 친화도 (약 10^{-8} M의 K_d^{-1})를 갖는 다수의 다양한 항체를 제공한다.

[0225]

별법으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일 벡터 내로 순차적으로 클로닝될 수도 있고, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 조립된 후에 클로닝될 수도 있다. 또한, PCR 조립을 사용하여 VH 및 VL DNA를 가요성 웨이드 스페이서를 코딩하는 DNA와 연결시켜 단일-쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성할 수도 있다. 또다른 기술에서는 문헌 [Embleton et al., *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 "세포내 PCR 조립"을 사용하여 VH 및 VL 유전자를 릴프구 내에서 PCR로 조합시킨 후에 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝한다.

[0226]

나이브 라이브러리에 의해 생성된 항체 (천연 또는 합성)는 중간 정도의 친화도 (약 10^6 내지 10^7 M $^{-1}$ 의 K_d^{-1})를 가질 수 있지만, 친화도 성숙은 또한 문헌 [Winter et al. (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 2차 라이브러리를 구축하고 그로부터 재선택함으로써 시험관내 모방될 수도 있다. 예를 들어, 돌연변이는 문헌 [Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89:3576-3580 (1992)]의 방법으로 오류-유발(error-prone) 중합효소 (문헌 [Leung et al., *Technique*, 1:11-15 (1989)]에 보고됨)를 사용함으로써 무작위로 시험관내 도입될 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은 예를 들어 선택된 개별 Fv 클론에서 관심 CDR에 걸쳐 있는 무작위 서열을 보유하는 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 하나 이상의 CDR을 무작위 돌연변이시키고, 보다 고친화도의 클론을 스크리닝함으로써 수행할 수 있다. WO 96/07754 (1996년 3월 14일 공개)는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성-결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하는 방법을 기재하였다. 또다른 효과적인 접근법은, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 천연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 갖는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 여러 회의 쇄 재셔플링 (reshuffling)으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 이러한 기술을 통해 친화도가 10^{-9} M 범위 이내인 항체 및 항체 단편을 생성할 수 있다.

[0227]

Notch1 NRR 핵산 및 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. Notch1 NRR을 코딩하는 핵산 서열은 Notch1 NRR의 원하는 영역의 아미노산 서열을 사용하여 디자인될 수 있다. 상기 서열은 서열 55, 서열 13 또는 서열 14의 서열을 포함할 수 있다. 별법으로, 진뱅크 관리 번호(GenBank Accession No.) NM_017617의 cDNA 서열 (또는 그의 단편)이 사용될 수 있다. Notch1 NRR을 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 이러한 방법은 문헌 [Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28:716-734 (1989)]에 기재된 임의의

방법에 의한 화학적 합성법, 예를 들어 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미디트 및 H-포스포네이트 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 발현 숙주 세포에 의해 선호되는 코돈이 Notch1 NRR 코딩 DNA의 디자인에 사용된다. 별법으로, Notch1 NRR을 코딩하는 DNA는 게놈 또는 cDNA 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0228] Notch1 NRR을 코딩하는 DNA 분자의 구축 후에, 상기 DNA 분자는 발현 벡터, 예를 들어 플라스미드 내의 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결되고, 여기서의 상기 제어 서열은 그 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식된다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 해당 숙주 세포와 상용가능한 종에서 유래된 복제 및 제어 서열을 함유한다. 벡터는 통상적으로 복제 부위 뿐만이 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 단백질을 코딩하는 서열도 보유한다. 원핵 및 진핵 숙주 세포에서의 발현에 적합한 벡터는 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에 추가로 기재되어 있다. 진핵 유기체, 예컨대 효모를 사용할 수도 있고, 또는 다세포 유기체, 예컨대 포유동물로부터 유래된 세포를 사용할 수도 있다.

[0229] 임의로, Notch1 NRR을 코딩하는 DNA는 분비 리더 서열에 작동가능하게 연결되어, 그 숙주 세포의 발현 생성물이 배양 배지로 분비되도록 한다. 분비 리더 서열의 예는 stII, 애코틴, 1amB, 헤르페스 GD, lpp, 알칼리성 포스파타제, 인버타제 및 알파 인자를 포함한다. 또한, 본원에서 사용하기에 적합한 것은 단백질 A의 36개 아미노산 리더 서열 [Abrahmsen et al., EMBO J., 4:3901 (1985)]이다.

[0230] 숙주 세포는 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선별하거나 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 본 발명의 상기한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 및 바람직하게는 형질전환된다.

[0231] 형질감염은 임의의 코딩 서열이 사실상 발현되는지 여부와 관계 없이 숙주 세포에 의해 발현 벡터가 흡수되는 것을 나타낸다. 예를 들어 CaPO₄ 침전법 및 전기천공법과 같은 수많은 형질감염 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 일반적으로, 해당 벡터의 작동에 대한 임의의 지시가 숙주 세포 내에서 나타나는 경우에 성공적인 형질감염이 인지된다. 형질감염 방법은 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에 추가로 기재되어 있다.

[0232] 형질전환은 DNA를 유기체 내로 도입하여 상기 DNA가 염색체의 요소로서 또는 염색체 통합에 의해 복제가능한 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 형질전환 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 일부는 본원에 추가로 기재되어 있다.

[0233] Notch1 NRR을 생성하는데 사용되는 원핵 숙주 세포는 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 일반적으로 기재된 것과 같이 하여 배양할 수 있다.

[0234] Notch1 NRR 생성에 사용되는 포유동물 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있으며, 이러한 배지는 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에 기재되어 있다.

[0235] 본 개시내용에서 언급되는 숙주 세포는 시험관내 배양물 중의 세포 뿐만이 아니라 숙주 동물 내의 세포도 포함한다.

[0236] Notch1 NRR의 정제는 당업계에서 인지되는 방법으로 수행될 수 있고, 이러한 방법 중 일부는 본원에 기재되어 있다.

[0237] 정제된 Notch1 NRR은, 파지 디스플레이 클론의 친화도 크로마토그래피 분리에 사용될 적합한 매트릭스, 예를 들어 아가로스 비드, 아크릴아미드 비드, 유리 비드, 셀룰로스, 각종 아크릴산 공중합체, 히드록실 메타크릴레이트 겔, 폴리아크릴산 및 폴리메타크릴산 공중합체, 나일론, 중성 및 이온성 캐리어 등에 부착될 수 있다. Notch1 NRR 단백질을 매트릭스에 부착시키는 것은, 문헌 [Methods in Enzymology, vol. 44 (1976)]에 기재된 방법으로 수행될 수 있다. 단백질 리간드를 다당류 매트릭스, 예를 들어 아가로스, 엑스트란 또는 셀룰로스에 부착시키는데 통상적으로 이용되는 기술은, 시아노겐 할라이드를 사용하여 상기 캐리어를 활성화시킨 후에 웹티드 리간드의 지방족 또는 방향족 1차 아민을 활성화된 매트릭스로 커플링시키는 것을 수반한다.

[0238] 별법으로, Notch1 NRR은 흡착 플레이트에 고착된 숙주 세포에서 발현되어 흡착 플레이트의 웰을 코팅하는데 사용될 수도 있고, 세포 분류에 사용될 수도 있고, 또는 스트렙타비딘-코팅된 비드를 포획하기 위해 바이오틴에 접합될 수도 있으며, 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하는 임의의 다른 당업계 공지의 방법에 사용될 수도 있다.

[0239] 파지 라이브러리 샘플을 파지 입자의 적어도 일부를 흡착제와 결합시키는데 적합한 조건하에 고정된 Notch1 NRR

과 접촉시킨다. 보통, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 88:7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산으로, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리로, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차에 따른 Notch1 NRR 항원 경쟁으로 용출시킨다. 파지는 단일 선별 라운드에서 20 내지 1,000배 농축될 수 있다. 또한, 농축된 파지를 박테리아 배양액에서 성장시키고, 추가의 선별 라운드를 실행시킬 수 있다.

[0240]

선별의 효율은 세척 동안의 해리 역학, 및 단일 파지 상의 다수 항체 단편이 항원과 동시에 결합할 수 있는지 여부를 포함하는 많은 요인에 따라 달라진다. 신속한 해리 역학 (및 약한 결합 친화도)을 갖는 항체는 짧은 세척, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 중 높은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 보유될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합에 유리하다. 느린 해리 역학 (및 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선별은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]과 WO 92/09690에 기재된 바와 같이 오랜 세척 및 1가 파지 디스플레이, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol, 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 낮은 코팅 밀도의 항원을 사용하여 촉진될 수 있다.

[0241]

Notch1 NRR에 상이한 친화도, 심지어는 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체를 선별하는 것이 가능하다. 그러나, 선별된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 일부 친화도 성숙 기술에서 수행된 바와 같음)는 항원에 가장 강하게 결합하고, 몇몇은 보다 고친화도를 갖는 많은 돌연변이체를 초래하는 경향이 있다. Notch1 NRR을 제한하면, 드문 고친화도의 파지가 경쟁에 의해 제거될 수 있다. 보다 고친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지는 과량의 바이오티닐화 Notch1 NRR과 함께 인큐베이션될 수 있지만, 바이오티닐화 Notch1 NRR은 Notch1 NRR에 대한 표적 물 친화도 상수보다 더 낮은 물농도의 농도로 사용된다. 이어서, 고친화도-결합 파지는 스트렙타비딘-코팅된 상자성(paramagnetic) 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"으로 항체는 그들의 결합 친화도에 따라 선별될 수 있고, 그의 민감도는 친화도가 보다 낮은 매우 과량의 파지로부터 2배 더 높은 수준의 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 클론의 단리를 허용한다. 고체상에 결합된 파지를 세척하는데 사용되는 조건은 또한 해리 역학을 기초로 하여 식별하기 위해 조작될 수 있다.

[0242]

항-Notch1 NRR 클론은 활성에 따라 선별될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 Notch1 수용체와 그의 리간드 (예컨대, 재기드1, 재기드2, 엘타-유사1, 엘타-유사3, 및 엘타-유사4) 사이의 결합, 또는 리간드 결합에서 유도된 Notch1의 단백질분해 절단을 차단하는 항-Notch1 NRR 항체를 제공한다. 상기 항-Notch1 NRR 항체에 상응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브리리로부터 항-Notch1 NRR 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 성장시킴으로써 상기 집단을 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비-차단 활성이 요망되는 Notch1 NRR 및 제2 단백질을 선택하고; (3) 항-Notch1 NRR 파지 클론을 고정된 Notch1 NRR에 흡착시키고; (4) 과량의 제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 중복되거나 공유하는 Notch1 NRR-결합 결정자를 인식하는 임의의 원치않는 클론을 용출시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용출시킴으로써 선택될 수 있다. 임의로, 원하는 차단/비-차단 특성을 갖는 클론은 본원에 기재된 선별 절차를 1회 이상 반복함으로써 추가로 농축될 수 있다.

[0243]

본 발명의 하이브리도마-유래된 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 원하는 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 디자인된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열결정된다. 일단 단리된 후, DNA는 발현 벡터 내로 도입될 수 있고, 이어서 이는 재조합 숙주 세포에서 원하는 모노클로날 항체의 합성을 달성하기 위해 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 이뮤노글로불린 단백질을 달리 생산하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염된다. 박테리아에서 항체-코딩 DNA의 재조합 발현에 관한 문헌으로는 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs, 130:151 (1992)])이 있다.

[0244]

본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 문헌 [Kabat et al. 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있다)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. 임의의 이소형의 불변 영역, 예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있고, 상기 불변 영역은 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄를 위한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 바람직한 실시양태에서, 인간 가변

DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 모든 인간 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.

[0245] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 하이브리도마- 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유 연결시켜 추가로 변형될 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

항체 단편

[0247] 본 발명은 항체 단편을 포함한다. 특정 상황에서는, 온전한 항체보다 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편은 신속한 클리어런스를 가능하게 하고, 충실성 종양에 대한 접근성을 개선시킬 수 있다.

[0248] 항체 단편 생산을 위해 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 상기 단편은 무손상 항체의 단백질 분해 소화를 통해 유도되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]) 참조). 그러나, 상기 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되고 이로부터 분비되어 다양한 상기 단편을 쉽게 생산하게 할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의한 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 $F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 다른 방법에 따르면, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편이 미국 특허 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 해당 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894; 및 미국 특허 5,587,458 참조). Fv 및 sFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고, 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합하다. sFv 융합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 효과기 단백질의 융합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

인간화 항체

[0249] [0250] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비-인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이를 비-인간 아미노산 잔기는 일반적으로 "도입(import)" 가변 도메인으로부터 취한 "도입" 잔기로서 종종 언급된다. 인간화는 본질적으로 인간 항체의 상응하는 서열을 과가변 영역 서열로 대체함으로써 윈터(Winter) 및 공동연구자의 방법 (문헌 [Jones et al (1986) Nature, 321:522-525], [Riechmann et al (1988) Nature, 332:323-327]; [Verhoeyen et al (1988) Science, 239:1534-1536])을 따라 수행할 수 있다. 따라서, 상기 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 작은 도메인이 비-인간 종의 상응하는 서열로 대체된 키메라 항체 (미국 특허 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 일반적으로 일부 과가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.

[0251] 인간화 항체 제조에 사용되는 경쇄 및 중쇄 모두의 인간 가변 도메인의 선택은 항원성 감소를 위해 중요할 수 있다. 소위 "최적 맞춤(best-fit)" 방법에 따르면, 설치류 항체의 가변 도메인 서열은 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 것과 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체의 인간 프레임워크로서 허용된다 (문헌 [Sims et al (1993) J. Immunol., 151:2296]; [Chothia et al (1987) J. Mol. Biol., 196:901]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위집단의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래한 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 복수개의 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al (1993) J. Immunol., 151:2623]).

[0252]

항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것이 일반적으로 더욱 바람직하다. 이를 달성하기 위해서, 한 방법에 따르면, 인간화 항체는 모서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모서열 및 상이한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수 가능하고, 당업자에게 잘 알려져 있다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 형태적 구조를 그려 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용 가능하다. 상기 디스플레이의 조사를 통해 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 끼치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 과가변 영역 잔기는 항원 결합에 대한 영향에 직접적으로 가장 실질적으로 관련이 있다.

[0253]

인간 항체

[0254]

본 발명의 인간 항-Notch1 NRR 항체는 인간-유래 과자 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기한 바와 같이 공지의 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축할 수 있다. 별법으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항-Notch1 NRR 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 제조를 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 [Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984)], [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)] 및 [Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)])에 기재되어 있다.

[0255]

면역화시에, 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재하에 인간 항체의 전체 래퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 생산하는 것이 또한 가능해졌다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 기재되었다. 상기 생식세포 돌연변이체 마우스에서 인간 생식세포 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전이는 항원 시험 접종시에 인간 항체를 생성시킬 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362:255 (1993)] 및 [Brugermann et al., Year in Immunol, 7:33 (1993)])을 참조한다.

[0256]

또한, 유전자 셀플링을 사용하여 비-인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도할 수 있고, 여기서 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅(imprinting)"으로 불리는 상기 방법에 따라, 상기한 바와 같은 과자 디스플레이 기술에 의해 얻은 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 래퍼토리로 대체되어 비-인간 쇄/인간 쇄 scFv 또는 Fab 키메라의 집단을 생성시킨다. 항원으로 선택하면, 비-인간 쇄/인간 쇄 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되는데, 이때 인간 쇄가 1차 과자 디스플레이 클론에서 상응하는 비-인간 쇄의 제거시에 파괴되는 항원 결합 부위를 복구한다 - 즉, 에피토프가 인간 쇄 파트너 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비-인간 쇄를 대체하기 위해 상기 과정을 반복하면 인간 항체를 얻게 된다 (1993년 4월 1일 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 상기 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0257]

이중특이적 항체

[0258]

이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다. 본 발명의 경우, 결합 특이성 중 하나는 Notch1 NRR에 대한 것이고, 다른 하나는 임의의 다른 항원에 대한 것이다. 예시적인 이중특이적 항체는 Notch1 NRR의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이적 항체는 또한 Notch1 NRR을 발현하는 세포에 세포독성제를 국소화시키는데 사용될 수도 있다. 이들 항체는 Notch1 NRR-결합 아암, 및 세포독성제에 결합하는 아암 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로서 제조될 수 있다.

[0259]

이중특이적 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이적 항체의 재조합 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 중쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein and Cuello, Nature, 305:537 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이들 하이브리도마 (쿠아드로마(quadroma))는 10종의 상이한 항체 분자의 가능한 혼합물을 생산하는데, 이 중에서 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 보통 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한

분자의 정체는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 1993년 5월 13일 공개된 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991)]에 개시되어 있다.

[0260] 상이한 더욱 바람직한 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 융합은 예를 들어 헌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 사용한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재한다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및, 필요한 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시 형질감염시킨다. 이는 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇄의 불균등한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3종의 폴리펩티드 단편의 동일하지 않은 비율을 조정하는데 있어서 높은 융통성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2종 이상의 폴리펩티드 쇄의 발현이 고수율로 일어나거나 상기 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우에는 하나의 발현 벡터 내에 2종 또는 3종의 모든 폴리펩티드 쇄의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0261] 상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 손쉬운 분리 방법을 제공하므로, 상기 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이 방법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0262] 다른 방법에 따르면, 한쌍의 항체 분자들 사이의 계면은 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율을 최대화하도록 처리될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 상기 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들면, 티로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들면, 알라닌 또는 트레오닌)으로 교체함으로써 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "캐비티(cavity)"가 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예를 들어 동종이량체에 의해 이종이량체의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다.

[0263] 이중특이적 항체는 가교결합 또는 "이종접합" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 바이오틴에 커플링될 수 있다. 상기 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/00373 및 EP 03089) 제안되었다. 이종접합 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합체는 당업계에 잘 알려져 있고, 많은 가교결합 기술과 함께 미국 특허 4,676,980에 개시되어 있다.

[0264] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 결합을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)]에서는 무손상 항체가 단백질 분해 방식으로 절단되어 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기술하고 있다. 이를 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디슬피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비소산나트륨의 존재하에 환원된다. 이어서, 생성된 Fab' 단편은 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환된다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나는 머캅토에틸아민으로 환원시켜 Fab'-티올로 재전환되고, 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 이중특이적 항체를 형성한다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로서 사용될 수 있다.

[0265] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)]에서는 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 기술하고 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비되었고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내에서 유도 화학 커플링 반응에 적용되었다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 HER2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발시킬 수 있었다.

[0266] 이중특이적 항체 단편을 재조합 세포 배양액으로부터 직접 제조하고 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생산되었다 (문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 웹티드가 유전자 융합에 의해 2종의 상이

한 항체의 Fab' 부분에 연결되었다. 항체 동종이량체는 헌지 영역에서 환원되어 단량체를 형성한 다음, 재산화되어 항체 이종이량체를 형성하였다. 상기 방법은 또한 항체 동종이량체의 생산에 이용될 수도 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편 제조를 위한 다른 메카니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 쇄 상의 두개의 도메인 사이에 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인과 강제로 페어링되고, 이에 의해 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용한 이종특이적 항체 단편의 다른 제조 전략도 보고된 바 있다 (문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)] 참조).

[0267] 2가 초과의 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)]).

다가 항체

[0269] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 빠르게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 항원 결합 부위가 3개 이상인 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 부류 이외의 것)일 수 있고, 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 헌지 영역을 포함한다 (또는 이루어진다). 상기 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 바람직한 다가 항체는 3 내지 약 8개, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다. 다가 항체는 하나 이상의 폴리펩티드 쇄 (예를 들어, 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하고, 여기서 폴리펩티드 쇄(들)은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄(들)은 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 쇄가고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄(들)은 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역 쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 쇄를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 더 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 더 포함한다.

항체 변이체

[0271] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 웨პ티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 상기 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는 한, 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 최종 구축물에서 발생하게 된다. 아미노산 변경은 서열이 제조될 때 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0272] 돌연변이유발을 위해 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"로 불린다. 여기서, 표적 잔기들의 잔기 또는 기가 확인되고 (예를 들면, arg, asp, his, lys 및 glu과 같은 대전된 잔기), 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 주도록 중성 또는 음으로 대전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 교체된다. 이어서, 치환에 대한 기능적 감수성을 나타내는 이들 아미노산 위치는 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가의 또는 다른 변이체를 도입함으로써 개량된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 자체의 성질은 미리 결정할 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 분석하기 위해 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고, 발현된 이뮤노글로불린은 원하는 활성에 대해 스크리닝된다.

[0273] 아미노산 서열 삽입은 길이가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/ 또는 카르복실-말단 융합체, 뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체, 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체가 있다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체로는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 (예를 들어, ADEPT) 또는 폴리펩티드에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 대한 융합체가 있다.

[0274]

폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기의 측쇄에 탄수화물 모이어티의 부착을 의미한다. 트리펩티드 서열, 즉 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄로의 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내의 상기 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성시킨다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세일갈락토스아민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 일반적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신도 사용될 수 있다.

[0275]

항체에 대한 글리코실화 부위의 부가는 하나 이상의 상기 트리펩티드 서열 (N-연결 글리코실화 부위에 대해)을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성된다. 또한, 변형은 본래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가, 결실 또는 치환에 의해 수행될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0276]

항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 여기에 부착된 탄수화물은 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 결핍된 성숙 탄수화물 구조를 갖는 항체는 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (프레스타, 엘.(Presta, L.))에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 하코 고교사(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물에 이등분(bisecting) N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 2003/011878 (진-메이렛(Jean-Mairet) 등)과 미국 특허 6,602,684 (우마나(Umana) 등)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고당 내에 하나 이상의 갈락토스 잔기를 갖는 항체는 WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등)에 보고되어 있다. 또한, Fc 영역에 부착된 변경된 탄수화물을 갖는 항체에 관하여는 WO 1998/58964 (라주, 에스.(Raju, S.))와 WO 1999/22764 (라주, 에스.)를 참조한다. 또한, 변경된 글리코실화가 존재하는 항원 결합 분자에 대해서는 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 참조한다.

[0277]

본원에서 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 결핍되어 있는 Fc 영역을 포함한다. 상기 변이체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 추가로 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)의 치환을 더 포함한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 연관된 간행물의 예로는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)])이 있다. 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]); 미국 특허 출원 공개 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히 실시예 11), 및 넉아웃(knockout) 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)])를 포함한다.

[0278]

다른 종류의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이들 변이체는 항체 분자의 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 교체되어 있다. 치환 돌연변이유발을 위한 가장 흥미로운 부위는 과가변 영역을 포함하지만, FR 변형도 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제하에 표 1에 나타낸다. 상기 치환이 생물학적 활성의 원하는 변경을 유도하면, 하기 표 1에 "예시적인 치환"으로 명명되거나 아미노산 종류에 대해 하기로 기재된 보다 실질적인 변화가 도입되어, 생성물을 스크리닝할 수 있다.

표 1

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

[0279]

[0280] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역 내 폴리펩티드 주쇄의 구조, 예를 들어 시트 또는 나선 형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크성(bulk)을 유지하는 것에 미치는 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 천연 발생 잔기는 통상적인 측쇄 특성을 기초로 하여 다음 군으로 분류할 수 있다:

[0281] (1) 소수성: 노르뉴신, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

[0282] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,

[0283] (3) 산성: Asp, Glu,

[0284] (4) 염기성: His, Lys, Arg,

[0285] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro, 및

[0286] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0287] 비보존적 치환은 상기 종류의 하나의 일원을 다른 종류와 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0288] 한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 과가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가 개발을 위해 선택된 생성되는 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 변형된 (예를 들어, 개선된) 생물학적 특성을 가질 것이다. 그러한 치환 변이체를 생성하기 위한 편리한 방법은 과자 디스플레이를 사용하는 친화도 성숙이다. 간단히 설명하면, 몇몇 과가변 영역 부위 (예를 들어, 6-7개의 부위)가 각 부위에서 모든 가능한 아미노 치환을 생성하도록 돌연변이된다. 이렇게 생성된 항체는 각 입자 내에 패키징된 과자 외피 단백질의 적어도 일부 (예를 들어, M13의 유전자 III 산물)에 대한 융합체로서

필라멘트상 파지 입자로부터 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 그들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 과가변 영역 부위를 확인하기 위해, 항원 결합에 유의하게 기여하는 과가변 영역 잔기를 확인하는 스캐닝 돌연변이유발 (예를 들어, 알라닌 스캐닝)을 수행할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위해 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 상기 접촉 잔기 및 이웃 잔기가, 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 그러한 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본원에서 기재된 기술을 포함하여 당업계에 공지된 기술을 사용하여 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0289] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 상기 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (천연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 항체의 초기 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위 지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0290] 본 발명의 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직 할 수 있다. Fc 영역 변이체는 헌지 시스테인의 위치를 포함하여 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 변형 (예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0291] 본원 명세서 및 선행기술의 교시 내용에 따르면, 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 상응 항체에 비해, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변형을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고, 상기 항체는 야생형 상응 항체와 비교할 때 치료 유용성에 필요한 실질적으로 동일한 특성을 보유할 것이다. 예를 들어, WO 99/51642에 기재된 바와 같이 변경된 (즉, 개선되거나 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 야기하는 특정 변형이 Fc 영역에서 형성될 수 있다고 생각된다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 대해서는 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 5,648,260; 미국 특허 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참고한다. WO 00/42072 (프레스타(Presta)) 및 WO 2004/056312 (로우만(Lowman))에는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체가 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다 (또한, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)] 참조). 모체 IgG의 태아로의 전달을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에 대한 개선된 결합 및 증가된 반감기를 갖는 항체는 US2005/0014934A1 (힌톤(Hinton) 등)에 기재되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에 대한 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 그 내부에 갖는 Fc 영역을 포함한다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열 및 증가 또는 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 미국 특허 6,194,551 B1 및 WO 99/51642에 기재되어 있다. 상기 특허 공개의 내용은 본원에 참고로 구체적으로 포함된다. 또한, 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)]도 참조한다.

항체 유도체

[0293] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 이용가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비-제한적인 예로는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥슬란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 무작위 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알코올 및 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이로 한정되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 그의 물에서의 안정성 때문에 제조상의 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있으며, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과의 중합체가 부착될 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 종류는 개선시키고자 하는 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건하에서 요법에 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나 이로 한정되지 않는 고려사항을 기초로 하여 결정될 수 있다.

원하는 특성을 갖는 항체에 대한 스크리닝

[0295] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및 생물학적 기능에 대해 특징

분석될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 Notch1 활성화의 감소 또는 차단, Notch1 하류 분자 신호전달의 감소 또는 차단, 리간드 (예를 들어, 재기드1, 재기드2, 멜타-유사1, 멜타-유사3, 또는 멜타-유사4)와의 Notch1 결합의 방해 또는 차단, 및/또는 중양, 세포 증식성 장애 또는 암의 치료 및/또는 예방; Notch1 발현 및/또는 활성 (예컨대, 증가된 Notch1 발현 및/또는 활성)과 관련된 장애의 치료 및/또는 예방 중 임의의 하나 이상에 대해 특징분석될 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체는 Notch1 활성화의 유도 또는 증가, Notch1 하류 분자 신호전달의 유도 또는 증가, 및/또는 Notch1 발현 및/또는 활성과 관련된 장애의 치료 또는 예방 중 임의의 하나 이상에 대해 특징분석될 수 있다.

[0296] 정제된 항체를 N-말단 서열결정, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 비롯한 (이에 한정되지는 않음) 일련의 검정에 의해 추가로 특성화할 수 있다.

[0297] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 생산된 항체는 그의 생물학적 활성에 대해 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 그의 항원 결합 활성에 대해 시험된다. 당업계에 공지되어 있으며 본원에서 사용될 수 있는 항원 결합 검정에는 웨스턴 블로트, 방사성면역검정, ELISA (효소 연결된 면역흡수 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 사용하는 임의의 직접적 또는 경쟁적 결합 검정이 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 예시적인 항원 결합 검정이 하기 실시예 단락에 제공된다.

[0298] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 Notch1 NRR에의 결합에 대해 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 및/또는 항체 A-3과 경쟁하는 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체를 제공한다. 이러한 경쟁자 항체는 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 및/또는 항체 A-3에 의해 인식되는 Notch1 NRR 에피토프와 동일하거나 이와 중복되는 Notch1 NRR 에피토프를 인식하는 항체를 포함한다. 이러한 경쟁자 항체는 표지된 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 및/또는 항체 A-3과의 경쟁에서 고정된 Notch1 NRR에의 결합에 대해 항-Notch1 NRR 하이브리도마 상등액을 선별함으로써 수득될 수 있다. 경쟁자 항체를 함유하는 하이브리도마 상등액은, 관계없는 항체를 함유하는 (또는 항체를 함유하지 않는) 대조군 결합 혼합물에서 검출된 결합, 표지된 항체의 양에 비해 대상체 경쟁 결합 혼합물에서 검출된 결합, 표지된 항체의 양을 감소시킬 것이다. 본원에 기재된 임의의 경쟁 결합 검정은 상기 절차에서 사용하기에 적합하다.

[0299] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 또는 항체 A-3의 하나 이상 (예컨대 2, 3, 4, 5, 및/또는 6개)의 HVR을 포함하는 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체를 제공한다. 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 및/또는 항체 A-3의 하나 이상의 HVR(들)을 포함하는 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체는 템플레이트 항체 서열, 예를 들어 모 항체의 상응하는 뮤린 서열에 밀접한 인간 항체 서열, 또는 모 항체 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군에서 모든 인간 항체의 컨센서스 서열 상에 항체 A, 항체 A-1, 항체 A-2, 및/또는 항체 A-3의 하나 이상의 HVR(들)을 그래프팅하고, 본원에 기재된 바와 같은 재조합 숙주 세포에서 수반하는 불변 영역 서열(들)과 함께 또는 이(들)없이 생성된 키메릭 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역 서열(들)을 발현시켜 제작될 수 있다.

[0300] 본원에 기재된 고유한 성질을 갖는 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체는 임의의 편리한 방법에 의해 목적하는 성질에 대한 항-Notch1 NRR 하이드로마 클론을 선별함으로써 수득될 수 있다. 예를 들어, Notch1에 대한 Notch1 리간드의 결합을 차단하거나 또는 차단하지 않는 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체가 필요한 경우, 후보 항체가 결합 경쟁 검정, 예컨대 경쟁적 결합 ELISA에서 시험될 수 있으며, 여기서 플레이트 웰을 Notch1로 코팅하고, 과량의 Notch1 중 항체의 용액을 코팅된 플레이트 상에 충상화하고, 결합된 항체를 효소적으로 검출, 예를 들어 결합된 항체를 HRP-접합된 항-Ig 항체 또는 비오티닐화된 항-Ig 항체와 접촉시키고, 예를 들어 플레이트를 스트렙타비딘-HRP 및/또는 과산화수소로 전개시켜 HRP 컬러 반응을 전개시키고, HRP 컬러 반응을 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 490 nm에서 분광계에 의해 검출한다.

[0301] 세포 성장을 억제하는 항-Notch1 NRR 항체가 필요한 경우, 후보자 항체가 세포 성장의 억제를 측정하는 시험관내 및/또는 생체내 검정에서 시험될 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있으며, 본원에 추가로 기재 및 예시된다.

[0302] 한 실시양태에서, 본 발명은 생체내 항체의 반감기가 중요하지만 특정 작동체 기능 (예컨대 상보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 다수의 응용에서 항체를 바람직한 후보자로 만드는 작동체 기능 일부 (전부는 아님)를 갖는 변형된 항체를 고찰한다. 특정 실시양태에서, 생산된 이뮤노글로불린의 Fc 활성을 측정하여 필요한 성질만을 유지하도록 보증한다. 시험관내 및/또는 생체내 생체독성 검정을 수행하여 CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/소실을 확인할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행하여, 항체가 FcγR 결합은 결핍되어 있지만 (따라서 ADCC 활성도 결핍됨) FcRn 결합력은 보유한다는 것을 보증할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII 만을 발현하지만, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현하다. 조혈 세포 상

의 FcR 발현이 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 페이지 464의 표 3에 요약되어 있다. 목적 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 한 예가 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 검정에 유용한 작동체 세포에는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 추가적으로, 목적 분자의 ADCC 활성을 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 또한, C1q 결합 경정을 수행하여 항체가 C1q에 결합할 수 없으며 따라서 CDC 활성이 결핍된다는 것을 확인할 수 있다. 상보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 또한, 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 실시에 단락에 기재된 방법을 사용하여 FcRn 결합 및 생체내 제거율/반감기 측정을 수행할 수 있다.

[0303]

벡터, 숙주 세포, 및 재조합 방법

[0304]

본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해, 그를 코딩하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능 벡터 내로 삽입시킨다. 항체를 코딩하는 DNA를 통상의 방법을 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리하고 서열결정한다. 다수의 벡터가 이용될 수 있다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 의해 결정된다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 (일반적으로 포유동물)에서 기원한다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 비롯한 임의의 이소형의 불변 영역이 이러한 목적을 위해 사용될 수 있고, 상기 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 얻을 수 있음이 이해될 것이다.

[0305]

a. 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0306]

i. 벡터 제조

[0307]

본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생산 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 별법으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 이용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따라 결정될 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입체 및 전사 종결 서열을 포함하지만 이로 한정되지는 않는다.

[0308]

일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 조절 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선별을 제공할 수 있는 마킹 (marking) 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 일반적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라사이클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지도 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 카터 (Carter) 등의 미국 특허 5,648,237에 상세하게 기재되어 있다.

[0309]

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

[0310]

본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 그의 발현을 조정하는 시스트론에 대해 상류 (5')에 위치하는 비번역 조절 서열이다. 원핵 생물 프로모터는 전형적으로 두 종류의 프로모터, 즉 유도가능 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도가능 프로모터는 배양 조건의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도의 변화에 반응하여 그의 제어하에 시스트론의 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다.

[0311]

다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 매우 많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급된 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으

로써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘다 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0312] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 PhoA 프로모터, β -갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예를 들어 tac 또는 trc 프로모터를 포함한다. 그러나, 박테리아 (예를 들어, 다른 공지의 박테리아 또는 과지 프로모터)에서 가능한 다른 프로모터도 적합하다. 이들의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 따라서 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터 (adaptor)를 사용하여 이를 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션 시킬 수 있다 [Siebenlist et al (1980) Cell 20:269].

[0313] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위 (translocation)를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택되는 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱되는 (즉, 신호 켓티다제에 의해 절단되는) 것이어야 한다. 이종 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식하여 프로세싱하지 않는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은 예를 들어 알칼린 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, Pe1B, OmpA 및 MBP로 이루어지는 군으로부터 선택되는 원핵 신호 서열에 의해 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 두 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.

[0314] 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생산은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고 조립되어 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 군주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB- 군주)는 디슬피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 조립을 허용한다 [Proba and Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)].

[0315] 본 발명의 항체 발현에 적합한 원핵 숙주 세포는 원시세균 및 진정세균, 예를 들어 그램-음성 또는 그램-양성 유기체를 포함한다. 유용한 박테리아의 예는 에스케리치아 (Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실러스 (Bacilli) (예를 들어, 비. 섭틸리스 (B. subtilis)), 장내세균 (Enterobacteria), 슈도모나스 (Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사 (P. aeruginosa)), 살모넬라 티피무리움 (Salmonella typhimurium), 세라티아 마르세스칸스 (Serratia marcescans), 클렙시엘라 (Klebsiella), 프로테우스 (Proteus), 시겔라 (Shigella), 리조비아 (Rhizobia), 비트레오실라 (Vitreoscilla), 또는 파라코커스 (Paracoccus)를 포함한다. 한 실시양태에서, 그램-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 군주의 예로는 유전자형 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (미국 특허 5,639,635)을 갖는 군주 33D3를 비롯한 군주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.:American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체를 들 수 있다. 다른 군주 및 그의 유도체, 예를 들어 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 비, 이. 콜라이 λ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 상기 예는 제한적이 아니라 예시적이다. 한정된 유전자형을 갖는 임의의 상기 언급된 박테리아의 유도체를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, 이. 콜라이, 세라티아 또는 살모넬라 종은 pBR322, pBR325, pACYC177 또는 pKNA10과 같은 널리 공지된 플라스미드가 레플리콘을 공급하는데 사용될 경우 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

ii. 항체 생산

[0316] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0317] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또다

른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 이용되는 또다른 기술은 전기천공이다.

- [0319] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵 세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰 (luria broth) (LB)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵 세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구조를 기초로 하여 선택된 선별제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.
- [0320] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로 또는 복합 질소 공급원과 같은 다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오프레이톨로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상의 환원제를 함유할 수 있다.
- [0321] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이의 성장 온도는 예를 들어 약 20 °C 내지 약 39°C, 약 25°C 내지 약 37°C, 및 약 30°C이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이. 콜라이에 대해, pH는 약 6.8 내지 약 7.4, 또는 약 7.0이다.
- [0322] 유도가능 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용될 경우, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 한 실시양태에서, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 인듀서가 사용될 수 있다.
- [0323] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 단백질 회수는 전형적으로, 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 과쇄물 또는 온전한 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화도 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 별별으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상등액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블로트 분석과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0324] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생산은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 (fed-batch) 발효 절차는 재조합 단백질의 생산에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 특정 실시양태에서 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 상기 발효기는 산소 및 영양물, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로 부피 용량으로 대략 100 리터 이하인 발효기에서의 발효를 지칭하며, 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.
- [0325] 발효 과정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD550으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 인듀서를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.
- [0326] 본 발명의 폴리펩티드의 생산 수율 및 품질을 개선시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적절한 조립 및 폴딩을 개선시키기 위해, Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 (chaperone) 활성을 갖는 웨스턴 블로트 분석과 같은 사페론 단백질을 과발현하는 추가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 동시에 형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생산된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Chen et al (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 조지오 (Georgiou) 등의 미국 특허 6,083,715; 조지오 등의 미국 특허 6,027,888; [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210]).
- [0327] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결합된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주는 프로테아제 III,

OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 이들의 조합물과 같은 공지된 박테리아 프로테아제를 코딩하는 유전자에서 유전자 돌연변이(들)를 수행하도록 변형될 수 있다. 일부 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 문헌 [Joly et al (1998), 상기 문헌]; 조지오 등의 미국 특허 5,264,365; 조지오 등의 미국 특허 5,508,192; 문헌 [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)])에 기재되어 있다.

[0328] 한 실시양태에서, 단백질 분해 효소가 결핍되고 1종 이상의 샤페론 단백질을 과발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0329] *iii. 항체 정제*

[0330] 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 다음 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화도 또는 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전법, 및 예를 들어 세파덱스 (Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0331] 한 측면에서, 고체상 상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전체 길이 항체 생성물의 면역친화도 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고 친화도로 결합하는 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)로부터의 41 kD 세포벽 단백질이다 (문헌 [Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]). 단백질 A가 고정되는 고체상은 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 컬럼 또는 제어된 공극 유리 컬럼 또는 규산 컬럼일 수 있다. 일부 용도에서, 컬럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

[0332] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 제제를 단백질 A가 고정된 고체상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적 결합된 오염물을 제거한다. 최종적으로, 목적하는 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0333] **b. 진핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:**

[0334] 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 1종 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0335] (i) 신호 서열 성분

[0336] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱된 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단된) 것일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다. 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임 (reading frame)으로 라이게이션된다.

[0337] (ii) 복제 기점

[0338] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0339] (iii) 선별 유전자 성분

[0340] 발현 및 클로닝 벡터는 선별가능한 마커로도 지정되는 선별 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선별 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 연관된 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양물을 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0341] 선별 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 상기 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선별 처리시에도 생존한다. 이러한 우세한 선별의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 이용한다.

[0342] 포유동물 세포에 적합한 선별가능 마커의 다른 예는 항체 핵산, 예를 들어 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 테아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등을 섭취하는데 감응성이 있는 세포의 확인을 가능하게 하는 것이다.

[0343] 예를 들어, DHFR 선별 유전자로 형질전환된 세포는 우선 메토트렉세이트 (Mtx), DHFR의 경쟁적 길항제를 함유하

는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인할 수 있다. 야생형 DHFR을 사용할 때 적합한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0344] 별법으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 다른 선별가능 마커, 예를 들어 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 이것으로 함께 형질전환된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선별가능 마커에 대한 선별체, 예를 들어 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신, 또는 G418를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선별될 수 있다. 미국 특히 4,965,199를 참조한다.

[0345] (iv) 프로모터 성분

[0346] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 진핵 세포에 대한 프로모터 서열이 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 약 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT 풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발부로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 영역이다. 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에는 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 모든 상기 서열이 진핵 발현 벡터 내에 적합하게 삽입될 수 있다.

[0347] 포유동물 숙주 세포 내의 벡터로부터의 전사는 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성일 경우 바이러스, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 조류폭스 바이러스, 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 열 충격 프로모터로부터 얻은 프로모터에 의해 조절될 수 있다.

[0348] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 또한 SV40 바이러스 복제 기점을 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 인간 사이토메갈로바이러스의 극초기 (immediate early) 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻는다. 소 유두종 바이러스를 벡터로서 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 시스템은 미국 특히 4,419,446에 기재되어 있다. 이 시스템의 변형은 미국 특히 4,601,978에 기재되어 있다. 별법으로, 라우스 육종 바이러스의 장쇄 말단 반복부가 프로모터로서 사용될 수도 있다.

[0349] (v) 인핸서 요소 성분

[0350] 고등 진핵 세포에 의한 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -페토단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 일반적으로 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 (bp 100-270) 쪽의 SV40 인핸서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인핸서 요소를 기재한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 벡터 내 위치 5' 또는 3'에서 항체 폴리펩티드 코딩 서열로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터부터 부위 5'에 위치한다.

[0351] (vi) 전사 종결 성분

[0352] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 함유할 수도 있다. 상기 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상 얻을 수 있다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다. 한 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0353] (vii) 숙주 세포의 선별 및 형질전환

[0354] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵 세포를 포함한다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 라인 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1997)]; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urbaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌

[Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 벼팔로 래트 간세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암세포주 (Hep G2)이다.

[0355] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기한 발현 또는 클로닝 벡터를 사용하여 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키는데 적절하게 변형된 통상의 영양 배지에서 배양한다.

[0356] (viii) 숙주 세포의 배양

본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 배지, 예를 들어 햄 (Ham) F10 (시그마 (Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 (Dulbecco) 개질 이글 (Eagle) 배지 (DMEM, 시그마)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)], 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985)에 기재된 임의의 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예를 들어, HEPES), 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들어, 젠타마이신(GENTAMYCIN)™ 약물), 미량 원소 (보통 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물이 또한 당업자에게 잘 알려진 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등은 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0358] (ix) 항체의 정제

[0359] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생산되거나 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되면, 제1 단계로서, 입자형 파쇄물, 숙주 세포 또는 용해된 단편은 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 상기 발현 시스템으로부터의 상등액을 일반적으로 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Palllicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축할 수 있다. 단백질 분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF가 임의의 선행 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

[0360] 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어, 히드록실아파티트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화도 크로마토그래피가 편리한 기술이다. 친화도 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간 γ 1, γ 2 또는 γ 4 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al. J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ 3에 대해 추천된다 (문헌 [Guss et al. EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화도 리간드가 부착되는 매트릭스는 아가로스일 수 있지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들어 제어된 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠이 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유동 속도와 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이.티. 베이커 (J.T. Baker), 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들어 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전도 회수되는 항체에 따라 사용될 수 있다.

[0361] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물을 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는, 약 2.5-4.5의 pH의 용출 완충액을 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[0362] 면역접합체

[0363] 또한, 본 발명은 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식

물, 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성 접합체)에 접합된 본 발명의 임의의 항-Notch1 NRR 항체를 포함하는 면역접합체 (상호교환가능하게 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"로 언급됨)를 제공한다.

[0364]

세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 암의 치료에서 종양 세포를 살해 또는 억제하는 약물의 국소 전달을 위해 항체-약물 접합체를 사용함으로써 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172; 미국 특허 4,975,278] 참조) 약물 모이어티를 종양에 표적 전달하고 세포내 축적시킬 수 있으며, 여기서 이를 비접합 약물 제제의 전신적 투여는 정상 세포 뿐만 아니라 제거되어야 할 종양 세포에 허용불가능한 수준의 독성을 초래할 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506] 참조). 따라서 최소 독성을 갖는 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 둘 다가 이를 전략에 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87] 참조). 이를 방법에 사용된 약물에는 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트 및 빈데신이 포함된다 (문헌 [Rowland et al., (1986) supra] 참조). 항체-독소 접합체에 사용된 독소에는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소, 예컨대 리신, 소분자 독소, 예컨대 젤다나마이신 (문헌 [Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al., (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al., (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791] 참조), 메이탄시노이드 (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al., (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al., (1993) Cancer Res. 53:3336-3342] 참조)이 포함된다. 독소는 튜불린 결합, DNA 결합 또는 토포이소머라제 억제를 포함하는 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 거대 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우 불활성이거나 덜 활성인 경향이 있다.

[0365]

ZEVALIN® (이브리투모맙 티옥세탄, 바이오젠/이텍(Biogen/Idec))은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된 ¹¹¹In 또는 ⁹⁰Y 방사성동위원소로 구성된 항체-방사성동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69] 참조). ZEVALIN® B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대한 활성을 갖더라도, 투여는 대부분의 환자에서 심각한 장기 혈구감소증을 초래한다. 칼리케아미신에 연결된 huCD33 항체로 구성된 항체 약물 접합체인 MYLOTARG™ (젬투주맙 오조가미신, 와이어스 파마슈티칼즈(Wyeth Pharmaceuticals))는 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료를 위해 2000년에 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,6937,62; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001 참조). 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 디솔피드 링커 SPP를 통해 연결된 huC242 항체로 구성된 항체 약물 접합체인 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노젠, 인크.)은 CanAg을 발현하는 암, 예컨대 대장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위한 단계 II 시험을 진행중이다. 메이탄시노이드 약물 모이어티 DM1에 연결된 항-전립전 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 구성된 항체 약물 접합체인 MLN-2704 (밀레니엄 팜., BZL 바이올로직스, 이뮤노젠, 인크.)는 전립선암의 잠재적 치료를 위해 개발 중이다. 아우리스타틴 펩피드, 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE), 돌라스타틴의 합성 유사체는 키메릭 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스 Y에 특이적) 및 cAC10 (혈액 악성종양 상의 CD30에 특이적)에 접합하며 (문헌 [Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784] 참조), 치료 개발 중이다.

[0366]

면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제가 본원에 (예를 들어 상기에) 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소적 으로 활성인 독소 및 이의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터의 것), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시닐리스 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센이 포함된다. 예를 들어 1993년 10월 28일에 공개된 WO 93/21232를 참조한다. 다양한 방사성 핵종이 방사성 접합된 항체의 생산에 이용가능하다. 예로는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re가 포함된다. 항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙

신이미딜-3-(2-페리딜디티올) 프로페오네이트 (SPDP), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디페미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스-(p-아지도벤조일)-헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역 독소는 문헌 [Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)이 항체에 대한 방사성뉴클레오티드의 접합에 예시적인 퀄레이팅제이다 (W094/11026 참조).

[0367] 항체와 하나 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 돌라스타틴, 아우로스타틴, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 상기 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에서 고찰된다.

[0368] i. 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0369] 몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된 본 발명의 항체 (전체 길이 또는 단편)를 포함한다.

[0370] 메이탄시노이드는 튜뷸린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 3,896,111). 뒤이어, 특정 미생물도 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 밝혀졌다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0371] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 이들이 (i) 발효 또는 화학적 변형, 발효 생성물의 유도체화에 의해 제조하기 위해 비교적 이용가능하고, (ii) 비-디슬피드 링커를 통해 항체에 접합되기에 적합한 관능기로 유도체화될 수 있고, (iii) 혈장에서 안정하며, (iv) 다양한 종양 세포주에 대해 효과적이기 때문에, 항체 약물 접합체에서 흥미있는 약물 모이어티이다.

[0372] 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체, 이의 제조 방법, 및 이의 치료 용도가 예를 들어 미국 특허 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있으며, 이들 문헌의 개시내용은 본원에 참조로 명백히 포함된다. 문헌 [Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 대장직장 암에 대해 지시된 모노클로날 항체 C242에 연결된 메이탄시노이드 지정 DM1을 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 접합체는 배양된 대장암 세포에 대해 매우 세포독성인 것으로 밝혀졌으며, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타내었다. 문헌 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에는 메이탄시노이드가 인간 대장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7 또는 HER-2/neu 발암유전자에 결합하는 또 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디슬피드 링커를 통해 접합된 면역접합체가 기재되어 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포 당 3×10^5 개의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3 상에서 시험관내 시험하였다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 정도의 세포독성을 달성하였으며, 이는 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가할 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신적 세포독성을 나타내었다.

[0373] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 메이탄시노이드 분자에 항체를 화학적으로 연결시켜 제조된다. 예를 들어 미국 특허 5,208,020 (이의 개시 내용은 본원에 참조로 명백히 포함됨)를 참조한다. 비록 항체 당 1개 분자의 독소가 네이키드 항체의 사용에 의해 세포독성을 향상시키는 것으로 예상되더라도, 항체 분자 당 평균 3-4개의 메이탄시노이드 분자 접합은 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 표적 세포의 세포독성을 향상시키는데 효능을 나타내었다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있으며 공지된 기술에 의해 합성될 수 있거나 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 5,208,020 및 본원 상기에 언급된 다른 특허문헌 및 비특허 공개문헌에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0374] 예를 들어 미국 특허 5,208,020 또는 유럽 특허 0 425 235 B1, 문헌 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)], 및 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허출원 10/960,602 (이들 문헌의 개시내용은 본원에 참조로

명백히 포함됨)에 개시된 것을 비롯한, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위해 당업계에 공지된 다수의 연결기가 존재한다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허출원 10/960,602에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 연결기에는 상기 특허문헌에 개시된 바와 같은 디솔피드기, 티오에테르기, 산 불안정성 기, 광 불안정성 기, 펩티다제 불안정성 기, 또는 에스테라제 불안정성기가 포함되며, 디솔피드 및 티오에테르기가 바람직하다. 추가의 연결기가 본원에 기재 및 예시된다.

[0375] 항체와 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티오란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미레이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스-(p-아지도벤조일)-헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 툴루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 특히 바람직한 커플링제에는 디솔피드 연결에 제공되는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)] 참조) 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP)가 포함된다.

[0376] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 사용하여 히드록실기와 반응시킴으로써 형성될 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시노이드 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

ii. 아우리스타틴 및 돌라스타틴

[0377] 몇몇 실시양태에서, 면역접합체는 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 즉 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 5,635,483; 5,780,588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (미국 특허 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드성 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).

[0378] 예시적인 아우리스타틴 실시양태에는 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허출원 일련번호 10/983,340 "리간드에 접합할 수 있는 모노메틸발린 화합물(Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands)" (이의 개시내용은 본원에 참조로 명백히 포함됨)에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF가 포함된다.

[0380] 전형적으로, 펩티드-기체 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 널리 공지된 액상 합성 방법 (문헌 [E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides," volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티는 미국 특허 5,635,483 및 5,780,588; 문헌 [Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al., Synthesis, 1996, 719-725]; 및 [Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863]의 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 그 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784]; 2004년 11월 5일에 출원된 미국 특허출원 일련번호 10/983,340 "리간드에 접합할 수 있는 모노메틸발린 화합물(Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands)" (예를 들어 링커 및 링커에 접합된 MMAE 및 MMAF와 같은 모노메틸발린 화합물의 제조 방법을 개시함)을 참조한다.

iii. 칼리케아미신

[0381] 다른 실시양태에서, 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 칼리케아미신류 항생제는 서브-피코몰 농도로 이중-가닥 DNA 파괴를 생성할 수 있다. 칼리케아미신류 접합체의 제조에 대해서는 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296 (모두 아메리칸 시안아미드 컴퍼니(American Cyanamid Company))를 참조한다. 사용될 수 있는 칼

리케아미신의 구조적 유사체에는 Y_1^1 , a_2^1 , a_3^1 , N-아세틸- Y_1^1 , PSAG 및 Θ^1_1 이 포함될 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시안아미드의 미국 특허 참조). 항체가 접합될 수 있는 또다른 항-종양 약물은 안티폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA 모두 세포내 작용 부위를 가지며, 원형질막을 용이하게 통과하지 못한다. 따라서, 항체 매개된 내부화를 통한 상기 작용제의 세포 흡수는 그의 세포독성 효과를 대단히 향상시킨다.

[0383] *i.v. 다른 세포독성제*

본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항암제에는 BCNU, 스트렙토조이신, 빙크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394 및 5,770,710에 기재된, 접합적 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제류, 뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)이 포함된다.

[0385] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 이의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터의 것), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함된다. 예를 들어 1993년 10월 28일에 공개된 WO 93/21232호를 참조한다.

[0386] 본 발명은 추가로 항체화 핵분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 고찰한다.

[0387] 종양의 선택적 파괴를 위해, 항체는 고도 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합된 항체의 생산에 이용된다. 예로는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu 의 방사성 동위원소가 포함된다. 접합체가 검출에 사용되는 경우, 신티그레픽 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I^{123} , 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (또한 자기 공명 영상화 (mri)라고도 알려짐)를 위한 스핀 표지, 예컨대 다시 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

[0388] 방사성- 또는 다른 표지가 공지된 방법으로 접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 웨티드는 생합성되거나 또는 예를 들어 수소를 대신해 불소-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용하여 화학 아미노산 합성에 의해 합성될 수 있다. tc^{99m} 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지가 웨티드에 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90이 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. IODOGEN 방법 (문헌 [Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57] 참조)이 요오드-123을 혼입시키는데 사용될 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세하게 기재되어 있다.

[0389] 항체와 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HC1), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 툴루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펩타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성핵종의 접합을 위한 예시적인 키레이트제이다 (WO94/11026 참조). 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 웨티다제-민감성 링커, 광-불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디슬피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0390] 본 발명의 화합물은 (예를 들어, 미국 일리노이주 록퍼드 소재의 피어스 바이오테크놀로지 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.)로부터) 상업적으로 입수가능한 가교제 시약 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 이용하여 제조된 ADC를 명백하게 의도하

지만, 이에 한정되지는 않는다 (문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog, pages 467-498] 참조).

[0391] *v. 항체 약물 접합체의 제조*

[0392] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)을 통해 항체 1개 당 1개 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 하기 화학식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 기를 2가의 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키는 것; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가의 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 D-L을 형성시킨 후, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것을 비롯한, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 이용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다. ADC를 제조하기 위한 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0393] <화학식 I>

[0394] $Ab-(L-D)_p$

[0395] 링커는 1종 이상의 링커 성분으로 이루어질 수 있다. 예시적인 링커 성분에는 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-페리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC") 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")가 포함된다. 추가의 링커 성분은 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에 기재되어 있다. 또한, 문헌 [Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands], 그 내용이 전체로서 본원에 참고로 포함되는 2004년 11월 5일자로 출원된 미국 일련 번호 10/983,340을 참조한다.

[0396] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분에는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드가 포함된다. 예시적인 디펩티드에는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)이 포함된다. 예시적인 트리펩티드에는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)이 포함된다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기에는 천연적으로 발생한 것, 뿐만 아니라 소수 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린이 포함된다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양 관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단에 대한 그의 선택성에 대해 설계되고 최적화될 수 있다.

[0397] 항체 상의 친핵성 기에는 (i) N-말단 아민기, (ii) 측쇄 아민기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 당 히드록실 또는 아미노기 (이 경우, 항체는 글리코실화됨)가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실기는 친핵성이고, (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 비롯한, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 사슬간 디술퍼드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 항체를 DTT (디티오티레이톨)와 같은 환원제로 처리함으로써 링커 시약과의 접합에 반응성으로 만들 수도 있다. 이에 따라, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 아민을 티올로 전환시키는 리신과 2-이미노티올란 (트라우트(Traut) 시약)의 반응을 통해, 추가의 친핵성 기를 항체 내로 도입시킬 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 1개 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편) 내로 도입될 수 있다.

[0398] 본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하기 위한 항체의 변형에 의해 생산될 수 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 페요오데이트 산화 시약으로 산화시켜, 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 쇠프(Schiff) 염기 기는 안정한 결합을 형성할 수 있거나, 또는 예를 들어 수소화붕소 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 결합을 형성할 수 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-페요오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨, 바이오컨쥬게이트 테크닉스(Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-페요오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; 미국 특허 번호 5,362,852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

- [0399] 유사하게, 약물 모이어티 상의 친핵성 기에는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOEt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 비롯한, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트 및 아릴히드라지드기가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0400] 다르게는, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은, 예를 들어 재조합 기술 또는 웨비드 합성에 의해 제조할 수 있다. DNA의 길이에는 서로 인접하고 있거나 접합체의 목적한 특성을 파괴하지 않는 링커 웨비드를 코딩하는 영역에 의해 분리되어 있는 접합체의 두 부분을 코딩하는 각각의 영역이 포함될 수 있다.
- [0401] 또 다른 실시양태에서는, 항체-수용체 접합체를 개체에 투여한 후, 제거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거한 다음, 세포독성제 (예를 들어, 방사성핵종)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여하는 종양 예비표적화에 활용하기 위해 항체를 "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있다.
- [0402] **제약 제제**
- [0403] 본 발명의 항체를 포함하는 치료 제제는, 목적한 순도를 갖는 항체를 임의적인 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여, 보관을 위해 수용액, 동결건조 제제 또는 다른 건조된 제제의 형태로 제조된다 (문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)]). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 이용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 여기에는 포스페이트, 시트레이트, 히스티딘 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 산화방지제; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸 벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리웨비드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 칼레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 상대이온; 금속착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제가 포함된다.
- [0404] 본원에서의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요한 경우 1종 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에 대해 부정적인 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도된 목적으로 유효한 양으로 조합되어 존재한다.
- [0405] 활성 성분은 또한, 예를 들어 액적 형성 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달계 (예를 들어, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 마크로에멀젼 내에 봉입될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)]에 개시되어 있다.
- [0406] 생체내 투여를 위해 사용될 제약 제제는 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0407] 지속 방출 제제가 제조될 수 있다. 지속 방출 제제의 적합한 예에는 본 발명의 이뮤노글로불린을 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되며, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속 방출 매트릭스의 예에는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타미트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOTTM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로스피어) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 넘게 분자를 방출시킬 수 있지만, 특정 히드로겔은 더 짧은 기간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 이뮤노글로불린이 체내에 장시간 동안 유지되는 경우, 이들은 37°C에서 습기에 노출시 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 손실 및 면역원성 변화의 가능성을 초래한다. 관여된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략을 고안할 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디술피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀진다면, 술프 히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 습기 함량의 조절, 적절한 첨가제의 사용 및 특정한 중합

체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 안정화를 달성할 수 있다.

[0408] 용도

[0409] 본 발명의 항체는, 예를 들어 시험관내, 생체외 및 생체내 치료 방법에 사용될 수 있다.

[0410] 한 측면에서, 본 발명은 Notch1의 증가된 발현 및/또는 활성 (신호전달)과 관련된 종양, 암 및/또는 세포 증식 성 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여하는 것을 포함하는, Notch1의 증가된 발현 및/또는 활성 (신호전달)과 관련된 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0411] 또 다른 측면에서, 본 발명은 종양 또는 암의 성장을 감소, 억제 또는 방지시키는 것을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여하는 것을 포함하는, 종양 또는 암의 성장을 감소, 억제 또는 방지시키는 방법을 제공한다.

[0412] 또한, 본 발명의 항체 중 적어도 일부는 다른 종으로부터의 항원에 결합할 수 있다. 바람직하게는, Notch1 NRR 항체는 인간 및 마우스 Notch1 NRR 둘 다에, 바람직하게는 1×10^{-7} 이상의 Kd로 결합한다. 따라서, 본 발명의 항체는, 예를 들어 항원을 함유하는 세포 배양액에서, 인간 개체에서, 또는 본 발명의 항체가 교차-반응하는 항원을 갖는 다른 포유동물 대상체 (예를 들어, 침팬지, 비비(baboon), 마모셋, 사이노몰거스 및 붉은털 원숭이, 돼지 또는 마우스)에서 특정 항원 활성이 결합하는 데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항원 활성이 억제되도록 항체를 항원과 접촉시킴으로써 항원 활성을 억제하는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 항원은 인간 단백질 분자이다.

[0413] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 개체 내 항원이 결합되도록 본 발명의 항체를 개체에 투여하는 것을 포함하는, 증가된 항원 발현 및/또는 활성 (신호전달)과 관련된 장애를 겪고 있는 개체에서 항원을 결합시키는 방법에 사용될 수 있다. 증가된 Notch1 활성 (신호전달)은 Notch 활성화 돌연변이에 기인한 증가된 Notch1 활성, Notch 리간드의 증가된 발현 및/또는 활성에 기인한 증가된 Notch1 활성, 뿐만 아니라 다른 메카니즘에 기인한 증가된 Notch1 활성을 포괄한다. 바람직하게는, 항원은 인간 단백질 분자이고, 개체는 인간이다. 다르게는, 개체는 본 발명의 항체가 결합하는 항원을 발현하는 포유동물일 수 있다. 추가로, 개체는 (예를 들어, 항원의 투여 또는 항원 트랜스진(transgene)의 발현에 의해) 항원을 도입시킨 포유동물일 수 있다. 본 발명의 항체는 치료 목적으로 인간 개체에 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 수의 목적으로 또는 인간 질환의 동물 모델로서, 이뮤노글로불린이 교차-반응하는 항원을 발현하는 비-인간 포유동물 (예를 들어, 영장류, 돼지 또는 마우스)에 투여될 수 있다. 후자와 관련하여, 이러한 동물 모델은 본 발명 항체의 치료 효능을 평가하는 데 (예를 들어, 투여량 및 시간별 투여 과정을 시험하는 데) 유용할 수 있다.

[0414] 본 발명의 항체는 하나 이상의 항원 분자의 발현 및/또는 활성과 관련된 질환, 장애 또는 증상의 치료, 억제, 진행 지연, 재발 방지/지연, 개선 또는 예방에 사용될 수 있다.

[0415] 예시적인 장애에는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프성 악성 종양이 포함된다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암 및 폐의 편평세포 암종을 비롯한 폐암, 복막암, 간세포암, 위장관암을 비롯한 위암, 췌장암, 교아세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간종양, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종, 뇌암, 뿐만 아니라 두경부암, 및 관련 전이암이 포함된다. 일부 실시양태에서, 암은 소세포 폐암, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종, 위암, 결장직장암 (CRC) 및 간세포 암 종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0416] 본 발명의 항체는 또한 세포 퇴행 또는 기능이상이 그의 병리에 포함되는 장애의 치료 (예방 포함), 예컨대 다양한 (만성) 신경퇴행성 장애 및 급성 신경 세포 손상의 치료에 유용하다. 이러한 신경퇴행성 장애에는, 제한 없이, 말초 신경병증; 운동신경세포 장애, 예컨대 근위축성 측삭 경화증 (ALS, 루게릭병), 벨 마비(Bell's palsy), 및 척수성 근위축증 또는 마비를 포함하는 다양한 증상; 및 기타 인간 신경퇴행성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질, 다발성 경화증, 헌팅턴 무도병, 다운 증후군, 신경농 및 메니에르병, 및 예를 들어 외상 또는 척수 손상에 기인한 급성 신경 세포 손상이 포함된다.

[0417] Notch1 활성은 발달기 및 성체기 둘 다에서 다양한 줄기 세포 및 초기 기원 세포 시스템의 발달에 관여한다 (예를 들어, 문헌 [Chirba, S. (2006) Stem Cells 24:2437-2447] 참조). 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은

전구 세포의 분화가 억제되도록 전구 세포에서의 Notch 경로를 조절함으로써 비-최종 분화 세포 ("전구 세포")를 증식시키는 방법을 제공한다. 본원에 사용된 "전구 세포"는 임의의 비-최종 분화 세포를 의미하는 것이다. 전구 세포는 바람직하게는 줄기 세포 또는 기원 세포이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 줄기 세포의 분화가 억제되도록 세포에서의 Notch 경로를 활성화시킴으로써 전구 세포 함유 집단에서 전구 세포를 증식시키는 방법을 제공한다. 추가로, Notch 경로 활성화 전후에 필요에 따라 전구 세포를 세포 집단으로부터 단리시킬 수 있다. Notch 경로의 활성화는 바람직하게는 세포를 항-Notch1 NRR 효능제 항체와 접촉시킴으로써 달성된다.

- [0418] 본 발명의 한 실시양태는 Notch 경로의 효능제로 목적한 세포 집단을 처리한 다음, 이를 세포를 배양액 내에서 증식시킨 후 적절한 영역으로 다시 이식하거나, 또는 이들을 반드시 시험관내에서 증식시킬 필요 없이 직접 이식하는 것이다. 길항제는 Notch 기능 효능제의 작용을 역전 또는 중화시키는 데 사용될 수 있다.
- [0419] 본 발명의 증식된 줄기 세포 집단은 이식할 줄기 세포의 유형 및 이식 부위에 적절한 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해서 질환 또는 손상의 치료, 또는 유전자 요법을 위한 개체에 이식될 수 있다. 조혈 줄기 세포는 정맥내로 이식될 수 있고, 간에 위치하게 될 간 줄기 세포도 그러할 수 있다. 신경 줄기 세포는 뇌의 손상 또는 질환 부위에 직접 이식될 수 있다.
- [0420] 본원에 기재된 항-Notch1 NRR 길항제 항체의 사용 외에, 항-Notch1 NRR 효능제 항체 또한 Notch1 발현 및/또는 활성 및/또는 임의의 생물학적으로 관계된 Notch1 및/또는 Notch1 리간드의 생물학적 경로의 교란과 관련된 질환 상태를 조절하기 위한 치료 또는 조성물에 유용하다.
- [0421] 한 측면에서, 본 발명은 면역학적 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 면역학적 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역학적 장애는 비정상적 T 세포 발생 또는 조절로부터 비롯된 장애이다 (예를 들어, 문헌 [McKenzie et al., Expert. Opin. Ther. Targets 9:395-410, 2005] 참조).
- [0422] 또 다른 측면에서, 본 발명은 자가면역 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 자가면역 당뇨병, 다발성 경화증 또는 류마티스 관절염이다.
- [0423] 추가적인 측면에서, 본 발명은 이식 거부반응의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 이식 거부반응의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0424] 보다 추가적인 측면에서, 본 발명은 조직 재생 및/또는 복구의 촉진을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 효능제 항체를 투여하는 것을 포함하는, 조직 재생 및/또는 복구의 촉진 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 골격근, 심근 또는 골의 재생 및/또는 복구를 촉진하는 것을 포함한다.
- [0425] 본 발명은 또한 Notch1의 발현 및/또는 활성, 예컨대 증가 또는 감소된 발현 및/또는 활성, 또는 원하지 않는 발현 및/또는 활성과 관련된 질환 상태를 조절하는 데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다.
- [0426] 한 측면에서, 본 발명은 Notch1의 증가된 발현 및/또는 활성과 관련된 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여하는 것을 포함하는, Notch1의 증가된 발현 및/또는 활성과 관련된 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0427] 한 측면에서, 본 발명은 혈관신생의 억제를 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생의 억제 방법을 제공한다.
- [0428] 한 측면에서, 본 발명은 혈관신생과 관련된 병리학적 증상의 치료를 필요로 하는 개체에 유효량의 항-Notch1 NRR 항체를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애이다. 일부 실시양태에서, 혈관신생과 관련된 병리학적 증상은 안내 신생혈관 질환이다.
- [0429] 특정 실시양태에서는, 1종 이상의 세포독성제(들)와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체가 개체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체가 결합된 면역접합체 및/또는 항원은 세포에 의해 내재화되고, 이는 면역접합체가 결합된 표적 세포의 사멸에 있어서 면역접합체의 치료 효능을 증가시킨다. 한 실시양태에서, 세포독성제는 표적 세포 내 핵산을 표적으로 하거나 이것을 방해한다. 한 실시양태에서, 세포독성제제는 미세소관 중합을 표적으로 하거나 이것을 방해한다. 이러한 세포독성제의 예에는 본원에 언급된 임의의 화학요법제 (예컨대, 메이탄시노이드, 아우리스타틴, 돌라스타틴 또는 칼리케아미신), 방사성 동위원소, 또는 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도

뉴클레아제가 포함된다.

- [0430] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또 다른 항체, 화학요법제(들) (화학요법제의 카테일 포함), 다른 세포독성제(들), 항-헬관신생제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들)와 공동 투여될 수 있다. 본 발명의 항체가 종양 성장을 억제하는 것일 경우, 그것을 종양 성장을 또한 억제하는 1종 이상의 다른 치료제(들)와 조합하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 다르게는 또는 추가로는, 개체에 조합 방사선 요법 (예를 들어, 외부 빔 조사 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체를 이용한 요법)을 적용할 수 있다. 상기 언급된 이러한 조합 요법에는 조합 투여 (이 경우에는 2종 이상의 작용제가 동일 또는 별도 제제에 포함됨) 및 별도 투여가 포함되고, 이 경우 본 발명 항체는 보조 요법 또는 요법들의 투여 전 및/또는 후에 투여될 수 있다.
- [0431] 조합 요법
- [0432] 상기 지시된 바와 같이, 본 발명은 항-Notch1 NRR 항체가 또 다른 요법과 함께 투여되는 조합 요법을 제공한다. 예를 들어, 항-Notch1 NRR 항체는 항암 요법, 또는 다양한 신생물성 또는 비-신생물성 증상을 치료하기 위한 항-신생혈관증식 요법과 조합하여 사용된다. 한 실시양태에서, 신생물성 또는 비-신생물성 증상은 비정상적이거나 원하지 않은 혈관신생과 관련된 병리학적 장애를 특징으로 한다. 항-Notch1 NRR 항체는 동일한 조성물 또는 별도의 조성물로서 상기 목적에 유효한 다른 작용제와 순차적으로 또는 조합하여 투여될 수 있다. 다르게는 또는 추가로는, Notch1의 다중 억제제가 투여될 수 있다.
- [0433] 항-Notch1 NRR 항체의 투여는 동시에, 예를 들어 단일 조성물로서 또는 동일하거나 상이한 투여 경로를 사용하는 2개 이상의 별개 조성물로서 수행될 수 있다. 다르게는 또는 추가로는, 투여는 임의 순서로 연속하여 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 조성물의 투여 사이에는 수분 내지 수일, 수주, 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다. 예를 들어, 항암제가 먼저 투여되고, 이후 Notch1 억제제가 투여될 수 있다. 그러나, 동시 투여 또는 항-Notch1 NRR 항체를 먼저 투여하는 것 또한 고려된다.
- [0434] 항-Notch1 NRR 항체와 조합하여 투여되는 치료제의 유효량은 내과의 또는 수의사의 재량일 것이다. 치료할 증상에 대한 최대한의 처치를 달성하기 위해 투여량의 관리 및 조정이 수행된다. 용량은 또한 사용되는 치료제의 유형 및 치료할 특정 개체와 같은 인자에 의존할 것이다. 항암제에 대한 적합한 투여량은 통상적으로 사용되는 양이며, 항암제와 항-Notch1 NRR 항체의 조합 작용 (상승작용)에 기인하여 낮아질 수 있다. 특정 실시양태에서, 억제제의 조합은 단일 억제제의 효능을 강화시킨다. 용어 "강화시키다"는 치료제의 통상적인 또는 승인된 용량에서 그의 효능을 향상시키는 것을 지칭한다.
- [0435] 전형적으로, 항-Notch1 NRR 항체 및 항암제는 동일하거나 유사한 질환에서 병리학적 장애, 예컨대 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단 또는 감소시키기에 적합하다. 한 실시양태에서, 항암제는 항-헬관신생제이다.
- [0436] 예시적인 항암제에는 알킬화제, 폴레이트 길항제, 피리미딘 길항제, 세포독성 항생물질, 백금 화합물 또는 백금 계 화합물, 턱산, 빙카 알칼로이드, c-Kit 억제제, 토포이소머라제 억제제, 항-헬관신생 억제제, 예컨대 항-VEGF 억제제, HER-2 억제제, EGFR 억제제 또는 이중 EGFR/HER-2 키나제 억제제, 항-에스트로겐, 예컨대 풀베스트란트, 및 호르몬 요법제, 예컨대 카르보플라틴, 시스플라틴, 켐시타빈, 카페시타빈, 에피루비신, 타목시펜, 아로마타제 억제제, 및 프레드니손이 포함된다. 일부 실시양태에서, 암은 결장직장암이고 제2 약제는 EGFR 억제제, 예컨대 엘로티닙, 항-VEGF 억제제, 예컨대 베바시주맙이거나, 세톡시맙, 아리노테칸, 아리노테칸 또는 FOLFOX이거나, 또는 암은 유방암이고 제2 약제는 항-에스트로겐 조절제, 예컨대 풀베스트란트, 타목시펜, 또는 아로마타제 억제제, 예컨대 레트로졸, 엑세메스탄 또는 아나스트로졸이거나, VEGF 억제제, 예컨대 베바시주맙이거나, 화학요법제, 예컨대 독소루비신, 및/또는 턱산, 예컨대 파클리탁셀이거나, 항-HER-2 억제제, 예컨대 트라스투주맙, 또는 이중 EGFR/HER-2 키나제 억제제, 예컨대 라파티닙 또는 HER-2 하향조절제, 예컨대 17AAG (열 충격 단백질 [Hsp] 90 포이즌인 젤다나마이신) (예를 들어, 트라스투주맙에 대해 진전된 유방암을 위한 것)이다. 다른 실시양태에서, 암은 소세포 폐암과 같은 폐암이고, 제2 약제는 베바시주맙과 같은 VEGF 억제제, 또는 예를 들어 엘로티닙과 같은 EGFR 억제제, 또는 예를 들어 이마티닙과 같은 c-Kit 억제제이다.
- [0437] 암과 관계된 항-헬관신생 요법은 종양 성장을 지원하기 위한 영양분을 제공하는 데 필요한 종양 혈관 발달의 억제를 목표로 하는 암 치료 전략이다. 혈관신생은 1차 종양 성장 및 전이 둘 다에 관여하기 때문에, 본 발명에 의해 제공된 항-헬관신생 치료는 1차 부위에서 종양의 신생물성 성장을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 2차 부위에서 종양의 전이를 방지할 수 있고, 그러므로 다른 요법에 의한 종양의 공격을 허용한다.
- [0438] 다수의 항-헬관신생제가 확인되었고, 본원에 기재된 것, 예를 들어 "정의"란에 기재된 것을 비롯하여 당업계에

공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000)]; [Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)]; 및 [Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)]에 의해 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 출원 US20030055006도 참조한다. 한 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 항체는 항-VEGF 중화 항체 (또는 단편) 및/또는 또 다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 제한 없이, 예를 들어 가용성 VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 뉴로필린 (예를 들어, NRP1, NRP2)) 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단하고 항-VEGFR 항체를 중화할 수 있는 압타머, VEGFR 티로신 키나제 (RTK)의 저분자량 억제제, VEGF에 대한 안티센스 전략, VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임, VEGF의 길항제 변종; 및 이들의 임의의 조합물과 조합하여 사용된다. 다르게는 또는 추가로는, VEGF 길항제 및 다른 작용제 외에 2종 이상의 혈관신생 억제제가 임의로 개체에 공동 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서는, 1종 이상의 추가적 치료제, 예를 들어 항암제가 항-Notch1 NRR 항체, VEGF 길항제 및 항-혈관신생제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0439]

본 발명의 특정 측면에서, 항-Notch1 NRR 항체를 이용한 조합 종양 요법에 유용한 다른 치료제에는 다른 암 요법 (예를 들어, 수술, 방사선 치료 (예를 들어, 방사성 물질의 조사 또는 투여), 화학요법, 본원에 기재되고 당업계에 공지된 항암제를 이용한 치료, 또는 이들의 조합)이 포함된다. 다르게는 또는 추가로는, 본원에 개시된 동일한 항원 또는 2종 이상의 상이한 항원에 결합하는 2종 이상의 항체가 개체에 공동 투여될 수 있다. 때로는, 개체에 1종 이상의 시토카인을 또한 투여하는 것이 유리할 수 있다.

[0440]

화학요법제

[0441]

특정 측면에서, 본 발명은 유효량의 Notch1 및/또는 혈관신생 억제제(들)의 길항제 및 1종 이상의 화학요법제를 암에 걸리기 쉽거나 암으로 진단된 개체에 투여함으로써 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 다양한 화학요법제가 본 발명의 조합 치료 방법에 사용될 수 있다. 고려되는 화학요법제의 예시적이고 비-제한적인 목록은 본원의 "정의"란에 제공되어 있고, 일부는 상기 기재되어 있다.

[0442]

당업자에게 이해되는 바와 같이, 화학요법제의 적절한 용량은 일반적으로 임상 요법에서 이미 이용되고 있는 정도일 것이고, 여기서 화학요법제는 단독으로 또는 다른 화학요법제와 조합하여 투여된다. 투여량은 치료할 증상에 따라 달라질 것이다. 치료를 관리하는 내과의는 개체에 적절한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

[0443]

재발성 종양 성장

[0444]

본 발명은 또한 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 억제 또는 방지하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장은 하나 이상의 현재 이용가능한 요법 (예를 들어, 암 요법, 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법, 항-VEGF 항체 요법, 특히 특정 암에 대한 표준 치료 계획)을 받고 있거나 이러한 치료를 받은 개체에서, 상기 요법이 개체를 치료하기에 임상적으로 적당하지 않거나, 또는 개체가 추가의 효과적인 요법을 필요로 할 정도로 상기 요법으로부터 더 이상 어떠한 이로운 효과도 얻고 있지 못한 상태를 기술하기 위해 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 상기 문구는 또한, 예를 들어 여전히 부작용을 겪고 있는 요법에 반응하는 개체, 내성이 발생한 개체, 요법에 반응하지 않는 개체, 요법에 만족스럽게 반응하지 않는 개체 등을 기술하는 "비-반응성/난치성" 개체의 상태를 지칭할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 암은 암 세포의 수가 유의하게 감소하지 않거나 또는 증가하거나, 또는 종양 크기가 유의하게 감소하지 않거나 또는 증가하거나, 또는 암 세포의 크기 또는 수에 있어서 임의의 추가적인 감소를 달성하지 못한 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장이다. 암 세포가 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장인지 아닌지에 대한 결정은 "재발성" 또는 "난치성" 또는 "비-반응성"의 당업계에서 용인된 문맥상의 미를 사용하여, 암 세포에 대한 치료의 유효성을 평가하기 위한 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생체내 또는 시험관내에서 수행될 수 있다. 항-VEGF 치료에 내성인 종양이 재발성 종양 성장의 예이다.

[0445]

본 발명은 개체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키기 위해 하나 이상의 항-Notch1 NRR 항체를 투여함으로써 개체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서는, 길항제가 암 요법에 이어 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서는, 항-Notch1 NRR 항체가 암 요법과 동시에 투여된다. 다르게는 또는 추가로는, 항-Notch1 NRR 항체 요법을 또 다른 암 요법과 교대로 수행하며, 이는 임의의 순서로 수행될 수 있다. 본 발명은 또한 암에 걸리기 쉬운 개체에서 암의 발병 또는 재발을 방지하기 위해 하나 이상의 억제제 항체를 투여하는 방법을 포함한다. 일반적으로, 개체는 암 요법을 받았거나 동시에 받고 있는 것이다. 한 실시양태에서, 암 요법은 항-혈관신생제, 예를 들어 VEGF 길항제를 이용한 치료이다. 항-혈관신생제에는 당업계에 공지된 것 및 본원의 "정의"란에 기재된 것이 포함된다. 한 실시양태에서, 항-혈관신생제는 항-VEGF 중화 항체 또는 단편 (예를 들어, 인간화 A4.6.1, AVASTIN® (미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 제넨테크(Genentech)), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 등)이다.

예를 들어, 미국 특허 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 추가적인 작용제가 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키기 위해 VEGF 길항제 및 항-Notch1 NRR 항체와 조합하여 투여될 수 있다 (예를 들어, 본원의 "조합 요법"란 참조).

[0446] 본 발명의 화합물 (예를 들어, 항-Notch1 NRR 항체)은 공지된 방법에 따라, 예컨대 볼루스로서의 정맥내 투여, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 예를 들어 경구, 국소, 또는 흡입 경로, 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비강내, 및 국소 치료용으로 필요할 경우의 병변내 투여에 의해 개체 (예를 들어, 인간 환자)에 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 뇌척수내, 활액막내, 경막내 또는 피하 투여가 포함된다. 국소 투여는 광범위한 부작용 또는 독성이 Notch1 신호전달의 억제와 관련되는 경우에 특히 바람직하다. 생체 외 전략이 또한 치료 용도로 사용될 수 있다. 생체외 전략에는, 예를 들어 개체로부터 얻은 세포에 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 형질감염 또는 형질도입시키는 것이 포함된다. 그 다음, 형질감염 또는 형질도입된 세포를 개체로 복귀시킨다. 세포는 제한 없이 조혈 세포 (예를 들어, 골수 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, T 세포 또는 B 세포), 섬유모세포, 상피 세포, 내피 세포, 각질형성세포 또는 근육 세포를 포함하는 광범위한 유형의 세포 중 임의의 것일 수 있다.

[0447] 또한, 항체는 적합하게는, 특히 항체의 감소하는 투여량으로 펠스 주입에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 부분적으로는 투여가 단시간인지 장시간인지에 따라 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행된다.

[0448] 또 다른 예에서, 항-Notch1 NRR 항체는 국소로, 예를 들어 장애 또는 종양의 위치가 허용하는 경우에 직접 주사에 의해 투여되고, 주사는 주기적으로 반복될 수 있다. 항-Notch1 NRR 항체는 또한 국소 재발 또는 전이를 방지 또는 감소시키기 위해서 개체에 전신적으로 또는 종양 세포, 예를 들어 종양, 또는 종양의 외과적 절제 후의 종양 부위에 직접적으로 전달될 수 있다.

[0449] 다르게는, 항-Notch1 NRR 항체를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 억제제 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오티드를 개체의 적절한 세포에 전달할 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산은 종양 자체를 향할 수 있다.

[0450] 핵산은 이용된 벡터에 적절한 임의의 수단에 의해서 세포에 도입될 수 있다. 다수의 이러한 방법이 당업계에 익히 공지되어 있다 (샘브룩(Sambrook) 등의 상기 문헌, 및 문헌 [Watson et al., *Recombinant DNA*, Chapter 12, 2d edition, *Scientific American Books*, 1992]). 유전자 전달 방법의 예에는 리포좀 매개 형질감염, 전기천공, 칼슘 포스페이트/DEAE 렉스트란 방법, 유전자 총 및 미세주사가 포함된다.

[0451] 투여는 부분적으로는 투여가 단시간인지 장시간인지에 따라 임의의 적합한 경로, 예를 들어 주사, 예컨대 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 항체 조성물은 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고, 용량에 따라 분배되고, 투여될 것이다. 이러한 맥락에서 고려되는 인자에는 치료할 특정 장애, 치료할 특정 포유동물, 개체의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료인에게 공지된 기타 인자가 포함된다. 항체는, 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로는 해당 장애를 예방 또는 치료하는 데 통상적으로 사용되는 1종 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이러한 다른 작용제의 유효량은 제제내에 존재하는 본 발명 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 상기 논의된 다른 인자에 의존한다. 이는 일반적으로 상기 사용된 바와 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 본원에서 이용된 투여량의 1 내지 99%로 사용된다.

[0452] 질환의 예방 또는 치료를 위한 본 발명의 항체의 적절한 투여량 (단독으로 또는 화학요법제와 같은 1종 이상의 다른 작용제와 조합하여 사용되는 경우)은 치료할 질환의 유형, 항체의 유형, 질환의 심도 및 과정, 항체가 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 이전의 요법, 개체의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당 의사의 결정에 의존할 것이다. 항체는 적합하게는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 개체에 투여된다. 질환의 유형 및 심도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별도 투여에 의해서든 연속 주입에 의해서든, 약 1 μ g /kg 내지 15 mg/kg (예를 들어, 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 항체가 개체에 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 한 가지 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여에서는, 상태에 따라, 질환 증상의 목적한 억제가 일어날 때까지 치료가 지속될 것이다. 한 가지 예시적인 항체 투여량은 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 범위일 것이다. 따라서, 약 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg 또는 10 mg/kg (또는 이들의 임의의 조합) 중 하나 이상의 용량이 개체에 투여될 수 있다. 이러한 용량은 간헐적으로, 예를 들어 매주 또는 3주마다 (예를 들어, 개체가 약 2 내지

20회, 예를 들어 약 6회 용량의 항체를 투여받도록) 투여될 수 있다. 초기의 보다 높은 로드 용량, 그 후 1회 이상의 보다 낮은 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 투여 계획에는 약 4 mg/kg의 초기 로드 용량 후에 약 2 mg/kg의 항체를 매주 유지 용량으로 투여하는 것이 포함된다. 그러나, 다른 투여 계획도 유용할 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상적인 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0453] 본 발명의 항-Notch1 NRR 항체는 또한 항체를 이하에 기재된 바와 같이 표지하고/거나 불용성 매트릭스 상에 고정시킨 특정 세포 또는 조직에서 Notch1 발현을 검출하는 분석 (예컨대, 진단 또는 예측 분석)에 유용하다.

[0454] 또 다른 측면에서, 본 발명은 샘플에서 Notch1-항-Notch1 NRR 항체 복합체를 검출하는 것을 포함하는 Notch1의 검출 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "검출"에는 대조군에 대한 참조를 이용하거나 이용하지 않는 정성적 및/또는 정량적 검출 (수치 측정)이 포함된다.

[0455] 또 다른 측면에서, 본 발명은 장애를 갖고 있거나 갖고 있을 것으로 의심되는 개체로부터의 생물학적 샘플에서 Notch1-항-Notch1 NRR 항체 복합체를 검출하는 것을 포함하는, Notch1 발현 및/또는 활성과 관련된 장애의 진단 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, Notch1 발현은 증가된 발현 또는 비정상적 (원하지 않는) 발현이다. 일부 실시양태에서, 장애는 종양, 암 및/또는 세포 증식성 장애이다. 다른계는 또는 Notch1 발현의 검출 외에, 본원에 기재된 진단 또는 치료 방법에서는 생물학적 샘플 내 Notch1 리간드의 발현을 측정할 수 있다. Notch1 리간드 발현은 당업계의 표준 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

[0456] 또 다른 측면에서, 본 발명은 검출가능한 표지를 포함하는 본원에 기재된 임의의 항-Notch1 NRR 항체를 제공한다.

[0457] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항-Notch1 NRR 항체와 Notch1의 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 생체내 또는 시험관내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 암 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-Notch1 NRR 항체는 검출가능하게 표지된다.

[0458] 항-Notch1 NRR 항체는 다수의 익히 공지된 검출 분석 방법 중 어느 하나에서 Notch1을 검출하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 목적한 공급원으로부터 생물학적 샘플을 얻고, 샘플을 항-Notch1 NRR 항체와 혼합하여 항체가 혼합물에 존재하는 임의의 Notch1과 함께 항체/Notch1 복합체를 형성하도록 하고, 혼합물에 존재하는 임의의 항체/Notch1 복합체를 검출함으로써, 생물학적 샘플을 Notch1에 대해 분석할 수 있다. 생물학적 샘플은 특정 샘플에 적합한 당업계에 공지된 방법에 의해서 분석용으로 제조될 수 있다. 샘플을 항체와 혼합하는 방법 및 항체/Notch1 복합체를 검출하는 방법은 사용된 분석의 유형에 따라 선택된다. 이러한 분석에는 면역조직화학, 경쟁 및 샌드위치 분석, 및 입체 억제 분석이 포함된다.

[0459] Notch1에 대한 분석 방법은 모두 하기 시약 중 1종 이상을 사용한다: 표지된 Notch1 유사체, 고정된 Notch1 유사체, 표지된 항-Notch1 NRR 항체, 고정된 항-Notch1 NRR 항체 및 입체 접합체. 표지된 시약은 또한 "트레이서"로도 알려져 있다.

[0460] 사용된 표지는 Notch1과 항-Notch1 NRR 항체의 결합을 방해하지 않는 임의의 검출가능한 관능기이다. 다수의 표지가 면역분석에서의 사용에 대해 공지되어 있고, 그 예에는 직접 검출될 수 있는 모이어티, 예컨대 형광색소, 화학발광체 및 방사성 표지, 뿐만 아니라 검출하기 위해서 반응시키거나 유도시켜야 하는 모이어티, 예컨대 효소가 포함된다. 이러한 표지의 예에는 방사성 동위원소 ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H 및 ¹³¹I, 형광단, 예컨대 희토 퀄레이트 또는 플루오레세인 및 그의 유도체, 로다민 및 그의 유도체, 단실, 웜밸리페론, 루세리페라제, 예를 들어 반딧불이 루시페라제 및 박테리아성 루시페라제 (미국 특허 번호 4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 호스래디쉬 페옥시다제 (HRP), 알칼리성 포스페이트, β-갈락토시다제, 글루코아밀라제, 리소자임, 당류 옥시다제, 예를 들어 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 데히드로게나제, 헤테로시클릭 옥시다제, 예컨대 우리카제 및 크산틴 옥시다제, 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 이용하는 효소와 커플링시킨 것, 예컨대 HRP, 락토페옥시다제 또는 마이크로페옥시다제, 비오틴/아비딘, 스픈 표지, 박테리오파지 표지, 안정한 자유 라디칼 등이 포함된다.

[0461] 통상적인 방법이 이들 표지를 단백질 또는 폴리펩티드에 공유 결합시키는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 디알데히드, 카르보디이미드, 디말레이이미드, 비스-이미레이트, 비스-디아조화 벤지딘 등과 같은 커플링제를 사용하여 항체에 전술한 형광색소, 화학발광체 및 효소 표지를 부가할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 3,940,475 (형광측정법) 및 3,645,090 (효소); 문헌 [Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962)]; [David et al., Biochemistry, 13:1014-1021 (1974)]; [Pain et al., J. Immunol. Methods, 40:219-230 (1981)]; 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407-412 (1982)] 참조). 본원에서 바람직한 표지는 호스래디쉬 페옥시다제

및 알칼리성 포스파타제와 같은 효소이다. 효소를 비롯한 이러한 표지의 항체에 대한 접합은 면역분석 기술에 있어서 당업자에게는 표준적인 조작 절차이다 (예를 들어, 문헌 [O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166] 참조).

[0462] 특정 분석 방법에 대해서는 시약의 고정이 요구된다. 고정은 용액에 유리 상태로 남아 있는 임의의 Notch1 또는 Notch1 NRR로부터 항-Notch1 NRR 항체를 분리하는 것을 필요로 한다. 이는 통상적으로 수-불용성 매트릭스 또는 표면에 대한 흡착 (베니히(Bennich) 등의 미국 특허 번호 3,720,760), 공유 커플링 (예를 들어, 글루타르알데히드 가교 사용)에 의해 항-Notch1 NRR 항체 또는 Notch1 NRR 유사체를 분석 절차 전에 불용성화함으로써, 또는 예를 들어 면역침강에 의해 항-Notch1 NRR 항체 또는 Notch1 NRR 유사체를 그 후에 불용성화함으로써 달성된다.

[0463] 샘플 내 단백질의 발현은 면역조직화학 및 염색 프로토콜을 사용하여 검사할 수 있다. 조직 절편의 면역조직화학 염색은 샘플 내 단백질의 존재를 평가 또는 검출하는 합리적인 방법인 것으로 나타나 있다. 면역조직화학 ("IHC") 기술은 프로브에 대한 항체를 이용하고, 일반적으로 발색 또는 형광 방법에 의해 세포 항원을 제자리에서 시각화한다. 샘플 제조를 위해서는 포유동물 (전형적으로는 인간)로부터의 조직 또는 세포 샘플을 사용할 수 있다. 샘플의 예에는 결장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 폐암, 위암, 췌장암, 림프종 및 백혈병 암 세포와 같은 암 세포가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 샘플은 외과적 절제, 흡인 또는 생검을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 당업계에 공지된 다양한 절차에 의해서 수득될 수 있다. 조직은 신선한 상태이거나 동결된 상태일 수 있다. 한 실시양태에서는, 샘플을 파라핀 등에 고정 및 포매시킨다. 조직 샘플은 통상의 방법에 의해 고정 (즉, 보존)될 수 있다. 당업자라면, 샘플이 조직학적으로 염색되거나 또는 다른 방법에 의해 분석되는 목적으로 따라 고정액의 선택이 결정됨을 인지하고 있을 것이다. 당업자라면 또한 고정 기간이 조직 샘플의 크기 및 사용된 고정액에 의존함을 인지하고 있을 것이다.

[0464] IHC는 형태학적 염색법 및/또는 형광 동소 보합법과 같은 추가 기술과 조합하여 수행될 수 있다. 직접 분석 및 간접 분석의 2가지 일반적인 IHC 방법이 이용가능하다. 첫 번째 분석에 따르면, 표적 항원 (예를 들어, Notch1 NRR)에 대한 항체의 결합이 직접적으로 측정된다. 이 직접 분석은 추가 항체의 상호작용 없이 시각화될 수 있는, 형광 식별표 또는 효소-표지된 1차 항체와 같은 표지된 시약을 사용한다. 전형적인 간접 분석에서는, 비-접합 1차 항체를 항원에 결합시킨 다음 표지된 2차 항체를 1차 항체에 결합시킨다. 2차 항체를 효소 표지에 접합시킨 경우에는, 발색 또는 형광 기질을 첨가하여 항원의 시각화를 제공한다. 몇몇 2차 항체는 1차 항체 상의 상이한 에피토프와 반응할 수도 있기 때문에 신호 증폭이 발생한다.

[0465] 면역조직화학에 사용된 1차 및/또는 2차 항체는 전형적으로는 검출가능한 모이어티로 표지될 것이다. 일반적으로 하기 범주로 분류될 수 있는 다수의 표지가 이용가능하다:

[0466] 앞서 논의한 샘플 제조 절차 외에, IHC 이전, 동안 또는 이후에 조직 절편을 추가로 처리하는 것이 바람직할 수 있는데, 예를 들어 시트레이트 완충액 중에서 조직 샘플을 가열하는 것과 같은 에피토프 회복 방법을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)] 참조).

[0467] 임의적 블로킹 단계 후, 1차 항체가 조직 샘플 내 표적 단백질 항원에 결합하기에 충분한 기간 및 적합한 조건 하에, 조직 절편을 1차 항체에 노출시킨다. 이를 달성하기에 적절한 조건은 일반적인 실험에 의해 결정될 수 있다. 샘플에 대한 항체의 결합 정도는 앞서 논의된 검출가능한 표지 중 어느 하나를 사용하여 측정된다. 바람직하게는, 표지는 3,3'-디아미노벤자린 색원체와 같은 발색 기질의 화학적 변화에 촉매작용을 하는 효소 표지 (예를 들어, HRPO)이다. 바람직하게는, 효소 표지를 1차 항체에 특이적으로 결합하는 항체에 접합시킨다 (예를 들어, 1차 항체는 토끼 다클론 항체이고 2차 항체는 염소 항-토끼 항체임).

[0468] 이로써 제조된 표본을 슬라이드에 올리고 커버슬립으로 덮을 수 있다. 그 다음, 예를 들어 혼미경을 사용하여 슬라이드 평가를 수행하고, 당업계에서 일반적으로 사용되는 염색 강도 기준을 이용할 수 있다. 염색 강도 기준은 하기와 같이 평가될 수 있다:

표 2

염색 패턴	점수
세포에서 염색이 관찰되지 않음	0
10% 초과의 세포에서 짚은/거의 인식할 수 없는 염색이 검출됨	1+

10% 초과의 세포에서 약한 정도 내지 중간 정도의 염색이 관찰됨	2+
10% 초과의 세포에서 중간 정도 내지 강한 정도의 염색이 관찰됨	3+

- [0470] 전형적으로는, IHC 분석에서 약 2+ 이상의 염색 패턴 점수가 진단 및/또는 예측되었다. 일부 실시양태에서는, 약 1+ 이상의 염색 패턴 점수가 진단 및/또는 예측되었다. 다른 실시양태에서는, 약 3+ 이상의 염색 패턴 점수가 진단 및/또는 예측되었다. 종양 또는 결장 선종으로부터의 세포 및/또는 조직을 IHC를 사용하여 검사한 경우, 염색은 일반적으로 (샘플에 존재할 수 있는 기질 또는 주위 조직에 반대되는 것으로서) 종양 세포 및/또는 조직에서 측정 또는 평가되는 것으로 이해된다.
- [0471] 경쟁 또는 샌드위치 분석으로 알려진 다른 분석 방법도 잘 수립되어 있으며 상업적 진단 산업에서 널리 사용되고 있다.
- [0472] 경쟁 분석은 제한된 수의 항-Notch1 NRR 항체 항원-결합 부위에 대해 시험 샘플 Notch1 NRR과 경쟁하는 트레이에서 Notch1 NRR 유사체의 능력에 의존한다. 항-Notch1 NRR 항체를 일반적으로 경쟁 전후에 불용성화한 다음, 항-Notch1 NRR 항체에 결합된 트레이에서 및 Notch1 또는 Notch1 NRR을 결합되지 않은 트레이에서 및 Notch1 또는 Notch1 NRR로부터 분리한다. 이러한 분리는 경사분리 (결합 상태가 미리 불용성화된 경우) 또는 원심분리 (결합 상태가 경쟁 결합 후에 불용성화된 경우)에 의해 달성된다. 시험 샘플 Notch1 또는 Notch1 NRR의 양은 마커 물질의 양에 의해 측정되는 바와 같은 결합된 트레이에서의 양에 역비례한다. 기지의 양의 Notch1 NRR을 이용한 용량-반응 곡선을 제작하여 시험 결과와 비교함으로써 시험 샘플에 존재하는 Notch1 또는 Notch1 NRR의 양을 정량적으로 측정한다. 이를 분석은 측정가능한 마커로서 효소를 사용하는 경우에 ELISA 시스템으로 지칭된다.
- [0473] "동종" 분석이라 불리는 다른 종류의 경쟁적 분석은 상 분리를 필요로 하지 않는다. 여기서, Notch 1 또는 Notch1 NRR을 갖는 효소의 접합체를 제조하고 항-Notch1 NRR 항체가 Notch 1 또는 Notch1 NRR에 결합하는 경우에 항-Notch1 NRR 항체의 존재가 효소 활성을 조절하도록 이용한다. 상기 경우, Notch 또는 Notch1 NRR 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 효소, 예컨대 페오キ시다제에 대하여 이중작용성 유기 가교에 의해 접합된다. 접합체는, 항-Notch1 NRR 항체가 결합하여 표지의 효소 활성을 억제하거나 강화시키도록 항-Notch1 NRR 항체와 함께 사용하기 위해 선택된다. 상기 방법 그 자체는 EMIT이라는 명칭하에 널리 실시된다.
- [0474] 동종 분석을 위한 입체 장애 방법에서는 입체 접합체를 사용한다. 상기 접합체를, 작은 Notch1 NRR 단편에 저분자량 합텐을 공유 결합시킴으로써 합성하여, 실질적으로 합텐에 대한 항체가 항-Notch1 NRR 항체로서 접합체에 결합할 수 있게 한다. 상기 분석 방법하에, 시험 샘플 중에 존재하는 Notch1 NRR은 항-Notch1 NRR 항체와 결합할 것이고, 이로써 항-합텐이 접합체에 결합하게 하여, 접합체 합텐의 특성 변화 (예를 들어, 합텐이 형광단(fluorophore)인 경우에 형광의 변화)를 초래할 것이다.
- [0475] 샌드위치 분석은 특히, Notch 1, Notch1 NRR 또는 항-Notch1 NRR 항체의 측정에 유용하다. 순차적 샌드위치 분석에서는, 고정화된 항-Notch1 NRR 항체를 사용하여 시험 샘플 Notch 1 또는 Notch1 NRR을 흡착하고, 세척에 의해 시험 샘플을 제거하고, 결합된 Notch 1 또는 Notch1 NRR을 사용하여 2차 표지된 항-Notch1 NRR 항체를 흡착한 다음, 결합된 물질을 잔류 트레이에서부터 분리한다. 결합된 트레이에서의 양은 시험 샘플 Notch1 또는 Notch1 NRR에 직접적으로 비례한다. "동시" 샌드위치 분석에서는, 시험 샘플을 분리하지 않고, 표지된 항-Notch1 NRR을 첨가한다. 항-Notch1 NRR 모노클로날 항체를 하나의 항체로 사용하고, 폴리클로날 항-Notch1 NRR 항체를 다른 항체로 사용하는 순차적 샌드위치 분석이, Notch1 또는 Notch1 NRR에 대한 샘플을 시험하는데 있어서 유용하다.
- [0476] 상기는 Notch1 또는 Notch1 NRR에 대한 단지 예시적인 검출 분석법이다. 본원에 기재된 생물학적분석 (bioassay)를 비롯하여, Notch1 또는 Notch1 NRR을 측정하기 위한 항-Notch1 NRR 항체를 사용하는 현재나 이후에 개발된 다른 방법은 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0477] 한 측면에서, 본 발명은 개체, 예컨대 인간 개체로부터 얻은 생물학적 샘플 중의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, Notch1 폴리뉴클레오티드) (예를 들어, 그의 존재 또는 부재, 또는 양)를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 폴리뉴클레오티드를 검출하는 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 여기에는, 예를 들어 RT-PCR, 택맨(TaqMan; 등록 상표) 유전자 발현 분석, 증폭 방법, 폴리뉴클레오티드 마이크로어레이(microarray) 등이 포함된다.
- [0478] 폴리뉴클레오티드 (예컨대, mRNA)를 검출하는 방법은 공지되어 있으며, 여기에는, 예를 들어 상보적 DNA 탐침을 이용하는 혼성화 분석 (예컨대, 표지된 Notch1 리보프로브(riboprobe)를 이용하는 원위치 혼성화), 노던 블롯 (Northern blot) 및 관련 기술, 및 다양한 핵산 증폭 분석 (예컨대, Notch1에 대해 특이적인 상보적 프라이머를

이용하는 RT-PCR, 및 기타 증폭 유형 검출 방법, 예컨대 분지형 DNA, SPIA (단일 프라이머 등온 증폭), 리보-SPIA, SISBA, NASBA (핵산 서열 기재 증폭), TMA (전사 매개 증폭) 등)이 포함된다.

[0479]

포유동물로부터 얻은 생물학적 샘플을, 예를 들어 Notch1 mRNA에 대해 노던 블롯, 도트 블롯(dot blot) 또는 PCR 분석을 이용하여 편리하게 분석할 수 있다. 예를 들어 RT-PCR 분석, 예컨대 정량적 PCR 분석은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명의 예시적인 실시양태에서, 생물학적 샘플 중의 Notch1 mRNA를 검출하는 방법에는 하나 이상의 프라이머를 이용하는 역전사에 의해 샘플로부터 cDNA를 생성하고; Notch1 폴리뉴클레오티드를 센스 및 앤티센스 프라이머로 사용하여 거기서 Notch1 cDNA를 증폭시킴으로써 상기 생성된 cDNA를 증폭시키고; 증폭된 Notch1 cDNA의 존재 또는 부재를 검출하는 것이 포함된다. 또한, 상기 방법에는, 생물학적 샘플 중의 Notch1 mRNA의 양 (수준)을 측정하는 (예를 들어, 하우스키핑(housekeeping) 유전자, 예컨대 액틴 계열 구성원의 비교 대조군 mRNA 서열 수준을 동시에 조사함으로써) 하나 이상의 단계가 포함될 수 있다. 임의로는, 증폭된 Notch1 cDNA의 서열을 측정할 수 있다.

[0480]

탐침 및/또는 프라이머를 검출가능한 마커, 예컨대 방사성동위원소, 형광 화합물, 생물발광(bioluminescent) 화합물, 화학발광(chemiluminescent) 화합물, 금속 킬레이터 또는 효소로 표지할 수 있다. 상기 탐침 및 프라이머를 샘플 중의 Notch1 폴리뉴클레오티드의 존재를 검출하는데 사용할 수 있고, Notch1 단백질 발현 세포를 검출하는 수단으로서 사용할 수 있다. 당업자가, 매우 많은 서로 다른 프라이머 및 탐침을 제조할 수 있고 (예를 들어, 본원에서 제공되는 서열에 기초하여), 이를 효율적으로 사용하여 Notch1 mRNA를 증폭하고/거나, 클로닝하고/거나, 그의 존재 또는 부재 및/또는 양을 측정할 수 있음을 이해할 것이다.

[0481]

본 발명의 임의의 방법에는, 마이크로어레이 기술을 이용하여 조직 또는 세포 샘플 중의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 Notch1 폴리뉴클레오티드를 검출하는 것을 포함하는 프로토콜이 포함된다. 예를 들어, 핵산 마이크로어레이를 이용하여, 시험군 및 대조군 조직 샘플로부터 얻은 시험군 및 대조군 mRNA 샘플을 역전사시키고, 표지하여 cDNA 탐침을 제조한다. 이어서, 탐침을 고체 지지체 상에 고정화된 핵산의 어레이에 혼성화시킨다. 이 어레이를 어레이의 각 구성원의 서열 및 위치를 알도록 배열한다. 예를 들어 특정 질환 상태에서 발현되는 잠재력을 갖는 유전자의 선택물을 고체 지지체 상에 배열할 수 있다. 특정 어레이 구성원을 갖는 표지된 탐침의 혼성화는, 탐침이 유도된 샘플이 상기 유전자를 발현함을 나타낸다. 질환 조직의 차별적인 유전자 발현 분석은 가치 있는 정보를 제공할 수 있다. 마이크로어레이 기술은 핵산 혼성화 기술 및 연산 기술을 이용하여 단일 실험내에서 수천개의 유전자의 mRNA 발현 프로필을 평가한다 (예를 들어, 2001년 10월 11일 공개된 WO 01/75166 참조). (어레이 제작 검토를 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,700,637호; 미국 특허 제5,445,934호; 미국 특허 제5,807,522호; 문헌 [Lockart, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996)]; 및 문헌 [Cheung, V.G. et al., *Nature Genetics* 21(Suppl):15-19 (1999)] 참조)). DNA 마이크로어레이에는, 유리 또는 다른 기질 상에서 직접 합성되거나 스팟팅(spotted)되는 유전자 단편을 함유하는 미니어처 어레이이다. 수천개의 유전자는 통상 단일 어레이로 나타낸다. 전형적 마이크로어레이 실험에는 다음의 단계가 포함된다: (1) 샘플로부터 단리된 RNA로부터 형광 표지된 표적의 제작, (2) 표지된 표적의 마이크로어레이로의 혼성화, (3) 어레이의 세척, 염색 및 스캐닝, (4) 스캐닝한 영상 분석, 및 (5) 유전자 발현 프로필의 생성. 최근에는, 2가지 주요 유형의 DNA 마이크로어레이가 사용된다: 올리고뉴클레오티드 (통상, 25 내지 70 mer) 어레이 및 cDNA로부터 제조한 PCR 생성물을 함유하는 유전자 발현 어레이. 어레이를 형성하는 경우, 올리고뉴클레오티드는 사전제작되어 표면에 스팟팅되거나, 또는 표면상에서 직접 합성될 수 있다 (원위치).

[0482]

애피메트릭스 진침(Affymetrix GeneChip; 등록상표) 시스템은, 유리 표면상에 올리고뉴클레오티드를 직접 합성함으로써 제작되는 어레이를 포함하는 상업적으로 입수가능한 마이크로어레이 시스템이다. 탐침/유전자 어레이: 올리고뉴클레오티드 ("올리고스") (통상, 25 mer)를, 반도체-기재 광식각법(photolithography) 및 고체상 화학 합성 기술을 조합하여 유리 웨이퍼 상에서 직접 합성한다. 각 어레이는 400,000개 이하의 서로 다른 올리고뉴클레오티드를 함유하며, 각 올리고뉴클레오티드는 수백만개의 복제물로 존재한다. 올리고뉴클레오티드 탐침을 어레이상의 공지된 위치에 합성하며, 혼성화 패턴 및 신호 강도는 애피메트릭스 마이크로어레이 스위트(Affymetrix Microarray Suite) 소프트웨어에 의해 유전자 확인 및 상대적 발현 수준 면에서 해석할 수 있다. 각 유전자는 일련의 서로 다른 올리고뉴클레오티드 탐침에 의해 어레이 상에서 나타난다. 각 탐침 쌍은 완전 매치 올리고뉴클레오티드 및 미스매치 올리고뉴클레오티드로 이루어진다. 완전 매치 탐침은 특정 유전자에 대해 정확하게 상보적인 서열을 가지므로, 유전자 발현을 측정한다. 미스매치 탐침은 중심 염기 위치에서의 단일 염기 치환에 의해 완전 매치 탐침과 상이하여 표전 유전자 전사물의 결합을 방해한다. 이는 완전 매치 올리고뉴클레오티드에 대해 측정된 신호에 기여하는 배경(background) 및 비특이적 혼성화를 측정하게 한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 완전 매치 탐침의 혼성화 강도로부터 미스매치 탐침의 혼성화 강도를 감하여 각

탐침 세트에 대한 절대 강도값 또는 특이적 강도값을 측정한다. 탐침은 진뱅크 및 기타 뉴클레오티드 정보보관소의 최근 정보에 기초하여 선택한다. 서열은 유전자의 3' 말단의 특수한 영역을 인식하는 것으로 여겨진다. 진침 혼성화 오븐 ("회전식(rotisserie)" 오븐)을 사용하여 한번에 64개 까지의 어레이의 혼성화를 수행한다. 플루이딕스 스테이션(fluidics station)은 탐침 어레이의 세척과 염색을 수행한다. 이는 완벽하게 자동화되어 있고, 4가지 모듈을 포함하며, 각 모듈에는 하나의 탐침 어레이가 들어간다. 각 모듈은 미리 프로그래밍된 플루이딕스 프로토콜을 이용하여 마이크로어레이 스위트 소프트웨어를 통해 독립적으로 제어된다. 스캐너는 공초점 레이저 형광 스캐너이며, 이는 탐침 어레이에 결합된 표지 cRNA에 의해 방출되는 형광 강도를 측정한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어에 의한 컴퓨터 워크스테이션은 플루이딕스 스테이션 및 스캐너를 제어한다. 마이크로어레이 스위트 소프트웨어는 탐침 어레이에 대해 미리 프로그래밍된 혼성화, 세척 및 염색 프로토콜을 이용하여 8개까지의 플루이딕스 스테이션을 제어할 수 있다. 또한, 소프트웨어는 혼성화 강도 데이터를 획득하고 적합한 알고리즘을 이용하여 각 유전자에 대한 존재/부재 신호로 전환한다. 마지막으로, 소프트웨어는 유전자 발현 실험들 간의 비교 분석에 의해 유전자 발현의 변화를 탐지하고, 결과물을 텍스트 파일 형식으로 구성하며, 이를 추가 데이터 분석을 위해 다른 소프트웨어 프로그램에 대해 이용할 수 있다.

[0483]

일부 실시양태에서, Notch1 유전자 결실, 유전자 돌연변이 또는 유전자 증폭이 검출되었다. 유전자 결실, 유전자 돌연변이 또는 증폭은 당업계에 공지된 매우 다양한 프로토콜 중 어느 것, 예를 들어 통상적인 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 (mRNA 전사 정량) (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201 5205 (1980)), 도트 블롯팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 탐침을 이용하는 원위치 혼성화 (예를 들어, 형광 원위치 혼성화 ("FISH")), 세포유전학 방법 또는 적절하게 표지된 탐침을 이용하는 비교 유전자 혼성화 (CGH)에 의해 측정할 수 있다. 또한, 상기 방법을 사용하여 Notch1 리간드 유전자 결실, 리간드 돌연변이, 또는 유전자 증폭을 검출할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "Notch1 발현 검출"에는 Notch1 유전자 결실, 유전자 돌연변이 또는 유전자 증폭을 검출하는 것이 포함된다.

[0484]

또한, 조직 또는 세포 샘플 중 Notch1 유전자의 메틸화 상태를 조사할 수 있다. 유전자 5' 조절 영역의 CpG 섬의 비정상적 탈메틸화 및/또는 과메틸화는, 불멸화되고 변형된 세포에서 빈번하게 발생하며, 여러 유전자의 변형 발현을 초래할 수 있다. 유전자의 메틸화 상태를 조사하는 다양한 분석법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 서던 혼성화 접근법에서 메틸화 CpG 위치를 함유하는 서열을 절단할 수 없는 메틸화-감수성 제한 효소를 이용하여 CpG 섬의 메틸화 상태를 평가할 수 있다. 또한, MSP (메틸화 특이적 PCR)는 주어진 유전자의 CpG 섬에 존재하는 모든 CpG 위치의 메틸화 상태를 신속하게 프로파일링할 수 있다. 이러한 방법에는 DNA를 아황산나트륨 (메틸화되지 않은 모든 시토신을 우라실로 전환시킴)으로 초기 개질시키고, 이어서 메틸화되지 않은 DNA에 의해 메틸화 DNA에 특이적인 프라이머를 이용하여 증폭시키는 것이 포함된다. 또한, 메틸화 간섭을 포함하는 프로토콜을, 예를 들어 문헌 [Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995]; [De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)]; [Brooks et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7:531-536 (1998)]; 및 [Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)]에서 찾아볼 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "Notch1 발현 검출"에는 Notch1 유전자 메틸화 검출이 포함된다.

[0485]

제품

[0486]

본 발명의 다른 측면에서는 상기 장애를 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유용한 물질을 함유하는 제품이 제공된다. 제품에는 용기 및 라벨, 또는 용기상이나 용기와 연합된 패키지 삽입물이 포함된다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등이 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는, 단독으로 또는 다른 조성물(들)과 조합하여 질병을 치료, 예방 및/또는 진단하는데 유효한 조성물을 보유하며, 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 봉지 또는 바이알일 수 있음). 조성물 중의 하나 이상의 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 선택 질병 (예컨대, 암)을 치료하기 위해 사용된다는 것을 표시해준다. 또한, 제품은 (a) 본 발명의 항체가 포함된 조성물을 함유하는 제1 용기; 및 (b) 추가 세포독성제를 포함하는 조성물을 함유하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서의 제품은, 제1 및 제2 항체 조성물이 특정 질병 (예를 들어, 암)을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 별도로 또는 추가로, 제품은 또한 제약상-허용되는 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWF1), 인산염-완충 식염수, 링거액(Ringer's solution) 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 포함할 수 있다. 이는 기타 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 비롯하여 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0487] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 실시예이다. 상기 제공된 상세한 설명에 나타낸 다른 여러 실시양태를 실시할 수 있음을 이해한다.

[0488] <실시예>

[0489] 실시예 1: 항-Notch1 NRR 항체를 생성하기 위한 면역원의 생성

[0490] hNotch1 NRR

[0491] 인간 Notch 1 NRR (hNotch1 NRR)을 함유하는 면역원을 다음과 같이 수득하였다.

[0492] 발현 서브클로닝

[0493] 참조 서열 및 주형으로서 인간 Notch1의 전장 클론을 이용하여 (진뱅크 수탁 번호 NM_017617), 아미노산 V1307 내지 Q1733에 걸쳐있는 Notch1 영역 (서열 56)을 증폭시키도록 4개의 PCR 프라이머 세트를 설계하였다. 상기 영역은 EGF 반복영역 34-36을 포함하며, 막횡단 도메인 바로 앞에서 종결된다. 유전자 특이적 서열의 상류에 즉시 N-말단 Flag 태그를 삽입하도록 5' 프라이머를 설계하였다. 제한 독립적 클로닝(Restriction Independent Cloning; RIC) 방법을 이용하여 Sf-9 곤충 세포로부터의 분비 발현을 위해, 상기 도메인에 상응하는 PCR 생성물을 벡터 B9.1로 클로닝하였다. 요컨대, 5' 연장(extension)을 함유한 프라이머는, *Pfu* 폴리머라제 (스트라타진 (Stratagene) 제품)를 이용하여 생성한 두 독립적 PCR 생성물에 제한 부위 BamHI 및 EcoRI의 부분을 삽입하는 것이 필요하였다. 상기 PCR 생성물의 변성 및 재어닐링에 의해 DNA 집단이 생성되었으며, 여기서 생성물 중 25 %가 그의 5' 및 3' 말단에서 각각 돌출된 BamHI 및 EcoRI를 나타내는 적합한 뉴클레오티드를 함유하였다. 이어서, 상기 DNA 혼합물을 BamHI 및 EcoRI에 의한 제한효소 분해(restriction digestion)로 제조된 B9.1 벡터에 결찰시켰다. DNA 서열과 관련하여 생성된 구조물을 확인하고, 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9라 명명하였다. 벡터 B9.1은 pACGP67 배클로바이러스(*baculovirus*) DNA 전이 벡터 (BD 팜인젠(BD Pharmingen) 제품)의 개질된 버전이었으며, BamHI 클로닝 위치 앞의 Gp 67 분비 신호, C-말단 트롬빈 절단 부위 및 His 태그를 함유하였다.

[0494] 인간 Notch1 구조물의 클로닝과 관련된 서열을 하기에 도시하였다.

PCR 프라이머:

정방향:

[Phosp]gatccGATTACAAAGATGACGATGACAAGggctctggGTCAATGGCTGCAAAGGCAAG

(서열 48)

역방향: cCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (서열 49)

정방향: cGATTACAAAGATGACGATGACAAGggctctggGTCAATGGCTGCAAAGGCAAG

(서열 50)

역방향: [phosp]aattcCTGCGCCGGCGGGGGCGGCTCCACG (서열 51)

[0495] 대문자는 Notch1 유전자 특이적 서열을 나타내며, 소문자는 삽입된 제한 부위를 나타내고, 밑줄은 Flag 태그를 나타낸다.

발현된 단백질의 DNA 서열:

```

atgctactagtaaatcagtcacaccaaggctcaataaggaacacacaaggcaagatggta
agcgctatgtttataatgtgcgttggcgccggccggcatctgcgttgcggcggat
ctggatccgattacaaagatgacgatgacaagggtctgtGTCATCAATGGCTGCAAA
GGCAAGCCCTGCAAGAATGGGGCACCTGCCGTGGCCTCAACACGCCCGCGGGTTC
ATCTGCAAGTGCCCTGCGGGCTTCGAGGGGCCACGTGTGAGAATGACGCTGTACCTGC
GGCAGCCTGCGCTGCCCAACGGCGGACATGCATCTCGGCCGCGAGCCCCACCTGC
CTGTGCGCTGGGCCCTTCACGGCCCCGAATGCCAGTCCCGCCAGCAGCCCCCTGCCTG
GGCGGCAACCCCTGCTACAACCAGGGACCTGTGAGCCCACATCCGAGAGCCCCCTCTAC
CGTTGCCCTGCCCGCAAATTCAACGGGCTTGTGCCACATCTGGACTACAGCTTC
GGGGTGGGGCCGGCGACATCCCCCGCCGCTGATCGAGGAGGCGTGCAGCTGCC
GAGTGCAGGAGGACGCGGGCAACAAGGTCTGCAGCCTGCACTGCAACAACCACGCGTGC
GGCTGGACGGCGGTGACTGCTCCCTCAACTTCAATGACCCCTGAAAGAACTGACCGCAG
TCTCTGCACTGCTGAAAGTACTTCAGTGACGCCACTGTGACAGCCAGTGCAACTCAGCC
GGCTGCCCTTCGACGGCTTGACTGCCAGCGTGCAGGCAAGGCCAGTGCAACCCCCCTGTAC
GACCAAGTACTGCAAGGACCACCTCAGCGACGGGCACTGCGACCAGGGCTGCAACAGCGCG
GAGTGCAGTGGGACGGGCTGGACTGTGCGAGCATGTACCCGAGAGGCTGGCGGGCCG
ACGCTGGTGGTGGTGGTGTGATGCCGCCGAGCAGCTGCCAACAGCTCTTCACTTC
CTGCGGAGCTCAGCGCGTGTGCACACCAACGTGGTCTTCAAGCGTGACGCACAGGC
CAGCAGATGATCTCCCCTACTACGGCGCGAGGAGGCTGCGCAAGCACCCCATCAAG
CGTGCAGGCGAGGGCTGGGCGCACCTGACCCCTGCTGGCCAGGTGAAGGCCCTCGCTG
CTCCCTGGTGGCAGCGAGGGTGGCGGGCGAGGGAGCTGGACCCCATGGACGTCCGC
GGCTCCATCGTCTACCTGGAGATTGACAACCGGCACTGAGTGTGCAAGGCCCTCGCAGTGC
TTCCAGAGTGCCACCGACGTGGCGCATTCCTGGAGCGCTCGCTGGCAGCCTC
AACATCCCCCTACAAGATGAGGGCGTGCAGAGTGAAGACCTGGAGGCCGCCCCGCCG
CAGgaattcggctggcccgctggcagcggtcatcaccatcaccatcac (서열 55)

```

발현된 단백질 서열:

```

mlvnqshqfnkehtskmvsavlyvllaaaahsafaadlgsdykdddkgsgVINGCKGKPCKNGGTCAVASNTARGFI
CKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGGT CISGPRSPTCLCLPFTGPECQFPASSPCLGGNPY
NQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGAGRDIPPLIEACEPEQEDAGNKVCS
LQCNNHACGWDDGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDFGHDQSNCNSAGCLFDGFDCQRAE
GQCNPYDQYCKDHFSDFGHDQGCNSAECEWDGLDAEHVPERLAAGTLLVVVLMPPQLRN
SSFHFLRELSRVLHTNVVFKRDAHQQQMFYPYYGEEELRKHPIKRAAEGWAAPDALLGQVKA
SLLPGGSEGGRRRRELDPMMDVRGSIVYLEIDNRQCVQASSQCFQSATDVAFLGALASLGSNIP
YKIEAVQSETVEPPPPAQefglvprsghhhhh (서열 13)

```

[0499] 대문자는 Notch1 유전자 특이적 서열을 나타내고, 소문자는 Gp67 분비 신호, N-말단 Flag 태그, 트롬빈 위치, C-말단 Flag 태그 및 발현 벡터에 삽입된 임의의 잔기를 나타낸다.

배클로바이러스 원액 제조 및 단백질 생성

[0501] 인간 Notch1의 아미노산 V1307-Q1733을 코딩하는 구조물을 *Sf-9* 세포에서 발현시켰다. DNA 전이 벡터 [101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1을 이용하여 배클로바이러스 원액을 제조하였다 (발현 서브클로닝 부분 참조). 전이 벡터 DNA를, 제조자의 권장사항에 따라 백팩6(BacPak6; 상표명) 선형 바이러스 DNA (BC 클론테크(BD Clontech) 제품, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재) 및 백팩틴(Bacfectorin; 상표명) (BC 클론테크 제품)에 의해 27°C에서 ESF921 단백질-무함유 배지 (익스프레션 시스템즈 LLC(Expression Systems LLC) 제품; 미국 캘리포니아주 우드랜드 소재) 중에서 배양된 점착성 *Sf-9* 곤충 세포로 동시-형질감염시켰다. 생성된 P1 바이러스 원액을 2회 증폭시켜, 대규모 단백질 생성에 사용되는 P3 바이러스 원액을 제조하였다. 예상 감염다중도 (MOI) 0.3 바이러스 입자/세포를 이용하여, ESF921 배지 중 혼탁 배양된 *Sf-9* 세포를 1 내지 2×10^6 세포/ml의 세포 밀도로 감염시키고, 감염 후 3 내지 5일에 수확하였다. *Sf-9* 세포를 원심분리에 의해 분리하고, 생성된 바이러스 원액을 여과하여 멀균을 보장하고, 바이러스 안정성을 위해 3% 열-불활성화 우테렐청 (FBS)을 첨가하였다. 모든 바이러스 원액을 4°C에서 보관하였다. [101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 구조물을 함유하는 바이러스 원액은 *Sf-9* 세포를 유효하게 감염시키고, 재조합 단백질을 발현시키는 것으로 나타났다.

[101V-1]: 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1 구조물을 11 및 16 리터 규모의 2회의 발효 공정에서 발현시켰다. 단백질-무함유 배지에서의 혼탁 성장에 적응한 *Sf-9* 세포를 발효 공정에 이용하였다. 세포를, 유

사한 조작 조건을 갖는 시드 생물반응기(seed bioreactor)로부터 생산 용기로 약 2×10^6 세포/ml의 밀도로 접종하였다. 27°C에서, ESF 921 배지 중에서 발효를 수행하고, 요구시 산소 살포 및 지속적인 상부공간 통기로 의해 용해된 산소 수준을 50%의 공기 포화도에서 제어하였다. 사용되는 용기에 따라 2개의 경사날 추진기 또는 1개의 편평날 패들을 이용하여 100-rpm 교반하에 생물반응기를 작동시켰다. 세포를 24 내지 48시간에 걸쳐 약 2.0 내지 2.7×10^6 세포/ml의 밀도의 감염점까지 성장시킨 다음, MOI 0.5 바이러스 입자/세포에서 Notch1 폴리펩티드 코딩 바이러스 원액으로 감염시켰다. 세포의 감염 신호 (성장 중단, 세포 직경 증가)를 모니터링하였으며, 세포를 추가로 65 내지 72시간 동안 성장시켰다. 결과물 배지를 냉각시키고, 원심분리에 의해 수확하고, 즉시 단백질 정제를 실시하였다.

[0503] hNotch1 NRR-함유 면역원의 정제

[0504] 구조물 696.G40.V2.Notch1.V1307-Q1733(N-Flag).B9.1에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 발현하는 SF9 세포로부터 얻은 상층 배지를 냉생 완충액 A (50 mM 헤페스, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ 및 0.5 mM 폐닐메탄술포닐 플루오라이드)로 회석 (v/v=1:4)하고, 배지 1 리터당 수지 2 ml의 비율로 미리-평형화된 Ni-NTA 수퍼플로우 (superflow) 수지 (퀴아젠(Qiagen), 제품 번호 30450)에 15 내지 20분 동안 배치(batch) 결합시켰다. Ni-NTA 친화성 수지를 0.8 μm 필터 (날젠(Nalgene), 제품 번호 450-0080)를 통한 여과에 의해 수집하고, 후속적으로 적절한 중력 드립 컬럼 (d:h 1:10)에 채웠다. 이 컬럼을 10 컬럼 부피 (CV)의 냉생 완충액 B (50 mM 헤페스, pH 7.5, 1000 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ 및 10 mM 이미다졸)로 세척하고, 이어서 10 CV의 완충액 A (PMSF 없음)로 세척하였다. 이어서, 컬럼을 5 CV의 완충액 A (250 mM 이미다졸 함유 (PMSF 없음))로 용출시켰다. 용출된 단백질을 아미콘 울트라(Amicon Ultra) 농축기 (3,000 MWCO)를 이용하여 농축시키고, 제조자의 권장사항에 따라 PD-10 컬럼 (GE 헬스케어(GE Healthcare))을 이용하여 완충액을 보관 완충액 (10 mM 헤페스 pH 7.5, 150 mM NaCl 및 5 mM CaCl₂)으로 교환하였다. SDS-PAGE (쿠마시 염색 이용)에 의해 단백질 순도가 90% 초과인 것으로 평가하였다. 정제된 단백질의 농도를, BSA를 표준물질로 사용하여 브래드포드(Bradford) 분석 (쿠마시 플러스 (Coomassie Plus) 키트, 피어스 제품, 카탈로그 번호 23236)에 의해 평가하였다. 트립신 분해시킨 단백질을 질량분석법에 의해 펩티드 서열분석하여 단백질을 동정하였다.

[0505] mNotch1 NRR

[0506] 마우스 Notch1 NRR (mNotch1 NRR)을 함유하는 면역원을 다음과 같이 수득하였다.

[0507] 마우스 Notch1의 아미노산 V1307 내지 Q1723에 걸쳐있는 서열 (서열 57)을 서브클로닝하고, 인간 Notch1 면역원에 대해 상기된 바와 같이 일반적으로 발현시켰다. 마우스 Notch1의 상기 영역은 EGF 반복영역 34-36을 포함하며, 막횡단 도메인 바로 앞에서 종결된다. 면역원을 발현하는 구조물을 64794.G1.Notch1.V1307-Q1723 (N-Flag, C-His).pRK5-GNE로 지칭하였다. 마우스 Notch1 NRR에 대한 항체를 생성하기 위해 사용되는 면역원에 대한 발현된 단백질의 아미노산 서열은 다음과 같으며, N-말단 FLAG 태그 및 C-말단 His 태그를 함유하였다.

```

MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRGKDYKD DDDKLEIVING
CRGPKCKNGG VCAVASNTAR GFICRCPAGF EGATCENDAR
TCGSRLCLNG GTCISGPRSP TCLCLGSFTG PECQFPASSP
CVGSNPVCYNQ GTCEPTESEN P FYRCLCPAKF NGLLCHILDY
SFTGGAGRDI PPPQIEEACE LPECQVDAGN KVCNLQCNH
ACGWDGGSDCS LNFNDPWKNC TQSLQCWKYF SDGHCDSQCN
SAGCLFDGFD CQLTEGQCNP LYDQYCKDHF SDGHCDQGCN
SAECEWDGLD CAEHVPERLA AGTLLVLL PPDQLRNNSF
HFLRELSHVL HTNVVFKRDA QQQQMIFPYY GHEEELRKHP
IKRSTVGWAT SSLPGTSGG RQRRELDPMID IRGSIVYLEI
DNRQCVQSSS QCFQSATDVA AFLGALASLG SLNIPYKIEA
VKSEPVEPPL PSQGSGHHHH HH (서열 14)

```

[0508]

[0509] 상기 서열의 N-말단 (서열 14의 아미노산 MGGTAARLGA VILFVVIVGL HGVRG)을 단백질을 발현하는 세포에 의해 절단하였다. 따라서, 마우스 Notch1 NRR 특이적 항체를 생성하기 위해 사용된 면역원은 상기 N-말단 서열이 존재하지 않는다.

[0510] 단백질 생성

[0511] 마우스 Notch1의 아미노산 V1307-Q1723을 코딩하는 구조물을, 무혈청 혼탁 배양에 적응된 프리스타일

(Freestyle) 293-F 세포 (프리스타일 293-F 세포, 인비트로젠(Invitrogen) 카탈로그 번호 R790-07) 중에서 일시적으로 발현시켰다.

[0512] 세포를 기브코(GIBCO; 등록상표) 프리스타일 293 발현 배지 (인비트로젠 카탈로그 번호 12338-018)에서 배양하였다. 세포를 진탕 플라스크 중 0.3 내지 3×10^6 생존 세포/ml의 밀도에서 유지시키고, 37°C에서, 8% CO₂의 습윤 분위기 중에서, 125 rpm으로 회전하는 궤도형 진탕기 플랫폼 상에서 인큐베이션하였다. 형질감염 전날, 세포를 5×10^5 생존 세포/ml의 밀도에서 시딩하였다. 형질감염 당일, 세포의 생존도 및 밀도 (90% 초과 및 1 x 10^6 세포/ml)를 확인하였다. 각 형질감염에 대해, 지질-DNA 복합체를 다음과 같이 제조하였다: 세포 (1 x 10^6 세포/ml) 500 ml에 대해, 플라스미드 DNA 500 µg을 옵티(Opti)-MEM(등록상표) I (인비트로젠 카탈로그 번호 51985-034) 40 ml, 폴리에틸렌이민 1.5 µg/ml 용액 (PEI 폴리에틸렌이민, 리니어(Linear), MW 25,000 폴리사이언시즈(Polysciences) 카탈로그 번호 9002-98-6) 500 µl에 서서히 첨가하였다. 혼합물을 온화하게 혼합하고, 실온에서 20 내지 30분 동안 인큐베이션하여 DNA-지질 복합체가 형성되게 하였다. 이어서, DNA-지질 복합체를 서서히 세포에 첨가하고, 3일 동안 인큐베이션한 후 배지를 수확하였다.

[0513] mNotch1 구조물을 2회의 1 리터 공정으로 발현시켰다. 세포를 0.9 내지 1×10^6 세포/ml의 밀도에서 형질감염시키고, 65 내지 75시간 후 세포 밀도가 2.2 내지 2.5×10^6 /ml이고, 세포의 75 내지 78%가 생존하였을 때 배지를 수확하였다.

[0514] 결과물 배지를 냉각시키고, 원심분리에 의해 수확하고, 즉시 NRR 함유 마우스 Notch1 폴리펩티드 정제에 사용하였다.

mNotch1NRR 함유 면역원의 정제

[0516] 항-FLAG M2 아가로스 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 제품 번호 A2220)를 이용하여 배치 방식에 의해 HEK 293 분비 배지로부터 면역원을 정제하였다. 완충액 B (50 mM 헤페스 pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) 중 항-FLAG M2 아가로스를 분비 배지 (EDTA 프로테아제 억제제가 없는 컴플리트(Complete) (배지 1 리터당 정제 20개, 로슈(Roche) 제품) 함유)에 배지 1 리터당 아가로스 5 ml의 비율로 첨가하였다. 이어서, 배지를 4°C에서 3시간 동안 일정하게 회전시키면서 인큐베이션하였다. 항-FLAG 아가로스를 0.8 µm 필터 (날젠, 제품 번호 450-0080)를 통해 여과에 의해 수집하고, 중력 유동 컬럼 (바이오래드(BioRad), 제품 번호 731-0003)에 채웠다. 아가로스를 10 CV의 완충액 B로 세척하고, 후속적으로 4 CV의 완충액 B 중 0.1 mg/ml FLAG 웨პ티드 (시그마-알드리치, 제품 번호 F3290)에 의해 단백질을 용출시켰다. 용출된 마우스 Notch1 폴리펩티드를 아미콘 울트라 농축기 (10,000 MWCO, 밀리포어, 제품 번호 UFC 901096)에서 농축시키고, PD-10 컬럼 (GE 헬스사이언시즈((GE Healthsciences), 제품 번호 17-0851-01)을 이용하여 완충액을 보관 완충액 (10 mM 헤페스, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5% 글리세롤)으로 교환하였다. 역상 HPLC에 의해 순도를 92% 초과인 것으로 평가하였다. 농도를, BSA를 표준물질로 사용하여 브래드포드 분석 (쿠마시 플러스 키트, 피어스 제품, 제품 번호 23236)에 의해 측정하였다. 트립신 분해시킨 단백질을 질량분석법에 의해 웨პ티드 서열분석하여 단백질을 동정하였다.

실시예 2: 항-Notch1 NRR 항체의 생성

[0518] 항-Notch1 NRR 항체를 다음과 같이 생성하였다.

항-Notch1 NRR 항체를 동정하기 위한 라이브러리 분류 및 스크리닝

[0520] 인간 Notch1 NRR 단백질 면역원 (상기됨)을 항원으로 사용하였다. 눈크(Nunc) 96개 웰 맥시소프 이뮤노플레이트(Maxisorp immunoplate)를 4°C에서 밤새 표적 항원 (10 µg/ml)으로 코팅하고, 파지 블로킹(phage blocking) 완충액 PBST (인산염-완충 식염수 (PBS), 1% (w/v) 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.05% (v/v) 트윈-20)에 의해 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 항체 파지 라이브러리 디스플레이 Fab 단편 (예를 들어, 문헌 [Lee et al., J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004] 참조)을 항원 플레이트에 첨가하고, 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 항원-코팅 플레이트를 PBT (0.05% 트윈-20을 포함하는 PBS)로 10회 세척하고, 결합된 파지를 50 mM HCl 및 500 mM NaCl에 의해 30분 동안 용출시키고, 동량의 1 M 트리스 염기 (pH 7.5)로 중화시켰다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포 중에서 증폭시켰다. 후속 선택 주기 동안, 항원-코팅 플레이트에 의한 항체 파지 인큐베이션을 2 내지 3시간으로 단축시키고, 플레이트 세척의 가혹도(stringency)를 점차 증가시켰다.

[0521] 4 주기의 패닝(panning) 후, 유의한 증대(enrichment)가 관찰되었다. 190 클론을 가려내어, 이들이 인간 Notch1 NRR에 특이적으로 결합하는지 측정하고, 모든 190 클론의 가변 영역을 PCR 서열분석하여 독특한 서열 클론을 식별하였다.

[0522] 인간 및 뮤린 Notch1 NRR 둘 모두에 결합하는 파지 항체를 식별하기 위해, ELISA를 이용하여 인간 및 뮤린 Notch1에 대한 결합에 대해 모든 독특한 클론을 시험하였다. 본원의 실시예에서 하기 기재된 단일 스팟 경쟁 ELISA를 이용하여 파지 항체의 친화도의 순위를 매겼다. 본래 문헌 [Lee, C. V., et al. (2004) J Mol Biol 340, 1073-93]에 기재된 경쟁적 파지-결합 ELISA를 이용하여 파지 항체 IC50 값을 추가로 측정하였다. 요컨대, 눈크 96개 웰 맥시소프 이뮤노플레이트를 1 μ g/ml 인간 NRR1 또는 뮤린 NRR1로 4°C에서 밤새 코팅하고, 블로킹 완충액 PBST (PBS, 1% BSA 및 0.05% 트윈 20)에 의해 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 파지를 실온에서 1시간 동안 인간 또는 뮤린 NRR1의 연속 희석물과 혼합한 후, 혼합물을 인간 및 뮤린 NRR1 코팅 플레이트에 첨가하였다. 결합된 파지를 항-M13 HRP 접합체로 검출하고, TMB 기질로 약 5분 동안 발현시키고, 1 M H₃PO₄로 켐칭하고, 450 nm에서 분광학적으로 판독하였다. 4개-파라미터 비-선형 회기 곡선-접합 프로그램 (칼레이디그라프 (Kaleidagraph), 시너지 소프트웨어(Synergy Software))에 의해 경쟁 곡선을 접합시켜 IC50 값을 측정하였다 (용액 결합 단계에서 파지-디스플레이 항체가 고정화된 항원에 대해 결합하는 것을 50% 억제하는 항원의 농도로 계산함).

[0523] 항체 A, B 및 C를, 개별 클론의 V_L 및 V_H 영역을 각각 LPG3 및 LPG4 백터로 클로닝하고, 일시적으로 포유동물 CHO 세포에서 발현시키고, 단백질 A 컬럼에 의해 정제하여 IgG로 재설정하였다. 상기 클론을 인간 및 뮤린 Notch2 NRR, Notch3 NRR 및 Notch4 NRR 중 하나 이상에 대한 교차-반응성에 대해, 그리고 실시예 5에 기재된 공배양 분석을 이용하여 블로킹 활성에 대해 시험하였다. 이러한 특성규명의 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

항-Notch1 NRR IgG의 특성규명

항-Notch1 NRR 항체	인간/마우스 NRR1 결합	인간/마우스 NRR2 결합	인간/마우스 NRR3 결합	인간/마우스 NRR4 결합	공배양 블로킹
항체 B	O	X	ND	ND	약
항체 A	O	X	X	X	강*
항체 C	O	X	ND	ND	약

* IC50 ~100ng/ml

ND=측정되지 않음

[0524]

[0525] V_H 라이브러리에서 유래한 클론의 친화도 개선을 위한 구조물 라이브러리

[0526] 항체 A를 친화도 개선을 위해 선택하였다. 파지미드 pW0703 (파지미드 pV0350-2b로부터 유래하였으며 (Lee et al., J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004))), 모든 CDR-L3 위치에 정지 코돈 (TAA)를 함유하고, M13 박테리오파지의 표면상에 1가 Fab를 나타냄)은, 친화도 성숙에 대한 V_H 라이브러리로부터 관심의 대상인 클론의 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 이식하기 위한 라이브러리 주형으로 작용하였다. 친화도 성숙을 위해 완전(hard) 및 부분(soft) 무작위화 전략 모두를 이용하였다. 완전 무작위화의 경우, 천연 인간 항체를 모방하기 위해 설계된 아미노산을 이용하여 세 경쇄 CDR의 선택된 위치를 갖는 하나의 경쇄 라이브러리를 무작위화하였으며, 설계된 DNA 다의성 (degeneracy)은 문헌 [Lee et al. (J. Mol. Biol 340, 1073-1093 (2004))]에 기재되어 있었다. 부분 무작위화의 경우, CDR-L3의 91-94 및 96 위치, CDR-H1의 28-31 및 34-35 위치, CDR-H2의 50, 52 및 53-58 위치, CDR-H3의 95-99 및 100A 위치의 잔기를 표적화하고, CDR 루프, L3/H1/H2 및 L3/H3의 2개의 상이한 조합을 무작위화에 대해 선택하였다. 부분 무작위화 조건을 달성하기 위해 (선택된 위치에서 약 50% 돌연변이율 도입), 돌연변이 원성 DNA를 야생형 뉴클레오티드에 우호적인 염기의 70-10-10-10 혼합물에 의해 합성하였다 (Gallo et al., Journal of Medicinal Chemistry 37:1233-1251 (1994)).

[0527]

친화도를 개선하기 위한 파지 분류 전략

[0528]

친화도 개선 선택을 위해, 파지 라이브러리를 제1 주기에 대해 플레이트 분류하고, 이어서 세 주기의 용액 분류를 실시하였다. 제1 주기의 플레이트 분류에서, 세 라이브러리를 파지 주입(input) (1% BSA 및 0.05% 트윈 20 중 약 3 O.D./ml)과는 별개로, 표적 (인간 Notch1 NRR-ECD)-코팅 플레이트 (눈크 맥시소프 플레이트)에 대해

37°C에서 2시간 동안 분류하였다. 제1 주기의 플레이트 분류 후, 3 내지 4 주기의 용액 분류를 수행하여 선택의 가혹도를 증가시켰다. 용액 분류를 위해, 제1 주기의 플레이트 분류로부터 전달된 1 O.D./m1 파지를 완충액 (1% 수퍼블록(Superblock) (피어스 바이오테크놀로지) 및 0.05% 트윈20 함유) 100 μl 중 20 nM의 비오티닐화 표적 단백질 (여기서 농도는 모클론 파지 IC50 값에 기초한 것임)과 함께 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 1% 수퍼블록에 의해 추가로 10배 희석하고, 웰당 100 μl 를, 실온에서 15분 동안 온화하게 진탕시키면서 뉴트라비딘-코팅 웰 (5 $\mu\text{g}/\text{m1}$)에 적용하여 비오티닐화 표적이 파지에 결합하게 하였다. 상기 웰을 PBS-0.05% 트윈 20으로 10회 세척하였다. 배경 결합을 측정하기 위해, 파지를 비오티닐화 되지 않은 표적과 함께 포함하는 대조군 웰을 뉴트라비딘-코팅 플레이트 상에 포함시켰다. 결합된 파지를 0.1 N HCl에 의해 20분 동안 용출시키고, 1/10 부피의 1 M 트리스 (pH 11)로 중화시키고, 역가측정하고, 다음 주기를 위해 전달하였다. 다음에, 선택 가혹도를 증가시키는 두가지 방법과 함께, 용액 분류를 2 또는 3 주기 더 수행하였다. 첫번째 방법은 비오티닐화 표적 단백질 농도를 2 nM에서 0.1 nM로 감소시키는 것에 의한 결합율(on-rate) 선택에 대한 것이고, 두번째 방법은 과량의 비-비오티닐화 표적 단백질 (100 내지 1000배 더)을 첨가하여 더 약한 결합자를 경쟁에서 탈락시키는 것에 의한 해리율(off-rate) 선택에 대한 것이다. 또한, 파지 주입을 감소시켜 (0.1~0.5 O.D./m1) 배경 파지 결합을 저하시켰다.

[0529] 고 처리량 친화도 스크리닝 ELISA (단일 스팟 경쟁)

제3 및 제4 주기 스크리닝으로부터 콜로니를 가려내고, 96-웰 플레이트(팔콘(Falcon))에서, 2YT 배지 (150 μl /웰) 중에서 카르베니실린 50 $\mu\text{g}/\text{m1}$ 및 K07 1E10/m1와 함께 37°C에서 밤새 증식시켰다. 동일한 플레이트로부터, XL-1 감염된 모파지의 콜로니를 대조군으로 가려내었다. 96-웰 눈크 맥시소프 플레이트를 웰당 PBS 중 표적 단백질 (2 $\mu\text{g}/\text{m1}$) 100 μl 로 4°C에서 밤새 또는 실온에서 2시간 동안 코팅하였다. 플레이트를 1% BSA 65 μl 로 30분 동안 블로킹하고, 1% 트윈 20 40 μl 로 추가 30분 동안 블로킹하였다.

파지 상층액을 ELISA (효소 연결 면역흡착제 분석) 완충액 (PBS (0.5% BSA, 0.05% 트윈20 포함)) (10 nM의 표적 단백질을 포함하거나 포함하지 않음)으로 1:10으로 희석하여 총 부피가 100 μl 가 되게 하고, 실온에서 적어도 1시간 동안 F 플레이트 (눈크) 중에서 인큐베이션하였다. 표적 단백질을 포함하거나 포함하지 않는 혼합물 75 μl 를, 표적 단백질 코팅 플레이트로 나란히 이동시켰다. 플레이트를 15분 동안 온화하게 진탕시켜 미결합 파지가 표적 단백질-코팅 플레이트에 포함되게 하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 적어도 5회 세척하였다. ELISA 완충액 (1:5000) 중 호스래디쉬(horseradish) 페옥시다제 (HRP)-접합된 항-M13 항체를 첨가함으로써 결합을 정량화하고, 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS-0.05% 트윈 20으로 적어도 5회 세척하였다. 다음에, 각 웰에 1:1 비율의 3,3',5,5'-테트라메틸벤자린 (TMB) 페옥시다제 기질 및 페옥시다제 용액 B (H_2O_2) (키르케가르트-페리 래버러토리즈(Kirkegaard - Perry Laboratories), 미국 메릴랜드주 게이터스버그 소재) 100 μl 를 첨가하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 각 웰에 1 M 인산 (H_3PO_4) 100 μl 를 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 450 nm에서 각 웰의 황색의 OD (광학 밀도)를 측정하였다. OD 감소율 (%)을 다음의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ 감소율 } (\%) = [(\text{경쟁자 존재 웰의 OD}_{450\text{nm}}) / (\text{경쟁자 부재 웰의 OD}_{450\text{nm}})] * 100$$

모파지 웰 (100%)에 대한 OD_{450nm} 감소율 (%) 비교에서, OD_{450nm} 감소율 (%)이 50%보다 낮은 클론을 서열 분석을 위해 가려내었다. 파지 제조를 위해 독특한 클론을 선택하고 모클론과 비교하여 결합 친화도 (파지 IC50)를 측정하였다 (표 4).

표 4

친화도 성숙 항체 클론의 특성 규명

클론명	CDR 변화	파지 IC50 (nM)		공배양 블로킹
		인간 NRR1	마우스 NRR1	
항체 A-1	L3/H2	0.8	0.6	+
항체 A-2	L3/H2	0.5	0.5	+
항체 A-3	L3/H2	0.5	2.5	+

NRR1 = Notch1 NRR

[0535] **실시예 3: 항-Notch1 NRR 항체의 특성규명**

[0536] 항-Notch1 NRR Mab의 결합 친화도 및 결합 동역학을 추가로 특성규명하기 위해, 바이아코어(BIAcore; 상표명)-3000에 의해 표면 플라스몬 공명 (SRP) 측정을 이용하였다 (바이아코어, Inc., 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재). 요컨대, 공급자의 지침에 따라 카르복시메틸화 벡스트란 바이오센서 칩 (CM5, 바이아코어 Inc.)을 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)에 의해 활성화시켰다. 토끼 항-인간 항체 (피어스)를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 희석 (20 μ g/ml)한 후, 분당 5 μ l의 유속으로 주입하여 커플링된 항체의 약 3000 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 다음에, 1 M 에탄올아민을 주입하여 미반응 기를 블로킹하였다. 항-NRR1 mab (전장 IgG로 형식화됨)를 칩상에 코팅된 토끼 항-인간 IgG에 의해 포획하여 약 200 반응 단위 (RU)를 달성하였다. 동역학 측정을 위해, 인간 NRR1-ECD 또는 뮤린 NRR1-ECD 단백질의 2배 연속 희석물 (3.9 nM 내지 500 nM)을 25°C에서 PBT 완충액 (PBS (0.05% 트윈 20 포함)) 중에 30 μ l/분의 유속으로 주입하였다. 간단한 일-대-일 랭무어(Langmuir) 결합 모델 (바이아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 이용하여 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})를 계산하였다. 평형 해리 상수 (K_D)를 k_{off}/k_{on} 비율로 계산하였다.

[0537] 상기 실험의 결과를 표 5에 나타내었다. "NA"는 측정이 수행되지 않았음을 의미한다.

표 5

인간 및 마우스 Notch1 NRR 함유 폴리펩티드에 대한 항-Notch1 NRR 항체 결합의 결합 친화도 및 동역학

항-Notch1 NRR 항체	마우스 Notch1 NRR			인간 Notch1 NRR		
	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$K_d(M)$	$k_{on}/(1/Ms)$	$k_{off}/(1/s)$	$K_d(M)$
항체 A	9.10E+04	2.10E-02	2.31E-07	8.20E+04	1.10E-02	1.34E-07
항체 A-1	8.50E+04	3.30E-04	3.88E-09	6.70E+04	2.30E-04	3.43E-09
항체 A-2	1.10E+05	3.40E-04	3.09E-09	8.70E+04	2.20E-04	2.53E-09
항체 A-3	9.20E+04	1.20E-03	1.30E-08	6.80E+04	4.00E-04	5.88E-09

[0538]

[0539] **실시예 4: 항-Notch1 NRR 항체 에피토프의 특성규명**

[0540] 항체 A, A-1 및 A-2의 결합 결정요인을 조사하기 위해, 인간 및 마우스 Notch1 단편을 이용하여 결합 실험을 수행하였다.

[0541] 다음의 단백질을 이번 실험에 사용하였다.

[0542] (1) hFLAG-EGF34+NRR-His6 (101V)- 상기 실시예 1에 기재된 인간 Notch1 면역원.

[0543] (2) hFLAG-NRR-His6 (102V): 이는 인간 Notch1의 아미노산 E1447-Q1733, FLAG 태그, HIS 태그 및 트롬빈 절단 부위를 함유한다. Notch1 부분은 LNR_A, LNR_B, LNR_C, HD_N, HD_C로부터의 서열을 포함한다. 상기 단백질은 임의의 EGF-유사 반복영역 서열을 포함하지 않는다.

[0544] (3) hFLAG-HD-His6 (103V): 이는 인간 Notch1의 아미노산 R1568 내지 Q1733, FLAG 태그, 트롬빈 절단 부위 및 HIS 태그를 함유한다. Notch1 부분은 HD_N 및 HD_C로부터의 서열을 함유한다. 상기 단백질은 임의의 EGF-유사 반복영역 서열을 함유하지 않으며, 세 LNR 영역도 함유하지 않는다.

[0545] (4) mFLAG-EGF34+NRR-His6: 상기 실시예 1에 기재된 뮤린 면역원.

[0546] (5) mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc: 이는 L1597H 돌연변이를 갖는 마우스 Notch1의 아미노산 V1307 내지 Q1723, Flag 태그, Fc 태그 및 TEV 프로테아제 부위를 함유한다. L1597H 돌연변이는 Notch1의 활성화를 야기하며, 이는 예를 들어 문헌 [Weng et al., Science 306:269-271, 2004]에 기재되어 있다.

[0547] (6) Flag 대조군: 이는 Flag 태그를 포함하는 대조군 폴리펩티드이다.

[0548] (7) His 대조군: 이는 His 태그를 포함하는 대조군 폴리펩티드이다.

[0549] ELISA 프로토콜:

[0550] PBS 중 단백질 1 μ g/ml (pH 7.4)를 4°C에서 밤새 ELISA 플레이트 (눈크 맥시소프) 상에 코팅하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 PBS (인산염 완충 식염수; 피어스) 중 카제인 블로커(Casein blocker)에 의해 블로킹하

였다. PBST 완충액 (PBT 완충액 (PBS + 0.05% (v/v) 트윈 20), (0.5% (w/v) BSA 포함)) 중 항-Notch1 NRR IgG 또는 무관한(irrelevant) IgG의 연속 3-배 희석물을 플레이트에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 하였다. 이어서, 플레이트를 PBST로 세척하고, 결합된 항체를 퍼옥시다제-접합된 염소 항-인간 Fab 특이적 IgG (시그마)에 의해 검출하였다. TMB 기질 (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)을 사용하였으며, 표준 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 650 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 칼레이디아그래프 (시너지 소프트웨어)를 이용하여 IgG의 농도에 대한 흡광도를 도면으로 나타내었다.

[0551] 상기 실험의 결과를 도 12A (항체 A-hIgG1), 12B (항체 A-1-hIgG1) 및 12C (항체 A-2-hIgG1)에 나타내었다. 항체 A, A-1 및 A-2는 폴리펩티드 hFLAG-EGF34+NRR-His6 (101V), hFLAG-NRR-His6 (102V), hFLAG-HD-His6 (103V), mFLAG-EGF34+NRR-His6에 결합하였으며, Notch1 서열이 존재하지 않는 대조군 폴리펩티드에 결합하지 않았다. 이러한 결과는 Notch1 NRR 도메인이 항체 A, 항체 A-1 및 항체 A-2에 결합하기에 충분함을 입증한다. 또한, 항체 A, A-1 및 A-2는 단백질 mEGF34+NRR-L1597H-FLAG-TEV-Fc (돌연변이 L1597H를 활성화시키는 Notch1 함유)에 결합하였다. 이러한 결과는 항체가 돌연변이 Notch1 수용체에 결합할 수 있음을 입증한다.

[0552] 실시예 5: 항-Notch1 NRR 항체에 대한 기능적 분석

[0553] Notch1 리포터 분석

[0554] Notch1 리포터 분석 (또한, 본원에서 "공배양 분석"이라고도 함)을 수행하여 항-Notch1 NRR 항체가 Notch 신호 전달을 억제하는 능력을 측정하였다. 요컨대, 분석에는 다음 단계들이 포함되었다.

[0555] (1) 인간 Notch1을 발현하는 NIH-3T3 세포를, Notch 신호전달에 반응하는 루시퍼라제 리포터 플라스미드에 의해 형질감염시키는 단계;

[0556] (2) 세포를 항체 또는 여러 대조군 시약으로 처리하는 단계;

[0557] (3) 인간 재기드1을 안정하게 발현하는 NIH-3T3 세포를 첨가하여 신호전달을 개시하는 단계; 및

[0558] (4) 리포터 플라스미드로부터 발현된 루시퍼라제 활성을 측정하여 Notch 신호전달의 수준을 평가하는 단계.

[0559] 보다 상세하게는, 다음과 같은 분석을 수행하였다.

[0560] (1) 인간 Notch1 (N1)을 안정하게 발현하는 NIH-3T3 세포를 흑색-벽, 투명-웰 96-웰 플레이트에 웰당 세포 5000개씩 DMEM 고농도-글루코스 배지 (10% FBS 함유 및 항생제 무함유) 중에 플레이팅하였다. 세포를 37°C에서 16시간 동안 5% CO₂ 하에 인큐베이션하였다. 이어서, 배지를 DMEM (무혈청)으로 교환하고, 세포를 TP-1 (CSL 프로모터, Notch 활성화에 반응성) 루시퍼라제 플라스미드 100 ng/웰 (예를 들어, 문헌 [Minoguchi et al., Mol. Cell. Biol. 17:2679-2687 (1997)] 참조) 및 pRL-CMV 레닐라 루시퍼라제 리포터 (프로메가(Promega) 제품) 5 ng/ml로 형질감염시켰다. 형질감염을 37°C, 5% CO₂ 하에 6시간 동안 지속시켰으며, 제4 시간이 시작 할 때 혈청을 첨가하였다.

[0561] (2) 제6 시간의 종료시에, 형질감염 시약을 함유하는 배지를 흡입에 의해 제거하고, DMEM/FBS 50 μl를 다음과 함께 첨가하였다: A. 신선한 배지 (모의 자극을 위해 나중에 대조군 NIH-3T3 모세포를 수용함); B. 신선한 배지 (DMEM (10% FBS 포함)); C. 인간 IgG 이소형 대조군 항체 (400 ng/ml); 서로 다른 네가지 농도의 항-Notch1 NRR 항체 A (D. 16 ng/ml, E. 80 ng/ml, F. 400 ng/ml, G. 2000 ng/ml); H. 정제된 Notch1 NRR 단백질 (웰당 5 μg)과 함께 30분 동안 미리 인큐베이션시킨 항-Notch1 NRR 항체 A (400 ng/ml); I. Notch1 NRR 단백질과 함께 H에서와 같이 처리한 인간 IgG 이소형 대조군 항체 (400 ng/ml); J. 다시 첨가한 BSA 단백질 (6.5 μg/웰)과 함께 30분 동안 미리 인큐베이션시킨 항-Notch1 NRR 항체 A (400 ng/ml); K. 화합물 E (감마-세크레타제 억제제; C₂₇H₂₄F₂N₄O₃; (Seiffert et al., J. Biol. Chem. 275:34086, 2000)) (1 μM); 및 L. DMSO 대조군 (화합물 E 용매만). 상기 열거된 시약을 형질감염된 NIH-3T3-Notch1 세포와 함께 37°C, 5% CO₂하에 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0562] 인간 재기드1 리간드를 안정하게 발현하는 NIH-3T3 세포 5000개를 각 웰에 첨가하였으며 (J는 제외), 여기서 상기 세포는 NIH-3T3 모세포주였다. 이어서, 플레이트를 37°C, 5% CO₂하에 23시간 동안 인큐베이션하였다.

[0563] 반딧불이 (TP1) 및 레닐라 (pRL-CMV) 루시퍼라제 활성을 듀얼-글로(Dual-Glo) 루시퍼라제 키트 (프로메가)에 의해 측정하였다. 반딧불이 판독값을 레닐라 판독값으로 나누고, 각 조건의 8회 반복값을 평균내어 Notch 신호전달의 수준을 계산하였다. 결과를 도 7에 도시하였으며, 여기서 오차 막대는 반복값의 표준 편자를 나타낸다.

- [0564] 도 7에 도시한 바와 같이, 항체 A는 강력한 Notch 1 억제제였다. TP1-Luc 리포터를 이용하여 측정한 바와 같이, 항체 A는 Notch 신호전달을 억제하였다. 항체 적정을 도시하였으며, 400 ng/ml의 항체는 Notch 신호전달을 대조군 "온(on)" 수준 (이소형 대조군 (400 ng/ml)을 사용하여 관찰한 신호전달의 수준)의 18%로 억제하였다. 가용성 NRR 단백질을 추가로 첨가함으로써 (BSA 대조군은 첨가하지 않음), 신호전달에 대한 항체-유도 차단을 경감시켰으며, 이는 항체의 신호전달 억제가 항체-Notch1 NRR 상호작용으로 인한 것임을 입증하는 것이다. 감마-세크레타제 억제제인 화합물 E를 대조군으로 사용하여 억제를 입증하였다. 다른 대조군으로서, 재기드1-발현 세포를 모세포 (NIH-3T3 단독, 재기드1 부재)로 대체하여 완전 신호전달을 유도하는 것에 실패하였으며, 이는 신호전달에 재기드1이 요구됨을 입증하는 것이다.
- [0565] 상기에서 이용된 공배양 분석 방법을 이용하여, 몇가지 농도에서의 처리에 의해 항체 A를 그의 친화도-성숙 상대 항체 A-1, 항체 A-2 및 항체 A-3와 비교하였다. 80 ng/ml의 항체에서 나타난 바와 같이, 항체 A-2 및 항체 A-3는 항체 A에 비해 더욱 강력하게 Notch 신호전달을 차단하는 것으로 밝혀졌다 (도 8).
- [0566] C2C12 근모세포 분화 분석
- [0567] 마우스 C2C12 근모세포를 분화 배지로 처리하는 경우, 근관(myotube)으로 분화하였다. 재기드1 리간드-발현 세포와의 공배양에 의해 Notch 신호전달을 자극함으로써 분화를 억제하였다. 하기 상세히 설명된 바와 같이, Notch1 신호전달을 억제하는 항체 A의 능력과 일치하게, 항체 A를 첨가함으로써 분화가 회복되었다. 또한, 대조군인 감마 세크레타제 억제제도 분화를 회복시켰다.
- [0568] 구체적으로, 마우스 C2C12 근모세포 세포를 10 mm 원형 멸균 커버 슬립이 달린 24-웰 조직 배양 접시의 바닥에 2.5×10^4 세포/ml (웰당 1 ml 사용)를 플레이팅하였다. 세포를 부착시키고, 37°C, 5% CO₂하에 성장 배지 (DMEM (10% FBS 포함))에서 22시간 동안 성장시켰다. 이어서, 성장 배지를 흡입해내고, 분화 배지 (DM) (DMEM (6% 말 혈청 포함))를 첨가하였다. 세포를, A. DM 단독; B. DM과 3T3-J1 세포; C. DM과 NIH-3T3-재기드1 및 인간 IgG 이소형 대조군 항체; D. DM과 3T3-J1 세포 및 항체 A (200 ng/ml); E. DM과 NIH-3T3-재기드1 세포 및 DMSO (비히클); F. DM과 3T3-J1 세포 및 화합물 E (감마-세크레타제 억제제) (1 μM)로 처리하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂하에 4일 동안 인큐베이션하였다. 커버 슬립을 회수하고, 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, PBS 중 0.2% 트리톤 X-100로 투과성화시켰다. 이어서, 세포를 PBS 중 10% FBS로 블로킹하였다. 알렉사 (등록상표) 488에 접합된 염소 항-마우스 IgG (H+L) 이차 항체 (분자 탐침) 및 미오신 중쇄 인식 항체 (밀리포어, 항-미오신 HC, 클론 A4.1025 복수)를 사용하여 분화된 근관을 염색하였다. DAPI를 사용하여 핵을 대조-염색하였다. 각각의 조건에 대하여 서로 다른 세 영역의 영상을 획득하였다. 상기 영상의 서브세트를 도 10에 도시하였다. 메타모프(Metamorph) 소프트웨어 (몰레큘러 디바이시즈(Molecular Devices))를 이용하여 알렉사 (등록상표) 488 염색 면적 및 핵의 수를 계수하였다. 알렉사(등록상표) 488 염색 면적을 핵의 수로 나누고, 평균내고, 그래프화하였다. 오차 막대는 삼중 표본 영상의 표준 편차를 나타낸다. 상기 결과를 도 9에 도시하였다.
- [0569] 실시예 6: 항-Notch1 NRR 항체는 야생형 및 돌연변이 Notch1 수용체에 의한 신호전달을 억제함
- [0570] L1594P 돌연변이 Notch1 수용체, DelPEST 돌연변이 Notch1 수용체 및 야생형 (wt) Notch1 수용체를 코딩하는 TP-1 및 pRL-CMV 플라스미드에 의해 일시적으로 형질감염된 NIH-3T3 세포 (리포펙트아민(Lipofectamine) 및 리포펙트아민 플러스(Lipofectamine Plus) 시약 (인비트로젠)을 이용함) 및 인간 재기드-1을 안정하게 발현하는 NIH-3T3 세포를 이용하여, 본래 상기된 바와 같이 루시퍼라제 리포터 공배양 분석을 수행하였다. L1594P 돌연변이는, HD-N 도메인 중 아미노산 (aa) 1594에서 류신이 프롤린으로 돌연변이된 것을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Weng et al., Science 306:269-271, 2004] 참조). DelPEST는, aa 2473에서 출발하는 PEST 도메인의 카르복실-말단 결실을 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Malecki et al., Mol. Cell. Biol. 26:4642-4651, 2006] 참조). 공개된 결과와 일치하게, 도 13에 도시된 결과는, L1594P 및 DelPEST 돌연변이 둘 모두가 Notch1 신호전달을 활성화시킴을 확증하였다. 동일한 이소형의 무관한 과자-유래 모노클로날 항체를 이용하는 음성 대조군에 비해, 항체 A는 세 수용체 각각을 통해 용량-의존적 방식으로 신호전달을 억제하였다. DMSO에 용해시킨 감마 세크레타제 억제제 화합물 E (CmpE)를 Notch 신호전달 억제에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. 단색의 흑색 막대는 2000 ng/ml의 대조군 항체를 사용하여 수득한 결과를 도시한 것이고, 굵은 점선 막대는 80 ng/ml의 항체 A를 사용하여 수득한 결과를 도시한 것이고; 가는 선 막대는 400 ng/ml의 항체 A를 사용하여 수득한 결과를 도시한 것이고; 굵은 선 막대는 2000 ng/ml의 항체 A를 사용하여 수득한 결과를 도시한 것이고; 교차-벳금 막대는 화합물 E (10 μM)를 사용하여 수득한 결과를 도시한 것이고; 가는 점선 막대는 DMSO (화합물 E에 대한 비히클)를 사용

하여 수득한 결과를 도시한 것이다. 각 조건에 대해 8회 반복하여 결과를 측정한 다음, 표준 편차를 나타내는 오차 막대와 함께 평균값으로 나타내었다.

[0571] 실시예 7: 항-Notch1 NRR 항체는 맥관형성 및 혈관신생을 방해함

HUVEC 세포 발아(sprouting) 분석을 이용하여 맥관형성 및 혈관신생에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 조사하였다. 상기 분석은 문헌 [Nakatsu et al. (Microvasc. Res. 66 (2):102-112, 2003)]에 기재된 것과 유사하다. HUVEC 세포를 사이토덱스 3(Cytodex 3; 등록상표) 비드 (아머샴 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 상에 코팅한 다음, 이를 피브린 겔에 이식하였다. 인간 피부 섬유아세포를 피브린 겔층 상에 플레이팅한 다음, 이를 조직 배양 배지로 덮었다. HUVEC 세포로부터의 혈관 발아를 4 내지 9일 후 조사하였다. 항-D114 처리에 대해 관찰된 결과와 유사하게, 도 14A에 도시한 바와 같이 항-Notch1 NRR 처리는 혈관 발아 및 길이에서의 두드러진 증가를 야기하였다. 대조군으로서 PBS로 처리한 세포, 또는 항체 A 또는 A-2로 처리한 세포에 대한 결과를 도시하였다. 항-Notch1 NRR은 혈관 발아 및 맥관구조 네트워크 밀도를 증가시킴으로써 맥관형성 및 혈관신생을 방해하였다.

또한, 각막 주머니(corneal pocket) 혈관신생 분석을 이용하여 맥관형성 및 혈관신생에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 조사하였다. 도 14B에 요약한 프로토콜에 의해 나타난 바와 같이, 설치류 각막 (통상적으로 무혈성임)에 VEGF 펠렛을 이식하여 혈관신생을 유도하거나 (#63, #132 & #390), 음성 대조군으로서 처리하지 않은 채 두었다 (#381). 후속적으로, 2개의 각막을 양성 대조군으로서 혈관 네트워크 밀도의 증가를 위해 항-D114 (#132)로 처리하거나, 또는 항체 A-2 (#390)로 처리하였다. 항-CD31-기재 면역형광 염색 기술 (적색)에 의해 혈관을 시각화하였다. 도 14B에 도시된 바와 같이, 항-Notch1 NRR 처리는 혈관 네트워크 밀도를 유의하게 증가시켰다. 또한, 도 14B에 대해 상기된 바와 같이 처리된 각막의 혈관에 FITC-렉스트란 (녹색)을 관류시켜 혈관을 통한 흐름을 평가하였다. 도 14C에 도시한 바와 같이, 항-D114- 및 항-Notch1 NRR-처리 혈관 둘 모두를 통과하는 관류가 제한되었다.

또한, 마우스 망막 모델의 혈관신생에서의 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 조사하였다. 도 14D에 요약한 프로토콜에 나타난 바와 같이, P1 (생후 제1일) 또는 P3 (생후 제3일) 마우스로부터의 마우스 망막을, 나타낸 농도의 두드러기쑥(ragweed) 항체 (음성 대조군) 또는 항체 A-2로 처리하였다. 망막을 P5 (생후 제5일)에 수확하였다. 이소렉틴(Isolectin) B4를 사용하여 맥관구조를 시각화하였다. 도 14A 내지 14C에 도시한 결과와 일치하게, 항-Notch1 NRR 처리는 맥관구조 밀도를 증가시켰으며, 과발아 표현형을 생성하였다. 도 14D에 대해 상기된 바와 같이 처리한 마우스 망막을 DAPI로 염색하여 핵 DNA를 시각화하였다. 도 14E에 도시한 바와 같이, 항-Notch1 NRR 처리는 핵 수의 증가를 야기하였으며, 이는 증식 증가 가능성을 시사한다.

[0575] 실시예 8: 항-Notch1 NRR 항체는 생체내 종양 증식을 억제함

생체내 마우스 모델을 이용하여 종양 증식에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 조사하였다. 면역결핍 마우스 (Balb-C Nu/Nu)를 HM7 세포주 (결장 선암)를 사용하는 이종이식 연구에서 사용하였다. 5백만개의 세포를 마트리겔(Matrigel) (BC 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 산 호세 소재) 0.1 ml에 이식하고, 이를 마우스에 피하로 접종하였다. 나타낸 바와 같이, 종양을 약 250 내지 300 mm³로 증식시킨 후, 마우스를 무작위로 세개의 처리 계열 군으로 나누고 투여를 시작하였다. 도 15A에 도시한 바와 같이, 항체 A-2 처리에 의해 종양 증식이 중단되었다. 항-두드러기쑥 및 항-VEGF는 각각 음성 및 양성 대조군으로 작용하였다. 도 15A에 대해 상기된 것과 유사한 실험에서, 항체 A-2의 여러 투여량에 대해 종양 증식을 중단시키거나 늦추는 능력을 시험하였다. 결과를 도 15B에 도시하였다. CALU6 세포주 (비-소세포 폐암 세포주)를 HM7 세포주 대신 사용한 것을 제외하고는 도 15A에 대해 상기된 것과 유사한 실험에서, 도 15C에 도시된 바와 같이 항체 A-2가 종양 부피를 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 도 15A 내지 15C에 도시된 결과를 취합하면, 항-Notch1 NRR 항체가 종양 증식을 억제함을 나타낸다.

도 15B에 대해 상기된 것과 유사한 실험에서, 도 15D에 도시된 바와 같이 항체 A-2에 의한 처리가 투여량-의존적 방식으로 무게 감소를 일으키는 것으로 나타났다. 도 15B에 대해 상기된 것과 유사한 실험에서, 나타낸 시점에서 처리 마우스의 혈청 중 인간 Fc의 농도를 측정함으로써 항체 A-2의 청소율(clearance)를 조사하였다. 그 결과를 도 15E에 도시하였다.

[0578] 실시예 9: 항-Notch1 NRR 항체는 장 세포의 증식 및 분화에 영향을 미침

마우스 장관 세포에 대한 항-Notch1 NRR 항체의 효과를 조사하였다. 대조군 마우스 (비히클) 및 항체 A-2를 3 일 내지 4일마다 투여한지 10일 후의 처리군 마우스로부터 장을 단리하였다. 샘플을 혜마톡실린 및 에오신 (+

류신에 대해 알시안 블루 (청색, 분비 세포에 대한 마커, 또는 통상적으로 사용되는 증식성 마커 단백질 Ki-67에 대한 항-Ki-67 (갈색; 항체-기재 면역조직화학적 염색법))으로 염색하였다. 도 16A 및 16B는 대조군 항체 (비히를) 또는 나타낸 농도의 항체 A-2로 처리한 마우스의 소장 또는 대장 각각으로부터 음와(crypt) 및 융모의 표본을 도시한다. 이러한 결과는 항-Notch1 NRR이 전이 증폭 세포의 증식을 중단시키고, 분비 세포 (배상 (goblet) 세포 및 파네트(Paneth) 세포를 포함함)의 수를 증가시킴을 입증한다.

실시예 10: 항-Notch1 NRR 항체 및 감마-세크레타제 억제제는 특정 암 세포주의 생존도를 감소시킴

암 세포주 패널에 대한 항-Notch1 NRR, 감마 세크레타제 억제제 DAPT 및 "화합물 E" (CmpE)의 효과를 조사하였다. 도 17에 나타낸 세포주 (x -축)를, 나타낸 항체 A-2, DAPT, CmpE 또는 DMSO (대조군, 감마-세크레타제 억제제에 대한 비히클)의 존재 또는 부재하에 증식시키고, 세포의 생존도를 셀타이터-글로(CellTiter-Glo; 상표명) 발광 세포 생존도 분석 (프로메가, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)를 이용하여 평가하였다. 상기 분석에 의해, 존재하는 ATP (대사적으로 활성인 세포의 지표)의 정량에 기초하여 배양물 중 생존 세포의 수를 측정하였다. 도 17에서, 발광을 "상대 발광 단위"로 정량화하였다 (y -축). 도 17에 도시한 바와 같이, DAPT, CmpE 또는 항-Notch1 NRR의 존재하에 인큐베이션한 MT-3 (유방암 세포주로 보고됨) 및 OVCAR-3 (난소암 세포주)는 ATP 수준 감소 (증식 감소 및/또는 세포사 증가의 지표)를 나타내었다.

이해를 명료하게 할 목적으로, 상기 본 발명이 도면 및 실시예에 의해 다소 상세하게 기재되어 있으나, 상세한 설명 및 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석해서는 안된다.

도면

도면1a

클론 #	H1									
	26	2 7	28	29	30	31	32	33	34	35
항체 A	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
항체 A-1	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
항체 A-2	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H
항체 A-3	G	F	T	F	S	S	Y	W	I	H

클론 #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
항체 A	A	R	I	N	P	S	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
항체 A-1	A	R	I	N	P	P	N	G	S	A	H	Y	A	D	S	V	K	G
항체 A-2	A	R	I	N	P	P	N	R	S	N	Q	Y	A	D	S	V	K	G
항체 A-3	A	R	I	N	P	A	N	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G

클론 #	H3											
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	101	102
항체 A	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y
항체 A-1	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y
항체 A-2	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y
항체 A-3	A	R	G	S	G	F	R	W	V	M	D	Y

도면1b

클론 #	L1										
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
항체 A	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
항체 A-1	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
항체 A-2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A
항체 A-3	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A

클론 #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
항체 A	S	A	S	F	L	Y	S
항체 A-1	S	A	S	F	L	Y	S
항체 A-2	S	A	S	F	L	Y	S
항체 A-3	S	A	S	F	L	Y	S

클론 #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
항체 A	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
항체 A-1	Q	Q	S	Y	T	T	P	A	T
항체 A-2	Q	Q	F	Y	T	T	P	S	T
항체 A-3	Q	Q	S	F	S	T	P	A	T

도면2

항체 A

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWV

ARINPSNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQ

GTLVTVSS (서열 58)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR

FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPATFGQGTVKEIKR (서열 59)

항체 A-1

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNGSAH

YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS

(서열 60)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR

FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPATFGQGTVKEIKR (서열 61)

항체 A-2

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPPNRSNQ

YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS

(서열 62)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR

FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPATFGQGTVKEIKR (서열 63)

항체 A-3

HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWIHWVRQAPGKGLEWVARINPANGSTR

YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGFRWVMDYWGQGTLVTVSS

(서열 64)

LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR

FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSFSTPATFGQGTVKEIKR (서열 65)

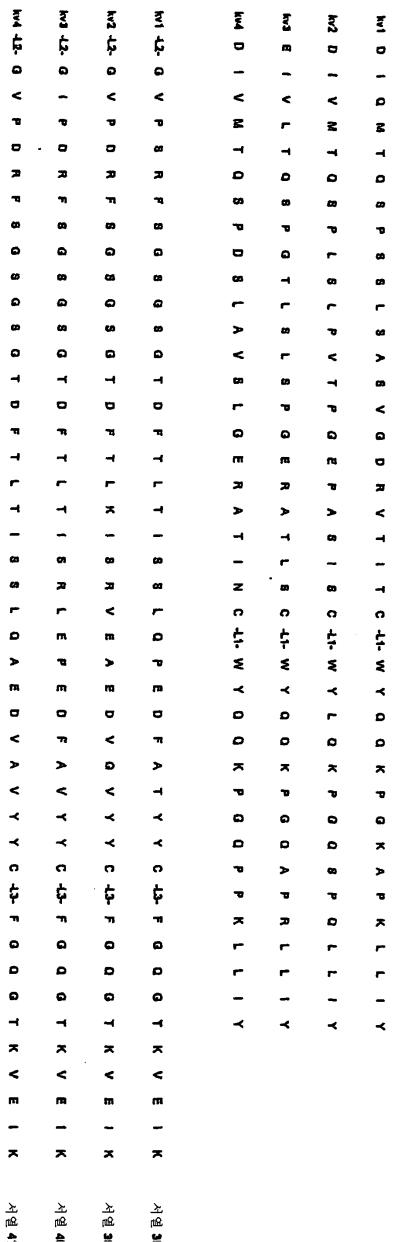
도면3a

I	
A	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T
B	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S
C	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S
D	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S
II	
A	Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S V S
B	Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S
C	Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S
D	Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S
III	
A	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S
B	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
C	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
D	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
△8자	
A	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K
B	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
C	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
A2 수용자	
A	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K
B	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
C	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
D	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S

도면3b

I	R V T I T A D T S T S T A Y M E L L S S L R S E D T A V V Y C A R R V T I T A D T S T S T A Y M E L L S S L R S E D T A V V Y C A R R V T I T A D T S T S T A Y M E L L S S L R S E D T A V V Y C A R V T I T A D T S T S T A Y M E L L S S L R S E D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 19 서월 20 서월 21 서월 22
II	R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V V Y C A R R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V V Y C A R R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V V Y C A R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 23 서월 24 서월 25 서월 26
III	R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 27 서월 28 서월 29 서월 30
제2 수용자	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 31 서월 32 서월 33
제2 수용자	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 34 서월 35 서월 36
도면3b	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V V Y C A	-H3- -H3- -H3-	W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S W G Q G T L V T V S S	서월 37

도면4



도면5

huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 15)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 16)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 17)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 18)

huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 42)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 43)

HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 44)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 45)

도면6

위치66(밀줄)에서 변형된 huMAb4D5-8 경쇄의 프레임워크 서열

LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (서열 15)

LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹ (서열 16)

LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸ (서열 46)

LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (서열 18)

위치 71, 73 및 78(밀줄)에서 변형된 huMAb4D5-8 중쇄의 프레임워크 서열

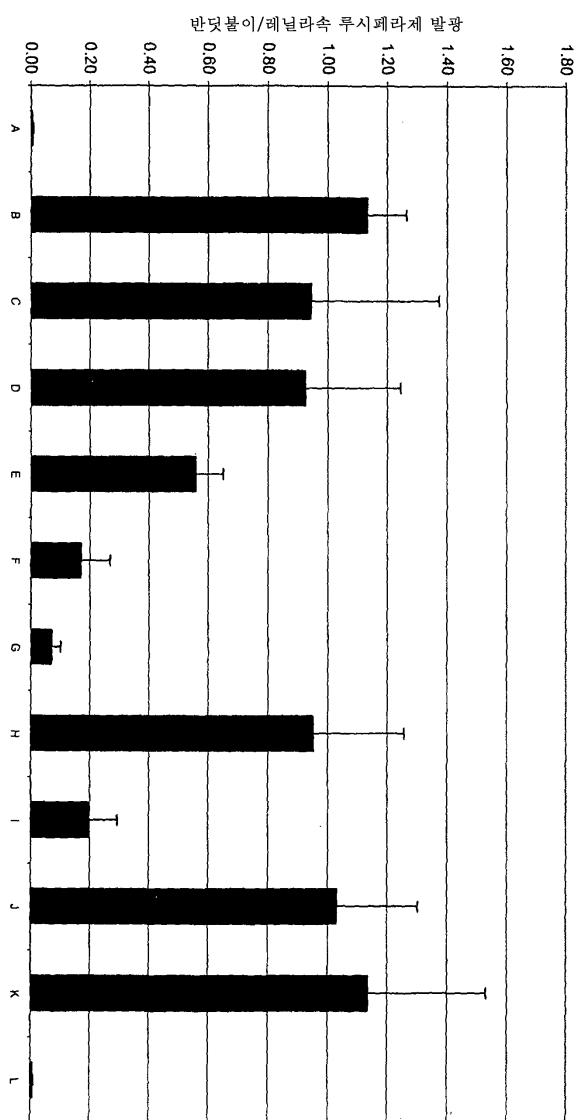
HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (서열 42)

HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸ (서열 43)

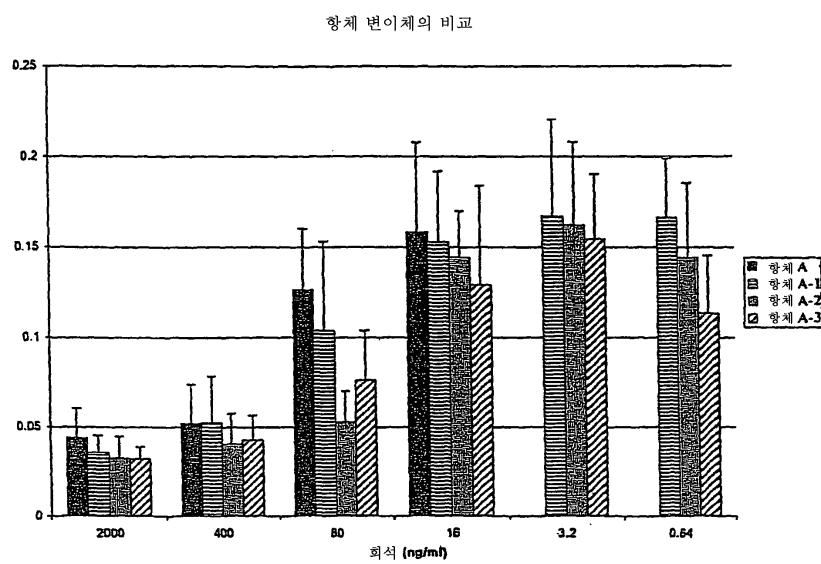
HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹² (서열 47)

HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (서열 45)

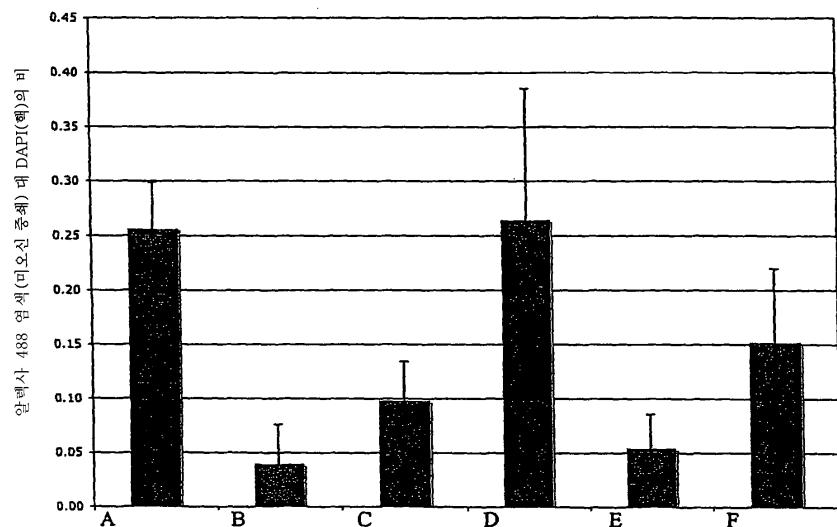
도면7



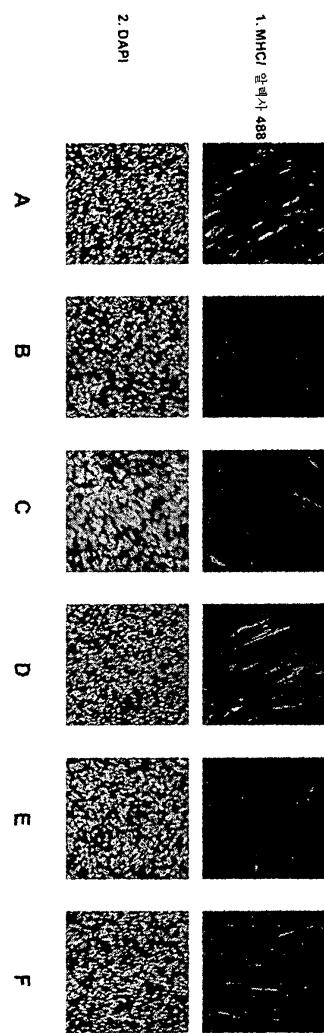
도면8



도면9



도면10



도면11a

2556개의 잔기 오버랩에서 90.7%의 동일성; 스코어:13215.0; 캡의 빈도:1.0%

인간	1 MPPLLAPLLCCLALLPALAARGPRCSQPGETCLNGGKCAANGTEACVCGGAFVGPRCQDP
마우스	1 MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSOPSGTCLNGGRCEVASGTEACVCSGAFVGQRCODS
	***** 신호 패티드 EGF1
인간	61 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCALGPSPGLCLTPLDNACLTNP CRNGGTC DLL
마우스	61 NPCLSTPCKNAGTCHVVDRRGVADYACSCPLGPSPGLCLTPLDNACLTNP CRNGGTC DLL
	***** EGF2 EGF3
인간	121 TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNP CANGGQCLPFEASYICHCPSPFHGPTCRQDVN
마우스	121 TLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNP CANGGQCLPFEASYICHCPSPFHGPTCRQDVN
	***** EGF4
인간	181 ECGQKPGLCRHEGGTCHNEVGSYRCVRATHTPNCERPVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT
마우스	181 ECSQNPGLCRHEGGTCHNEIGSYRCACRATHTPNCERPVPCSPSPCQNGGTCRPTGDVT
	***** EGF5 EGF6
인간	241 HECACLPGFTGQNCEENIDDCPGNNCKNNGGACVDGVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECO
마우스	241 HECACLPGFTGQNCEENIDDCPGNNCKNNGGACVDGVNTYNCRCPPEWTGQYCTEDVDECO
	***** EGF7 EGF8
인간	301 LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWITGEDCSENIDDCASAACFEGATC HDRVASFYCE
마우스	301 LMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWITGEDCSENIDDCASAACFEGATC HDRVASFYCE
	***** EGF9
인간	361 CPHEGRTGILLCHLNDA C1SNPCNEGSNC DTNPVNGKAICTCPGSGYTPGAC SQDVDEC SLGA
마우스	361 CPHEGRTGILLCHLNDA C1SNPCNEGSNC DTNPVNGKAICTCPGSGYTPGAC SQDVDEC ALGA
	***** EGF10
인간	421 NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNNECVSNP CNDATCLDQIGEFQ CICMP
마우스	421 NPCEHAGKCINTLGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNNEC1SNP CNDATCLDQIGEFQ CICMP
	***** EGF12
인간	481 GYEGVBCEVNTDECASSPCLHNGRCLDKINEFQCECP TGFTGHLCQYDVDEC ASTPCKNG
마우스	481 GYEGVYCEINTDECASSPCLHNGHCMMDKINEFQCCPKGFNGHLCQYDVDEC ASTPCKNG
	***** EGF13 EGF14
인간	541 AKCLDGPN TYTCVCTEGYTGTBCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLCRPGYTGHBC
마우스	541 AKCLDGPN TYTCVCTEGYTGTBCEVDIDECDPDPCHYGSCKDGVATFTCLCQPGYTGHBC
	***** EGF15
인간	601 ETNINECSSQPCRHGGTCQDRDNAYLCFLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
마우스	601 ETNINECSQPCRHGGTCQDRDN SYLCFLKGTGPNCEINLDDCASSPCDSGTCLDKID
	***** EGF16

도면11b

인간 마우스	661 GYECAE PGY TGSMCWINIDECA GNPC HNGG TCE DING FT C R C PEGY HD P T CL SEV NEC 661 GYECAE PGY TGSMC NVN IDECA GSP C HNGG TCE DING FT C R C PEGY HD P T CL SEV NEC ***** EGF18 ***** EGF19 *****
인간 마우스	721 NSNP C VEH GAC RDLS LNGY KCD CDP GWS GT NC DINN NECE S N P C VNGG TCK DMT SGY V CTR 721 NSNP C VEH GAC RDGL LNGY KCD CAG P GWS GT NC DINN ZES N P C VNGG TCK DMT SGY V CTR ***** EGF20 *****
인간 마우스	781 EGF SGP NC QTN INEC ASNP CLN QGT CIDD VAGY KCN CLLPY T GAT C E VV LAP C A P S P C R N 781 EGF SGP NC QTN INEC ASNP CLN QGT CIDD VAGY KCN CLLPY T GAT C E VV LAP C A T S P C K N ***** EGF21 ***** EGF22 *****
인간 마우스	841 GGE CRQ S E D Y E S F S C V C P T G W Q Q T C E V D I N E C V L S P C R H G A S C Q N T E G G Y R C H C Q A G Y S 841 S G V C K E S E D Y E S F S C V C P T G W Q Q T C E V D I N E C V K S P C R H G A S C Q N T E G G Y R C L C Q A G Y T ***** EGF23 *****
인간 마우스	901 GRNC E T D I D D C R P N P C H N G G S C T D G I N T A F C D C L P G F R G T C E D I N E C A S D P C R N G A C 901 GRNC E S D I D D C R P N P C H N G G S C T D G I N T A F C D C L P G F Q G A P C E E D I N E C A S N P C Q N G A C ***** EGF24 *****
인간 마우스	961 TDC VD S Y T C T C P A G P S G I H C E N N T P D C T E S C F N G G T C V D G I N S F T C L C P P G F T G S Y C Q H 961 TDC VD S Y T C T C P V G F N G I R C E N N T P D C T E S C F N G G T C V D G I N S F T C L C P P G F T G S Y C Q Y ***** EGF26 *****
인간 마우스	1021 DVNE C D S Q P C L H G G T C Q D G C G S Y R C T C P Q G Y T G P N C Q N L V E W C D S S P C K N G G K C W Q T H T Q 1021 DVNE C D S R P C L H G G T C Q D S Y G T Y K C T C P Q G Y T G L N C Q N L V R W C D S A P C K N G G R C W Q T N T Q ***** EGF27 *****
인간 마우스	1081 YRCE C P S G W T G L Y C D V P S V S C E V A A Q R Q G V D V A R L C Q H G G L C V D A G N T H H C R C Q A G Y T G S 1081 YRCE C R S G W T G V N C D V L S V S C E V A A Q K R G I D V T L L C Q H G G L C V D E G D K H Y C B C Q A G Y T G S ***** EGF29 *****
인간 마우스	1141 YC E D L V D E C S P C Q N G A T C T D Y L G G Y S C K C V A G Y H G V N C S E E I D E C L S H P C Q N G G T C D 1141 YC E D E V D E C S P N P C Q N G A T C T D Y L G G F S C K C V A G Y H G S N C S E E I N E C L S Q P C Q N G G T C I D ***** EGF30 *****
인간 마우스	1201 LPNT Y K C S C P R G T Q G V B C E I N V D D C N P P V D P V S R S P K C F N N G T C V D Q V G G Y S C T C P P G F V 1201 LTNS Y K C S C P R G T Q G V B C E I N V D D C H P P L D P A S R S P K C F N N G T C V D Q V G G Y T C T C P P G F V ***** EGF32 *****
인간 마우스	1261 G E R C E G D V N E C L S N P C D A R G T Q N C V Q R V N D P H C E C R A G H T G R R C E S V I N G C R G K P C K N G G 1261 G E R C E G D V N E C L S N P C D P R G T Q N C V Q R V N D P H C E C R A G H T G R R C E S V I N G C R G K P C K N G G ***** EGF33 ***** EGF34 *****

면역원(시작)

도면11c

인간
마우스 1321 TCAVASNTARGFICKCPAGFEGATCENDARTCGSLRCLNGTCISGPRSPTCCLCLGPTG
1321 VCAVASNTARGFICRCPAFEGATCENDARTCGSLRCLNGTCISGPRSPTCCLCLGPTG

EGF35

인간
마우스 1381 PECQFFASSPCLGNNPCYINQGTCEPTSESPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFGGGAGRDI
1381 PECQFFASSPCVGSSNPYCYNQGTCEPTSENPPYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGGAGRDI

EGF36

인간
마우스 1441 PPPQIEEACELPECQVDAGNKVCSSLQCNNEACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF
1441 PPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQCNNEACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYF

LNR_A LNR_B

인간
마우스 1501 SDGHCDSQCNNSAGCLFDGFDQCRAEGQCNPPLYDQYCKDHEFSDGHCDCQGCNSAECEDWDGLD
1501 SDGHCDSQCNNSAGCLFDGFDQCQLTEGQCNPPLYDQYCKDHEFSDGHCDCQGCNSAECEDWDGLD

LNR_C

인간
마우스 1561 CAEHVERLAAAGTLVVVVIIMPPEQLRNNSSFEPFLRELSRVLSTNVVFKRDAHQGQMIFFYY
1561 CAEHVERLAAAGTLVLLVLLPPDQLRNNNSFEPFLRELSRVLSTNVVFKRDAHQGQMIFFYY

HD-N

인간
마우스 1621 GREEELRKHPIKRAAEWAAPDALLGQVKASLLPFGGSEGRRRRELDPMVDVRGSIVYLEI
1621 GHEEELRKHPIKRSTVGWAT-----SSLLPGTS-GGRQRRELDPMDIRGSIVYLEI

S1 HD-C

인간
마우스 1681 DNRQCVQASSQCFQSATDVAAPFLGALASLGSLNIPYKIEAVQSETVEPPPQLHFMVVA
1671 DNRQCVQSSQCFQSATDVAAPFLGALASLGSLNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLHLMVVA

S2 TM

인간
마우스 1741 AAAFVLLFFVCGGVLLSRKRRRQHGQLWPPFGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLPLKNA
1731 AAAFVLLFFVCGGVLLSRKRRRQHGQLWPPFGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLPLKNA

인간
마우스 1801 SDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEEPVVLPDLDDQTDHROWTQQHLDAAADLRMSAMAP
1791 SDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEEPVVLPDLSDQTDHROWTQQHLDAAADLRMSAMAP

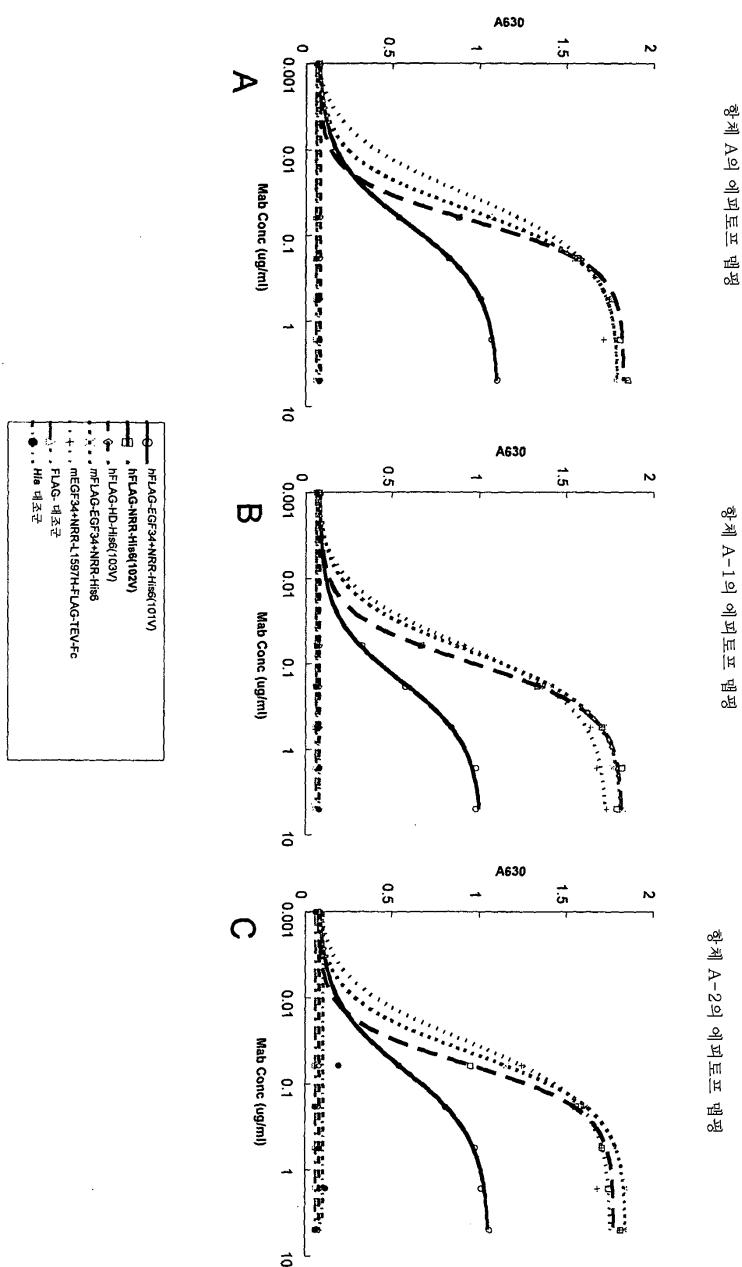
인간
마우스 1861 TPPQGEVDACMDVNVRGPDGFTPPLMIASCSSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL
1851 TPPQGEVDACMDVNVRGPDGFTPPLMIASCSSGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL

인간
마우스 1921 HNQTDRTGETALHAAARYSRSDAAKRILLEASADANIQDNMGRTPLEAAVSADAQGVFQIL
1911 HNQTDRTGETALHAAARYSRSDAAKRILLEASADANIQDNMGRTPLEAAVSADAQGVFQIL

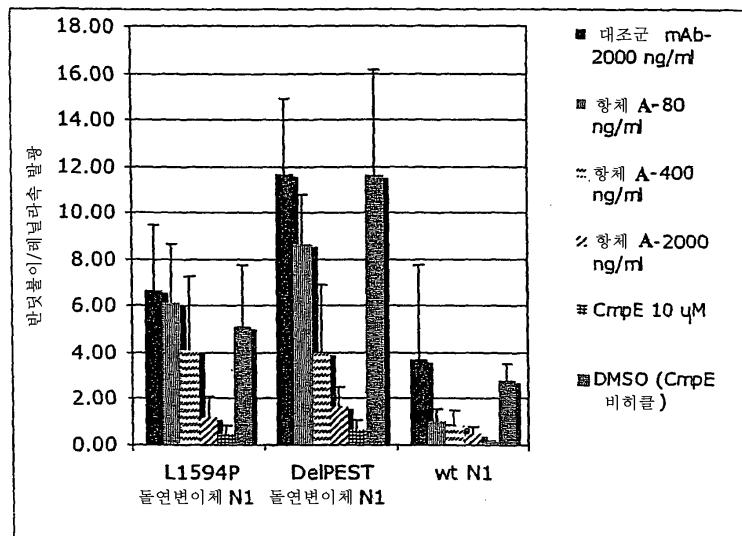
도면11d

인간 마우스	1981 IRNRATDLDARMEDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAVNN 1971 LRNRATDLDARMEDGTTPLILAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDLGKSALHWAAVNN *****
인간 마우스	2041 VDAAVVLLKNGANKDMQNNREETPLFLAAREGSYETAKVLLDFANRDITDEMDRPRBI 2031 VDAAVVLLKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDFANRDITDEMDRPRDI *****
인간 마우스	2101 AQERMHHEDIVRLLDEYNLVRSPQLHGAPLGGTPTLSPPCLSPNGYLGSILKPGVQGKKVRK 2091 AQERMHHEDIVRLLDEYNLVRSPQLBGTALGGTPTLSPTCLSPNGYLGNLKSATQGKKARK *****
인간 마우스	2161 PSSKGGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSGMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLLP 2151 PSTKGGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSMLSPVDSLESPHGYLSDVASPPLLP ** *****
인간 마우스	2221 SPFQQSPSPVPLNHLPGMPDTHLGIGHLNVAAPEMAAALGGGRLAFAETGPPRLSHLPVAS 2211 SPFQQSPSPMLSHLPGMPDTHLGISHLNVAAPEMAAALAGGSRLAFAEPPPPRLSHLPVAS *****
인간 마우스	2281 GTSTVLGSSSGGALNFTVGGSTSINGQCEWLSRLQSGMVPNQYNPLRGSVAPGPLSTQAP 2271 SASTVLSLTNGTGAMMFTVGAPASLNGQCEWLPRLQNGMVPQYNPLRGVTPGTLSTQAA ****
인간 마우스	2341 SLQHGMVGPLHSSLAASALSQMMSYQGLPSTRLATQPHLVQTOQQVQFQNLQMQQQNLQPA 2331 GLQHSMMPGLESSLTNTLSPII-YQGLPNTRLATQPHLVQTOQQVQFQNLQLPQNLQPA *** *
인간 마우스	2401 NIQQQQSLQPPPPPPQPHLGVSAAASGHLGRSFLSGEFSQADVQPLGPSSLAVHTILPQE 2389 -----PSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEFSQADVQPLGPSSLVHTILPQE * ***
인간 마우스	2461 SPALPTSLPSSLVPPVTAACFLTPPSQESYSS-PVDNTPSBQLQVPEBPFITPSPEPDQ 2436 SQALPTSLPSSMVPPTTQFLTPPSQESYSSSPVDNTFSBQLQVPEBPFITPSPEPDQ * *****
인간 마우스	2520 WSSSSPNSNVSDWSEGVSPPPTSMOSQIARIPEAFK 2496 WSSSSPNSNISDWSEGIISSPPPTMPSQITHIPEAFK *****

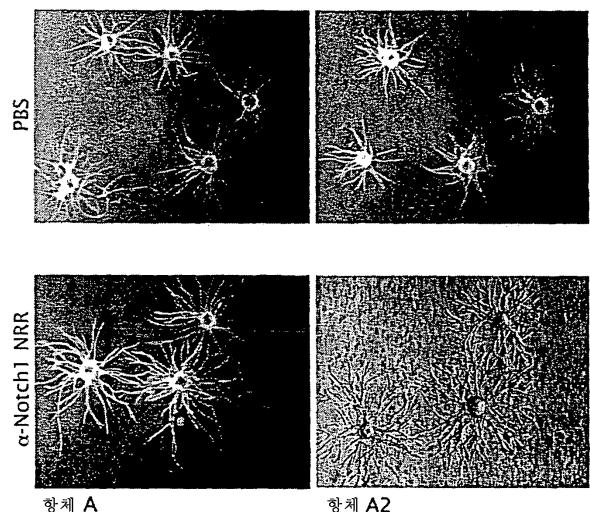
도면12



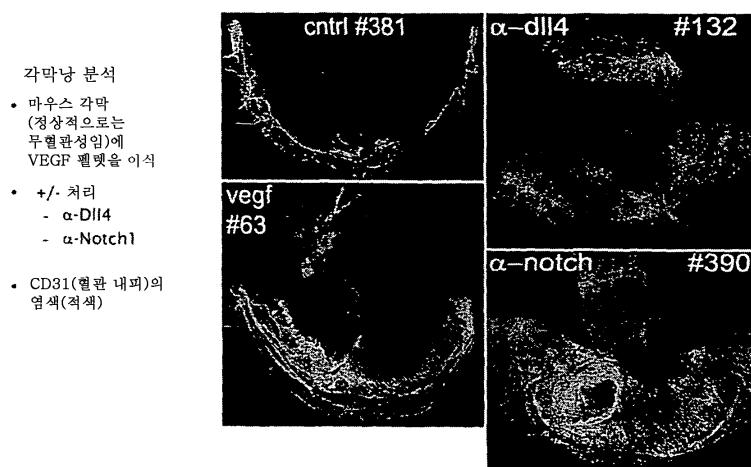
도면13



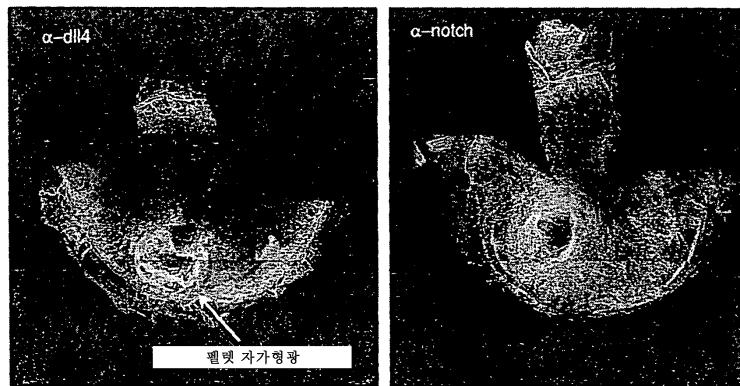
도면14a



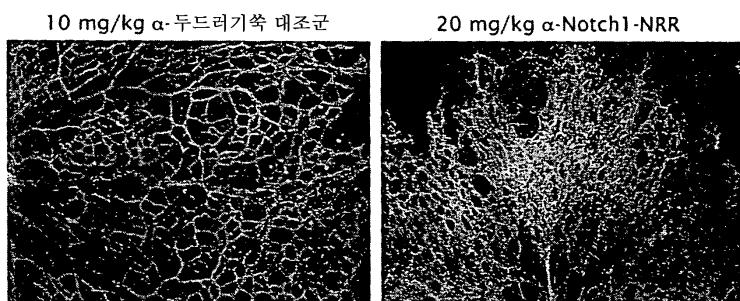
도면14b



도면14c



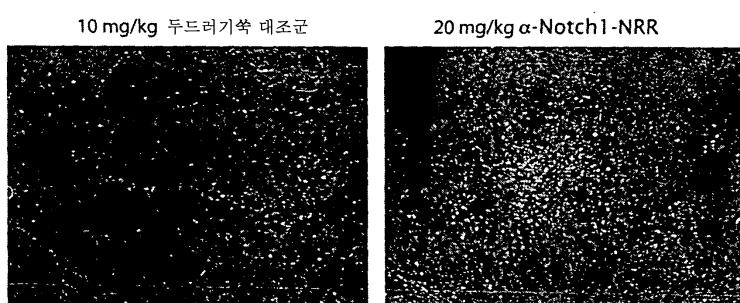
도면14d



혈관신생의 마우스 망막 모델.

α -두드러기쑥 또는 α -Notch1-NRR을 P1 및 P3에 주사한 마우스
P5에서 수거한 망막
망막 맥판 구조를 가시화하기 위한 이소렉틴 B4

도면14e

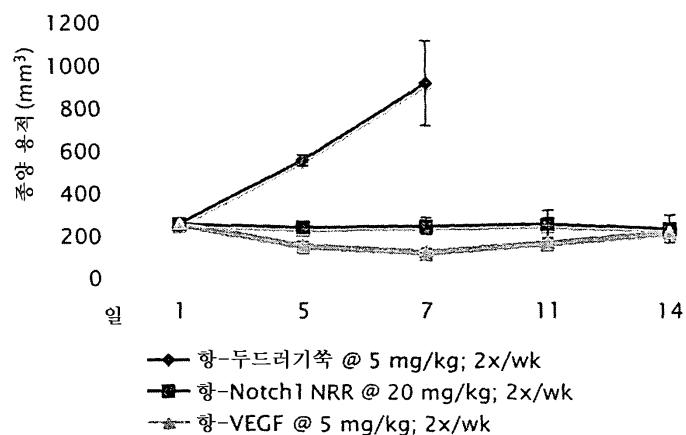


P1 및 P3에 주사한 마우스

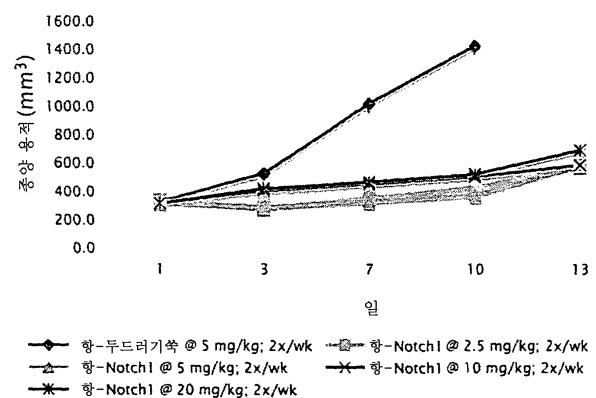
P5에서 수거한 망막
DNA를 염색하기 위한 DAPI

도면15a

HM7 이종이식의 효능

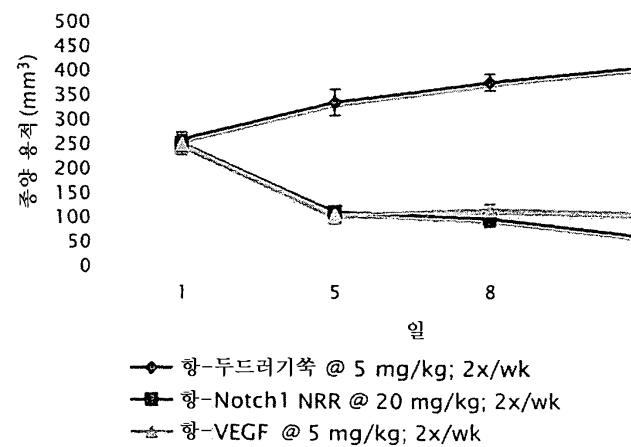


도면15b

HM7 투여량 반응
(2.5 - 20 mg/kg; 2x/week)

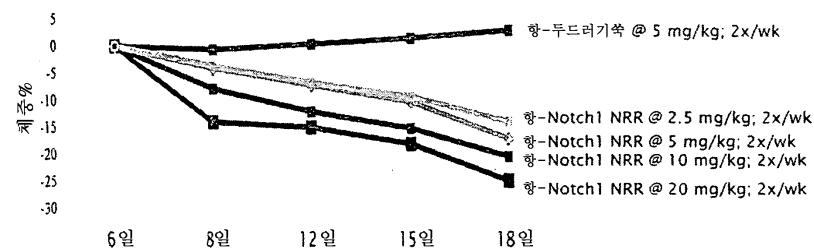
도면15c

CALU6 이종이식의 효능



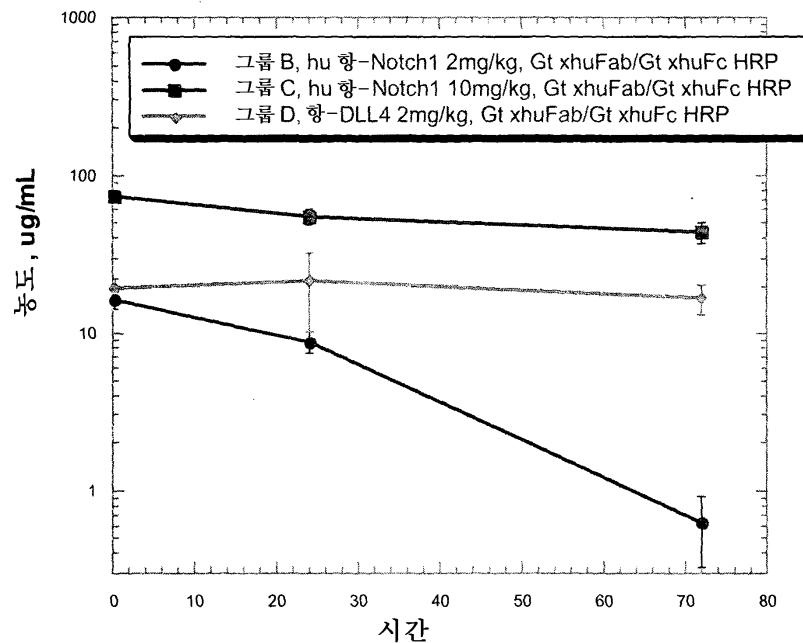
도면15d

형-N1-NRR은 체중 감소를 유발한다(HM7 모델)

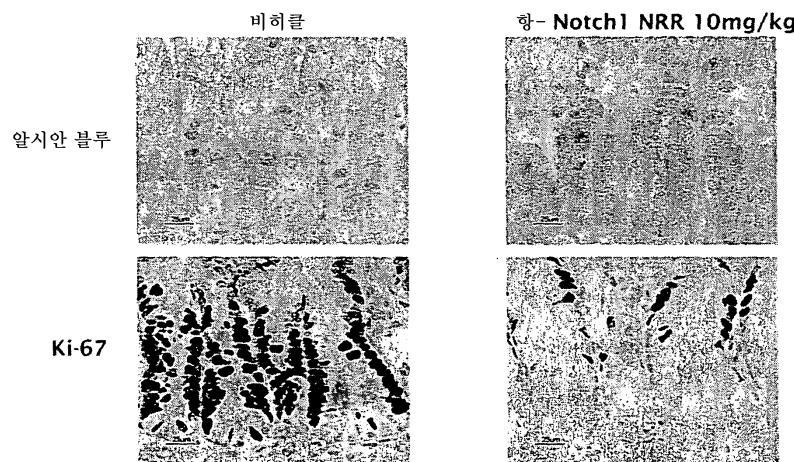


도면15e

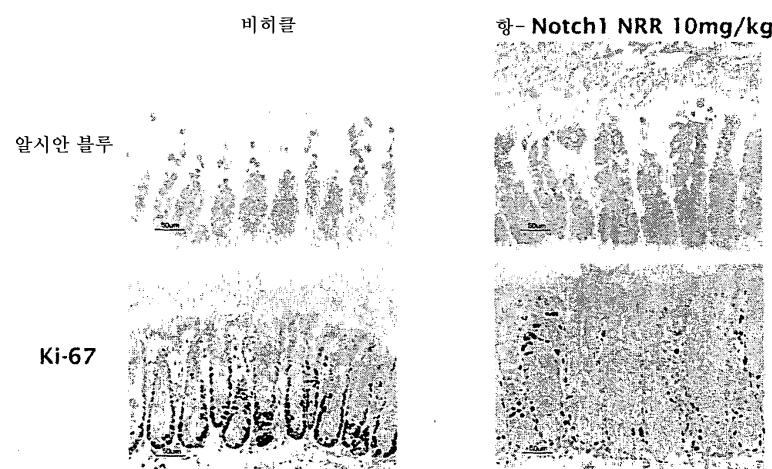
Nu/Nu 마우스에서의 약동학



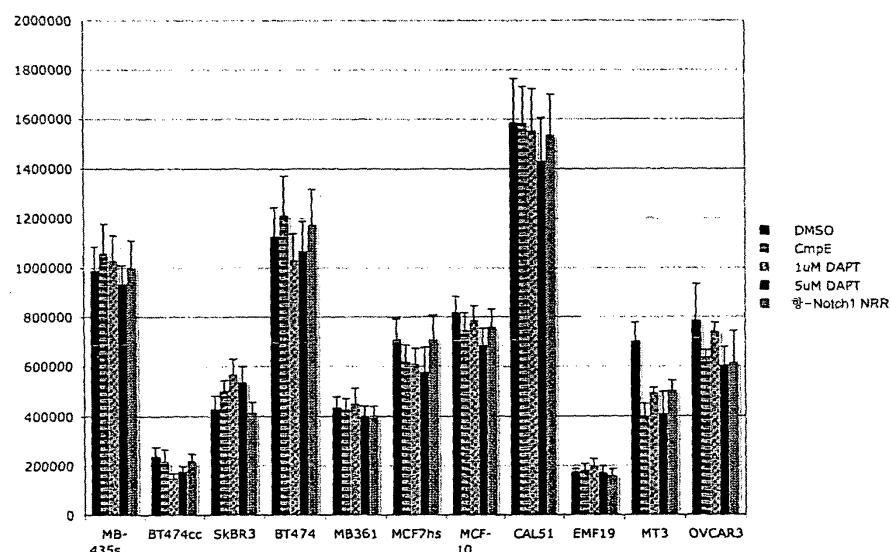
도면16a



도면16b



도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc. et al.

<120> Anti-Notch1 NRR Antibodies and Methods Using Same

<130> 50474/013W03

<150> US 60/994,646

<151> 2007-09-20

<150> US 60/933,072

<151> 2007-06-04

<160> 65

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 2

Ala Arg Ile Asn Pro Ser Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 3

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 4

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Arg Ser Asn Gln Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 5

Ala Arg Ile Asn Pro Ala Asn Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 6

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 8

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 9

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Ala Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 11

Gln Gln Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Thr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 12

Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Ala Thr

1 5

<210> 13

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Leu Leu Val Asn Gln Ser His Gln Gly Phe Asn Lys Glu His Thr

1 5 10 15

Ser Lys Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala
20 25 30Ala His Ser Ala Phe Ala Ala Asp Leu Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp
35 40 45

Asp Asp Lys Gly Ser Gly Val Ile Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys

50 55 60

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

Ser Gly Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr Gly

115 120 125

Pro Glu Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro
130 135 140Cys Tyr Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr
145 150 155 160Arg Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
165 170 175

Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Leu

180	185	190
Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala Gly Asn		
195	200	205
Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly		
210	215	220
Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln		
225	230	235
Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln		
245	250	255
Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Arg Ala		
260	265	270
Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe		
275	280	285
Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp		
290	295	300
Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly		
305	310	315
Thr Leu Val Val Val Val Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser		
325	330	335
Ser Phe His Phe Leu Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val		
340	345	350
Val Phe Lys Arg Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr		
355	360	365
Gly Arg Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu		
370	375	380
Gly Trp Ala Ala Pro Asp Ala Leu Leu Gly Gln Val Lys Ala Ser Leu		
385	390	395
Leu Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro		
405	410	415
Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg Gln		
420	425	430

Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala

435

440

445

Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr

450

455

460

Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ala

465

470

475

480

Gln Glu Phe Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly His His His His His

485

490

495

His

<210> 14

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 14

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val

1

5

10

15

Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

20

25

30

Asp Lys Leu Glu Val Ile Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn

35

40

45

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

50

55

60

Arg Cys Pro Ala Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg

65

70

75

80

Thr Cys Gly Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly

85

90

95

Pro Arg Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Ser Phe Thr Gly Pro Glu

100

105

110

Cys Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Val Gly Ser Asn Pro Cys Tyr

115	120	125
Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Asn Pro Phe Tyr Arg Cys		
130	135	140
Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu Asp Tyr		
145	150	155
Ser Phe Thr Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro Gln Ile Glu		
165	170	175
Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala Gly Asn Lys Val		
180	185	190
Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp		
195	200	205
Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys Asn Cys Thr Gln Ser Leu		
210	215	220
Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Ser Gln Cys Asn		
225	230	235
Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly		
245	250	255
Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp		
260	265	270
Gly His Cys Asp Gln Gly Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly		
275	280	285
Leu Asp Cys Ala Glu His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu		
290	295	300
Val Leu Val Val Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe		
305	310	315
His Phe Leu Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe		
325	330	335
Lys Arg Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His		
340	345	350
Glu Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp		
355	360	365

Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg Arg

370	375	380
Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile		
385	390	395
Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala		
405	410	415
Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu		
420	425	430
Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro		

435	440	445
Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ser Gly His His His His His His		
450	455	460
<210> 15		
<211> 23		
<212> PRT		
<213> Artificial		
<220><223> Synthetic		
<400> 15		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys		

20			
<210> 16			
<211> 15			
<212> PRT			
<213>			
Artificial			
<220><223> Synthetic			
<400> 16			

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1	5	10	15
<210> 17			
<211> 32			

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Val Thr Ile

35 40 45

Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

50 55 60

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

85

<210> 20

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

65 70 75 80

Ser

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr

35 40 45

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

50	55	60	
Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
65	70	75	80
<210> 22			
<211> 79			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic			
<400> 22			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
20	25	30	
Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr			
35	40	45	
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala			
50	55	60	
Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
65	70	75	
<210> 23			
<211> 87			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220><223> Synthetic			
<400> 23			
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 Gly Ser Val Ser Trp Ile			
20	25	30	
Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile			
35	40	45	
Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val			

50 55 60
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

85

<210> 24

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 24

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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

65 70 75 80

Ser

<210> 25

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 25

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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 26

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 26

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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

35 40 45

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

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 27

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val

20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Phe Thr Ile
 35 40 45
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 50 55 60
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 85

<210> 28
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic
 <400> 28

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

35 40 45
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 50 55 60
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Ser

<210> 29
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic
 <400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 30

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 31

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val
 20 25 30

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

<210> 32

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 32

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

Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Ser

<210> 33

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 34

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Trp Val

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly

65 70 75 80

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

85

<210> 35

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

65 70 75 80

Ser

<210> 36

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75 80

<210> 37

<211> 79

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys

35 40 45

Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

50 55 60

Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

65 70 75

<210> 38

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 38

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

50 55 60

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 39

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 39

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

20 25 30

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 40

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala

20 25 30

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp

50 55 60

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 41

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 41

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro

20 25 30

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

35 40 45

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp

50 55 60

Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

65 70 75 80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 43

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

1 5 10

<210> 44

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 45

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 46

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 47

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 48

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 48

gatccgatta caaagatgac gatgacaagg gctctggtgt catcaatggc tgcaaaggca 60

ag 62

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 49

cctgcgcggc cgggggcgcc tccacg 26

<210> 50

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 50

cgattacaaa gatgacgatg acaagggctc tgggtgtcatc aatggctgca aaggcaag 58

<210> 51

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 51

aattcctgcg ccggcggggg cggctccacg 30

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 52

Ala Arg Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala

1 5 10

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 53

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 55

<211> 1491

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

atgctactag taaatcagtc acaccaaggc ttcaataagg aacacacaag caagatggta 60

agcgctattg ttttatatgt gctttggcg gcgccggcgc attctgcctt tgcggcggat 120

cttggatccg attacaaga tgacgatgac aagggtctg gtgtcatcaa tggctgcaa 180

ggcaagccct gcaagaatgg gggcacctgc gccgtggcct ccaacaccgc ccgcgggttc 240

atctgcaagt gccctgcggg cttcgaggc gccacgttg agaatgacgc tcgtacctgc 300

ggcagcctgc gctgcctcaa cggcggcaca tgcatctcg gcccgcgcag ccccacctgc 360

ctgtgcctgg gccccttac gggcccccga tgccagttcc cggccagcag cccctgcctg 420

ggcggcaacc cctgctacaa ccaggggacc tgtgagcca catccgagag ccccttctac 480

cgttgcctgt gccccgccaa attcaacggg ctcttgtcc acatcctgga ctacagcttc 540

gggggtgggg ccgggcgcga catcccccg ccgctgatcg aggagggcgtg cgagctgcc 600

gagtgccagg aggacgcggg caacaaggc tgcagcctgc agtgcaacaa ccacgcgtgc 660
 ggctgggacg gccgtgactg ctccctcaac ttcaatgacc cctggaagaa ctgcacgcag 720
 tctctgcagt gctggaagta cttcagtgac ggccactgtg acagccagtg caactcagcc 780
 ggctgcctc tcgacggct tgactgccag cgtgcggaaag gccagtgcaa cccctgtac 840
 gaccagtact gcaaggacca cttcagcgcac gggcactgac accaggcgtg caacagcgc 900
 gagtgcgagt gggacggcgt ggactgtgcg gagcatgtac ccgagaggct ggcggccggc 960
 acgctggtgg tggtggtgct gatgccgccc gagcagctgc gcaacagctc cttccacttc 1020

ctgcgggagc tcagccgcgt gtcgcacacc aacgtggtct tcaagcgtga cgcacacggc 1080
 cagcagatga tctccctca ctacggccgc gaggaggagc tgcgcaagca ccccatcaag 1140
 cgtgccgcg agggctggc cgcacctgac gccctgctgg gccaggtgaa ggcctcgctg 1200
 ctccctggtg gcacgcggg tggcggcgg cggaggagc tggacccat ggacgtccgc 1260
 ggctccatcg tctacctgga gattgacaac cggcagtgtg tgcaggcctc ctcgcagtgc 1320
 ttccagagtgc ccacgcgt ggccgcattc ctggagcgc tcgcctcgct gggcagcctc 1380
 aacatcccatacaagatcga ggccgtgcag agtgagaccg tggagccgccc cccgcggcgc 1440

caggaattcg gtctggttcc gcgtggcagc ggtcatcacc atcaccatca c 1491

<210> 56

<211> 2555

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Met Pro Pro Leu Leu Ala Pro Leu Leu Cys Leu Ala Leu Leu Pro Ala

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Gly Pro Arg Cys Ser Gln Pro Gly Glu Thr Cys Leu

20 25 30

Asn Gly Gly Lys Cys Glu Ala Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys

35 40 45

Gly Gly Ala Phe Val Gly Pro Arg Cys Gln Asp Pro Asn Pro Cys Leu

50 55 60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp Arg Arg

65 70 75 80

Gly Val Ala Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Ala Leu Gly Phe Ser Gly Pro

85 90 95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Thr Asn Pro Cys Arg

100 105 110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg

115 120 125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys

130 135 140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ala

145 150 155 160

Ser Tyr Ile Cys His Cys Pro Pro Ser Phe His Gly Pro Thr Cys Arg

165 170 175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Gly Gln Lys Pro Gly Leu Cys Arg His Gly

180 185 190

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

195 200 205

Thr His Thr Gly Pro Asn Cys Glu Arg Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro

210 215 220

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Val Thr

225 230 235 240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Thr Gly Gln Asn Cys Glu Glu

245 250 255

Asn Ile Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys

260 265 270

Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr

275 280 285

Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn

290 295 300

Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn

305 310 315 320

Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile

325	330	335
Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe His Gly Ala Thr Cys His Asp		
340	345	350
Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu		
355	360	365
Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly		
370	375	380
Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys		
385	390	395
395 400		
Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys		
405	410	415
Ser Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Ile Asn Thr		
420	425	430
Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg		
435	440	445
Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Val Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp		
450	455	460
Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro		
465	470	475
475 480		
Gly Tyr Glu Gly Val His Cys Glu Val Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser		
485	490	495
Ser Pro Cys Leu His Asn Gly Arg Cys Leu Asp Lys Ile Asn Glu Phe		
500	505	510
Gln Cys Glu Cys Pro Thr Gly Phe Thr Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp		
515	520	525
Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu		
530	535	540
Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly		
545	550	555
555 560		
Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His		
565	570	575

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Arg
 580 585 590
 Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ser
 595 600 605
 Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ala
 610 615 620

Tyr Leu Cys Phe Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
 625 630 635 640
 Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Ser Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
 645 650 655
 Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
 660 665 670
 Ser Met Cys Asn Ile Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Asn Pro Cys His
 675 680 685

Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Asn Gly Phe Thr Cys Arg Cys
 690 695 700
 Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
 705 710 715 720
 Asn Ser Asn Pro Cys Val His Gly Ala Cys Arg Asp Ser Leu Asn Gly
 725 730 735
 Tyr Lys Cys Asp Cys Asp Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile
 740 745 750

Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys
 755 760 765
 Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser
 770 775 780
 Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
 785 790 795 800
 Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn
 805 810 815
 Cys Leu Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro

820	825	830
Cys Ala Pro Ser Pro Cys Arg Asn Gly Gly Glu Cys Arg Gln Ser Glu		
835	840	845
Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln		
850	855	860
Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Leu Ser Pro Cys Arg His		
865	870	875
880		
Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr His Gly Tyr Arg Cys His Cys Gln		
885	890	895
Ala Gly Tyr Ser Gly Arg Asn Cys Glu Thr Asp Ile Asp Asp Cys Arg		
900	905	910
Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr		
915	920	925
Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Arg Gly Thr Phe Cys Glu Glu		
930	935	940
Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asp Pro Cys Arg Asn Gly Ala Asn Cys		
945	950	955
960		
Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser		
965	970	975
Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys		
980	985	990
Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu		
995	1000	1005
Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln His Asp Val Asn		
1010	1015	1020
Glu Cys Asp Ser Gln Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp		
1025	1030	1035
Gly Cys Gly Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly		
1040	1045	1050
Pro Asn Cys Gln Asn Leu Val His Trp Cys Asp Ser Ser Pro Cys		
1055	1060	1065

Lys Asn Gly Gly Lys Cys Trp Gln Thr His Thr Gln Tyr Arg Cys
 1070 1075 1080
 Glu Cys Pro Ser Gly Trp Thr Gly Leu Tyr Cys Asp Val Pro Ser
 1085 1090 1095
 Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Arg Gln Gly Val Asp Val Ala
 1100 1105 1110
 Arg Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Ala Gly Asn Thr
 1115 1120 1125

His His Cys Arg Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140
 Asp Leu Val Asp Glu Cys Ser Pro Ser Pro Cys Gln Asn Gly Ala
 1145 1150 1155
 Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Tyr Ser Cys Lys Cys Val Ala
 1160 1165 1170
 Gly Tyr His Gly Val Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asp Glu Cys Leu
 1175 1180 1185

Ser His Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu Asp Leu Pro Asn
 1190 1195 1200
 Thr Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys
 1205 1210 1215
 Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys Asn Pro Pro Val Asp Pro Val Ser
 1220 1225 1230
 Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
 1235 1240 1245

Gly Gly Tyr Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg
 1250 1255 1260
 Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Asp Ala
 1265 1270 1275
 Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys
 1280 1285 1290
 Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile

1295	1300	1305
Asn Gly Cys Lys Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Thr Cys Ala		
1310	1315	1320
Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Lys Cys Pro Ala		
1325	1330	1335
Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg Thr Cys Gly		
1340	1345	1350
Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly Pro Arg		
1355	1360	1365
Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Pro Phe Thr Gly Pro Glu Cys		
1370	1375	1380
Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Leu Gly Gly Asn Pro Cys Tyr		
1385	1390	1395
Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Ser Pro Phe Tyr Arg		
1400	1405	1410
Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu		
1415	1420	1425
Asp Tyr Ser Phe Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro		
1430	1435	1440
Leu Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Glu Asp Ala		
1445	1450	1455
Gly Asn Lys Val Cys Ser Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly		
1460	1465	1470
Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys		
1475	1480	1485
Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly		
1490	1495	1500
His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly		
1505	1510	1515
Phe Asp Cys Gln Arg Ala Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp		
1520	1525	1530

Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly

1535 1540 1545

Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu

1550 1555 1560

His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Val Val Val

1565 1570 1575

Leu Met Pro Pro Glu Gln Leu Arg Asn Ser Ser Phe His Phe Leu

1580 1585 1590

Arg Glu Leu Ser Arg Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg

1595 1600 1605

Asp Ala His Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Arg Glu

1610 1615 1620

Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gly Trp

1625 1630 1635

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

1640 1645 1650

Pro Gly Gly Ser Glu Gly Gly Arg Arg Arg Arg Glu Leu Asp Pro

1655 1660 1665

Met Asp Val Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu Glu Ile Asp Asn Arg

1670 1675 1680

Gln Cys Val Gln Ala Ser Ser Gln Cys Phe Gln Ser Ala Thr Asp

1685 1690 1695

Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu Asn

1700 1705 1710

Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Gln Ser Glu Thr Val Glu Pro

1715 1720 1725

Pro Pro Pro Ala Gln Leu His Phe Met Tyr Val Ala Ala Ala Ala

1730 1735 1740

Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly Val Leu Leu Ser Arg

1745 1750 1755

Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu Gly Phe

1760	1765	1770
Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu Gly		
1775	1780	1785
Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly		
1790	1795	1800
Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu		
1805	1810	1815
Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp		
1820	1825	1830
Leu Asp Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu		
1835	1840	1845
Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro		
1850	1855	1860
Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly		
1865	1870	1875
Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly		
1880	1885	1890
Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala		
1895	1900	1905
Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln		
1910	1915	1920
Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr		
1925	1930	1935
Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu Glu Ala Ser Ala Asp		
1940	1945	1950
Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr Pro Leu His Ala Ala		
1955	1960	1965
Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile Leu Ile Arg Asn		
1970	1975	1980
Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly Thr Thr Pro		
1985	1990	1995

Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu Glu Asp
 2000 2005 2010
 Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu Gly
 2015 2020 2025

Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala
 2030 2035 2040
 Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln Asn
 2045 2050 2055
 Asn Arg Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser
 2060 2065 2070
 Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp
 2075 2080 2085

Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu
 2090 2095 2100
 Arg Met His His Asp Ile Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu
 2105 2110 2115
 Val Arg Ser Pro Gln Leu His Gly Ala Pro Leu Gly Gly Thr Pro
 2120 2125 2130
 Thr Leu Ser Pro Pro Leu Cys Ser Pro Asn Gly Tyr Leu Gly Ser
 2135 2140 2145

Leu Lys Pro Gly Val Gln Gly Lys Lys Val Arg Lys Pro Ser Ser
 2150 2155 2160
 Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu Ala Lys Asp Leu Lys Ala
 2165 2170 2175
 Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys Gly Cys Leu Leu Asp Ser
 2180 2185 2190
 Ser Gly Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu Glu Ser Pro His Gly
 2195 2200 2205

Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu Leu Pro Ser Pro Phe
 2210 2215 2220
 Gln Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Asn His Leu Pro Gly Met Pro

2225	2230	2235
Asp Thr His Leu Gly Ile Gly His Leu Asn Val Ala Ala Lys Pro		
2240	2245	2250
Glu Met Ala Ala Leu Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu Thr		
2255	2260	2265
Gly Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr Ser		
2270	2275	2280
Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr Val		
2285	2290	2295
Gly Gly Ser Thr Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser Arg		
2300	2305	2310
Leu Gln Ser Gly Met Val Pro Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Gly		
2315	2320	2325
Ser Val Ala Pro Gly Pro Leu Ser Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln		
2330	2335	2340
His Gly Met Val Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ala		
2345	2350	2355
Leu Ser Gln Met Met Ser Tyr Gln Gly Leu Pro Ser Thr Arg Leu		
2360	2365	2370
Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln		
2375	2380	2385
Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln Asn Leu Gln Pro Ala Asn Ile Gln		
2390	2395	2400
Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro His		
2405	2410	2415
Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly His Leu Gly Arg Ser Phe		
2420	2425	2430
Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val Gln Pro Leu Gly Pro		
2435	2440	2445
Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln Glu Ser Pro Ala		
2450	2455	2460

Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro Val Thr Ala
 2465 2470 2475
 Ala Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser Ser Pro
 2480 2485 2490
 Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His Pro
 2495 2500 2505

Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser
 2510 2515 2520
 Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser
 2525 2530 2535
 Pro Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala
 2540 2545 2550

Phe Lys

2555

<210> 57

<211> 2531

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Met Pro Arg Leu Leu Thr Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala

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

Ser Gly Ala Phe Val Gly Gln Arg Cys Gln Asp Ser Asn Pro Cys Leu
 50 55 60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp His Gly

65 70 75 80
 Gly Thr Val Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Pro
 85 90 95
 Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Ala Asn Pro Cys Arg

100	105	110	
Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg			
115	120	125	
Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys			
130	135	140	
Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ser			
145	150	155	160
Ser Tyr Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe His Gly Pro Thr Cys Arg			
165	170	175	
Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly			
180	185	190	
Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala			
195	200	205	
Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro			
210	215	220	
Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr			
225	230	235	240
His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu			
245	250	255	
Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys			
260	265	270	
Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr			
275	280	285	
Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn			
290	295	300	
Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn			
305	310	315	320
Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile			
325	330	335	
Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp			
340	345	350	

Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365
 Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380
 Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
 385 390 395 400
 Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415
 Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
 420 425 430
 Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
 435 440 445
 Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Ile Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
 450 455 460
 Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
 465 470 475 480
 Gly Tyr Glu Gly Val Tyr Cys Glu Ile Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
 485 490 495
 Ser Pro Cys Leu His Asn Gly His Cys Met Asp Lys Ile Asn Glu Phe
 500 505 510
 Gln Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Asn Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
 515 520 525
 Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
 530 535 540
 Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
 545 550 555 560
 Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
 565 570 575
 Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Gln
 580 585 590
 Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys His

595	600	605	
Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ser			
610	615	620	
Tyr Leu Cys Leu Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile			
625	630	635	640
Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu			
645	650	655	
Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly			
660	665	670	
Ser Met Cys Asn Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Ser Pro Cys His			
675	680	685	
Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Ala Gly Phe Thr Cys Arg Cys			
690	695	700	
Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys			
705	710	715	720
Asn Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Ala Cys Arg Asp Gly Leu Asn Gly			
725	730	735	
Tyr Lys Cys Asp Cys Ala Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile			
740	745	750	
Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys			
755	760	765	
Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser			
770	775	780	
Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys			
785	790	795	800
Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn			
805	810	815	
Cys Pro Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro			
820	825	830	
Cys Ala Thr Ser Pro Cys Lys Asn Ser Gly Val Cys Lys Glu Ser Glu			
835	840	845	

Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln

850 855 860

Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Pro Cys Arg His

865 870 875 880

Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Gln

885 890 895

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

900 905 910

Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr

915 920 925

Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Gln Gly Ala Phe Cys Glu Glu

930 935 940

Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys

945 950 955 960

Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Val Gly Phe Asn

965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys

980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu

995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn

1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp

1025 1030 1035

Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly

1040 1045 1050

Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys

1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys

1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val Asn Cys Asp Val Leu Ser

1085	1090	1095
Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Lys Arg Gly Ile Asp Val Thr		
1100	1105	1110
Leu Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Glu Gly Asp Lys		
1115	1120	1125
His Tyr Cys His Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu		
1130	1135	1140
Asp Glu Val Asp Glu Cys Ser Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala		
1145	1150	1155
Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Phe Ser Cys Lys Cys Val Ala		
1160	1165	1170
Gly Tyr His Gly Ser Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Cys Leu		
1175	1180	1185
Ser Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile Asp Leu Thr Asn		
1190	1195	1200
Ser Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys		
1205	1210	1215
Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys His Pro Pro Leu Asp Pro Ala Ser		
1220	1225	1230
Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val		
1235	1240	1245
Gly Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg		
1250	1255	1260
Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Asp Pro		
1265	1270	1275
Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys		
1280	1285	1290
Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile		
1295	1300	1305
Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Val Cys Ala		
1310	1315	1320

Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Ala

1325	1330	1335
Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys	Glu Asn Asp Ala Arg	Thr Cys Gly
1340	1345	1350
Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly	Gly Thr Cys Ile Ser	Gly Pro Arg
1355	1360	1365
Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu	Gly Ser Phe Thr Gly	Pro Glu Cys
1370	1375	1380
Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro	Cys Val Gly Ser Asn	Pro Cys Tyr

1385	1390	1395
Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro	Thr Ser Glu Asn Pro	Phe Tyr Arg
1400	1405	1410
Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe	Asn Gly Leu Leu Cys	His Ile Leu
1415	1420	1425
Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Gly	Ala Gly Arg Asp Ile	Pro Pro Pro
1430	1435	1440
Gln Ile Glu Glu Ala Cys Glu	Leu Pro Glu Cys Gln	Val Asp Ala

1445	1450	1455
Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu	Gln Cys Asn Asn His	Ala Cys Gly
1460	1465	1470
Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser	Leu Asn Phe Asn Asp	Pro Trp Lys
1475	1480	1485
Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln	Cys Trp Lys Tyr Phe	Ser Asp Gly
1490	1495	1500
His Cys Asp Ser Gln Cys Asn	Ser Ala Gly Cys Leu	Phe Asp Gly

1505	1510	1515
Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu	Gly Gln Cys Asn Pro	Leu Tyr Asp
1520	1525	1530
Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe	Ser Asp Gly His Cys	Asp Gln Gly
1535	1540	1545
Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu	Trp Asp Gly Leu Asp	Cys Ala Glu

1550	1555	1560
His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val Val		
1565	1570	1575
Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu		
1580	1585	1590
Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg		
1595	1600	1605
Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu		
1610	1615	1620
Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp		
1625	1630	1635
Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg		
1640	1645	1650
Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu		
1655	1660	1665
Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe		
1670	1675	1680
Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser		
1685	1690	1695
Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser		
1700	1705	1710
Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr		
1715	1720	1725
Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly		
1730	1735	1740
Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp		
1745	1750	1755
Phe Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg		
1760	1765	1770
Arg Glu Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys		
1775	1780	1785

Asn Ala Ser Asp Gly Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp
 1790 1795 1800
 Gly Asp Glu Asp Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro

 1805 1810 1815
 Val Val Leu Pro Asp Leu Ser Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp
 1820 1825 1830
 Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met
 1835 1840 1845
 Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp
 1850 1855 1860
 Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala

 1865 1870 1875
 Ser Cys Ser Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu
 1880 1885 1890
 Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala
 1895 1900 1905
 Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His
 1910 1915 1920
 Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu

 1925 1930 1935
 Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr
 1940 1945 1950
 Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln
 1955 1960 1965
 Ile Leu Leu Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His
 1970 1975 1980
 Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu

 1985 1990 1995
 Gly Met Leu Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala
 2000 2005 2010
 Val Asp Asp Leu Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val

2015	2020	2025
Asn Asn Val Asp Ala Ala Val	Val Leu Leu Lys Asn	Gly Ala Asn
2030	2035	2040
Lys Asp Met Gln Asn Asn Lys	Glu Glu Thr Pro Leu	Phe Leu Ala
2045	2050	2055
Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu	Thr Ala Lys Val Leu	Leu Asp His
2060	2065	2070
Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr	Asp His Met Asp Arg	Leu Pro Arg
2075	2080	2085
Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met	His His Asp Ile Val	Arg Leu Leu
2090	2095	2100
Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg	Ser Pro Gln Leu His	Gly Thr Ala
2105	2110	2115
Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu	Ser Pro Thr Leu Cys	Ser Pro Asn
2120	2125	2130
Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Lys	Ser Ala Thr Gln Gly	Lys Lys Ala
2135	2140	2145
Arg Lys Pro Ser Thr Lys Gly	Leu Ala Cys Gly Ser	Lys Glu Ala
2150	2155	2160
Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg	Lys Lys Ser Gln Asp	Gly Lys Gly
2165	2170	2175
Cys Leu Leu Asp Ser Ser Ser	Met Leu Ser Pro Val	Asp Ser Leu
2180	2185	2190
Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu	Ser Asp Val Ala Ser	Pro Pro Leu
2195	2200	2205
Leu Pro Ser Pro Phe Gln Gln	Ser Pro Ser Met Pro	Leu Ser His
2210	2215	2220
Leu Pro Gly Met Pro Asp Thr	His Leu Gly Ile Ser	His Leu Asn
2225	2230	2235
Val Ala Ala Lys Pro Glu Met	Ala Ala Leu Ala Gly	Gly Ser Arg
2240	2245	2250

Leu Ala Phe Glu Pro Pro Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val
 2255 2260 2265
 Ala Ser Ser Ala Ser Thr Val Leu Ser Thr Asn Gly Thr Gly Ala
 2270 2275 2280
 Met Asn Phe Thr Val Gly Ala Pro Ala Ser Leu Asn Gly Gln Cys

 2285 2290 2295
 Glu Trp Leu Pro Arg Leu Gln Asn Gly Met Val Pro Ser Gln Tyr
 2300 2305 2310
 Asn Pro Leu Arg Pro Gly Val Thr Pro Gly Thr Leu Ser Thr Gln
 2315 2320 2325
 Ala Ala Gly Leu Gln His Ser Met Met Gly Pro Leu His Ser Ser
 2330 2335 2340
 Leu Ser Thr Asn Thr Leu Ser Pro Ile Ile Tyr Gln Gly Leu Pro

 2345 2350 2355
 Asn Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln
 2360 2365 2370
 Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Leu Gln Pro Gln Asn Leu Gln Pro
 2375 2380 2385
 Pro Ser Gln Pro His Leu Ser Val Ser Ser Ala Ala Asn Gly His
 2390 2395 2400
 Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val

 2405 2410 2415
 Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Val His Thr Ile Leu Pro
 2420 2425 2430
 Gln Glu Ser Gln Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Met Val
 2435 2440 2445
 Pro Pro Met Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His
 2450 2455 2460
 Ser Tyr Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu

 2465 2470 2475
 Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro

2480	2485	2490
Asp Gln Trp Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp		
2495	2500	2505
Ser Glu Gly Ile Ser Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile		
2510	2515	2520
Thr His Ile Pro Glu Ala Phe Lys		
2525	2530	

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 58

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

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

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

20	25	30
----	----	----

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
----	----	----

Ala Arg Ile Asn Pro Ser Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Pro Asn Gly Ser Ala His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

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

115

<210> 61
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 61
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 62
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic
 <400> 62

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

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

<210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic
 <400> 63

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Asn Pro Ala Asn Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Gly Phe Arg Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 65

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105