



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0044441
(43) 공개일자 2018년05월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7011474(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년02월28일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7025770
원출원일자(국제) 2011년02월28일
심사청구일자 2016년02월26일
- (85) 번역문제출일자 2018년04월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/026489
- (87) 국제공개번호 WO 2011/109298
국제공개일자 2011년09월09일
- (30) 우선권주장
61/309,494 2010년03월02일 미국(US)
- (71) 출원인
애브비 인코포레이티드
미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건 로드 1
- (72) 발명자
리 잉춘
미국 일리노이주 60089 버팔로 그로브 뉴필드 드라이브 103
구 지지에 제임스
미국 매사추세츠주 01545 슈루즈버리 크림슨 드라이브 19
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 117 항

(54) 발명의 명칭 치료학적 DLL4 결합 단백질

(57) 요약

항체, CDR-이식된 항체, 사람화된 항체, 및 이의 DLL4 결합 단편, 고 친화성으로 DLL4에 결합하는 단백질, 및 DLL4 및/또는 VEGF 활성을 중화하는 DLL4 결합 단백질을 포함하는 DLL4 결합 단백질이 본원에 기술되어 있다. DLL4 결합 단백질은 암 및 종양을 치료하거나 예방하고, 특히 중앙 혈관형성을 치료하거나 예방하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/18 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/435 (2013.01)
C07K 14/475 (2013.01)
C07K 14/54 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/24 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)

(72) 발명자

모르간-라페 수잔

미국 일리노이주 60656 시카고 노스 캔필드 애비뉴
5419

천 밍주

미국 델라웨어주 19808 월링턴 바베리 드라이브
232

시에 충-밍

미국 메사추세츠주 02459 뉴턴 올데 필드 로드 22

명세서

청구범위

청구항 1

DLL4에 결합할 수 있는 단백질로서,

서열 번호 157, 서열 번호 158, 서열 번호 159, 서열 번호 160, 서열 번호 161, 서열 번호 162, 서열 번호 163, 및 서열 번호 164로 이루어진 아미노산 서열의 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는, DLL4에 결합할 수 있는 결합 단백질.

청구항 2

적어도 하나의 CDR을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는, 사람 DLL4에 결합할 수 있는 결합 단백질로서, 여기서:

CDR-H1이:

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 (서열 번호 151)(여기서;

X_1 은 N, H, 또는 Y이고;

X_2 는 F이며;

X_3 은 P이고;

X_4 는 M이며;

X_5 는 A 또는 S이다);

서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 38H12);

서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 37D10);

서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 32C7);

서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14G1);

서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14A11);

서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 15D6);

서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 1A11);

서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1a 1A11);

서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 1A11);

서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 1A11);

서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 38H12);

서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1A 38H12);

서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 38H12);

서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);

서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11VH.1);

서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A6);

서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A8);

서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.C6);
 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A11);
 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.B5);
 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.E12);
 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.G3);
 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.F5); 및
 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
 CDR-H2가:

$X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$ (서열 번호 152)(여기서;

X_1 은 T 또는 S이고;

X_2 는 I이며;

X_3 은 S이고;

X_4 는 S 또는 G이며;

X_5 는 S이고;

X_6 은 D이며;

X_7 은 G, A, D, S, 또는 E이고;

X_8 은 T 또는 W이며;

X_9 는 T, P, 또는 A이고;

X_{10} 은 Y, S, T, 또는 N이며;

X_{11} 은 Y 또는 I이고;

X_{12} 는 R 또는 G이며;

X_{13} 은 D이고;

X_{14} 는 S이며;

X_{15} 는 V이고;

X_{16} 은 K이며;

X_{17} 은 G이다);

서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 38H12);

서열 번호 161의 50 내지 68번 잔기(CDR-H2 37D10);

서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 32C7);

서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14G1);

서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14A11);

서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 15D6);

서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 1A11);
 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1a 1A11);
 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 1A11);
 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 1A11);
 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 38H12);
 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1A 38H12);
 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);
 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11VH.1);
 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A6);
 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A8);
 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.C6);
 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A11);
 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.B5);
 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.E12);
 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.G3);
 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.F5); 및
 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;
 CDR-H3이:
 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9$ (서열 번호 153)(여기서;
 X_1 은 G이고;
 X_2 는 Y이며;
 X_3 은 Y이고;
 X_4 는 N이며;
 X_5 는 S이고;
 X_6 은 P이며;
 X_7 은 F이고;
 X_8 은 A이며;
 X_9 는 Y, F, 또는 S이다);
 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 38H12);
 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기(CDR-H3 37D10);
 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 32C7);
 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 14G1);
 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 14A11);

서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 15D6);

서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 1A11);

서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1a 1A11);

서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 1A11);

서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 1A11);

서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 38H12);

서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1A 38H12);

서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);

서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);

서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11VH.1);

서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A6);

서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A8);

서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.C6);

서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A11);

서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.B5);

서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.E12);

서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.G3);

서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.F5); 및

서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

CDR-L1이:

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (서열 번호 154)(여기서;

X_1 은 R이고;

X_2 는 A이며;

X_3 은 S이고;

X_4 는 E 또는 Q이며;

X_5 는 D 또는 E이고;

X_6 은 I이며;

X_7 은 Y 또는 W이고;

X_8 은 S, I, Y, N, 또는 R이며;

X_9 는 N이고;

X_{10} 은 L이며;

X_{11} 은 A이다);

서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 38H12);

서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 37D10);
 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 32C7);
 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 14G1);
 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 14A11);
 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 15D6);
 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 1A11);
 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 1A11);
 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 1A11);
 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 1A11);
 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 38H12);
 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 38H12);
 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 38H12);
 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 38H12);
 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11VL.1);
 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A2);
 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A12);
 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A7);
 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B4);
 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B5); 및
 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;
 CDR-L2가:

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (서열 번호 155)(여기서;

X_1 은 D이고;

X_2 는 T이며;

X_3 은 N 또는 S이고;

X_4 는 N, D, S, I, Y, 또는 V이며;

X_5 는 L이고;

X_6 은 A이며;

X_7 은 D이다);

서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 38H12);
 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 37D10);
 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 32C7);
 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 14G1);
 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 14A11);

서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 15D6);
 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 1A11);
 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 1A11);
 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 1A11);
 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 1A11);
 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 38H12);
 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 38H12);
 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 38H12);
 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 38H12);
 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11VL.1);
 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A2);
 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A12);
 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A7);
 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B4);
 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B5); 및
 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
 CDR-L3이:

X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (서열 번호 156)(여기서;

X_1 은 Q이고;

X_2 는 Q이며;

X_3 은 Y이고;

X_4 는 N, D, 또는 T이며;

X_5 는 N, Y, 또는 W이고;

X_6 은 Y 또는 V이며;

X_7 은 P이고;

X_8 은 P이며;

X_9 는 T이다);

서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 38H12);

서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 37D10);

서열 번호 164의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 32C7);

서열 번호 166의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 14G1);

서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 14A11);

서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 15D6);

서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 1A11);

서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 1A11);
 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 1A11);
 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 1A11);
 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 38H12);
 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 38H12);
 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 38H12);
 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 38H12);
 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11VL.1);
 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A2);
 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A12);
 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A7);
 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B4);
 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B5); 및
 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 적어도 하나의 CDR이 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 38H12); 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 38H12); 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 38H12); 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 38H12); 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 38H12); 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 38H12); 서열 번호 159의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 1A11); 서열 번호 159의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 1A11); 서열 번호 159의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 1A11); 서열 번호 160의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 1A11); 서열 번호 160의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 1A11); 서열 번호 160의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 1A11); 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 37D10); 서열 번호 161의 50 내지 68번 잔기(CDR-H2 37D10); 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기(CDR-H3 37D10); 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 37D10); 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 37D10); 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 37D10); 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 32C7); 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 32C7); 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 32C7); 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 32C7); 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 32C7); 서열 번호 164의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 32C7); 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14G1); 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14G1); 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 14G1); 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 14G1); 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 14G1); 서열 번호 166의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 14G1); 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14A11); 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14A11); 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 14A11); 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 14A11); 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 14A11); 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 14A11); 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 15D6); 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 15D6); 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 15D6); 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 15D6); 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 15D6); 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 15D6); 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 1A11); 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 1A11); 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 1A11); 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1a 1A11); 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1a 1A11); 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1a 1A11); 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 1A11); 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 1A11); 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 1A11); 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 1A11); 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 1A11); 서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 1A11); 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 1A11); 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 1A11); 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 1A11); 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 1A11); 서열 번호 176의

50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 1A11); 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 1A11); 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 1A11); 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 1A11); 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 1A11); 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 1A11); 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 1A11); 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 1A11); 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 38H12); 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 38H12); 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 38H12); 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1A 38H12); 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1A 38H12); 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1A 38H12); 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 38H12); 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12); 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 38H12); 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12); 서열 번호 182의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 38H12); 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 38H12); 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 38H12); 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 38H12); 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 38H12); 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 38H12); 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 38H12); 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 38H12); 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 38H12); 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 38H12); 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 38H12); 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 38H12); 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 38H12); 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 38H12); 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11VH.1), 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11VH.1); 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11VH.1); 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A6), 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A6); 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A6); 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A8), 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A8); 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A8); 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.C6), 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.C6); 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.C6); 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A11), 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A11); 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A11); 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.B5), 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.B5); 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.B5); 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.E12), 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.E12); 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.E12); 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.G3), 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.G3); 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.G3); 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.F5), 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.F5); 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.F5); 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.H2), 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.H2); 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.H2); 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11VL.1), 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11VL.1); 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11VL.1); 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A2), 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A2); 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A2); 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A12), 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A12); 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A12); 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A7), 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A7); 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A7); 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B4), 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B4); 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B4); 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B5), 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B5); 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B5); 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.E12), 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.E12); 및 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 적어도 3개의 CDR을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 적어도 3개의 CDR이:

VH 38H12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기

VL 38H12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기

VH 1A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 159의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 159의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 159의 99 내지 107번 잔기

VL 1A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 160의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 160의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 160의 89번 내지 97번 잔기

VH 37D10 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 161의 50 내지 68번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기

VL 37D10 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기

VH 32C7 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기

VL 32C7 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 164의 89 내지 98번 잔기

VH 14G1 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기

VL 14G1 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 166의 89 내지 97번 잔기

VH 14A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기

VL 14A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기

VH 15D6 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기

VL 15D6 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기

VH VH.1 1A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기

VH VH.1a 1A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기

VH VH.1b 1A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기

VH VH.2a 1A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기

VL VL.1 1A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기

VL VL.1a 1A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기

VL VL.1b 1A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기

VL VL.2a 1A11 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기

VH VH.1 38H12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기

VH VH.1a 38H12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기

VH VH.1b 38H12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기

VH VH.2a 38H12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 182의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기

VL VL.1 38H12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기

VL VL.1a 38H12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기

VL VL.1b 38H12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기

VL VL.2a 38H12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기

VH hA11VH.1 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.A6 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.A8 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.C6 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.A11 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.B5 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기

CDR-H2: 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기

CDR-H3: 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.E12 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.G3 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.F5 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기

VH hA11.H2 CDR 세트

CDR-H1: 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기
 CDR-H2: 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기
 CDR-H3: 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기

VL h1A11VL.1 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기

VL h1A11.A2 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기

VL h1A11.A12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기

VL h1A11.A7 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기

VL h1A11.B4 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기
 CDR-L2: 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기
 CDR-L3: 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기

VL h1A11.B5 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기

및

VL h1A11.E12 CDR 세트

CDR-L1: 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기

CDR-L2: 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기

CDR-L3: 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 도메인 CDR 세트로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 적어도 2개의 가변 도메인 CDR 세트로부터의 CDR을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 적어도 2개의 가변 도메인 CDR 세트가:

VH 38H12 CDR 세트 및 VL 38H12 CDR 세트,

VH 1A11 CDR 세트 및 VL 1A11 CDR 세트,

VH 37D10 CDR 세트 및 VL 37D10 CDR 세트,

VH 32C7 CDR 세트 및 VL 32C7 CDR 세트,

VH 14G1 세트 및 VL 14G1 CDR 세트,

VH 14A11 CDR 세트 및 VL 14A11 CDR 세트,

VH 15D6 CDR 세트 및 VL 15D6 CDR 세트,

VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,

VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,

VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,

VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,

VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,

VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,

VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,

VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,

VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,

VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,

VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,

VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,

VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,

VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,

VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,
 VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,
 VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
 VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
 VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
 VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
 VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
 VH h1A11.A6 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
 VH h1A11.C6 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
 VH h1A11.A11 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
 VH h1A11.A8 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
 VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.B4 CDR 세트,
 VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A7 CDR 세트,
 VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A12 CDR 세트,
 VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A2 CDR 세트,
 VH h1A11.B5 CDR 세트 및 VL h1A11.B5 CDR 세트,
 VH h1A11.E12 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트,
 VH h1A11.G3 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트,
 VH h1A11.F5 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트, 및
 VH h1A11.H2 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR 세트의 쌍인, 결합 단백질.

청구항 8

제4항에 있어서, 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함하는, 결합 단백질.

청구항 9

제5항에 있어서, 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함하는, 결합 단백질.

청구항 10

제6항에 있어서, 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함하는, 결합 단백질.

청구항 11

제7항에 있어서, 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함하는, 결합 단백질.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 표 3 및 표 4에 나열된 수용체 서열의 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 표 3 및 표 4에 나열된 수용체 서열의 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 표 3 및 표 4에 나열된 수용체 서열의 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 표 3 및 표 4에 나열된 수용체 서열의 그룹으로부터 선택되는, 결합 단백질.

청구항 16

제8항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 영역 서열내 임의의 골격 서열로부터 선택되는, 결합 단백질:

서열 번호 171 VH.1 1A11	서열 번호 180 VH.1a 38H12	서열 번호 188 VH h1A11.A6	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 172 VH.1a 1A11	서열 번호 181 VH.1b 38H12	서열 번호 189 VH h1A11.A8	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 173 VH.1b 1A11	서열 번호 182 VH.2a 38H12	서열 번호 190 VH h1A11.C6	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 174 VH.2a 1A11	서열 번호 183 VL.1 38H12	서열 번호 191 VH h1A11.A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 175 VL.1 1A11	서열 번호 184 VL.1a	서열 번호 192 VH h1A11.B5	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 176 VL.1a 1A11	서열 번호 185 VL.1b	서열 번호 193 VH h1A11.E12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 177 VL.1b 1A11	서열 번호 186 VL.2a	서열 번호 194 VH h1A11.G3	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 178 VL.2a 1A11	서열 번호 187 VH h1A11VH.1	서열 번호 195 VH h1A11.F5	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 179 VH.1 38H12			

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 영역 서열내 임의의 골격 서열로부터 선택되는, 결합 단백질:

서열 번호 171 VH.1 1A11	서열 번호 180 VH.1a 38H12	서열 번호 188 VH h1A11.A6	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 172 VH.1a 1A11	서열 번호 181 VH.1b 38H12	서열 번호 189 VH h1A11.A8	서열 번호 197 VL h1A11.VL.1
서열 번호 173 VH.1b 1A11	서열 번호 182 VH.2a 38H12	서열 번호 190 VH h1A11.C6	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 174 VH.2a 1A11	서열 번호 183 VL.1 38H12	서열 번호 191 VH h1A11.A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 175 VL.1 1A11	서열 번호 184 VL.1a	서열 번호 192 VH h1A11.B5	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 176 VL.1a 1A11	서열 번호 185 VL.1b	서열 번호 193 VH h1A11.E12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 177 VL.1b 1A11	서열 번호 186 VL.2a	서열 번호 194 VH h1A11.G3	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 178 VL.2a 1A11	서열 번호 187 VH h1A11.VH.1	서열 번호 195 VH h1A11.F5	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 179 VH.1 38H12			

청구항 18

제10항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 영역 서열내 임의의 골격 서열로부터 선택되는, 결합 단백질:

서열 번호 171 VH.1 1A11	서열 번호 180 VH.1a 38H12	서열 번호 188 VH h1A11.A6	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 172 VH.1a 1A11	서열 번호 181 VH.1b 38H12	서열 번호 189 VH h1A11.A8	서열 번호 197 VL h1A11.VL.1
서열 번호 173 VH.1b 1A11	서열 번호 182 VH.2a 38H12	서열 번호 190 VH h1A11.C6	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 174 VH.2a 1A11	서열 번호 183 VL.1 38H12	서열 번호 191 VH h1A11.A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 175 VL.1 1A11	서열 번호 184 VL.1a	서열 번호 192 VH h1A11.B5	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 176 VL.1a 1A11	서열 번호 185 VL.1b	서열 번호 193 VH h1A11.E12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 177 VL.1b 1A11	서열 번호 186 VL.2a	서열 번호 194 VH h1A11.G3	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 178 VL.2a 1A11	서열 번호 187 VH h1A11.VH.1	서열 번호 195 VH h1A11.F5	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 179 VH.1 38H12			

청구항 19

제11항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 영역 서열내 임의의 골격 서열로부터 선택되는, 결합 단백질:

서열 번호 171 VH.1 1A11	서열 번호 180 VH.1a 38H12	서열 번호 188 VH h1A11.A6	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 172 VH.1a 1A11	서열 번호 181 VH.1b 38H12	서열 번호 189 VH h1A11.A8	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 173 VH.1b 1A11	서열 번호 182 VH.2a 38H12	서열 번호 190 VH h1A11.C6	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 174 VH.2a 1A11	서열 번호 183 VL.1 38H12	서열 번호 191 VH h1A11.A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 175 VL.1 1A11	서열 번호 184 VL.1a	서열 번호 192 VH h1A11.B5	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 176 VL.1a 1A11	서열 번호 185 VL.1b	서열 번호 193 VH h1A11.E12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 177 VL.1b 1A11	서열 번호 186 VL.2a	서열 번호 194 VH h1A11.G3	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 178 VL.2a 1A11	서열 번호 187 VH h1A11VH.1	서열 번호 195 VH h1A11.F5	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 179 VH.1 38H12			

청구항 20

제8항에 있어서, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체 골격 서열을 포함하는, 결합 단백질:

중쇄 골격-1 (H-FR1):

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- X_{30} (서열 번호 143)(여기서, X_{30} 은 S, R, 또는 G 이다);

중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

중쇄 골격-3 (H-FR3):

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K- X_{11} -S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C- X_{31} -R(서열 번호 145)(여기서;

X_{11} 은 N 또는 S이고;

X_{31} 은 A 또는 S이다);

중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

경쇄 골격-1 (L-FR1):

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K- X_9 -P-K-L-L-I- X_{15} (서열 번호 148)(여기서;

X_9 은 A 또는 S이고;

X_{15} 은 F 또는 Y이다);

경쇄 골격-3 (L-FR3):

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D- X_{15} -T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

X_{15} 은 F 또는 S이다); 및

경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

청구항 21

제9항에 있어서, 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체 골격 서열을 포함하는, 결합 단백질:

중쇄 골격-1 (H-FR1):

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-X₃₀ (서열 번호 143)(여기서, X₃₀은 S, R, 또는 G 이다);

중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

중쇄 골격-3 (H-FR3):

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R(서열 번호 145)(여기서;

X₁₁은 N 또는 S이고;

X₃₁은 A 또는 S이다);

중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

경쇄 골격-1 (L-FR1):

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-X₁₅ (서열 번호 148)(여기서;

X₉는 A 또는 S이고;

X₁₅은 F 또는 Y이다);

경쇄 골격-3 (L-FR3):

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

X₁₅은 F 또는 S이다); 및

경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

청구항 22

제10항에 있어서, 상기 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체 골격 서열을 포함하는, 결합 단백질:

중쇄 골격-1 (H-FR1):

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-X₃₀ (서열 번호 143)(여기서, X₃₀은 S, R, 또는 G 이다);

중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

중쇄 골격-3 (H-FR3):

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R(서열 번호 145)(여기서;

X₁₁은 N 또는 S이고;

X₃₁은 A 또는 S이다);

중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

경쇄 골격-1 (L-FR1):

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-X₁₅ (서열 번호 148)(여기서;

X_9 는 A 또는 S이고;

X_{15} 은 F 또는 Y이다);

경쇄 골격-3 (L-FR3):

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D- X_{15} -T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

X_{15} 은 F 또는 S이다); 및

경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

청구항 23

제11항에 있어서, 상기 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체 골격 서열을 포함하는, 결합 단백질:

중쇄 골격-1 (H-FR1):

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- X_{30} (서열 번호 143)(여기서, X_{30} 은 S, R, 또는 G 이다);

중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

중쇄 골격-3 (H-FR3):

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K- X_{11} -S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C- X_{31} -R(서열 번호 145)(여기서;

X_{11} 은 N 또는 S이고;

X_{31} 은 A 또는 S이다);

중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

경쇄 골격-1 (L-FR1):

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K- X_9 -P-K-L-L-I- X_{15} (서열 번호 148)(여기서;

X_9 는 A 또는 S이고;

X_{15} 은 F 또는 Y이다);

경쇄 골격-3 (L-FR3):

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D- X_{15} -T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

X_{15} 은 F 또는 S이다); 및

경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

청구항 24

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 사람 수용체 골격 서열 및 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산을 갖는 적어도 하나의 가변 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

서열 번호 171 VH VH.1 1A11	서열 번호 188 VH h1A11.A6
서열 번호 172 VH VH.1a 1A11	서열 번호 189 VH h1A11.A8
서열 번호 173 VH VH.1b 1A11	서열 번호 190 VH h1A11.C6
서열 번호 174 VH VH.2a 1A11	서열 번호 191 VH h1A11.A11
서열 번호 175 VL VL.1 1A11	서열 번호 192 VH h1A11.B5
서열 번호 176 VL VL.1a 1A11	서열 번호 193 VH h1A11.E12
서열 번호 177 VL VL.1b	서열 번호 194 VH h1A11.G3
서열 번호 178 VL VL.2a 1A11	서열 번호 195 VH h1A11.F5
서열 번호 179 VH VH.1 38H12	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 180 VH VH.1a 38H12	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 181 VH VH.1b 38H12	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 182 VH VH.2a 38H12	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 183 VL VL.1 38H12	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 184 VL VL.1a 38H12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 185 VL VL.1b 38H12	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 186 VL VL.2a 38H12	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 187 VH h1A11VH.1	

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 2개의 가변 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

서열 번호 171 및 서열 번호 175 VH.1 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 180 및 서열 번호 186 VH.1a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 176 VH.1 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 183 VH.1b 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 177 VH.1 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 184 VH.1b 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 178 VH.1 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 185 VH.1b 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 175 VH.1a 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 186 VH.1b 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 176 VH.1a 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 183 VH.2a 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 177 VH.1a 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 184 VH.2a 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 178 VH.1a 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 185 VH.2a 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 173 및 서열 번호 175 VH.1b 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 186 VH.2a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 173 및 서열 번호 176 VH.1b 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 188 및 서열 번호 197 h1A11.A6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 177 VH.1b 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 190 및 서열 번호 197 h1A11.C6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 178 VH.1b 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 191 및 서열 번호 197 h1A11.A11 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 175 VH.2a 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 189 및 서열 번호 197 h1A11.A8 VH 및 h1A11 VL.1 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 176 VH.2a 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 187 및 서열 번호 201 h1A11VH.1 및 h1A11.B4 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 177 VH.2a 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 187 및 서열 번호 200 h1A11VH.1 및 h1A11.A7 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 178 VH.2a 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 187 및 서열 번호 199 h1A11VH.1 및 h1A11.A12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 183 VH.1 및 VL.1 38H12 (표 16)	서열 번호 187 및 서열 번호 198 h1A11VH.1 VH 및 h1A11.A2 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 184 VH.1 및 VL.1a 38H12 (표 16)	서열 번호 192 및 서열 번호 202 h1A11.B5 VH 및 h1A11.B5 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 185 VH.1 및 VL.1b 38H12 (표 16)	서열 번호 193 및 서열 번호 203 h1A11.E12 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 186 VH.1 및 VL.2a 38H12 (표 16)	서열 번호 194 및 서열 번호 203 h1A11.G3 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 180 및 서열 번호 183 VH.1a 및 VL.1 38H12 (표 16)	서열 번호 195 및 서열 번호 203 h1A11.F5 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21

서열 번호 180 및 서열 번호 184 VH.1a 및 VL.1a 38H12 (표 16)	서열 번호 196 및 서열 번호 203 h1A11.H2 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 180 및 서열 번호 185 VH.1a 및 VL.1b 38H12 (표 16)	

청구항 26

제8항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이

CDR에 인접한 잔기;

글리코실화 부위 잔기;

드른 잔기;

사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

표준 잔기(canonical residue);

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기;

베르니어 영역(Vernier zone)내 잔기; 및

쇼티아(Chothia)-정의된 가변 중쇄 CDR1과 카바트(Kabat)-정의된 제1 중쇄 골격 사이에 중첩되는 영역내 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 주요 잔기(key residue)에서 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 27

제11항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이

CDR에 인접한 잔기;

글리코실화 부위 잔기;

드른 잔기;

사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

CDR과 상호작용할 수 있는 잔기;

표준 잔기(canonical residue);

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기;

베르니어 영역(Vernier zone)내 잔기; 및

쇼티아(Chothia)-정의된 가변 중쇄 CDR1과 카바트(Kabat)-정의된 제1 중쇄 골격사이에 중첩된 영역내 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 주요 잔기(key residue)에서 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격 서열이

CDR에 인접한 잔기;

글리코실화 부위 잔기;

드른 잔기;

사람 DLL4와 상호작용할 수 있는 잔기;

CDR과 상호작용할 수 있는 잔기;

표준 잔기;

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기;

베르니어 영역내 잔기; 및

쇼티아-정의된 가변 중쇄 CDR1과 카바트-정의된 제1 중쇄 골격 사이에 중첩되는 영역내 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 주요 잔기에서 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 결합 단백질이 컨센서스(consensus) 사람 가변 도메인 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 결합 단백질이 컨센서스 사람 가변 도메인 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 결합 단백질이 컨센서스 사람 가변 도메인 서열을 포함하는, 결합 단백질.

청구항 32

제8항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격이 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 상기 골격의 아미노산 서열이 사람 배선 수용체 골격의 서열에 대해 적어도 65% 동일하며, 사람 배선 수용체 골격과 동일한 적어도 70개의 아미노산 잔기를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 33

제11항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격이 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 상기 골격의 아미노산 서열이 사람 배선 수용체 골격의 서열에 대해 적어도 65% 동일하며, 사람 배선 수용체 골격과 동일한 적어도 70개의 아미노산 잔기를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기 사람 수용체 골격이 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 상기 골격의 아미노산 서열이 사람 배선 수용체 골격의 서열에 대해 적어도 65% 동일하며, 사람 배선 수용체 골격과 동일한 적어도 70개의 아미노산 잔기를 포함하는, 결합 단백질.

청구항 35

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 가변 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

서열 번호 157 VH 38H12	서열 번호 181 VH VH.1b 38H12
서열 번호 158 VL 38H12	서열 번호 182 VH VH.2a 38H12
서열 번호 159 VH 1A11	서열 번호 182 VL VL.1 38H12
서열 번호 160 VL 1A11	서열 번호 184 VL VL.1a 38H12
서열 번호 161 VH 37D10	서열 번호 185 VL VL.1b 38H12
서열 번호 162 VL 37D10	서열 번호 186 VL VL.2a 38H12
서열 번호 163 VH 32C7	서열 번호 187 VH h1A11VH.1
서열 번호 164 VL 32C7	서열 번호 188 VH h1A11.A6
서열 번호 165 VH 14G1	서열 번호 189 VH h1A11.A8
서열 번호 166 VL 14G1	서열 번호 190 VH h1A11.C6
서열 번호 167 VH 14A11	서열 번호 191 VH h1A11.A11
서열 번호 168 VL 14A11	서열 번호 192 VH h1A11.B5
서열 번호 169 VH 15D6	서열 번호 193 VH h1A11.E12
서열 번호 170 VL 15D6	서열 번호 194 VH h1A11.G3
서열 번호 171 VH VH.1 1A11	서열 번호 195 VH h1A11.F5
서열 번호 172 VH VH.1a 1A11	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 173 VH VH.1b 1A11	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 174 VH VH.2a 1A11	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 175 VL VL.1 1A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 176 VL VL.1a 1A11	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 177 VL VL.1b	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 178 VL VL.2a 1A11	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 179 VH VH.1 38H12	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 180 VH VH.1a 38H12	

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 결합 단백질이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 2개의 가변 도메인을 포함하는, 결합 단백질:

서열 번호 157 및 서열 번호 158 38H12	서열 번호 179 및 서열 번호 186 VH.1 및 VL.2a 38H12
서열 번호 159 및 서열 번호 160 1A11	서열 번호 180 및 서열 번호 183 VH.1a 및 VL.1 38H12
서열 번호 161 및 서열 번호 162 37D10	서열 번호 180 및 서열 번호 184 VH.1a 및 VL.1a 38H12
서열 번호 163 및 서열 번호 164 32C7	서열 번호 180 및 서열 번호 185 VH.1a 및 VL.1b 38H12
서열 번호 165 및 서열 번호 166 14G1	서열 번호 180 및 서열 번호 186 VH.1a 및 VL.2a 38H12
서열 번호 167 및 서열 번호 168 14A11	서열 번호 181 및 서열 번호 183 VH.1b 및 VL.1 38H12
서열 번호 169 및 서열 번호 170 15D6	서열 번호 181 및 서열 번호 184 VH.1b 및 VL.1a 38H12
서열 번호 171 및 서열 번호 175 VH.1 및 VL.1 1A11 (표 11)	서열 번호 181 및 서열 번호 185 VH.1b 및 VL.1b 38H12
서열 번호 171 및 서열 번호 176 VH.1 및 VL.1a 1A11	서열 번호 181 및 서열 번호 186 VH.1b 및 VL.2a 38H12
서열 번호 171 및 서열 번호 177 VH.1 및 VL.1b 1A11	서열 번호 182 및 서열 번호 183 VH.2a 및 VL.1 38H12
서열 번호 171 및 서열 번호 178 VH.1 및 VL.2a	서열 번호 182 및 서열 번호 184 VH.2a 및 VL.1a 38H12
서열 번호 172 및 서열 번호 175 VH.1a 및 VL.1	서열 번호 182 및 서열 번호 185 VH.2a 및 VL.1b 38H12
서열 번호 172 및 서열 번호 176 VH.1a 및 VL.1a	서열 번호 182 및 서열 번호 186 VH.2a 및 VL.2a 38H12
서열 번호 172 및 서열 번호 177 VH.1a 및 VL.1b	서열 번호 188 및 서열 번호 197 h1A11.A6 VH 및 h1A11VL.1
서열 번호 172 및 서열 번호 178 VH.1a 및 VL.2a	서열 번호 190 및 서열 번호 197 h1A11.C6 VH 및 h1A11VL.1
서열 번호 173 및 서열 번호 175 VH.1b 및 VL.1	서열 번호 191 및 서열 번호 197 h1A11.A11 VH 및 h1A11VL.1
서열 번호 173 및 서열 번호 176 VH.1b 및 VL.1a	서열 번호 189 및 서열 번호 197 h1A11.A8 VH 및 h1A11 VL.1
서열 번호 173 및 서열 번호 177 VH.1b 및 VL.1b	서열 번호 187 및 서열 번호 201 h1A11VH.1 및 h1A11.B4 VL
서열 번호 173 및 서열 번호 178 VH.1b 및 VL.2a	서열 번호 187 및 서열 번호 200 h1A11VH.1 및 h1A11.A7 VL
서열 번호 174 및 서열 번호 175 VH.2a 및 VL.1	서열 번호 187 및 서열 번호 199 h1A11VH.1 및 h1A11.A12 VL
서열 번호 174 및 서열 번호 176 VH.2a 및 VL.1a	서열 번호 187 및 서열 번호 198 h1A11VH.1 VH 및 h1A11.A2 VL
서열 번호 174 및 서열 번호 177 VH.2a 및 VL.1b	서열 번호 192 및 서열 번호 202 h1A11.B5 VH 및 h1A11.B5 VL

서열 번호 174 및 서열 번호 178 VH.2a 및 VL.2a	서열 번호 193 및 서열 번호 203 h1A11.E12 VH 및 h1A11.E12 VL
서열 번호 179 및 서열 번호 183 VH.1 및 VL.1 38H12	서열 번호 194 및 서열 번호 203 h1A11.G3 VH 및 h1A11.E12 VL
서열 번호 179 및 서열 번호 184 VH.1 및 VL.1a 38H12	서열 번호 195 및 서열 번호 203 h1A11.F5 VH 및 h1A11.E12 VL
서열 번호 179 및 서열 번호 185 VH.1 및 VL.1b 38H12	서열 번호 196 및 서열 번호 203 h1A11.H2 VH 및 h1A11.E12 VL

청구항 37

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치 단백질(Notch protein)과의 DLL4 상호작용을 차단할 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 결합 단백질이 노치-1, 노치-2, 노치-3, 노치-4, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 노치 단백질과의 DLL4 상호작용을 차단할 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 39

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 DLL4의 생물학적 기능을 조절할 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 40

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 DLL4의 생물학적 기능을 중화시킬 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 41

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 VEGFR2 활성화, VEGFR1 활성화, 또는 이들 둘 다를 억제할 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 42

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 이의 수용체에 결합하는 DLL4의 능력을 약화시킬 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 43

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 정상 혈관형성을 억제할 수 있는, DLL4 결합 단백질.

청구항 44

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 적어도 약 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 온 속도 상수(on rate constant: K_{on})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 45

제8항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 적어도 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 온 속도 상수(K_{on})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 46

제24항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 적어도 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 적어도 약 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 및 적어도 약 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 온 속도 상수(K_{on})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 47

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 최대 10^{-3} s^{-1} ; 최대 약 10^{-4} s^{-1} ; 최대 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 최대 약 10^{-6} s^{-1} 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 오프 속도 상수(off rate constant: K_{off})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 48

제8항에 있어서, 상기 결합 단백질이 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 최대 약 10^{-3} s^{-1} ; 최대 약 10^{-4} s^{-1} ; 최대 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 최대 약 10^{-6} s^{-1} 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 오프 속도 상수(K_{off})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 49

제24항에 있어서, 상기 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 최대 약 10^{-3} s^{-1} ; 최대 약 10^{-4} s^{-1} ; 최대 약 10^{-5} s^{-1} ; 및 최대 약 10^{-6} s^{-1} 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 오프 속도 상수(K_{off})를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 50

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M ; 최대 약 10^{-8} M ; 최대 약 10^{-9} M ; 최대 약 10^{-10} M ; 최대 약 10^{-11} M ; 최대 약 10^{-12} M ; 및 최대 10^{-13} M 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 해리 상수(dissociation constant: K_D)를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 51

제8항에 있어서, 상기 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M ; 최대 약 10^{-8} M ; 최대 약 10^{-9} M ; 최대 약 10^{-10} M ; 최대 약 10^{-11} M ; 최대 약 10^{-12} M ; 및 최대 10^{-13} M 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 해리 상수(dissociation constant: K_D)를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 52

제24항에 있어서, 상기 결합 단백질이 최대 약 10^{-7} M ; 최대 약 10^{-8} M ; 최대 약 10^{-9} M ; 최대 약 10^{-10} M ; 최대 약 10^{-11} M ; 최대 약 10^{-12} M ; 및 최대 10^{-13} M 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 대한 해리 상수(dissociation constant: K_D)를 갖는, DLL4 결합 단백질.

청구항 53

제 2 항에 기재된 결합 단백질을 포함하는 항체 작제물로서,

상기 항체 작제물이 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 고정 도메인을 추가로 포함하는, 항체 작제물.

청구항 54

제53항에 있어서,

면역글로불린 분자,

모노클로날 항체,

키메라 항체,

CDR-이식된 항체,

Fab,

Fab',

F(ab')₂,

Fv,

이황화물 결합된 Fv,

scFv,

단일 도메인 항체,
디아바디(diabody),
다특이적인 항체,
이중 특이적인 항체, 및
이특이적인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항체 작제물.

청구항 55

제53항에 있어서, 상기 항체 작제물이

사람 IgM 고정 도메인,

사람 IgG1 고정 도메인,

사람 IgG2 고정 도메인,

사람 IgG3 고정 도메인,

사람 IgG4 고정 도메인,

사람 IgE 고정 도메인, 및

사람 IgA 고정 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 면역글로불린 고정 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 56

제53항에 있어서, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 고정 도메인을 포함하는, 항체 작제물.

청구항 57

제53항 내지 제 56항 중 어느 한 항에 기재된 항체 작제물을 포함하는 항체 접합체로서,

상기 항체 접합체가 영상화제, 치료제, 세포독성제, 및 면역부착 분자로 이루어진 그룹 중에서 선택된 제제를 추가로 포함하는, 항체 접합체.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 제제가 방사성 표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자기 표지, 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 영상화제인, 항체 접합체.

청구항 59

제57항에 있어서, 상기 영상화제가 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방사성 표지인, 항체 접합체.

청구항 60

제57항에 있어서, 상기 제제가 항-대사물질, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관형성제, 항-유사 분열제, 안트라사이클린, 독소, 및 세포자멸사제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 치료제 또는 세포독성제인, 항체 접합체.

청구항 61

제53항에 있어서, 상기 결합 단백질이 사람 글리코실화 패턴을 소유하는, 항체 작제물.

청구항 62

제57항에 있어서, 상기 결합 단백질이 사람 글리코실화 패턴을 소유하는, 항체 접합체.

청구항 63

제4항에 있어서, 상기 결합 단백질이 결정으로서 존재하는, 결합 단백질.

청구항 64

제53항에 있어서, 상기 항체 작제물이 결정으로서 존재하는, 항체 작제물.

청구항 65

제57항에 있어서, 상기 항체 작제물이 결정으로서 존재하는, 항체 접합체.

청구항 66

제63항에 있어서, 상기 결정이 담체를 함유하지 않는 약제학적 제어 방출 결정인, 결합 단백질.

청구항 67

제64항에 있어서, 상기 결정이 담체를 함유하지 않는 약제학적 제어 방출 결정인, 항체 작제물.

청구항 68

제65항에 있어서, 상기 결정이 담체를 함유하지 않는 약제학적 제어 방출 결정인, 항체 접합체.

청구항 69

제63항에 있어서, 상기 결합 단백질 결정이 결합 단백질의 가용성 대응물보다 생체내 반감기가 큰, 결합 단백질.

청구항 70

제64항에 있어서, 상기 항체 작제물 결정이 항체 작제물의 가용성 대응물보다 생체내 반감기가 큰, 항체 작제물.

청구항 71

제65항에 있어서, 상기 항체 접합체 결정이 항체 접합체의 가용성 대응물보다 생체내 반감기가 큰, 항체 접합체.

청구항 72

제63항에 있어서, 상기 결합 단백질 결정이 결합 단백질의 비-결정형의 생물학적 활성을 보유하는, 결합 단백질.

청구항 73

제64항에 있어서, 상기 항체 작제물 결정이 항체 작제물의 비-결정형의 생물학적 활성을 보유하는, 항체 작제물.

청구항 74

제65항에 있어서, 상기 항체 접합체 결정이 항체 접합체의 비-결정형의 생물학적 활성을 보유하는, 항체 접합체.

청구항 75

제2항에 기재된 결합 단백질 아미노산 서열을 암호화하는, 분리된 핵산.

청구항 76

제2항에 기재된 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3 중 하나 이상을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드; 제2항에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3 중 하나 이상을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩

타이드; 및 상기 폴리펩타이드 둘 다의 조합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는, 분리된 핵산.

청구항 77

제76항에 따른 분리된 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 벡터가 pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, 및 pBJ로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 벡터.

청구항 79

제77항에 기재된 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 숙주 세포가 원핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 숙주 세포가 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)인, 숙주 세포.

청구항 82

제79항에 있어서, 상기 숙주 세포가 진핵 세포인, 숙주 세포.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 진핵 세포가 원생 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 숙주 세포.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 진핵 세포가 포유동물 세포, 조류 세포, 및 곤충 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 동물 세포인, 숙주 세포.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 86

제84항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 COS 세포인, 숙주 세포.

청구항 87

제83항에 있어서, 상기 진균 세포가 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)인, 숙주 세포.

청구항 88

제84항에 있어서, 상기 곤충 세포가 Sf9 세포인, 숙주 세포.

청구항 89

제79항에 기재된 숙주 세포를 사람 DLL4에 결합하는 결합 단백질을 생산하기에 충분한 조건 하에 배양 배지 중에서 배양하는 단계를 포함하는, 사람 DLL4에 결합하는 결합 단백질을 생산하는 방법.

청구항 90

제89항의 방법에 따라 생산된, DLL4 결합 단백질.

청구항 91

결합 단백질의 방출을 위한 조성물로서,

- (a) 제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 기재된 결정화된 결합 단백질, 및 성분을 포함하는 제형; 및
- (b) 적어도 하나의 중합체 담체를 포함하는, 결합 단백질의 방출을 위한 조성물.

청구항 92

제93항에 있어서, 상기 중합체 담체가 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(덱시펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산), 폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논); 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리((하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루로닉 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 설페이트화된 폴리사카라이드, 이들의 배합물 및 공중합체로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 중합체인, 조성물.

청구항 93

제91항에 있어서, 상기 성분이 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 94

포유동물을 치료하는 방법으로서,

제91항에 기재된 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물을 치료하는 방법.

청구항 95

제2항에 기재된 DLL4 결합 단백질, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 96

제95항에 있어서, DLL4 활성이 유해한 장애를 치료하기 위한 적어도 하나의 추가의 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 97

제95항에 있어서, 상기 추가의 제제가 치료제; 영상화제; 항신생물제; 화학치료제; 혈관형성 억제제; 항-VEGF 항체; 항-EGFR 항체; 항-cMet 항체; 항-ErbB3 항체; 항-HER2 항체; 항-CD20 항체; 아플리베르셉트; 키나제 억제제; 동시-자극 분자 차단제; 항-B7.2 항체; CTLA4-Ig; 부착 분자 차단제; 항-E 선택인 항체; 항-L 선택인 항체; 항-사이토킨 항체 또는 이들의 기능성 단편; 항-IL-18 항체; 항-TNF 항체; 항-IL-6 항체; 메토타렉세이트; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; DNA 알킬화제; 시스플라틴; 카보플라틴; 항-투몰린제; 파클리탁셀; 도세탁셀; 독소루비신; 겐시타빈; 겐자르; 안트라사이클린; 아드리아마이신; 토포이소머라제 I 억제제; 토포이소머라제 II 억제제; 5-플루오로우라실(5-FU); 류코보린; 이리노테칸; 수용체 타이로신 키나제 억제제; 세포자멸사 억제제; Bcl2/Bclx 억제제; 에를로티니브; 게피티니브; COX-2 억제제; 셀렉코시브; 사이클로스포린; 라파마이신, 검출가능한 표지 또는 리포터 분자; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제; 마약; 진통제; 마취제; 진정제; 국소 마취제; 신경근육 차단제; 항미생물제; 항건선제; 코르티코스테로이드; 동화작용 스테로이드; 에리트로포이에틴; 면역화; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사성 약제학적 약물; 항우울제; 정신병 약물; 자극제; 천식 의약; 베타 효능제; 흡입된 스테로이드; 에피네프린; 이의 에피네프린 유사체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 98

사람 DLL4를 제2항에 기재된 결합 단백질과 접촉시켜 사람 DLL4 활성이 감소되도록 함을 포함하는, 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법.

청구항 99

제2항에 기재된 결합 단백질을 사람 대상체에게 투여하여 당해 사람 대상체에서 사람 DLL4 활성이 감소되도록 함을 포함하는, DLL4 활성이 유해한 장애로 고생하는 사람 대상체에서 사람 DLL4 활성을 감소시키는 방법.

청구항 100

제2항에 기재된 DLL4 결합 단백질을 대상체에게 투여함으로써 치료를 달성하는, DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애에 대해 대상체를 치료하는 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 장애가 유방 암, 결장 암, 직장 암, 폐 암, 입인두 암, 하인두 암, 식도 암, 위장 암, 췌장 암, 간 암, 쓸개 암, 담관 암, 소장 암, 노관 암, 여성 생식기관 암, 남성 생식기관 암, 내분비선 암, 피부 암, 혈관종, 흑색종, 육종, 뇌 종양, 신경 암, 눈 종양, 뇌척수막 암, 조혈성 악성암으로부터의 고형 종양, 종양 전이, 안구 신생혈관증식, 부종, 류마티스 관절염, 죽상 경화관, 크론병(Crohn's disease), 염증성 장 질환, 난치성 복수, 건선, 사코이드증, 동맥의 동맥경화증, 폐혈증, 소화궤양, 화상, 췌장염, 다낭성 난소병(POD), 자궁내막증, 자궁 섬유양, 양성 전립선 비대증, T-세포 급성 림프아구 백혈병(T-ALL), 피질하 경색증을 갖는 대뇌 보통 우성 동맥병증(cerebral autosomal dominant arteriopathy) 및 백질뇌병(CADASIL), 다발성 경화증(MS), 팔로네징후(tetralogy of Fallot: TOF), 알라질 증후군(Alagille syndrome: AS), 황반 변성 및 노화-관련 황반 변성 질환, 및 비정상적인 DLL4 활성을 특징으로 하는 다른 혈관형성 독립적인 및 의존적인 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 장애가 원발성 암 및 전이성 암인, 방법.

청구항 103

제101항에 있어서, 상기 노관 암이 직장 암, 방광 암, 및 요로상피 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 104

제101항에 있어서, 상기 여성 생식기관 암이 자궁경부 암, 자궁 암, 난소 암, 용모막 암종 및 임신영양막병으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 105

제101항에 있어서, 상기 남성 생식기관 암이 전립선 암, 정낭 암, 고환 암, 및 배 세포 종양으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 106

제101항에 있어서, 상기 내분비선 암이 갑상선 암, 부신 암, 및 뇌하수체 암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 107

제101항에 있어서, 상기 육종이 골 육종, 연조직 육종, 및 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 108

제101항에 있어서, 상기 뇌막 암이 성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종, 및 수막종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 109

제101항에 있어서, 상기 조혈성 악성 암으로부터의 고형 종양이 백혈병, 호지킨 백혈병(Hodgkin's leukemia) 및

비-호지킨 백혈병, 림프종, 호지킨 림프종 및 비-호지킨 림프종인, 방법.

청구항 110

제101항에 있어서, 상기 안구 신생혈관증식이 당뇨병성 실명, 망막병, 노화-관련된 황반 변성, 및 피부홍조로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 111

제101항에 있어서, 상기 대상체에 대한 투여가 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 관절낭내, 연골내, 강내, 복내(intracelial), 소뇌내, 대뇌심실내, 대장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장내, 복강내, 흉강내, 전립선내, 폐내, 직장내, 망막내, 척주내, 윤활막내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 대량주입, 질내, 직장, 볼, 설하, 비강내, 및 경피로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 방식에 의한 것인, 방법.

청구항 112

제2항에 기재된 DLL4 결합 단백질을 치료학적 유효량의 제2 제제의 투여 전, 동시 또는 후에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 제2 제제가 사람 VEGFR2에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 메토크세이트; 사람 TNF에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 비-스테로이드성 소염제(NSAID); 방사선 치료제; 항신생물제; 화학치료제; DNA 알킬화제; 시스플라틴; 카보플라틴; 항-투블린제; 파클리탁셀; 도세탁셀; 탁솔; 독소루비신; 겐시타빈; 겐자르; 안트라사이클린; 아드리아마이신; 토포이소머라제 I 억제제; 토포이소머라제 II 억제제; 5-플루오로우라실(5-FU); 류코보린; 이리노테칸; 수용체 타이로신 키나제 억제제; 에를로티니브; 게피티니브; COX-2 억제제; 셀레코시브; 키나제 억제제; 혈관형성 억제제; 항-VEGF 항체; 아플리베르셉트; 동시-자극 분자 차단제; 항-B7.1 항체; 항-B7.2 항체; CTLA4-Ig; 항-CD20 항체; 부착 분자 차단제; 항-LFA-1 항체; 항-E 셀렉틴 항체; 및 항-L 셀렉틴 항체; 소 분자 억제제; 항-사이토킨 항체 또는 이들의 기능성 단편; 항-IL-18 항체; 항-TNF 항체; 항-IL-6 항체; 항-사이토킨 수용체 항체; 검출 가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제; 마약; 진통제; 마취제; 진정제; 국소 마취제; 신경근육 차단제; 항미생물제; 항건선 약물; 코르티코스테로이드; 동화작용 스테로이드; 에리트로포이에틴; 면역화; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사성 약제학적 약물; 항우울제; 정신병 약물; 자극제; 천신 의약; 베타 효능제; 흡입된 스테로이드; 에피네프린; 에피네프린 유사체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, DLL4가 유해한 장애로 고생하는 환자를 치료하는 방법.

청구항 113

제2항에 있어서, 상기 결합 단백질이 항체인, 결합 단백질.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체, 전장의 사합체 면역글로불린, IgG 분자, IgG₁ 분자, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 사람화된 항체, 및 친화성 성숙된 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 항체.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인, 항체.

청구항 116

제36항에 있어서, 상기 2개의 가변 도메인이:

서열 번호 188 및 서열 번호 197,

서열 번호 190 및 서열 번호 197, 및

서열 번호 191 및 서열 번호 197로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는, 결합 단백질.

청구항 117

제36항에 있어서, 상기 2개의 가변 도메인이 서열 번호 181 및 서열 번호 185의 아미노산 서열을 갖는, 결합 단

백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 2010년 3월 2일자로 출원된 미국 가특허원 제61/309,494호에 대한 우선권을 청구하며, 이의 전문은 본원에서 참조로 도입된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 양식으로 EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록을 포함하며, 이의 전문이 본원에 참조로 도입되어 있다. 2011년 2월 24일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 10920W001.txt로 명명되며 크기는 111,426 바이트이다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 DLL4 결합 단백질의 개발 및 용도, 및 암, 종양, 다른 혈관형성-의존성 질환, 혈관형성-독립성 질환, 및 이상 DLL4 발현 또는 활성을 특징으로 하는 황반 변성 및 노화-관련 황반 변성 질환의 억제, 예방 및/또는 치료시 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] **발명의 배경**

[0008] 세포-대-세포 소통(cell-to-cell communication)은 분화, 증식, 및 항상성과 같은 많은 생물학적 과정에 요구된다. 광범위한 진핵세포에 의해 이용된 한가지 시스템은 노치-시그널링 경로(Notch-signaling pathway)이다. 당해 경로, 특히 노치 수용체는 또한 기능성 종양 혈관형성에 중요하다. 따라서, 노치 수용체 기능의 억제, 노치 수용체의 차단, 및/또는 노치-시그널링 경로의 차단은 항암 조성물 및 치료요법을 위한 강력한 전략(potential strategy)이다. 노치 수용체의 소 분자 억제제는 신체 전체에서 노치 수용체의 야생형(정상) 조직 발현을 억제하므로 이들은 독성인 것으로 입증되어 왔다. 따라서, 상이한 수의 노치-시그널링 경로가 치료요법에 대한 강력한 표적으로 고려되어야 한다.

[0009] 노치 수용체에 대한 혈관구조 리간드는 델타 4 또는 델타-유사(Delta-like) 4(DLL4)이다. 혈관구조 내에서 대량 발현된, DLL4는 혈관 발달에 중요하다[참조: Yan et al., *Clin. Cancer Res.*, 13(24): 7243-7246 (2007); Shutter et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1313-1318 (2000); Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 14(11): 1343-1352 (2000)]. DLL4에 대한 마우스 이형접합체는 혈관 발달에 있어 주요 결점으로 인하여 배아적으로 치명적이다[참조: Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Duarte et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2474-2478 (2004); Krebs et al., *Genes Dev.*, 18(20): 2469-2473 (2004)]. DLL4의 발현은 VEGF에 의해 유도될 수 있다[참조: Liu et al., *Mol. Cell Biol.*, 23(1): 14-25 (2003); Lobov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3219-3224 (2007)]. 요컨대, DLL4는 부분적으로 VEGFR2를 억제하고 VEGFR1을 유도함을 통해 VEGF 시그널링을 음성적으로 조절할 수 있다[참조: Harrington et al., *Microvasc. Res.*, 75(2): 144-154 (2008); Suchting et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(9): 3225-3230 (2007)]. DLL4와 VEGF 사이의 정교한 조화는 기능적 혈관형성에 필수적이다.

[0010] 이의 생리학적 역할 이외에도, DLL4는 종양 혈관 내에서 상향-조절된다[참조: Gale et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(45): 15949-15954 (2004); Mailhos et al., *Differentiation*, 69(2-3): 135-144 (2001); Patel et al., *Cancer Res.*, 65(19): 8690-8697 (2005); Patel et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(16): 4836-4844 (2006); Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006)]. DLL4의 차단은 다수의 모델에서 원발성 종양 성장을 강력하게 억제하였다[참조: Noguera-Troise et al., *Nature*, 444(7122): 1032-1037 (2006); Ridgway et al., *Nature*, 444(7122): 1083-1087 (2006); Scknet et al., *Blood*, 109(11): 4753-4760 (2007)]. DLL4의 억제는 심지어 항-VEGF 치료요법에 대해 내성인 종양에 대해서 효과적이었다. DLL4 및 VEGF 둘 다의 조합적인 억제는 향상된 항-종양 활성을 제공하였다. 흥미롭게도, 종양 혈관 형성을 감소시키는 VEGF 억제와는 달리, DLL4 차단은 종양 혈관구조 밀도에 있어 증가를 초래하며, 여기서 혈관은 비정상적이고, 효율적인 혈액 수송을 지지할 수 없으며, 효과적으로 비기능성이다. 따라서, DLL4는 암 치료용의 강력한 표적을 제공

한다.

[0011] DLL4-노치 경로를 표적화함으로써 종양 혈관형성 및 성장을 억제하거나 심지어 예방할 수 있는 치료제에 대해 당해 분야의 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0012] 발명의 요약

[0013] 본 발명은 사람 DLL4에 결합하는 단백질을 제공한다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 래트 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 사람화된 항체, 영장류화된 항체, 친화성 성숙된 항체, 및 사람 DLL4에 결합할 수 있는 이의 단편을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 본원에 기술된 결합 단백질은 친화성이 높은 사람 DLL4에 결합한다. 보다 바람직하게는, 본 발명에 따른 결합 단백질은 사람 DLL4를 중화시킬 수 있다. 본 발명은 또한 DLL4 결합 단백질을 제조하는 방법 및 이를 사용하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 하나의 양상은 사람 DLL4에 결합할 수 있는 결합 단백질을 제공하며, 여기서 결합 단백질은 서열 번호 157, 서열 번호 158, 서열 번호 159, 서열 번호 160, 서열 번호 161, 서열 번호 162, 서열 번호 163, 및 서열 번호 164로 이루어진 아미노산 서열의 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 본 발명의 하나의 양상은, 사람 DLL4에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 결합 단백질에 관한 것이며, 상기 항원 결합 도메인은 적어도 하나 이상(즉, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR을 포함하며, 여기서:

[0016] CDR-H1은:

[0017] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열 번호 151)(여기서:

[0018] X_1 은 N, H, 또는 Y이고;

[0019] X_2 는 F이며;

[0020] X_3 은 P이고;

[0021] X_4 는 M이며;

[0022] X_5 는 A 또는 S이다);

[0023] 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 38H12);

[0024] 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 37D10);

[0025] 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 32C7);

[0026] 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14G1);

[0027] 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14A11);

[0028] 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 15D6);

[0029] 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 1A11);

[0030] 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1a 1A11);

[0031] 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 1A11);

[0032] 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 1A11);

[0033] 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 38H12);

[0034] 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1A 38H12);

[0035] 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 38H12);

[0036] 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);

[0037] 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11VH.1);

- [0038] 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A6);
- [0039] 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A8);
- [0040] 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.C6);
- [0041] 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A11);
- [0042] 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.B5);
- [0043] 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.E12);
- [0044] 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.G3);
- [0045] 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.F5); 및
- [0046] 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0047] CDR-H2는
- [0048] X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} (서열 번호 152)(여기서;
- [0049] X_1 은 T 또는 S이고;
- [0050] X_2 는 I이며;
- [0051] X_3 은 S이고;
- [0052] X_4 는 S 또는 G이며;
- [0053] X_5 는 S이고;
- [0054] X_6 은 D이며;
- [0055] X_7 은 G, A, D, S, 또는 E이고;
- [0056] X_8 은 T 또는 W이며;
- [0057] X_9 는 T, P, 또는 A이고;
- [0058] X_{10} 은 Y, S, T, 또는 N이며;
- [0059] X_{11} 은 Y 또는 I이고;
- [0060] X_{12} 는 R 또는 G이며;
- [0061] X_{13} 은 D이고;
- [0062] X_{14} 는 S이며;
- [0063] X_{15} 는 V이고;
- [0064] X_{16} 은 K이며;
- [0065] X_{17} 은 G이다);
- [0066] 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 38H12);
- [0067] 서열 번호 161의 50 내지 68번 잔기(CDR-H2 37D10);
- [0068] 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 32C7);
- [0069] 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14G1);

- [0070] 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14A11);
- [0071] 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 15D6);
- [0072] 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 1A11);
- [0073] 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1a 1A11);
- [0074] 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 1A11);
- [0075] 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 1A11);
- [0076] 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 38H12);
- [0077] 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1A 38H12);
- [0078] 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);
- [0079] 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
- [0080] 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11VH.1);
- [0081] 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A6);
- [0082] 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A8);
- [0083] 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.C6);
- [0084] 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A11);
- [0085] 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.B5);
- [0086] 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.E12);
- [0087] 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.G3);
- [0088] 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.F5); 및
- [0089] 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;
- [0090] CDR-H3은
- [0091] X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (서열 번호 153)(여기서;
- [0092] X_1 은 G이고;
- [0093] X_2 는 Y이며;
- [0094] X_3 은 Y이고;
- [0095] X_4 는 N이며;
- [0096] X_5 는 S이고;
- [0097] X_6 은 P이며;
- [0098] X_7 은 F이고;
- [0099] X_8 은 A이며;
- [0100] X_9 는 Y, F, 또는 S이다);
- [0101] 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 38H12);
- [0102] 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기(CDR-H3 37D10);
- [0103] 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 32C7);

- [0104] 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 14G1);
- [0105] 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 14A11);
- [0106] 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 15D6);
- [0107] 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 1A11);
- [0108] 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1a 1A11);
- [0109] 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 1A11);
- [0110] 서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 1A11);
- [0111] 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 38H12);
- [0112] 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1A 38H12);
- [0113] 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);
- [0114] 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
- [0115] 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11VH.1);
- [0116] 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A6);
- [0117] 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A8);
- [0118] 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.C6);
- [0119] 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A11);
- [0120] 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.B5);
- [0121] 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.E12);
- [0122] 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.G3);
- [0123] 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.F5); 및
- [0124] 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.H2)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0125] CDR-L1은:
- [0126] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}$ (서열 번호 154)(여기서;
- [0127] X_1 은 R이고;
- [0128] X_2 는 A이며;
- [0129] X_3 은 S이고;
- [0130] X_4 는 E 또는 Q이며;
- [0131] X_5 는 D 또는 E이고;
- [0132] X_6 은 I이며;
- [0133] X_7 은 Y 또는 W이고;
- [0134] X_8 은 S, I, Y, N, 또는 R이며;
- [0135] X_9 는 N이고;
- [0136] X_{10} 은 L이며;

- [0137] X_{11} 은 A이다);
- [0138] 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 38H12);
- [0139] 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 37D10);
- [0140] 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 32C7);
- [0141] 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 14G1);
- [0142] 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 14A11);
- [0143] 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 15D6);
- [0144] 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 1A11);
- [0145] 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 1A11);
- [0146] 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 1A11);
- [0147] 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 1A11);
- [0148] 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 38H12);
- [0149] 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 38H12);
- [0150] 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 38H12);
- [0151] 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 38H12);
- [0152] 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11VL.1);
- [0153] 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A2);
- [0154] 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A12);
- [0155] 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A7);
- [0156] 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B4);
- [0157] 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B5); 및
- [0158] 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;
- [0159] CDR-L2는:
- [0160] X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (서열 번호 155)(여기서;
- [0161] X_1 은 D이고;
- [0162] X_2 는 T이며;
- [0163] X_3 은 N 또는 S이고;
- [0164] X_4 는 N, D, S, I, Y, 또는 V이며;
- [0165] X_5 는 L이고;
- [0166] X_6 은 A이며;
- [0167] X_7 은 D이다);
- [0168] 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 38H12);
- [0169] 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 37D10);
- [0170] 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 32C7);

- [0171] 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 14G1);
- [0172] 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 14A11);
- [0173] 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 15D6);
- [0174] 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 1A11);
- [0175] 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 1A11);
- [0176] 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 1A11);
- [0177] 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 1A11);
- [0178] 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 38H12);
- [0179] 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 38H12);
- [0180] 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 38H12);
- [0181] 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 38H12);
- [0182] 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11VL.1);
- [0183] 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A2);
- [0184] 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A12);
- [0185] 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A7);
- [0186] 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B4);
- [0187] 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B5); 및
- [0188] 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0189] CDR-L3은:
- [0190] X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (서열 번호 156)(여기서;
- [0191] X_1 은 Q이고;
- [0192] X_2 는 Q이며;
- [0193] X_3 은 Y이고;
- [0194] X_4 는 N, D, 또는 T이며;
- [0195] X_5 는 N, Y, 또는 W이고;
- [0196] X_6 은 Y 또는 V이며;
- [0197] X_7 은 P이고;
- [0198] X_8 은 P이며;
- [0199] X_9 는 T이다);
- [0200] 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 38H12);
- [0201] 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 37D10);
- [0202] 서열 번호 164의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 32C7);
- [0203] 서열 번호 166의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 14G1);
- [0204] 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 14A11);

- [0205] 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 15D6);
- [0206] 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 1A11);
- [0207] 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 1A11);
- [0208] 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 1A11);
- [0209] 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 1A11);
- [0210] 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 38H12);
- [0211] 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 38H12);
- [0212] 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 38H12);
- [0213] 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 38H12);
- [0214] 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11VL.1);
- [0215] 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A2);
- [0216] 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A12);
- [0217] 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A7);
- [0218] 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B4);
- [0219] 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B5);
- [0220] 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0221] 바람직하게는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은
- [0222] 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 38H12); 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 38H12); 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 38H12); 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 38H12); 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 38H12); 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 38H12); 서열 번호 159의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 1A11); 서열 번호 159의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 1A11); 서열 번호 159의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 1A11); 서열 번호 160의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 1A11); 서열 번호 160의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 1A11); 서열 번호 160의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 1A11); 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 37D10); 서열 번호 161의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 37D10); 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기(CDR-H3 37D10); 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 37D10); 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 37D10); 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 37D10); 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 32C7); 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 32C7); 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 32C7); 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 32C7); 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 32C7); 서열 번호 164의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 32C7); 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14G1); 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14G1); 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 14G1); 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 14G1); 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 14G1); 서열 번호 166의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 14G1); 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14A11); 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14A11); 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 14A11); 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 14A11); 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 14A11); 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 14A11); 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 15D6); 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 15D6); 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 15D6); 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 15D6); 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 15D6); 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 15D6); 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 1A11); 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 1A11); 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 1A11); 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1a 1A11); 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1a 1A11); 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1a 1A11); 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 1A11); 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 1A11); 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 1A11); 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 1A11); 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 1A11); 서열 번호 174의 99

내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 1A11); 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 1A11); 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 1A11); 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 1A11); 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 1A11); 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 1A11); 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 1A11); 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 1A11); 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 1A11); 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 1A11); 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 1A11); 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 1A11); 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 1A11); 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 38H12); 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 38H12); 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 38H12); 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1A 38H12); 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1A 38H12); 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1A 38H12); 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 38H12); 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12); 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 38H12); 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12); 서열 번호 182의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 38H12); 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 38H12); 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 38H12); 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 38H12); 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 38H12); 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 38H12); 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 38H12); 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 38H12); 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 38H12); 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 38H12); 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 38H12); 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 38H12); 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 38H12); 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 38H12); 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11VH.1), 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11VH.1); 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11VH.1); 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A6), 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A6); 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A6); 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A8), 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A8); 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A8); 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.C6), 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.C6); 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.C6); 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A11), 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A11); 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A11); 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.B5), 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.B5); 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.B5); 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.E12), 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.E12); 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.E12); 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.G3), 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.G3); 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.G3); 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.F5), 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.F5); 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.F5); 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.H2), 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.H2); 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.H2); 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11VL.1), 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11VL.1); 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11VL.1); 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A2), 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A2); 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A2); 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A12), 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A12); 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A12); 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A7), 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A7); 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A7); 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B4), 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B4); 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B4); 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B5), 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B5); 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B5); 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.E12), 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.E12); 및 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.E12)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 적어도 하나의 CDR을 포함한다.

[0223]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 본원(상기 또는 하기)에 기술된 적어도 3개의 CDR을 포함한다. 비-제한적 예에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 본원에 기술된 3개의 CDR을 포함하고, 여기서 3개의 CDR은 본원에 기술된 것으로서 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3이다. 다른 비-제한적 예에서, 본 발명의 DLL4 결합

단백질은 본원에 기술된 3개의 CDR을 포함하고, 여기서 3개의 CDR은 본원에 기술된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3이다.

- [0224] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 본원(상기 또는 하기)에 기술된 하나 이상의 CDR, 예를 들면, 본원에 기술된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 CDR을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질은 본원에 기술된 6개의 CDR, 예를 들면, 본원에 기술된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3을 포함한다.
- [0225] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 가변 도메인 CDR의 세트로부터 선택된 3개의 CDR을 포함하고, 여기서 가변 도메인 CDR의 세트는 다음으로 이루어진 가변 도메인 CDR 세트의 그룹으로부터 선택된다:
- [0226] VH 38H12 CDR 세트
- [0227] CDR-H1: 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기
- [0228] CDR-H2: 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기
- [0229] CDR-H3: 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기
- [0230] VL 38H12 CDR 세트
- [0231] CDR-L1: 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기
- [0232] CDR-L2: 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기
- [0233] CDR-L3: 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기
- [0234] VH 1A11 CDR 세트
- [0235] CDR-H1: 서열 번호 159의 31 내지 35번 잔기
- [0236] CDR-H2: 서열 번호 159의 50 내지 66번 잔기
- [0237] CDR-H3: 서열 번호 159의 99 내지 107번 잔기
- [0238] VL 1A11 CDR 세트
- [0239] CDR-L1: 서열 번호 160의 24 내지 34번 잔기
- [0240] CDR-L2: 서열 번호 160의 50 내지 56번 잔기
- [0241] CDR-L3: 서열 번호 160의 89번 내지 97번 잔기
- [0242] VH 37D10 CDR 세트
- [0243] CDR-H1: 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기
- [0244] CDR-H2: 서열 번호 161의 50 내지 68번 잔기
- [0245] CDR-H3: 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기
- [0246] VL 37D10 CDR 세트
- [0247] CDR-L1: 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기
- [0248] CDR-L2: 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기
- [0249] CDR-L3: 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기
- [0250] VH 32C7 CDR 세트
- [0251] CDR-H1: 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기
- [0252] CDR-H2: 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기
- [0253] CDR-H3: 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기

[0254]	<u>VL 32C7 CDR 세트</u>
[0255]	CDR-L1: 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기
[0256]	CDR-L2: 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기
[0257]	CDR-L3: 서열 번호 164의 89 내지 98번 잔기
[0258]	<u>VH 14G1 CDR 세트</u>
[0259]	CDR-H1: 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기
[0260]	CDR-H2: 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기
[0261]	CDR-H3: 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기
[0262]	<u>VL 14G1 CDR 세트</u>
[0263]	CDR-L1: 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기
[0264]	CDR-L2: 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기
[0265]	CDR-L3: 서열 번호 166의 89 내지 97번 잔기
[0266]	<u>VH 14A11 CDR 세트</u>
[0267]	CDR-H1: 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기
[0268]	CDR-H2: 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기
[0269]	CDR-H3: 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기
[0270]	<u>VL 14A11 CDR 세트</u>
[0271]	CDR-L1: 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기
[0272]	CDR-L2: 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기
[0273]	CDR-L3: 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기
[0274]	<u>VH 15D6 CDR 세트</u>
[0275]	CDR-H1: 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기
[0276]	CDR-H2: 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기
[0277]	CDR-H3: 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기
[0278]	<u>VL 15D6 CDR 세트</u>
[0279]	CDR-L1: 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기
[0280]	CDR-L2: 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기
[0281]	CDR-L3: 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기
[0282]	<u>VH VH.1 1A11 CDR 세트</u>
[0283]	CDR-H1: 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기
[0284]	CDR-H2: 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기
[0285]	CDR-H3: 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기
[0286]	<u>VH VH.1a 1A11 CDR 세트</u>
[0287]	CDR-H1: 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기
[0288]	CDR-H2: 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기
[0289]	CDR-H3: 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기

[0290]	<u>VH VH.1b 1A11 CDR 세트</u>
[0291]	CDR-H1: 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기
[0292]	CDR-H2: 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기
[0293]	CDR-H3: 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기
[0294]	<u>VH VH.2a 1A11 CDR 세트</u>
[0295]	CDR-H1: 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기
[0296]	CDR-H2: 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기
[0297]	CDR-H3: 서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기
[0298]	<u>VL VL.1 1A11 CDR 세트</u>
[0299]	CDR-L1: 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기
[0300]	CDR-L2: 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기
[0301]	CDR-L3: 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기
[0302]	<u>VL VL.1a 1A11 CDR 세트</u>
[0303]	CDR-L1: 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기
[0304]	CDR-L2: 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기
[0305]	CDR-L3: 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기
[0306]	<u>VL VL.1b 1A11 CDR 세트</u>
[0307]	CDR-L1: 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기
[0308]	CDR-L2: 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기
[0309]	CDR-L3: 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기
[0310]	<u>VL VL.2a 1A11 CDR 세트</u>
[0311]	CDR-L1: 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기
[0312]	CDR-L2: 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기
[0313]	CDR-L3: 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기
[0314]	<u>VH VH.1 38H12 CDR 세트</u>
[0315]	CDR-H1: 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기
[0316]	CDR-H2: 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기
[0317]	CDR-H3: 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기
[0318]	<u>VH VH.1a 38H12 CDR 세트</u>
[0319]	CDR-H1: 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기
[0320]	CDR-H2: 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기
[0321]	CDR-H3: 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기
[0322]	<u>VH VH.1b 38H12 CDR 세트</u>
[0323]	CDR-H1: 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기
[0324]	CDR-H2: 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기
[0325]	CDR-H3: 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기

[0326]	<u>VH VH.2a 38H12 CDR 세트</u>
[0327]	CDR-H1: 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기
[0328]	CDR-H2: 서열 번호 182의 50 내지 66번 잔기
[0329]	CDR-H3: 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기
[0330]	<u>VL VL.1 38H12 CDR 세트</u>
[0331]	CDR-L1: 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기
[0332]	CDR-L2: 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기
[0333]	CDR-L3: 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기
[0334]	<u>VL VL.1a 38H12 CDR 세트</u>
[0335]	CDR-L1: 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기
[0336]	CDR-L2: 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기
[0337]	CDR-L3: 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기
[0338]	<u>VL VL.1b 38H12 CDR 세트</u>
[0339]	CDR-L1: 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기
[0340]	CDR-L2: 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기
[0341]	CDR-L3: 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기
[0342]	<u>VL VL.2a 38H12 CDR 세트</u>
[0343]	CDR-L1: 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기
[0344]	CDR-L2: 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기
[0345]	CDR-L3: 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기
[0346]	<u>VH hA11VH.1 CDR 세트</u>
[0347]	CDR-H1: 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기
[0348]	CDR-H2: 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기
[0349]	CDR-H3: 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기
[0350]	<u>VH hA11.A6 CDR 세트</u>
[0351]	CDR-H1: 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기
[0352]	CDR-H2: 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기
[0353]	CDR-H3: 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기
[0354]	<u>VH hA11.A8 CDR 세트</u>
[0355]	CDR-H1: 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기
[0356]	CDR-H2: 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기
[0357]	CDR-H3: 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기
[0358]	<u>VH hA11.C6 CDR 세트</u>
[0359]	CDR-H1: 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기
[0360]	CDR-H2: 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기
[0361]	CDR-H3: 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기

[0362]	<u>VH hA11.A11 CDR 세트</u>
[0363]	CDR-H1: 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기
[0364]	CDR-H2: 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기
[0365]	CDR-H3: 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기
[0366]	<u>VH hA11.B5 CDR 세트</u>
[0367]	CDR-H1: 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기
[0368]	CDR-H2: 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기
[0369]	CDR-H3: 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기
[0370]	<u>VH hA11.E12 CDR 세트</u>
[0371]	CDR-H1: 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기
[0372]	CDR-H2: 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기
[0373]	CDR-H3: 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기
[0374]	<u>VH hA11.G3 CDR 세트</u>
[0375]	CDR-H1: 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기
[0376]	CDR-H2: 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기
[0377]	CDR-H3: 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기
[0378]	<u>VH hA11.F5 CDR 세트</u>
[0379]	CDR-H1: 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기
[0380]	CDR-H2: 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기
[0381]	CDR-H3: 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기
[0382]	<u>VH hA11.H2 CDR 세트</u>
[0383]	CDR-H1: 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기
[0384]	CDR-H2: 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기
[0385]	CDR-H3: 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기
[0386]	<u>VL h1A11VL.1 CDR 세트</u>
[0387]	CDR-L1: 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기
[0388]	CDR-L2: 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기
[0389]	CDR-L3: 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기
[0390]	<u>VL h1A11.A2 CDR 세트</u>
[0391]	CDR-L1: 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기
[0392]	CDR-L2: 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기
[0393]	CDR-L3: 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기
[0394]	<u>VL h1A11.A12 CDR 세트</u>
[0395]	CDR-L1: 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기
[0396]	CDR-L2: 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기
[0397]	CDR-L3: 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기

- [0398] VL h1A11.A7 CDR 세트
- [0399] CDR-L1: 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기
- [0400] CDR-L2: 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기
- [0401] CDR-L3: 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기
- [0402] VL h1A11.B4 CDR 세트
- [0403] CDR-L1: 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기
- [0404] CDR-L2: 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기
- [0405] CDR-L3: 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기
- [0406] VL h1A11.B5 CDR 세트
- [0407] CDR-L1: 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기
- [0408] CDR-L2: 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기
- [0409] CDR-L3: 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기
- [0410] 및
- [0411] VL h1A11.E12 CDR 세트
- [0412] CDR-L1: 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기
- [0413] CDR-L2: 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기
- [0414] CDR-L3: 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기
- [0415] 하나의 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 상기 그룹에서 가변 도메인 CDR의 적어도 2개 세트로부터의 CDR을 포함한다.
- [0416] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 상기 그룹내 3개의 CDR의 임의의 VH 세트로부터 선택된 3개의 CDR 및 상기 그룹내 3개의 CDR의 임의의 VL 세트로부터 선택된 3개의 CDR을 포함한다.
- [0417] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CDR의 VH 및 VL 세트의 쌍으로부터의 상기 기술된 3개의 CDR의 VH 세트 및 상기 기술된 3개의 CDR의 VL 세트를 포함한다:
- [0418] VH 38H12 CDR 세트 및 VL 38H12 CDR 세트,
- [0419] VH 1A11 CDR 세트 및 VL 1A11 CDR 세트,
- [0420] VH 37D10 CDR 세트 및 VL 37D10 CDR 세트,
- [0421] VH 32C7 CDR 세트 및 VL 32C7 CDR 세트,
- [0422] VH 14G1 세트 및 VL 14G1 CDR 세트,
- [0423] VH 14A11 CDR 세트 및 VL 14A11 CDR 세트,
- [0424] VH 15D6 CDR 세트 및 VL 15D6 CDR 세트,
- [0425] VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,
- [0426] VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,
- [0427] VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,
- [0428] VH VH.1 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,
- [0429] VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,
- [0430] VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,

- [0431] VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,
- [0432] VH VH.1a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,
- [0433] VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,
- [0434] VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,
- [0435] VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,
- [0436] VH VH.1b 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,
- [0437] VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1 1A11 CDR 세트,
- [0438] VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1a 1A11 CDR 세트,
- [0439] VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.1b 1A11 CDR 세트,
- [0440] VH VH.2a 1A11 CDR 세트 및 VL VL.2a 1A11 CDR 세트,
- [0441] VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
- [0442] VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
- [0443] VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
- [0444] VH VH.1 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
- [0445] VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
- [0446] VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
- [0447] VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
- [0448] VH VH.1a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
- [0449] VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
- [0450] VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
- [0451] VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
- [0452] VH VH.1b 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
- [0453] VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1 38H12 CDR 세트,
- [0454] VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1a 38H12 CDR 세트,
- [0455] VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.1b 38H12 CDR 세트,
- [0456] VH VH.2a 38H12 CDR 세트 및 VL VL.2a 38H12 CDR 세트,
- [0457] VH h1A11.A6 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
- [0458] VH h1A11.C6 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
- [0459] VH h1A11.A11 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
- [0460] VH h1A11.A8 CDR 세트 및 VL h1A11VL.1 CDR 세트,
- [0461] VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.B4 CDR 세트,
- [0462] VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A7 CDR 세트,
- [0463] VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A12 CDR 세트,
- [0464] VH h1A11VH.1 CDR 세트 및 VL h1A11.A2 CDR 세트,
- [0465] VH h1A11.B5 CDR 세트 및 VL h1A11.B5 CDR 세트,
- [0466] VH h1A11.E12 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트,

- [0467] VH h1A11.G3 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트,
- [0468] VH h1A11.F5 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트, 및
- [0469] VH h1A11.H2 CDR 세트 및 VL h1A11.E12 CDR 세트.
- [0470] 바람직한 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 6개의 CDR을 포함하는 DLL4 항원 결합 도메인(또는 결합 부위)을 지니며, 여기서 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3은 중쇄 가변 영역(VH) 내에 위치하고 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 경쇄 가변 영역(VL)에 위치하고, 여기서 VH 및 VL 영역의 연합은 DLL4 결합 단백질의 기능적 DLL4 항원 결합 도메인을 형성한다. 당해 실시형태의 추가의 비-제한적 예에서, 2개의 DLL4 항원 결합 도메인을 지닌 DLL4 결합 단백질은 VH 및 VL 영역의 2개 세트를 포함하므로 12개의 CDR을 포함한다.
- [0471] 다른 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 6개의 CDR을 포함하는 DLL4 항원 결합 도메인을 지니며, 여기서 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3은 중쇄 가변 영역(VH)에 위치하고, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3은 경쇄 가변 영역(VL)에 위치하며 여기서 각각의 가변 영역내 나머지 서열은 골격(FR) 영역을 구성함으로써 각각의 CDR은 총 4개의 FR 서열, 즉, FR1, FR2, FR3, 및 FR4에 대해 2개의 FR 영역 서열 사이에 위치한다. 당해 실시형태에서, 가변 영역내 FR 및 CDR 서열의 배열은 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이다. 당해 실시형태에서, VH 영역 및 VL 영역의 연합에 의해 형성된 결합 도메인은 8개의 FR 서열 및 6개의 CDR을 포함한다.
- [0472] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 CDR-이식된 항체를 포함하며, 여기서 하나의 종(공여체 종)의 항체의 VH 및/또는 VL 영역의 하나 이상의 CDR은 당해 분야에서 이용가능한 재조합 기술을 사용하여 다른(수용체) 종의 항체의 VH 및/또는 VL의 상응하는 CDR내로 이식되고 대체된다. 공여체 종의 예는 본원에 기술된 래트 항-사람 DLL4 모노클로날 항체이며 수용체 종의 예는 사람 면역글로불린 감마(IgG) 분자이고, 여기서 사람 IgG 분자의 VH 및 VL 영역의 사람 FR 서열은 공여체 래트 모노클로날 항체로부터의 CDR내에 이식된 것을 수용하는 사람 수용체 골격 서열이다. 수득되는 CDR-이식된 항체의 사람 수용체 골격 서열은 추가로 돌연변이되어 CDR-이식된 항체의 하나 이상의 특성을 개선시킬 수 있다. 비-제한적 예로서, CDR-이식된 항체의 하나 이상의 FR 서열 중 하나 이상의 잔기는 돌연변이되어 사람 대상체에서 DLL4 결합 친화성을 개선시키거나 CDR-이식된 항체의 면역원성을 저하시킬 수 있다.
- [0473] 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는 DLL4 결합 단백질은 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게는, DLL4 결합 단백질은 하나 이상(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 사람 수용체 골격 서열을 포함한다.
- [0474] 본 발명의 DLL4 결합 단백질내에 존재하는 사람 수용체 골격 서열은 DLL4에 결합하는 래트 모노클로날 항체내 존재하는 하나 이상의 상응하는 아미노산 잔기로 역(back) 돌연변이되고/되거나 바람직하지 않은 반응에 대한 부위(들)를 감소시키거나 제거함으로써, 예를 들면, 바람직하지 않은 글리코실화에 대한 부위 및/또는 바람직하지 않은 N-말단 피로글루타메이트 형성에 대한 부위 및/또는 잠재적으로 감소된 면역원성 위험에 대한 부위를 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 아미노산 잔기로 돌연변이되는, 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.
- [0475] 하나의 실시형태에서, 상기 기술한 하나 이상의 CDR을 포함하는 DLL4 결합 단백질은 하기 표 3 및 표 4에서의 사람 수용체 골격 서열의 그룹으로부터 선택된 하나 이상(예를 들면, 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 사람 수용체 골격 서열을 추가로 포함한다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질내에 존재하는 표 3 및 표 4로부터의 하나 이상의 사람 수용체 골격 서열은 DLL4에 결합하고/하거나 바람직하지 않은 반응에 대한 부위(들)를 감소시키거나 제거함으로써, 예를 들면, 바람직하지 않은 글리코실화에 대한 부위 및/또는 바람직하지 않은 N-말단 피로글루타메이트 형성에 대한 부위 및/또는 잠재적으로 감소된 면역원성 위험에 대한 부위를 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 아미노산으로 돌연변이된 래트 모노클로날 항체내에 존재하는 하나 이상의 상응하는 아미노산 잔기로 역 돌연변이된 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가로 포함한다.
- [0476] 다른 실시형태에서, 본 발명은 상기 기술한 하나 이상 CDR을 포함하는 DLL4 결합 단백질을 제공하며, 여기서 결합 단백질은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 가변 영역 서열내에 존재하는 임의의 골격 서열로부터 선택된 사람 수용체 골격 서열 중 하나 이상(예를 들면, 결합 도메인당 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)를 또한 포함한다:

서열 번호 171 VH.1 1A11	서열 번호 180 VH.1a 38H12	서열 번호 188 VH h1A11.A6	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 172 VH.1a 1A11	서열 번호 181 VH.1b 38H12	서열 번호 189 VH h1A11.A8	서열 번호 197 VL h1A11.VL.1
서열 번호 173 VH.1b 1A11	서열 번호 182 VH.2a 38H12	서열 번호 190 VH h1A11.C6	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 174 VH.2a 1A11	서열 번호 183 VL.1 38H12	서열 번호 191 VH h1A11.A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 175 VL.1 1A11	서열 번호 184 VL.1a	서열 번호 192 VH h1A11.B5	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 176 VL.1a 1A11	서열 번호 185 VL.1b	서열 번호 193 VH h1A11.E12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 177 VL.1b 1A11	서열 번호 186 VL.2a	서열 번호 194 VH h1A11.G3	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 178 VL.2a 1A11	서열 번호 187 VH h1A11.VH.1	서열 번호 195 VH h1A11.F5	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 179 VH.1 38H12			

[0477]

[0478]

본 발명의 또 다른 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상(예를 들면, 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개)의 수용체 골격 서열을 추가로 포함한다:

[0479]

중쇄 골격-1 (H-FR1):

[0480]

E-V-Q-L-V-E-S-G-G-L-V-Q-P-G-G-S-L-R-L-S-C-A-A-S-G-F-T-F-X₃₀ (서열 번호 143)(여기서 X₃₀은 S, R, 또는 G 이다);

[0481]

중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

[0482]

중쇄 골격-3 (H-FR3):

[0483]

R-F-T-I-S-R-D-N-A-K-X₁₁-S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C-X₃₁-R(서열 번호 145)(여기서;

[0484]

X₁₁은 N 또는 S이고;

[0485]

X₃₁은 A 또는 S이다);

[0486]

중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

[0487]

경쇄 골격-1 (L-FR1):

[0488]

D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

[0489]

경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K-X₉-P-K-L-L-I-X₁₅ (서열 번호 148)(여기서;

[0490]

X₉는 A 또는 S이고;

[0491]

X₁₅은 F 또는 Y이다);

[0492]

경쇄 골격-3 (L-FR3):

[0493]

G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-X₁₅-T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

[0494]

X₁₅은 F 또는 S이다); 및

[0495]

경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

[0496]

다른 실시형태에서, 상기 기술한 하나 이상의 CDR를 포함하는 DLL4 결합 단백질은 또한 상기 기술한 사람 수용체 골격 서열을 포함하고, 여기서 사람 수용체 골격 서열은 주요 잔기에서 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 주요 잔기는 CDR에 인접한 잔기, 글리코실화 부위 잔기, 드문 잔기, 사람 DLL4와 상호 작용할 수 있는 잔기, CDR과 상호작용할 수 있는 잔기, 표준 잔기(canonical residue), 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기, 베르니어 영역(Vernier zone)내 잔기, 및 초티아(Chothia)-정의된 가변 중쇄 CDR1 과 카바트(Kabat)-정의된 제1 중쇄 골격 사이에 중첩된 영역내 잔기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0497] 다른 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질의 사람 수용체 골격 서열은 적어도 하나의 골격 영역 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 골격의 아미노산 서열은 사람 배선 수용체 골격의 서열에 대해 적어도 65% 동일하고, 사람 배선 수용체 골격에 대해 동일한 적어도 70개 아미노산 잔기를 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 컨센스 사람 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0498] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 사람 수용체 골격 서열을 포함하는 DLL4 결합 단백질을 제공하며, 여기서 결합 단백질은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 가변 도메인을 포함한다:

서열 번호 171 VH VH.1 1A11	서열 번호 188 VH h1A11.A6
서열 번호 172 VH VH.1a 1A11	서열 번호 189 VH h1A11.A8
서열 번호 173 VH VH.1b 1A11	서열 번호 190 VH h1A11.C6
서열 번호 174 VH VH.2a 1A11	서열 번호 191 VH h1A11.A11
서열 번호 175 VL VL.1 1A11	서열 번호 192 VH h1A11.B5
서열 번호 176 VL VL.1a 1A11	서열 번호 193 VH h1A11.E12
서열 번호 177 VL VL.1b	서열 번호 194 VH h1A11.G3
서열 번호 178 VL VL.2a 1A11	서열 번호 195 VH h1A11.F5
서열 번호 179 VH VH.1 38H12	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 180 VH VH.1a 38H12	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 181 VH VH.1b 38H12	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 182 VH VH.2a 38H12	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 183 VL VL.1 38H12	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 184 VL VL.1a 38H12	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 185 VL VL.1b 38H12	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 186 VL VL.2a 38H12	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 187 VH h1A11VH.1	

[0499]

[0500] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 상기 기술한 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 2개의 가변 도메인을 포함하며, 여기서 2개의 가변 도메인은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다:

서열 번호 171 및 서열 번호 175 VH.1 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 180 및 서열 번호 186 VH.1a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 176 VH.1 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 183 VH.1b 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 177 VH.1 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 184 VH.1b 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 178 VH.1 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 185 VH.1b 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 175 VH.1a 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 181 및 서열 번호 186 VH.1b 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 176 VH.1a 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 183 VH.2a 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 177 VH.1a 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 184 VH.2a 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 178 VH.1a 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 185 VH.2a 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 173 및 서열 번호 175 VH.1b 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 182 및 서열 번호 186 VH.2a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 173 및 서열 번호 176 VH.1b 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 188 및 서열 번호 197 h1A11.A6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 177 VH.1b 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 190 및 서열 번호 197 h1A11.C6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 178 VH.1b 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 191 및 서열 번호 197 h1A11.A11 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 175 VH.2a 및 VL.1 1A11 (표 12)	서열 번호 189 및 서열 번호 197 h1A11.A8 VH 및 h1A11 VL.1 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 176 VH.2a 및 VL.1a 1A11 (표 12)	서열 번호 1878 및 서열 번호 201 h1A11VH.1 및 h1A11.B4 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 177 VH.2a 및 VL.1b 1A11 (표 12)	서열 번호 187 및 서열 번호 200 h1A11VH.1 및 h1A11.A7 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 178 VH.2a 및 VL.2a 1A11 (표 12)	서열 번호 187 및 서열 번호 199 h1A11VH.1 및 h1A11.A12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 183 VH.1 및 VL.1 38H12 (표 16)	서열 번호 187 및 서열 번호 198 h1A11VH.1 VH 및 h1A11.A2 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 184 VH.1 및 VL.1a 38H12 (표 16)	서열 번호 192 및 서열 번호 202 h1A11.B5 VH 및 h1A11.B5 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 185 VH.1 및 VL.1b 38H12 (표 16)	서열 번호 193 및 서열 번호 203 h1A11.E12 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 186 VH.1 및 VL.2a 38H12 (표 16)	서열 번호 194 및 서열 번호 203 h1A11.G3 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 180 및 서열 번호 183 VH.1a 및 VL.1 38H12 (표 16)	서열 번호 195 및 서열 번호 203 h1A11.F5 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21

[0501]

서열 번호 180 및 서열 번호 184 VH.1a 및 VL.1a 38H12 (표 16)	서열 번호 196 및 서열 번호 203 h1A11.H2 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 180 및 서열 번호 185 VH.1a 및 VL.1b 38H12 (표 16)	

[0502]

[0503]

하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 가변 도메인을 포함한다:

서열 번호 157 VH 38H12	서열 번호 181 VH VH.1b 38H12
서열 번호 158 VL 38H12	서열 번호 182 VH VH.2a 38H12
서열 번호 159 VH 1A11	서열 번호 182 VL VL.1 38H12
서열 번호 160 VL 1A11	서열 번호 184 VL VL.1a 38H12
서열 번호 161 VH 37D10	서열 번호 185 VL VL.1b 38H12
서열 번호 162 VL 37D10	서열 번호 186 VL VL.2a 38H12
서열 번호 163 VH 32C7	서열 번호 187 VH h1A11VH.1
서열 번호 164 VL 32C7	서열 번호 188 VH h1A11.A6
서열 번호 165 VH 14G1	서열 번호 189 VH h1A11.A8
서열 번호 166 VL 14G1	서열 번호 190 VH h1A11.C6
서열 번호 167 VH 14A11	서열 번호 191 VH h1A11.A11
서열 번호 168 VL 14A11	서열 번호 192 VH h1A11.B5
서열 번호 169 VH 15D6	서열 번호 193 VH h1A11.E12
서열 번호 170 VL 15D6	서열 번호 194 VH h1A11.G3
서열 번호 171 VH VH.1 1A11	서열 번호 195 VH h1A11.F5
서열 번호 172 VH VH.1a 1A11	서열 번호 196 VH h1A11.H2
서열 번호 173 VH VH.1b 1A11	서열 번호 197 VL h1A11VL.1
서열 번호 174 VH VH.2a 1A11	서열 번호 198 VL h1A11.A2
서열 번호 175 VL VL.1 1A11	서열 번호 199 VL h1A11.A12
서열 번호 176 VL VL.1a 1A11	서열 번호 200 VL h1A11.A7
서열 번호 177 VL VL.1b	서열 번호 201 VL h1A11.B4
서열 번호 178 VL VL.2a 1A11	서열 번호 202 VL h1A11.B5
서열 번호 179 VH VH.1 38H12	서열 번호 203 VL h1A11.E12
서열 번호 180 VH VH.1a 38H12	

[0504]

[0505]

다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 2개의 가변 도메인을 포함하며, 여기서 2개의 가변 도메인은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다:

서열 번호 157 및 서열 번호 158 38H12	서열 번호 179 및 서열 번호 186 VH.1 및 VL.2a 38H12 (표 16)
서열 번호 159 및 서열 번호 160 1A11	서열 번호 180 및 서열 번호 183 VH.1a 및 VL.1 38H12 (표 16)
서열 번호 161 및 서열 번호 162 37D10	서열 번호 180 및 서열 번호 184 VH.1a 및 VL.1a 38H12 (표 16)
서열 번호 163 및 서열 번호 164 32C7	서열 번호 180 및 서열 번호 185 VH.1a 및 VL.1b 38H12 (표 16)
서열 번호 165 및 서열 번호 166 14G1	서열 번호 180 및 서열 번호 186 VH.1a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 167 및 서열 번호 168 14A11	서열 번호 181 및 서열 번호 183 VH.1b 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 169 및 서열 번호 170 15D6	서열 번호 181 및 서열 번호 184 VH.1b 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 175 VH.1 및 VL.1 1A11 (표 11)	서열 번호 181 및 서열 번호 185 VH.1b 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 176 VH.1 및 VL.1a 1A11 (표 11)	서열 번호 181 및 서열 번호 186 VH.1b 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 177 VH.1 및 VL.1b 1A11 (표 11)	서열 번호 182 및 서열 번호 183 VH.2a 및 VL.1 (표 16)
서열 번호 171 및 서열 번호 178 VH.1 및 VL.2a (표 11)	서열 번호 182 및 서열 번호 184 VH.2a 및 VL.1a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 175 VH.1a 및 VL.1 (표 11)	서열 번호 182 및 서열 번호 185 VH.2a 및 VL.1b (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 176 VH.1a 및 VL.1a (표 11)	서열 번호 182 및 서열 번호 186 VH.2a 및 VL.2a (표 16)
서열 번호 172 및 서열 번호 177 VH.1a 및 VL.1b (표 11)	서열 번호 188 및 서열 번호 197 h1A11.A6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 172 및 서열 번호 178 VH.1a 및 VL.2a (표 11)	서열 번호 190 및 서열 번호 197 h1A11.C6 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 175 VH.1b 및 VL.1 (표 11)	서열 번호 191 및 서열 번호 197 h1A11.A11 VH 및 h1A11VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 176 VH.1b 및 VL.1a (표 11)	서열 번호 189 및 서열 번호 197 h1A11.A8 VH 및 h1A11 VL.1 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 177 VH.1b 및 VL.1b (표 11)	서열 번호 187 및 서열 번호 201 h1A11VH.1 및 h1A11.B4 VL 표 20/21
서열 번호 173 및 서열 번호 178 VH.1b 및 VL.2a (표 11)	서열 번호 187 및 서열 번호 200 h1A11VH.1 및 h1A11.A7 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 175 VH.2a 및 VL.1 (표 11)	서열 번호 187 및 서열 번호 199 h1A11VH.1 및 h1A11.A12 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 176 VH.2a 및 VL.1a (표 11)	서열 번호 187 및 서열 번호 198 h1A11VH.1 VH 및 h1A11.A2 VL 표 20/21
서열 번호 174 및 서열 번호 177 VH.2a 및 VL.1b (표 11)	서열 번호 192 및 서열 번호 202 h1A11.B5 VH 및 h1A11.B5 VL 표 20/21

[0506]

서열 번호 174 및 서열 번호 178 VH.2a 및 VL.2a (표 11)	서열 번호 193 및 서열 번호 203 h1A11.E12 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 183 VH.1 및 VL.1 38H12 (표 16)	서열 번호 194 및 서열 번호 203 h1A11.G3 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 184 VH.1 및 VL.1a 38H12 (표 16)	서열 번호 195 및 서열 번호 203 h1A11.F5 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21
서열 번호 179 및 서열 번호 185 VH.1 및 VL.1b 38H12 (표 16)	서열 번호 196 및 서열 번호 203 h1A11.H2 VH 및 h1A11.E12 VL 표 20/21

[0507]

[0508] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 2개의 가변 도메인을 포함한다:

[0509] 서열 번호 188 (h1A11.A6 VH) 및 서열 번호 197 (h1A11VL.1),

[0510] 서열 번호 190 (h1A11.C6 VH) 및 서열 번호 197 (h1A11VL.1), 및

[0511] 서열 번호 191 (h1A11.A11 VH) 및 서열 번호 197 (h1A11.VL.1).

- [0512] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 아미노산 서열 번호 181 (VH.1b 38H12) 및 서열 번호 185 (VL.1b 38H12)을 갖는 2개의 가변 도메인을 포함한다.
- [0513] 본 발명에 따라서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질 중 어느 하나의 가변 중쇄(VH) 도메인 및 가변 경쇄(VL) 도메인은 또한 당해 분야에서 이용가능한 재조합 기술을 사용하여 셔플(shuffle)되어 생성되고, 본원에 기술된 VH 및 VL 도메인의 각종 조합을 포함하는 추가의 DLL4 결합 단백질에 대해 선택될 수 있다.
- [0514] 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질은 사람 DLL4 (hu DLL4) 및 적어도 하나의 다른 종의 DLL4에 결합한다. 보다 바람직하게는, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 사람 DLL4, 및 사이노몰거스 (cynomolgus) 원숭이 DLL4(사이노몰거스 DLL4, cyno DLL4), 마우스 DLL4(mu DLL4), 래트 DLL4, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4에 결합한다.
- [0515] 다른 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 노치(Notch) 단백질과의 DLL4 상호작용을 차단할 수 있다. 바람직하게는, 노치 단백질은 노치-1, 노치-2, 노치-3, 노치-4, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0516] 하나의 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 사람 DLL4의 하나 이상의 생물학적 기능을 조절하거나, 억제하거나 증화시킬 수 있다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 사람 DLL4, 사이노몰거스 DLL4, 원숭이 DLL4, 래트 DLL4, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DLL4의 활성을 조절하거나, 억제하거나 증화시킬 수 있다.
- [0517] 추가의 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 VEGFR2 활성, VEGFR1 활성, 또는 VEGFR2 및 VEGFR1 활성 둘 다를 억제할 수 있다.
- [0518] 하나의 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 정상 혈관형성을 억제할 수 있다.
- [0519] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은, 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, DLL4에 대한 온 속도 상수(on rate constant: K_{on})가 적어도 약 $10^2 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; 적어도 약 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 또는 적어도 약 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, DLL4에 대한 온 속도 상수(K_{on})가 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 내지 $10^3 M^{-1} s^{-1}$; $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 내지 $10^4 M^{-1} s^{-1}$; $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 내지 $10^5 M^{-1} s^{-1}$; 또는 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 내지 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 이다.
- [0520] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, DLL4에 대한 오프 속도 상수(off rate constant: K_{off})가 약 $10^{-3} s^{-1}$ 이하; 약 $10^{-4} s^{-1}$ 이하; 약 $10^{-5} s^{-1}$ 이하; 또는 약 $10^{-6} s^{-1}$ 이하이다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서 DLL4에 대한 오프 속도 상수(K_{off})가 $10^{-3} s^{-1}$ 내지 $10^{-4} s^{-1}$; $10^{-4} s^{-1}$ 내지 $10^{-5} s^{-1}$; 또는 $10^{-5} s^{-1}$ 내지 $10^{-6} s^{-1}$ 이다.
- [0521] 다른 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 DLL4에 대한 해리 상수(dissociation constant: K_D)가 약 $10^{-7} M$ 이하; 약 $10^{-8} M$ 이하; 약 $10^{-9} M$ 이하; 약 $10^{-10} M$ 이하; 약 $10^{-11} M$ 이하; 약 $10^{-12} M$ 이하; 또는 $10^{-13} M$ 이하이다. 바람직하게는, 본 발명의 결합 단백질은 DLL4에 대한 해리 상수(K_D)가 $10^{-7} M$ 내지 $10^{-8} M$; $10^{-8} M$ 내지 $10^{-9} M$; $10^{-9} M$ 내지 $10^{-10} M$; $10^{-10} M$ 내지 $10^{-11} M$; $10^{-11} M$ 내지 $10^{-12} M$; 또는 $10^{-12} M$ 내지 $10^{-13} M$ 이다.
- [0522] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 상기 기술된 DLL4 결합 단백질 및 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 고정 도메인을 포함하는 항체 작제물을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 항체 작제물은 면역글로불린 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 사람화된 항체, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 이항화물 결합된 Fv, scFv, 단일 도메인 항체, 디아바디(diabody), 다특이적인 항체, 이중 특이적인 항체, 및 이특이적인 항체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0523] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체 작제물은 사람 IgM 고정 도메인, 사람 IgG1 고정 도메인, 사람 IgG2 고정 도메인, 사람 IgG3 고정 도메인, 사람 IgG4 고정 도메인, 사람 IgE 고정 도메인, 및 사람 IgA 고정 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중쇄 면역글로불린 고정 도메인을 포함한다.

- [0524] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 작제물은 면역글로불린 감마-1 (IgG-1) 중쇄 고정 영역(예를 들면, 서열 번호 3), 돌연변이체 IgG-1 중쇄 고정 영역(예를 들면, 서열 번호 4), 면역글로불린 카파 경쇄 고정 영역(예를 들면, 서열 번호 5), 면역글로불린 람다 경쇄 고정 영역(예를 들면, 서열 번호 6), 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 면역글로불린 고정 영역을 포함한다.
- [0525] 다른 실시형태에서, 항체 작제물은 글리코실화되어 있다. 바람직하게는, 글리코실화는 사람 글리코실화 패턴이다.
- [0526] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 제제에 접합된 본원에 기술된 항체 작제물을 포함하는 항체 접합체를 제공한다. 바람직하게는, 제제는 영상화제, 치료제, 세포독성제, 및 면역부작 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 영상화제는 방사성 표지, 효소, 형광성 표지, 발광성 표지, 생물발광성 표지, 자기 표지, 및 비오틴으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 영상화제는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 및 ^{153}Sm 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 방사성 표지이다. 바람직한 실시형태에서, 치료제 또는 세포독성제는 항-대사물질, 알킬화제, 항생제, 성장 인자, 사이토킨, 항-혈관형성제, 항-유사분열제, 안트라사이클린, 독소, 및 세포자멸사제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0527] 다른 실시형태에서, 상기 기술된 DLL4 결합 단백질, 항체 작제물, 또는 항체 접합체는 결정으로서 존재한다. 바람직하게는, 결정은 담체-불포함 약제학적 제어 방출 결정이다. 다른 실시형태에서, 이러한 결정화된 결합 단백질, 결정화된 항체 작제물, 또는 결정화된 항체 접합체는, 이의 가용성 대응물보다 생체내 반감기가 더 크다. 바람직한 실시형태에서, 결정화된 결합 단백질, 결정화된 항체 작제물, 또는 결정화된 항체 접합체는 결정화 후 가용성 또는 비-결정형의 결합 단백질, 항체 작제물, 또는 항체 접합체의 생물학적 활성을 유지한다.
- [0528] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질(임의의 항체 작제물 또는 항체 접합체를 포함함)의 하나 이상의 아미노산 서열을 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0529] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 중쇄 가변 도메인(여기서 중쇄 가변 도메인은 상기 기술된 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3 중 하나 이상을 포함한다); 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드(여기서, 경쇄 가변 도메인은 상기 기술된 CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3 중 하나 이상을 포함한다); 및 폴리펩타이드 둘 다의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다.
- [0530] 본 발명의 하나의 양상은 DLL4 결합 단백질, 항체 작제물, DLL4 결합 항체 접합체, 또는 이들의 DLL4 결합 부분을 암호화하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 중쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드(여기서, 중쇄 가변 도메인은 상기 기술된 CDR-H1, CDR-H2, 또는 CDR-H3을 포함한다); 경쇄 가변 도메인을 포함하는 폴리펩타이드(여기서, 경쇄 가변 도메인은 상기 기술된 CDR-L1, CDR-L2, 또는 CDR-L3을 포함한다); 또는 폴리펩타이드 둘 다의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산이 특히 바람직하다.
- [0531] 추가의 실시형태는 본원에 기술된 분리된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 벡터는 pcDNA, pTT[참조: Durocher et al., *Nucl. Acids Res.*, 30(2e9): 1-9 (2002)], pTT3(추가 다중 클로닝 부위를 지닌 pTT), pEFBOS[참조: Mizushima et al., *Nucl. Acids. Res.*, 18 (17): 5322 (1990)], pBV, pJV, 및 pBJ로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0532] 본 발명의 다른 양상에서, 상기 기술된 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 제공된다. 숙주 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 바람직한 원핵 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)이다. 바람직하게는, 진핵 세포는 원생 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 숙주 세포는 CHO 및 COS 세포를 포함하나, 이들에 한정되지 않는 포유동물 세포이다. 바람직한 진균 세포는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)이다. 바람직한 곤충 세포는 Sf9 세포이다.
- [0533] 본 발명의 다른 양상에서, 상기 기술된 숙주 세포 중 어느 하나를, 사람 DLL4에 결합하는 결합 단백질을 생산하기에 충분한 조건 하에서 배양 배지 중에서 배양하는 단계를 포함하는, 사람 DLL4에 결합하는 결합 단백질을 생산하는 방법이 제공된다.
- [0534] 하나의 실시형태는 본 발명에 따른 DLL4 결합 단백질의 방출용 조성물을 제공하며, 여기서 당해 조성물은 상기 기술한 바와 같은 결정화된 DLL4 결합 단백질, 결정화된 항체 작제물, 또는 결정화된 접합체, 및 성분, 및 추가의 적어도 하나의 중합체 담체를 포함하는 제형을 포함한다. 바람직하게는, 중합체 담체는 폴리(아크릴산), 폴리(시아노아크릴레이트), 폴리(아미노산), 폴리(무수물), 폴리(펩타이드), 폴리(에스테르), 폴리(락트산),

폴리(락틱-코-글리콜산) 또는 PLGA, 폴리(b-하이드록시부티레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리(디옥사논); 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리((하이드록시프로필)메타크릴아미드, 폴리[(오가노)포스파젠], 폴리(오르토 에스테르), 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 말레산 무수물-알킬 비닐 에테르 공중합체, 플루로닉 폴리올, 알부민, 알기네이트, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체, 콜라겐, 피브린, 젤라틴, 하이알루론산, 올리고사카라이드, 글리카미노글리칸, 실페이트화된 폴리사카라이드, 이들의 배합물 및 공중합체로 이루어진 그룹 중의 하나 이상으로부터 선택된 중합체이다. 바람직하게는, 성분은 알부민, 슈크로스, 트레할로스, 락티톨, 젤라틴, 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 메톡시폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0535] 다른 실시형태는 포유동물에게 상기 기술된 결정화된 DLL4 결합 단백질, 결정화된 항체 작제물, 또는 결정화된 항체 접합체를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다.

[0536] 본 발명은 또한 상기 기술한 바와 같은 DLL4 결합 단백질(상기 기술한 바와 같은 항체 작제물 또는 항체 접합체를 포함함) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 제공한다. 추가의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가의 제제를 포함한다. 추가의 제제는, DLL4가 유해한 장애를 치료하기 위한 치료제일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물은 치료제; 영상화제; 항신생물제; 화학치료제; 혈관형성 억제제; 항-VEGF 항체; 항-EGFR 항체; 항-cMet 항체; 항-ErbB3 항체; 항-HER2 항체; 항-CD20 항체; VEGF-트랩(trap) 분자; 키나제 억제제; 동시-자극 분자 차단제; 항-B7.2 항체; a CTLA4-Ig; 부착 분자 차단제; 항-E 선택틴 항체; 항-L 선택틴 항체; 항-사이토킨 항체 또는 이들의 기능성 단편; 항-IL-18 항체; 항-TNF 항체; 항-IL-6 항체; 메토티렉세이트; 코르티코스테로이드; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; DNA 알킬화제; 시스플라틴; 항-투블린제; 파클리탁셀; 도세탁셀; 독소루비신; 겐시타빈; 겐자르; 안트라사이클린; 아드리아마이신; 토포이소머라제 I 억제제; 토포이소머라제 II 억제제; 5-플루오로우라실(5-FU); 류코보린; 이리노테칸; 수용체 타이로신 키나제 억제제; 세포자멸사 억제제; Bcl2/Bclx 억제제; 에블로티니브; 게피티니브; COX-2 억제제; 셀렉코시브; 사이클로스포린; 라파마이신, 검출가능한 표지 또는 리포터 분자; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제; 마약; 진통제; 마취제; 진정제; 국소 마취제; 신경근육 차단제; 항미생물제; 항건선제; 코르티코스테로이드; 동화작용 스테로이드; 에리트로포이에틴; 면역화; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사성 약제학적 약물; 항우울제; 정신병 약물; 자극제; 천식 의약; 베타 효능제; 흡입된 스테로이드; 에피네프린; 이의 에피네프린 유사체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택된 추가의 제제를 포함한다.

[0537] 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 결합 단백질과 사람 DLL4를 접촉시켜 사람 DLL4가 억제되거나 중화되도록 함을 포함하는, 사람 DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 관련 양상에서, 본 발명은 사람 대상체에게 상기 기재된 결합 단백질을 투여함으로써 사람 대상체에서 사람 DLL4가 억제되고 치료가 달성되도록 함을 포함하는, DLL4가 유해한 장애로 고생하는 사람 대상체에서 DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 장애는 원발성 및 전이성 암, 예를 들면 유방, 결장, 직장, 폐, 입인두, 하인두, 식도, 위장, 췌장, 간, 쓸개 및 담관, 소장, 노관(신장, 방광 및 요로상포 포함), 여성 생식기관(자궁경부, 자궁 및 난소, 및 또한 융모막암종 및 임신영양막병 포함), 남성 생식기관(전립선, 정낭, 고환, 및 배 세포 종양 포함), 내분비선(갑상선, 부신, 및 뇌하수체 포함), 및 피부의 암종, 및 또한 혈관종, 흑색종, 육종[골 및 연조직으로부터 발생한 것들 및 또한 카포시 육종(Kaposi's sarcoma) 포함], 뇌, 신경, 눈, 및 뇌척수막(성상세포종, 신경교종, 교모세포종, 망막아세포종, 신경종, 신경아세포종, 신경초종, 및 수막종 포함), 백혈병 및 림프종[호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma) 및 비-호지킨 림프종 둘 다]과 같은 조혈성 악성암의 고형 종양, 종양 전이, 안구 신생혈관증식(당뇨병성 실명, 망막병, 노화-유도된 황반 변성 및 피부홍조 포함), 부종, 류마티스 관절염, 죽상경화관, 난치성 복수, 건선, 췌장염, 다낭성 난소병(POD), 자궁내막증, 자궁 섬유양, 양성 전립선 비대증, T-세포 급성 림프아구 백혈병(T-ALL), 피질하 경색증을 갖는 대뇌 보통 우성 동맥병증(cerebral autosomal dominant arteriopathy) 및 백질뇌병(CADASIL), 다발성 경화증(MS), 팔로네 징후(tetralogy of Fallot: TOF), 알라질 증후군(Alagille syndrome: AS), 황반 변성 및 노화-관련 황반 변성 질환, 및 비정상적인 DLL4 발현 또는 활성을 특징으로 하는 다른 혈관형성 독립적인 및 의존적인 질환을 포함하는 그룹으로부터 선택된다.

[0538] 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기재된 결합 단백질 중 어느 하나를 치료학적 유효량의 제2 제제의 투여 전, 동시 또는 후에 투여하는 단계를 포함하는, 사람 DLL4가 유해한 장애로 고생하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 제2 제제는 방사선 치료제; 항신생물제; 화학치료제; DNA 알킬화제; 시스플라틴; 카보플라틴; 항-투블린제; 파클리탁셀; 도세탁셀; 탁솔; 독소루비신; 겐시타빈; 겐자르; 안트라사이클린; 아드리아마이신; 토포이소머라제 I 억제제; 토포이소머라제 II 억제제; 5-플루오로우라실(5-FU); 류코보린; 이리노테칸; 수용체 타이로신 키나제 억제제; 세포자멸사 억제제; Bcl2/Bclx 억제제; 에블로티니브; 게피티니브; COX-2 억제제; 셀렉코시브; 키나제 억제제; 혈관형성 억제제; 항-VEGF 항체; 항-EGFR 항체; 항-cMet 항체; 항-ErbB3

항체; 항-HER2 항체; 항-CD20 항체; VEGF-트랩(아플리베르셉트); 동시-자극 분자 차단제; 항-B7.1 항체; 항-B7.2 항체; CTLA4-Ig; 부착 분자 차단제; 항-LFA-1 항체; 항-E 셀렉틴 항체; 항-L 셀렉틴 항체; 소 분자 억제제; 항-사이토킨 항체 또는 이들의 기능성 단편; 항-IL-18 항체; 항-TNF 항체; 항-IL-6 항체; 항-사이토킨 수용체 항체; 메토티렉세이트; 사이클로스포린; 라파마이신; FK506; 검출가능한 표지 또는 리포터; TNF 길항제; 항류마티스제; 근육 이완제; 마약; 비-스테로이드 소염 약물(NSAID); 진통제; 마취제; 진정제; 국소 마취제; 신경근육 차단제; 항미생물제; 항건선 약물; 코르티코스테로이드; 동화작용 스테로이드; 에리트로포이에틴; 면역화; 면역글로불린; 면역억제제; 성장 호르몬; 호르몬 대체 약물; 방사성 약제학적 약물; 항우울제; 정신병 약물; 자극제; 천식 의약; 베타 효능제; 흡입된 스테로이드; 에피네프린; 에피네프린 유사체; 사이토킨; 및 사이토킨 길항제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0539] 바람직한 실시형태에서, 상기 기재된 약제학적 조성물은 대상체에게 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 관절낭내, 연골내, 강내, 복내(intracelial), 소뇌내, 대뇌심실내, 대장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장내, 복강내, 흉강내, 전립선내, 폐내, 직장내, 망막내, 척주내, 윤활막내, 흉곽내, 자궁내, 방광내, 1회분(bolus), 질내, 직장, 볼, 설하, 비강내, 및 경피로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 방식으로 투여된다.

[0540] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 적어도 하나의 DLL4 결합 단백질에 대한 적어도 하나의 DLL4 항-유전형 항체를 제공한다. 항-유전형 항체는 이들에 제한되지 않지만, 본 발명의 결합 단백질내로 도입될 수 있는 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 리간드 결합 부분, 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 중쇄 또는 경쇄 고정 영역, 골격 영역, 및 이들의 임의의 부분의 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)과 같은 면역글로불린 분자의 적어도 일부를 포함하는 분자를 함유하는 임의의 단백질 또는 펩타이드를 포함한다.

[0541] 다양한 면역검출 검사 양식 중 어느 하나는 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 사용하기 위해 조정되어 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료 중에서 DLL4를 검출하거나 측정할 수 있다. 이러한 면역검출 검사 양식은 방사선 면역 검사(RIA), 면역침전, 효소-결합된 면역흡착 검사(ELISA), 면역블롯(예를 들면, 웨스턴(Western)), 기질에 흡착되거나 고정된 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 포함하는 면역스트립(예를 들면, 면역딥스틱(immunodipsticks)), FACS, 등을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 사용한 DLL4의 검출은 시험관내에서 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료 중에서 수행할 수 있다. 본 발명의 결합 단백질과 접촉시켜 시료 중에서 DLL4를 검출하거나 측정할 수 있는 생물학적 시료는 뇨, 타액, 경구 도말(볼, 혀 또는 인후 도말), 피부 도말, 피부 스크레이프(scrape), 직장 도말, 질 도말, 전혈 시료, 혈장 시료, 혈청 시료, 조직 생검, 및 당해 분야에 공지된 과정에 의해 개체로부터 수득된 임의의 다른 시료를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 다른 실시형태에서, DLL4 결합 단백질을 사용하여 X-선 컴퓨터 단층 촬영법(CT), 자기 공명 영상(MRI), 및 양전자 방출 단층 촬영(PET)을 포함하나, 이들에 한정되지 않는 각종 단층 촬영법 및 주사 방법과 같이 생체내 DLL4를 검출할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0542] **발명의 상세한 설명**

[0543] 본 발명은 DLL4에 결합하는 DLL4 결합 단백질, 특히 항-DLL4 항체, 또는 이의 항원-결합 부분에 관한 것이다. 사람 DLL4에 대한 아미노산 서열(서열 번호 1)은 상응하는 DLL4 뉴클레오타이드 암호화 서열(서열 번호 2)과 함께 표 1에 나타나 있다. 본 발명의 각종 양상은 항체 및 항체 단편, 및 이의 약제학적 조성물, 및 이러한 항체 및 단편을 제조하기 위한 핵산, 재조합체 발현 벡터, 및 숙주 세포에 관한 것이다. 시험관내 또는 생체내에서, 본 발명의 항체를 사용하여 사람 DLL4 또는 뮤린 DLL4를 검출하는 방법, 사람 또는 마우스 DLL4 및/또는 사람 또는 마우스 VEGFR2 또는 VEGFR1 활성을 억제하는 방법, 및 유전자 발현을 조절하는 방법이 또한 본 발명에 포함된다.

표 1

사람 DLL4에 대한 아미노산 및 뉴클레오타이드 암호화 서열.

서열의 종류	서열 동정	서열
		123456789012345678901234567890
사람 DLL4 아미노산 서열	서열 번호 1	MAAASRSASGWALLLLVALWQORAAGSGVF QLQLQEFINERGVLASGRPCPEPCRTFFRV CLKHFFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFA VRDSSGGGRNPLQLPFFNFTWPGTFSLIIE AWHAPGDDLRPEALPPDALISKIAIQGSLA VGQNWLLDEQTSSTLRLRYSYRVICSDNY GDNC SRLCKKRNDFHGHVVCQPDGNLSCLP GWTGEYCQQPICLSGCHQNGYCSKFAECL CRFGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCTFPWQC TCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSFCKNGATC SNSGQRSYTCCTCRPGYTGVDCELELSECD NPCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGYGLHCE HSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACEC PPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNR GPSRMCRCRPGFTGTTCYCELVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRCBVRTS IDCASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPY GFVGSRCFFPVGLPSPFPWVAVSLGVGLAV LLVLLGMVAVRQLRLRRPDDGSRAMNN LSDFQKDNLIIPAAQLKNTNQKKELEVDCGL DKSNCGKQNHITLDYNLAPGPLGRGTMPGK FPHSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAICS PRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV
사람 DLL4 뉴클레오타이드 암호화 서열	서열 번호 2	atggcgagcagcgtcccgagcgcctctggc tggcgctactgctgctggtggcactttgg cagcagcgcgcggccggctccggcgtcttc cagctgcagctgcaggagttcatcaacgag cgcggtactggccagtgggcggtctgc gagcccggtgcccgaactttcttcgcgtc tgcttaagcacttccaggcggtcgctcg ccggaccctgcaccttcgggaccgtctcc acgcgggtattgggcaccaactccttcgct gtccgggacgacagtagcggcgggggcg aacctctccaactgcccttcaatttcacc tggcggtaccttctcgctcatcatcgaa gcttggcacgcgcaggagacgacctggg ccagaggccttgccaccagatgcactcatc agcaagatcgccatccagggtcccttagct gtgggtcagaactggttattggatgagcaa accagcaccctcacaaggctgcgctactct taccgggtcatctgcagtgacaactactat ggagacaactgctccgcctgtgcaagaag cgcaatgaccacttcggccactatgtgtgc cagccagatggcaacttgctcgtcctgccc ggttgactgggaatattgccaacagcct atctgtcttcgggtgtcatgaacagaat ggctactgcagcaagccagcagagtgcctc tgccgcccagggtggcaggcggtgtgt aacgaatgcacccccacaatggctgtcgc

[0544]

서열의 종류	서열 동정	서열
		123456789012345678901234567890
		cacggcacctgcagcactccctggcaatgt acttgtgatgagggtggggaggcctgtt tgtaccaagatctcaactactgcaccac cactccccatgcaagaatggggcaactgtc tccaacagtgggcagcgaagctacacctgc acctgtcgccaggctacactggtgtggac tgtgagctggagctcagcgagtgtgacagc aaccctgtcgcaatggaggcagctgtaag gaccaggaggatggctaccactgcctgtgt cctcgggctactatggcctgcattgtgaa cacagcaccttgagctgcgccactcccc tgcttcaatgggggtcctgccgggagcgc aaccagggggccaactatgcttgtgaatgt cccccaacttcaccgggtccaactgcgag aagaaagtggacaggtgcaccagcaacccc tgtccaacgggggacagtgcctgaaccga ggtccaagccgcatgtgccgtgccgtcct ggattcacgggcacctactgtgaactccac gtcagcgactgtgccgttaacccttgccgc cacggtggcacttgccatgacctggagaat gggctcatgtgcacctgccctgccggttc tctggccgacgtgtgaggtgccgacatcc atcgatgcctgtgcctcgagtcctgttc aacagggccacctgctacaccgacctctcc acagacacctttgtgtgcaactgcccttat ggctttgtgggcagcgcgtgcgagttcccc gtgggcttgccgccagcttccctgggtg gccgtctcgtgggtgtggggtggcagtg ctgctggtactgctgggcatggtggcagtg gctgtcggcagctgccgcttcgacggccg gacgacggcagcaggaagccatgaacaac ttgtcggacttcagaaggacaacctgatt cctgccgccagcttaaaaacacaaaccag aagaaggagctggaagtggactgtgcctg gacaagtccaactgtggcaaacagcaaac cacacattggactataatctgccccaggg cccctggggcgggggaccatgccaggaaag tttcccacagtgcacaagacttaggagag aaggcgccactgcggttacacagtgaag ccagagtgtcgatatcagcgatatgctcc cccagggactccatgtaccagtctgtgtgt ttgatatcagaggaggaatgaatgtgtc attgccacggaggtataa

[0545]

[0547]

본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당해 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 용어들의 의미 및 영역은 명백해야 하지만, 임의의 잠재적 모호한 사건에서도, 본원에 제공된 정의들이 어떠한 사전적 또는 외적인 정의보다 앞선다. 또한, 내용에서 달리 요구하지 않는 한, 단수 용어들은 복수를 포함하고 복수 용어들은 단수를 포함한다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 기술하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라 "포함하다" 및 "포함된"과 같은 다른 형태는 제한되지 않는다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어들은 하나의 단위 및 달리 구체적으로 기술하지 않는 한 하나 이상의 소단위를 포함하는 요소들 및 성분들을 포함하는 요소들 및 성분들 둘 다를 포함한다.

[0548]

일반적으로, 본원에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학의 기술 및 하이브리드화와 관련하여 사용된 명명법은 당해 분야에서 잘 공지되고 일반적으로 사용되는 것들이다. 본 발명의 방법 및 기술은 일반적으로 당해 분야에 잘 공지된 통상의 방법에 따라서 및 달리 나타내지 않는 한 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 각종 일반적이고 보다 특정한 참조문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 효소 반응 및 정제 기술은 당해 분야에서 일반적으로 달성되거나 본원에 기술된 바와 같이, 제조업자의 명세서에 따라 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학 및 약제 화학의 기술 및 이의 실험실 과정과 관련하여 사용된 명명법들은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 일반적으로 사용된다. 표준 기술이 화학적 합성, 화학적 분석, 약제학적 제제, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 사용된다.

- [0549] 본 발명을 보다 용이하게 이해할 수 있는 선택된 용어들을 하기 정의한다.
- [0550] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "폴리펩타이드"는 아미노산의 임의의 중합체쇄를 말한다. 용어 "펩타이드" 및 "단백질"은 용어 폴리펩타이드와 함께 상호교환적으로 사용되며, 또한 아미노산의 중합체쇄를 말한다. 용어 "폴리펩타이드"는 천연 또는 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체를 포함한다. 폴리펩타이드는 단량체성 또는 중합체성일 수 있다. 본원에서 "폴리펩타이드"의 사용은 달리 기술하지 않는 한, 폴리펩타이드 및 이의 단편 및 변이체(변이체의 단편 포함)를 포함하는 것으로 의도된다. 항원성 폴리펩타이드의 경우, 폴리펩타이드의 단편은 임의로 폴리펩타이드의 적어도 하나의 연속되거나 비선형인 에피토프를 함유한다. 적어도 하나의 에피토프 단편의 상세한 경계는 당해 분야의 통상의 기술을 사용하여 확인할 수 있다. 단편은 적어도 약 5개의 연속된 아미노산, 예를 들면, 적어도 약 10개의 연속된 아미노산, 적어도 약 15개의 연속된 아미노산, 또는 적어도 약 20개의 연속된 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드의 변이체는 본원에 기술되어 있다.
- [0551] 용어 "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩타이드"는 이의 기원 또는 유도체의 공급원으로 인해 이의 천연 상태에서 이와 동반하는 천연적으로 관련된 성분들과 연합되지 않거나; 동일한 종으로부터의 다른 단백질을 실질적으로 포함하지 않거나; 세포에 의해 상이한 종으로부터 발현되거나; 천연에서 발생하지 않는 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 따라서, 천연적으로 기원하는 세포와 상이한 세포 시스템내에서 합성되거나 화학적으로 합성되는 폴리펩타이드는 이의 천연적으로 연합된 성분들로부터 "분리될" 것이다. 단백질은 또한 당해 분야에 잘 공지되어 있는 단백질 정제 기술을 사용하여, 분리에 의해 천연적으로 관련된 성분들을 실질적으로 함유하지 않도록 할 수 있다.
- [0552] 본원에 사용된 것으로서 용어 "회수하는"은 예를 들면, 당해 분야에 잘 공지되어 있는 단백질 정제 기술을 사용하여, 분리에 의해 천연적으로 관련된 성분들을 실질적으로 함유하지 않는 폴리펩타이드와 같은 화학 종이 되도록 하는 공정을 말한다.
- [0553] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "사람 DLL4"(본원에서 "hDLL4" 또는 "huDLL4"로 약칭됨)은 수개의 EGF-유사 도메인, 및 수용체 결합에 요구되는 DSL 도메인을 포함한다. 당해 용어는 약 74 내지 75 kDa의 단백질을 포함한다. 사람 DLL4의 구조 및 유추된 DNA 및 단백질 서열은 또한 예를 들면, 문헌[참조: Shutter et al., *Genes & Dev.*, 4: 1313-1318 (2000)]에 기술되어 있다. 용어 "사람 DLL4"는 표준 재조합체 발현 방법으로 제조될 수 있는 재조합체 사람 DLL4(rh DLL4)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0554] DLL4와 관련하여 본원에 사용된 것으로서, "생물학적 활성"은 DLL4의 모든 고유의 생물학적 특성을 말한다. DLL4의 생물학적 특성은 노치 수용체에 대한 결합, 노치 수용체의 활성화, VEGF 시그널링의 음성적인 조절, VEGFR2의 억제, 및 VEGFR1의 유도를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0555] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은, 제2 화학 종과 항체, 단백질 또는 펩타이드의 상호작용을 참조로, 당해 상호작용이 화학 종에서 특정 구조(예를 들면, 항원성 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존함을 의미하는데; 예를 들면, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특이적인 단백질 구조를 인식하여 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서, 에피토프 A(또는 유리된, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.
- [0556] "결합 단백질"은 결합 파트너에 결합하여 이와 복합체를 형성하는 단량체성 또는 다량체성 단백질이며, 폴리펩타이드, 항원, 화학적 화합물, 또는 다른 분자, 또는 임의의 종류의 기질일 수 있다. 결합 단백질은 결합 파트너에 특이적으로 결합한다. 결합 단백질은 항체 및 항원 분자 상의 특정 부위(에피토프) 또는 항원 분자에 결합하는 하나 이상의 항원-결합 도메인을 포함하는 다른 분자를 포함한다. 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나, 및 당해 분야에 공지되고 하기 기술된 항체들의 각종 형태 및 유도체를 포함한다. 따라서, 결합 단백질은 항체, 사량체성 면역글로불린, IgG 분자, IgG₁ 분자, 모노클로날 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 사람화된 항체, 친화성 성숙된 항체, 및 항원에 결합하는 능력을 보유한 임의의 이러한 항체의 단편을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.
- [0557] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "항체"는 광범위하게는, 4개의 폴리펩타이드쇄, 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄로 이루어진 임의의 면역글로불린(Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 필수적인 에피토프 결합 특징을 보유한 이의 기능적 단편, 돌연변이체, 변이체, 또는 유도체를 말한다. 이러한 돌연변이체, 변이체, 또는 유도체 항체 포맷은 당해 분야에 공지되어 있다. 이의 비제한적인 실시형태는 하기 논의되어 있다.

[0558] 전장의 항체에서, 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 VH로 약술) 및 중쇄 고정 영역으로 구성된다. 중쇄 고정 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 VL로 약술) 및 경쇄 고정 영역으로 구성된다. 경쇄 고정 영역은 하나의 도메인, CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 또한 보다 보존된, 골격 영역(FR)으로 명명된 영역과 함께 배치된, 상보성 결정 영역(CDR)로 명명된 초가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4의 순서로 아미노-말단으로부터 카복시-말단으로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 소부류일 수 있다.

[0559] 용어 "Fc 영역"은 온전한 항체의 파파인 분해로 생성될 수 있는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 사용된다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 고정 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하며, 임의로 CH4 도메인을 포함한다. 항체 효과기 기능을 변경시키기 위한 Fc 부분내 아미노산 잔기의 대체는 당해 분야에 공지되어 있다(참조: 미국 특허 제 5,648,260호 및 제5,624,821호). 항체의 Fc 부분은 몇가지 중요한 효과기 기능, 예를 들면, 사이토킨 유도, ADCC, 포식작용, 상보체 의존성 세포독성(CDC), 및 항체 및 항원-항체 복합체의 반감기/청소율(half-life/clearance)을 중재한다. 일부 경우에, 이들 효과기 기능은 치료학적 항체에 바람직하지만 다른 경우에 치료학적 대상에 따라, 불필요하거나 심지어 유해할 수 있다. 특정의 사람 IgG 이소형, 특히 IgG1 및 IgG3은 각각 FcγR 및 상보체 C1q에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 중재한다. 네오나탈(Neonatal) Fc 수용체(FcRn)는 항체의 순환하는 반감기를 결정하는 주요 성분이다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기는 항체의 고정 영역, 예를 들면, 항체의 Fc 영역내에서 대체됨으로써, 항체의 효과기 기능이 변경되도록 한다. 면역글로불린의 2개의 동일한 중쇄의 이합체화는 CH3 도메인의 이합체화에 의해 중재되며 힌지 영역내에서 이황화물 결합에 의해 안정화된다[참조: Huber et al., *Nature*, 264: 415-420 (1976); Thies et al., *J. Mol. Biol.*, 293: 67-79 (1999)]. 힌지 영역내에서 시스테인 잔기의 돌연변이로 중쇄-중쇄 이황화물 결합을 방지하는 것은 CH3 도메인의 이합체화를 탈안정화시킬 것이다. CH3 이합체화에 관여하는 잔기는 동정되어 있다[참조: Dall'Acqua, *Biochem.*, 37: 9266-9273 (1998)]. 따라서, 1가 반-Ig(half-Ig)를 생성하는 것이 가능하다. 흥미롭게도, 이들 1가의 반 Ig 분자는 천연적으로 IgG 및 IgA 소부류 둘 다의 경우 발견되었다[참조: Seligman, *Ann. Immunol.*, 129: 855-70 (1978); Biewenga et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 51: 395-400 (1983)]. FcRn:Ig Fc 영역의 화학량론은 2:1인 것으로 측정되었고[참조: West et al., *Biochem.*, 39: 9698-9708 (2000)], 반 Fc는 FcRn 결합을 중재하는데 있어 충분하다[참조: Kim et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 542-548 (1994)]. CH3 도메인의 이합체화를 파괴하는 돌연변이는 CH3 이합체화에 중요한 잔기가 CH3 b 시트(sheet) 구조의 내부 계면 상에 위치하는 반면, FcRn 결합에 관여하는 영역은 CH2-CH3 도메인의 외부 계면에 위치하므로 이의 FcRn 결합에 있어 보다 큰 부작용을 가지지 않을 수 있다. 그러나, 반 Ig 분자는 정규 항체의 것과 비교하여 이의 보다 작은 크기로 인하여 조직 침투에 있어 특정의 이점을 지닐 수 있다. 하나의 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기는 본 발명의 결합 단백질의 고정 영역, 예를 들면, Fc 영역내에서 대체됨으로써, 중쇄의 이합체화가 파괴되어 반 Ig 분자가 생성된다. IgG의 소염 활성은 IgG Fc 단편의 N-결합된 글리칸의 시알릴화에 완전히 의존한다. 소염 활성에 대한 정확한 글리칸 요건이 측정됨으로써 적절한 IgG1 Fc 단편이 생성될 수 있고, 이에 의해 효능이 크게 향상된 완전한 제조합체, 시알릴화된 IgG1 Fc가 생성될 수 있다[참조: Anthony et al., *Science*, 320: 373-376 (2008)].

[0560] 본원에 사용된 것으로서, 용어 항체의 "항원-결합 부분"(또는 단순히 "항체 부분")은 항원에(즉, 항원의 특정한 에피토프, 예를 들면, DLL4의 에피토프에) 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다고 나타나 있다. 이러한 항체 실시형태는 또한 이특이적, 이중 특이적, 또는 다-특이적 양식; 2개 이상의 상이한 항원(또는 동일한 항원의 2개 이상의 상이한 에피토프)에 대한 특이적인 결합일 수 있다. 용어 항체의 "항원-결합 부분"내 포함된 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편, VL, VH, CL, 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가의 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 이황화물 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가의 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) 단일 가변 도메인을 포함하는 dAb 단편[참조: Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989); PCT 공보 제WO 90/05144 A1호]; 및 (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인, VL 및 VH이 별도의 유전자에 의해 암호화된다고 해도, 이들은 제조합체 방법을 사용하여 이들이 VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가의 분자를 형성하는 단일 단백질 채로서 제조되도록 할 수 있는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다[단일쇄 Fv(scFv)로 공지됨; 참조: 예를 들면, Bird et al., *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-

5883 (1988)]. 이러한 단일쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분" 내에 포함되는 것으로 의도된다. 디아바디(diabody)와 같은 단일쇄 항체의 다른 형태 또한 포함된다. 디아바디는, VH 및 VL 도메인이 단일의 폴리펩타이드 쇄 상에서 발현되지만 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍을 이루도록 하기에 너무 짧은 링커를 사용함으로써 도메인이 다른 쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원 결합 부위를 생성하도록 하는 2가의, 이특이적 항체이다[참조: 예를 들면, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)]. 이러한 항체 결합 부분은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, New York, 2001), p. 790 (ISBN 3-540-41354-5)]. 또한, 단일쇄 항체는 또한 상보성 경쇄 폴리펩타이드와 함께 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 탄뎀(tandem) Fv 분절의 쌍(VH-CH1-VH-CH1)을 포함하는 "선형 항체"를 포함한다[참조: Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995); 및 미국 특허 No. 5,641,870].

[0561]

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체 작제물"(또는 "DLL4 항체 작제물")은 링커 폴리펩타이드 또는 면역글로불린 고정 도메인에 연결된 본 발명의 하나 이상의 항원 결합 부분을 포함하는 폴리펩타이드를 말한다. 링커 폴리펩타이드는 펩타이드 결합에 의해 결합된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하며 하나 이상의 항원 결합 부분을 연결시키는데 사용된다. 이러한 링커 폴리펩타이드는 당해 분야에 잘 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993); Poljak, R.J., *Structure*, 2: 1121-1123 (1994)]. 면역글로불린 고정 도메인은 중쇄 또는 경쇄 고정 도메인을 말한다. 사람 IgG 중쇄 및 경쇄 고정 도메인 아미노산 서열은 당해 분야에 공지되어 있으며 표 2에 나타낸다.

표 2

사람 IgG 중쇄 고정 도메인 및 경쇄 고정 도메인의 서열

단백질	서열 동정	서열
		12345678901234567890123456789012
Ig 감마-1 고정 영역	서열 번호 3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNYHT QKSLSLSPGK
Ig 감마-1 고정 영역 돌연변이체	서열 번호 4	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNYHT QKSLSLSPGK
Ig 카파 고정 영역	서열 번호 5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLTSLTADSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig 람다 고정 영역	서열 번호 6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVWAKADSSPVKAGVETTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[0562]

[0563]

또한, 추가로 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 항체 또는 항체 부분과 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비공유 연합으로 형성된 보다 큰 면역부착 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예는 사합체성 scFv 분자를 제조하기 위한 스트랩트아비딘 코어 영역의 사용[참조: Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6: 93-101 (1995)] 및 2가 및 비오틴화된 scFv 분자를 제조하기 위한 시스템인 잔기, 마커 펩타이드, 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용[참조: Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31: 1047-1058 (1994)]를 포함한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 부분은 전체 항체로부터 각각 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해와 같은 통상의 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 또한, 항체, 항체 부분, 및 면역부착 분자는 본원에 기술되고 당해 분야에 공지된 바와 같은 표준 재조합체 DNA 기술을 사용하여 수득될 수 있다.

[0564]

본원에 사용된 것으로서, "분리된 항체"는 상이한 항원성 특이성(예를 들면, hDLL4에 특이적으로 결합하는 분리

된 항체는, hDLL4 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 실질적으로 함유하지 않는다)을 갖는 다른 항체를 실질적으로 함유하지 않는 항체를 말하는 것으로 의도된다. 그러나, hDLL4에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터의 DLL4 분자(예를 들면, muDLL4)와 같이, 다른 항원에 대해 교차-반응성을 갖는다. 또한, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질을 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.

[0565] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "모노클로날 항체" 및 약어 "Mab" 및 "mAb"는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 말하며, 즉, 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이며, 단일 항원에 대해 지시된다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 각각의 mAb는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정 방법으로도 항체의 생산에 요구되는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0566] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "사람 항체"는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 고정 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 사람 항체는, 예를 들면, CDR 및 특히 CDR3에서 사람 배선 면역글로불린 서열(예를 들면, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 것으로서, 용어 "사람 항체"는, 다른 포유동물 중, 예를 들면, 마우스의 배선으로부터 유도된 CDR 서열이 사람 골격 서열 상으로 이식된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0567] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "재조합체 사람 항체"는 재조합체 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 모든 사람 항체, 예를 들면, 숙주 세포내로 형질감염된 재조합체 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합체로부터 분리된 항체, 조합적 사람 항체 라이브러리[참조: Hoogenboom, *Trends Biotechnol.*, 15:62-70 (1997); Azzazy and Highsmith, *Clin. Biochem.*, 35: 425-445 (2002); Gavalondo and Larrick, *BioTechniques*, 29: 128-145 (2000); Hoogenboom and Chames, *Immunol. Today*, 21: 371-378 (2000)], 사람 면역글로불린 유전자에 대해 유전자삽입성인 동물(예를 들면, 마우스)로부터 분리된 항체[참조: Taylor et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 6287-6295 (1992); Kellermann and Green, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 593-597 (2002); Little et al., *Immunol. Today*, 21: 364-370 (2000)] 또는 다른 DNA 서열로의 사람 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱(splicing)을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해서도 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 분리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합체 사람 항체는 사람 배선 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 고정 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시형태에서, 이러한 재조합체 사람 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는, 사람 Ig 서열에 대해 유전자삽입성인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용되므로, 재조합체 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 사람 배선 VH 및 VL 서열로부터 유도되고 이와 관련되지만, 생체내에서 사람 항체 배선 레퍼토리(repertoire)내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0568] 용어 "키메라 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 다른 종으로부터의 고정 영역 서열을 포함하는 항체, 예를 들면, 사람 고정 영역에 연결된 무인 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 말한다.

[0569] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "CDR"은 항체 가변 서열내 상보성 결정 영역을 말한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 각각에는 3개의 CDR이 존재하며, 이는 가변 영역 중 각각에 대해 "CDR1", "CDR2", 및 "CDR3"으로 지정된다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합하는 단일 가변 영역내에 발생하는 3개의 CDR의 그룹을 말한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되어 왔다. 카바트(Kabat)에 의해 기술된 시스템[참조: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))]은 항체의 임의의 가변 영역에 적용가능한 명확한 잔기 번호매김 시스템을 제공할 뿐만 아니라, 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계도 제공한다. 이들 CDR은 "카바트(Kabat) CDR"로서 언급될 수 있다. 초티아(Chothia) 및 공동연구자들[참조: Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature*, 342: 877-883 (1989)]은, 카바트 CDR내 특정의 소-부위가 아미노산 서열의 수준에서 큰 다양성을 가짐에도 불구하고, 거의 동일한 펩타이드 골격 입체구조를 채택함을 발견하였다. 이들 소-부위는 "L1", "L2", 및 "L3", 또는 "H1", "H2", 및 "H3"으로 지정되었으며, 여기서, "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지정한다. 이들 영역은 카바트 CDR과 중첩되는 경계들을 갖는 "초티아(Chothia) CDR"로 언급될 수 있다. 카바트 CDR과 중첩되는 CDR을 정의하는 다른 경계는 문헌[참조: Padlan, *FASEB J.*, 9: 133-139 (1995) 및 MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262(5): 732-745 (1996)]에 기술되어 있다. 또 다른 CDR 경계 정의는, 비록 이들이 특정 잔기 또는 잔기의 그룹 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의적으로 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견의 측면에서 짧아지거나 연장될 수 있다고 해도, 본원의 시스템

템들 중 하나를 엄격하게 따르지 않을 수 있지만, 그럼에도 불구하고 카바트 CDR과 중첩될 것이다. 본원에 사용된 방법들은, 비록 특징의 실시형태들이 카바트 또는 초티아 정의된 CDR을 사용한다고 해도, 이들 시스템들 중 어느 하나에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있다.

- [0570] 용어 "카바트 번호매김(Kabat numbering)", "카바트 정의", 및 "카바트 표지화(Kabat labeling)"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 당해 분야에서 인지되는 이들 용어들은 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 이의 항원 결합 부분내 다른 아미노산 잔기보다 더 가변성인(즉, 초가변성인) 아미노산 잔기 번호매김 시스템을 말한다[참조: Kabat et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 190: 382-391 (1971) 및 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)]. 중쇄 가변 영역(VH)에 있어서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 31 내지 35번 위치, CDR2의 경우 50 내지 65번 아미노산 위치, 및 CDR3의 경우 95 내지 102번 아미노산 위치의 범위이다. 경쇄 가변 영역(VL)의 경우, 초가변 영역은 CDR1의 경우 24 내지 34번 아미노산 위치, CDR2의 경우 50 내지 56번 아미노산 위치, 및 CDR3의 경우 89 내지 97번 아미노산 위치의 범위이다.
- [0571] 지난 20여년에 걸쳐 가변성 중쇄 및 경쇄 영역의 아미노산 서열의 집중적인 공공의 데이터베이스의 성장 및 분석은 가변 영역 서열내 골격 영역(FR) 및 CDR 서열 사이의 대표적인 경계의 이해를 가져왔고 당해 분야의 숙련가가 카바트 번호매김, 초티아 번호매김 또는 다른 시스템에 따라 CDR을 정밀하게 측정할 수 있도록 하였다. 예를 들면, Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable domains," *In* Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433을 참조한다. 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 영역의 아미노산 서열내에서 카바트 CDR의 아미노산 서열, 및 이에 의한 카바트 FR의 서열을 측정하는 유용한 방법은 하기 제공된다:
- [0572] CDR-L1 아미노산 서열을 동정하기 위하여:
- [0573] VL 영역의 아미노 말단으로부터 대략 24개 아미노산 잔기로부터 출발한다;
- [0574] CDR-L1 서열 이전의 잔기는 항상 시스테인(C)이다;
- [0575] CDR-L1 서열 이후의 잔기는 항상 트립토판(W), 전형적으로 Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q)이지만, 또한 Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q), 및 Trp-Tyr-Leu (W-Y-L)이다;
- [0576] 길이는 전형적으로 10 내지 17개 아미노산 잔기이다.
- [0577] CDR-L2 아미노산 서열을 동정하기 위하여:
- [0578] CDR-L1의 말단 이후 항상 16개 잔기로 출발한다;
- [0579] CDR-L2 서열 이전의 잔기는 일반적으로 Ile-Tyr (I-Y)이지만, 또한 Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K), 및 Ile-Phe (I-F)이다;
- [0580] 길이는 항상 7개 아미노산 잔기이다.
- [0581] CDR-L3 아미노산 서열을 동정하기 위하여:
- [0582] CDR-L2의 말단 이후 33개 아미노산에서 항상 출발한다;
- [0583] CDR-L3 아미노산 서열 이전의 잔기는 항상 시스테인(C)이다;
- [0584] 이후의 잔기는 항상 Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G)(서열 번호 7)이고, 여기서 X는 임의의 아미노산이다;
- [0585] 길이는 전형적으로 7 내지 11개 아미노산 잔기이다.
- [0586] CDR-H1 아미노산 서열을 동정하기 위하여:
- [0587] VH 영역의 아미노 말단으로부터 대략 31개 아미노산 잔기 및 시스테인(C) 이후 항상 9개 잔기로 출발한다;
- [0588] 이전 잔기는 항상 Cys-X-X-X-X-X-X-X(서열 번호 8)이고, 여기서 X는 임의의 아미노산이다;
- [0589] 이후의 잔기는 항상 Trp (W), 전형적으로 Trp-Val (W-V)이지만, 또한 Trp-Ile (W-I), 및 Trp-Ala (W-A)이다;
- [0590] 길이는 전형적으로 5 내지 7개 아미노산 잔기이다.
- [0591] CDR-H2 아미노산 서열을 동정하기 위하여:

- [0592] CDR-H1의 말단 이후의 15개 아미노산 잔기에서 항상 출발한다;
- [0593] 이전의 잔기는 전형적으로 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G)(서열 번호 9)이지만, 다른 변이 또한 존재한다;
- [0594] 이후의 잔기는 Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A)이다;
- [0595] 길이는 전형적으로 16 내지 19개 아미노산 잔기이다.
- [0596] CDR-H3 아미노산 서열을 동정하기 위하여:
- [0597] CDR-H2의 말단 이후 항상 33개 아미노산 잔기 및 시스테인(C) 이후 항상 3개 아미노산 잔기로 출발한다;
- [0598] 이전의 잔기는 항상 Cys-X-X (C-X-X)이고, 여기서 X는 임의의 아미노산, 전형적으로 Cys-Ala-Arg (C-A-R)이다;
- [0599] 이후의 잔기는 항상 Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G)(서열 번호 10)이고, 여기서 X는 임의의 아미노산이다;
- [0600] 길이는 전형적으로 3 내지 25개 아미노산 잔기이다.
- [0601] 용어 "CDR-이식된 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만 VH 및/또는 VL의 CDR 영역 중 하나 이상이 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예를 들면, 무린 CDR 중 하나 이상(예를 들면, CDR3)이 사람 CDR 서열로 대체된 무린 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 갖는 항체를 말한다.
- [0602] 용어 "사람화된 항체"는 비-사람 종(예를 들면, 마우스)으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, 여기서 VH 및/또는 VL 서열 중 적어도 일부가 보다 "사람-유사"하게 변경된, 즉 사람 배선 가변 서열과 더 유사한 항체를 말한다. "사람화된 항체"는 목적 항원에 면역특이적으로 결합하며 실질적으로 사람 항체의 아미노산 서열을 가진 골격(FR) 영역 및 실질적으로 비-사람 항체의 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체 또는 이의 변이체, 유도체, 유사체 또는 단편이다. 본원에 사용된 것으로서, CDR과 관련하여 용어 "실질적으로"는 비-사람 항체 CDR의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 CDR을 말한다. 사람화된 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv)을 실질적으로 모두 포함하며, 여기서 CDR 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 비-사람 면역글로불린(즉, 공여체 항체)의 것에 상응하며, 골격 영역 모두 또는 실질적으로 모두는 사람 면역글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 하나의 실시형태에서, 사람화된 항체는 또한 면역글로불린 고정 영역(Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로 사람 면역글로불린의 적어도 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사람화된 항체는 경쇄뿐만 아니라, 중쇄의 적어도 가변 도메인 둘 다를 함유한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지(hinge), CH2, CH3, 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사람화된 항체만이 사람화된 경쇄를 함유한다. 일부 실시형태에서, 사람화된 항체만이 사람화된 중쇄를 함유한다. 특정 실시형태에서, 사람화된 항체만이 경쇄 및/또는 사람화된 중쇄의 사람화된 가변 도메인을 함유한다.
- [0603] 사람화된 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA, 및 IgE를 포함하는 면역글로불린의 임의의 부류, 및 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하나 이들에 한정되지 않는 임의의 이소형으로부터 선택될 수 있다. 사람화된 항체는 하나 이상의 부류 또는 이소형으로부터의 서열을 포함할 수 있으며, 특정 고정 도메인은 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 선택하여 바람직한 효과기 기능을 최적화할 수 있다.
- [0604] 사람화된 항체의 골격 영역 및 CDR은 모 서열, 예를 들면, 공여체 항체 CDR에 정확히 상응할 필요가 없거나 컨센서스 골격은 적어도 하나의 아미노산 잔기의 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 돌연변이유발됨으로써 이러한 부위에서 CDR 또는 골격 잔기는 공여체 항체 또는 컨센서스 골격에 상응하지 않는다. 그러나, 바람직한 실시형태에서, 이러한 돌연변이는 광범위하지 않을 것이다. 일반적으로, 사람화된 항체 잔기의 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%가 모 FR 및 CDR 서열의 것에 상응할 것이다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "컨센서스 골격"은 컨센서스 면역글로불린 서열내 골격 영역을 말한다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "컨센서스 면역글로불린 서열"은 관련된 면역글로불린 서열의 계열내 가장 흔히 발생하는 아미노산(또는 뉴클레오타이드)로부터 형성된 서열을 말한다[참조: 예를 들면, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)]. 따라서, "컨센서스 면역글로불린 서열"은 "컨센서스 골격 영역(들)" 및/또는 "컨센서스 CDR(들)"을 포함할 수 있다. 면역글로불린 계열에서, 컨센서스 서열내 각각의 위치는 계열내 이러한 위치에서 가장 흔히 발생하는 아미노산에 의해 점유된다. 2개의 아미노산이 동등하게 흔히 발생하는 경우, 하나는 컨센서스 서열내에 포함될 수 있다.
- [0605] "친화성 성숙된" 항체는 변경(들)을 소유하지 않는 모 항체와 비교하여, 표적 항원에 대한 항체의 친화성에 있어 개선을 초래하는 하나 이상의 CDR내 하나 이상의 변형을 갖는 항체이다. 예시적인 친화성 성숙된 항체는 표

적 항원에 대해 나노물 또는 심지어 피코물 친화성을 가질 것이다. 친화성 성숙된 항체를 생산하기 위한 다양한 공정은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 마크(Mark) 등의 문헌[참조: Marks et al., *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화성 성숙을 기술한다. CDR 및/또는 골격 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌[참조: Barbas et al., *Proc. Nat. 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): 3310-3319 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)]에 기술되어 있다. 선택적인 돌연변이유발 위치 및 접촉 또는 초돌연변이 위치에서 활성 항상 아미노산 잔기를 사용한 선택적인 돌연변이는 미국 특허 제6,914,128 B1호에 기술되어 있다.

[0606] 용어 "다가 결합 단백질"은 2개 이상의 항원 결합 부위(또한 본원에서 "항원 결합 도메인"으로 언급됨)를 포함하는 결합 단백질을 말한다. 다가 결합 단백질은 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 바람직하게 조작되며, 일반적으로 천연적으로 발생하는 항체가 아니다. 용어 "다특이적 결합 단백질"은 동일한 표적 분자의 2개 이상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 결합 단백질을 포함하는, 2개 이상의 관련되거나 관련되지 않은 표적을 결합시킬 수 있는 결합 단백질을 말한다.

[0607] 본원에 사용된 것으로서 용어 "이특이적 항체"는 쿼드로마 기술(quadroma technology)[참조: Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983)], 2개의 상이한 모노클로날 항체의 화학적 접합[참조: Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985)], 또는 knob-into-hole(knob-into-hole) 또는 Fc 영역 내에 돌연변이를 도입하는 유사한 접근법[참조: Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993)]에 의해 생성되어, 하나만이 기능성 이특이적 항체인 다수의 상이한 면역글로불린 종을 생성하는 전장 항체를 말한다. 분자 기능에 의해, 이특이적 항체는 이의 2개의 결합 아암 중 하나(HC/LC의 하나의 쌍)에서의 하나의 항원(또는 에피토프)에 결합하며, 이의 제2 아암(HC/LC의 상이한 쌍)에서 상이한 항원(또는 에피토프)에 결합한다. 당해 정의에 의해, 이특이적 항체는 2개의 명백한 항원 결합 아암(특이성 및 CDR 서열 둘 다)을 가지며, 이것이 결합하는 항원 각각에 대해 1가이다.

[0608] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "이중-특이적인 항체"는 이의 2개의 결합 아암(HC/LC의 하나의 쌍)의 각각에서 2개의 상이한 항원(또는 에피토프)에 결합할 수 있는 전장의 항체를 말한다(참조: PCT 공보 제WO 02/02773호). 따라서, 이중-특이적인 결합 단백질은 동일한 특이성 및 동일한 CDR 서열을 갖는 2개의 동일한 항원 결합 아암을 가지며, 이것이 결합하는 각각의 항원에 대해 2가이다.

[0609] 본 발명의 "이중 가변성 도메인"("DVD") 결합 단백질은 2개 이상의 항원 결합 부위를 포함하며 2가(2개의 항원 결합 부위), 4가(4개의 항원 결합 부위), 또는 다가 결합 단백질일 수 있다. DVD는 단일 특이적, 즉 하나의 항원(또는 하나의 특이적인 에피토프)에 결합할 수 있거나, 다특이적, 즉 2개 이상의 항원(즉, 동일한 표적 항원 분자의 2개 이상의 에피토프 또는 상이한 표적 항원의 2개 이상의 에피토프)에 결합할 수 있다. 바람직한 DVD 결합 단백질은 2개의 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하며 "DVD 면역글로불린" 또는 "DVD-Ig"로 언급된다. 따라서, 이러한 DVD-Ig 결합 단백질은 IgG 분자의 사합체성이고 연상성(remiscent)이지만, IgG 분자보다 더 많은 결합 부위를 제공한다. 따라서, 사합체성 DVD-Ig 분자의 각각의 반은 IgG 분자의 하나의 반의 연상성이며 중쇄 DVD 폴리펩타이드 및 경쇄 DVD 폴리펩타이드를 포함하지만, 단일 항원 결합 도메인을 제공하는 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄의 쌍과는 달리, DVD-Ig의 중쇄 및 경쇄의 쌍은 2개 이상의 항원 결합 부위를 제공한다.

[0610] DVD-Ig 결합 단백질의 각각의 항원 결합 부위는 공여체("모") 모노클로날 항체로부터 유도되므로 항원 결합 부위당 항원 결합에 관여하는 총 6개의 CDR을 지닌 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함한다. 따라서, 2개의 상이한 에피토프(즉, 2개의 상이한 항원 분자의 2개의 상이한 에피토프 또는 동일한 항원 분자의 2개의 상이한 에피토프)에 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질은 제1 모 모노클로날 항체로부터 유도된 항원 결합 부위 및 제2 모 모노클로날 항체의 항원 결합 부위를 포함한다.

[0611] DVD-Ig 결합 분자의 설계, 발현, 및 특성화의 설명은 문헌[참조: PCT 공보 제WO 2007/024715호, 미국 특허 제7,612,181호, 및 Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007)]에서 제공된다. 이러한 DVD-Ig 분자의 바람직한 예는 구조식 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n(여기서, VD1은 제1 중쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 중쇄 가변 도메인이며, C는 중쇄 고정 도메인이고, X1은 링커이며, 단 이는 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역이며, n은 0 또는 1이지만, 바람직하게는 1이다)을 포함하는 중쇄; 및 구조식 VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n(여기서, VD1은 제1 경쇄 가변 도메인이고, VD2는 제2 경쇄 가변 도메인이며, C는 경쇄 고정 도메인이고, X1은 링커이며, 단 이는 CH1이 아니고, X2는 Fc 영역을 포함하지 않으며; n은 0 또는 1이나, 바람직하게는 1이다)을 포함하는 경쇄를 포함한다.

이러한 DVD-Ig는 2개의 이러한 중쇄 및 2개의 이러한 경쇄를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 쇠는 가변 영역들 사이의 개재하는(intervening) 고정 영역 없이 탄뎀으로 연결된 가변 도메인을 포함하고, 여기서 중쇄 및 경쇄는 연합하여 탄뎀 기능적 항원 결합 부위를 형성하고, 중쇄 및 경쇄의 쌍은 중쇄 및 경쇄의 다른 쌍과 연합하여 4개의 기능성 항원 결합 부위와 함께 사합체성 결합 단백질을 형성한다. 다른 예에서, DVD-Ig 분자는, 각각이 가변 도메인 사이의 개재하는 고정 영역없이 탄뎀으로 연결된 3개의 가변 도메인(VD1, VD2, VD3)을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함할 수 있으며, 여기서 중쇄 및 경쇄의 쌍은 연합하여 3개의 항원 결합 부위를 형성할 수 있고, 여기서 중쇄 및 경쇄의 쌍은 중쇄 및 경쇄의 다른 쌍과 연합하여 6개의 항원 결합 부위를 갖는 사합체성 결합 단백질을 형성할 수 있다.

[0612] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 DVD-Ig 결합 단백질은 이의 모 모노클로날 항체에 의해 결합된 동일한 표적 분자에 결합할 뿐만 아니라, 이의 모 모노클로날 항체 중 하나 이상 중 하나 이상의 바람직한 특성도 지닌다. 바람직하게는, 이러한 추가의 특성은 모 모노클로날 항체 중 하나 이상의 항체 매개변수이다. 이의 모 모노클로날 항체 중 하나 이상으로부터의 DVD-Ig 결합 단백질에 기여할 수 있는 항체 매개변수는 항원 특이성, 항원 친화성, 효능, 생물학적 기능, 에피토프 인식, 단백질 안정성, 단백질 가용성, 생산 효능, 면역원성, 약동학, 생체 이용률, 조직 교차 반응성, 및 이중상동성 항원 결합을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0613] 본 발명에 따른 DVD-Ig 결합 단백질은 사람 DLL4 단백질 중 적어도 하나의 에피토프에 결합한다. 본 발명에 따른 DVD-Ig 결합 단백질의 비-제한적 예는 사람DLL4의 하나 이상의 에피토프에 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질, 사람 DLL4의 에피토프 및 다른 종(예를 들면, 마우스)의 DLL4의 에피토프에 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질, 및 사람 DLL4의 에피토프 및 다른 표적 분자(예를 들면, VEGFR2 또는 VEGFR1)의 에피토프에 결합하는 DVD-Ig 결합 단백질을 포함한다.

[0614] 결합 단백질의 "기능성 항원 결합 부위"는 표적 항원에 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화성은, 항원 결합 부위가 유도된 모 항체와 같이 필수적으로 강하지 않지만, 항원을 결합시키는 능력은 항원에 대한 항체 결합을 평가하기 위해 공지된 각종 방법 중 어느 하나를 사용하여 측정가능하여야 한다. 또한, 본원의 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화성은 정량적으로 동일할 필요는 없다.

[0615] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "수용체" 및 "수용체 항체"는 골격 영역(FR) 중 하나 이상의 아미노산 서열의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%를 제공하거나 암호화하는 항체 또는 핵산 서열을 말한다. 일부 실시형태에서, 용어 "수용체"는 고정 영역(들)을 제공하거나 암호화하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 말한다. 또 다른 실시형태에서, 용어 "수용체"는 골격 영역 및 고정 영역(들) 중 하나 이상을 제공하거나 암호화하는 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 말한다. 특정 실시형태에서, 용어 "수용체"는 골격 영역 중 하나 이상의 아미노산 서열의 적어도 80%, 바람직하게는, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 100%를 제공하거나 암호화하는 사람 항체 아미노산 또는 핵산 서열을 말한다. 당해 실시형태에 따라서, 수용체는 사람 항체의 하나 이상의 특이적인 위치에 발생하지 않는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 10개의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다. 수용체 골격 영역 및/또는 수용체 고정 영역(들)은 예를 들면, 배선 항체 유전자, 성숙한 항체 유전자, 기능성 항체(예를 들면, 당해 분야에 잘 공지된 항체, 개발중인 항체, 또는 시판되는 항체)로부터 유도되거나 수득될 수 있다.

[0616] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "표준(canonical)" 잔기는 쇼티아 등에 의해 정의된 특정한 표준 CDR 구조[참조: *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817 (1992)], 이들 둘 다는 본원에 참조로 도입되어 있다]를 정의하는 CDR 또는 골격내 잔기를 말한다. 쇼티아 등에 따르면, 많은 항체의 CDR의 주요 부분은 아미노산 서열의 수준에서 큰 다양성에도 불구하고 거의 동일한 펩타이드 골격 입체구조를 갖는다. 각각의 표준 구조는 루프를 형성하는 아미노산 잔기의 연속된 분절에 대한 펩타이드 골격 비틀림 각의 세트를 주로 구체화한다.

[0617] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "공여체" 및 "공여체 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 항체를 말한다. 바람직한 실시형태에서, 공여체 항체는 골격 영역이 수득되거나 유도되는 항체와는 상이한 종으로부터의 항체이다. 사람화된 항체와 관련하여, 용어 "공여체 항체"는 하나 이상의 CDR을 제공하는 비-사람 항체를 말한다.

[0618] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "골격" 또는 "골격 서열"은 CDR을 뺀 가변 영역의 나머지 서열을 말한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템(예를 들면, 상기 참조)에 의해 측정될 수 있으므로, 골격 서열의 의미는 상응하게 상이한 해석에 속한다. 6개의 CDR(경쇄의 CDR-L1, -L2, 및 -L3 및 중쇄의 CDR-H1, -H2, 및 -H3)은 또한 경쇄 및 중쇄 상의 골격 영역을 각각의 쇠 상에서 4개의 소-영역(FR1, FR2, FR3, 및 FR4)으로 분리시키며, 여기서 CDR1은 FR1과 FR2 사이에 위치하며, CDR2는 FR2와 FR3 사이에, 및 CDR3은 FR3과 FR4 사이에

위치한다. FR1, FR2, FR3, 또는 FR4로서 특정 소-영역을 구체화하지 않고, 다른 것으로 언급된 골격 영역은 단일의 천연적으로 발생하는 면역글로불린쇄의 가변 영역내 결합된 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 것으로서, FR은 4개의 소-영역 중 하나를 나타내고, FR은 골격 영역을 구성하는 4개의 소-영역 중 2개 이상을 나타낸다.

[0619]

당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 비-사람 항체를 사람화하기 위한 중쇄 및 경쇄 "수용체" 골격 서열(또는 단순히, "수용체" 서열)로서 사용될 수 있는 사람 중쇄 및 경쇄 골격(FR) 서열은 당해 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 사람 중쇄 및 경쇄 수용체 서열은 V-염기(V-base)(hypertext transfer protocol://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) 또는 국제 ImMunoGeneTics[®](IMGT[®]) 정보 시스템(hypertext transfer protocol://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/)와 같은 공공 이용가능한 데이터베이스에 나열된 골격 서열로부터 선택된다. 하기 표 3은 당해 분야에 공지된 사람 중쇄 수용체 서열의 예의 비-제한된 목록을 제공한다. 하기 표 4는 당해 분야에 공지된 사람 경쇄 수용체 서열의 예의 비-제한적 목록을 제공한다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 사람 중쇄 및 경쇄 수용체 서열은 하기 표 3 및 표 4에 기술된 아미노산 서열로부터 선택되나, 표 3 및 표 4에 나열되지 않은 다른 사람 중쇄 및 경쇄 수용체 서열을 또한 사용하여 본 발명에 따른 항체를 사람화할 수 있다.

표 3

사람 IgG 중쇄 고정 도메인 및 경쇄 고정 도메인의 서열

단백질	서열 동정	서열
		12345678901234567890123456789012
Ig 감마-1 고정 영역	서열 번호 3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCTPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNN YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 감마-1 고정 영역 돌연변이체	서열 번호 4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCTPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNN YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Ig 카파 고정 영역	서열 번호 5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Ig 람다 고정 영역	서열 번호 6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

[0620]

서열 번호	단백질 영역 /가장 가까운 배선 계열	아미노산 서열
23	VH3-30 FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFS
24	VH3-30 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
25	VH3-30 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
27	VH3 컨센서스 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
28	VH3 컨센서스 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
29	VH3 컨센서스 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
30	JH3 FR4	WGQGTMTVTVSS
31	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRSESGPALVKPTQTTLTLCTFSGFSL
32	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
33	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDT SKNQVLTMTNMDPVD TATYYCAR
34	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
35	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESG PVLVKPTETTLTLCTVSGFSL
36	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
37	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDT SKSQVLTMTNMDPVD TATYYCAR
38	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
39	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
40	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
41	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDD SKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
42	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
43	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
44	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
45	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
46	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
47	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFS
48	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMMG
49	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
50	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
51	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
52	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMMG
53	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
54	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTMTVTVSS
55	IGHV4-59 FR1	EVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS
56	IGHV4-59 FR2	WIRQPPGKGLEWIG
57	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
58	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
59	IGHV3-66 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSIS
60	IGHV3-66 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
61	IGHV3-66 FR3	RVTISVDTSKN SFYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
62	IGHV3-66/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
63	IGHV4-59 FR1	EVQLQESG PGLVKPGETLSLTCTVSGGSIS
64	IGHV4-59 FR2	WIRQAPGKGLEWIG
65	IGHV4-59 FR3	RVTISVDTSKNQFYLKLSSVRAEDTAVYYCAR
66	IGHV4-59/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
67	IGHV5-51 FR1	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISKVSGGSIS
68	IGHV5-51 FR2	WIRQMPGKGLEWIG
69	IGHV5-51 FR3	QVTISVDTSFNTFFLQWSSSLKASDTAMYYCAR
70	IGHV5-51/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
71	IGHV2-70 FR1	EVTLRSESGPALVKPTQTTLTLCTVSGGSIS
72	IGHV2-70 FR2	WIRQPPGKGLEWIG

[0621]

서열 번호	단백질 영역 /가장 가까운 배선 계열	아미노산 서열
73	IGHV2-70 FR3	RVTISVDTSKNQFVLTMTNMDPVD TATYYCAR
74	IGHV2-70/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
75	IGHV3-15 FR1	EVQLLES GGLVKSGGSLRLSCAASGFTFR
76	IGHV3-15 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
77	IGHV3-15 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
78	IGHV3-15/JH FR4	WGQGTMTVTVSS
79	IGHV3-43 FR1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFG
80	IGHV3-43 FR2	WVRQAPGKGLEWVA
81	IGHV3-43 FR3	RFTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCAK
82	IGHV3-43/JH FR4	WGQGTMTVTVSS

[0622]

표 4

경쇄 수용체 서열

서열 번호	단백질 영역/ 가장 가까운 배선 계열	서열
		12345678901234567890123456789012
83	O2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
84	O2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
85	O2 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
86	JK2 FR4	FGGGTKLEIK
87	L2 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
88	L2 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
89	L2 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
90	JK2 FR4	FGGGTKLEIK
91	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC
92	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
93	B3/JK4 FR3	GVPDFRSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC
94	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
95	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
96	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
97	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
98	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
99	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
100	L15/JK4 FR2	WYQQKPKAPKSLIY
101	L15/JK4 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
102	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
103	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
104	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
105	L5/JK4 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
106	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
107	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
108	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
109	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
110	IGLV3-1/JL FR4	FGYGTKVTVL
111	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
112	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
113	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
114	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG

[0624]

서열 번호	단백질 영역/ 가장 가까운 배선 계열	서열
115	IGLV3-1 FR1	YELTQPPSVSVSPGQTASITC
116	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
117	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQPMDEADYYC
118	IGLV3-1/JL FR4	GGGTKLTVLG
119	IGLV3-1 FR1	LYVLTQPPSVSVSPGQTASITC
120	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
121	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGDTATLTISGTQTMDEADYLC
122	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVLG
123	IGKV6D-21 FR1	EYVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
124	IGKV6D-21 FR2	WYQQKPDQSPKLVIIY
125	IGKV6D-21 FR3	GVPSRFGSGSNSGDDATLTINSLEAEDAATYYC
126	IGKV6D-21/JK FR4	FGGGTKVEIKR
127	IGKV3D-15 FR1	EYVLTQSPATLSVSPGERATLSC
128	IGKV3D-15 FR2	WYQQKPGQSPRLVIY
129	IGKV3D-15 FR3	DIPARFSGSNSGDEATLTISLQSEDFAVYYC
130	IGKV3D-15/JK FR4	FGGTRLEIKR
131	IGKV4-1 FR1	DYVLTQSPDLSAVSLGERATINC
132	IGKV4-1 FR2	WYQQKPGQSPKLVIIY
133	IGKV4-1 FR3	GIPDRFSGSNSGDDATLTISLQAEADVAVYYC
134	IGKV4-1/JK FR4	FGGGTKVEIKR
135	IGLV3-1 FR1	LPVLTQPPSVSVSPGQTASITC
136	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
137	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
138	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKVTVL
139	IGLV3-1 FR1	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
140	IGLV3-1 FR2	WYQQKPGQSPVLVIY
141	IGLV3-1 FR3	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYLC
142	IGLV3-1/JL FR4	FGGGTKLTVL

[0625]

[0627]

하나의 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4에 결합하는 사람화된 항체를 생성하는데 사용하기 위한 표 3으로부터의 중쇄 사람 수용체 골격 서열은 VH3-7 FR1, VH3-7 FR2, VH3-7 FR3, 및 JH4 FR4 수용체 서열로 이루어진 세

트; VH3 컨센서스 FR1, VH3 컨센서스 FR2, VH3 컨센서스 FR3, 및 JH4 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트; VH1-46 FR1, VH1-46 FR2, VH1-46 FR3, 및 JH4 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트; VH3-30 FR1, VH3-30 FR2, VH3-30 FR3, 및 JH3 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트; 및 VH3 컨센서스 FR1, VH3 컨센서스 FR2, VH3 컨센서스 FR3, 및 JH3 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트를 포함한다.

[0628] 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4에 결합하는 사람화된 항체를 생성하는데 사용하기 위한 표 4로부터의 경쇄 사람 수용체 골격 서열은 O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, 및 JK2 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트, 및 L2 FR1, L2 FR2, L2 FR3, 및 JK2 FR4 수용체 서열로 이루어진 세트를 포함한다.

[0629] 하나의 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4에 결합하는 사람화된 항체를 생성하는데 사용하기 위한 사람 수용체 골격 서열의 세트는 다음으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 수용체 골격 서열 중 하나 이상(예를 들면, 결합 도메인당 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개)을 포함한다:

[0630] 중쇄 골격-1 (H-FR1):

[0631] 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- X_{30} (서열 번호 143)(여기서, X_{30} 은 S, R, 또는 G 이다);

[0632] 중쇄 골격-2 (H-FR2): W-V-R-Q-A-P-G-K-G-L-E-W-V-A (서열 번호 144);

[0633] 중쇄 골격-3 (H-FR3):

[0634] R-F-T-I-S-R-D-N-A-K- X_{11} -S-L-Y-L-Q-M-N-S-L-R-A-E-D-T-A-V-Y-Y-C- X_{31} -R (서열 번호 145)(여기서;

[0635] X_{11} 은 N 또는 S이고;

[0636] X_{31} 은 A 또는 S이다);

[0637] 중쇄 골격-4 (H-FR4): W-G-Q-G-T-L-V-T-V-S-S (서열 번호 146);

[0638] 경쇄 골격-1 (L-FR1):

[0639] D-I-Q-M-T-Q-S-P-S-S-L-S-A-S-V-G-D-R-V-T-I-T-C (서열 번호 147);

[0640] 경쇄 골격-2 (L-FR2): W-Y-Q-Q-K-P-G-K- X_9 -P-K-L-L-I- X_{15} (서열 번호 148)(여기서;

[0641] X_9 는 A 또는 S이고;

[0642] X_{15} 는 F 또는 Y이다);

[0643] 경쇄 골격-3 (L-FR3):

[0644] G-V-P-S-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D- X_{15} -T-L-T-I-S-S-L-Q-P-E-D-F-A-T-Y-Y-C (서열 번호 149)(여기서;

[0645] X_{15} 는 F 또는 S이다); 및

[0646] 경쇄 골격-4 (L-FR4): F-G-Q-G-T-K-L-E-I-K (서열 번호 150).

[0647] 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 DLL4에 결합하는 항체는 상기 기술된 H-FR1, H-FR2, H-FR3, H-FR-4, L-FR1, L-FR2, L-FR3, 및 L-FR4 수용체 서열로 이루어진 사람 수용체 서열의 세트를 사용하여 사람화된다.

[0648] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "배선 항체 유전자" 또는 "유전자 단편"은 특정 면역글로불린의 발현을 위한 유전적 재배열 및 돌연변이를 가져오는 성숙화 공정을 겪지 않은 비-림프구 세포에 의해 암호화된 면역글로불린 서열을 말한다[참조: 예를 들면, Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol.*, 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 484:13-30 (2001)]. 본 발명의 각종 실시형태에 의해 제공된 이점들 중 하나는, 배선 항체 유전자가 성숙한 항체 유전자보다 더 유사하여 종내 개체의 필수적인 아미노산 서열 구조 특징을 보존하므로 이러한 종에서 치료학적으로 사용되는 경우 외부 공급원으로부터의 것과 같이 인식되는 경향이 없다는 인식으로부터 기인한다.

[0649] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "주요 잔기(key residue)"는 항체, 특히 사람화된 항체의 결합 특이성 및/또는 친화성에 보다 영향을 미치는 가변 영역내 특정 잔기를 말한다. 주요 잔기는 다음 중 하나 이상을 포함하나,

이들에 한정되지 않는다: CDR에 인접한 잔기, 잠재적인 글리코실화 부위(N- 또는 O-글리코실화 부위일 수 있음), 드문 잔기, 항원과 상호작용할 수 있는 잔기, CDR과 상호작용할 수 있는 잔기, 표준 잔기, 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기, 베르니어 영역(Vernier zone)내 잔기, 및 가변 중쇄 CDR1의 쇼티아 정의와 제1 중쇄 골격의 카바트 정의 사이에 중첩된 영역내 잔기.

[0650] 본원에 사용된 것으로서, "베르니어" 영역은 푸트(Foote) 및 윈터(Winter)에 의해 기술된 것으로서[참조: *J. Mol. Biol.*, 224: 487-499 (1992)] CDR 구조를 조절하고 항원에 대한 적합성을 미세-조율(fine-tune)할 수 있는 골격 잔기의 소세트를 말한다. 베르니어 영역 잔기는 CDR 하부에 놓이는 층을 형성하며 CDR의 구조 및 항체의 친화성에 영향을 미칠 수 있다.

[0651] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "중화"는, 결합 단백질이 항원에 특이적으로 결합하는 경우 항원의 생물학적 활성에 역작용하는 것을 말한다. 하나의 실시형태에서, 중화 결합 단백질은 항원에 결합하여 이의 생물학적 활성을 적어도 약 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 그 이상 감소시킨다.

[0652] 용어 "활성"은 항원에 대한 항체, 예를 들면 DLL4 항원에 결합하는 항-hDLL4 항체의 결합 특이성/친화성 및/또는 항체, 또는 hDDL4에 대한 이의 결합이 hDDL4의 생물학적 활성을 억제하는, 예를 들면, 사람 노치 수용체 결합 검사, 또는 PHA 블라스트 인터페론-감마 유도 검사에서 PHA 블라스트 증식을 억제하거나 수용체 결합을 억제하는 항-hDDL4 항체의 중화 효능과 같은 활성을 포함한다.

[0653] 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합하는 임의의 폴리펩타이드 결정인자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프 결정인자는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 설포닐과 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함하며, 특정 실시형태에서, 특이적인 3차원 구조적 특징 및/또는 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다. 따라서, 에피토프는 특이적인 결합 파트너 상의 상보성 부위에 결합하는 것으로 공지된 항원(또는 이의 단편)의 영역의 아미노산 잔기로 이루어진다. 항원 또는 항원성 단편은 하나 이상의 에피토프를 함유할 수 있다. 따라서, 당해 분야의 숙련가에 의해, 항체 분자의 모든 "항원 결합 부위"는 항원 분자의 에피토프에 결합하며 모든 항원 분자는 1개, 2개, 수개 또는 많은 에피토프를 가질 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 당해 분야의 숙련가에 의해 항원 분자에 대한 2개의 독립적으로 분리된 항체가 항원 분자 상의 동일한 에피토프 또는 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 것으로 이해된다.

[0654] 특정 실시형태에서, 항체는 단백질 및/또는 거대분자의 복합체 혼합물 내 이의 표적 항원을 인식하는 경우 항원에 특이적으로 결합하는 것으로 일컬어진다. 항체가 교차-경쟁(하나가 다른 하나의 결합 또는 조절 효과를 방지한다)하는 경우, 항체는 "동일한 에피토프에 결합한다"로 일컬어진다. 또한, 에피토프의 구조적 정의(중첩, 유사, 동일)은 유익하지만, 기능적 정의는, 이들이 구조적(결합) 및 기능적(조절, 경쟁) 매개변수를 포함하므로 흔히 더 관련되어 있다.

[0655] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "표면 플라스몬 공명"은 예를 들면, BIAcore[®] 시스템(제조원: 스웨덴 옵살라에 소재하는 BIAcore International AB, 미국 뉴저지주 피스카타웨이에 소재하는 GE Healthcare company)를 사용하여, 바이오센서 매트릭스내에서 단백질 농도에 있어서의 변경을 검출함으로써 실시간 생물특이적인 상호작용의 분석을 허용하는 광학적 현상을 말한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[참조: Joensson et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51: 19-26 (1993); Joensson et al. *BioTechniques*, 11: 620-627 (1991); Johnsson et al., *J. Mol. Recognit.*, 8: 125-131 (1995); 및 Johnsson et al., *Anal. Biochem.*, 198: 268-277 (1991)]을 참조한다.

[0656] 본원에 사용된 것으로서 용어 " K_{on} "은 당해 분야에 공지된 바와 같은 결합 파트너/인식 파트너(예를 들면, 항체/항원) 복합체를 형성하기 위한 인식체 파트너(cognate partner)(예를 들면, 항원)에 대한 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 연합에 대한 온 속도 상수(on rate constant)를 말하는 것으로 의도된다. " K_{on} "은 또한 본원에서 상호교환적으로 사용된 것으로서 용어 "연합 속도 상수" 또는 " k_a "로 공지되어 있다. 항체와 항원 사이의 복합체 형성의 속도 또는 이의 표적 항원에 대한 항체의 결합 속도를 나타내는 당해 값은 또한 하기 식으로 나타낸다:

[0657] 항체 ("Ab") + 항원 ("Ag") \rightarrow Ab-Ag.

[0658] 본원에 사용된 것으로서, 용어 " K_{off} "는 당해 분야에 공지된 것으로서 예를 들면, 항체/항원 복합체로부터 결합 단백질(예를 들면, 항체)의 해리를 위한 오프 속도 상수를 말하는 것으로 의도된다. " K_{off} "은 또한 본원에 상호

교환적으로 사용된 것으로서 용어 "해리 속도 상수" 또는 k_d 로 공지되어 있다. 당해 값은 하기 식으로 나타낸 것으로서 시간 경과에 따른 Ab-Ag 복합체의 유리된 항체 및 항원으로의 분리 또는 이의 표적 항원으로부터 항체의 해리 속도를 나타낸다:

[0659] $Ab + Ag \leftarrow Ab-Ag$.

[0660] 본원에서 상호교환적으로 사용된 것으로서, 용어 "평형 해리 상수" 또는 " K_D "는 평형시 적정 측정에서 수득된 값, 또는 해리 속도 상수(K_{off})를 연합 속도 상수(K_{on})로 나누어 수득된 값을 말한다. 연합 속도 상수, 해리 속도 상수, 및 평형 해리 상수를 사용하여 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 나타낸다. 연합 및 해리 속도 상수를 측정하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 형광성-기초 기술의 사용은 평형시 생리학적 완충액 중에서 시료를 시험하는 능력 및 고 민감성을 제공한다. BIAcore[®] 표면 플라즈몬 공명(생물분자 상호작용 분석) 검사와 같은 다른 실험적 접근 및 장비(예를 들면, 스웨덴 오퍼살라에 소재하는 BIAcore International AB, GE Healthcare company로부터 이용가능한 장비)를 사용할 수 있다. 또한, 사피다인 인스트루먼트(Sapidyne Instruments)(아이다호주 보이즈 소재)로부터 시판되는 KinExA[®][역학적 배제 검사(Kinetic Exclusion Assay)] 검사를 또한 사용할 수 있다.

[0661] "표지" 및 "검출가능한 표지"는 항체 또는 항체에 의해 결합된 분석물과 같이, 예를 들면, 항체 및 분석물과 같은 특이적인 결합 쌍의 구성원들 사이에서 반응이 검출가능하도록 하는 특이적인 결합 파트너에 부착된 모이어티를 의미한다. 이렇게 표지된 특이적인 결합 파트너, 예를 들면, 항체 또는 분석물은 "검출가능하게 표지된"으로 언급된다. 따라서, 본원에 사용된 것으로서 용어 "표지된 결합 단백질"은 결합 단백질의 동정을 위해 제공되는 도입된 표지를 지닌 단백질을 말한다. 하나의 실시형태에서, 표지는 가시적인 수단 또는 장비 수단, 예를 들면, 방사성 표지된 아미노산의 도입 또는 표식된 아비딘(예를 들면, 광학적 방법 또는 비색법에 의해 검출될 수 있는 형광성 마커 또는 효소 활성을 함유하는 아비딘 또는 스트렙타아비딘)에 의해 검출될 수 있는 비오틴 모이어티의 폴리펩타이드에 대한 부착을 의미한다. 폴리펩타이드용 표지의 예는 하기를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다: 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예를 들면, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, 및 ¹⁵³Sm); 색소원, 형광성 표지(예를 들면, FITC, 로다민, 및 란타나이드 인), 효소 표지(예를 들면, 서양 고추냉이 퍼옥시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제); 화학발광성 마커; 비오틴 그룹; 제2 리포터(예를 들면, 루이신 지퍼 쌍 서열(leucine zipper pair sequence), 제2 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 및 에피토프 태그)에 의해 인식된 예정된 폴리펩타이드 에피토프; 및 가돌리늄 킬레이트와 같은 자기 제제. 면역검사에 일반적으로 사용된 표지의 대표적인 예는 광을 생성시키는 모이어티, 예를 들면, 아크리디늄 화합물, 및 형광성을 생산하는 모이어티, 예를 들면, 플루오레세인을 포함한다. 다른 표지는 당해 분야에 공지되어 있거나 본원에 기술되어 있다. 이와 관련하여, 모이어티 자체는 검출가능하게 표지되지 않을 수 있지만 여전히 다른 모이어티와의 반응시 검출될 수 있다. "검출가능하게 표지된"의 사용은 검출가능한 표지의 후자 유형을 포함하는 것으로 의도된다.

[0662] 용어 "항체 접합체"는 치료제 또는 세포독성제와 같은 제2 화학적 모이어티에 화학적으로 연결된 항체와 같은 결합 단백질을 말한다. 용어 "제제"는 본원에서 화학적 화합물, 화학적 화합물들의 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 물질로부터 제조된 추출물을 나타내기 위해 사용된다. 바람직하게는, 치료제 또는 세포독성제는 백일해 독소, 탁솔, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 액티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 푸로마이신 및 이의 유사체 또는 동족체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0663] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "결정" 및 "결정화된"은, 결정의 형태로 존재하는, 결합 단백질(예를 들면, 항체), 또는 이의 항원 결합 부분을 말한다. 결정은 물질의 고체 상태의 한가지 형태이며, 이는 무정형 고체 상태 또는 액체 결정성 상태와 같은 다른 형태와는 구별된다. 결정은 원자, 이온, 분자(예를 들면, 항체와 같은 단백질), 또는 분자 조립체(예를 들면, Fab/항원 복합체를 포함하는 항원/항체 복합체)의 규칙적이고, 반복되는, 3차원 배열로 구성된다. 이들 3-차원 배열은 당해 분야에서 잘 이해되는 특이적인 수학적 관계에 따라 배열된다. 결정내에서 반복되는 기본 단위 또는 빌딩 블록(building block)은 비대칭 단위로 일컬어진다. 제공된, 잘-정의된 결정학상 대칭과 일치하는 배열내 비대칭 단위의 반복은 결정의 "단위 셀(unit cell)"을 제공

한다. 모든 3차원에서 규칙적인 번역에 의한 단위 셀의 반복은 결정을 제공한다[참조: Giege et al., *In Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., (Ducruix and Giege eds.) (Oxford University Press, New York, 1999), chapter 1, pages 1-16].

[0664] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 어느 한가지 유형의 뉴클레오타이드의 변형된 형태의 2개 이상의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 의미한다. 당해 용어는 DNA의 단일 및 이중 가닥 형태를 포함한다.

[0665] 용어 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 이의 기원에 의해, "분리된 폴리뉴클레오타이드"는, 이와 함께 "분리된 폴리뉴클레오타이드"가 천연에서 발견되거나; 천연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결되거나; 보다 큰 서열의 일부로 천연에서 발생하지 않는 폴리뉴클레오타이드 모두 또는 일부와 연합되지 않는 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 게놈성, cDNA, 또는 합성 기원, 또는 이의 일부 조합)를 의미할 수 있다.

[0666] 용어 "벡터"는, 이것이 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 말하는 것으로 의도된다. 벡터의 한가지 유형은 "플라스미드"이며, 이는, 추가의 DNA 분절이 연결될 수 있는 환상 이중 가닥 DNA 루프를 말하는, "플라스미드"이다. 벡터의 다른 유형은 바이러스 벡터이며, 여기서 추가의 DNA 분절은 바이러스 게놈내로 연결될 수 있다. 특정의 벡터는, 이들이 도입된 숙주 세포내에서 자가 복제할 수 있다(예를 들면, 세균 복제 기원을 갖는 세균 벡터 및 에피소말(episomal) 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들면, 비-에피소말 포유동물 벡터)는 숙주 세포내로 도입시 숙주 세포의 게놈내로 통합됨으로써 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정의 벡터가, 이들이 작동적으로 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합체 발현 벡터"(또는 단순히 "발현 벡터")로 언급된다. 일반적으로, 재조합체 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 흔히 플라스미드의 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는, 플라스미드가 벡터의 가장 일반적으로 사용된 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들면, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 발현 벡터의 이러한 다른 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 벡터의 RNA 버전(RNA 바이러스 벡터 포함)은 또한 본 발명에서 발견할 수 있다.

[0667] 용어 "작동적으로 연결된"은 근접부위(juxtaposition)를 말하며, 여기서 기술된 성분들은, 이들의 이의 의도된 방식으로 기능하는 관계에 있다. 암호화 서열에 대해 "작동적으로 연결된" 제어 서열은, 암호화 서열의 발현이 제어 서열과 혼용성인 조건 하에서 달성되도록 하는 방식으로 연결된다. "작동적으로 연결된" 서열은 목적 유전자와 연속적인 발현 제어 서열, 트랜스(in trans)로 작용하는, 즉, 목적 유전자보다 다양한 핵산 분자 상에 위치하는 발현 제어 서열, 및 또한 동일한 핵산 분자 상에 위치하지만 목적 유전자와는 떨어져서 위치하는 발현 제어 서열을 포함한다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "발현 제어 서열"은, 이들이 연결된 암호화 서열의 발현 및 프로세싱을 유효화하는데 필수적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 말한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 시그널과 같은 효율적인 RNA 프로세싱 시그널; 세포질성 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효능을 향상시키는 서열[즉, 코작 컨센서스 서열(Kozak consensus sequence); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 목적하는 경우, 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 이러한 제어 서열의 특성은 숙주 유기체에 따라 상이한데; 원핵 세포에서, 이러한 제어 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함하며; 진핵 세포에서, 일반적으로, 이러한 제어 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "제어 서열"은, 이의 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 성분을 포함하는 것으로 의도되며, 또한 이의 존재가 유리한 추가의 성분, 예를 들면, 리더 서열(leader sequence) 및 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.

[0668] "형질전환"은 이에 의해 외인성 핵산(예를 들면, DNA 분자)가 숙주 세포내로 도입되는 임의의 공정을 말한다. 형질전환은 당해 분야에 잘 공지된 각종 방법을 사용하는 천연 또는 인공 조건 하에서 발생할 수 있다. 형질전환은 외부 핵산 서열의 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로의 삽입을 위한 임의의 공지된 방법에 의존할 수 있다. 당해 방법은 형질전환되는 숙주 세포를 기준으로 선택되며 세포막을 통과하는 플라스미드 흡수, 바이러스 감염, 전기천공, 지질감염 및 입자 충격(particle bombardment)을 포함할 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 "형질전환된" 세포는, 삽입된 DNA가 자가 복제하는 플라스미드로서 또는 숙주 염색체의 일부로서 복제할 수 있는 안정하게 형질전환된 세포를 포함한다. 이들은 또한 제한된 기간 동안 삽입된 DNA 또는 RNA를 일시적으로 발현하는 세포를 포함한다.

[0669] 용어 "재조합체 숙주 세포"(또는 단순히 "숙주 세포")는, 외인성 DNA가 도입된 세포를 말하는 것으로 의도된다. 하나의 실시형태에서, 숙주 세포는 비-제한적 예로서 미국 특허 제7,262,028호에 기술된 숙주 세포와 같은, 항

체를 암호화하는 2개 이상(예를 들면, 다수)의 핵산을 포함한다. 이러한 용어는 특정한 대상 세포만을 언급하는 것이 아니라, 이러한 세포의 후대 세포 또한 언급하는 것으로 의도된다. 특정의 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 발생할 수 있지만, 이러한 후대 세포는 실제로, 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용된 것으로서 용어 "숙주 세포"의 범위 내에 포함된다. 하나의 실시형태에서, 숙주 세포는 생명계(Kingdoms of life) 중 어느 하나로부터 선택된 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 진핵 세포는 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)와 같은 원핵 세포 중; CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2, 및 PER.C6과 같은 포유동물 세포주; 곤충 세포주 Sf9; 및 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 진균 세포 종을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0670] 표준 기술이 재조합체 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 및 조직 배양 및 형질전환(예를 들면, 전기천공, 지질 감염)에 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술을 제조업자의 명세에 따라서 또는 당해 분야에서 일반적으로 달성된 바와 같이 또는 본원에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. 상기한 기술 및 과정은 일반적으로 당해 분야에 잘 공지된 통상의 방법에 따라서 및 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 각종의 일반적이고 보다 특정한 참조 문헌에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다[참조: 예를 들면, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989)].

[0671] 당해 분야에 공지된 것으로서, "유전자삽입 유기체(Transgenic organism)"는 삽입유전자를 함유하는 세포를 갖는 유기체를 말하며, 여기서 유기체(또는 유기체의 조상)내로 도입된 삽입유전자는 유기체내에서 천연적으로 발현되지 않는 폴리펩타이드를 발현한다. "삽입유전자"는 DNA 작제물이며, 이는, 유전자삽입 유기체가 발현하는 세포의 게놈내로 안정하게 및 작동적으로 통합되어 유전자삽입 유기체의 하나 이상의 세포 유형 또는 조직내에서 암호화된 유전자 생성물의 발현을 지시한다.

[0672] 용어 "조절하다" 및 "조정하다"는 상호교환적으로 사용되며, 본원에 사용된 바와 같이, 목적 분자의 활성(예를 들면, hDLL4의 생물학적 활성)에 있어서의 변화 또는 변경을 말한다. 조정은 목적 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 증가 또는 감소일 수 있다. 분자의 예시적인 활성 및 기능은 결합 특성, 효소 활성, 세포 수용체 활성화, 및 시그널 형질도입을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0673] 상응하게는, 본원에 사용된 것으로서 용어 "조절인자"는 목적 분자의 활성 또는 기능(예를 들면, hDLL4의 생물학적 활성)을 변화시키거나 변경시킬 수 있는 화합물이다. 예를 들면, 조절인자는 조절인자의 부재 하에 관찰된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 증가 또는 감소를 유발할 수 있다. 특정 실시형태에서, 조절인자는 분자의 적어도 하나의 활성 또는 기능의 크기를 감소시키는 억제제이다. 예시적인 억제제는 단백질, 펩타이드, 항체, 펩티바디(peptibody), 탄수화물 또는 소 유기 분자를 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 펩티바디는 기술되어 있다. 예를 들면, PCT 공보 제W001/83525호를 참조한다.

[0674] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "효능제"는 목적 분자와 접촉시 효능제의 부재 하에 관찰된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 증가를 유발한다. 특정한 목적의 효능제는 노치-시그널링 경로의 구성원, DLL4 폴리펩타이드, 및 DLL4에 결합하는 핵산, 탄수화물, 또는 임의의 다른 분자도 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0675] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "길항제" 또는 "억제제"는 목적 분자와 접촉시 길항제의 부재 하에 관찰된 활성 또는 기능의 크기와 비교하여 분자의 특정 활성 또는 기능의 크기에 있어서의 감소를 유발하는 조절인자를 말한다. 특정한 목적의 길항제는 DLL4, 특히 사람 DLL4(hDLL4)의 생물학적 또는 면역학적 활성을 차단하거나 조정하는 것들을 포함한다. hDLL4의 길항제 및 억제제는 hDLL4 및/또는 설치류 DLL4에 결합하는 단백질, 핵산, 탄수화물, 또는 임의의 다른 분자를 포함할 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0676] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "유효량"은 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 증중도 및/또는 지속기간을 감소시키거나 완화시키거나; 장애의 진전을 억제시키거나 예방하거나; 장애의 퇴행을 유발하거나; 장애와 관련된 하나 이상의 증상의 재발, 발달, 발생, 또는 진행을 억제하거나 방지하거나; 장애를 검출하거나; 다른 치료요법(예를 들면, 예방제 또는 치료제)의 예방학적 또는 치료학적 효과(들)을 향상시키거나 개선시키기에 충분한 치료요법의 양을 말한다.

[0677] "환자" 및 "대상체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되어 영장류(예를 들면, 사람, 원숭이, 및 침팬지), 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 낙타, 라마, 말, 염소, 토끼, 양, 햄스터, 기니아 피그, 고양이, 개, 래트, 마우스 및 고래), 조류(예를 들면, 오리 또는 거위), 및 상어를 포함하는 포유동물과 같은 동물을 말할 수 있다. 바람

직하게는, 환자 또는 대상체는 사람이며, 예를 들면, 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료중이거나 평가된 사람; 질환, 장애 또는 병태에 대한 위험이 있는 사람; 질환, 장애 또는 병태를 지닌 사람; 및/또는 질환, 장애 또는 병태에 대해 치료중인 사람이다. 보다 바람직하게는, 환자 또는 대상체는, 존재하는 비정상적인 DLL4 발현이 암 또는 다른 질환을 지지하고 DLL4 활성의 억제 또는 파괴가 암 또는 다른 질환을 치료하는데 바람직한 다른 질환 또는 암에 대해 치료중이거나 이로 평가된다.

[0678] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "시료"는 이의 가장 광범위한 의미로 사용된다. 본원에 사용된 것으로서 "생물학적 시료"는 살아있는 것 또는 앞서 살아있는 것들로부터의 물질의 임의의 양을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 살아있는 것들은 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 물질은 혈액(예를 들면, 전혈), 혈장, 혈청, 뇨, 양수, 윤활액, 내피 세포, 백혈구, 단핵구, 다른 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0679] "성분", "성분들" 및 "적어도 하나의 성분"은 일반적으로 본원에 기술된 방법 및 당해 분야에 공지된 다른 방법에 따라 환자 뇨, 혈청 또는 혈장 시료와 같은 시험 시료의 검사를 위한 키트내에 포함될 수 있는 포획 항체, 검출 또는 접합체 항체, 대조군, 교정기, 일련의 교정기, 민감성 패널, 용기, 완충액, 희석제, 염, 효소, 효소에 대한 보조-인자, 검출 시약, 전처리 시약/용액, 기질(예를 들면, 용액으로서), 정지 용액 등을 말한다. 따라서, 본 기재내용과 관련하여, "적어도 하나의 성분", "성분" 및 "성분들"은 상기와 같은 폴리펩타이드 또는 다른 분석물, 예를 들면, 항-분석물(예를 들면, 항-폴리펩타이드) 항체에 대한 결합에 의해서와 같이, 고체 지지체 상에 임의로 고정된, 폴리펩타이드와 같은 분석물을 포함하는 조성물을 포함할 수 있다. 일부 성분은 용액 중에 존재할 수 있거나 검사에서 사용하기 위해 재구성용으로 동결건조될 수 있다.

[0680] "위험(risk)"은 현재 또는 미래의 일부 시점에서 발생하는 특정 사건의 가능성 또는 개연성을 말한다. "위험 계층화(risk stratification)"는, 의사가 환자를 특정한 질환, 장애 또는 병태로 진행될 위험을 저, 중간, 고 또는 최고로 분류하도록 하는 공지된 임상 위험 인자의 배열을 말한다.

[0681] 특정한 결합 쌍의 구성원(예를 들면, 항원 또는 이의 단편 및 항체 또는 이의 항원 결합 단편) 사이의 상호작용과 관련하여 "특이적인" 및 "특이성"은 상호작용의 선택적인 반응성을 말한다. 어구 "에 특이적으로 결합하는" 및 유사 어구는 항체(또는 이의 항원 결합 단편)와 같은 결합 단백질이 목적 분자(또는 이의 단편)에 특이적으로 결합하며 다른 실체에 대해 특이적으로 결합하지 않는 능력을 말한다.

[0682] "특이적인 결합 파트너"는 특정한 결합 쌍의 구성원이다. 특이적인 결합 쌍은 화학적 또는 물리적 수단을 통해서 특이적으로 결합한, 2개의 상이한 분자를 포함한다. 따라서, 항원 및 항체 특이적인 결합 쌍 이외에, 다른 특이적인 결합 쌍은 비오틴 및 아비딘(또는 스트렙타아비딘), 탄수화물 및 렉틴, 상보성 뉴클레오타이드 서열, 효소가 및 수용체 분자, 보조인자 및 효소, 효소 억제제 및 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 특이적인 결합 쌍은 원래의 특이적인 결합 구성원의 유사체, 예를 들면, 분석물-유사체인 구성원을 포함할 수 있다. 면역 반응성의 특이적인 결합 구성원은 분리되거나 재조합적으로 생산되는 것에 상관없이, 항원, 항원 단편, 및 항체, 예를 들면, 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 및 또한 이의 복합체, 단편 및 변이체(변이체의 단편 포함)를 포함한다.

[0683] 본원에 사용된 것으로서, "변이체"는 아미노산 서열내에서 아미노산의 첨가(예를 들면, 삽입), 결실 또는 보존적 치환에 의해 제공된 폴리펩타이드(예를 들면, DLL4 폴리펩타이드 또는 항-DLL4 항체)와는 상이하지만, 제공된 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 보유하는(예를 들면, 변이체 DLL4는, 변이체 DLL4가 야생형 DLL4의 원래의 항체 결합 부위(에피토프)를 보유하는 경우 항-DLL4 항체와의 결합에 대해 야생형 DLL4와 경쟁할 수 있다) 폴리펩타이드를 의미한다. 아미노산의 보존적 치환, 즉, 아미노산을 유사한 특성(예를 들면, 친수성 및 하전된 영역의 정도 및 분포)의 상이한 아미노산으로 대체하는 것은 당해 분야에서 전형적으로 약간의 변화를 포함하는 것으로 인식된다. 이들 약간의 변화는 부분적으로는 당해 분야에 이해되는 것으로서[참조: 예를 들면, Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132 (1982)], 아미노산의 수치요법 지수(hydropathic index)를 고려함으로써 확인될 수 있다. 아미노산의 수치요법 지수는 이의 소수성 및 전하의 고려를 기초로 한다. 유사한 수치요법 지수의 아미노산이 치환될 수 있으며 여전히 단백질 기능을 보유하는 것은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 하나의 양상에서, 수치요법 지수가 ± 2 인 아미노산이 치환된다. 아미노산의 친수성을 또한 사용하여 생물학적 기능을 보유하는 단백질을 생성할 수 있는 치환을 나타낼 수 있다. 펩타이드와 관련하여 아미노산의 친수성의 고려는 항원성 및 면역원성과 잘 상호관련된 것으로 보고된 유용한 척도인, 이러한 펩타이드의 최대 국소 평균 친수성의 계산을 허용한다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제4,554,101호). 유사한 친수성 값을 가진 아미노산의 치환은 당해 분야에 이해된 것으로서, 생물학적 활성, 예를 들면, 면역원성을 보유하는 펩타이드를 생성할 수 있다.

하나의 양상에서, 치환은 서로 ± 2 내의 친수성 값을 갖는 아미노산을 사용하여 수행된다. 아미노산의 소수성 지수 및 친수성 값 둘 다는 이러한 아미노산의 특정 측쇄에 의해 영향을 받는다. 이러한 관찰과 일치하여, 생물학적 기능과 일치하는 아미노산 치환은 소수성, 친수성, 전하, 크기 및 다른 특성에 의해 나타낸 바와 같이, 아미노산의 상대적인 유사성, 및 특히 이들 아미노산의 측쇄에 의존하는 것으로 이해된다. "변이체"는 또한 단백질 분해, 인산화, 또는 다른 번역 후 변형과 같이 차등적으로 프로세싱되지만, 이의 생물학적 활성 또는 항원 반응성, 예를 들면, DLL4에 결합하는 능력을 여전히 보유하는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 기술하기 위해 사용될 수 있다. 본원의 "변이체"의 용도는 달리 내용에서 부정하지 않는 한 변이체의 단편을 포함하는 것으로 의도된다.

[0684] 본원에 사용된 것으로서 용어 "시료"는 이의 가장 광범위한 의미로 사용된다. 본원에 사용된 것으로서, "생물학적 시료"는 살아있는 것 또는 앞서 살아있는 것으로부터의 물질의 임의의 양도 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 살아있는 것들은 사람, 마우스, 래트, 원숭이, 개, 토끼 및 다른 동물을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다. 이러한 물질은 혈액, 혈청, 뇨, 활액, 세포, 기관, 조직, 골수, 림프절 및 비장을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0686] I. 사람 DLL4에 결합하는 항체.

[0687] 본 발명의 하나의 양상은 DLL4에 고 친화성, 느린 오프 속도 및/또는 고 중화능으로 결합하는 분리된 래트 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 부위를 제공한다. 본 발명의 다른 양상은 DLL4에 결합하는 키메라 항체를 제공한다. 다른 양상에서, 본 발명은 CDR 이식된 항체, 또는 이러한 DLL4의 항원-결합 부위를 제공한다. 본 발명의 다른 양상은 DLL4에 결합하는 사람화된 항체, 또는 이의 항원-결합 부위를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 항체, 또는 이의 부위는 분리된 항체 또는 분리된 이의 부위이다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 중화 항-DLL 항체이다. 유리하게는, DLL4에 결합하는 이러한 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 개체(사람 또는 다른 포유동물)에게 투여될 수 있는 치료제로서의 용도가 밝혀져 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 중화 항-DLL4 및/또는 항-VEGFR2 항체이다.

[0689] A. 항-DLL4 항체를 제조하는 방법

[0690] 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지된 다수의 기술 중 어느 것에 의해 제조될 수 있다. 사용하여 본 발명에 따른 DLL4 모노클로날 항체를 수득할 수 있는 각종 기술의 양상은 하기 기술된다.

[0691] 1. 하이브리도마 기술을 사용한 항-DLL4 모노클로날 항체

[0692] 모노클로날 항체는 하이브리도마, 재조합체, 및 파아지 디스플레이 기술, 또는 이의 조합의 사용을 포함하는 당해 분야에 공지된 광범위한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 모노클로날 항체는 당해 분야에 공지되고, 예를 들면, 문헌[참조: 예를 들면, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, second edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., In *Monoclonal Antibodies 및 T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, New York, 1981)에 교시된 것들을 포함하는 하이브리도마 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에 한정되지 않음에 또한 주목한다. 용어 "모노클로날 항체"는 임의의 진핵, 원핵 또는 파아지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유도된 항체를 말하며, 이것이 생상되는 방법이 아니다.

[0693] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 모노클로날 항체를 생산하는 방법 및 또한 본 발명의 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 배양함을 포함하는 방법에 의해 생산된 항체를 제공하며, 여기서, 바람직하게는, 하이브리도마는 DLL4로 면역화시킨 동물, 예를 들면, 래트 또는 마우스로부터 분리된 비장세포를 흑색종 세포와 융합시킨 후 본 발명의 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대한 융합으로부터 생성된 하이브리도마를 스크리닝함으로써 생성된다. 요약하면, 래트는 DLL4 항원으로 면역화시킬 수 있다(참조: 하기 실시예). 바람직한 실시형태에서, DLL4 항원은 보조제와 함께 투여되어 면역 반응을 자극한다. 이러한 보조제는 완전 또는 불완전 프로인트 보조제(complete or incomplete Freund's adjuvant), RIBI (무라밀 디펩타이드) 또는 ISCOM(면역자극 복합체)를 포함한다. 이러한 보조제는 이를 국소 침착물내에 봉쇄시킴으로써 신속한 확산으로부터 폴리펩타이드를 보호할 수 있거나, 이들은 숙주를 자극하여 대식구 및 면역계의 다른 성분들에 대해 화학주성인 인자들을 분비하는 물질을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 폴리펩타이드가 투여되는 경우, 면역화 스케줄은 폴리펩타이드의 2회 이상의 투여, 수주에 걸친 확산을 포함할 것이지만, 폴리펩타이드의 단일 투여 또

한 사용될 수 있다.

- [0694] 동물을 DLL4 항원으로 면역화한 후, 항체 및/또는 항체-생산 세포를 동물로부터 수득할 수 있다. 항-DLL4 항체-함유 혈청은 동물로부터 동물을 방혈시키거나 희생시켜 수득한다. 혈청은 동물로부터 수득되므로 사용될 수 있으며, 면역글로불린 분획은 혈청으로부터 수득될 수 있거나, 항-DLL4 항체는 혈청으로부터 정제될 수 있다. 이러한 방식으로 수득된 혈청 또는 면역글로불린은 폴리클로날이므로, 특성의 이중 배열을 갖는다.
- [0695] 일단 면역 반응이 검출되면, 예를 들어, 항원 DLL4에 대해 특이적인 항체가 래트 혈청 중에서 검출되면, 래트 비장을 수거하고 비장세포를 분리한다. 이후에, 비장세포를 잘-공지된 기술에 의해 임의의 적합한 비장 세포, 예를 들면, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection: ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재)로부터 이용가능한 세포주 SP20으로부터의 세포에 융합시킨다. 하이브리도마를 선택하고 제한 희석으로 클로닝한다. 하이브리도마 클론을 이후에 당해 분야에 공지된 방법에 의해 DLL4에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 검사한다. 일반적으로 고 수준의 항체를 함유하는 복수액은 래트를 양성 하이브리도마 클론으로 면역화시켜 생성할 수 있다.
- [0696] 다른 실시형태에서, 항체-생산 무한증식된 하이브리도마는 면역화된 동물로부터 제조할 수 있다. 면역화 후, 동물을 희생시키고 비장 B 세포를 무한증식된 흑색종 세포에 당해 분야에 잘 공지된 바와 같이 융합시킨다(참조: 예를 들면, Harlow and Lane, 상기 참조). 바람직한 실시형태에서, 흑색종 세포는 면역글로불린 폴리펩타이드(비-분비성 세포주)를 분비하지 않는다. 융합 및 항생제 선택 후, 하이브리도마를 DLL4, 또는 이의 일부, 또는 DLL4를 발현하는 세포를 사용하여 스크리닝한다. 바람직한 실시형태에서, 초기 스크리닝은 효소-결합된 면역흡착성 검사(ELISA) 또는 방사면역검사(RIA), 바람직하게는 ELISA를 사용하여 수행한다. ELISA 스크리닝의 예는 PCT 공보 제WO 00/37504호에서 제공된다.
- [0697] 항-DLL4 항체-생산 하이브리도마를 하기 추가로 논의된 바와 같이, 선택하고, 클로닝하고, 견고한 하이브리도마 성장, 고 항체 생산, 및 바람직한 항체 특징을 포함하는 바람직한 특징에 대해 추가로 스크리닝한다. 하이브리도마는 동계 동물, 즉 면역계를 결여한 동물, 예를 들면, 누드 마우스(nude mouse)내에서 생체내로 또는 시험관 내 세포 배양물로 배양하고 확장시킬 수 있다. 하이브리도마를 선택하고, 클로닝하며 확장시키는 방법은 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지되어 있다.
- [0698] 바람직한 실시형태에서, 하이브리도마는 본원에 기술된 바와 같이, 래트 하이브리도마이다. 다른 실시형태에서, 하이브리도마는 마우스, 양, 돼지, 염소, 소 또는 말과 같은 비-사람, 비-래트 종에서 생산된다. 여전히 다른 바람직한 실시형태에서, 하이브리도마는 사람 하이브리도마이며, 여기서 사람 비-분비성 흑색종은 항-DLL4 항체를 발현하는 사람 세포와 함께 융합된다.
- [0699] 특이적인 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지된 기술로 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 과파인(2개의 동일한 Fab 단편을 생산하기 위함) 또는 펩신[F(ab')₂ 단편을 생산하기 위함]과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해적 분해에 의해 생산될 수 있다. IgG 분자의 F(ab')₂ 단편은 경쇄(가변 경쇄 및 고정 경쇄 영역 함유) 둘 다, 중쇄의 CH1 도메인, 및 모 IgG 분자의 이황화물-형성 힌지 영역(hinge region)을 포함하는 보다 큰("모") IgG 분자의 2개의 항원-결합 부위를 보유한다. 따라서, F(ab')₂ 단편은 모 IgG 분자와 같이 항원 분자를 여전히 가교결합시킬 수 있다.
- [0701] **2. SLAM을 사용한 항-DLL4 모노클로날 항체**
- [0702] 본 발명의 다른 양상에서, 재조합체 항체는 미국 특허 제5,627,052호; PCT 공보 제WO 92/02551호; 및 문헌[참조: Babcook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996)]에 기술된 바와 같이, 선택된 림프구 항체 방법(SLAM)으로서 당해 분야에서 언급된 과정을 사용하여 단일의, 분리된 림프구로부터 생성된다. 당해 방법에서, 목적한 항체, 예를 들면, I.A.1(상기)에 기술된 면역화된 동물 중 어느 하나로부터 유도된 림프구는 항원-특이적인 용혈 플라크 검사를 사용하여 스크리닝되며, 여기서 항원 DLL4, aDLL4의 소단위 또는 이의 단편은 양 적혈구 세포에 비오틴과 같은 링커를 사용하여 커플링되며 DLL4에 대해 특이성을 갖는 항체를 분비하는 단일 세포를 확인하기 위해 사용된다. 목적한 항체-분비 세포를 확인한 다음, 중쇄- 및 경쇄 가변 영역 cDNA를 역 트랜스크립타제-PCR(RT-PCR)에 의해 세포로부터 구조하고 이후에 이들 가변 영역을 COS 또는 CHO 세포와 같은 포유동물 숙주 세포내에서, 적절한 면역글로불린 고정 영역(예를 들면, 사람 고정 영역)의 맥락으로, 발현시킬 수 있다. 이후에, 생체내 분비된 림프구로부터 유도된, 증폭된 면역글로불린 서열로 형질감염된 숙주

세포는 예를 들면, 형질감염된 세포를 패닝(panning)하여 DLL4에 대한 항체를 발현하는 세포를 분리함으로써, 추가의 분석 및 시험관내 선택을 진행시킬 수 있다. 또한, 증폭된 면역글로불린 서열은 시험관내 친화성 성숙 방법에 의해서와 같이 시험관내에서 조작할 수 있다(참조: 예를 들면, PCT 공보 제WO 97/29131호 및 PCT 공보 제WO 00/56772호).

[0703] **3. 유전자삽입 동물을 사용한 항-DLL4 모노클로날 항체**

[0704] 본 발명의 다른 실시형태에서, 항체는 사람 면역글로불린 유전자자리 중 일부 또는 모두를 포함하는 비-사람 동물을 DLL4 항원을 사용하여 면역화시킴으로써 생산한다. 하나의 실시형태에서, 비-사람 동물은 XENOMOUSE[®] 유전자삽입 마우스, 즉 사람 면역글로불린 유전자자리의 거대 단편을 포함하며 마우스 항체 생산을 결여하고 있다(참조: 예를 들면, Green et al., *Nature Genetics*, 7: 13-21 (1994) 및 미국 특허 제5,916,771호; 제5,939,598호; 제5,985,615호; 제5,998,209호; 제6,075,181호; 제6,091,001호; 제6,114,598호; 및 제6,130,364호). 또한 PCT 공보 제WO 91/10741호; 제WO 94/02602호; 제WO 96/34096호; 제WO 96/33735호; 제WO 98/16654호; 제WO 98/24893호; 제WO 98/50433호; 제WO 99/45031호; 제WO 99/53049호; 제WO 00/09560호; 및 제WO 00/37504호를 참조한다. XENOMOUSE[®] 유전자삽입 마우스는 완전한 사람 항체의 성체-유사 사람 레퍼토리를 생산하며, 항원-특이적인 사람 모노클로날 항체를 생성한다. XENOMOUSE[®] 유전자삽입 마우스는 사람 중쇄 유전자자리 및 x 경쇄 유전자자리의 메가염기(megabase) 크기의, 배성 구조 YAC 단편의 도입을 통해 사람 항체 레퍼토리의 대략 80%를 함유한다[참조: 이의 기재내용이 본원에 참조로 혼입된 문헌: Mendez et al., *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495 (1998)].

[0705] **4. 재조합체 항체 라이브러리를 사용한 항-DLL4 모노클로날 항체**

[0706] 시험관내 방법을 또한 사용하여 본 발명의 항체를 제조할 수 있으며, 여기서 항체 라이브러리를 스크리닝하여 목적하는 DLL4-결합 특이성을 갖는 항체를 확인한다. 이러한 재조합체 항체 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 예를 들면, 미국 특허 제5,223,409호(Ladner et al.); PCT 공보 제WO 92/18619호(Kang et al.); PCT 공보 제WO 91/17271호(Dower et al.); PCT 공보 제WO 92/20791 (Winter et al.); PCT 공보 제WO 92/15679호(Markland et al.); PCT 공보 제WO 93/01288호(Breitling et al.); PCT 공보 제WO 92/01047호(McCafferty et al.); PCT 공보 제WO 92/09690호(Garrard et al.); 문헌[참조: Fuchs et al., *Bio/Technology*, 9: 1369-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3: 81-85 (1992); Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992); Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992); Garrard et al., *Bio/Technology*, 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991)]; 미국 특허원 공보 제2003/0186374호; 및 PCT 공보 제WO 97/29131호에 기술되어 있으며, 이들 각각의 내용은 본원에 참조로 혼입된다.

[0707] 재조합체 항체 라이브러리는 DLL4, 또는 DLL4의 일부로 면역화된 대상체로부터 기원할 수 있다. 대안적으로, 재조합체 항체 라이브러리는 나이브(naive) 대상체, 즉, 사람 DLL4로 면역화되지 않은 사람 대상체로부터의 사람 항체 라이브러리와 같은, DLL4로 면역화되지 않은 대상체로부터 기원할 수 있다. 본 발명의 항체는 재조합체 항체 라이브러리를 사람 DLL4를 포함하는 펩타이드를 사용하여 스크리닝함으로써 DLL4를 인식하는 항체를 선택함에 의해 선택된다. 이러한 스크리닝 및 선택을 수행하는 방법은 앞서의 단락에서 참조 문헌들에 기술된 바와 같이, 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 특정한 K_{off} 속도 상수로 사람 DLL4로부터 해리되는 항체와 같은, DLL4에 대해 특정 결합 친화성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해, 표면 플라즈몬 공명의 당해 분야에 잘 공지된 방법을 사용하여 목적하는 K_{off} 속도 상수를 갖는 항체를 선택할 수 있다. 특정한 IC_{50} 을 갖는 항체와 같이, hDLL4에 대해 특정한 중화 활성을 갖는 본 발명의 항체를 선택하기 위해, DLL4 활성의 억제를 평가하기 위해 당해 분야에 공지된 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0708] 하나의 양상에서, 본 발명은 사람 DLL4에 결합하는 분리된 항체, 또는 이의 항원-결합 부위에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체는 중화 항체이다. 각종 실시형태에서, 항체는 재조합체 항체 또는 모노클로날 항체이다.

[0709] 예를 들면, 본 발명의 항체는 또한 당해 분야에 공지된 다양한 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 파아지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 수반하는 파아지 입자의 표면에 나타난다. 이러한 파아지를 이용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들

면, 사람 또는 뮤린)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타낼 수 있다. 목적한 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파아지는 항원, 예를 들면, 고체 표면 또는 비드(bead)에 결합되거나 포획된 항원 또는 표지된 항원을 사용하여 선택하거나 확인할 수 있다. 이들 방법에 사용된 파아지는 전형적으로 파아지 유전자 III 또는 유전자 VIII 단백질에 재조합적으로 융합된 Fab, Fv, 또는 이항화물 안정화된 Fv 항체 도메인을 지닌 파아지로부터 발현된 fd 및 M13 결합 도메인을 포함하는 필라멘트성 파아지이다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파아지 디스플레이 방법의 예는 문헌[참조: Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene*, 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology*, 57: 191-280 (1994)]; PCT 공보 제WO 92/01047호; PCT 공보 제WO 90/02809호; 제WO 91/10737호; 제WO 92/01047호; 제WO 92/18619호; 제WO 93/11236호; 제WO 95/15982호; 제WO 95/20401; 및 미국 특허 제5,698,426호; 제5,223,409호; 제5,403,484호; 제5,580,717호; 제5,427,908호; 제5,750,753호; 제5,821,047호; 제5,571,698호; 제5,427,908호; 제5,516,637호; 제5,780,225호; 제5,658,727호; 제5,733,743호; 및 제5,969,108호에 기재된 것들을 포함한다.

[0710] 상기 참조 문헌들에 기술된 바와 같이, 파아지 선택 후, 파아지로부터 항체 암호화 영역을 분리하여 사람 항체 또는 임의의 다른 목적하는 항원 결합 단편을 포함하는 전체 항체를 생성시키는데 사용하고, 예를 들면, 하기에 상세히 기술된 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 세균을 포함하는 임의의 목적하는 숙주내에서 발현시킬 수 있다. 예를 들면, Fab, Fab', 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생산하기 위한 기술을 또한 PCT 공보 제WO 92/22324호; 문헌[참조: Mullinax et al., *BioTechniques*, 12(6): 864-869 (1992); Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 34: 26-34 (1995); 및 Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988)]에 기술된 것들과 같이, 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 이용할 수 있다. 단일쇄 Fv 및 항체를 생산하는데 사용될 수 있는 기술의 예는 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; 문헌[참조: Huston et al., *Methods in Enzymology*, 203: 46-88 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999 (1993); 및 Skerra et al., *Science*, 240: 1038-1041 (1988)]에 기술된 것들을 포함한다.

[0711] 파아지 디스플레이에 의한 재조합체 항체 라이브러리의 스크리닝에 대한 대안으로, 거대한 조합 라이브러리를 스크리닝하기 위해 당해 분야에 공지된 다른 방법을 본 발명의 항체의 확인에 적용시킬 수 있다. 대안적인 발현 시스템 중 하나의 유형은, 재조합체 항체 라이브러리를 PCT 공보 제WO 98/31700호(Szostak 및 Roberts), 및 문헌[참조: Roberts 및 Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-12302 (1997)]에 기술된 바와 같이, RNA-단백질 융합체로서 발현시키는 것이다. 당해 시스템에서, 공유결합성 융합체가 mRNA와 이의 3' 말단에서 푸로마이신, 펩티드 수용체 항생제를 수반하는 합성 mRNA의 시험관내 번역에 의해 암호화하는 펩타이드 또는 단백질 사이에 생성된다. 따라서, 특이적인 mRNA가 암호화된 펩타이드 또는 단백질, 예를 들면, 항체 또는 이의 일부의 특성, 예를 들면, 항체의 결합을 기준으로 한 mRNA(예를 들면, 조합 라이브러리), 또는 이중 특이성 항원에 대한 이의 일부의 복합체 혼합물로부터 농축될 수 있다. 이러한 라이브러리의 스크리닝으로부터 회수된, 항체를 암호화하는 핵산 서열 또는 이의 일부는 상기 기술된 바와 같이 재조합체 수단에 의해(예를 들면, 포유동물 숙주 세포내에서) 발현될 수 있으며, 또한, 돌연변이가 원래 선택된 서열(들)내로 도입되는 추가 라운드의 mRNA-펩타이드 융합체의 스크리닝에 의해, 또는 상기 기술된 바와 같이, 재조합체 항체의 시험관내 친화성 성숙에 대한 다른 방법에 의해 추가의 친화성 성숙에 적용시킬 수 있다. 이러한 방법의 바람직한 예는 실시예(하기)에서 사용된 PRO융합 디스플레이 기술이다.

[0712] 다른 시도에서, 본 발명의 항체는 또한 당해 분야에 공지된 효모 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 효모 디스플레이 방법에서, 유전 방법을 사용하여 효모 세포벽에 항체 도메인을 묶고(tether) 이들을 효모의 표면에 나타낸다. 특히, 이러한 효모를 이용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리(예를 들면, 사람 또는 뮤린)로부터 발현된 항원-결합 도메인을 나타낼 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 효모 디스플레이 방법의 예는 본원에 참조로 혼입된 미국 특허 제6,699,658호(Wittrup et al.)에 기재된 것들을 포함한다.

[0713] B. 재조합체 DLL4 항체의 생산

[0714] 본 발명의 항체는 당해 분야에 공지된 다수의 기술 중 어느 것, 예를 들면, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)이 표준 기술에 의해 숙주 세포내로 형질감염된, 숙주 세포로부터의 발현에 의해 생산될 수 있다. 용어 "형질감염"의 각종 형태는 외인성 DNA의 원핵 또는 진핵 숙주 세포내로의 도입에 일반적으로 사용된 광범위한 기술, 예를 들면, 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 포함하는 것으로 의도된다. 비록 본

발명의 항체를 원핵 또는 진핵 세포내에서 발현시키는 것이 가능하다고 해도, 진핵 세포내에서, 및 가장 바람직하게는 포유동물 숙주 세포내에서 항체의 발현이 바람직하데, 그 이유는, 이러한 진핵 세포(및 특히 포유동물 세포)가 원핵 세포보다 적절하게 폴딩(folding)되고 면역학적으로 활성인 항체를 조립하고 분비하는 경향이 있기 때문이다.

[0715] 본 발명의 재조합체 항체를 발현하기 위한 예시적인 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary: CHO 세포) 세포[예를 들면, Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.*, 159: 601-621 (1982)에 기술된 것으로서 DHFR 선택가능한 마커와 함께 사용된, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980)에 기술된, dhfr- CHO 세포), NSO 흑색종 세포, COS 세포, 및 SP2 세포를 포함한다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합체 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포내로 도입되는 경우, 항체는 숙주 세포를 숙주 세포내에서 항체의 발현을 허용하거나, 보다 바람직하게는, 항체를 숙주 세포가 성장하는 배양 배지내로 분비하도록 하는데 충분한 기간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생산된다. 항체는 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 회수할 수 있다.

[0716] 숙주 세포를 또한 사용하여 Fab 단편 또는 scFv 분자와 같은 기능적 항체 단편을 생산할 수 있다. 상기 과정에 있어서의 변화는 본 발명의 영역내에 있음이 이해될 것이다. 예를 들면, 숙주 세포를 본 발명의 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 기능적 단편을 암호화하는 DNA로 형질감염시키는 것이 바람직할 수 있다. 재조합체 DNA 기술을 또한 사용하여 목적한 항원에 대한 결합에 필수적이지 않은 경쇄 및 중쇄 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 DNA 중 일부 또는 모두를 회수할 수 있다. 이러한 트렁케이티드(truncated) DNA 분자로부터 발현된 분자는 또한 본 발명의 항체에 의해 포함된다. 또한, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄가 본 발명의 항체이고(즉 사람 DLL4에 결합하고) 다른 중쇄 및 경쇄가 본 발명의 항체를 표준 화학적 교차 방법에 의해 제2 항체에 교차결합시킴으로써 사람 DLL4 이외의 항체에 대해 특이적인 이기능성 항체를 생산할 수 있다.

[0717] 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합 부위의 재조합체 발현을 위한 바람직한 시스템에서, 항체 중쇄 및 항체 경쇄 둘 다를 암호화하는 재조합체 발현 벡터는 인산칼슘-매개된 형질감염에 의해 dhfr- CHO 세포내로 도입된다. 재조합체 발현 벡터내에서, 항체 중쇄 및 경쇄 유전자 각각은 CMV 인핸서/AdMLP 프로모터 조절 성분에 작동적으로 연결되어 유전자의 고 수준의 전사를 구동한다. 재조합체 발현 벡터는 또한 메토타렉세이트 선택/증폭을 사용하여 벡터로 형질감염된 CHO 세포의 선택을 허용하는 DHFR 유전자를 수반한다. 선택된 형질전환체 숙주 세포는 배양하여 항체 중쇄 및 경쇄가 발현되도록 하고 완전한 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 재조합체 발현 벡터를 제조하고, 숙주 세포를 형질감염시키고, 형질전환체를 선택하며, 숙주 세포를 배양하고 항체를 배양 배지로부터 회수한다. 여전히 또한 본 발명은 본 발명의 재조합체 항체가 합성될 때까지 본 발명의 숙주 세포를 적합한 배양 배지 중에서 배양함으로써 본 발명의 재조합체 항체를 합성하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 또한 배양 배지로부터 재조합체 항체를 분리함을 추가로 포함할 수 있다.

[0718] 1. 항-DLL4 항체

[0719] 사람 DLL4에 결합하는 분리된 래트 모노클로날 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 표 9에서 클론 38H12, 1A11, 37D10, 32C7, 14G1, 14A11, 및 15D6에 대한 것으로 밝혀졌다(참조: 하기 실시예 4). 본원에 기술된 분리된 항-DLL4 항체 CDR 서열은 본 발명에 따라 분리되고, 이로부터 유도된 CDR 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 이의 친화성 성숙된 클론을 포함하는 DLL4 결합 단백질의 계열을 확립한다. 모노클로날 항체 및 이의 친화성 성숙된 유도체의 가변 영역 및 CDR의 서열은 표 9, 11, 16, 20, 및 21에 나열되어 있다. 사람 DLL4와 관련하여 바람직한 DLL4 결합 및/또는 중화 활성을 갖는 본 발명에 따른 결합 단백질에 대한 CDR을 생성시키고 선택하기 위하여, 본원에 구체적으로 기술된 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는, 본 발명의 결합 단백질을 생성하여 이들 결합 단백질의 DLL4 결합 및/또는 중화 특징을 평가하는 당해 분야에 공지된 표준 방법을 사용할 수 있다.

[0720] 본원에 기술된 항-DLL4 항체 클론의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)의 CDR의 아미노산 서열의 정렬을 기초로 하여, 본 발명은 사람 DLL4에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 DLL4 결합 단백질을 제공하며, 당해 항원 결합 도메인은 6개의 CDR 중 하나 이상, 즉, 하기 정의한, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDRL-3을 포함한다:

[0721] CDR-H1은 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$ (서열 번호 151)(여기서;

[0722] X_1 은 N, H, 또는 Y이고;

- [0723] X_2 는 F이며;
- [0724] X_3 은 P이고;
- [0725] X_4 는 M이며;
- [0726] X_5 은 A 또는 S이다);
- [0727] 서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기 (CDR-H1 38H12);
- [0728] 서열 번호 161의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 37D10);
- [0729] 서열 번호 163의 31 내지 35번 잔기 (CDR-H1 32C7);
- [0730] 서열 번호 165의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14G1);
- [0731] 서열 번호 167의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 14A11);
- [0732] 서열 번호 169의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 15D6);
- [0733] 서열 번호 171의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 1A11);
- [0734] 서열 번호 172의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1a 1A11);
- [0735] 서열 번호 173의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 1A11);
- [0736] 서열 번호 174의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 1A11);
- [0737] 서열 번호 179의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1 38H12);
- [0738] 서열 번호 180의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1A 38H12);
- [0739] 서열 번호 181의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.1b 38H12);
- [0740] 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
- [0741] 서열 번호 187의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11VH.1);
- [0742] 서열 번호 188의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A6);
- [0743] 서열 번호 189의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A8);
- [0744] 서열 번호 190의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.C6);
- [0745] 서열 번호 191의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.A11);
- [0746] 서열 번호 192의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.B5);
- [0747] 서열 번호 193의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.E12);
- [0748] 서열 번호 194의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.G3);
- [0749] 서열 번호 195의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.F5); 및
- [0750] 서열 번호 196의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 h1A11.H2)로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;
- [0751] CDR-H2는 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} - X_{16} - X_{17} (서열 번호 152)(여기서;
- [0752] X_1 은 T 또는 S이고;
- [0753] X_2 는 I이며;
- [0754] X_3 은 S이고;
- [0755] X_4 는 S 또는 G이며;
- [0756] X_5 는 S이고;

- [0757] X_6 은 D이며;
- [0758] X_7 은 G, A, D, S, 또는 E이고;
- [0759] X_8 은 T 또는 W이며;
- [0760] X_9 는 T, P, 또는 A이고;
- [0761] X_{10} 은 Y, S, T, 또는 N이며;
- [0762] X_{11} 은 Y 또는 I이고;
- [0763] X_{12} 는 R 또는 G이며;
- [0764] X_{13} 은 D이고;
- [0765] X_{14} 는 S이며;
- [0766] X_{15} 는 V이고;
- [0767] X_{16} 은 K이며;
- [0768] X_{17} 은 G이다);
- [0769] 서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 38H12);
- [0770] 서열 번호 161의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 37D10);
- [0771] 서열 번호 163의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 32C7);
- [0772] 서열 번호 165의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14G1);
- [0773] 서열 번호 167의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 14A11);
- [0774] 서열 번호 169의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 15D6);
- [0775] 서열 번호 171의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 1A11);
- [0776] 서열 번호 172의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1a 1A11);
- [0777] 서열 번호 173의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 1A11);
- [0778] 서열 번호 174의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.2a 1A11);
- [0779] 서열 번호 179의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1 38H12);
- [0780] 서열 번호 180의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1A 38H12);
- [0781] 서열 번호 181의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);
- [0782] 서열 번호 182의 31 내지 35번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
- [0783] 서열 번호 187의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11VH.1);
- [0784] 서열 번호 188의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A6);
- [0785] 서열 번호 189의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A8);
- [0786] 서열 번호 190의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.C6);
- [0787] 서열 번호 191의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.A11);
- [0788] 서열 번호 192의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.B5);
- [0789] 서열 번호 193의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.E12);

- [0790] 서열 번호 194의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.G3);
- [0791] 서열 번호 195의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.F5); 및
- [0792] 서열 번호 196의 50 내지 66번 잔기(CDR-H2 h1A11.H2)로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;
- [0793] CDR-H3은 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (서열 번호 153)(여기서;
- [0794] X_1 은 G이고;
- [0795] X_2 는 Y이며;
- [0796] X_3 은 Y이고;
- [0797] X_4 는 N이며;
- [0798] X_5 는 S이고;
- [0799] X_6 은 P이며;
- [0800] X_7 은 F이고;
- [0801] X_8 은 A이며;
- [0802] X_9 는 Y, F, 또는 S이다);
- [0803] 서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 38H12);
- [0804] 서열 번호 161의 101 내지 111번 잔기(CDR-H3 37D10);
- [0805] 서열 번호 163의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 32C7);
- [0806] 서열 번호 165의 99 내지 105번 잔기(CDR-H3 14G1);
- [0807] 서열 번호 167의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 14A11);
- [0808] 서열 번호 169의 99 내지 110번 잔기(CDR-H3 15D6);
- [0809] 서열 번호 171의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 1A11);
- [0810] 서열 번호 172의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1a 1A11);
- [0811] 서열 번호 173의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1b 1A11);
- [0812] 서열 번호 174의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.2a 1A11);
- [0813] 서열 번호 179의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1 38H12);
- [0814] 서열 번호 180의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 VH.1A 38H12);
- [0815] 서열 번호 181의 99 내지 107번 잔기(CDR-H2 VH.1b 38H12);
- [0816] 서열 번호 182의 99 내지 107번 잔기(CDR-H1 VH.2a 38H12);
- [0817] 서열 번호 187의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11VH.1);
- [0818] 서열 번호 188의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A6);
- [0819] 서열 번호 189의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A8);
- [0820] 서열 번호 190의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.C6);
- [0821] 서열 번호 191의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.A11);
- [0822] 서열 번호 192의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.B5);
- [0823] 서열 번호 193의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.E12);

- [0824] 서열 번호 194의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.G3);
- [0825] 서열 번호 195의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.F5); 및
- [0826] 서열 번호 196의 99 내지 107번 잔기(CDR-H3 h1A11.H2)로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;
- [0827] CDR-L1은 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} (서열 번호 154)(여기서;
- [0828] X_1 은 R이고;
- [0829] X_2 는 A이며;
- [0830] X_3 은 S이고;
- [0831] X_4 는 E 또는 Q이며;
- [0832] X_5 는 D 또는 E이고;
- [0833] X_6 은 I이며;
- [0834] X_7 은 Y 또는 W이고;
- [0835] X_8 은 S, I, Y, N, 또는 R이며;
- [0836] X_9 는 N이고;
- [0837] X_{10} 은 L이며;
- [0838] X_{11} 은 A이다);
- [0839] 서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 38H12);
- [0840] 서열 번호 162의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 37D10);
- [0841] 서열 번호 164의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 32C7);
- [0842] 서열 번호 166의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 14G1);
- [0843] 서열 번호 168의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 14A11);
- [0844] 서열 번호 170의 23 내지 37번 잔기(CDR-L1 15D6);
- [0845] 서열 번호 175의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 1A11);
- [0846] 서열 번호 176의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 1A11);
- [0847] 서열 번호 177의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 1A11);
- [0848] 서열 번호 178의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 1A11);
- [0849] 서열 번호 183의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1 38H12);
- [0850] 서열 번호 184의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1a 38H12);
- [0851] 서열 번호 185의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.1b 38H12);
- [0852] 서열 번호 186의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 VL.2a 38H12);
- [0853] 서열 번호 197의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11VL.1);
- [0854] 서열 번호 198의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A2);
- [0855] 서열 번호 199의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A12);
- [0856] 서열 번호 200의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.A7);

- [0857] 서열 번호 201의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B4);
- [0858] 서열 번호 202의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.B5); 및
- [0859] 서열 번호 203의 24 내지 34번 잔기(CDR-L1 h1A11.E12)로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;
- [0860] CDR-L2는 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 (서열 번호 155)(여기서;
- [0861] X_1 은 D이고;
- [0862] X_2 는 T이며;
- [0863] X_3 은 N 또는 S이고;
- [0864] X_4 는 N, D, S, I, Y, 또는 V이며;
- [0865] X_5 는 L이고;
- [0866] X_6 은 A이며;
- [0867] X_7 는 D이다);
- [0868] 서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 38H12);
- [0869] 서열 번호 162의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 37D10);
- [0870] 서열 번호 164의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 32C7);
- [0871] 서열 번호 166의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 14G1);
- [0872] 서열 번호 168의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 14A11);
- [0873] 서열 번호 170의 53 내지 59번 잔기(CDR-L2 15D6);
- [0874] 서열 번호 175의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 1A11);
- [0875] 서열 번호 176의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 1A11);
- [0876] 서열 번호 177의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 1A11);
- [0877] 서열 번호 178의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 1A11);
- [0878] 서열 번호 183의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1 38H12);
- [0879] 서열 번호 184의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1a 38H12);
- [0880] 서열 번호 185의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.1b 38H12);
- [0881] 서열 번호 186의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 VL.2a 38H12);
- [0882] 서열 번호 197의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11VL.1);
- [0883] 서열 번호 198의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A2);
- [0884] 서열 번호 199의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A12);
- [0885] 서열 번호 200의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.A7);
- [0886] 서열 번호 201의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B4);
- [0887] 서열 번호 202의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.B5); 및
- [0888] 서열 번호 203의 50 내지 56번 잔기(CDR-L2 h1A11.E12)로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;
- [0889] CDR-L3은 X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 - X_7 - X_8 - X_9 (서열 번호 156)(여기서;
- [0890] X_1 은 Q이고;

- [0891] X_2 는 Q이며;
- [0892] X_3 은 Y이고;
- [0893] X_4 는 N, D, 또는 T이며;
- [0894] X_5 은 N, Y, 또는 W이고;
- [0895] X_6 은 Y 또는 V이고;
- [0896] X_7 은 P이며;
- [0897] X_8 은 P이고;
- [0898] X_9 는 T이다);
- [0899] 서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 38H12);
- [0900] 서열 번호 162의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 37D10);
- [0901] 서열 번호 164의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 32C7);
- [0902] 서열 번호 166의 89 내지 98번 잔기(CDR-L3 14G1);
- [0903] 서열 번호 168의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 14A11);
- [0904] 서열 번호 170의 92 내지 100번 잔기(CDR-L3 15D6);
- [0905] 서열 번호 175의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 1A11);
- [0906] 서열 번호 176의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 1A11);
- [0907] 서열 번호 177의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 1A11);
- [0908] 서열 번호 178의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 1A11);
- [0909] 서열 번호 183의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1 38H12);
- [0910] 서열 번호 184의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1a 38H12);
- [0911] 서열 번호 185의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.1b 38H12);
- [0912] 서열 번호 186의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 VL.2a 38H12);
- [0913] 서열 번호 197의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11VL.1);
- [0914] 서열 번호 198의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A2);
- [0915] 서열 번호 199의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A12);
- [0916] 서열 번호 200의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.A7);
- [0917] 서열 번호 201의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B4);
- [0918] 서열 번호 202의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.B5); 및
- [0919] 서열 번호 203의 89 내지 97번 잔기(CDR-L3 h1A11.E12)로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0920] 바람직하게는, DLL4 결합 단백질은 위에 기술된 적어도 하나의 CDR, 보다 바람직하게는 위에 기술된 임의의 2개의 CDR, 보다 바람직하게는 위에 기술된 임의의 3개의 CDR, 심지어 보다 바람직하게는 위에 기술된 임의의 4개의 CDR, 여전히 보다 바람직하게는 위에 기술된 임의의 5개의 CDR, 및 가장 바람직하게는 위에 기술된 임의의 6개의 CDR(즉, 위에 기술된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, 및 CDR-L3)을 포함한다. 3개의 CDR을 포함하는 특히 바람직한 DLL4 결합 단백질은 위에 기술된 바와 같은 CDR-H1, CDR-H2, 및 CDR-H3을 포함한다.
- [0921] 바람직하게는, 위에 기술된 하나 이상 CDR을 포함하는 DLL4 결합 단백질은 사람("hu", "h") DLL4 및, 마우스("murine", "mu") DLL4, 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)("cynomolgus", "cyno") DLL4, 및 래트 DLL4

로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 DLL4 단백질에 결합한다.

[0922] 바람직하게는, 위에 기술된 하나 이상의 CDR을 포함하는 DLL4 결합 단백질은 사람("hu") DLL4 및 또한 사이노몰거스 원숭이("cynomolgus", "cyno") DLL4에 결합한다.

[0923] 2. 항-DLL4 키메라 항체.

[0924] 키메라 항체는 뮤린 모노클로날 항체로부터 유도된 가변 영역 및 사람 면역글로불린 고정 영역을 갖는 항체와 같이, 항체의 상이한 부위가 상이한 동물 종으로부터 유도된 분자이다[참조: 예를 들면, Morrison, *Science*, 229: 1202-1207 (1985); Oi et al., *BioTechniques*, 4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods*, 125: 191-202 (1989); 미국 특허 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호]. 또한, 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자와 함께 적절한 생물학적 활성의 사람 항체 분자로부터의 유전자와 함께 스플라이싱함에 의한 "키메라 항체"의 생산을 위해 개발된 기술을 사용할 수 있다[참조: 예를 들면, 본원에 이의 전문이 참조로 혼입된 문헌, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314: 452-454 (1985)]

[0925] 3. 항-DLL4 CDR 이식된 항체

[0926] 본 발명의 분리된 항-DLL4 항체 CDR 서열을 사용하여 원래의 항체의 특성을 조절하는 CDR-이식된 항체를 제조할 수 있다. 이러한 특성은 결합 역학, 친화성, 생물학적 활성, 중 교차-반응성, 분자 교차-반응성, 에피토프, 물리화학적 특성, 약물동력학적 특성, 약력학적 특성, 또는 약리학적 특성을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. CDR-이식된 항체는, VH 및/또는 VL 중 CDR 영역의 하나 이상이 원래의 항-DLL4 항체의 CDR 서열로 대체된 사람 항체 또는 비-사람 영장류 항체로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함한다. 임의의 사람 또는 비-사람 영장류 항체로부터의 골격 서열은 CDR 이식용 주형으로서 제공될 수 있다. 그러나, 이러한 골격 위의 적체 대체는 흔히 항원에 대한 결합 친화성의 일부 손실을 초래한다. 사람 또는 다른 종에 보다 더 동종성일 수록, 항체는 원래의 사람 항체에 대해서이며, CDR과 신규 사람 골격 또는 비-사람 영장류 골격의 조합이 친화성 또는 다른 특성을 감소시킬 수 있는 CDR내 왜곡을 도입시킬 가능성은 더 적어진다. 따라서, CDR로부터 떨어진 사람 가변 영역 골격을 교체하기 위해 선택된 가변 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 적어도 30% 서열 동질성을 갖는 것이 바람직하다. CDR로부터 떨어진 사람 가변 영역 골격을 교체하기 위해 선택된 가변영역 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 적어도 40% 서열 동질성을 갖는 것이 보다 바람직하다. CDR로부터 떨어진 사람 가변 영역 골격을 교체하기 위해 선택된 가변영역 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 적어도 50% 서열 동질성을 갖는 것이 보다 바람직하다. CDR로부터 떨어진 사람 가변 영역 골격을 교체하기 위해 선택된 가변영역 골격이 사람 항체 가변 영역 골격과 적어도 60% 서열 동질성을 갖는 것이 보다 바람직하다. CDR로부터 떨어진 새로운 사람 또는 비-사람 영장류 및 원래의 사람 가변 영역 골격이 적어도 70% 서열 동질성을 갖는 것이 보다 바람직하다. CDR로부터 떨어진 새로운 사람 또는 비-사람 영장류 및 원래의 사람 가변 영역 골격이 적어도 75% 서열 동질성을 갖는 것이 훨씬 더 바람직하다. CDR로부터 떨어진 새로운 사람 또는 비-사람 영장류 및 원래의 사람 가변 영역 골격이 적어도 80% 서열 동질성을 갖는 것이 가장 바람직하다. 원래의 사람 항-DLL4 항체의 CDR을 이식하기 위해 고도로 동종인 사람 또는 비-사람 영장류 골격을 사용하는 경우에도, 수득되는 이식된 항체는 여전히 항체에 대한 결합 친화성을 어느 정도 상실할 수 있다. 이 경우, 친화성을 재획득하기 위하여, 새로이 이식된 항체의 상응하는 위치에 대해 원래 항체의 적어도 하나 이상의 주요 골격 잔기(들) 치환을 포함시키는 것이 필수적이다. 이러한 주요 잔기는:

[0927] CDR에 인접한 잔기;

[0928] 글리코실화 부위 잔기;

[0929] 드른 잔기;

[0930] 사람 DLL4과 상호작용할 수 있는 잔기;

[0931] 표준 잔기;

[0932] 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이의 접촉 잔기;

[0933] 베르니어 영역내 잔기; 및

[0934] 초티아-정의된 가변 중쇄 CDR1과 카바트-정의된 제1 중쇄 골격 사이에 중첩된 영역내 잔기로 이루어진 그룹 중에서 선택될 수 있다.

[0935] 4. 항-DLL4 사람화된 항체.

[0936] 본 발명의 조성물이 사람화된 항체를 제조하기 위한 요건을 제거하지만, 사람화된 DLL4 항체는 본 발명의 조성물을 사용하여 제조할 수 있다. 사람화된 항체는 비-사람 종으로부터의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 사람 면역글로불린 분자로부터의 골격 영역을 갖는 바람직한 항원에 결합하는 비-사람 종 항체로부터의 항체 분자이다. 공지된 사람 Ig 서열은 the world wide web (www.)을 통해 이용가능한 웹 사이트, 예를 들면, ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; atcc.org/phage/hdb.html; sciqest.com/; abcam.com/; antibodyresource.com/onlinecomp.html; public.iastate.edu/.about.pedro-/research_tools.html; mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; whfreeman.com/immunology-/CH05/kuby05.htm; library.thinkquest.org/12429/Immune/antibody.html; hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks-/Immunology.html; immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; biotech.ufl.edu/.about.hcl/; pebio.com/pa/340913-/340913.html; nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; m.ehimeu.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; biodesign.com/table.asp; icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; mrc-cpe.cam.ac.uk/int-doc/public/INTRO.html; ibt.unam.mx/-vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; anti-body.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; unizh.ch/.about.honegger/AHO-seminar/Slide01.html; cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm; path.cam.ac.uk/.about.mrc7/사람isation/TAHHP.html; ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.-html; biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Webpages-/Pept/spottech.html; jerini.de/frroducts.htm; patents.ibm.com/ibm.html 및 문헌[참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 전체적으로 본원에 참조로 혼입된다. 이러한 도입된 서열을 사용하여 당해 분야에 공지된 바와 같이, 면역원성을 감소시키거나 결합, 친화성, 온-속도, 오프-속도, 항원항체결합력, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소시키거나, 향상시키거나 개질시킬 수 있다.

[0937] 사람 골격 영역내 골격 잔기는 CDR 공여체 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환하여 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선시킬 수 있다. 이들 골격 치환은 당해 분야에 잘 공지된 방법, 예를 들면 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위한 CDR과 골격 영역의 상호작용의 모델링 및 특정 위치에서 특정한 골격 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의해 확인된다[참조: 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참조로 혼입된 미국 특허 제5,585,089호 (Queen et al.); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988)]. 3차원 면역글로불린 모델이 일반적으로 이용가능하며 당해 분야의 숙련가에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 설명하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이의 검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기들의 유사한 역할의 분석, 즉, 후보 면역글로불린의 이의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 컨센서스 및 도입 서열로부터 선택하고 결합시켜 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화성과 같은 목적하는 항체 특성이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로 및 가장 실질적으로 관여된다. 항체는 당해 분야에 공지된 각종 기술, 예를 들면, 문헌[참조: Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988), Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296-2308 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987), Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623-2632 (1993), Padlan, E.A., *Molecular Immunology*, 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6): 805-814 (1994); Roguska. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973 (1994); PCT 공보 제WO 91/09967호, 제WO 99/06834호(PCT/US98/16280), 제WO 97/20032호(PCT/US96/18978), 제WO 92/11272호(PCT/US91/09630), 제WO 92/03461호(PCT/US91/05939), 제WO 94/18219호(PCT/US94/01234), 제WO 92/01047호(PCT/GB91/01134), 제WO 93/06213호(PCT/GB92/01755), 제WO90/14443호, 제WO90/14424호, 및 제WO90/14430호; 유럽 공보 제EP 0 592 106호, 제EP 0 519 596호, 및 제EP 0 239 400호; 미국 특허 제5,565,332호; 제5,723,323호; 제5,976,862호; 제5,824,514호; 제5,817,483호; 제5,814,476호; 제5,763,192호; 제5,723,323호; 제5,766,886호; 제5,714,352호; 제6,204,023호; 제6,180,370호; 제5,693,762호; 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,225,539호; 및 제4,816,567호에 기술된 것들과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 것들을 사용하여 사람화될 수 있다.

[0938] C. 항체 및 항체-생산 세포주의 생산

[0939] 바람직하게는, 본 발명의 항-DLL4 항체는 예를 들면, 당해 분야에 공지된 시험관내 및 생체내 검사에서 수개 중 어느 하나에 의해 평가된 것으로서, 종양 혈관형성 활성을 감소시키거나 중화시키는 고 능력을 나타낸다. 예를 들면, 이들 항체는 노치-시그널링 경로(Notch-signaling pathway)에서 DLL4 상호작용을 DLL4에서 적어도 약 10^{-7} M, 또는 약 10^{-8} M의 범위의 IC_{50} 값으로 중화시킨다. 바람직하게는, 본 발명의 항-DLL4 항체는 또한 DLL4 활성을 감소시키거나 중화시키는 고 능력을 나타낸다.

[0940] 바람직한 실시형태에서, 분리된 항체, 또는 이의 항원 결합 부위는 사람 DLL4에 결합하며, 여기서 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 0.1 s^{-1} 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리되거나, IC_{50} 이 약 1×10^{-6} M 이하인 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 억제한다. 대안적으로, 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리될 수 있거나, 사람 DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 약 1×10^{-7} M 이하의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리될 수 있거나, 사람 DLL4 및/또는 사람 DLL4를 약 1×10^{-8} M 이하의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리될 수 있거나, 사람 DLL4 활성을 약 1×10^{-9} M 이하의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리될 수 있거나, DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 약 1×10^{-10} M 이하의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다. 대안적으로, 항체, 또는 이의 항원-결합 부위는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 것으로서, 사람 DLL4로부터 약 $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하의 K_{off} 속도 상수로 해리될 수 있거나, DLL4 및/또는 사람 DLL4 활성을 약 1×10^{-11} M 이하의 IC_{50} 으로 억제할 수 있다.

[0941] 특정 실시형태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, 또는 IgD 고정 영역과 같은 중쇄 고정 영역을 포함한다. 바람직하게는, 중쇄 고정 영역은 IgG1 중쇄 고정 영역 또는 IgG4 중쇄 고정 영역이다. 또한, 항체는 카파 경쇄 고정 영역 또는 람다 경쇄 고정 영역의 경쇄 고정 영역을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 카파 경쇄 고정 영역을 포함한다. 대안적으로 항체 부위는 예를 들면, Fab 단편 또는 단일쇄 Fv 단편일 수 있다.

[0942] Fc 부위에서 아미노산의 대체로 항체 효과기 기능을 변경시키는 것은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: 미국 특허 제5,648,260호 및 5,624,821호(Winter et al.)]. 항체의 Fc 부위는 몇가지 중요한 효과기 기능, 예를 들면, 사이토킨 유도, ADCC, 포식작용, 상보체 의존성 세포독성(CDC), 및 항체 및 항원-항체 복합체의 반감기/청소율을 중재한다. 일부 경우에, 이들 효과기 기능은 치료학적 항체에 바람직하지만, 다른 경우에 치료 목적에 따라 불필요하거나 심지어 유해할 수 있다. 특정의 사람 IgG 이소형, 특히 IgG1 및 IgG3은 Fc γ R 및 상보체 C1q 각각에 대한 결합을 통해 ADCC 및 CDC를 중재한다. 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 항체의 순환하는 반감기를 결정하는 주요 성분이다. 여전히 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기가 항체의 고정 영역, 예를 들면, 항체의 Fc 영역내에서 대체됨으로써, 항체의 효과기 기능이 변경된다.

[0943] 하나의 실시형태는 표지된 결합 단백질을 제공하며, 여기서 본 발명의 항체 또는 항체 부위는 유도체화되거나 다른 기능성 분자(예를 들면, 다른 펩타이드 또는 단백질)에 연결된다. 예를 들면, 본 발명의 표지된 결합 단백질은 본 발명의 항체 또는 항체 부위를 하나 이상의 다른 분자 실체, 예를 들면, 다른 항체(예를 들면, 이특이적 항체 또는 디아바디), 검출가능한 제제, 세포독성제, 약제 및/또는, 항체 또는 항체 부위와 다른 분자(예를 들면, 스트렙트아비딘 코어 영역 또는 폴리히스티딘 태그)와의 연합을 중재할 수 있는 단백질 또는 펩타이드에 기능적으로 연결(화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유결합적 연합 또는 기타에 의해)시킴으로써 유도될 수

있다.

[0944] 본 발명의 항체 또는 항체 부위가 유도될 수 있는 유용한 검출가능한 제제는 형광성 화합물을 포함한다. 예시적인 형광성 검출가능한 제제는 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나트 탈렌실포닐 클로라이드, 피코에리트린 등을 포함한다. 항체는 또한 검출가능한 효소, 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 글루코즈 옥시다제 등으로 유도체화될 수 있다. 항체가 검출가능한 효소로 유도체화되는 경우, 이는 효소가 검출가능한 반응 생성물을 생산하기 위해 사용하는 추가의 시약을 첨가함으로써 검출된다. 예를 들면, 검출가능한 제제 서양 고추냉이 퍼옥시다제가 존재하는 경우, 과산화수소 및 디아미노벤지딘의 첨가가 검출가능한, 착색된 반응 생성물을 초래한다. 항체는 또한 비오틴으로 유도체화하고, 아비딘 또는 스트렙타비딘 결합의 간접적인 측정을 통해 검출할 수 있다.

[0945] 본 발명의 다른 실시형태는 결정화된 DLL4 결합 단백질을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 전체 항-DLL4 항체, 이의 단편, 및 또한 항체 작제물 및 결합 단백질 접합체를 포함하는, 본원에 기재된 DLL4 결합 단백질의 결정, 및 이러한 결정을 포함하는 제형 및 조성물에 관한 것이다. 하나의 실시형태에서, 결정화된 결합 단백질은 결합 단백질의 가용성 대응부보다 생체내 반감기가 더 크다. 다른 실시형태에서, 결합 단백질은 결정화 후에 생물학적 활성을 유지한다. 본 발명의 결정화된 결합 단백질은 당해 분야에 공지되고 본원에 참조로 혼입된 PCT 공보 제WO 02/72636호에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다.

[0946] 본 발명의 다른 실시형태는 글리코실화된 결합 단백질을 제공하는 것이며, 여기서 항체 또는 이의 항원-결합 부위는 하나 이상의 탄수화물 잔기를 포함한다. 초기의 생체내 단백질 생산은 번역 후 변형(post-translational modification)으로 공지된, 추가의 프로세싱을 겪을 수 있다. 특히, 글리코실화로 공지된 공정인, 당(글리코실) 잔기가 효소적으로 가해질 수 있다. 공유결합으로 연결된 올리고사카라이드 측쇄를 지닌 수득되는 단백질은 글리코실화된 단백질 또는 당단백질로서 공지되어 있다. 단백질 글리코실화는 목적 단백질의 아미노산 서열, 및 또한 단백질이 발현되는 숙주 세포에 의존한다. 상이한 유기체는 상이한 글리코실화 효소(예를 들면, 글리코실트랜스퍼라제 및 글리코시다제)를 생산할 수 있으며 이용가능한 상이한 기질(뉴클레오타이드 당)을 갖는다. 이러한 인자들로 인해, 단백질 글리코실화 패턴, 및 글리코실 잔기의 조성은, 특정 단백질이 발현되는 숙주 시스템에 따라 상이할 수 있다. 본 발명에 유용한 글리코실 잔기는 글루코즈, 갈락토즈, 만노즈, 푸코즈, n-아세틸글루코사민 및 시알산을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 글리코실화된 결합 단백질은 글리코실 잔기를 포함함으로써 글리코실화 패턴은 사람이다.

[0947] 상이한 단백질 글리코실화가 상이한 단백질 특징을 생성할 수 있음은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들어, 미생물 숙주, 예를 들면, 효모에서 생산되고 효모 내인성 경로를 이용하여 글리코실화된 치료학적 단백질의 효능은 CHO 세포주와 같은 포유동물 세포내에서 발현된 동일한 단백질의 것과 비교하여 감소될 수 있다. 이러한 당단백질은 또한 사람에서 면역원성일 수 있으며 투여 후 감소된 생체내 반감기를 나타낸다. 사람 및 다른 동물에서 특이적인 수용체는 특이적인 글리코실 잔기를 인식할 수 있으며 혈류로부터 단백질의 신속한 청소를 촉진한다. 다른 부작용은 단백질 폴딩, 가용성, 프로테아제에 대한 민감성, 트래피킹(trafficking), 수송, 구분(compartmentalization), 분비, 다른 단백질 또는 인자들에 의한 인식, 항원성, 또는 알레르기항원성을 포함할 수 있다. 따라서, 숙련가들은 특이적인 조성 및 글리코실화 패턴, 예를 들면, 사람 세포 또는 의도된 대상체 동물의 중-특이적인 세포내에서 생산된 것과 동일하거나, 적어도 유사한 글리코실화 조성 및 양식을 지닌 치료학적 단백질을 선호할 수 있다.

[0948] 숙주 세포의 것과는 상이한 글리코실화된 단백질의 발현은 숙주 세포를 유전적으로 변형시켜 이중 글리코실화 효소를 발현시킴으로써 달성할 수 있다. 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 숙련가들은 사람 단백질 글리코실화를 나타내는 항체 또는 이의 항원-결합 부위를 생성할 수 있다. 예를 들면, 효모 균주는 유전적으로 변형되어 비-천연적으로 발생하는 글리코실화 효소를 발현함으로써 이들 효모 균주내에서 생산된 글리코실화된 단백질(당단백질)이 동물 세포, 특히 사람 세포의 것과 동일한 단백질 글리코실화를 나타내도록 한다(미국 특허원 공보 제2004/0018590호 및 제2002/0137134호).

[0949] 또한, 목적 단백질이 유전적으로 가공되어 각종 글리코실화 효소를 발현하는 숙주 세포의 라이브러리를 사용하여 발현됨으로써 라이브러리의 구성원 숙주 세포가 목적 단백질을 변이체 글리코실화 패턴으로 생산할 수 있음은 당해 분야의 숙련가에게 인식될 것이다. 이후에, 숙련가는 특정한 신규 글리코실화 패턴을 가진 목적 단백질을 선택하여 분리할 수 있다. 바람직하게는, 특정하게 선택된 신규한 글리코실화 패턴을 가진 단백질은 개선되거나 변경된 생물학적 특성을 나타낸다.

[0950] D. DLL4 결합 단백질의 용도.

- [0951] 사람 DLL4 및 무린 DLL4에 결합하는 이들의 능력이 제공되면, 항체 및 이의 부위를 포함하는 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질을 사용하여 시료(예를 들면, 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료, 예를 들면, 혈액, 혈청 또는 혈장)를 당해 분야에 공지된 통상의 면역검사, 예를 들면, 효소 연결된 면역흡착 검사(ELISA), 방사선 면역검사(RIA), 또는 조직 면역조직화학 중 어느 것을 사용하여 검출하거나 측정할 수 있다. 본 발명은 시료를 DLL4 결합 단백질과 접촉시키고 사람 DLL4 및/또는 무린 DLL4에 결합된 DLL4 결합 단백질 또는 결합되지 않은 결합 단백질을 검출함으로써 시료 중에서 사람 DLL4 및/또는 무린 DLL4를 검출함을 포함하여, 시료 중에서 사람 DLL4 및/또는 무린 DLL4를 검출하는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 검출가능한 물질로 직접 또는 간접적으로 표지함으로써 결합되거나 결합되지 않은 DLL4 결합 단백질의 검출을 용이하게 할 수 있다. 적합한 검출가능한 물질은 각종 효소, 보조 그룹(prosthetic group), 형광성 물질, 발광성 물질 및 방사활성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린스테라제를 포함하며; 적합한 인공 그룹 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광성 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린을 포함하며; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 적합한 방사활성 물질의 예는 ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , 또는 ^{153}Sm 을 포함한다.
- [0952] DLL4에 대해 검사될 수 있는 생물학적 시료는 뇨, 대변, 혈액, 혈청, 혈장, 발한, 타액, 경구 도말(불, 혀, 인후), 질 도말, 직장 도말, 피부 도말, 피부 스크래프, 조직 생검, 및 당해 분야에서 이용가능한 방법으로 수득될 수 있는 임의의 다른 조직 시료를 포함한다.
- [0953] 결합 단백질을 표지하는 것에 대한 대안으로, 사람 DLL4를 생물학적 유액 중에서 본원에 기술된 검출가능한 물질로 표지된 제조합체 사람(rh) DLL4 표준물 및 표지되지 않은 DLL4 결합 단백질을 이용하는 경쟁 면역검사에 의해 생물학적 유액 중에서 검사할 수 있다. 당해 검사에서, 생물학적 시료, 표지된 rhDLL4 표준물, 및 DLL4 결합 단백질을 합하고 표지되지 않은 결합 단백질에 결합된 표지된 rhDLL4 표준물의 양을 측정한다. 생물학적 시료 중에서 사람 DLL4의 양은 DLL4 결합 단백질에 결합된 표지된 rhDLL4 표준물의 양에 역으로 비례한다. 유사하게, 사람 DLL4는 또한 생물학적 유액 중에서 본원에 기술된 검출가능한 물질로 표지된 rhDLL4 표준물 및 표지되지 않은 DLL4 결합 단백질을 이용하는 경쟁 면역검사에 의해 검사할 수 있다.
- [0954] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 시험관내 및 생체내 둘 다에서 바람직하게는 DLL4 활성, 특히 hDLL4 활성을 중화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 이러한 결합 단백질은 예를 들면, 사람 대상체, 또는 본 발명의 결합 단백질이 교차-반응하는 DLL4를 발현하는 다른 포유동물 대상체내에서 DLL4를 함유하는 세포 배양물 중에서 DLL4 활성을 억제하는데 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 DLL4를 본 발명의 DLL4 항체 또는 항체 부위와 접촉시킴으로써 DLL4 활성을 억제시킴을 포함하여 DLL4 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 예를 들면, DLL4를 함유하거나 함유하는 것으로 추정된 세포 배양물 중에서, 본 발명의 항체 또는 항체 부위를 배양 배지에 가하여 배양물 중에서 DLL4 활성을 억제할 수 있다.
- [0955] 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체, 유리하게는 DLL4 또는 DLL4 활성이 유해한 질환 또는 장애로 고생하는 대상체로부터 DLL4 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 대상체에게 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 투여함으로써 대상체에서 DLL4 또는 DLL4 활성을 감소시킴을 포함하여, 이러한 질환 또는 장애로 고생하는 대상체에서 DLL4 또는 DLL4 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는, DLL4는 사람 DLL4이고, 대상체는 사람 대상체이다. 대안으로, 대상체는, 본 발명의 DLL4 결합 단백질이 결합할 수 있는 DLL4를 발현하는 포유동물일 수 있다. 여전히 추가로, 대상체는, DLL4가 도입된(예를 들면, DLL4의 투여에 의해 또는 DLL4 삽입유전자의 발현에 의해 도입된) 포유동물일 수 있다. 본 발명의 항체 또는 다른 DLL4 결합 단백질은 사람 대상체에게 치료 목적으로 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은, 결합 단백질이 수의학 목적으로 또는 사람 질환의 동물 모델로서 결합할 수 있는 DLL4를 발현하는 비-사람 포유동물에게 투여될 수 있다. 후자와 관련하여, 이러한 동물 모델은 본 발명의 항체 및 다른 DLL4 결합 단백질의 치료 효능을 평가(예를 들면, 용량 및 투여 시간 경로의 시험)하는데 사용될 수 있다.
- [0956] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "DLL4 및/또는 노치 시그널링 활성이 유해한 장애"는 암, 및 질환으로 고생하는 대상체에서 DLL4 및/또는 노치 시그널링 활성의 존재가 질환의 악화에 기여하는 인자 또는 질환의 병리생리학에 관여하는 것으로 밝혀지거나 예측된 다른 질환을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, DLL4 및/또는 노치 시그널링 활성이 유해한 장애는, DLL4 및/또는 노치 시그널링 활성의 감소가 질환의 증상 및/또는 진행(예를 들면, 종양 성장)을 완화시키는 것으로 예측되는 질환이다. 이러한 질환은, 예를 들면, 상기 기술한 바와 같은 항-

DLL4 항체를 사용한, 검출될 수 있는, 예를 들면, 당해 질환으로 고생하는 대상체에서의 혈관형성의 증가(예를 들면, 종양 성장 및 형성 동안 대상체의 혈청, 혈장, 활액 등에서 증가하는 당해 분야에 공지된 각종 단백질 농도에 있어서의 증가)에 의해 입증될 수 있다. 본 발명의 항체로 치료될 수 있는 질환의 비-제한적 예는 본 발명의 항체의 약제학적 조성물과 관련되는, 하기 단락에서 논의된 질환들을 포함한다.

II. 약제학적 조성물 및 치료학적 용도

본 발명은 또한 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 이에 제한되지 않는 질환의 진단, 검출 또는 모니터링에서; 질환 또는 이의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 완화시; 및/또는 조사시 사용된다. 특정 실시형태에서, 조성물은 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질을 포함한다. 다른 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질 및, DLL4 및/또는 DLL4 활성이 유해한 장애를 치료하기 위한 본 발명의 결합 단백질 이외의 하나 이상의 예방 또는 치료제를 포함한다. 바람직하게는, 예방제 또는 치료제는 암 또는 종양과 같은 질환, 또는 하나 이상의 이의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 완화에 사용하기에 유용하거나 사용되어 왔거나 현재 사용중인 것으로 공지되어 있다. 이들 실시형태에 따라서, 조성물은 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 결합 단백질은 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로 혼입될 수 있다. 전형적으로, 약제학적 조성물은 본 발명의 DLL4 결합 단백질(또는 이의 DLL4 결합 부위) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 혼용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 피복제, 항생제, 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 물, 염수, 인산염 완충된 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등, 및 또한 이의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 많은 경우에, 등장성 제제, 예를 들면, 당, 폴리알코올, 예를 들면, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 중에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 약제학적으로 허용되는 담체는 소량의 보조 물질, 예를 들면, 항체 또는 항체 일부의 반감기 또는 효능을 향상시키는, 습윤제, 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 보조 물질을 포함할 수 있다.

각종 전달 시스템이 공지되어 있으며 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질 또는 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질과, 질환 또는 이의 하나 이상의 장애를 예방하거나, 관리하거나, 치료하거나 완화시키는, 예를 들면, 종양 혈관형성을 감소시키는데 유용한 치료제 또는 예방제, 리포솜내 봉입물(encapsulation), 미세입자, 미세캡셀, DLL4 결합 단백질을 발현시킬 수 있는 재조합체 세포, 수용체-매개된 세포내이입[참조: 예를 들면, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987)], 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서의 핵산의 작제물 등의 조합물을 투여하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 예방제 또는 치료제를 투여하는 방법은 비경구 투여(예를 들면, 피내, 근육내, 경피내, 정맥내 및 피하), 경막외 투여, 종양내 투여, 및 점막 투여(예를 들면, 비강내 및 경구 경로)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 폐 투여를, 예를 들면, 흡입기 또는 분무기, 및 에어로졸화제와의 제형의 사용에 의해 사용할 수 있다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제6,019,968호; 제5,985,320호; 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공보 제WO 92/19244호, 제WO 97/32572호, 제WO 97/44013호, 제WO 98/31346호, 및 제WO 99/66903호; 이들 각각은, 이들의 전문이 본원에 참조로 혼입된다). 하나의 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질, 조합 치료요법, 또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR[®] 폐 약물 전달 기술[제조원: 알커메스 인코포레이티드(Alkermes, Inc.), 미국 메사추세츠주 캄브리지 소재]를 사용하여 투여한다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제는 근육내, 정맥내, 종양내, 경구, 비강내, 폐 또는 피하로 투여된다. 예방제 또는 치료제는 임의의 편리한 경로, 예를 들면, 주입 또는 거환 주사, 상피 또는 점막피부 내층(예를 들면, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여할 수 있으며 다른 생물학적으로 활성인 제제와 함께 투여할 수 있다. 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다.

특정 실시형태에서, 본 발명의 예방제 또는 치료제를 치료가 요구되는 부위에 국소적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있으며; 이는 예를 들면 국소 주입, 주사에 의해, 또는 이식물을 사용하여 달성할 수 있으며, 당해 이식물은 시알라스틱 막, 중합체, 섬유성 매트릭스(예를 들면, Tissuel[®]), 또는 콜라겐 매트릭스와 같은 막 및 매트릭스를 포함하는 다공성 또는 비-다공성 물질이다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 길항제 하나 이상의 DLL4 결합 단백질 유효량이 대상체에 대해 영향받은 부위에 국소 투여됨으로써 질환 또는 이의 증상을 예방, 치료, 관리 및/또는 완화시킨다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 하나 이상의 DLL4 결합 단백질의 유효량은 본 발명의 결합 단백질 이외의 하나 이상의 치료요법(예를 들면, 하나 이상의 예방제 또는 치료제)의 유효량과 함께 대상

체의 영향받은 부위에 국소 투여됨으로써 질환 또는 이의 하나 이상의 증상을 예방하고/하거나 치료하고/하거나 관리하고/하거나 완화시킨다.

[0962] 다른 실시형태에서, 예방제 또는 치료제는 조절된 방출 또는 지연된 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 펌프를 사용하여 조절된 방출 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다[참조: Langer (*Science*, 249: 1527-1533 (1990)); Sefton, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 14: 201-240 (1987); Buchwald et al., *Surgery*, 88: 507-516 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579 (1989)]. 다른 실시형태에서, 중합체 물질을 사용하여 본 발명의 조절된 방출 또는 지연된 방출을 달성할 수 있다[참조: 예를 들면, Goodson, J.M., *In Medical Applications of Controlled Release, Vol. II, Applications 및 Evaluations*, (Langer and Wise, eds.), (CRC Press Inc., Boca Raton, 1984), chapter 6, pages 115-138; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design 및 Performance*, Smolen and Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126 (1983); 또한 Levy et al., *Science*, 228: 190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol.*, 25: 351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*, 71: 105-112 (1989); 미국 특허 제5,679,377호; 제5,916,597호; 제5,912,015호; 제5,989,463호; 및 제5,128,326호; 및 PCT 공보 제WO 99/15154호 및 제WO 99/20253호 참조]. 지연된 방출 제형으로 사용된 중합체의 예는 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드(PLG), 다카무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락타이드(PLA), 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시형태에서, 지연된 방출 제형에 사용된 중합체는 불활성이고, 유출가능한 불순물을 함유하지 않으며, 저장시 안정하고, 멸균되어 있으며, 생분해성이다. 여전히 다른 실시형태에서, 조절되거나 지연된 방출 시스템은 예방학적 또는 치료학적 표적에 근접하여 위치함으로써 전신계적 투여량의 분획만을 필요로 할 수 있다[참조: 예를 들면, Goodson, *In Medical Applications of Controlled Release*, (1984), pages 115-138].

[0963] 조절된 방출 시스템은 랑거(Langer)에 의한 보고서[참조: *Science*, 249: 1527-1533 (1990)]에 논의되어 있다. 당해 분야의 숙련가에게 공지된 임의의 기술도 사용하여 본 발명의 하나 이상의 치료제를 포함하는 지연된 방출 제형을 생산할 수 있다[참조: 예를 들면, 미국 특허 제4,526,938호; PCT 공보 제WO 91/05548호 및 제WO 96/20698호; Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiother. Oncol.*, 39: 179-189 (1996); Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," *PDA J. Pharm. Sci.Tech.*, 50: 372-377 (1996); Cleek et al., "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Proceed. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854 (1997), 및 Lam et al., "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759-760 (1997), 이들 각각은, 본원에 이들의 전문이 참조로 혼입된다].

[0964] 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 조성물이 예방제 또는 치료제를 암호화하는 핵산인 경우, 당해 핵산은 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 이를 작제하고 이를 투여하여 이것이 예를 들면, 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해 세포내로 되도록 함으로써(참조: 미국 특허 제4,980,286호), 또는 직접적인 주사에 의해, 또는 미세입자 충격[예를 들면, 유전자 총; 제조원: 바이오리스틱(Biolistic), 듀폰트(DuPont)], 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제를 사용한 피복에 의해, 또는 이를 핵에 도입되는 것으로 공지된 호메오박스-유사 펩타이드(homeobox-like peptide)에 대해 연결시켜 투여함으로써[참조: 예를 들면, Joliot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1864-1868 (1991)], 생체내 투여되어 이의 암호화된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진할 수 있다. 대안으로, 핵산은 세포내로 도입될 수 있고 동종 재조합에 의한 발현용 숙주 세포 DNA내로 혼입될 수 있다.

[0965] 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 의도된 투여 경로와 상용성이 되도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구(예를 들면, 정맥내), 피내, 피하, 경구, 비강내(예를 들면, 흡입), 경피(예를 들면, 국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 조성물은 사람에게 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비강내, 또는 국소 투여용으로 조정된 약제학적 조성물로서 통상의 과정에 따라 제형화된다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균 등장성 수성 완충액 속의 용액이다. 경우에 따라, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위에서 통증을 경감시키기 위한 리그노캄네(lignocaine)와 같은 국소 마취제를 포함할 수 있다.

[0966] 본 발명의 조성물이 국소 투여되어야 하는 경우, 조성물은 연고제, 크림제, 경피 패치, 로션제, 젤제, 샴푸제, 분무제, 에어로졸제, 액제, 유제의 형태 또는 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지된 다른 형태로 제형화될 수 있다

[참조: 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995)]. 비-분무가능한 국소 용량형의 경우, 국소 적용과 혼용성인 담체 또는 하나 이상의 부형제를 포함하고, 바람직하게는 물보다 큰 역학적 점도를 갖는 점성 내지 반-고체 또는 고체 형태를 전형적으로 사용한다. 적합한 제형은 액제, 현탁제, 유제, 크림제, 연고제, 산제, 도찰제, 고약(salve) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 이들은 경우에 따라, 멸균되거나 예를 들면, 삼투압과 같은 각종 특성에 영향을 미치기 위한 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제, 완충액, 또는 염)와 혼합된다. 다른 적합한 국소 용량형은 분무가능한 에어로졸 제제를 포함하며, 여기서 활성 성분은 바람직하게는 고체 또는 액체 불활성 담체와 함께, 가압된 휘발물(예를 들면, FREON[®]과 같은 가스성 추진제) 또는 스퀴즈 병(squeeze bottle)과의 혼합물내로 패키징화된다. 보습제 또는 습윤제가 또한 약제학적 조성물 및 경우에 따라 용량형에 첨가될 수 있다. 이러한 추가의 성분의 예는 당해 분야에 잘 공지되어 있다.

[0967] 본 발명의 방법이 조성물의 비강내 투여를 포함하는 경우, 조성물은 에어로졸제 형태, 분무제, 연무제 또는 점적제의 형태로 제형화될 수 있다. 특히, 본 발명에 따라 사용하기 위한 예방제 또는 치료제는 적합한 추진제(예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스)를 사용하여 편리하게는 가압 팩 또는 분무기(nebulizer)로부터 에어로졸 분무 표시의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸제의 경우에, 용량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 캡셀제 및 카트릿지(예를 들면, 젤라틴으로 구성됨)는 화합물과 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화시킬 수 있다.

[0968] 본 발명의 방법이 경구 투여를 포함하는 경우, 조성물은 정제, 캡셀제, 카세트(cachet), 젤캡제(gelcap), 액제, 현탁제 등의 형태로 경구적으로 제형화될 수 있다. 정제 또는 캡셀제는 결합제(예를 들면, 예비젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈, 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들면, 락토즈, 미세결정성 셀룰로스, 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들면, 스테아르산마그네슘, 활석, 또는 실리카); 붕해제(예를 들면, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트)와 같은 약제학적으로 허용되는 부형제를 사용하여 통상의 수단으로 제조할 수 있다. 정제는 당해 분야에 잘 공지된 방법으로 피복할 수 있다. 경구 투여용 액제 제제는 액제, 시럽제 또는 현탁제의 형태를 취할 수 있으나, 이에 한정되지 않거나, 이들은 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클과 함께 구성하기 위한 무수 생성물로서 제공될 수 있다. 이러한 액제 제제는 통상의 수단에 의해 현탁화제(예를 들면, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체, 또는 수소화된 식물 지방); 유화제(예를 들면, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예를 들면, 아몬드 오일, 오일성 에스테르, 에틸 알코올, 또는 분획화된 야채 오일); 및 방부제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)과 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제와 함께 제조될 수 있다. 제제는 또한 적절하게는 완충액 염, 풍미제, 착색제, 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여용 제제는 예방제 또는 치료제(들)의 서방출, 조절된 방출 또는 지연된 방출에 적합하게 제형화될 수 있다.

[0969] 본 발명의 방법은 예를 들면, 흡입기 또는 분무기(nebulizer)의 사용에 의해 에어로졸화제와 함께 제형화된 조성물의 폐 투여를 포함할 수 있다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제6,019,968호; 제5,985,320호; 제5,985,309호; 제5,934,272호; 제5,874,064호; 제5,855,913호; 제5,290,540호; 및 제4,880,078호; 및 PCT 공보 제WO 92/19244호, 제WO 97/32572호, 제WO 97/44013호, 제WO 98/31346호, 및 제WO 99/66903호, 이들 각각은 이들의 전문이 본원에 참조로 혼입된다). 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 항체, 조합 치료요법, 및/또는 본 발명의 조성물은 Alkermes AIR[®] 폐 약물 전달 기술[제조원: 알케메스, 인코포레이티드(Alkermes, Inc.), 미국 매사추세츠주 캄브릿지 소재]을 사용하여 투여된다.

[0970] 본 발명의 방법은 주사(예를 들면, 거한 주사 또는 연속 주입)에 의해 비경구 투여용으로 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 주사용 제형은 첨가된 방부제와 함께 단위 용량형(예를 들면, 앰플 또는 다중-투여량 용기내)으로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중에서 현탁제, 액제 또는 유제와 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클(예를 들면, 멸균 발열원을 함유하지 않는 물)과 함께 구성하기 위한 산제 형태일 수 있다.

[0971] 본 발명의 방법은 또한 데포트 제제(depot preparation)로 제형화된 조성물의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 장기 작용하는 제형은 이식술에 의해(예를 들면, 피하 또는 근육내로) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 조성물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들면, 허용되는 오일 중

유제로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체로서(예를 들면, 난용성 염으로서) 제형화될 수 있다.

[0972] 본 발명의 방법은 중성 또는 염 형태로 제형화된 조성물의 투여를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 기원한 것들, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제 이철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 기원한 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0973] 일반적으로, 조성물의 성분들은 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 사체(sachette)와 같은 밀폐하여 밀봉된 용기 중에 무수 동결건조된 분말 또는 물을 함유하지 않는 농축물로서 단위 용량형과 함께 혼합되거나, 별도로 공급된다. 투여 방식이 주입인 경우, 조성물은 멸균 약제 등급의 물 또는 염수를 함유하는 주입병으로 제공될 수 있다. 투여 방식이 주사인 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플을 제공하여 성분들을 투여 전에 혼합할 수 있다.

[0974] 특히, 본 발명은 또한 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 하나 이상이 제제의 양을 나타내는 앰플 또는 사체와 같은 밀폐적으로 밀봉된 용기 중에 패키징된다. 하나의 실시형태에서, 예방제 또는 치료제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 하나 이상은 밀폐하여 밀봉된 용기 중에 무수 멸균된 동결건조된 분말 또는, 물을 함유하지 않는 농축물로서 공급될 수 있으며 대상체에게 투여하기 위한 적절한 농도로 재구성(예를 들면, 물 또는 염수를 사용하여)시킬 수 있다. 바람직하게는, 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 하나 이상은 밀폐하여 밀봉된 용기 중에 적어도 5 mg, 보다 바람직하게는 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 적어도 75 mg, 또는 적어도 100 mg의 단위 용량으로 무수 멸균 동결건조된 분말로서 공급된다. 동결건조된 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 원래의 용기 중에서 2°C 내지 8°C 사이에서 저장하여야 하며, 예방제 또는 치료제, 또는 본 발명의 약제학적 조성물은 재구성된 후 1주내, 바람직하게는 5일내, 72시간내, 48시간내, 24시간내, 12시간내, 6시간내, 5시간내, 3시간내, 또는 1시간내에 투여되어야 한다. 대안적인 실시형태에서, 예방제 또는 치료제 또는 본 발명의 약제학적 조성물 중 하나 이상은 제제의 양 및 농도를 나타내는 밀폐하여 밀봉된 용기 중에 액체 형태로 공급된다. 바람직하게는, 투여된 조성물의 액체 형은 밀폐하여 밀봉된 용기 중에 적어도 0.25 mg/ml, 보다 바람직하게는 적어도 0.5 mg/ml, 적어도 1 mg/ml, 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 8 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/kg, 적어도 25 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 75 mg/ml, 또는 적어도 100 mg/ml로 공급된다. 액체 형은 이의 원래의 용기 중에 2°C 내지 8°C 사이에서 저장되어야 한다.

[0975] 본 발명의 결합 단백질은 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물내로 혼입될 수 있다. 바람직하게는, 결합 단백질은 0.1 내지 250 mg/ml 항체를 함유하는 주사가 가능한 액체로 제조될 것이다. 주사가 가능한 액체는 플린트(flint) 또는 앰버 바이알(amber vial), 앰플 또는 예비-충진된 주사기 중에 액체 또는 동결건조된 용량형으로 구성될 수 있다. 완충액은 최적으로는 5 내지 10 mM의, pH 5.0 내지 7.0(최적으로 pH 6.0)에서 L-히스티딘(1-50 mM)일 수 있다. 다른 적합한 완충액은 석신산나트륨, 시트르산나트륨, 인산나트륨 또는 인산칼륨을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 염화나트륨을 사용하여 용액의 독성을 0 내지 300 mM(최적으로 액체 용량형의 경우 150 mM)에서 조절하는데 사용할 수 있다. 동결보호제, 원칙적으로 0 내지 10% 슈크로스(최적으로 0.5 내지 1.0%)가 동결건조된 용량형을 위해 포함될 수 있다. 다른 적합한 동결보호제는 트레할로스 및 락토스를 포함한다. 증량제(bulking agent), 원칙적으로 1 내지 10% 만니톨(최적으로는 2 내지 4%)이 동결건조된 용량형을 위해 포함될 수 있다. 안정화제, 원칙적으로 1 내지 50 mM L-메티오닌(최적으로 5 내지 10 mM) 액체 및 동결건조된 용량형으로 사용될 수 있다. 다른 적합한 증량제는 글리신, 아르기닌을 포함하며, 0 내지 0.05% 폴리소르베이트-80(최적으로는 0.005 내지 0.01%)로서 포함될 수 있다. 추가의 계면활성제는 폴리소르베이트 20 및 BRIJ 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0976] 본 발명의 조성물은 각종 형태일 수 있다. 이들은 예를 들면, 액체, 반-고체 및 고체 용량형, 예를 들면, 액체 액체(예를 들면, 주사가 가능하고 주입가능한 액체), 분산제 또는 현탁제, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌제를 포함한다. 바람직한 형태는 의도된 투여 방식 및 치료학적 적용에 의존한다. 대표적인 바람직한 조성물은 주사가 가능하거나 주입가능한 액체, 예를 들면, 다른 항체를 사용한 사람의 수동 면역화에 사용된 것들과 유사한 조성물의 형태이다. 바람직한 투여 방식은 비경구(예를 들면, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)이다. 바람직한 실시형태에서, 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 정맥내 주입 또는 주사로 투여된다. 다른 바람직한 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 근육내 또는 피하 주사로 투여된다.

[0977] 치료학적 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 전형적으로 멸균되어야 하며 안정하여야 한다. 조성물은 액체,

미세유제, 분산제, 리포솜, 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 주문된 구조로 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 액제는 활성 화합물(즉, 항체 또는 항체 일부)를 필요한 양으로 적절한 용매 중에서 상기 나열된 성분들 중 하나 또는 조합과 함께 혼합한 후, 경우에 따라, 여과된 멸균에 의해 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 나열된 것들로부터의 요구된 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클내로 혼합함으로써 제조한다. 멸균된 주사가 가능한 액제의 제조를 위한, 멸균되고, 동결건조된 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 활성 성분의 분말과 이의 앞서 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 수득하는 분무-건조 및 진공 건조이다. 액제의 적절한 유동성은 예를 들면, 레시틴과 같은 피복제의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물 중에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0978] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은, 비록 많은 치료학적 적용의 경우, 바람직한 투여 경로/방식이 피하 주사, 정맥 내 주사 또는 주입이라고 해도, 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당해 분야의 숙련가에 의해 인식될 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 변할 것이다. 특정 실시형태에서, 활성 화합물은 삼입물, 경피 패취 및 미세봉입된 전달 시스템을 포함하는 조절된 방출 제형과 같이, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해가능한, 생적합형 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 다카무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 많은 방법이 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)].

[0979] 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은 예를 들면, 불활성 희석제 또는 동화할 수 있는 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 화합물(및 필요한 경우, 다른 성분들)은 또한 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡셀 중에 봉입되거나, 정제로 압착되거나, 대상체의 식이내로 직접 혼합될 수 있다. 경구 치료학적 투여를 위해, 화합물은 부형제와 함께 혼합될 수 있으며 소화가능한 정제, 볼내 정제, 트로키제, 캡셀제, 엘릭서르제, 현탁제, 시럽제, 웨이퍼제(wafer) 등의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 비경구 투여 이외로 투여하기 위해, 화합물을 이의 불활성화를 방지하는 물질로 피복시키거나, 화합물을 이와 함께 동시-투여하는 것이 필수적일 수 있다.

[0980] 보충적인 활성 화합물을 또한 조성물내로 혼합시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질은, DLL4 활성이 유해한 장애를 치료하는데 유용한 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 공제형화되고/되거나 공투여된다. 예를 들면, 본 발명의 항-huDLL4 항체 또는 항체 부위는 다른 표적에 결합하는 하나 이상의 추가의 항체(예를 들면, 다른 사이토킨에 결합하거나 세포 표면 분자에 결합하는 항체)와 함께 공제형화되고/되거나 공투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 하나 이상의 결합 단백질을 앞서의 치료제 중 2개 이상과 함께 사용할 수 있다. 이러한 조합 치료요법은 투여된 치료제의 보다 적은 용량을 유리하게 이용할 수 있으므로, 각종 단독치료요법과 관련된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.

[0981] 특정 실시형태에서, 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 당해 분야에 공지된 반감기 연장 비히클에 연결된다. 이러한 비히클은 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜, 및 텍스트란을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 비히클은 예를 들면, 본원에 참조로 혼합된 미국 특허 제6,660,843 B1호 및 공개된 PCT 공보 제WO 99/25044호에 기술되어 있다.

[0982] 구체적인 실시형태에서, 본 발명의 결합 단백질 또는 본 발명의 다른 예방제 또는 치료제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 서열은 유전자 치료요법의 방식으로 질환 또는 이의 하나 이상의 증상을 치료하거나, 예방하거나, 관리하거나, 완화시키기 위해 투여된다. 유전자 치료요법은 발현되거나 발현가능한 핵산의 대상체에 대한 투여에 의해 수행된다. 본 발명의 당해 실시형태에서, 핵산은 예방학적 또는 치료학적 효과를 매개하는 본 발명의 이들의 암호화된 결합 단백질 또는 예방제 또는 치료제를 생산한다.

[0983] 당해 분야에서 이용가능한 유전자 치료요법에 대한 방법 중 어느 것도 본 발명에 따라 사용할 수 있다. 유전자 치료요법의 방법의 일반적인 고찰을 위해서는, 문헌[참조: Goldspiel et al., *Clin. Pharmacy*, 12: 488-505 (1993); Wu 및 Wu, *Biotherapy*, 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260: 926- 932 (1993); 및 Morgan 및 Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217 (1993); Robinson, C., *Trends Biotechnol.*, 11(5):155 (1993)]을 참조한다. 사용될 수 있는 재조합체 DNA 기술의 당해 분야에 일반적으로 공지된 방법은 문헌[참조: Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A

Laboratory Manual, (Stockton Press, New York, 1990)]에 기술되어 있다. 유전자 치료요법의 각종 방법의 상세한 기술은 본원에 참조로 혼입된 미국 특허원 공보 제20050042664 A1호에 기재되어 있다.

- [0984] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 DLL4-관련된 종양을 치료(예를 들면, 이의 발병을 치유하거나, 억제하거나, 완화시키거나, 지연시키거나 예방하거나, 이의 재발 또는 지연을 방지하는)하거나 예방하는 방법을 제공한다. 당해 방법은 대상체에게 DLL4 결합 단백질, 예를 들면, 본원에 기술된 항-DLL4 항체 또는 이의 단편을 DLL-관련된 종양 또는 암을 치료하거나 예방하기에 충분한 양으로 투여함을 포함한다. DLL4 길항제, 즉, 항-DLL4 항체 또는 이의 단편은 대상체에게 단독으로 또는 본원에 기술된 바와 같은 다른 치료학적 양식과 함께 투여될 수 있다. DLL4는 면역 및 염증 성분, 특히 암 및 종양 혈관형성을 포함하는 각종 질환과 관련된 병리학에서 중요한 역할을 한다. DLL4-관련된 질환의 예는 다음의 생물학적 과정에 역으로 영향을 미치는 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 신경세포 기능 및 발달; 동맥 내피 파멸(arterial endothelial fate) 및 혈관형성의 안정화; 판막 원시의 형성 및 심실 발달과 분화 둘 다 동안 심내막과 심근 사이의 결정적인 세포 교통 현상(cell communication event)의 조절; 심장 판막 항상성, 및 또한 심근계를 포함하는 다른 사람 질환에 있어서의 합병증; 내분비 및 외분비 체계 둘 다의 시의적절한 세포 계통 명세; 위에서 분비 및 흡수 계통 사이에서 선택하여야만 하는 세포의 이원성 파멸 결정의 영향; 골 발달 동안 조혈 줄기 세포 구획의 확장 및 골다공증과 같은 골모세포 계통에 대한 강제입원에 있어서의 관여; 수개의 명백한 발달 단계에서 유선에 있어 세포-파멸 결정의 조절; 및 타이로신 키나제 Ab1을 통한 액틴 세포골격의 조절과 같은, 특정의 비-핵 메카니즘. 보다 구체적으로, DLL4-관련된 질환은 암, T-ALL(T-세포 급성 림프아구 백혈병), CADASIL(피질하 경색증 및 백질뇌병을 지닌 대뇌 보통염색체 우성 동맥병증), MS(다발성 경화증), 팔로사징증(tetralogy of Fallot: TOF), 및 알라질 증후군(Alagille syndrome: AS), 황반 변성 및 노화-관련 황반 변성 질환, 및 비정상적인 DLL4 발현 또는 활성에 의해 특징화되는 다른 혈관형성 독립성 및 의존성 질환을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0985] 바람직하게는, 본원에 기술된 바와 같은 항체 및 이의 항원-결합 부위와 같은 DLL4 결합 단백질을 사용하여 암 및 종양을 치료한다.
- [0986] 본 발명에 따른 결합 단백질은 단독으로 또는 조합으로, 즉 본원에 기술된 하나 이상의 DLL4-결합 단백질과 함께 사용되어 암, 종양 또는 DLL4에 대한 결합, 이의 억제, 및/또는 중화가 개인의 건강에 바람직하거나 기타의 경우 유리할 것으로 고려되는 다른 질환을 치료할 수 있다.
- [0987] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 단독으로 또는 추가의 제제, 예를 들면, 치료제와 함께 사용될 수 있으며, 상기 추가의 제제는 이의 의도된 목적을 위해 숙련가에 의해 선택된다. 예를 들면, 추가의 제제는 당해 분야에서 암, 종양 또는, DLL4에 대한 결합 또는 이의 억제가 암, 종양, 또는 다른 질환 또는 병태를 치료하는데 바람직하거나 유리한 것으로 고려되는 다른 질환 또는 병태를 치료하는데 유리한 것으로 인식되는 치료제일 수 있다. 추가의 제제는 또한 치료학적 조성물에 유리한 기여를 제공하는 제제, 예를 들면, 조성물의 점도에 영향을 미치는 제제일 수 있다.
- [0988] 본 발명에 포함되어야 하는 조합은 이들의 의도된 목적에 유리한 조합임이 또한 이해되어야 한다. 하기 설정된 제제는 목적을 위해 설명한 것이며 제한함을 의도하지 않는다. 본 발명의 일부인 당해 조합은 본 발명의 항체 및 하기 목록으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 제제일 수 있다. 당해 조합은, 형성된 조성물이 이의 의도된 기능을 수행할 수 있도록 존재하는 경우, 이는 또한 하나 이상의 추가의 제제, 예를 들면, 2개 또는 3개의 추가의 제제를 포함할 수 있다.
- [0989] 치료제의 바람직한 조합은 전-종양원성 또는 전-혈관형성 시그널링 경로에서 상이한 시점에서 방해할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물에 유용한 치료제의 바람직한 예는 항신생물제, 방사선 치료요법, 및 화학치료요법, 예를 들면, DNA 알킬화제, 시스플라틴, 카보플라틴, 항-투블린제, 파클리탁셀, 도세탁셀, 탁솔, 독소루비신, 겐시타빈, 겐자르, 안트라사이클린, 아드리아마이신, 토포이소머라제 I 억제제, 토포이소머라제 II 억제제, 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 이리노테칸, 수용체 타이로신 키나제 억제제(예를 들면, 에를로티니브, 게피티니브), COX-2 억제제(예를 들면, 셀레코시브), 및 키나제 억제제를 포함한다.
- [0990] 본 발명의 DLL4 결합 단백질은 또한 메토트렉세이트, 6-MP, 아자티오프린 설파살라진, 메살라진, 올살라진 클로로퀴논/하이드록시클로로퀴논, 펜실라민, 아우로티오말레이트(근육내 및 경구), 아자티오프린, 콜치신, 코르티코스테로이드(경구, 흡입 및 국소 주사), 베타-2 아드레노수용체 효능제(살부타몰, 테르부타린, 살메테랄), 크산틴(테오필린, 아미노필린), 크로모글리케이트, 네도크로필, 케토티펜, 이프라트로피움 및 옥시트로피움, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀레이트 모페틸, 레플루노미드, NSAID, 예를 들면, 이부프로펜, 프레드니솔론과 같은 코르티코스테로이드, 포스포디에스테라제 억제제, 아데노신 효능제, 항혈전제, 상보체 억제제,

아드레날린성 제제, 전염증성 사이토킨, 예를 들면, TNF α 또는 IL-1(예를 들면, IRAK, NIK, IKK, p38 또는 MAP 키나제 억제제), IL-1 β 전환 효소 억제제, TNF α 전환 효소(TACE) 억제제, T-세포 시그널링 억제제, 예를 들면, 키나제 억제제, 메탈로프로테이나제 억제제, 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토프린, 안지오텐신 전환 효소 억제제, 가용성 사이토킨 수용체 및 이의 유도체[예를 들면, 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체 및 유도체 p75TNFRlgG (EnbrelTM) 및 p55TNFRlgG (레네트셉트), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R], 소염성 사이토킨(예를 들면, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 및 TGF β), 셀레콕시브, 엽산, 하이드록시클로로퀸 설페이트, 로페콕시브, 에타네르셉트, 인플릭시마브, 나프록센, 발데콕시브, 설파살라진, 메틸프레드니솔론, 멜록시캄, 메틸프레드니솔론 아세테이트, 금 나트륨 티오말레이트, 아스피린, 트리암시놀론 아세트나이드, 프로폭시펜 납실레이트/apap, 폴레이트, 나부메톤, 디클로페낙, 피록시캄, 에토독락, 디클로페낙 나트륨, 옥사프로진, 옥시코돈 hcl, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 디클로페낙 나트륨/미소프로스톨, 펜타닐, 아나킨라, 사람 재조합체, 트라마돌 hcl, 살살레이트, 술린락, 시아노코발라민/fa/피리독신, 아세트아미노펜, 알렌드로네이트 나트륨, 프레드니솔론, 모르핀 설페이트, 리도카인 하이드로클로라이드, 인도메타신, 글루코사민 sulf/콘드로이틴, 아미트립틸린 HCl, 설파디아진, 옥시코돈 HCl/아세트아미노펜, 울로파타딘 hcl, 미소프로스톨, 나프록센 나트륨, 오메프라졸, 사이클로포스파미드, 리툽시마브, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, 항-IL-18, 항-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, 로플루밀라스트, IC-485, CDC-801, 및 메소프람과 같은 제제와 함께 투여될 수 있다.

[0991] 본 발명의 DLL4 결합 단백질이 함께-투여되거나 함께 사용될 수 있는 암에 대한 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 부테노시드; 상피 성장 인자; 설파살라진; 아미노살리실레이트; 6-머캅토프린; 아지티오프린; 메트로니다졸; 리폭시게나제 억제제; 메살라민; 올살라진; 발살라지드; 항산화제; 트롬복산 억제제; IL-1 수용체 길항제; 항-IL-1 β 모노클로날 항체; 항-IL-6 모노클로날 항체; 성장 인자; 엘라스타제 억제제; 피리디널-이미다졸 화합물; 및 다른 사람 사이토킨 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 이의 길항제, 예를 들면, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 및 PDGF. 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 부위는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90과 같은 세포 표면 분자에 대한 항체, 또는 이들의 리간드와 함께 조합될 수 있다.

[0992] 본 발명의 DLL4 결합 단백질이 조합될 수 있는 치료제의 다른 예는 다음을 포함한다. TNF 길항제, 예를 들면, 항-TNF 항체, D2E7(PCT 공보 제WO 97/29131호; HUMIRA[®]), CA2(REMICADE[®]), CDP 571, TNFR-Ig 작제물(p75TNFRlgG (ENBREL[®]) 및 p55TNFRlgG(레네트셉트), 및 PDE4 억제제. 본 발명의 결합 단백질은 메살라민, 프레드니손, 아자티오프린, 머캅토프린, 인플릭시마브, 메틸프레드니솔론 나트륨 석시네이트, 디페녹실레이트/아트로프 설페이트, 로페라미드 하이드로클로라이드, 메토타렉세이트, 오메프라졸, 폴레이트, 시프로플록사신/텍스트로즈-물, 하이드로코돈 비타르테이트/apap, 테트라사이클린 하이드로클로라이드, 플루오시노니드, 메트로니다졸, 티메로살/붕산, 콜레스티라민/슈크로스, 시프로플록사신 하이드로클로라이드, 하이오스시아민 설페이트, 메페리딘 하이드로클로라이드, 미다졸람 하이드로클로라이드, 옥시코돈 hcl/아세트아미노펜, 프로메타진 하이드로클로라이드, 인산나트륨, 설파메톡사졸/트리메토프림, 셀레콕시브, 폴리카르보필, 프로폭시펜 나프실레이트, 하이드로코르티손, 멀티비타민, 발살라진 이나트륨, 코데인 포스페이트/apsp, 콜레세벨람 hcl, 시아노코발라민, 엽산, 레보플록사신, 메틸프레드니솔론, 나탈리주마브, 및 인터페론-감마와 조합될 수 있다.

[0993] 본 발명의 결합 단백질과 조합될 수 있는 치료제의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 아스피린, 니트로글리세린, 이소소르바이드 모노니트레이트, 메토프롤롤 석시네이트, 아테놀롤, 메토프롤롤 타르테이트, 암로디핀 베실레이트, 딜티아젠펜 하이드로클로라이드, 이소소르바이드 디니트레이트, 클로피도그렐 비설페이트, 니페디핀, 아토르바스타틴 칼슘, 엽화칼슘, 푸로세미드, 심바스타틴, 베라파밀 hcl, 디곡신, 프로프라놀롤 하이드로클로라이드, 카르베딜롤, 리시노프릴, 스피로놀락톤, 하이드로클로로티아지드, 에날라프릴 말레이트, 나돌롤, 라미프릴, 에녹사파린 나트륨, 헤파린 나트륨, 발사르탄, 소탈롤 하이드로클로라이드, 페노피브레이트, 에제티미베, 부메타니드, 로사르탄 칼슘, 리시노프릴/하이드로클로로티아지드, 펠로디핀, 카프토프릴, 및 비소프롤롤 푸마레이트.

[0994] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 결합 단백질의 "치료학적 유효량" 또는 "예방학적 유효량"을 포함할 수 있다. "치료학적 유효량"은 목적하는 치료학적 결과를 달성하기에 필수적인 용량에서 및 이러한 기간 동안 효과적인 양을 말한다. 결합 단백질의 치료학적 유효량은 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있으며 개인의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개인에서 목적하는 반응을 유발시키는 결합 단백질의 능력에 따라 변할 수 있다. 치료학적 유효량은 또한, 결합 단백질의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 더 큰 것이다. "예방학적 유효량"은 목적하는 예방학적 결과를 달성하기에 필수적인 용량에서 및 이러한 기간

동안, 효과적인 양을 말한다. 전형적으로, 예방학적 투여량은 질환의 초기 단계 또는 전에 대상체에서 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량 미만일 것이다.

[0995] 용량 요법은 최적의 목적하는 반응(예를 들면, 치료학적 또는 예방학적 반응)을 제공하기 위해 조절될 수 있다. 예를 들면, 단일 거환이 투여될 수 있으며, 수회의 분할된 투여량을 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나 투여량을 치료학적 상황의 위급사태에 의해 처방되는 바와 같이 비례적으로 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위해 용량 단위형으로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 용량 단위형은 치료되는 포유동물 대상체에 대한 단일의 용량으로서 적합한 물리적으로 구별된 단위를 말하며; 각각의 단위는 필요한 약제학적 담체와 함께 목적하는 치료학적 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 화합물의 예정된 양을 함유한다. 본 발명의 용량 단위형에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성될 특정 치료학적 또는 예방학적 효과, 및 (b) 개인에서 민감성의 치료를 위한 활성 화합물과 같은 화합의 당해 분야에서 고유한 제한에 의해 영향받거나 직접적으로 의존한다.

[0996] 본 발명의 DLL4 결합 단백질의 치료학적 또는 예방학적 유효량에 대한 예시적인 비-제한적 범위는 0.1 내지 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg이다. 용량 값은 완화될 병태의 유형 및 중증도에 따라 변할 수 있음이 주목되어야 한다. 또한, 임의의 특정 대상체의 경우, 구체적인 용량 요법이 개인의 요구도 및 조성물을 투여하거나 이의 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 조절되어야 하고, 본원에 설정된 용량 범위는 단지 예이며 특허청구된 조성물의 영역 또는 실시를 제한하는 것으로 의도되지 않음이 이해되어야 한다.

[0997] III. 면역기술에서의 용도

[0998] 각종의 면역검출 검사 양식 중 어느 것도 조정하여 혼합물, 용액 또는 생물학적 시료 중에 존재하는 DLL4를 검출하는데 사용하기 위한 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 사용할 수 있다. 이러한 면역검출 검사 양식은 방사선 면역검사(RIA), 면역침전, 효소-연결된 면역흡착 검사(ELISA), 면역블롯(예를 들면, 웨스턴 블롯(Western blot)), 기질에 흡착되거나 고정된 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 포함하는 면역스트립(immuno-strip)(예를 들면, 면역딥스틱(immunodipsticks)), 형광성 활성화된 세포 분류(FACS) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본원에 기술된 DLL4 결합 단백질은 당해 분야에서 이용가능한 친화성 컬럼 또는 임의의 다른 친화성 양식에서 사용하기 위해 기질, 예를 들면, 수지 입자 또는 다른 물질에 흡착시키거나 고정시킬 수 있다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질을 사용한 DLL4의 검출은 혼합물, 용액, 또는 생물학적 시료 위에서 시험관내에서 수행할 수 있다. 본 발명의 DLL4 결합 단백질과 접촉하여 시료 중에서 DLL4를 검출하거나 측정할 수 있는 생물학적 시료는 뇨, 타액, 경구 도말(볼, 혀, 또는 인후 도말), 피부 도말, 피부 긁음, 직장 도말, 질 도말, 전혈 시료, 혈장 시료, 혈청 시료, 조직 생검, 및 당해 분야의 공지된 과정에 의해 개인으로부터 취득된 임의의 다른 시료를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 실시형태에서, DLL4 결합 단백질은 X-선 컴퓨터 보조된 단층촬영법(CT), 자기 공명 영상(MRI), 및 양전자 방출 단층촬영법(PET)을 포함하나 이에 한정되지 않는 각종 단층촬영법 및 주사 방법과 같이 생체내에서 DLL4를 검출하는데 사용될 수 있다.

[0999] 본원에 기술된 본 발명의 방법의 다른 적합한 변형 및 적응이 명백하며 본 발명의 영역 또는 본원에 기재된 실시형태로부터 벗어남이 없이 적합한 등가물을 사용하여 제조할 수 있음이 당해 분야의 숙련가에게 용이하게 명백할 것이다. 지금까지 본 발명을 상세히 기술하고, 이의 기술은 다음 실시예를 참조로 보다 명확하게 이해될 것이며, 이러한 실시예는 설명할 목적으로만 포함되고 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

[1000] 실시예

[1001] 실시예 1: DLL4 항체의 기능적 활성을 측정하기 위해 사용된 시험관내 검사

[1002] 실시예 1.1: BIACORE[®] 표면 플라스몬 공명 기술을 사용한 친화성 측정

[1003] BIACORE[®] 표면 플라스몬 공명 검사[제조원: 비아코어, 인코포레이티드(Biacore, Inc.), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재]는 온-속도 및 오프-속도 상수의 역학적 측정을 갖는 항체의 친화성을 측정한다. 정제된 재조합체 DLL4 세포외 도메인(ECD)에 대한 DLL4 항체의 결합은 Biacore[®] 장비(또는 Biacore 2000, Biacore 3000, 또는 Biacore T100; 제조원: 지이 헬스케어(GE Healthcare), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)을 사용하여 이동 완충액(running buffer) HBS-EPB (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA 및 0.005% 계면활성제 P20)를 사용하여 25°C에서 표면 플라스몬 공명-기초 측정으로 측정하였다. 예를 들면, 10 mM 아세트산나트륨(pH 4.5) 중에 희석된 대략 9000 RU의 염소 항-사람 Fc 특이적인 폴리클로날 항체[제조원: 씨모 피서

사이언티픽 인코포레이티드(Thermo Fisher Scientific Inc.), 미국 일리노이주 록포드 소재]를 CM5 조사 등급 바이오센서 칩을 따라 표준 아민 커플링 키트를 사용하여 제조업자의 지시 및 과정에 따라 25 μ g/ml에서 직접 고정화시킨다. 바이오센서 표면 위의 반응하지 않은 모이어티를 에탄올아민으로 차단하였다. 역학적 분석을 위해, 1:1 랑뮈르(Langmuir) 결합 모델로부터 유도된 속도 방정식을 스크리버(Scrubby) 2(BioLogic 소프트웨어), Biacore Biaevaluation 4.0.1 소프트웨어 또는 Biacore T100 평가 소프트웨어의 사용으로 다중 항원 주사 [총괄적인 피트 분석(global fit analysis)을 사용]에 동시 피팅하였다. 정제된 항체를 이동 완충액 중에서 염소 항-사람 Fc 반응 표면을 따라 포획하기 위해 희석하였다. 리간드(1 μ g/ml)로서 포획될 항체를 반응 매트릭스에 걸쳐 10 μ l/분의 유동 속도로 주입하였다. 검사 동안, 모든 측정은 오직 포획 표면에 대해 참조되었다(즉, 포획된 항-DLL4 항체 사용 안함). 연합 및 해리 속도 상수, K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) 및 K_{off} (s^{-1})를 80 μ l/분의 연속된 유동 속도하에 측정하였다. 속도 상수는 3배 희석 연속물로서 1.23 내지 900 nM 범위의 상이한 항원 농도에서 역학적 결합을 측정함으로써 유도시키고, 완충액만의 주입(이중 참조를 위해 사용됨)에 포함시켰다. 이후에, 항체와 표적 항원 사이의 반응의 평형 해리 상수 $K_D(M)$ 를 다음 식에 의해 역학적 속도 상수로부터 계산하였다: $K_D = K_{off}/K_{on}$. 결합을 시간의 함수로 기록하고 역학적 속도 상수를 계산하였다. 당해 검사에서, $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 정도로 신속한 온-속도 및 $10^{-6} s^{-1}$ 정도로 느린 오프-속도를 측정할 수 있다.

[1004] **실시예 1.2: ELISA에 의해 측정된 것으로서 가용성 DLL4 세포의 도메인에 대한 DLL4 항체의 결합.**

[1005] 방법 1 (포획 ELISA).

[1006] 96-웰 눈크-임뮤노 플레이트(Nunc-Immuno plate)(#439454)를 D-PBS(Gibco #14190) 중 사람 IgG에 대한 5 μ g/ml의 항체(Fcg 단편 특이적임, 제조원: 잭슨 임뮤노 리서치(Jackson ImmunoResearch), #109-005-098, 100 μ l/웰)로 피복하고 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. ELISA 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.05% 트윈-20)으로 3회 세척한 후 200 ml/웰의 차단 완충액(D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0.05% 트윈-20)으로 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 차단시켰다. 플레이트를 3회 세척하고 100 μ l/웰의 DLL4 항체(0.0001 내지 100 nM, 차단 완충액 중 10배 일련 희석)와 함께 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 항온처리한 후 다시 3회 세척하였다. 포획된 DLL4 항체를 함유하는 플레이트를 비오틴-표지된 사람 DLL4 세포의 도메인(차단 완충액 중 10nM, 100 μ l/웰)과 함께 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 항온처리하고, 3회 세척하고, HRP(KPL #474-3000, 차단 완충액 중 1:10,000 희석물, 100 μ l/웰)와 접합된 스트렙트아비딘과 함께 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 항온처리하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 100 μ l/웰의 ELISA 기질(1-Step Ultra TMB-ELISA, Pierce #340280)과 함께 항온처리하였다. 반응을 2분 후에 25 $^{\circ}$ C에서 100 μ l/웰의 2N H₂SO₄를 사용하여 중지시키고 흡광도를 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어(Graphpad Prism software)를 사용하여 분석하고 EC₅₀ 값을 기록하였다.

[1007] 방법 2(구리 피복된 플레이트)

[1008] 96-웰 구리-피복된 플레이트[제조원: 써모 사이언티픽(Thermo Scientific) #15143]을 세척 완충액(PBS, 0.05% 트윈-20)을 사용하여 사용 전에 3회 세척한 후 100 μ l/웰의 6xHis-태그된 재조합체 DLL4 세포의 도메인(ECD)(서열 번호 206에 기재된 "6xHis")과 함께 1 μ g/ml에서 PBS 중에서 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C로 진탕하면서 항온처리하였다. 이후에, 플레이트를 3회 세척하였다. 100 μ l/웰의 재조합체 래트/사람 키메라 또는 재조합체 사람 항-DLL4 항체를 플레이트[0.00164 내지 27 nM, ELISA 완충액 = PBST 중 4배 일련 희석, 10% Superblock(Pierce #37515)]에 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 진탕하면서 가한 후 다시 3회 세척하였다. 플레이트를 염소 항-사람 HRP(Pierce #31412)(ELISA 완충액 중 1:40,000 희석, 100 μ l/웰)와 함께 1시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 진탕하면서 항온처리한 후 3회 세척하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 100 μ l/웰 ELISA 기질(Sigma #T8665)과 함께 항온처리하였다. 반응물을 8분 후 25 $^{\circ}$ C에서 100 μ l/웰의 1N HCl을 사용하여 중지시키고 흡광도를 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석하고, EC₅₀ 값을 기록하였다.

[1009] **실시예 1.3: 유동 세포분석법(FACS)에 의해 평가된 것으로서 사람 종양 세포주의 표면에 대한 DLL4 모노클로날 항체의 결합.**

[1010] 세포-표면 DLL4를 과발현하는 안정한 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수거하고, 4회 세척하고 1% 소 혈청 알부민 및 1 mM CaCl₂(FACS 완충액)을 함유하는 인산염 완충된 염수(PBS) 중에 재현탁시켰다. 1.5×10^5 세포를 항체와 함께 각종 농도에서 FACS 완충액 중에서 60분 동안 빙상에서 항온처리하였다. 세포를 2회 세척하고 50 μ L의 R-피코에리트린-접합된 항-래트 IgG, F(ab')₂ 단편(FACS 완충액 중 1:200 희석액)[제조원: 잭슨 임뮤노리

서치(Jackson ImmunoResearch), 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브 소재, Cat.#112-116-072]를 가하였다. 빙상(4℃, 60분)에서 항온처리한 후, 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 형광성을 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson) FACSCalibur-HTS[제조원: 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson), 미국 캘리포니아주 산 호세 소재]를 사용하여 측정하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석하고 EC₅₀ 값을 DLL4 발현 세포에 결합하는 최대 DLL4 항체의 50%를 달성하는 항체의 농도로서 기록하였다.

[1011] 실시예 1.4: DLL4 항체에 의한 가용성 DLL4 세포의 도메인과의 노치-1 상호작용의 억제(경쟁 ELISA).

[1012] 96-웰 눈크-임뮤노 플레이트(Nunc-Immuno plate)(huDLL4 ELISA의 경우 #439454) 및 96-웰 코스타 플레이트(Costar plate)(muDLL4 ELISA의 경우 #9018)를 16 nM 사람 노치-1[제조원: 알앤디 시스템스(R&D Systems) #3647-TK, D-PBS 중 100 μl/웰]로 피복시키고, 밤새 4℃에서 항온처리하였다. 이후에, 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.05% 트윈-20)으로 3회 세척하고 200 μl/웰의 차단 완충액(D-PBS, 1% BSA, 1 mM CaCl₂, 0.05% 트윈-20)으로 1시간 동안 25℃에서 차단시켰다. 차단하는 동안, 비오틴 표지된 DLL4 세포의 도메인(14 nM)을 항체(30 pM-66 nM, 차단 완충액 중 3배 일련 희석물)과 함께 1시간 동안 25℃에서 진탕하면서 혼합하였다. 검사 플레이트를 차단 후 세척하고, DLL4/항체 혼합물(100 μl/웰, 25℃에서 진탕하면서 1시간)과 함께 항온처리하였다. 플레이트를 다시 세척하고 HRP(Fitzgerald #65R-S104PHRPx, 차단 완충액 중에서 1:5,000로 희석됨)와 접합된 100 μl/웰의 스트렙트아비딘을 1시간 동안 25℃에서 진탕하면서 가하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 100 μl/웰 기질(TMB Sigma #T8665)을 사용하여 전개시키고, 반응을 100 μl/웰의 1N HCl을 사용하여 중지시키고, 흡광도를 450 nm에서 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어(Graphpad Prism software)를 사용하여 분석하고 노치 1에 결합된 DLL4의 50% 감소를 달성하는 항체의 농도로 기록하였다.

[1013] 실시예 1.5: 유동 세포분석법으로 평가한 항-DLL4 모노클로날 항체에 의한 DLL4-과발현 293G 세포에 대한 가용성 노치 결합의 차단(경쟁 FACS).

[1014] 노치 차단 검사: 요약하면, 세포-표면 DLL4를 과발현하는 안정한 세포주를 조직 배양 플라스크로부터 수거하고 1% 소 혈청 알부민 및 1 mM CaCl₂ (FACS 완충액)을 함유하는 인산염 완충된 염수(PBS) 중에서 재현탁시켰다.

HEK293G-DLL4 세포를 96-웰 플레이트(v-바닥)내로 1.5x10⁵ 세포/웰로 FACS 완충액 중에 분산시켰다. 세포를 회전하여 가라앉히고 상청액을 따라버리고, 적절히 희석된 50 μL의 정제된 IgG를 각각의 웰에 가하고, 빙상에서 4℃로 60분 동안 항온처리한 후, 사람 DLL4-293G의 경우 50 μl/웰의 노치 1-비오틴을 0.2 μg/mL에서 또는 마우스 DLL4-293G(1.0 또는 0.1 μg/mL 최종)의 경우 2.0 μg/mL로 추가의 1시간 항온처리 동안 4℃에서 첨가하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 후, 50 μL의 R-피코에리트린-접합된 스트렙트아비딘(FACS 완충액 중 1:150 희석액)(제조원: 잭슨 임뮤리서치, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브 소재, 제품 번호 #016-110-084)를 가하였다. 빙상(4℃, 60분)에서 항온처리한 후, 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액 중에 재현탁시켰다. 형광성을 Becton Dickinson FACSCalibur-HTS(제조원: 벡톤 디킨슨, 미국 캘리포니아주 산 호세 소재)를 사용하여 측정하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 분석하고, IC₅₀ 값은 DLL4 발현 세포에 결합한 노치 1의 50% 감소를 달성하는 항체의 농도로 기록하였다.

[1015] 실시예 1.6: 노치 리포터 검사(Notch Reporter Assay)를 사용하는 DLL4 항체에 의한 EA.hy926 세포내 DLL4-의 존성 노치 활성화의 억제.

[1016] 96-웰 블랙 클리어-바닥 조직 배양 플레이트(96-well black clear-bottom tissue culture plate)에 밤새 노치-반응성 프로모터에 의해 구동된 루시페라제를 발현하는 7,000개 세포/웰 조작된 EA.hy926 세포를 종균배양하였다. 200 nM로부터 일련 희석된 항체를 15분 동안 완전한 길이의 DLL4를 발현하는 5,000개 HEK293G 세포/웰의 동일 용적과 혼합하였다. 293G/DLL4 세포를 EA.hy926 노치 리포터 세포와 함께 24시간 동안 시험 항체의 존재 하에 동시-배양하였다. 루시페라제 활성을 프로메가 기질(Promega's substrate)(Promega # E2940)로 분석하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 분석하고, IC₅₀ 값을 DLL4-유도된 노치 활성화의 50% 감소를 달성하는 항체의 농도로 기록하였다.

[1017] 실시예 1.7: 물리화학적 특성 특정화를 위한 분석 방법 및 기술.

[1018] PEG 침전 방법.

[1019] 용적 배제의 원리에 따른 고체 단백질의 상 분리를 유도하기 위한 PEG의 사용은 단백질의 가용성을 평가하기 위한 실현가능한 접근법을 나타낸다. PEG는 주위 온도(단백질의 3차 구조에 영향을 미치지 않음) 및 조절이 필요

하지 않은 4℃ 내지 30℃ 온도 범위 이내에서 단백질의 최소 변성을 포함하는, 다른 침전물보다 몇가지 장점을 가지는데, 즉, 침전 연구는 실험실 벤치에서 주위 온도로 수행할 수 있다.

[1020] 일반적으로, PEG에 의한 단백질의 침전은 용적 배제 효과를 기준으로 설명된다. 당해 이론에 따라서, 단백질은 PEG 직체에 의해 점유된 용매의 영역으로부터 입체적으로 배제된다. 그 결과, 단백질이 농축되고 궁극적으로 이들의 가용성이 초과되는 경우 침전된다. 열역학적 측면에서, 입체적 배제는, 이것이 순수한 고체 상태의 것을 초과할 때까지 단백질의 화학적 전위에 있어서의 증가를 초래하여 단백질 침전을 생성한다. 이는, PEG와 단백질 사이의 상호작용의 큰 불리한 유리 에너지로 인하여 주로 발생하여 입체적 배제 효과로 인해 단백질의 우선적인 수화를 감소시킨다. 수용액에서, 우선적인 수화는 단백질의 천연 구조를 유지하는 것을 돕는다. 일반적으로, 용적 배제는 PEG의 분자량이 증가할수록 보다 효과적이 됨이 밝혀졌는데, 즉, PEG 분자량이 증가할 수록 단백질을 침전시키는데 PEG가 더 적게 요구된다.

[1021] 3000의 PEG 분자량을 당해 특허에 포함된 항체의 가용성을 추정하기 위해 선택하였다. 50% PEG 용액은 PEG를 탈이온수 중에서 1g의 PEG 대 1mL의 물의 비로 용해시켜 제조하였다. 이후에, PEG 용액을 초기에 농도가 0.5 mg/ml 이하이고 용적이 0.5 mL인 항체의 용액에 가하였다. PEG 용액을 연속하여 가하고 무색의 첫번째 예가 지속될 때까지 혼합하였다. 이러한 침전을 유발하는데 요구되는 PEG 3000의 퍼센트를 (50) x (첨가된 PEG 3000 용액의 용적)/(PEG 첨가 전 항체 용액의 초기 용적)으로 계산하였다.

[1022] 침전에 요구된 PEG 3000의 퍼센트를 공지된 수용성(수 용해도)을 갖는 단백질의 침전에 요구된 퍼센트와 비교하였다. 예를 들면, 아달리무마브의 수용성은 200 mg/mL를 초과한다. 결과적으로, 목적한 단백질을 침전시키는데 요구된 PEG 3000의 퍼센트는 아달리무마브를 침전시키는데 요구된 퍼센트와 유사하며, 이후, 당해 단백질의 예측된 가용성(용해도)은 아달리무마브의 가용성과 유사할 것이다.

[1023] 실제 가용성 방법

[1024] 실제 가용성은, 단백질이 용액으로부터 침전되는 것이 관찰될 때까지 또는 단백질이 여과기 장치내에서 단백질이 농축될 수 있는 최소 용적이 도달될 때까지 용액 중 단백질을 농축시키기 위한 아미콘 원심분리 여과기를 사용하여 측정하였다. 단백질을 최소 용적까지 농축시키기 위해, 15mL 아미콘 원심분리 여과기는 약 50 μ L의 최소 용적을 갖는 반면 4mL 아미콘 원심분리 여과기는 약 15 μ L의 최소 용적을 갖는다.

[1025] 우선, 단백질을 특정 제형(들)로 투석시켰다. 당해 연구를 위해, 항체량은 10mg 이하이었다. 이후에, 단백질 용액을 아미콘 원심분리 여과기 보유 챔버내로 삽입하였다. 챔버를, 원심분리력에 적용시키는 경우 10 내지 30 킬로달톤 미만의 분자가 통과하도록 하는 공극을 갖는 니트로셀룰로스 막과 일치시켰다. 전형적으로 140킬로달톤 초과인 항체를 보유시키는 동안 물, 완충액 분자, 소 부형제, 및 염을 통과시켰다. 이후에, 원심분리 여과기를 제조업자의 명세에 따라서 단백질이 용액으로부터 침전되는 것이 관찰될 때까지 또는 단백질이 여과기 장치내에서 농축될 수 있는 최소 용적이 도달할 때까지 원심분리하였다.

[1026] 원심분리 후, 단백질 용액을 농축물 챔버로부터 제거하고, 농도를 자외선 흡광도로 측정하였다. 이후에, 용액을 25℃ 및 5℃에서 1 내지 2일 동안 유지시키고 침전 신호에 대해 모니터링하였다.

[1027] 니어(Near) UV-CD 기술.

[1028] 니어 UV-CD 분광법은 단백질의 3차 구조에 대한 중요한 정보를 제공하며 이와 관련하여 가장 많이 사용된 기술 중 하나였다. CD는 평면 편광화된 방사선 좌측 및 우측 원편광 성분의 차등적 흡수를 말한다. 단백질의 경우, UVCD 영역(250 내지 320 nm) 근처에서 발색단은 방향족 아미노산(즉, 트립토판, 타이로신, 및 페닐알라닌) 및 이황화물 결합이며, 발색단이 비대칭(매복된) 환경 중에 존재하는 경우 CD 효과가 발생한다. 250 내지 270 nm 범위에서의 시그널은 페닐알라닌 잔기에 기여할 수 있으며, 270 내지 290 nm의 시그널을 타이로신에 기여할 수 있고, 280 내지 300 nm의 시그널은 트립토판에 기여할 수 있다. 이황화물 결합은 니어-UV 스펙트럼 전체에서 광범위한 약한 시그널을 생성한다. 니어-UV CD 스펙트럼은 제형 상태에 있어 단백질-단백질 상호작용 및/또는 변화에 기인한 것들과 같은 3차 구조내 작은 변화에 대해 민감성일 수 있다.

[1029] 방향족 아미노산의 CD 스펙트럼에 영향을 미칠 수 있는 다수의 다른 요인들이 존재한다. 이들 중에는 (1) 단백질의 강직성, (2) 수소 결합의 특성, 및 (3) 각종 방향족 아미노산 사이의 상호작용이 있다. 또한, 다수의 이러한 아미노산을 가진 단백질은 양성 및 음성 밴드의 무효화로 인하여 보다 작은 CD 밴드를 가질 수 있다.

[1030] 요약하면, 단백질은 1 mg/ml에서 목적하는 제형(들)로 투석되며 자스코(Jasco) 800 CD 분광계를 사용하여 250 내지 320 nm 또는 240 내지 320 nm로부터 주사(scanning)하였다. 단백질이 없는 상응하는 제형을 또한 주사하

고, 관독물을 단백질 용액의 주사의 값으로부터 감하였다. 니어 UV-CD 스펙트럼은 몰 타원율(molar ellipticity) 대 250 또는 240 내지 320 nm의 파장의 플롯이었다.

[1031] 일반적으로, 항체의 경우, 반-S곡선 프로파일(semi-sigmoidal profile)을 갖는 니어 UV-CD 스펙트럼은 우수한 3 차 구조 폴딩을 나타내는 반면, 편평하고 특징이 거의 없는 프로파일은 비폴딩의 것보다 큰 경향성을 나타낸다. 압착 폴딩은 우수한 안전성과 관련된 반면 불량한 폴딩은 바람직하지 않은 응집체의 형성을 생성하는 단백질 분자 중 소수성 상호작용을 초래할 수 있다.

[1032] DSC 기술

[1033] 항체의 열 안정성은 차등 주사 열량계(DSC) 장치를 사용하여 평가하였다. 사용된 DSC 장치는 모세관 셀((Capillary Cell)[Microcal, 제조원: 지이 헬스케어 리미티드(GE Healthcare Ltd.)/마이크로칼(Microcal), 영국 버킹엄셔 소재]이 장착된 자동화된 VP-DSC 장비였다. 분자의 비폴딩은 1℃/분의 주사 속도를 25℃ 내지 95℃ 온도 범위에서 시료에 대해 1 mg/mL로 적용시켜 연구하였다. 적용된 추가의 측정 매개변수는 16초의 핏팅 시간, 10분의 주사-전 대기 시간이었으며, 측정은 비-피드백 양식(none-feedback mode)으로 수행하였다. 개별 측정당, 420 µL의 시료/블랭크를 하기 제공된 플레이트 충전 계획을 사용하여 DSC 측정 시료 홀더 내로 충전시켰다. 수득된 온도 기록도를 비 2 상 모델(non two state model)에 핏팅하여 중점 온도 및 차등적인 이행의 엔탈피를 수득하였다.

[1034] 성공적인 생물학 개발 후보물을 위한 추가의 요건은, 단백질이 이의 천연 상태 및 구조로 유지되는 것이다. 수용액 중 단백질은 천연(폴딩된) 입체구조 및 이의 변성(폴딩되지 않은) 입체구조 사이에서 평형이다. 천연 상태의 안전성은 시스템의 깁스 자유 에너지((Gibbs free energy: DG) 및, 엔탈피(DH) 변화와 엔트로피(ΔS) 변화 사이의 열역학적 관계의 크기에 기초한다. 양성 DG는, 천연 상태가 변성된 상태보다 더 안정함을 나타내며, DG가 보다 더 양성일 수록 안정성이 보다 더 크다. 폴딩되지 않은 단백질의 경우, 안정화력을 파괴시키기 위해 요구된다. 구조적 엔트로피는 안정화력을 증가하여 단백질이, 엔트로피가 우세한 온도에서 폴딩되지 않도록 한다. DSC는 열 변성으로 인한 단백질 비폴딩의 DH를 측정한다. 일반적으로, 이행 중점(Tm)이 높을 수록, 보다 낮은 온도에서 단백질이 보다 더 안정한 것으로 기술될 수 있다. 동일한 실험 동안, DSC는 또한 단백질 변성에 대한 열 능력(DCp)에 있어서의 변화를 측정한다. 단백질 비폴딩과 관련된 열 능력 변화는 주로 천연 상태에서 매복된 측쇄의 수화에 있어서의 변화에 기인한다. DSC는 단백질 및 다른 생물학적 거대분자에 대한 액체 제형 안전성의 가치있는 예측인자임이 밝혀졌다(참조: Remmele, R.L. Jr., Gombotz, W.R., BioPharm 13, 36-46, 2000, and; Remmele, R.L. Jr., Nightlinger, N.S., Srinivasen, S., Gombotz, W.R., Pharm. Res. 15, 200-208, 1998).

[1035] SEC 기술.

[1036] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 크기를 기준으로 단백질을 분리하였다. 단백질은 수성 이동상 및 컬럼내 패킹된 다공성 정지상 수지내에서 이동시켰다. 컬럼내 보유 시간은 단백질의 수력학적 크기 및 패킹된 수지층내 공극의 크기의 함수이다. 보다 작은 분자는 수지내 보다 작은 공극내로 침투할 수 있으며 보다 큰 분자보다 더 오래 유지된다. 컬럼으로부터 용출시, 단백질은 UV 흡광도에 의해 검출된다. SEC 방법은 TSK 겔 가드(gel guard)[제조원: 도쇼 바이오사이언시스(TOSOH Biosciences), 미국 펜실베이니아주 몽고메리빌 소재, 제품 번호 08543] 및 TSK 겔 G3000SWxL(제조원: 도쇼 바이오사이언시스, 미국 펜실베이니아주 몽고메리빌 소재, 제품 번호 08541)을 사용하였다. 이동상은 100 mM Na₂HPO₄, 200 mM Na₂SO₄, pH 6.8이었다. 유동 속도는 0.25 mL/분이었다. 주입 용적은 20 µL의 1 mg/mL 시료였다. 컬럼 온도는 실온이었다. 자동 시료 채취기 온도는 2 내지 8℃이었다. 총 이동 시간은 55분이었다. 검출은, 밴드 폭이 밴드 폭이 100nm인 360nm에서의 참조 파장을 사용하여, 8nm로 설정된 밴드 너비를 갖는, 214nm 파장에서 UV 흡광도를 기준으로 하였다.

[1037] 동결-해동법

[1038] 목적하는 제형(들) 중에서 1 mg/ml에서 항체 용액을 -80℃로 적어도 4시간 동안 동결시킨 후 수욕(water bath) 중에서 30℃에서 해동시켰다. 이후에, 용액을 -80℃에서 재동결시켰다. 이를 5회 주기 동안 반복하였다. 특정의 동결-해동 주기 후, 예를 들면, 2 및 4번째 후, 용액 중 일부를 재동결 전에 SEC에 의한 분석을 위해 회수하였다. 동결-해동 안정성 시험은 낮은 단백질 농도에서 수행하여 변성 빙-수 계면에 대한 단백질 분자의 보다 큰 노출에 기인한 "불량한-경우 시나리오(worse-case scenario)"를 수득하였다. 보다 높은 농도에서, 다른 단백질 분자와 상호작용하는 대신, 빙-수 계면에 접촉하는 단백질은 비례적으로 적다.

[1039] **가속화된 안정성 방법**

[1040] 목적하는 제형(들)에서 1 mg/ml에서 항체 용액을 멸균 조건 하에서 0.22 μ m PVDF 여과기를 통과시키고 40℃ 및/또는 50℃에서 적어도 21일 동안 항온처리하였다. 7일 및 21일째에, 분취량을 멸균 조건 하에서 회수하고 SEC에 의한 분석에 적용시켰다. 이후에, 용액을 다시 항온처리하였다.

[1041] **실시예 2: 래트 하이브리도마 기술에 의한 래트 항-DLL4 모노클로날 항체의 생성**

[1042] 래트를 당해 분야에 공지된 방법[예를 들면, E Harlow, D. Lane, *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998)]에 따라 면역화하였다. 완전한 길이의 사람 DLL4 및 또한 재조합체 마우스 DLL4-ECD(DLL4 세포외 도메인) 단백질을 발현하는 사람 세포주를 면역원으로서 사용하였다. 사람 DLL4 또는 마우스 DLL4를 발현하는 마우스 세포주를 항-혈청 역가를 측정하고 항원-특이적인 항체를 분비하는 하이브리도마를 스크리닝하는데 사용하였다. 면역화 용량은 일차 및 부스트(boost) 면역화 둘 다에 대해 1 x 10⁶ 개 세포/래트/주사를 함유하였다. 마우스 DLL4에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해, 래트를 유액 형태의 재조합체 마우스 DLL4-ECD를 사용하여 불완전 프로인트 보조제(incomplete Freud's adjuvant)[제조원: 시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스 소재]와 함께 추가로 부스팅시켰다. 요약하면, 보조제-항원 혼합물을 우선 바이알 중에서 보조제를 와동(vortex)을 사용하여 온화하게 혼합하여 제조하였다. 바람직한 양의 보조제를 바이알로부터 제거하고 오토클레이빙된 1.5mL의 미세원심분리 튜브내로 두었다. 항원을 PBS 또는 염수 중에서 0.5 내지 1.0 mg/ml 범위의 농도로 제조하였다. 계산된 양의 항원을 이후에 보조제가 들어있는 미세원심분리 튜브에 가하고, 용액을 2분 동안 온화하게 와동시켜 혼합함으로써 유-중-수(water-in-oil) 유액을 생성시켰다. 이후에, 보조제-항원 용액을 동물 주사용 적절한 주사기내로 넣었다. 총 50 μ g의 항원을 50 내지 100 μ l의 용적으로 주사하였다. 각각의 동물을 면역화시킨 후 역가에 의존하여 2 내지 3회 부스팅하였다. 역가가 우수한 동물에게 융합 전에 사람 DLL4를 발현하는 세포주를 사용하여 최종 피하 부스트를 제공하였다.

[1043] **하이브리도마 융합 및 스크리닝**

[1044] 무린 흑색종 세포주(SP2/0-Ag14, ATCC CRL-1581)의 세포를 배양하여 융합 직전에 로그 상 상태(log phase stage)에 도달시켰다. 면역화시킨 래트 비장 세포를 멸균적으로 제조하여 당해 분야에 공지된 방법[예를 들면, E Harlow, D. Lane, *Antibody: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998); Kohler G, and Milstein C., "Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256: 495-497 (1975)]에 따라 흑색종 세포와 융합시켰다. 융합된 "하이브리드 세포"를 후속적으로 96-웰 플레이트 중에서 DMEM/20%FCS/HAT 매질 내에 분산시켰다. 생존하는 하이브리도마 콜로니는 융합 후 7 내지 10일째에 현미경 하에 관찰되었다. 2주 후에, 각각의 웰로부터의 상청액을 재조합체 사람 DLL4 또는 마우스 DLL4를 발현하는 마우스 세포주를 사용하여 세포-기초 결합 스크리닝에 적용시켰다. 요약하면, 사람 또는 마우스 DLL4를 발현하는 마우스 세포주의 혼합물(1:1 비)을 96-웰(환저) 플레이트내에 1 x 10⁶ 개 세포/웰로 분산시키고 하이브리도마 상청액(50 μ l)과 함께 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후에, 세포를 FACS 완충액(PBS+2% BSA)으로 3회 세척하고, HRP-염소 항-래트 Ig-PE(피코에리트린)를 FACS 기계 중에서 검출을 위해 사용하였다. 하이브리도마를 다음 과정에 따라 ELISA 양식을 사용하여 스크리닝하였다. ELISA 플레이트를 50 μ l의 사람 DLL4 또는 마우스 DLL4 (PBS 중 2.0 μ g/ml)로 밤새 4℃에서 피복하였다. 플레이트를 250 μ l의 PBS/0.5%트윈₂₀으로 3회 세척하고 200 μ l의 차단 완충액(0.5% 트윈₂₀이 들어있는 PBS 중 2% BSA)으로 차단시켰다. 희석된 혈청 또는 하이브리도마 상청액(100 μ l)을 각각의 웰에 가하고, 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후에, 플레이트를 PBS/0.5% 트윈₂₀으로 3회 세척하고, HRP-염소 항-래트-IgG를 검출을 위해 사용하고, 결합 OD를 450 nm에서 관찰하였다. 사람 DLL4 또는 마우스 DLL4 또는 이들 둘 다에 결합하는 항체를 분비하는 양성 하이브리도마를 이후에 선택하고 24-웰 플레이트로 이전시키고 제한 희석에 의해 서브클로닝(subcloning)하여 세포주의 클론 형성능을 보증하였다. 각각의 모노클로날 항체의 이소형을 자이메드 마우스(Zymed's Mouse) MonoAb-ID 키트(Kit)를 사용하여 측정하였다. 특이적인 결합 활성이 높은 항체를 생산하는 하이브리도마 클론을 서브클로닝하고 정제하였으며(표 5), 항체의 친화성(Biacore) 및 효능(노치 차단 FACS 및 리포터 검사)을 다음과 같이 특성화하였다.

표 5

랫 하이브리도마 기술을 사용하여 생성된 항-DLL4 항체의 목록

하이브리도마	이소형	FACS 결합	
		사람 DLL4	마우스 DLL4
MC10-37D10.1C2	IgG2a/k	+	+
MC10-40B10.3C3	IgG2a/k	+	+
MC10-32C7.5A4	IgG2a/k	+	+
MC10-38H12.2G8	IgG2a/k	+	-
MC13-14A11.3A4	IgG2a/K	+	+
MC13-14G1.1B4	IgG2a/K	+	-
MC13-1A11.2E1	IgG1/K	+	+
MC13-13E4.4A3	IgG1/K	+	+
MC13-15D6.1G7	IgG2a/K	+	+

"+"는 세포에 결합된 항체를 나타낸다; "-"는 세포에 결합되지 않은 항체를

나타낸다.

[1045]

[1046] 실시예 3. 항-DLL4 랫트 모노클로날 항체의 시험관내 특성화.

[1047] 이들 랫트 모노클로날 항체(mAb)의 항원 결합 친화성을 실시예 1.1에 기술된 바와 같은 BIACORE 기술로 측정하고, 하기 표 6 및 표 7에 나타낸다. 이들의 시험관내 활성을 또한 실시예 1에 기술된 다른 방법을 사용하여 실험하고, 표 8에 요약한다. 37D10 및 40B10을 측정한 추가의 특성화는 랫트 mAb와 동일하였다.

표 6

사람 및 사이노몰거스 원숭이 DLL4에 결합하는 항-DLL4 랫트 하이브리도마 항체의 Biacore 역학

클론	Biacore 역학					
	huDLL4 ECD			cynoDLL4 ECD		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
38H12	$4.0 \times 10^{+5}$	1.1×10^{-4}	0.3	$2.6 \times 10^{+5}$	9.8×10^{-5}	0.4
1A11	$1.9 \times 10^{+5}$	1.1×10^{-3}	5.8	$1.1 \times 10^{+5}$	9.3×10^{-4}	8.1
37D10 = 40B10	$1.4 \times 10^{+5}$	7.0×10^{-2}	484	$4.0 \times 10^{+4}$	Too fast*	<617
32C7	$2.8 \times 10^{+5}$	7.0×10^{-6}	0.03	$2.2 \times 10^{+5}$	6.3×10^{-6}	0.03
15D6	$1.1 \times 10^{+5}$	1.0×10^{-3}	9.2	$5.6 \times 10^{+4}$	8.3×10^{-4}	14.9
14A11	$1.2 \times 10^{+5}$	1.2×10^{-3}	10.3	$1.1 \times 10^{+5}$	1.2×10^{-3}	11.6
14G1	$5.4 \times 10^{+4}$	3.9×10^{-4}	7.2	$3.9 \times 10^{+4}$	4.1×10^{-4}	10.5
13E4	$2.3 \times 10^{+5}$	3.9×10^{-4}	1.7	$1.5 \times 10^{+5}$	4.2×10^{-4}	2.8

hu = 사람; cyno = 사이노몰거스 원숭이; * = 측정 범위에서 벗어남

[1048]

표 7

뮤린 및 래트 DLL4에 결합하는 항-DLL4 래트 하이브리도마 항체의 Biacore 역학

클론	Biacore 역학					
	muDLL4 ECD			래트 DLL4 ECD		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
38H12	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
1A11	1.3×10^{15}	2.9×10^{-3}	23	N/B	N/B	N/B
37D10 = 40B10	1.0×10^{15}	1.35×10^{-2}	135	N/D	N/D	N/D
32C7	4.8×10^{14}	4.1×10^{-3}	88	N/D	N/D	N/D
15D6	7.4×10^{14}	5.1×10^{-5}	0.7	N/B	N/B	N/B
14A11	7.0×10^{14}	9.0×10^{-5}	1.3	N/B	N/B	N/B
14G1	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B	N/B
13E4	1.8×10^{15}	1.9×10^{-4}	1.1	N/B	N/B	N/B

N/B = 유의적인 결합 없음; N/D = 측정되지 않음, mu = 마우스

[1049]

표 8

래트 하이브리도마 유도된 항-DLL4 항체의 시험관내 특성화

래트 mAb	직접적인 결합 검사				기능적 차단 검사				
	결합 ELISA (EC ₅₀ , nM)		FACS (EC ₅₀ , nM)		경쟁 ELISA (IC ₅₀ , nM)		경쟁 FACS (IC ₅₀ , nM)		노치 활성화 억제 (IC ₅₀ , nM)
	DLL4 ECD		DLL4 세포		DLL4 ECD/ huNotch-1		huNotch-1/ DLL4 세포		huDLL4 세포 / 노치 리포터 세포
	hu	mu	hu	mu	hu	mu	hu	mu	
1A11	0.06	0.11	34.8	0.8	0.78	0.79	8.4	0.8	2.9
38H12	0.06	-	1.2	-	3.63	-	1.7	-	0.5
37D10 = 40B10	0.12	0.14	2.3	0.7	5.39	3.36	5.5	3.8	-
32C7	0.08	0.15	3.1	0.8	-	-	-	-	효능제
14G1	N/D	N/D	8.6	>50	N/D	N/D	4.2	-	6.1
14A11	N/D	N/D	>50	2.1	-	19.8	205	1.6	2.7
15D6	N/D	N/D	15	1.6	-	-	25	1.5	3.2
13E4	N/D	N/D	26	1.3	-	-	5.2	>200	-

"-" = 활성 없음 또는 사용된 검사의 검출 한계 이하;

"N/D" = 측정되지 않음;

hu = 사람; cyno = 사이노몰거스 원숭이; mu = 마우스.

[1050]

[1051] 실시예 4. DNA 클로닝 및 서열분석에 의한 항-DLL4 래트 모노클로날 항체의 가변 영역 단백질 서열의 추론

[1052] 전체 RNA를 하이브리도마 세포 펠렛으로부터 RNeasy 미니 키트[제조사: 퀴아젠(Qiagen), 제품 번호 74104]를 사용하여 하기 프로토콜로 추출하였다. 600 µl의 완충액 RLT를 가하여 상하로 수회 피펫팅하여 세포를 파괴하였다. 세포 용해물을 RNase-불포함 주사기에 장착된 20-게이지 침을 통해 10회 통과시켜 균질화하였다. 1개 용

적의 70% 에탄올을 균질화된 분해물에 가하고 피펫팅하여 잘 혼합하였다. 경우에 따라 700 μ l 이하의 시료를 RNeasy 회전 컬럼에 가하고 15초 동안 10,000 rpm에서 회전시켜, 유동물을 완전 제거하였다. 700 μ l의 완충액 RW1을 컬럼에 가하고 15초 동안 10,000 rpm에서 회전시켜, 유동물을 완전히 제거하였다. 500 μ l의 완충액 RPE를 가하여 컬럼 막을 세척하고 15초 동안 10,000 rpm에서 회전시키고, 유동물을 완전 제거하였다. 동일한 단계를 1회 이상 반복하지만, 컬럼은 2분 동안 원심분리하였다. 이후에, 시료를 1분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하여 완충액 RPE의 모든 캐리오버(carryover)를 제거하였다. RNA를 30 μ l의 RNase-불포함 수를 사용하여 1분 동안 10,000 rpm에서 원심분리함으로써 용출시켰다. 후속적으로, 2 μ g의 총 RNA를 사용하여 단일쇄 cDNA를 RT-PCR용 슈퍼스크립트 제1-가닥 합성 시스템(SuperScript First-Strand Synthesis System)[제조원: 인비트로젠(Invitrogen), 제품 번호 11904-018]을 사용하여 다음 프로토콜에 따라 합성하였다: 2 μ g의 RNA + 2 μ l의 dNTP + 2 μ l의 올리고(dT) + DEPC-H₂O(20 ml 까지)를 65°C에서 5분 동안 항온처리한 후, 빙상에 적어도 1분 동안 이전시켰다. 이후에, 시료를 다음 혼합물: 4 μ l의 10X RT 완충액 + 8 μ l의 25 mM MgCl₂ + 4 μ l의 0.1 M DTT + 2 μ l의 RNase OUT에 가하고 42°C에서 2분 동안 항온처리하였다. 이후에, 2 μ l의 슈퍼스크립트(SuperScript) II RT를 시료에 가하고 42°C에서 50분 동안 항온처리하였다. 이후에, 시료를 70°C에서 15분 동안 항온처리하고 빙상에서 급냉시켰다. 이후에, 2 μ l의 RNase H를 가하고 시료를 37°C에서 20분 동안 항온처리하였다. 이후에, cDNA를 항체의 가변 영역의 PCR 증폭용 주형으로서 사용하였다. PCR을 제1-가닥 cDNA, 마우스 Ig-프라이머 세트(Primer Set)[제조원: 노바젠(Novagen), 제품 번호 69831-3] 및 백금 슈퍼 믹스 하이 피델티(Platinum Super Mix High Fidelity)(제조원: 인비트로젠, 제품 번호 12532-016)로부터의 프라이머를 사용하여 수행하였다. 증쇄 가변 영역을 증폭시키기 위해, PCR 시료를 다음과 같이 조립하였다: 22.5 μ l의 PCR 슈퍼 믹스(Super Mix) + 0.25 μ l 역 프라이머 MuIgG V_H3'-2 + 1 μ l의 cDNA + 1.25 μ l의 하나의 전방 프라이머(VH-A, VH-B) 또는 0.5 μ l의 전방 프라이머(VH-C, VH-D, VH-E, VH-F) 중 하나. 경쇄 가변 영역을 증폭시키기 위해 PCR 시료를 다음과 같이 조립하였다: 22.5 μ l의 PCR 슈퍼 믹스 + 0.25 μ l의 역 프라이머 MuIgKV_L-3'-1 + 1 μ l의 cDNA + 1.25 μ l의 전방 프라이머(VL-A, VL-B) 중 하나 또는 0.5 μ l의 전방 프라이머(VL-C, VL-D, VL-E, VL-F, VL-G) 중 하나.

- [1053] 프라이머 VH-A, VH-B, VL-A 및 VL-B를 가진 시료의 경우, 다음 PCR 주기를 사용하였다(40 내지 45회 주기, 단계 2 내지 4):
- [1054] 1-94°C에서 2분 동안 변성.
- [1055] 2-94°C에서 30초 동안 변성.
- [1056] 3-50°C에서 30초 동안 어닐링.
- [1057] 4- 68°C에서 1분 동안 연장.
- [1058] 5-68°C에서 5분 동안 최종 연장.
- [1059] 6-4°C에서 영구적으로 냉각.
- [1060] 프라이머 VH-C 내지 VH-F, 및 VL-C 내지 VL-G를 사용한 시료의 경우, 다음 PCR 주기를 사용하였다(40 내지 45회 주기, 단계 2 내지 4):
- [1061] 1-94°C에서 2분 동안 변성.
- [1062] 2-94°C에서 30초 동안 변성.
- [1063] 3-60°C에서 30초 동안 어닐링.
- [1064] 4-68°C에서 1분 동안 연장.
- [1065] 5-68°C에서 5분 동안 최종 연장.
- [1066] 6-4°C에서 영구적으로 냉각.
- [1067] PCR 생성물을 1.2% 아가로스 겔 상에 이동시키고, 예측된 크기(400 내지 500 bp)에서 이주하는 밴드를 DNA 추출을 위해 잘라내었다. DNA를 퀴아퀵 겔 추출 키트(QIAquick Gel Extraction Kit)(제조원: 퀴아젠, 제품 번호 28704)를 사용하여 다음 프로토콜에 따라 정제하였다: 겔 조각을 칭량하였다. 3 용적의 완충액 QG 내지 1 용적의 겔을 각각의 겔 조각에 가하였다. 시료를 50°C에서 10분 동안 겔 조각이 완전히 용해될 때까지 매 2 내지 3

분마다 혼합하면서, 항온처리하였다. 이후에, 1개의 겔 용적의 이소프로판올을 각각의 시료에 가하고 혼합하였다. 이후에, 시료를 쿼릭 컬럼에 적용시키고 1분 동안 13000 rpm에서 원심분리하였다. 세척하기 위해, 750 μ l의 완충액 PE를 시료에 가하고 1분 동안 13000 rpm에서 회전시켰다. 이후에, 컬럼을 추가로 1분 동안 13,000 rpm에서 원심분리하여 잔류성 에탄올을 제거하였다. DNA를 30 μ l의 H₂O를 각각의 컬럼에 가하고 1분 동안 13,000 rpm에서 회전시켜 용출시켰다. 이후에, 정제된 PCR 생성물을 서열분석하여 가변 영역 서열을 동정하였다(참조: 하기 표 9).

표 9

래트 항-DLL4 모노클로날 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
157	VH 38H12		EVQLVESGGGLVQPGRSLLKLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPTKGLQWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDNASTLYLQMDLSRSED TATYHCAALNWELGIDYWGQGVMTVSS
	VH 38H12 CDR-H1	서열 번호 157의 31 내지 35번 잔기	NYGMY
	VH 38H12 CDR-H2	서열 번호 157의 50 내지 66번 잔기	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH 38H12 CDR-H3	서열 번호 157의 99 내지 107번 잔기	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
158	VL 38H12		DIQMTQSPASLSASLGFTISIECRASEDIY SNLAWYQKKGSKSPQLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQ GSKFPLTFGSGTKLEIKR
	VL 38H12 CDR-L1	서열 번호 158의 24 내지 34번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL 38H12 CDR-L2	서열 번호 158의 50 내지 56번 잔기	AANRLQD
	VL 38H12 CDR-L3	서열 번호 158의 89 내지 97번 잔기	LQSGKFPLT
			123456789012345678901234567890
159	VH 1A11		EVQLVESGGGLVQPGRSMLKLSCAASGFTFR NFPMAWVRQAPTRGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNASTLYLQVNSLRSED TATYCSRGYNSFPAYWGQGLTVSS
	VH 1A11 CDR-H1	서열 번호 159의 31 내지 35번 잔기	NFPMA

[1068]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VL 37D10 CDR-L3	서열 번호 162 의 89 내지 97 번 잔기	YQYNGGPFT
			123456789012345678901234567890
163	VH 32C7		EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFPFS SVWMTWIRQAPGKGLEWIATITNSGASTYY SASVKGRFTISRDNVKSTLYLQMTSLGSED TATYYCTRVGTSFDYWGQGMVTSS
	VH 32C7 CDR-H1	서열 번호 163 의 31 내지 35 번 잔기	SVWMT
	VH 32C7 CDR-H2	서열 번호 163 의 50 내지 66 번 잔기	TTNSGASTYYSASVKG
	VH 32C7 CDR-H3	서열 번호 163 의 99 내지 105 번 잔기	VGTSFDY
			123456789012345678901234567890
164	VL 32C7		DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRASDDIY NGLAWFQQKPGKSPQLLIYDANTLHTGVPS RFGSGSGGTQFSLKINSLSQSEDVASYFCQQ FYDYPPTYTFGAGTKLELKR
	VL 32C7 CDR-L1	서열 번호 164 의 24 내지 34 번 잔기	RASDDIYNGLA
	VL 32C7 CDR-L2	서열 번호 164 의 50 내지 56 번 잔기	DANTLHT
	VL 32C7 CDR-L3	서열 번호 164 의 89 내지 98 번 잔기	QQFYDYPPTY
			123456789012345678901234567890
165	VH 14G1		EVQLQQSGAELAKPGSSVKISKASGYTFT NYDISWIKQTNGQGLELYGINTGSGGIYS NEKFKGKATLTVDKSSNTAFMQLSSLTPED TAVYYCVREGNNFDHWGQGVKVTSS
	VH 14G1 CDR-H1	서열 번호 165 의 31 내지 35 번 잔기	NYDIS
	VH 14G1 CDR-H2	서열 번호 165 의 50 내지 66 번 잔기	YINTGSGGIYSNEKFKG

[1069]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VH 14G1 CDR-H3	서열 번호 165 의 99 내지 105 번 잔기	EGNNFDH
			123456789012345678901234567890
166	VL 14G1		DTVMTQSPASMSTSVGERVTVNC KASQSVG TIV AWFQQKPGQSPKRLI YLATYRHT GVDP RFIGSGFGRDFTLTISNVEADLAVYY CLQ YGSRPFT FGAGTKLEIKR
	VL 14G1 CDR-L1	서열 번호 166 의 24 내지 34 번 잔기	KASQSVGTIVA
	VL 14G1 CDR-L2	서열 번호 166 의 50 내지 56 번 잔기	LATYRHT
	VL 14G1 CDR-L3	서열 번호 166 의 89 내지 97 번 잔기	LQYGSRPFT
			123456789012345678901234567890
167	VH 14A11		EVQLQQSGPELAKPGSSVKISCKASGYTFT NSYISWIKQTTGGLEYVGY INTGSGGADY NEKFKG KATLTVDKSSRTAFMQLSSLTPGD SAVYYCAKS ILLGSTCYFDY WGQGVLVTVS S
	VH 14A11 CDR-H1	서열 번호 167 의 31 내지 35 번 잔기	NSYIS
	VH 14A11 CDR-H2	서열 번호 167 의 50 내지 66 번 잔기	YINTGSGGADY NEKFKG
	VH 14A11 CDR-H3	서열 번호 167 의 99 내지 110 번 잔기	SILLGSTCYFDY
			123456789012345678901234567890
168	VL 14A11		NTVLTQSPALAVSLGQRVTIS KASRSVSS PMYSYIY WYQQKPGQP KLLIYRASTLASG VPA RFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIATYF CQQSWSDPFT FGSGTKLEIKR
	VL 14A11 CDR-L1	서열 번호 168 의 23 내지 37 번 잔기	KASRSVSS PMYSYIY
	VL 14A11 CDR-L2	서열 번호 168 의 53 내지 59 번 잔기	RASTLAS

[1070]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	VL 14A11 CDR-L3	서열 번호 168 의 92 내지 100 번 잔기	QQSWSDPFT
			123456789012345678901234567890
169	VH 15D6		EVQLQQSGPELAKPGSSVKISCKASGYTFT SSYISWIKQTTGQGLEIGYINTGSGGTDY NEKFKDKATLTVDKSSRTVFMQLSSLTPGD SAVYYCAKSILLGSTYYLDYWGQGVMTVVS S
	VH 15D6 CDR-H1	서열 번호 169 의 31 내지 35 번 잔기	SSYIS
	VH 15D6 CDR-H2	서열 번호 169 의 50 내지 66 번 잔기	YINTGSGGTDYNEKFKD
	VH 15D6 CDR-H3	서열 번호 169 의 99 내지 110 번 잔기	SILLGSTYYLDY
			123456789012345678901234567890
170	VL 15D6		DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCKASRSLSS PMYSYIYWYQQKLGQQPRLLIYRASTLASG VPARFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIATYF CQSWSDPFTFGSGTKLEIKR
	VL 15D6 CDR-L1	서열 번호 170 의 23 내지 37 번 잔기	KASRSLSSPMYSYIY
	VL 15D6 CDR-L2	서열 번호 170 의 53 내지 59 번 잔기	RASTLAS
	VL 15D6 CDR-L3	서열 번호 170 의 92 내지 100 번 잔기	QQSWSDPFT

[1071]

[1073]

실시예 5. 키메라 항체의 생성

[1074]

항-DLL4 래트 mAb의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(하기 표 9)을 돌연변이체 사람 IgG1 (L234, 235A) 중쇄 및 카파 경쇄 고정 영역 각각에 대해 프레임내(in-frame)에서 클로닝하였다. 수득되는 키메라 항체의 활성을 FACS-기초 결합 및 경쟁 분석(하기 표 10)에서 확인하고, 이들의 모 래트 mAb와 비교하였다.

표 10

항-DLL4 래트 mAb의 가변 도메인을 함유하는 재조합체 키메라 항체의 FACS-기초 결합 및 중화 활성.

	FACS 결합 (EC ₅₀ nM)		경쟁 FACS (IC ₅₀ nM)	
	DLL4 세포		hu 노치 -1/DLL4 세포	
하기의 키메라	사람 DLL4	마우스 DLL4	사람 DLL4	마우스 DLL4
1A11	19.59	0.74	2.338	0.682
38H12	1.468	N/D	1.443	N/D
32C7	3.706	4.114	ND	ND
37D10	2.32	0.99	5.951	4.395
14G1	0.994	N/D	4.11	N/D
14A11	1.613	2.139	4.025	1.391
15D6	1.715	1.817	10.48	1.49

[1075]

N/D = 측정되지 않음.

[1076]

실시예 6. 항-DLL4 래트 모노클로날 항체 1A11의 사람화.

[1077]

1A11 래트 항-DLL4 항체(상기 표 9)를 사람화하였다. 사람화된 변이체 아미노산 서열 VH.1, VH.1a, VH.1b,

VH.2a, VL.1, VL.1a, VL.1b, 및 VL.2a(하기 표 11)를 가장 동종인 사람 배선을 기준으로 하여 DNA 서열로 전환 시키고 합성하였다. 중쇄 변이체의 경우, 사람 배선 중쇄 수용체 서열 VH3-7 FR1, VH3-7 FR2, VH3-7 FR 3, 및 JH4 FR4를 사용하였다(참조: 상기 표 3). 경쇄 변이체 VL.1, VL.1a, 및 VL.1b의 경우, 사람 배선 경쇄 수용체 서열 O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, 및 JK2 FR4를 사용하였다(참조: 상기 표 3). 경쇄 변이체 VL.2a의 경우, 사람 배선 경쇄 수용체 서열 L2 FR1, L2 FR2, L2 FR3, 및 JK2 FR4를 사용하였다(참조: 상기 표 4). 개별의 작제물을 서열 입증하여 정확성에 대해 점검하였다. 이후에, 양성 변이체를 250 ml의 루리아 브로쓰(Luria broth) 및 암피실린내로 접종하고 밤새 37℃에서 배양하였다. DNA를 변이체 배양물로부터 퀴아젠 하이 스피드 맥시 프렙 키트(Qiagen Hi speed maxi prep kit)(12662)를 사용하여 추출하였다.

표 11

래트 항-DLL4 모노클로날 항체 1A11의 사람화된 버전의 VH 및 VL 아미노산 서열.

서열 번호	단백질 영역	서열
171	VH.1 1A11	123456789012345678901234567890 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVVYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	VH.1 1A11 CDR-H1	서열 번호 171 의 31 내지 35 번 관기 NFPMA
	VH.1 1A11 CDR-H2	서열 번호 171 의 50 내지 66 번 관기 TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.1 1A11 CDR-H3	서열 번호 171 의 99 내지 107 번 관기 GYNSPFAY
172	VH.1a 1A11	123456789012345678901234567890 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVVYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	VH.1a 1A11 CDR-H1	서열 번호 172 의 31 내지 35 번 관기 NFPMA
	VH.1a 1A11 CDR-H2	서열 번호 172 의 50 내지 66 번 관기 TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.1a 1A11 CDR-H3	서열 번호 172 의 99 내지 107 번 관기 GYNSPFAY

[1078]

173	VH.1b 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	VH.1b 1A11 CDR-H1	서열 번호 173 의 31 내지 35 번 잔기	NFPMA
	VH.1b 1A11 CDR-H2	서열 번호 173 의 50 내지 66 번 잔기	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.1b 1A11 CDR-H3	서열 번호 173 의 99 내지 107 번 잔기	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
174	VH.2a 1A11		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGTTY RDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	VH.2a 1A11 CDR-H1	서열 번호 174 의 31 내지 35 번 잔기	NFPMA
	VH.2a 1A11 CDR-H2	서열 번호 174 의 50 내지 66 번 잔기	TISSSDGTTYRDSVKG
	VH.2a 1A11 CDR-H3	서열 번호 174 의 99 내지 107 번 잔기	GYNSPFAY
			123456789012345678901234567890
175	VL.1 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIY SNLAWYQQRPGKAPKLLIYDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1 1A11 CDR-L1	서열 번호 175 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1 1A11 CDR-L2	서열 번호 175 의 50 내지 56 번 잔기	DTNNLAD

[1079]

	VL.1 1A11 CDR-L3	서열 번호 175 의 89 내지 97 번 잔기	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
176	VL.1a 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKSPKLLIFDTNNLADGVPS RFGSGSGTDSLTITISLQPEDFATYFCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1a 1A11 CDR-L1	서열 번호 176 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1a 1A11 CDR-L2	서열 번호 176 의 50 내지 56 번 잔기	DTNNLAD
	VL.1a 1A11 CDR-L3	서열 번호 176 의 89 내지 97 번 잔기	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
177	VL.1b 1A11		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIFDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR
	VL.1b 1A11 CDR-L1	서열 번호 177 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1b 1A11 CDR-L2	서열 번호 177 의 50 내지 56 번 잔기	DTNNLAD
	VL.1b 1A11 CDR-L3	서열 번호 177 의 89 내지 97 번 잔기	QQYNNYPPT
			123456789012345678901234567890
178	VL.2A 1A11		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIY SNLAWYQQKPGQSPRLLIIFTNNLADGVPA RFGSGSGTESTLTITISLQSEDFAVYFCQQ YNNYPPTFGQGTKLEIKR

[1080]

	VL.2a 1A11 CDR-L1	서열 번호 178 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.2a 1A11 CDR-L2	서열 번호 178 의 50 내지 56 번 잔기	DTNNLAD
	VL.2a 1A11 CDR-L3	서열 번호 178 의 89 내지 97 번 잔기	QQYNNYPPT

[1081]

[1083]

사람화된 항체는 각각의 중쇄 변이체를 각각의 경쇄 변이체와 총 16개 변이체에 대해 결합하여 생성시켰다(참조: 하기 표 12). 변이체 1 내지 4 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 0개의 역 돌연변이, VL.1a: 4개의 역 돌연변이, VL.1b: 1개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 5개의 역 돌연변이와 쌍을 이루는 VH.1을 함유하였다. 변이체 5 내지 8 각각은 각각의 VL 변이체: VL.1: 2개의 역 돌연변이, VL.1a: 6개의 역 돌연변이, VL.1b: 3개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 7개의 역 돌연변이와 쌍을 이루는 VH.1a를 함유하였다. 변이체 9 내지 12 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 1개의 역 돌연변이, VL.1a: 5개의 역 돌연변이, VL.1b: 2개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 6개

의 역 돌연변이와 쌍을 이루는 VH.1b를 함유하였다. 변이체 13 내지 16 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 3개의 역 돌연변이, VL.1a: 7개의 역 돌연변이, VL.1b: 4개의 역 돌연변이, VL.2a: 8개의 역 돌연변이와 쌍을 이루는 VH.2a를 함유하였다.

표 12

생성된 사람화된 1A11 항체 및 역 돌연변이의 요약

명칭	VH/VL 조합	가변 영역내 역 돌연변이† (VH/VL)
h1A11.1	VH.1/VL.1	0/0
h1A11.2	VH.1/VL.1a	0/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.3	VH.1/VL.1b	0/Y49F
h1A11.4	VH.1/VL.2a	0/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.5	VH.1a/VL.1	N76S, A93S/0
h1A11.6	VH.1a/VL.1a	N76S, A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.7	VH.1a/VL.1b	N76S, A93S/Y49F
h1A11.8	VH.1a/VL.2a	N76S, A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.9	VH.1b/VL.1	A93S/0
h1A11.10	VH.1b/VL.1a	A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.11	VH.1b/VL.1b	A93S/Y49F
h1A11.12	VH.1b/VL.2a	A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F
h1A11.13	VH.2a/VL.1	S49A, N76S, A93S/0
h1A11.14	VH.2a/VL.1a	S49A, N76S, A93S/A43S, Y49F, F71S, Y87F
h1A11.15	VH.2a/VL.1b	S49A, N76S, A93S/Y49F
h1A11.16	VH.2a/VL.2a	S49A, N76S, A93S/A43S, Y49F, I58V, F71S, Y87F

† 카바트 번호매김을 사용하였다.

[1084]

[1085]

모든 16개의 변이체를 50 ml의 HEK 293 6e 현탁액 세포 배양물내에 60% 내지 40%의 경쇄 대 중쇄 작제물의 비로 일시적으로 형질감염시켰다. 1 mg/ml의 PEI를 사용하여 세포를 형질감염시켰다. 세포 상청액을 6일 후 진탕 플라스크 중에서 수거하고, 회전 시켜 세포를 펠렛화하고, 0.22 μ m 여과기를 통해 여과하여 배양 오염물로부터 IgG를 분리하였다. 사람 DLL4에 결합하는 변이체를 염소 항 사람-Fc 포획 항체[제조원: 잭슨 면역노리서치 (Jackson ImmunoResearch), 109-005-008]을 이용하여 여과된 293 6e 상청액내에 IgG를 포획하는 포획 결합 ELISA(실시예 1.2)를 통해 초기에 평가하였다(참조: 하기 표 13). 모든 16개의 변이체는 매우 비교가능한 친화성을 가졌으며 추가의 특성화를 위해 정제하였다.

[1086]

모든 16개의 변이체(h1A11.1 내지 h1A11.16)를 1 상청액 용적의 단백질 A IgG 결합 완충액(Thermo Scientific 21001) 및 1 ml의 rProteinA 세파로즈 신속 비드(제조원: 지이 헬스케어, 17-1279-04)를 가하여 배치 정제하였다. 비드 및 완충액이 첨가된 상청액을 밤새 4°C에서 흔들고, 다음날 비드를 중력에 의해 폴리 프롭 크로마토 그래피 컬럼(poly prep chromatography columns)(Bio Rad, 731-1550) 위에 수집하였다. 일단 상청액이 컬럼을 통과하면 비드를 10 컬럼 용적의 결합 완충액으로 세척하고, IgG를 임퓨노퓨어(Immunopure) IgG 용출 완충액(Pierce, 185 1520)으로 용출시키고 1 ml의 분취량으로 수집하였다. IgG를 함유하는 분취를 혼주(pooling)시키고 PBS 중에서 밤새 4°C에서 투석하였다.

[1087]

정제된 변이체는 사람, 무린 및 사이노몰거스 DLL4에 대한 이들의 친화성에 대해 결합 ELISA(참조: 실시예 1.2, 방법 2), Biacore(실시예 1.1), 및 유동 세포분석법(FACS)으로 추가로 특성화하였다. 모든 16개의 변이체는 모든 3개의 검사에서 모 제조항체 항체 1A11에 대해 비교가능한 친화성을 나타내었다(표 13). 이후에, 사람화된

변이체를 사람 및 무린 DLL4와의 이들의 기능성에 대해 경쟁 ELISA(실시예 1.3) 및 노치 리포터 검사(Notch reporter assay)(실시예 1.6)에 의해 시험하였다. 모든 16개 변이체는 검사 둘 다에서 모 재조합체 항체 1A11에 대해 비교가능한 효능을 나타내었다(참조: 하기 표 14).

표 13

사람화된 1A11 mAb의 결합 활성의 요약

mAb	결합 데이터						
	사람 DLL4			마우스 DLL4			Cyno DLL4
	결합 ELISA (EC50, nM)	Biacore (KD, M)	결합 FACS (EC50, nM)	결합 ELISA (EC50, nM)	Biacore (KD, M)	결합 FACS (EC50, nM)	결합 ELISA (EC50, nM)
h1A11-1	0.08	1.5×10^{-8}	3.13	0.09	3.8×10^{-8}	0.21	0.13
h1A11-2	0.08	1.0×10^{-8}	2.85	0.09	1.9×10^{-8}	0.21	0.13
h1A11-3	0.07	1.5×10^{-8}	3.51	0.08	3.7×10^{-8}	0.24	0.16
h1A11-4	0.08	1.6×10^{-8}	3.61	0.09	3.9×10^{-8}	0.22	0.17
h1A11-5	0.07	0.96×10^{-8}	3.61	0.08	2.2×10^{-8}	0.21	0.16
h1A11-6	0.08	1.13×10^{-8}	3.74	0.10	3.1×10^{-8}	0.15	0.13
h1A11-7	0.06	1.3×10^{-8}	3.71	0.09	3.5×10^{-8}	0.18	0.14
h1A11-8	0.06	1.1×10^{-8}	3.34	0.09	2.4×10^{-8}	0.18	0.17
h1A11-9	0.07	1.3×10^{-8}	3.28	0.09	3.4×10^{-8}	0.18	0.15
h1A11-10	0.06	1.3×10^{-8}	nt	0.09	3.5×10^{-8}	nt	0.15
h1A11-11	0.07	1.2×10^{-8}	nt	0.09	2.7×10^{-8}	nt	0.15
h1A11-12	0.06	1.4×10^{-8}	nt	0.08	3.5×10^{-8}	nt	0.16
h1A11-13	0.06	1.4×10^{-8}	nt	0.09	3.7×10^{-8}	nt	0.16
h1A11-14	0.055	1.3×10^{-8}	nt	0.07	2.8×10^{-8}	nt	0.14
h1A11-15	0.07	1.4×10^{-8}	nt	0.09	3.7×10^{-8}	nt	0.13
h1A11-16	0.06	1.5×10^{-8}	nt	0.09	3.9×10^{-8}	nt	0.12
1A11 (키메라)	0.2	0.9×10^{-8}	6.29	0.3	2.4×10^{-8}	0.53	0.33
1A11 (래트 mAb)		0.6×10^{-8}					

nt = 시험되지 않음.

[1088]

표 14

사람화된 1A11 mAb의 시험관내 기능적 효능의 요약.

기능 데이터			
mAb	사람 DLL4		마우스 DLL4
	경쟁 ELISA (IC50, nM)	리포터 점정 (EC50, nM)	경쟁 ELISA (IC50, nM)
h1A11-1	0.4	2.53	1.3
h1A11-2	0.3	3.92	0.9
h1A11-3	0.2	2.53	0.9
h1A11-4	0.3	3.28	0.9
h1A11-5	0.3	3.8	0.8
h1A11-6	0.4	1.45	0.8
h1A11-7	0.5	4.84	0.9
h1A11-8	0.35	4.24	0.9
h1A11-9	0.3	3.18	0.9
h1A11-10	0.35	5.88	0.9
h1A11-11	0.4	3.73	0.8
h1A11-12	0.4	2.89	0.9
h1A11-13	0.3	10.42	1
h1A11-14	0.25	4.1	0.7
h1A11-15	0.2	5.4	0.7
h1A11-16	0.3	2.61	0.7
1A11 (키메라)	1.8	5.98	3.5
1A11 (랫트 하이브리도마 mAb)	0.5		1.1

[1089]

[1090] 항-DLL4 1A11 항체를 사람화하기 위한 추가의 설계.

[1091] 항-DLL4 랫트 모노클로날 항체 1A11을 사람화하기 위한 추가의 VH 및 VL 설계를 하기 표에 나타낸다.

표 15

1A11 항체를 사람화하기 위한 추가의 VH 및 VL 설계.

VH 또는 VL 설계	수용체 골격 서열	역 돌연변이†
h1A11VH.2	VH3 컨센서스 + JH4	0
h1A11VH.2b	VH3 컨센서스 + JH4	S49A, A93S
h1A11VH.3	VH1-46 + JH4 (N-말단 피로글루타메이트 형성을 방지하기 위한 Q1E 을 지님)	0
h1A11VH.3b	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, A93S
h1A11VH.3c	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, V67F, M69I, T73N, V78L, A93S, 및 T75I (바람직하지 않은 N- 글리코실화 시그널을 피함)
h1A11VH.3d	VH1-46 + JH4 (Q1E)	Y27F, M48V, G49A, V67F, M69I, V78L, A93S (바람직하지 않은 N- 글리코실화 시그널을 피하기 위해 빠진 T73N)
h1A11VL.1c	O2 + JK2	Y49F, F71S
h1A11VL.2	3-15/L2 + JK2	0
h1A11VL.2b	3-15/L2 + JK2	Y49F
h1A11VL.2c	3-15/L2 + JK2	Y49F, F71S

† 카바트 번호매김을 사용하였다.

[1092]

[1093]

실시예 7. 항-DLL4 래트 mAb 38H12의 사람화.

[1094]

38H12 래트 항-DLL4 항체(참조: 상기 표 9)를 사람화하였다. 사람화된 변이체 아미노산 서열 VH.1, VH.1a, VH.1b, VH.2a, VL.1, VL.1a, VL.1b, 및 VL.2a(참조: 하기 표 16)을 가장 동종인 사람 배선을 기초로 하여, DNA 서열로 전환시키고, 합성하였다. 사람 배선 중쇄 수용체 서열 VH3-30 FR1, VH3-30 FR2, VH3-30 FR3, 및 JH3 FR4(참조: 표 3)을 표 16에 나타난 사람화된 중쇄 변이체를 생성하는데 사용하였다. 사람 배선 경쇄 수용체 서열 O2 FR1, O2 FR2, O2 FR3, 및 JK2 FR4(참조: 표 4)를 표 16에 나타난 사람화된 경쇄 변이체를 생성하는데 사용하였다. 개개의 작제물을 서열 입증하여 정확성을 점검하였다. 이후에, 양성 변이체를 150 ml의 루리아 브로쓰(Luria broth) 및 암피실린내로 접종하고 밤새 37°C에서 배양하였다. DNA를 변이체 배양물로부터 퀴아겐 하이 스피드 맥시 프랩 키트(12662)를 사용하여 추출하였다.

표 16

사람화된 래트 항-DLL4 모노클로날 항체 38H12의 VH 및 VL 아미노산 서열.

서열 번호	단백질 영역		서열
179	VH.1 38H12		123456789012345678901234567890 EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARLNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.1 38H12 CDR-H1	서열 번호 179의 31 내지 35 번 잔기	NYGMY
	VH.1 38H12 CDR-H2	서열 번호 179의 50 내지 66 번 잔기	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1 38H12 CDR-H3	서열 번호 179의 99 내지 107 번 잔기	LNWELGIDY
180	VH.1a 38H12		123456789012345678901234567890 EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.1a 38H12 CDR-H1	서열 번호 180의 31 내지 35 번 잔기	NYGMY
	VH.1a 38H12 CDR-H2	서열 번호 180의 50 내지 66 번 잔기	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1a 38H12 CDR-H3	서열 번호 180의 99 내지 107 번 잔기	LNWELGIDY
181	VH.1b 38H12		123456789012345678901234567890 EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS NYGMYWVRQAPGKLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS

[1095]

	VH.1b 38H12 CDR-H1	서열 번호 181 의 31 내지 35 번 잔기	NYGMY
	VH.1b 38H12 CDR-H2	서열 번호 181 의 50 내지 66 번 잔기	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.1b 38H12 CDR-H3	서열 번호 181 의 99 내지 107 번 잔기	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
182	VH.2a 38H12		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMYWIRQAPGKGLEWVAFISHGGGITYY RDSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAED TAVYHCAALNWELGIDYWGQGTMTVSS
	VH.2a 38H12 CDR-H1	서열 번호 182 의 31 내지 35 번 잔기	NYGMY
	VH.2a 38H12 CDR-H2	서열 번호 182 의 50 내지 66 번 잔기	FISHGGGITYYRDSVKG
	VH.2a 38H12 CDR-H3	서열 번호 182 의 99 내지 107 번 잔기	LNWELGIDY
			123456789012345678901234567890
183	VL.1 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1 38H12 CDR-L1	서열 번호 183 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1 38H12 CDR-L2	서열 번호 183 의 50 내지 56 번 잔기	AANRLQD
	VL.1 38H12 CDR-L3	서열 번호 183 의 89 내지 97 번 잔기	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890
184	VL.1a 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIY SNLAWYQKKPGKSPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1a 38H12 CDR-L1	서열 번호 184 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1a 38H12 CDR-L2	서열 번호 184 의 50 내지 56 번 잔기	AANRLQD
	VL.1a 38H12 CDR-L3	서열 번호 184 의 89 내지 97 번 잔기	LQGSKFPLT
			123456789012345678901234567890

[1096]

185	VL.1b 38H12		DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.1b 38h12 CDR-L1	서열 번호 185 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.1b 38H12 CDR-L2	서열 번호 185 의 50 내지 56 번 잔기	AANRLQD
	VL.1b 38H12 CDR-L3	서열 번호 185 의 89 내지 97 번 잔기	LQSGKFPLT
			123456789012345678901234567890
186	VL.2a 38H12		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIY SNLAWYQKKPGQSPRLLIYAANRLQDGVPA RFGSGSGTEYTLTISSLQSEDFAVYFCLQ GSKFPLTFGQGTKLEIKR
	VL.2a 38H12 CDR-L1	서열 번호 186 의 24 내지 34 번 잔기	RASEDIYSNLA
	VL.2a 38H12 CDR-L2	서열 번호 186 의 50 내지 56 번 잔기	AANRLQD
	VL.2a 38H12 CDR-L3	서열 번호 186 의 89 내지 97 번 잔기	LQSGKFPLT

[1097]

[1099]

사람화된 항체를 총 16개의 변이체에 대해 각각의 중쇄 변이체와 각각의 경쇄 변이체를 결합하여 생성하였다(참조: 하기 표 17). 변이체 1 내지 4 각각은 각각의 VL 변이체: VL.1: 0개의 역 돌연변이, VL.1a: 4개의 역 돌연변이, VL.1b: 1개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 5개의 역 돌연변이와 쌍을 이룬 VH.1을 함유하였다. 변이체 5 내지 8 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 4개의 역 돌연변이, VL.1a: 8개의 역 돌연변이, VL.1b: 5개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 9개의 역 돌연변이와 쌍을 이룬 VH.1a를 함유하였다. 변이체 9 내지 12 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 1개의 역 돌연변이, VL.1a: 5개의 역 돌연변이, VL.1b: 2개의 역 돌연변이, 및 VL.2a: 5개의 역 돌연변이와 쌍을 이룬 VH.1b를 함유하였다. 변이체 13 내지 16 각각은 VL 변이체 각각: VL.1: 5개의 역 돌연변이, VL.1a: 9개의 역 돌연변이, VL.1b: 6개의 역 돌연변이, VL.2a: 10개의 역 돌연변이와 쌍을 이룬 VH.2a를 함유하였다.

표 17

생성된 사람화된 38H12 항체 및 역 돌연변이의 요약

명칭	VH/VL 조합	가변 영역내 역 돌연변이* (VH/VL)
h38H12.1	VH.1/VL.1	0/0 (N-말단 피로글루타메이트 형성을 방지하기 위한 VH 내 Q1E)
h38H12.2	VH.1/VL.1a	0/Q38K, A43S, F71Y, Y87F (상기 나타난 바와 같이 VH 내 Q1E)
h38H12.3	VH.1/VL.1b	0/F71Y (상기 나타난 바와 같이 VH 내 Q1E)

[1100]

h38H12.4	VH.1/VL.2a	0/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F (상기 나타낸 바와 같이 VH 내 Q1E)
h38H12.5	VH.1a/VL.1	V37I, N76S, Y91H, R94A/0
h38H12.6	VH.1a/VL.1a	V37I, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.7	VH.1a/VL.1b	V37I, N76S, Y91H, R94A/F71Y
h38H12.8	VH.1a/VL.2a	V37I, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F
h38H12.9	VH.1b/VL.1	R94A/0
h38H12.10	VH.1b/VL.1a	R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.11	VH.1b/VL.1b	R94A/F71Y
h38H12.12	VH.1b/VL.2a	R94A/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F
h38H12.13	VH.2a/VL.1	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/0
h38H12.14	VH.2a/VL.1a	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, F71Y, Y87F
h38H12.15	VH.2a/VL.1b	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/F71Y
h38H12.16	VH.2a/VL.2a	V37I, S49A, N76S, Y91H, R94A/Q38K, A43S, I58V, F71Y, Y87F

[†] 카바트 번호매김을 사용하였다.

[1101]

[1103]

모든 16개의 변이체를 50 ml의 HEK 293 6e 현탁액 세포 배양물내로 60% 대 40%의 경쇄 대 중쇄 작제물 비로 일시적으로 형질감염시켰다. 1 mg/ml의 PEI를 사용하여 세포를 형질감염시켰다. 세포 상청액을 7일 후에 진탕 플라스크 중에서 수거하고, 회전시켜, 세포를 펠렛화하고, 0.22 μ m 여과기를 통해 여과하여 배양 오염물로부터 IgG를 분리하였다. 사람 DLL4에 대한 변이체 결합을 염소 항 사람-Fc 포획 항체(제조원: 잭슨 임뮤노 리서치, 109-005-008)를 사용하여 여과된 293 6e 세포 상청액 내에 IgG를 포획시키는 포획 결합 ELISA(참조: 실시예 1.2)를 통해 초기에 평가하였다(ELISA 결합 EC₅₀, 참조: 하기 표 18). VH.1을 함유하는 변이체는 다른 변이체와 비교하여 최저 결합 친화성을 나타내었으며 스크리닝에서 배제하는 것으로 고려되었다. VH.1은 골격 역 돌연변이 없이 CDR-이식된다.

[1104]

이후에, 우수한 결합인자(h38H12.5-h38H12.16)를 1 상청액 용적의 단백질 A IgG 결합 완충액(Thermo Scientific 21001) 및 800 μ l의 rProteinA 세파로즈 패스트 플로우 비드(sepharose fast flow bead)(제조원: 지이 헬스케어, 17-1279-04)을 가하여 배치 정제하였다. 비드 및 완충액이 가해진 상청액을 실온에서 4시간 동안 교반하고, 비드를 중력에 의해 폴리 프랩 크로마토그래피 컬럼(Bio Rad, 731-1550) 위에 수집하였다. 상청액이 컬럼을 통과하면 비드를 10 ml의 결합 완충액으로 세척하고 IgG를 임뮤노퓨어 IgG 용출 완충액(제조원: 피어스, 185 1520)으로 세척하고 100 μ l의 1M 트리스, pH 8로 중화시킨 1ml의 분취량으로 수집하였다.

[1105]

정제된 변이체를, 노치-1 Fc를 ELISA 플레이트 위에 플레이팅하고 비오틴화된 사람 DLL4 및 적정된 항체를 예

비-항온처리하는 방식을 사용하는 사람 노치-1 경쟁 ELISA(참조: 실시예 1.4)에서 추가로 특성화하였다. 시그널을 노치-1 Fc에 대한 유리된 비오티닐화된 DLL4 결합에 의해 평가하였다. 강력한 결합인자는 낮은 항체 농도에서 시그널을 억제하였다. h38H12.5 내지 h38H12.7은 다른 변이체와 비교하여 보다 낮은 경쟁 효능을 나타내었다(참조: 노치 경쟁 ELISA EC₅₀, 참조: 하기 표 18).

[1106] 결합 ELISA에 의해 측정된 것으로서, 우수한 결합인자 변이체를 Biacore(참조: 실시예 1.1)에 의해 세포계 검사 스크린과 동시에 평가하였다. 사람 DLL4에 대한 K_D는 모든 변이체에 대해 유사하였다(참조: Biacore, 하기 표 18의 K_D). 변이체를 사람 DLL4에 대한 직접적인 결합(실시예 1.3; 하기 표 18에서 FACS 결합 EC₅₀) 및 노치-1 시그널링의 억제(실시예 1.6; 하기 표 18에서 노치 리포터 검사 EC₅₀)를 시험한 세포-기초 검사에서 스크리닝하였다.

표 18

사람화된 38H12 mAb의 사람 DLL4에 대한 시험관내 활성의 요약

명칭	ELISA 결합 EC ₅₀ (nM)	노치 경쟁 ELISA EC ₅₀ (nM)	FACS 결합 EC ₅₀ (nM)	노치 리포터 검정 EC ₅₀ (nM)	Biacore, K _D (nM)
h38H12.1	21.5		17.84		
h38H12.2	26.88				
h38H12.3	5.57				
h38H12.4	20.65				
h38H12.5	0.2015	14.81	77.15	7.307	0.401
h38H12.6	0.1584	26.96	12.29	6.317	0.434
h38H12.7	0.1798	12.49	19.06	2.598	0.34
h38H12.8	0.1972	8.315	20.02	5.557	0.397
h38H12.9	0.1155	4.158	3.71	1.436	0.986
h38H12.10	0.1226	3.902	2.489	0.7861	0.578
h38H12.11	0.1264	3.8	2.477	0.6572	0.554
h38H12.12	0.1651	3.228	1.478	1.062	0.819
h38H12.13	0.1534	5.287	2.556	0.7943	0.507
h38H12.14	0.146	5.839	1.04	1.014	0.303
h38H12.15	0.0904	5.714	2.369	0.837	0.355
h38H12.16	0.1696	3.766	2.914	1.185	0.392

[1107]

명칭	ELISA 결합 EC ₅₀ (nM)	노치 경쟁 ELISA EC ₅₀ (nM)	FACS 결합 EC ₅₀ (nM)	노치 리포터 검정 EC ₅₀ (nM)	Biacore, K _D (nM)
h38H12.1	21.5		17.84		
h38H12.2	26.88				
h38H12.3	5.57				
h38H12.4	20.65				
h38H12.5	0.2015	14.81	77.15	7.307	0.401
h38H12.6	0.1584	26.96	12.29	6.317	0.434
h38H12.7	0.1798	12.49	19.06	2.598	0.34
h38H12.8	0.1972	8.315	20.02	5.557	0.397
h38H12.9	0.1155	4.158	3.71	1.436	0.986
h38H12.10	0.1226	3.902	2.489	0.7861	0.578
h38H12.11	0.1264	3.8	2.477	0.6572	0.554
h38H12.12	0.1651	3.228	1.478	1.062	0.819
h38H12.13	0.1534	5.287	2.556	0.7943	0.507
h38H12.14	0.146	5.839	1.04	1.014	0.303
h38H12.15	0.0904	5.714	2.369	0.837	0.355
h38H12.16	0.1696	3.766	2.914	1.185	0.392

[1108]

[1110] 항-DLL4 38H12 항체를 사람화하기 위한 추가의 설계.

[1111] 항-DLL4 래트 모노클로날 항체 38H12를 사람화하기 위한 추가의 VH 및 VL 설계를 하기 표에 나타낸다.

표 19

38H12 항체를 사람화하기 위한 추가의 VH 및 VL 설계

VH 또는 VL 설계	배선 수용체 골격 서열	역 돌연변이†
h38H12VH.2	VH3 컨센서스 + JH3	0
h38H12VH.2b	VH3 컨센서스 + JH3	S49A, R94A
h38H12VH.3	VH1-46 + JH3	0 (N-말단 피로글루타메이트 형성을 방지하기 위한 VH 내 Q1E)
h38H12VH.3b	VH1-46 + JH3	Y27F, M48V, G49A, R94A (상기 나타낸 바와 같이 VH 내 Q1E)
h38H12VH.3c	VH1-46 + JH3	Y27F, Y37I, M48V, G49A, V67F, M69I, T73N, V78L, Y91H, R94A (바람직하지 않은 N- 글리코실화 시그널을 제거하기 위한 Q1E T75I, 상기 나타낸 바와 같이 VH 내 Q1E)
h38H12VH.3d	VH1-46 + JH3	Y27F, Y37I, M48V, G49A, V67F, M69I, V78L, Y91H, R94A (상기 나타낸 바와 같이 VH 내 Q1E)
h38H12VL.2	3-15/L2 + JK2	0
h38H12VL.2b	3-15/L2 + JK2	F71Y

[1112]

도핑 순서는 A-C-G-T 이다.

A₍₈₅₋₅₋₅₋₅₎, A₍₇₀₋₁₀₋₁₀₋₁₀₎

C₍₅₋₈₅₋₅₋₅₎, C₍₁₀₋₇₀₋₁₀₋₁₀₎

G₍₅₋₅₋₈₅₋₅₎, G₍₁₀₋₁₀₋₇₀₋₁₀₎

T₍₅₋₅₋₅₋₈₅₎, T₍₁₀₋₁₀₋₁₀₋₇₀₎

[1113]

알라닌 (A): GCN	$G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
트레오닌(T): ACN	$A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
프롤린(P): CCN	$C_{(10-70-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$	$C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
세린(S): TCN 의 경우 AGY 의 경우	$T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}S$ $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}S$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}$
발린(V): GTN	$G_{(10-10-70-10)}T_{(10-10-10-70)}S$	$G_{(5-5-85-5)}T_{(5-5-5-85)}S$
글리신 (G): GGN	$G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}S$	$G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}S$
루이신(L): CTN 의 경우 TTR 의 경우	$C_{(10-70-10-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$	$C_{(5-85-5-5)}T_{(5-5-5-85)}S$ $T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$
아르기닌(R): CGN 의 경우 AGR 의 경우	$C_{(10-70-10-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$	$C_{(5-85-5-5)}G_{(5-5-85-5)}S$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$
메티오닌(M): ATG	$A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$
트립토판 (W): TGG	$T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$	$T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$
페닐알라닌 (F): TTY	$T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$	$T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$
이소류이신 (I): 2 개의 올리고가 필요함 50% ATY	$A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$
50% ATA	$A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}$
타이로신 (Y): TAY	$T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
히스티딘 (H):		
CAY	$C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
글루타민 (Q): CAR	$C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$	$C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
아스파라긴 (N): AAY	$A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
라이신(K): AAR	$A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$	$A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
아스파르트산(D): GAY	$G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}$	$G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
글루탐산(E): GAR	$G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}$	$G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
시스테인(C): TGY	항상 NNS	

[†] 카바트 번호매김을 사용하였다.

- [1117] **실시예 8. h1A11.1의 친화성 성숙.**
- [1118] 사람화된 항체 h1A11.1을 친화성 성숙을 위한 주형으로서 사용하였다. 라이브러리(library)의 설계의 기술은 하기 제공한다. 모노클로날 항체의 가변 영역 서열의 번호매김을 카바트 번호매김(상기 기술된 바와 같거나; worldwide website bioinf.org.uk/abs/#kabatnum 참조)을 사용하여 주석을 달고 하기 기술된 라이브러리를 생성하는데 사용하였다.
- [1119] 3개의 라이브러리를 하기 기술한 바와 같이 제조하였다.
- [1120] H1+H2 라이브러리[도핑(doping): 76080808]:
- [1121] 30, 31, 32, 35, 50, 52, 52a, 55, 56, 57, 및 58번에서 도핑된 11개 잔기.
- [1122] 배선과 76번(V/I) 위치에서 h1A11 서열 사이의 토글(toggle).
- [1123] 적어도 3.7회 4개 이하의 돌연변이된 잔기를 갖는 10^9 개 라이브러리 샘플링된 돌연변이체.
- [1124] 4 내지 6개의 잔기를 수반하는 돌연변이체를 갖는 라이브러리 대부분을 도핑으로 돌연변이시켰다.
- [1125] H3 라이브러리(도핑: 70101010)
- [1126] 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 및 102번에서 도핑된 8개 잔기.
- [1127] 배선과 93번(A/S) 및 101번(D/A) 위치의 h1A11 사이에서 토글.
- [1128] 적어도 4.7회의 4개 이하의 돌연변이된 잔기를 갖는 10^9 개 라이브러리 샘플링된 돌연변이체.
- [1129] 4 내지 5개의 잔기를 수반하는 돌연변이체를 갖는 라이브러리 대부분을 도핑으로 돌연변이시켰다.
- [1130] LC 라이브러리(도핑: 70101010):
- [1131] 28, 30, 31, 50, 53, 92, 93, 94, 및 96번에서 도핑된 9개 잔기.
- [1132] 배선과 7개 위치 27번(Q/E), 43번(A/S), 49번(Y/F), 52번(S/N), 71번(F/S), 87번(Y/F), 및 91번(S/Y)에서의 h1A11 서열 사이의 토글.
- [1133] 적어도 1회 4개 이하의 돌연변이된 잔기를 갖는 10^9 개 라이브러리 샘플링된 돌연변이체.
- [1134] 4 내지 6개의 잔기를 수반하는 돌연변이체를 갖는 라이브러리 대부분을 도핑으로 돌연변이시켰다.
- [1135] rHC 라이브러리: H1+H2 및 H3 라이브러리의 결과를 재결합한다.
- [1136] rHCLC 라이브러리: H1+H2, H3, 및 LC 라이브러리의 결과를 재결합한다.
- [1137] VH 및 VL 골격 배선 둘 다는 예측한 면역원성을 감소시켰다. h1A11VL.1a에서 대부분의 목적하는 배선 돌연변이는 S43A 및 S71F이었다.
- [1138] 도핑된 잔기에 대해 본원에 규정된 사용된 코돈:
- [1139] 프롤린이 도핑되는 경우, 도핑 올리고는 항체 서열내 원래의 코돈에 상관없이 $C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$ 코돈을 가질 것이다. 이들 코돈을 다음 기준으로 선택하였다:
- [1140] 1. 동일하지 않은 돌연변이의 증가
- [1141] 2. 돌연변이된 경우 추가의 아미노산의 포함 증가
- [1142] 3. 고 빈도 코돈 사용
- [1143] 4. SSS 및 WWW 코돈 회피.
- [1144] 도핑 순서는 A-C-G-T이었다.
- [1145] $A_{(85-5-5-5)}$, $A_{(70-10-10-10)}$
- [1146] $C_{(5-85-5-5)}$, $C_{(10-70-10-10)}$

- [1147] $G_{(5-5-85-5)}, G_{(10-10-70-10)}$
- [1148] $T_{(5-5-5-85)}, T_{(10-10-10-70)}$
- [1149] 알라닌 (A):
- [1150] GCN $G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
- [1152] 트레오닌 (T):
- [1153] ACN $A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
- [1155] 프롤린 (P):
- [1156] CCN $C_{(10-70-10-10)}C_{(10-70-10-10)}S$ $C_{(5-85-5-5)}C_{(5-85-5-5)}S$
- [1158] 세린(S):
- [1159] If TCN $T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}S$ $T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}S$
- [1160] If AGY $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}C_{(10-70-10-10)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1162] 발린(V):
- [1163] GTN $G_{(10-10-70-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $G_{(5-5-85-5)}T_{(5-5-5-85)}S$
- [1165] 글리신(G):
- [1166] GGN $G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}S$
- [1168] 루이신(L):
- [1169] CTN의 경우 $C_{(10-70-10-10)}T_{(10-10-10-70)}S$ $C_{(5-85-5-5)}T_{(5-5-5-85)}S$
- [1170] TTR의 경우 $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1172] 아르기닌(R):
- [1173] CGN의 경우 $C_{(10-70-10-10)}G_{(10-10-70-10)}S$ $C_{(5-85-5-5)}G_{(5-5-85-5)}S$
- [1174] AGR의 경우 $A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}$ $A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1176] 메티오닌(M):
- [1177] ATG $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1179] 트립토판(W):

- [1180] TGG $T_{(10-10-10-70)}G_{(10-10-70-10)}G_{(10-10-70-10)}T_{(5-5-5-85)}G_{(5-5-85-5)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1182] 페닐알라닌(F):
- [1183] TTY $T_{(10-10-10-70)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}T_{(5-5-5-85)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1185] 이소루이신(I): 2개의 올리고 필요
- [1186] 50% ATY $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}C_{(10-70-10-10)}A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1187] 50% ATA $A_{(70-10-10-10)}T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}A_{(85-5-5-5)}T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}$
- [1189] 타이로신(Y):
- [1190] TAY $T_{(10-10-10-70)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}T_{(5-5-5-85)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1192] 히스티딘(H):
- [1193] CAY $C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1195] 글루타민(Q):
- [1196] CAR $C_{(10-70-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}C_{(5-85-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1198] 아스파라긴(N):
- [1199] AAY $A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1201] 라이신(K):
- [1202] AAR $A_{(70-10-10-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}A_{(85-5-5-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1204] 아스파르트산(D):
- [1205] GAY $G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}C_{(10-70-10-10)}G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}C_{(5-85-5-5)}$
- [1207] 글루탐산(E):
- [1208] GAR $G_{(10-10-70-10)}A_{(70-10-10-10)}G_{(10-10-70-10)}G_{(5-5-85-5)}A_{(85-5-5-5)}G_{(5-5-85-5)}$
- [1210] 시스테인(C):
- [1211] TGY 항상 NNS
- [1213] h1A11.1 라이브러리를 효모 세포내로 형질전환시키고 비오틴닐화된 DLL4 세포외 도메인이 자기에 이은 형광성

활성화된 세포 분류 대해 선택될 세포 표면 위에 나타내었다. 개선된 온-속도 또는 오프-속도 또는 둘 다에 대한 선택을 수행하고, 친화성-조절된 hu1A11 클론(하기 표 20 및 표 21)의 항체 단백질 서열을 효모 세포로부터 추가의 특성화를 위해 IgG 양식에 대해 역으로 전환시키기 위해 회수하였다(참조: 표 22에서 클론의 요약). 표 23은 골격 영역(FR) 및 CDR 둘 다에서 친화성 성숙 선택 동안 관찰된 아미노산을 나열한다.

표 20

친화성 성숙된 사람화된 1A11.1 클론의 VH 서열

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
187	h1A11VH.1 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFPMAWVRQAPGKLEWVATISSDGTYY RDSVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPPAYWGQGLTVSS
	h1A11VH.1 VH	CDR-H1	서열 번호 187 의 31 내지 35 번 잔기 NFPMA
	h1A11VH.1 VH	CDR-H2	서열 번호 187 의 50 내지 66 번 잔기 TISSSDGTYYRDSVKG

[1214]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11VH.1 VH	CDR- H3	서열 번호 187 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAY
188	h1A11.A6 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDAWPSY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A6 VH	CDR- H1	서열 번호 188 의 31 내지 35 번 잔기 HFPMA
	h1A11.A6 VH	CDR- H2	서열 번호 188 의 50 내지 66 번 잔기 TISSSDAWPSYRDSVKG
	h1A11.A6 VH	CDR- H3	서열 번호 188 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAY
189	h1A11.A8 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG NFPMSWVRQAPGKGLEWVASISSSDSWATI GDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A8 VH	CDR- H1	서열 번호 189 의 31 내지 35 번 잔기 NFPMS
	h1A11.A8 VH	CDR- H2	서열 번호 189 의 50 내지 66 번 잔기 SISSSDSWATIGDSVKG
	h1A11.A8 VH	CDR- H3	서열 번호 189 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAY
190	h1A11.C6 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR NFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSSDGWPTY RDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS

[1215]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11.C6 VH	CDR- H1	서열 번호 190 의 31 내지 35 번 관기 NFPMA
	h1A11.C6 VH	CDR- H2	서열 번호 190 의 50 내지 66 번 관기 TISSSDGWPTYRDSVKG
	h1A11.C6 VH	CDR- H3	서열 번호 190 의 99 내지 107 번 관기 GYNSPFAY
191	h1A11.A11 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKGLEWVATISSDDWPNY RDSVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAED TAVYYCSRGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.A11 VH	CDR- H1	서열 번호 191 의 31 내지 35 번 관기 HFPMA
	h1A11.A11 VH	CDR- H2	서열 번호 191 의 50 내지 66 번 관기 TISSDDWPNYRDSVKG
	h1A11.A11 VH	CDR- H3	서열 번호 191 의 99 내지 107 번 관기 GYNSPFAY
192	h1A11.B5 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFMSWVRQAPGKGLEWVASISGSDGWASY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFASWGQGLTVTVSS
	h1A11.B5 VH	CDR- H1	서열 번호 192 의 31 내지 35 번 관기 YFMS
	h1A11.B5 VH	CDR- H2	서열 번호 192 의 50 내지 66 번 관기 SISGSDGWASYRDSVKG

[1216]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11.B5 VH	CDR- H3	서열 번호 192 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAS
193	h1A11.E12 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFPMAWVRQAPGKLEWVATISGSEWPNY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAPFWGQGLTVTVSS
	H1A11.E12 VH	CDR- H1	서열 번호 193 의 31 내지 35 번 잔기 YFPMA
	h1A11.E12 VH	CDR- H2	서열 번호 193 의 50 내지 66 번 잔기 TISGSEWPNYRDSVKG
	h1A11.E12 VH	CDR- H3	서열 번호 193 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAP
194	h1A11.G3 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR YFPMSWVRQAPGKLEWVASISGSDGWASY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS
	h1A11.G3 VH	CDR- H1	서열 번호 194 의 31 내지 35 번 잔기 YFPMS
	h1A11.G3 VH	CDR- H2	서열 번호 194 의 50 내지 66 번 잔기 SISGSDGWASYRDSVKG
	h1A11.G3 VH	CDR- H3	서열 번호 194 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAY
195	h1A11.F5 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR HFPMAWVRQAPGKLEWVATISSDAWPSY RDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARGYNSPFAYWGQGLTVTVSS

[1217]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11.F5 VH	CDR- H1	서열 번호 195 의 31 내지 35 번 잔기 HFPMA
	h1A11.F5 VH	CDR- H2	서열 번호 195 의 50 내지 66 번 잔기 TISSSDAWPSYRDSVKG
	h1A11.F5 VH	CDR- H3	서열 번호 195 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAY
196	h1A11.H2 VH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFG NFPMSWVRQAPGKLEWVASISSDSWATI GDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVIYCARGYNSPFAFWGQGLVTVSS
	h1A11.H2 VH	CDR- H1	서열 번호 196 의 31 내지 35 번 잔기 NFPMS
	h1A11.H2 VH	CDR- H2	서열 번호 196 의 50 내지 66 번 잔기 SISSSDSWATIGDSVKG
	h1A11.H2 VH	CDR- H3	서열 번호 196 의 99 내지 107 번 잔기 GYNSPFAF

[1218]

표 21

친화성 성숙된 사람화된 1A11.1 클론의 VL 서열.

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
197	h1A11VL.1 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIY SNLAWYQQKPGKAPKLLIYDTNNLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YNNYPFTFGQGTKLEIK

[1220]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11VL.1 VL	CDR- L1	서열 번호 197 의 24 내지 34 번 잔기 RASEDIYSNLA
	h1A11VL.1 VL	CDR- L2	서열 번호 197 의 50 내지 56 번 잔기 DTNNLAD
	h1A11VL.1 VL	CDR- L3	서열 번호 197 의 89 내지 97 번 잔기 QQYNNYPPT
198	h1A11.A2 VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIY INLAWYQQKPKGKSPKLLIFDTNDLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YDYVPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A2 VL	CDR- L1	서열 번호 198 의 24 내지 34 번 잔기 RASQDIYINLA
	h1A11.A2 VL	CDR- L2	서열 번호 198 의 50 내지 56 번 잔기 DTNDLAD
	h1A11.A2 VL	CDR- L3	서열 번호 198 의 89 내지 97 번 잔기 QQYDYVPPT
199	h1A11.A12 VL		DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIY YNLAWYQQKPKGKSPKLLIFDTSSLADGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQ YDWYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A12 VL	CDR- L1	서열 번호 199 의 24 내지 34 번 잔기 RASQDIYINLA
	h1A11.A12 VL	CDR- L2	서열 번호 199 의 50 내지 56 번 잔기 DTSSLAD

[1221]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11.A12 VL	CDR- L3	서열 번호 199 의 89 내지 97 번 잔기 QQYDWYPPT
200	h1A11.A7 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY INLAWYQQKPGKAPKLLIFDTS DL ADGVPS RFGSGSGTDFTLTIS SL QPEDFATYYCQQ YDYYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.A7 VL	CDR- L1	서열 번호 200 의 24 내지 34 번 잔기 RASQDIYINLA
	h1A11.A7 VL	CDR- L2	서열 번호 200 의 50 내지 56 번 잔기 DTS DL AD
	h1A11.A7 VL	CDR- L3	서열 번호 200 의 89 내지 97 번 잔기 QQYDYYPPT
201	h1A11.B4 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIY YNLAWYQQKPGKAPKLLIFD TN ILADGVPS RFGSGSGTDFTLTIS SL QPEDFATYFCQQ YDYVPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.B4 VL	CDR- L1	서열 번호 201 의 24 내지 34 번 잔기 RASQDIYYNLA
	h1A11.B4 VL	CDR- L2	서열 번호 201 의 50 내지 56 번 잔기 DTN IL AD
	h1A11.B4 VL	CDR- L3	서열 번호 201 의 89 내지 97 번 잔기 QQYDYVPPT
202	h1A11.B5 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIW NNLAWYQQKPGKSPKLLIFD TS YLADGVPS RFGSGSGTDFTLTIS SL QPEDFATYYCQQ YDWYPPTFGQGTKLEIK

[1222]

서열 번호	단백질 영역		서열
			123456789012345678901234567890
	h1A11.B5 VL	CDR- L1	서열 번호 202 의 24 내지 34 번 잔기 RASQDIWNNLA
	h1A11.B5 VL	CDR- L2	서열 번호 202 의 50 내지 56 번 잔기 DTSYLAD
	h1A11.B5 VL	CDR- L3	서열 번호 202 의 89 내지 97 번 잔기 QQYDWYPPT
203	h1A11.E12 VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQEIY RNLAWYQQKPKGKPKLLIFDTSVLADGVPS RFGSGSGTDSTLTISLQPEDFATYYCQQ YTYYPPTFGQGTKLEIK
	h1A11.E12 VL	CDR- L1	서열 번호 203 의 24 내지 34 번 잔기 RASQEIYRNLA
	h1A11.E12 VL	CDR- L2	서열 번호 203 의 50 내지 56 번 잔기 DTSVLAD
	h1A11.E12 VL	CDR- L3	서열 번호 203 의 89 내지 97 번 잔기 QQYTYYPPT

[1223]

표 22

친화성 성숙된 h1A11.1 전환된 클론의 요약

클론 명칭	VH	VL
h1A11.A6	h1A11.A6 VH	h1A11VL.1
h1A11.C6	h1A11.C6 VH	h1A11VL.1
h1A11.A11	h1A11.A11 VH	h1A11VL.1
h1A11.A8	h1A11.A8 VH	h1A11VL.1
h1A11.B4	h1A11VH.1	h1A11.B4 VL
h1A11.A7	h1A11VH.1	h1A11.A7 VL
h1A11.A12	h1A11VH.1	h1A11.A12 VL
h1A11.A2	h1A11VH.1	h1A11.A2 VL
h1A11.B5	h1A11.B5 VH	h1A11.B5 VL
h1A11.E12	h1A11.E12 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.G3	h1A11.G3 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.F5	h1A11.F5 VH	h1A11.E12 VL
h1A11.H2	h1A11.H2 VH	h1A11.E12 VL

[1225]

표 23

골격 영역(FR)내 h1A11.1, 및 VH(서열 번호 204) 및 VL(서열 번호 205) 영역
에 대한 CDR 각각의 친화성 성숙 선택 동안 관찰된 아미노산

서열 번호 204

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS

CAASGFTFS

NF

MAWVRQ

APGK

GLEW

VATIS

SSDGTYYRDSVKG

RYY S

S G SSASIG

NH T

A AFDN

GS

EWST

KA

D PA

T

F D

L

Q

C

RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC

ARGYNSP

FATWGQGT

LTVSS

SL

D

DF

S

서열 번호 205

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR

ASEDIYSN

LAWYQQKPKAPKLLIYDTN

NLAD

TQE WN

S F NS

T EI

D

DT

Q

NR

T

M

V

G

E

GVPSRFRSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC

QQYNNY

PPTFGQGT

KLEIK

S

F SDWV P

TY

YI

F

P

[1226]

[1227]

hu1A11.1 친화성 성숙된 클론(표 22)을 시험관내에서 발현시키고, 정제하며 추가로 특성화하였다. 이들의 항원 결합 친화성은 실시예 1.1에 기술된 바와 같이 Biacore 기술로 측정하여, 표 24 및 표 25(하기)에 나타낸다. 세포-결합된 DLL4에 대한 결합 및 세포-결합된 DLL4-유도된 노치 활성화를 억제하는 이들의 활성을 실시예 1.3 및 1.6에 기술된 방법을 사용하여 추가로 실험하여, 표 26에 요약한다.

표 24

사람 및 사이노몰거스 원숭이 DLL4에 대한 친화성-성숙된 사람화된 1A11.1 항체 결합의 Biacore 역학

클론	Biacore 역학					
	사람 DLL4			Cyno DLL4		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
h1A11.A6	1.82 x 10 ⁺⁵	6.62 x 10 ⁻⁶	3.6 x 10 ⁻¹¹	1.71 x 10 ⁺⁵	2.10 x 10 ⁻⁵	1.2 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.C6	1.78 x 10 ⁺⁵	7.18 x 10 ⁻⁶	4.0 x 10 ⁻¹¹	1.71 x 10 ⁺⁵	3.12 x 10 ⁻⁵	1.8 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-G3	1.09 x 10 ⁺⁵	9.39 x 10 ⁻⁶	8.7 x 10 ⁻¹¹	9.90 x 10 ⁺⁴	1.73 x 10 ⁻⁵	1.7 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-F5	1.31 x 10 ⁺⁵	9.82 x 10 ⁻⁶	7.5 x 10 ⁻¹¹	1.18 x 10 ⁺⁵	2.00 x 10 ⁻⁵	1.7 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.A8	1.74 x 10 ⁺⁵	1.08 x 10 ⁻⁵	6.2 x 10 ⁻¹¹	1.60 x 10 ⁺⁵	2.40 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻¹⁰
h1A11.A11	1.83 x 10 ⁺⁵	2.66 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻¹⁰	1.70 x 10 ⁺⁵	3.35 x 10 ⁻⁵	2.0 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-E12	1.49 x 10 ⁺⁵	3.26 x 10 ⁻⁵	2.2 x 10 ⁻¹⁰	1.37 x 10 ⁺⁵	3.84 x 10 ⁻⁵	2.8 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-H2	1.43 x 10 ⁺⁵	3.85 x 10 ⁻⁵	2.7 x 10 ⁻¹⁰	1.31 x 10 ⁺⁵	4.60 x 10 ⁻⁵	3.5 x 10 ⁻¹⁰
h1A11-B5	1.30 x 10 ⁺⁵	1.34 x 10 ⁻⁴	1.0 x 10 ⁻⁹	1.17 x 10 ⁺⁵	1.78 x 10 ⁻⁴	1.5 x 10 ⁻⁹
h1A11.A2	1.42 x 10 ⁺⁵	4.21 x 10 ⁻⁴	3.0 x 10 ⁻⁹	1.34 x 10 ⁺⁵	5.27 x 10 ⁻⁴	3.9 x 10 ⁻⁹
h1A11-B4	1.57 x 10 ⁺⁵	8.23 x 10 ⁻⁴	5.2 x 10 ⁻⁹	1.43 x 10 ⁺⁵	9.90 x 10 ⁻⁴	6.9 x 10 ⁻⁹
h1A11.A7	1.70 x 10 ⁺⁵	9.73 x 10 ⁻⁴	5.7 x 10 ⁻⁹	1.58 x 10 ⁺⁵	1.24 x 10 ⁻³	7.8 x 10 ⁻⁹
h1A11.A12	1.73 x 10 ⁺⁵	1.32 x 10 ⁻³	7.6 x 10 ⁻⁹	1.58 x 10 ⁺⁵	1.62 x 10 ⁻³	1.0 x 10 ⁻⁸
h1A11.1	1.58 x 10 ⁺⁵	2.12 x 10 ⁻³	1.3 x 10 ⁻⁸	1.44 x 10 ⁺⁵	2.55 x 10 ⁻³	1.8 x 10 ⁻⁸

[1228]

표 25

마우스 및 래트 DLL4에 대한 친화성-성숙된 사람화된 1A11.1 항체 결합의

Biacore 역학

클론	Biacore 역학					
	마우스 DLL4			래트 DLL4		
	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (nM)
h1A11.A6	1.98 x 10 ⁺⁵	3.12 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻¹⁰	1.29 x 10 ⁺⁵	7.72 x 10 ⁻⁴	6.0 x 10 ⁻⁹
h1A11.C6	2.03 x 10 ⁺⁵	2.34 x 10 ⁻⁵	1.2 x 10 ⁻¹⁰	1.69 x 10 ⁺⁵	3.05 x 10 ⁻³	1.8 x 10 ⁻⁸
h1A11-G3	1.17 x 10 ⁺⁵	4.04 x 10 ⁻⁵	3.5 x 10 ⁻¹⁰	1.18 x 10 ⁺⁵	1.01 x 10 ⁻³	8.6 x 10 ⁻⁹
h1A11-F5	1.43 x 10 ⁺⁵	3.97 x 10 ⁻⁵	2.8 x 10 ⁻¹⁰	1.16 x 10 ⁺⁵	6.79 x 10 ⁻⁴	5.8 x 10 ⁻⁹
h1A11.A8	1.87 x 10 ⁺⁵	3.27 x 10 ⁻⁵	1.8 x 10 ⁻¹⁰	1.39 x 10 ⁺⁵	6.50 x 10 ⁻³	4.7 x 10 ⁻⁸
h1A11.A11	1.98 x 10 ⁺⁵	3.54 x 10 ⁻⁵	1.8 x 10 ⁻¹⁰	1.16 x 10 ⁺⁵	1.02 x 10 ⁻³	8.8 x 10 ⁻⁹
h1A11-E12	1.56 x 10 ⁺⁵	5.44 x 10 ⁻⁵	3.5 x 10 ⁻¹⁰	1.08 x 10 ⁺⁵	1.75 x 10 ⁻⁴	1.6 x 10 ⁻⁹
h1A11-H2	1.54 x 10 ⁺⁵	5.07 x 10 ⁻⁵	3.3 x 10 ⁻¹⁰	1.78 x 10 ⁺⁵	2.83 x 10 ⁻³	1.6 x 10 ⁻⁸
h1A11-B5	1.45 x 10 ⁺⁵	1.66 x 10 ⁻⁴	1.2 x 10 ⁻⁹	9.82 x 10 ⁺⁴	3.97 x 10 ⁻²	4.1 x 10 ⁻⁷
h1A11.A2	1.81 x 10 ⁺⁵	9.04 x 10 ⁻⁴	5.0 x 10 ⁻⁹	NB	NB	NB
h1A11-B4	4.79 x 10 ⁺⁵	2.51 x 10 ⁻³	5.2 x 10 ⁻⁹	NB	NB	NB
h1A11.A7	불량한 결합		1.3 x 10 ⁻⁸	NB	NB	NB
h1A11.A12	불량한 결합		1.6 x 10 ⁻⁸	NB	NB	NB
h1A11.1	1.56 x 10 ⁺⁵	4.98 x 10 ⁻³	3.2 x 10 ⁻⁸	NB	NB	NB

NB = 관찰가능한 결합 없음

표 26

친화성-성숙된 사람화된 1A11.1 항체의 세포-결합된 DLL4에 대한 시험관내

활성

	DLL4 세포에 대한 직접적인 결합, FACS (nM)		DLL4 세포를 통한 노치 활성화의 억제, 노치 리포터 검사(nM)	
	사람 DLL4	마우스 DLL4	사람 DLL4	마우스 DLL4
h1A11.A6	2.227	0.636	0.746	1.168
h1A11.C6	2.452	0.517	0.894	1.188
h1A11-G3	3.592	1.397	1.845	2.353
h1A11-F5	1.171	0.460	0.484	0.649
h1A11.A8	3.160	0.744	1.331	1.247
h1A11.A11	2.480	0.500	0.904	1.175
h1A11-E12	0.996	1.615	0.208	0.266
h1A11-H2	1.977	0.420	0.856	0.586
h1A11.A2	2.375	0.634	3.681	0.854
h1A11-B4	2.145	0.665	3.280	1.079
h1A11.A7	2.174	0.625	2.920	1.788
h1A11.A12	1.768	0.568	1.662	0.832

실시예 9. 래트 하이브리도마 항체의 분자 실체 및 물리화학적 특성

DLL4에 대해 특이적인 모노클로날 항체의 실체를 하기 기술된 바와 같이 질량 분광법으로 측정하였다.

h1A11.1의 질량 분광법 분석

- [1234] 23,501 달톤의 경쇄 분자량은 이론치에 잘 일치하였다. 중쇄 분자량은 이론치와 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50,190 달톤; 50,352 달톤; 및 50,514 달톤이었고, 상이한 글리코실화의 결과로 162 달톤에 상응하는 차이가 존재한다.
- [1235] h38H12.11의 질량분광법 분석
- [1236] 23,408 달톤의 경쇄 분자량은 이론치에 잘 일치하였다. 중쇄 분자량은 이론치에 잘 일치하였다. 관찰된 분자량은 50,368 달톤; 50,530 달톤; 및 50,692 달톤이고; 상이한 글리코실화의 결과로서 162 달톤에 상응하는 차이가 존재한다.
- [1237] 항체의 가용성은 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 3000 침전으로 추정하였다. 이들은 또한 항체를 특정 용액 및/또는 완충액 중에서 아미콘 원심분리 여과기(Amicon centrifugal filter)를 사용하여 농축시킴으로써, 예를 들면, 실제 가용성을 직접 측정 한 후 25℃ 및 5℃에서 어떠한 침전에 대해서도 관찰하였다. 안전성은 니어 자외선 순환(near ultra-violet circular: UV-CD) 및 차등 주사 열량계(DSC)에 의해 추론하였다. 동결 및 해동 및 승온에 대한 안전성(가속화된 안전성)은 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 평가하였다. 기술의 세부사항은 실시예 1.7에 기술되었으며, 결과는 하기 기술한다.
- [1238] 1A11에 대한 실제 가용성 스크리닝 결과
- [1239] hu1A11.1, hu1A11.3, hu1A11.9, hu1A11.11, 및 1A11 재조합체를 포함하는 일련의 1A11 클론의 경우, 각각 2 mg을 아미콘 원심분리 여과기로 60 mg/ml 초과까지 농축시켰다. 25℃에서 또는, 5℃에서 1일 동안 저장 후에 침전 또는 혼탁물은 관찰되지 않았다. 각각의 농도는 1A11.1의 경우 63 mg/ml, 1A11.3의 경우 76 mg/ml, 1A11.9의 경우 63 mg/ml, 1A11.11의 경우 69 mg/ml, 및 키메라 1A11의 경우 76 mg/ml이었다.
- [1240] **실시예 10. Biacore 기술에 의한 항-DLL4 항체 에피토프 그룹화**
- [1241] 에피토프 그룹화를 Biacore 2000, 3000, 및 T100 장치를 사용하여 수행하였다. 목적한 항체를 아미노 커플링을 통해 CM5 칩 표면에 직접 고정시켰다. 유사하게 고정된 관련되지 않은 IgG를 지닌 유동 셀 하나를 참조 표면으로 제공하였다. 우선, 고정된 모노클로날 항체(mAb)가 120초 동안 50 µl/분으로 재조합체 항원(적어도 200nM의 농도로)에 결합하도록 하였다. 이후에, 다른 항체를 50 µl/ml에서 120 내지 240 초 동안 주사하여 면역화된 mAb에 이미 결합된 항원에 결합하는 이의 능력을 모니터링하였다. 센소그램(sensogram)에서 추가의 결합 반응의 부재는 2개의 mAb의 에피토프내 중첩을 구성한다(하나는 칩상에 고정되고 하나는 액상으로 도입된다). 이후에, 검사의 배향을, 액상이었던 항체가 고정되는 방식 및 이러한 방식의 역으로 스위치한다. 검사의 배향 둘다에서 추가의 항체 결합을 허용하지 않는 mAb의 쌍을 이들 실험에서 실제 중첩으로 그룹화하였다. 에피토프가 중첩된 mAb의 수득되는 그룹화를 하기 표 27에 나타낸다.

표 27

BIAcore 기술에 의한 항-DLL4 항체 에피토프 그룹화

고정화된 항체	첫번째 주사	두번째 주사						
		huDLL4	38H12	15D6	13E4	1A11	14G1	14A11
38H12	+	-	+	+	+	+	+	+
15D6	+	+	-	-	-	-	-	-
13E4	+	+	-	-	-	+	-	-
1A11	+	+	-	-	-	-	-	-
14G1	+	+	+	+	+	-	-	-
14A11	+	+	-	-	-	-	-	-

- [1242] "+"는 결합함을 나타내고; "-"는 결합하지 않음을 나타낸다.

- [1243] **실시예 11. 시험관내에서 내피 세포 발아 검사(Endothelial Cell Sprouting Assay)에서 DLL4 항체의 활성**

- [1244] 피브린 겔 비드 발아 검사를 수행하여 HUVEC[2 내지 3회 계대, 제조원: 론자(Lonza)]의 시험관내 혈관형성 활성을 기술한 바와 같이(참조: Nakatsu, M. N. et al. 2003 *Microvasc. Res.* 66, 102-112) 시험하였다. 요약하면, 피브로겐 용액을 아프로티닌(4 단위/ml) 및 트롬빈(50 단위/ml)으로 재구성시켰다. 사이토크스 3 비드[제조원: 아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech)]를 비드당 350 내지 400 HUVEC로 밤새 피복시

켰다. 약 20개의 HUVEC-피복된 비드를 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰당 피브린 응괴내에 봉매하였다. 80% 합치성인 정상인 사람 섬유아세포(NHLF, 제조원: 룬자)로부터 유도된 조건화된 배지를 겔의 상부에 플레이팅하였다. 15 μ g/ml에서 DLL4 항체 및 대조군 항체 KLH를 웰에 가하였다. 10 및 12일째에, 영상을 역위된 현미경 및 니콘(Nikon) CCD 카메라를 사용하여 취하였다. 표 28은 시험관내에서 내피 세포 발아를 향상시키는 일부 DLL4 항체의 활성을 요약한다[참조: Nakatsu et al., "Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1," *Microvasc. Res.* 66, 102-112 (2003)].

표 28

내피 세포 발아를 자극하는 DLL4 항체의 활성

시험된 항체	HUVEC 발아 자극
38H12 래트 mAb	있음
1A11 래트 mAb	있음
h1A11.1	있음
40B10 래트 mAb	관찰되지 않음
32C7 래트 mAb	관찰되지 않음

[1245]

실시예 12. 하이브리도마-유도된 항체의 설치류 PK 평가

[1246]

[1247]

항-DLL4 항체의 약력학적 특성을 평가하기 위해, SCID-베이지(Beige) 마우스(항체당 n=3)에게 1, 5, 10, 또는 30 mg/kg의 농도에서 항체의 단일 복강내(IP) 용량을 묶인 DLL4에 대한 항체의 교차-반응성에 따라 투여하였다. 종측 혈청 시료(시점당 HBS-EP+완충액 중에서 1:50으로 희석된 전혈 5 μ l)를 각각의 동물로부터 21일에 걸쳐 수집하였다. 혈청 농도를 DLL4-특이적인 Biacore 플랫폼을 사용하여 측정하였다. 요약하면, 사람 DLL4를 센서칩(sensorchip)에 고정화시키고 시료를 유동셀(flowcell) 위에 분당 5 μ l에서 5분 동안 주사하고 수득되는 결합 수준을 측정하여 표준물에 대해 비교하였다. 혈청 농도 시간 프로파일을 사용하여 C_{max}(최대 혈청 농도), CL(청소율), 및 t_{1/2}(항체 반감기)의 약력학적 매개변수를 추정하여, 하기 표 29에 요약하였다.

표 29

단일의 복강내 투약 후 SCID-베이지 마우스에서의 항-DLL4 항체의 약동학적

매개변수

항체	용량 (mg/kg)	C _{max} (μ g/mL)	CL (mL/hr/kg)	t _{1/2} (d)
38H12 래트 mAb	5	30.2	0.3	20-29
h1A11.1	30	163	0.44	11.3
h1A11.1	10	49.9	0.50	9.9
h1A11.1	5	11.0	1.78	6.3
h1A11.1	1	3.1	2.16	4.4

[1248]

실시예 13. DLL4 항체 치료는 생체내 종양 성장을 억제하였다.

[1249]

[1250]

종양 성장에 있어서 항-DLL4 항체의 효과를 SCID-베이지 마우스에 이식된 피하 Calu-6 이종이식체 종양에서 평가하였다. 요약하면, 2 x 10⁶개의 세포를 암컷 SCID-베이지 마우스의 우측 뒤 옆구리내로 피하 접종하였다. 종양이 14 내지 18일 동안 확립되도록 하고, 이 시점에서 종양 용적을 전자 캘리퍼 측정(electronic caliper measurement)을 사용하여 측정하였다. 종양 크기를 수학적식: L x W²/2을 사용하여 계산하였다. 마우스를 치료 그룹(n = 그룹 당 10마리)내로 할당함으로써 동물의 각각의 집단(cohort)이 치료요법 개시 전에 동등한 평균 종양 용적(전형적으로 180 내지 250mm³)을 갖도록 하였다. 이후에, 동물에게 항-DLL4 항체를 주당 2회로 2주 동안(총 4회 용량) 또는 4주 동안 매주 복강내 투약하였다. 종양 용적을, 각각의 그룹에서 평균 종양 용적이 \geq

2,000 mm³의 종점에 이를 때까지 실험 과정 동안 1주에 평균 2회 측정하였다. 결과는 하기 표 30에 나타낸다.

표 30

Calu-6 사람 비-소세포 폐암 피하 이종이식체 모델에서의 항-DLL4 항체의 효
능

치료	용량, 경로, 치료 계획	%T/C ^a	%ILS ^b
1A11 래트 mAb	30 mg/kg, IP, 2X/주 X2	37**	89**
1A11 래트 mAb	10 mg/kg, IP, 2X/주 X2	47**	39**
1A11 래트 mAb	5 mg/kg, IP, 2X/주 X2	43**	57**
14A11 래트 mAb	10 mg/kg, IP, 2X/주 X2	37**	57**
40B10 래트 mAb	30 mg/kg, IP, 2X/주 X2	29**	89**
32C7 래트 mAb	30 mg/kg, IP, 2X/주 X2	65*	28*
14A11 키메라	10 mg/kg, IP, q7dX4	32**	114**
15D6 키메라	10 mg/kg, IP, q7dX4	47**	57**
40B10 키메라	10 mg/kg, IP, q7dX4	43**	73**
32C7 키메라	10 mg/kg, IP, q7dX4	71*	18*
h1A11.1	10 mg/kg, IP, q7dX4	34**	75**
h1A11.1	5 mg/kg, IP, q7dX4	31**	80**
h1A11.1	1 mg/kg, IP, q7dX4	43**	36**
h1A11.1	0.5 mg/kg, IP, q7dX4	62**	25*

^a %T/C = 치료 그룹의 평균 종양 용적/치료 대조군 그룹의 종양 용적 x 100.
P 값(별표로 나타냄)은 치료 그룹 대 치료 대조군 그룹의 스튜던츠 T 시험(Student's T test) 비교로부터 유도되었다. 25/26/27일 측정 기준.

^b %ILS = (T - C)/C x 100(여기서, T = 치료 그룹의 종점까지의 종양 시간이고, C = 치료 대조군 그룹의 종점까지의 종양 시간이다. P 값(별표로 나타냄)은 치료 그룹 대 치료 대조군 그룹의 카플란 마이어 로그-랭크 비교(Kaplan Meier log-rank comparison)로부터 유도되었다. 2000 mm³의 종점 기준.

*p < 0.05; **p < 0.001

[1251]

[1252]

참조 문헌의 인용

[1253]

본원 전체에서 인용될 수 있는 모든 인용된 문헌(문헌 참조, 특허, 특허원, 및 웹사이트 포함)의 내용은 이들 문헌에 인용된 참조문헌들과 같이, 특정 목적을 위해 이들의 전문이 참조로 본원에 표현하여 인용된다.

[1254]

등가물

[1255]

본 발명은 이의 취지 또는 필수적인 특징으로부터 벗어남이 없이 다른 구체적인 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 앞서의 실시형태들은 모든 양상에서 본원에 기술된 발명을 제한하는 것이 아니라 나열하는 것으로 고려되어야 한다. 따라서, 본 발명의 영역은 앞서의 기술에 의해서라기보다는 첨부된 특허청구범위에 의해 나타나므로,

특허청구범위의 등가의 의미 및 범위 내에 있는 모든 변화는 본원에 포함되는 것으로 의도된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ABBOTT LABORATORIES

<120> THERAPEUTIC DLL4 BINDING PROTEINS

<130> 10920W001

<150> US 61/309,494

<151> 2010-03-02

<160> 206

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu

20 25 30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg

35 40 45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His

50 55 60

Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser

65 70 75 80

Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser

85 90 95

Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro

100 105 110

Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp

115 120 125

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

130 135 140
 Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
 145 150 155 160

 Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
 165 170 175
 Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
 180 185 190
 Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
 195 200 205
 Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 215 220

 Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 230 235 240
 Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
 245 250 255
 Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 265 270
 Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 280 285

 Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
 305 310 315 320
 Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
 340 345 350

 Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
 355 360 365
 Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
 370 375 380

Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
 385 390 395 400
 Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
 405 410 415

Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
 420 425 430
 Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445
 Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 470 475 480

Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 490 495
 Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 505 510
 Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 520 525
 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 535 540

Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 550 555 560
 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 570 575
 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 585 590
 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 600 605

Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 615 620
 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu

625 630 635 640
 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 650 655
 Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670

Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 2

<211> 2058

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg	60
cagcagcgcg cgcccggtc cgccgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag	120
cgcgcgctac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggt gccggacttt ctccgcgtc	180
tgcttaagc acttcaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc	240
acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc	300
aacctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta cttctcgt catcatcgaa	360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcaactatc	420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa	480
accagcacc tcacaaggct gcgctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat	540
ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc	600
cagccagatg gcaactgtc ctgcctgccc ggttggactg gggaatattg ccaacagcct	660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc	720
tgccgcccag gctggcaggg ccggtgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc	780
cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt	840
tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaactgtc	900
tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggtacac tgggtggac	960
tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag	1020
gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggt actatggcct gcattgtgaa	1080
cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgettcaatg ggggtcctg ccgggagcgc	1140

aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagtg cctgaaccga 1260
ggccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
gtcagcgact gtgcccgtaa cccttgcgcc cacggtggca cttgccatga cctggagaat 1380
gggctcatgt gcacctgcc tgcggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc 1440
atcgatgcct gtgcctcgag tcctgtcttc aacaggcca cctgtctacac cgacctctcc 1500
acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagttcccc 1560

gtgggcttgc cgccagctt ccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagtg 1620
ctgtcgttac tgctgggcat ggtggcagtg gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg 1680
gacgacggca gcaggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtga ctgtggcctg 1800
gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccaggg 1860
cccctggggc gggggaccat gccaggaaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
aaggcgccac tgcggttaca cagtgaagc ccagagtgtc ggatatcagc gatatgctcc 1980

cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
attgccacgg aggtataa 2058

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

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

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85

90

95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 6

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35

40

45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys

50

55

60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser

65

70

75

80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu

85

90

95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

105

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Any amino acid

<400> 7

Phe Gly Xaa Gly

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(9)

<223> Any amino acid

<400> 8

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 9

Leu Glu Trp Ile Gly

1 5

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<

<223> Any amino acid

<400> 10

Trp Gly Xaa Gly

1

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

20 25 30

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 17

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 Ala Arg

20 25 30

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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

20 25 30

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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 Ala Arg

20 25 30

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

20 25 30

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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 Ala Arg

20 25 30

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 34

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser

20 25 30

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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
 20 25 30

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

1 5 10

<210> 41

<211>

> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 30

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10

<210> 45

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Glu 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

20 25 30

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 56

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 58

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 59

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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 Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

1 5 10

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 63

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

1 5 10

<210> 65

<211

> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 67

<211> 30

<212> PRT

<213

> Homo sapiens

<400> 67

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Trp Ile Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 69

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

1 5 10 15

Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 71

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser

20 25 30

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 75

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ser Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

1 5 10

<210> 77

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 80

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

1 5 10

<210> 81

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<400> 82

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 83

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

20

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

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

1 5 10 15

<210> 85

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 87

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1 5 10 15

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys			
	20	25	30

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

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

<210> 91

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

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

20

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

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

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 94

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 95

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 96

<211> 15

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

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

1 5 10 15

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 99

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

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

20

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

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

1 5 10 15

<210> 101

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

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> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1

5

10

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1

5

10

15

<210> 105

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 105

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> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

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

1 5 10 15

<210> 109

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Phe Gly Tyr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 111

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 112

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

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

1 5 10 15

<210> 113

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

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

1 5 10 15

Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

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

1 5 10 15

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 119

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Leu Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

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

1 5 10 15

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20 25 30

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

1 5 10

<210> 123

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 125

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 127

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Glu Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Val Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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

1 5 10 15

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

20

25

30

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 131

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Asp Tyr Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

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

1 5 10 15

<210> 133

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

1 5 10

<210> 135

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

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

1 5 10 15

<210> 137

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20 25 30

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 139

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 140

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

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

1 5 10 15

<210> 141

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Met Asp Glu Ala Asp Tyr Leu Cys

20 25 30

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 143

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser, Arg or Gly

<400> 143

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 Xaa

20 25 30

<210> 144

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 144

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

1 5 10

<210> 145

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Asn or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Ala or Ser

<400> 145

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 147

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 147

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

20

<210> 148

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Ala or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Phe or Tyr

<400> 148

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

1 5 10 15

<210> 149

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Phe or Ser

<400> 149

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Xaa 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> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 150

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 151

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Asn, His or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Ala or Ser

<400> 151

Xaa Phe Pro Met Xaa

1 5

<210> 152

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Thr or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Ser or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Gly, Ala, Asp, Ser or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Thr or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Thr, Pro or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Tyr, Ser, Thr or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Tyr or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Arg or Gly

<400> 152

Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Tyr, Phe or Ser

<400> 153

Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Xaa

1 5

<210> 154

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221>

MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Glu or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Asp or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Tyr or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ser, Ile, Tyr, Asn or Arg

<400> 154

Arg Ala Ser Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Asn or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Asn, Asp, Ser, Ile, Tyr or Val

<400> 155

Asp Thr Xaa Xaa Leu Ala Asp

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Asn, Asp or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Asn, Tyr or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Tyr or Val

<400> 156

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Pro Thr

1 5

<210> 157

<211> 118

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 157

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Gln Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr His Cys

85 90 95

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 158

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 158

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

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

<210> 159

<211> 118

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 159

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

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

65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 160

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 160

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

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

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

<210> 161

<211> 122

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 161

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met

65 70 75 80

Val Tyr Val Gln Met Asp Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Ala Ala Pro Trp Arg Asp Ser Tyr Ala His Val Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 162

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 162

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile His Lys Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Asp His Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Gly Gly Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 163

<211> 116

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 163

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Val

20

25

30

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

35

40

45

Ala Thr Ile Thr Asn Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Ser Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85

90

95

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

100

105

110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 164

<211> 109

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 164

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

1 5 10 15

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

20

25

30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Asp Ala Asn Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105
 <210>
 165
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.
 <400> 165
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Asn Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Ile Tyr Ser Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Glu Gly Asn Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Val Lys Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 166

<211> 108

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 166

```

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

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

           100          105

```

<210> 167

<211> 121

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 167

```

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

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

```

65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Lys Ser Ile Leu Leu Gly Ser Thr Cys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 168

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 168

Asn Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln

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

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

<210> 169

<211> 121

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 169

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Ile Lys Gln Thr Thr Gly Gln Gly Leu Glu Tyr Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Thr Gly Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Arg Thr Val Phe

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Ser Ile Leu Leu Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 170

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 170

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Ser Leu Ser Ser Pro Met

20 25 30

Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Gln Pro Arg

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Trp Ser

85 90 95
 Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 171

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 171

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

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

<210> 172

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 172

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

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

115

<210> 173

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 173

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

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

<210> 174

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 174

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

<210> 175

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 175

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 176

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 176

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 177

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 177

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 178

<

211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 178

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 179

<

211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 179

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 180

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 180

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 181

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 181

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ile Ser His Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 182

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 182

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

 85 90 95
 Ala Ala Leu Asn Trp Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 183

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 183

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Asn Arg Leu Gln Asp 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 Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu

85 90 95

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

100 105

<210> 184

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 184

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	Glu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Asn
20				25				30							
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
35				40				45							
Tyr	Ala	Ala	Asn	Arg	Leu	Gln	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50				55				60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70				75				80			

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 185

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 185

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 186

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu

85 90 95

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

100 105

<210> 187

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 187

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 Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 188

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 188

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 Arg His Phe

20 25 30
Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 189

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 189

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 Gly Asn Phe

20 25 30
Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Ser Ser Asp Ser Trp Ala Thr Ile Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 190

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 190

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 Arg Asn Phe
20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 191

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 191

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 Arg His Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 192

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 192

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 Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

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

 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 193

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 193

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 Arg Tyr Phe
 20 25 30

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 194

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 194

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 Arg Tyr Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Ile Ser Gly Ser Asp Gly Trp Ala Ser Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 195

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 195

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 Arg His Phe

20 25 30

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

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ala Trp Pro Ser Tyr Arg Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 196

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 196

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 Gly Asn Phe

20 25 30

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

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Tyr Asn Ser Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 197

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 197

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 Glu Asp Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Thr Asn Asn Leu Ala Asp 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 Tyr Asn Asn Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 198

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 198

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 Ile Tyr Ile Asn

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Thr Asn Asp Leu Ala Asp 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 Tyr Asp Tyr Val Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 199

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 199

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 Ile Tyr Tyr Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Asp Thr Ser Ser Leu Ala Asp 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 Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Trp Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 200

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 200

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 Ile Tyr Ile Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Asp Thr Ser Asp Leu Ala Asp 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 Tyr Asp Tyr Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 201

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 201

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 Ile Tyr Tyr Asn

20 25 30

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

35 40 45

Phe Asp Thr Asn Ile Leu Ala Asp 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 Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Val Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 202

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 202

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 Ile Trp Asn Asn

20 25 30

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

35 40 45
Phe Asp Thr Ser Tyr Leu Ala Asp 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 Tyr Asp Trp Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 203

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 203

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

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

<210> 204

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser, Arg, Asn, Gly, Lys, Thr or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Asn, Tyr, His, Ser or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> Phe or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (35)..(35)

<223> Ala, Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (50)..(50)

<223> Thr, Ser or Ala

<220><221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Ser or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (56)..(56)

<223> Gly, Ser, Ala, Glu, Asp, Phe, Gln or Cys

<220><221> MOD_RES

<222> (57)..(57)

<

223> Thr, Ser, Phe or Trp

<220><221> MOD_RES

<222> (58)..(58)

<223> Thr, Ala, Asp, Ser or Pro

<220><221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Tyr, Ser, Asn, Thr, Ala or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (60)..(60)

<223> Tyr or Ile

<220><221> MOD_RES

<222> (61)..(61)

<223> Arg or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (77)..(77)

<223> Asn or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (78)..(78)

<223> Ser or Leu

<220><221> MOD_RES

<222> (89)..(89)

<223> Glu or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (106)..(106)

<223> Ala or Asp

<220><221> MOD_RES

<222> (107)..(107)

<223> Tyr, Phe or Ser

<400> 204

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 Xaa Xaa Xaa

20 25 30

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

35 40 45

Ala Xaa Ile Ser Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

<210> 205

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Ser or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Glu or Gln

<220><221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

<223> Asp, Glu or Thr

<220><221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Tyr, Trp, Glu, Asp or Asn

<220><221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Ser, Asn, Ile, Thr, Arg, Met or Gly

<220><221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> Ala or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (49)..(49)

<223> Tyr or Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (53)..(53)

<223> Asn, Ser, Asp, Gln, Thr, Val or Glu

<220><221> MOD_RES

<222> (71)..(71)

<223> Phe or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (87)..(87)

<223> Tyr or Phe

<220><221> MOD_RES

<222> (91)..(91)

<223> Tyr or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (92)..(92)

<223> Asn, Asp, Thr or Tyr

<220><221> MOD_RES

<222> (93)..(93)

<223> Asn, Trp, Tyr, Ile, Phe or Pro

<220><221> MOD_RES

<222>

(94)..(94)

<223> Tyr or Val

<220><221> MOD_RES

<222> (97)..(97)

<223> Thr or Pro

<400> 205

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 Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asn

 20 25 30

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

 35 40 45

Xaa Asp Thr Asn Xaa Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

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

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 206

His His His His His His

1 5