



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0018523
(43) 공개일자 2010년02월17일

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7024920

(22) 출원일자 2008년04월25일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년11월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/061513

(87) 국제공개번호 WO 2008/137338

국제공개일자 2008년11월13일

(30) 우선권주장

60/915,340 2007년05월01일 미국(US)

(71) 출원인

제넨테크, 인크.

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

(72) 발명자

반 로케렌 캄파뉴, 멘노

미국 94127 캘리포니아주 샌 프란시스코 몰리모
드라이브 261

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 27 항

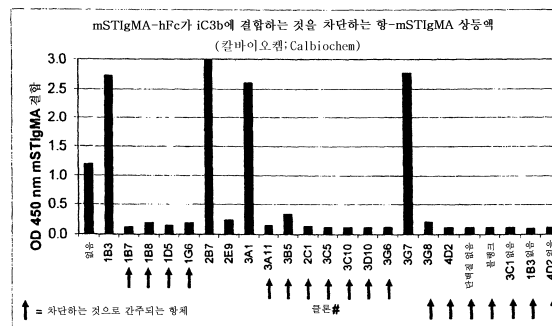
(54) C R I g 길항제

(57) 요 약

본 발명은 최근에 발견된 대식세포 특이적 수용체인 CRiG에 특이적으로 결합하는 차단 항체, 및 세포내 병원체, 예컨대 바이러스, 박테리아 또는 기생충의 세포 진입의 방지, 뿐만 아니라 적혈구 및 혈소판의 원치 않는 소거의 방지를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4

iC3b에 대한 튜린 STiGMA 결합을 차단하는
항체의 평가



특허청구의 범위

청구항 1

천연 서열 CRIg 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하고, 세포내 병원체의 CRIg-매개 보체-의 존적 세포 진입을 억제하거나 세포내 병원체를 순환으로부터 소거하는 CRIg 길항제.

청구항 2

제1항에 있어서, 항-CRIg 항체 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 3

제2항에 있어서, 모노클로날 항체 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 4

제3항에 있어서, 항체 단편이 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자, 미니바디(minibody), 디아바디(diabody), 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 CRIg 길항제.

청구항 5

제3항에 있어서, 14G8 (ATCC 기탁 번호 PTA-8298), 3D10 (ATCC 기탁 번호 PTA-8299) 및 2H1 (ATCC 기탁 번호 PTA-8300)로 이루어진 군으로부터 선택된 항-CRIg 항체와 동일한 에피토프에 본질적으로 결합하는 모노클로날 항체, 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 6

제3항에 있어서, 14G8 (ATCC 기탁 번호 PTA-8298), 3D10 (ATCC 기탁 번호 PTA-8299) 및 2H1 (ATCC 기탁 번호 PTA-8300)로 이루어진 군으로부터 선택된 모노클로날 항-CRIg 항체, 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체, 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항체가 인간화 항체, 또는 이의 단편인 CRIg 길항제.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 세포내 병원체가 바이러스, 기생충, 박테리아, 진균 및 프리온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 CRIg 길항제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 병원체가 RNA 또는 DNA 바이러스인 CRIg 길항제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 바이러스가 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), A형, B형 및 C형 간염 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스 (EBV), 및 인간 유두종 바이러스 (HPV)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 CRIg 길항제.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 병원체가 기생충인 CRIg 길항제.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 병원체가 박테리아인 CRlg 길항제.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 병원체가 진균인 CRlg 길항제.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 병원체가 프리온인 CRlg 길항제.

청구항 16

제3항의 항체를 코딩하는 핵산, 또는 이의 단편.

청구항 17

제1항 또는 제3항의 CRlg 길항제를 담체와 함께 포함하는 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 제약 조성물인 조성물.

청구항 19

세포내 병원체의 CRlg-매개 보체-의존적 세포 진입의 억제를 필요로 하는 포유류 대상체에게 유효량의 CRlg 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 세포내 병원체의 CRlg-매개 보체-의존적 세포 진입을 억제하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 포유류 대상체가 인간인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 CRlg 길항제가 항-CRlg 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 22

포유류 대상체에게 유효량의 CRlg 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상체의 순환으로부터 세포내 병원체를 소거하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 포유류 대상체가 인간인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 CRlg 길항제가 항-CRlg 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 25

감염성 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 포유류 대상체에게 유효량의 CRlg 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 감염성 질환의 예방 또는 치료 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 CRlg 길항제가 항-CRlg 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 27

CRlg 길항제 및 감염성 질환을 치료하기 위해 상기 CRlg 길항제를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 최근에 발견된 대식세포 특이적 수용체인 CRIg에 특이적으로 결합하는 차단 항체, 및 세포내 병원체, 예컨대 바이러스, 박테리아 또는 기생충의 세포 진입의 방지, 뿐만 아니라 적혈구 및 혈소판의 원치 않는 소거의 방지를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 보체 시스템

[0003] 보체 시스템은 정상적으로는 불활성의 효소전구체(pro-enzyme) 형태로 존재하는 일련의 혈청 당단백질들로 구성된 복합적인 효소 캐스케이드이다. 2가지 주요 경로인 통상적 경로 및 대안적 경로가 보체를 활성화시킬 수 있고, 이들은 C3 수준에서 병합되며, 이때 2개의 유사한 C3 전환효소가 C3을 C3a 및 C3b로 절단한다.

[0004] 대식세포는 세포-표면에서 발현된 확인 태그(tag), 소위 분자 패턴에서의 미세한 차이를 인식하는 선천적인 능력이 발달된 특화 세포이다 ([Taylor, et al., Eur J Immunol 33, 2090-2097 (2003)]; [Taylor, et al., Annu Rev Immunol 23, 901-944 (2005)]). 이러한 표면 구조들의 직접적인 인식이 선천적 면역성의 기초적인 양상인 한편, 옹소닌화는 일반적인 대식세포 수용체가 포식을 매개하도록 허용하여, 포식세포의 효능을 증가시키고 이의 인식 레퍼토리를 다양화시킨다 ([Stuart and Ezekowitz, Immunity 22, 539-550 (2005)]). 포식작용 과정은 다중 리간드-수용체 상호작용을 수반하고, 면역글로불린, 콜렉틴 및 보체 성분이 포함되는 다양한 옹소닌이 대식세포 세포 표면 수용체와의 상호작용을 통한 병원체 내재화에 필요한 세포 활성들을 안내한다는 것이 현재 자명하다 ([Aderem and Underhill, Annu Rev Immunol 17, 593-623 (1999)]; [Underhill and Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825-852 (2002)]에 리뷰되어 있음). 생식계열 유전자에 의해 코딩되는 천연 면역글로불린은 광범위한 병원체를 인식할 수 있는 한편, 대다수의 옹소닌화 IgG는 후천적 면역성을 통해 생성되고, 따라서 Fc 수용체를 통한 효율적인 소거는 즉각적이지 않다 ([Carroll, Nat Immunol 5, 981-986 (2004)]). 반면에, 보체는 병원체 표면 분자를 신속하게 인식하고, 입자를 보체 수용체에 의한 흡수에 대해 준비시킨다 ([Brown, Infect Agents Dis 1, 63-70 (1991)]).

[0005] 보체는 보체 수용체에 의한 인식을 위해 광범위한 병원체를 옹소닌화하는 30가지 초과 혈청 단백질로 구성된다. 캐스케이드의 초기 촉진물질에 따라, 3가지 경로가 구별될 수 있다 ([Walport, N Engl J Med 344, 1058-1066 (2001)]에 리뷰되어 있음). 3가지 경로 모두 중심 성분인 C3을 활성화시키는 공통적인 단계를 공유하지만, 인식의 성질, 및 C3 활성화를 유도하는 최초의 생화학적 단계에 따라 상이하다. 통상적 경로는 병원체 표면에 결합된 항체에 의해 활성화되고, 차례로 상기 항체가 C1q 보체 성분에 결합하여, 세린 프로테아제 캐스케이드를 시작하게 하고, 이러한 캐스케이드가 궁극적으로 C3을 이의 활성 형태인 C3b로 절단한다. 력틴 경로는 력틴 단백질에 의한 탄수화물 모티프의 인식 후에 활성화된다. 현재까지, 이러한 경로의 3개의 구성원이 확인되어 있다: 만노스-결합 력틴 (MBL), SIGN-R1 부류의 력틴 및 피콜린 ([Pyz et al., Ann Med 38, 242-251 (2006)]). MBL 및 피콜린 양쪽 모두 세린 프로테아제와 회합되고, 이는 통상적 경로에서의 C1과 유사하게 작용하여, 성분 C2 및 C4를 활성화시켜 중심 C3 단계에 이르게 한다. 대안적 경로는 내부 C3 에스테르와 병원체 표면 상의 인식 모티프의 직접적인 반응으로 인해 활성화된다는 점에서 통상적 경로 및 력틴 경로 양쪽 모두와 대조적이다. 활성화 표면에 대한 최초의 C3 결합은 대안적 경로 프로테아제 인자 B 및 인자 D의 작용을 통해 C3b 축적을 신속하게 증폭시킨다. 중요하게, 통상적 경로 또는 력틴 경로에 의해 축적된 C3b가 또한 인자 B 및 인자 D의 작용을 통해 C3b 축적을 증폭시킬 수 있다. 보체 활성화의 3가지 경로 모두에서, 옹소닌화에서의 중추적인 단계는 성분 C3이 C3b로 전환되는 것이다. 보체 캐스케이드의 효소에 의한 C3의 절단은 티오에스테르를 친핵성 공격에 노출시켜, C3b가 티오에스테르 도메인을 통해 항원 표면 상에 공유결합에 의해 부착되도록 한다. 이는 보체 옹소닌화에서의 최초의 단계이다. 이어지는 결합된 C3b의 단백질분해로 상이한 수용체들에 의해 인식되는 단편들인 iC3b, C3c 및 C3dg가 생산된다 ([Ross and Medof, Adv Immunol 37, 217-267 (1985)]). 추가로 C3b 축적을 증폭시키고, 막 손상을 지시할 수 있는 막 공격 복합체가 포함되는 보체 캐스케이드의 후기 성분들을 활성화시키는 C3b의 능력이 이러한 절단에 의해 폐지된다. 그러나, 대식세포 포식 수용체가 C3b 및 이의 단편을 우선적으로 인식한다; 에스테르-결합 형성의 다능성으로 인해, C3-매개 옹소닌화가 병원체 인식에 중요하고 ([Holers et al., Immunol Today 13, 231-236 (1992)]), 따라서 다양한 C3 분해 생성물에 대한 수용체가 숙주 면역 응답에서 중요한 역할을 한다.

[0006] C3 자체는 13개의 독특한 도메인들로 구성된 복합적이고 가요성인 단백질이다. 분자의 코어(core)는 8개의 소위 마크로글로불린 (MG) 도메인으로 만들어지고, 이들은 C3의 단단하게 패키징(packing)된 α 및 β 사슬을 구

성한다. CUB (C1r/C1s, Uegf & 골 형태형성 단백질(Bone morphogenetic protein)-1), 및 C3b와 병원체 표면의 공유결합에 의한 회합을 허용하는 티오에스테르 결합을 함유하는 TED 도메인이 이러한 구조 내로 삽입된다. 나머지 도메인은 C3a를 함유하거나, 코어 도메인들의 링커 또는 스페이서로 작용한다. C3b 및 C3c 대 C3의 구조 비교는 각각의 단백질분해로 분자에 주요 입체형상 재배열이 진행되고, 이는 TED, 뿐만 아니라 세포 수용체와 상호작용할 수 있는 분자의 추가적인 새로운 표면을 노출시킨다는 것을 나타낸다 ([Janssen and Gros, Mol Immunol 44, 3-10 (2007)]).

[0007] 포식 세포 상의 보체 C3 수용체

[0008] 보체 수용체의 3가지 유전자 거대부류가 공지되어 있다: CR1 및 CR2를 코딩하는 짧은 컨센서스 반복물 (SCR: short consensus repeat) 모듈, 베타-2 인테그린 부류 구성원 CR3 및 CR4, 및 면역글로불린 Ig-거대부류 구성원 CR1g.

[0009] CR1은 30개의 짧은 컨센서스 반복물 (SCR)로 구성된 180-210 kDa의 당단백질이고, 면역 복합체 소거에서 중요한 기능을 한다. SCR은 아미노산 약 60개의 모듈형 구조이고, 구조적 강직성을 제공하는 2쌍의 디설피드 결합이 각각 있다. C3b 및 C4b 양쪽 모두에 대한 고친화력 결합이 각각 3개의 SCR로 구성되는 2개의 독특한 부위를 통해 발생한다 ([Krych-Goldberg and Atkinson, Immunol Rev 180, 112-122 (2001)]에 리뷰되어 있음). CR1의 SCR 15-17 내에 함유된 C3b 결합 부위 (부위 2)의 구조가 MRI에 의해 결정되어 ([Smith et al., Cell 108, 769-780 (2002)]), 3개의 모듈이 16-17 접합부에서의 가요성이 있는 확장된 머리-꼬리(head-to-tail) 배열로 존재한다는 것이 밝혀졌다. 구조에 의해 안내된 돌연변이유발로 C4b 결합에 결정적인 모듈 15 상에서 양성 전하를 띠는 표면 영역이 확인되었다. 이러한 패치(patch)가, CR1의 동일한 측면 상에 노출된 모듈 16의 염기성 측쇄와 함께, C3b 결합에 필요하다. 면역 부착 수용체로서 최초로 기술된 CR1 ([Rothman et al., J Immunol 115, 1312-1315 (1975)])의 주요 기능은 운송 및 간에 의한 소거를 위해 적혈구 상의 IC를 포획하는 것이다 ([Taylor et al., Clin Immunol Immunopathol 82, 49-59 (1997)]). 중성구 상에서 CR1에 대해 포식작용에서의 역할이 있지만, 조직 대식세포에서는 없다 ([Sengelov et al., J Immunol 153, 804-810 (1994)]). 면역 복합체의 소거에서의 역할에 더하여, CR1은 각각의 전환효소와의 상호작용을 통해 통상적 경로 및 대안적 경로 양쪽 모두의 활성화의 강력한 억제제이다 (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001, 상기 문헌); [Krych-Goldberg et al., J Biol Chem 274, 31160-31 168 (1999)]. 마우스에서, CR1 및 CR2는 별법적인 스플라이싱(splicing)에 의해 형성된 동일한 유전자의 2가지 생성물이고, B-림프구 및 여포상 수지 세포와 우선적으로 회합되며, 주로 B-세포 응답의 조절에서 기능을 한다 ([Molina et al., 1996]). CR1의 마우스의 기능적 등가물인 Crry는 통상적 경로 및 대안적 경로 효소를 불활성화시키고, 포식성 수용체보다는 보체 활성화의 내인성 조절인자로서 작용한다 ([Molina et al., Proc Natl Acad Sci USA 93, 3357-3361 (1992)]).

[0010] CR2 (CD21)는 iC3b 및 C3dg에 결합하고, B 세포 면역을 강화시키는 주요 보체 수용체이다 ([Carroll, Nat Immunol 5, 981-986 (2004)]; [Weis et al., Proc Natl Acad Sci USA 81, 881-885 (1984)]). C3d로 코팅된 항원이 동족 B 세포에 흡수되면, B 세포 항원 수용체를 통해 강화된 신호가 초래된다. 따라서, CD21-CD19-CD81 공동수용체와 B 세포 항원 수용체의 공동고용(coengagement)은 B 세포 활성화의 역치를 낮추고, 중요한 생존 신호를 제공한다 ([Matsumoto et al., J Exp Med 173, 55- 64 (1991)]). iC3b 상의 CR2 결합 부위가 TED와 MG1 도메인 간의 계면 상에서 부분적으로 지도로 작성되었다 ([Clemenza and Isenman, J Immunol 165, 3839-3848 (2000)]).

[0011] CR3 및 CR4는 알파 서브유닛 (각각 CD11b 또는 α_M 및 CD11c 또는 α_X) 및 공통적인 베타 사슬 (CD18 또는 β_2)로 구성된 막형단 이종이량체이고, 세포외 매트릭스 및 다른 세포에 대한 부착, 뿐만 아니라 iC3b의 인식에서 수반된다. 이들은 인테그린 부류에 속하고, 포식작용뿐만 아니라 백혈구 트래피킹(trafficking) 및 이동, 시냅스 형성 및 공동자극에서 또한 기능을 수행한다 ([Ross, Adv Immunol 37, 217-267 (2000)]에 리뷰되어 있음). 인테그린 부착성은 인테그린을 저친화력에서 고친화력 결합 상태로 전환시키는 인사이드-아웃(inside-out) 신호 전달로 칭해지는 과정을 통해 조절된다 ([Liddington and Ginsberg, J Cell Biol 158, 833-839 (2002)]). 또한, 리간드 결합은 신호를 세포외 도메인으로부터 세포질로 변환시킨다. iC3b의 결합 부위가 CR3 및 CR4의 알파 사슬 상의 여러 도메인에 대해 지도로 작성되었다 ([Diamond et al., J Cell Biol 120, 1031-1043 (1993)]; [Li and Zhang, J Biol Chem 278, 34395-34402 (2003)]; [Xiong and Zhang, J Biol Chem 278, 34395-34402 (2001)]). CR3에 대한 여러 리간드인 iC3b, 베타-글루칸 및 ICAM-1은 CD11b의 I 도메인 내에 함유된 부분적으로 중복되는 부위에 결합하는 것으로 보인다 ([Balsam et al., 1998]; [Diamond et al., 1990]; [Zhang and Plow, 1996]). 단백질분해에 의해 불활성화된 형태의 C3b인 iC3b의 특이적 인식이 CR3 결합 부위를 C3b 내의

CUB 도메인의 언폴딩(unfolding) 시 노출되게 되는 잔기에 위치시키는 구조적 연구를 기초로 예측되고 ([Nishida et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, 19737-19742 (2006)]), 상기 언폴딩은 보체 조절 프로테아제인 인자 I에 의한 α' 사슬 절단 시에 발생한다.

[0012] CRIG는 A33 항원 및 JAM1에 대한 상동성이 있는 신규 대식세포-회합 수용체이다. 인간 JAM1의 보존된 Ig 도메인을 인식하는 다의성(degenerate) 프라이머를 사용하여 인간 태아 cDNA로부터 인간 CRIG 단백질이 최초로 클로닝되었다. 여러 클론의 서열분석은 아미노산 400개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 나타냈다. BLAST 검색으로 제1형 막횡단 단백질인 Z39Ig에 대한 유사성이 확인되었다 ([Langnaese et al., Biochim Biophys Acta 1492 (2000) 522-525]). 이러한 분자의 세포외 영역은 N-말단 V-set 도메인 및 C-말단 C2-set 도메인을 포함하는 2개의 Ig-유사 도메인으로 구성되는 것으로 발견되었다. 이러한 신규 인간 단백질은 "단일 막횡단 Ig 거대부류 구성원 대식세포 회합물" (huSTIGMA: single transmembrane Ig superfamily member macrophage associated)로 최초로 칭해졌다. 이어서, 3' 및 5' 프라이머를 사용하여, huSTIGMA의 스플라이스 변이체가 클로닝되었는데, 이는 막 인접 IgC 도메인이 없고, 아미노산 50개가 더 짧았다. 따라서, 이러한 인간 단백질의 더 짧은 스플라이스 변이체는 huSTIGMAshort로 칭해졌다. huSTIGMA의 아미노산 서열 (PRO362로 지칭됨) 및 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열이 미국 특허 번호 6,410,708 (2002년 6월 25일 허여)에 개시되어 있다. 또한, huSTIGMA 및 huSTIGMAshort 양쪽 모두가, 뮤린(murine) STIGMA (muSTIGMA) 단백질 및 핵산 서열과 함께, PCT 공개 WO 2004031105 (2004년 4월 15일 공개)에 개시되어 있다.

[0013] 간 동양혈관의 내강 내에 존재하는 쿠퍼(Kupffer) 세포 (KC)는 신체 내의 대식세포의 최대 집단을 형성한다. 다른 조직 거주 대식세포와 공통적인 마커가 KC에 있지만, 이는 소화관의 미세혈관 시스템으로부터 배수되는 문맥혈 내에 존재하는 장-유래 박테리아, 미생물 잔해물, 박테리아 내독소, 면역 복합체 및 죽은 세포의 효율적인 소거를 향해 조정된 특수 기능을 수행한다 ([Bilzer et al., Liver Int 26, 1175-1186 (2006)]). KC 표면에 대한 병원체의 효율적인 결합은 병원체에 대한 일선 면역 방어에서 결정적인 단계이다 ([Benacerraf et al., J Exp Med 110, 27-48 (1959)]). 순환으로부터의 병원체의 신속한 소거에서의 KC의 중심적인 역할은 KC가 결핍된 마우스에서의 현저하게 증가된 사망률에 의해 예증된다 ([Hirakata et al., Infect Immun 59, 289-294 (1991)]). CRIG의 확인은 순환 병원체에 대한 일선 면역 방어에서의 보체 및 KC의 결정적인 역할을 추가로 강조한다.

[0014] 마우스 KC 상에서 확인된 유일한 보체 C3 수용체는 CRIG 및 CR3인 한편 ([Helmy et al., Cell 124, 915-927 (2006)]), 인간 KC는 CR1 및 CR4의 추가적인 발현을 나타낸다 ([Hinglais et al., 1989]). KC 상의 CRIG 및 CR3 양쪽 모두 시험관내에서 iC3b 옵소닌화 입자에 대한 결합에 기여한다 ([Helmy et al., Lab Invest 61, 509-514 (2006)]). 생체내에서, iC3b-코팅 병원체에 대한 결합에서의 KC-발현 CR3의 역할은 덜 명확하다. CR3는 중성구의 고용 및 중성구-발현 ICAM1과의 상호작용을 통해 간접적으로 병원체의 소거에 기여하는 것으로 제안되었다 ([Conlan and North, Exp Med 179, 259-268 (1994)]; [Ebe et al., Pathol Int 49, 519-532 (1999)]; [Gregory et al., J Immunol 157, 2514-2520 (1996)]; [Gregory and Wing, J Leukoc Biol 72, 239-248 (2002)]; [Rogers and Unanue, Infect Immun 61, 5090-5096 (1993)]). 반면에, CRIG는 간 동양혈관 내강을 통과하는 병원체를 포획함으로써 직접적인 역할을 수행한다 ([Helmy et al., 2006, 상기문헌]). CRIG 대 CR3의 생물학적 차이가 이러한 2가지 수용체의 결합 특성에서의 차이에 의해 부분적으로 반영된다. KC 상에 발현된 CRIG는 단량체성 C3 단편에 구성적으로 결합하는 반면, CR3는 iC3b-옵소닌화 입자에만 결합한다 ([Helmy et al., 2006, 상기문헌]). 단량체성 C3b 및 iC3b, 뿐만 아니라 C3b/iC3b-코팅 입자를 효율적으로 포획하는 CRIG의 능력은 대식세포의 막 확장물의 침단에 농축된 CRIG 분자들 ([Helmy et al., 2006, 상기문헌])과 병원체 표면 상에 존재하는 C3b 및 iC3b의 다량체들 간의 다가 상호작용에 의해 생성된 증가된 결합력(avidity)을 반영한다. CR3는 iC3b-코팅 입자에만 결합하는 한편, CRIG는 혈청-옵소닌화 병원체 상에 형성된 최초의 C3 절단 생성물인 C3b에 추가적으로 결합한다 ([Croize et al., Infect Immun 61, 5134-5139 (1993)]). 병원체 표면에 결합된 다수의 C3b 분자가 인자 H 및 I에 의한 절단으로부터 보호되기 때문에 ([Gordon et al., J Infect Dis 157, 697-704 (1988)]), CRIG에 의한 C3b 리간드의 인식은 신속한 결합 및 소거를 확실하게 한다. 따라서, CRIG 및 CR3 양쪽 모두 KC 상에서 발현되지만, 이들은 상이한 리간드 특이성, 별개의 결합 성질, 및 별개의 병원체 소거 동역학을 나타낸다.

[0015] 세포 진입을 위해 세포 표면 수용체를 활용하는 병원체의 예는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV)와 같은 바이러스, 및 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 나병균(*Mycobacterium leprae*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*) 및 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria Monocytogenes*)와 같은 세포내 박테리아, 및 프로스티그마토이드(prostigmatoid) 큰 리슈만편모

충(*Leishmania major*)과 같은 기생충이다 ([Cossart and Sansonetti, Science 304:242-248 (2004)]; [Galan, Cell 103:363-366 (2000)]; [Hornet et al., Nat. Immunol. 3:1033-1040 (2002)]; [Stoiber et al., Mol. Immunol. 42: 153-160 (2005)]). 보체 시스템은 병원체를 죽이고 포식작용을 가속화시키기 위해 디자인되지만, 이는 아직 알려지지 않는 보체 수용체에 의한 병원체의 세포 진입을 또한 매개한다. CRiG는 세포내 병원체의 보체-의존적 세포 진입을 매개하는 수용체들 중 하나로 작용하는 것으로 여겨진다.

발명의 개요

본 발명은 C3-옵소닌화 병원체가 세포 표면에 결합하는 것을 차단하는 항-CRiG 항체, 및 이같은 병원체의 세포 진입을 방지하고/하거나 이의 생존을 차단하는 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

한 양상에서, 본 발명은 천연 서열 CRiG 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하고, 세포내 병원체의 CRiG-매개 보체-의존적 세포 진입을 억제하거나 세포내 병원체를 순환으로부터 소거하는 CRiG 길항제에 관한 것이다.

한 실시양태에서, 길항제는 항-CRiG 항체 또는 이의 단편이고, 이때 항체 단편은, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (ScFv)₂, dAb, 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자, 미니바디 (minibody), 디아바디(diabody), 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

또다른 실시양태에서, CRiG 길항제는 14G8 (ATCC 기탁 번호 PTA-8298), 3D10 (ATCC 기탁 번호 PTA-8299) 및 2H1 (ATCC 기탁 번호 PTA-8300)로 이루어진 군으로부터 선택된 항-CRiG 항체와 동일한 에피토프에 본질적으로 결합하는 모노클로날 항체, 또는 이의 단편이다.

또다른 실시양태에서, CRiG 길항제는 14G8 (ATCC 기탁 번호 PTA-8298), 3D10 (ATCC 기탁 번호 PTA-8299) 및 2H1 (ATCC 기탁 번호 PTA-8300)로 이루어진 군으로부터 선택된 모노클로날 항-CRiG 항체, 또는 이의 단편이다.

모든 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은 키메라, 인간화 또는 인간 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

모든 실시양태에서, 세포내 병원체는 바이러스, 기생충, 박테리아, 진균 및 프리온으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

또다른 양상에서, 본 발명은 본원에서의 차단 항-CRiG 항체를 코딩하는 핵산 또는 이의 단편에 관한 것이다.

또다른 양상에서, 본 발명은 CRiG 길항제를 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다.

추가적인 양상에서, 본 발명은 세포내 병원체의 CRiG-매개 보체-의존적 세포 진입의 억제를 필요로 하는 포유류 대상체에게 유효량의 CRiG 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 세포내 병원체의 CRiG-매개 보체-의존적 세포 진입을 억제하는 방법에 관한 것이다.

추가적인 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 CRiG 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 포유류 대상체의 순환으로부터 세포내 병원체를 소거하는 방법에 관한 것이다.

또다른 양상에서, 본 발명은 감염성 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 포유류 대상체에게 유효량의 CRiG 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 감염성 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

모든 양상에서, 포유류 대상체는 바람직하게는 인간이고, CRiG 길항제는 바람직하게는 차단 항-CRiG 항체이다.

추가적인 양상에서, 본 발명은 CRiG 길항제 및 감염성 질환을 치료하기 위해 상기 CRiG 길항제를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

용어 "CRiG", "PRO362", "JAM4", 및 "STiGMA"는 상호교환가능하게 사용되고, 천연 서열 및 변이체 CRiG 폴리펩티드를 지칭한다.

"천연 서열" CRiG는, 이의 제조 방식과 상관 없이, 천연으로부터 유래된 CRiG 폴리펩티드와 아미노산 서열이 동일한 폴리펩티드다. 따라서, 천연 서열 CRiG는 천연으로부터 단리될 수 있거나, 또는 재조합 및/또는 합성 수단에 의해 생산될 수 있다. 용어 "천연 서열 CRiG"는 천연-발생 말단절단 또는 분비 형태의 CRiG (예를 들어,

세포의 도메인 서열), 천연-발생 변이체 형태 (예를 들어, 별법적으로 스플라이싱된 형태) 및 CRIG의 천연-발생 대립유전자 변이체를 특히 포함한다. 천연 서열 CRIG 폴리펩티드에는 N-말단 신호 서열이 있거나 없고, 위치 1의 개시 메티오닌이 있거나 없으며, 서열 2의 대략적인 아미노산 위치 277 내지 307의 임의의 또는 모든 막횡단 도메인이 있거나 없는, 서열 2의 아미노산 399개 길이의 전장 인간 CRIG 폴리펩티드 (huCRIG, 도 1A 및 1B에 제시됨)가 특히 포함된다. 추가적인 실시양태에서, 천연 서열 CRIG 폴리펩티드는 N-말단 신호 서열이 있거나 없고, 위치 1의 개시 메티오닌이 있거나 없으며, 서열 4의 대략적인 위치 183 내지 213의 임의의 또는 모든 막횡단 도메인이 있거나 없는, 아미노산 305개의 짧은 형태의 인간 CRIG (huCRIG-short, 서열 4, 도 2A 및 2B에 제시됨)이다. 또다른 실시양태에서, 천연 서열 CRIG 폴리펩티드는 N-말단 신호 서열이 있거나 없고, 위치 1에 개시 메티오닌이 있거나 없으며, 서열 6의 대략적인 아미노산 위치 181 내지 211의 임의의 또는 모든 막횡단 도메인이 있거나 없는, 서열 6의 아미노산 280개 길이의 전장 무린 CRIG 폴리펩티드 (muCRIG, 도 3A-3C에 제시됨)이다. 고등 영장류 및 포유류가 포함되는 기타 비-인간 동물의 CRIG 폴리펩티드가 이러한 정의 내에 특히 포함된다.

[0047] CRIG "세포의 도메인" 또는 "ECD"는 각각의 전장 분자의 막횡단 및 세포질 도메인이 본질적으로 없는 형태의 CRIG 폴리펩티드를 지칭한다. 통상적으로, CRIG ECD에는 1% 미만의 이같은 막횡단 및/또는 세포질 도메인이 있을 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 이같은 도메인들이 있을 것이다. CRIG ECD는 서열 2, 4, 또는 6의 아미노산 잔기 1 또는 약 21에서 X까지 포함할 수 있고, 이때 X는 서열 2의 약 271 내지 281 중 임의의 아미노산, 서열 4의 약 178 내지 186 중 임의의 아미노산, 및 서열 6의 약 176 내지 184 중 임의의 아미노산이다.

[0048] 용어 "CRIG 길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 천연 서열 CRIG 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하고, 천연 서열 CRIG 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전하게 차단 또는 중화 (총괄적으로 "억제"로 지칭됨)하는 임의의 분자를 지칭한다. 바람직하게는, 생물학적 활성은 세포내 병원체의 보체-의존적 세포 진입을 매개하고/하거나 적혈구 또는 혈소판의 원치 않는 소거를 방지하는 CRIG의 능력이다. 따라서, 바람직한 길항제는 세포내 병원체의 CRIG-매개 보체-의존적 세포 진입을 억제한다. 적절한 CRIG 길항제 분자에는 차단 항-CRIG 항체 (항체 단편 포함), 기타 폴리펩티드, 예컨대 본원에서의 천연 서열 CRIG 폴리펩티드의 변이체 및 융합물, 펩티드 및 비-펩티드 (유기) 소형 분자, 및 안티센스(antisense) 폴리뉴클레오타이드 분자가 특히 비제한적으로 포함된다. CRIG 길항제의 바람직한 군에는 천연 CRIG 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고 이러한 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하는 항-CRIG 항체 (항체 단편 포함)가 포함된다.

[0049] 본원에서 정의된 "차단 항체"는 천연 서열 CRIG 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하고, 천연 서열 CRIG 폴리펩티드의 정상적 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전하게 차단 또는 중화 (총괄적으로 "억제"로 지칭됨)하는 항체이다. 바람직하게는, 생물학적 활성은 세포내 병원체의 보체-의존적 세포 진입을 매개하는 CRIG의 능력이다. 따라서, 바람직한 차단 항체는 세포내 병원체의 CRIG-매개 보체-의존적 세포 진입을 억제하고/하거나 적혈구 또는 혈소판의 원치 않는 소거를 방지한다.

[0050] "소형 분자"는 분자량이 약 600 달톤 미만, 바람직하게는 약 1000 달톤 미만, 예를 들어, 100 내지 600 달톤, 또는 100 내지 1000 달톤인 것으로 본원에서 정의된다. 용어 "비-펩티드 소형 분자"는 지시된 분자량 범위 내의 소형 유기 화합물을 지칭한다.

[0051] "항체" (Ab) 및 "면역글로불린" (Ig)은 구조적 특성이 동일한 당단백질이다. 항체는 특정 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 한편, 면역글로불린은 항체 및 항원 특이성이 결합된 기타 항체-유사 분자 양쪽 모두를 포함한다. 후자 유형의 폴리펩티드는, 예를 들어, 림프계에서 낮은 수준으로 생산되고, 골수종에서 증가된 수준으로 생산된다. 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 무손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중 특이적 항체), 및 항체 단편 (단, 원하는 생물학적 활성을 나타냄)을 특히 비제한적으로 포함한다.

[0052] "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 일반적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중사량체성 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 디설피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설피드 연결의 개수는 여러 면역글로불린 이소타입의 중쇄들 간에 상이하다. 또한 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적인 간격의 사슬내 디설피드 다리를 갖는다. 각각의 중쇄는 다수의 불변 도메인이 이어지는 가변 도메인 (V_H)을 한쪽 말단에 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L)을 갖고 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖는다; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫번째 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으

로 여겨진다.

- [0053] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 서열 면에서 항체들 간에 크게 상이하고, 각각의 특정 항체의 이의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 양쪽 모두에서 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역으로 칭해지는 3개의 절편에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 고도로 보존된 부분은 프레임워크 (FR)로 칭해진다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 베타-시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 CDR에 의해 연결된, 베타-시트 형상을 주로 채택한 4개의 FR 영역을 포함한다. 각각의 사슬 내의 CDR은 FR 영역에 의해 매우 근접하게 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR들과 함께, 항체의 항원-결합 부위를 형성하는데 기여한다 ([Kabat et al., NIH Publ. No.91-3242, Vol. I, pp 647-669 (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는데 직접적으로 수반되지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존적 세포형 세포독성에서의 항체의 참여를 나타낸다.
- [0054] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부분, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, dAb, 및 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자, 미니바디, 디아바디, 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체, 및, 일반적으로, 폴리펩티드에 특이적 항원 결합을 부여하는데 충분한 면역글로불린의 일부분을 적어도 함유하는 폴리펩티드가 비제한적으로 포함된다.
- [0055] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는, 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 칭해지는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.
- [0056] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린은 여러 클래스로 지정될 수 있다. 면역글로불린에는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM의 5가지 주요 클래스가 있고, 이들 중 몇몇은 서브클래스 (이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 클래스들에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 γ , μ , δ , α , 및 ϵ 로 칭해진다. 상이한 면역글로불린 클래스들의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 주지되어 있다.
- [0057] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하고, 즉 집단을 이루는 개별적인 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 천연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일한 항원성 부위에 대해 지시되어 고도로 특이적이다. 또한, 여러 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 전형적으로 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이의 특이성에 더하여, 모노클로날 항체는 다른 면역글로불린으로 오염되지 않은 하이브리도마 배양에 의해 합성된다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 수득된다는 항체의 특성을 가리키는 것이며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 요구하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는, 예를 들어, [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 또한 단리될 수 있다. 파지미드 및 파지 벡터를 사용한 항체 제조가 기술된 미국 특허 번호 5,750,373, 5,571,698, 5,403,484 및 5,223,409를 또한 참조한다.
- [0058] 본원에서의 모노클로날 항체에는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 사슬(들)의 나머지부분은 또다른 종으로부터 유래되거나 또다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로불린), 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이같은 항체의 단편이 특히 포함된다 (미국 특허 번호 4,816,567; [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]).
- [0059] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소의 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편이다. 대부분의 부분에 대해서, 인간화 항체는 수용자의 상보성-결정 영역 (CDR)으로부터의 몇몇 또는 모든 잔기가 원하는 특이성, 친화력 및 능력이 있는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (도너 항체)의 CDR로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에는, 인간 면역글로불린의 특정한 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔

기로 또한 교체될 수 있다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 수입된(imported) CDR 또는 프레임워크 서열에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 정련시키고 최대화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 최적으로는, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 또는 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 추가적인 상세사항은 [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)]; [Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)] 참조. 인간화 항체에는 항체의 항원-결합 영역이 당해 항원으로 짧은 꼬리 원숭이를 면역화시킴으로써 생산된 항체로부터 유래된 "영장류화" 항체가 포함된다. 구세계 원숭이로부터의 잔기를 함유하는 항체가 본 발명에서 또한 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,658,570; 5,693,780; 5,681,722; 5,750,105; 및 5,756,096 참조.

[0060] "단일쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재하는 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 V_H 도메인과 V_L 도메인 간의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. sFv의 리뷰를 위해서는, [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)] 참조.

[0061] 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드 사슬 (V_H - V_L) 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편을 지칭한다. 동일한 사슬 상의 두 도메인 간에 쌍을 형성하도록 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루어 2개의 항원-결합 부위를 생성하도록 강요된다. 디아바디는, 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0062] 본원에서 사용된 용어 "면역어드레신"은 이중성 단백질 ("부착소")의 결합 특이성이 면역글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합된 항체-유사 분자를 의미한다. 구조적으로, 면역어드레신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위가 아닌 (즉, "이중성"인) 원하는 결합 특이성이 있는 아미노산 서열과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합물을 포함한다. 전형적으로 면역어드레신 분자의 부착소 부분은 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 적어도 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 면역어드레신 내의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD, 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다.

[0063] 용어 "감염성 질환"은 감염성 생물에 의해 야기되는 임의의 질환을 지칭하도록 본원에서 사용된다. 감염성 생물은 바이러스 (예를 들어, 단일 가닥 RNA 바이러스, 단일 가닥 DNA 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), A형, B형 및 C형 간염 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인-바르 (Epstein-Barr) 바이러스 (EBV), 인간 유두종 바이러스 (HPV)), 기생충 (예를 들어, 원생동물 및 후생동물 병원체 예컨대 플라즈모디아(*Plasmodia*) 종, 리슈만편모충(*Leishmania*) 종, 예를 들어 큰 리슈만편모충, 주혈흡충 (*Schistosoma*) 종, 파동편모충(*Trypanosoma*) 종), 박테리아 (예를 들어, 마이코박테리아, 특히 결핵균, 나병균, 예르시니아 슈도투베르쿨로시스, 살모넬라 타이피무리움, 리스테리아 모노사이토제네스, 연쇄구균 (*Streptococcus*), 대장균, 포도상구균(*Staphylococcus*)), 진균 (예를 들어, 칸디다(*Candida*) 종, 아스페르길루스(*Aspergillus*) 종), 폐포자충(*Pneumocystis carinii*), 및 프리온을 포함할 수 있다.

[0064] "치료"는 장애의 발달을 방지하거나 이의 병리학을 변경시키려는 의도로 수행되는 개입이다. 따라서, "치료"는 치유적인 치료, 및 예방적 또는 방지성 수단 양쪽 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체에는 이미 장애가 있는 대상체, 뿐만 아니라 장애를 방지하려는 대상체가 또한 포함된다.

[0065] 본원에서 사용된 용어 "감염성 질환의 발달의 방지 또는 억제"는 감염성 질환의 발생이 방지되거나 감염성 질환의 발병이 지연되는 상황, 또는 기존의 감염의 확산이 역전되는 상황을 지칭한다.

[0066] 본원에서 사용된 "완화시킨다"는 더 양호하게 하거나 개선시키는 것으로 본원에서 정의된다.

[0067] 본원에서 사용된 용어 "포유동물"은 인간, 비-인간 영장류, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 운동 또는 애완 동물 예컨대 말, 돼지, 소, 개, 고양이 및 흰족제비 등이 비제한적으로 포함되는, 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 포유동물은 고등 영장류이고, 가장 바람직하게는 인간이다.

- [0068] II. 상세한 설명
- [0069] CRIg 폴리펩티드의 길항제의 확인
- [0070] CRIg 폴리펩티드의 길항제는 천연 서열 CRIg 폴리펩티드가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하고, 천연 서열 CRIg 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화하는 분자이다. CRIg 길항제는 항-CRIg 항체 (항체 단편 포함), 폴리펩티드, 펩티드 및 비-펩티드 소형 분자, 및 안티센스 분자를 포함하지만, 이에 한정되지 않고, 표준 결합 및/또는 기능 분석법이 포함되는 당업계에 공지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 천연 서열 CRIg 폴리펩티드의 길항제는 세포내 병원체, 예컨대 바이러스, 박테리아 또는 기생충의 세포 진입을 방지하는 능력으로 인해 감염성 질환의 예방 및 치료에서 유용성이 발견된다.
- [0071] 당업계에 공지된 방법, 예컨대 상기 및 실시예 1에 기술된 방법에 의해 항-CRIg 항체를 생산할 수 있다. CRIg에 결합하는 능력이 있는 기타 분자들을 당업계에 주지된 결합 분석법에서 확인할 수 있다.
- [0072] 길항제에 대한 모든 결합 분석법은 후보 길항제와 CRIg 폴리펩티드를 이러한 두 성분이 상호작용하도록 하는 데 충분한 조건 및 시간으로 접촉시키는 것을 필요로 한다는 점이 공통적이다. 결합 분석법에서, 상호작용은 결합이고, 형성된 복합체를 분리하거나 반응 혼합물에서 검출할 수 있다. 특정 실시양태에서, CRIg 폴리펩티드 또는 후보 길항제 중 하나가 고체 상, 예를 들어, 미량역가 플레이트 상에 공유결합 또는 비-공유결합 부착에 의해 고정된다. 비-공유결합 부착은 고체 표면을 CRIg 폴리펩티드의 용액으로 코팅하고 건조시킴으로써 일반적으로 달성된다. 별법적으로, 고정된 CRIg 폴리펩티드에 특이적인 고정된 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체가 CRIg 폴리펩티드를 고체 표면에 앵커링(anchoring)시키는데 사용될 수 있다. 고정되지 않은 성분 (검출가능한 표지로 표지될 수 있음)을 고정된 성분, 예를 들어, 앵커링된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 부가함으로써 분석법이 수행된다. 반응이 완료되면, 예를 들어 세정에 의해, 반응되지 않은 성분들을 제거하고, 고체 표면에 앵커링된 복합체를 검출한다. 원래 고정되지 않은 성분이 검출가능한 표지를 보유하는 경우, 표면 상에 고정된 표지의 검출은 복합체형성이 일어났음을 가리킨다. 원래 고정되지 않은 성분이 표지를 보유하지 않는 경우, 예를 들어, 고정된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용함으로써 복합체를 검출할 수 있다.
- [0073] 후보 화합물이 CRIg와 상호작용하지만 이에 결합하지는 않는 폴리펩티드라면, CRIg와 반응성 폴리펩티드의 상호작용을 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위한 주지된 방법에 의해 분석할 수 있다. 이같은 분석법에는 전통적인 접근법, 예를 들어, 가교, 공동-면역침전, 및 구배 또는 크로마토그래프 컬럼을 통한 공동-정제가 포함된다. 또한, [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)]에 개시된 바와 같이 Fields 및 공동 작업자 ([Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989)]; [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)])에 의해 기술된, 효모를 기초로 하는 유전자 시스템을 사용함으로써 단백질-단백질 상호작용을 모니터링할 수 있다. 다수의 전사 활성화제, 예컨대 효모 GAL4는 물리적으로 분리된 2개의 모듈형 도메인으로 구성되는데, 한 도메인은 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 나머지 도메인은 전사-활성화 도메인으로 기능한다. 상기 간행물들에 기술된 효모 발현 시스템 (일반적으로, "2-하이브리드 시스템"으로 지칭함)은 이의 장점을 이용하며, 2개의 하이브리드 단백질을 사용하는데, 이 중 하나에서는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합되고, 다른 하나에서는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합된다. GAL4-활성화된 프로모터의 제어 하에서의 GAL1-*lacZ* 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 의존한다. 상호작용하는 폴리펩티드들을 함유하는 콜로니가 β -갈락토시다제에 대한 발색 기질로 검출된다. 2-하이브리드 기술을 사용하여 2개의 특정 단백질들 간의 단백질-단백질 상호작용을 확인하기 위한 완성형 키트 (MATCHMAKER™)가 Clontech에서 시판된다. 또한, 이러한 시스템을 확장시켜, 특정 단백질 상호작용에 수반되는 단백질 도메인의 지도를 작성할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 상호작용에 결정적인 아미노산 잔기를 정확하게 알아낼 수 있다.
- [0074] 본원에서 상세하게 논의된 스크리닝 분석법은 단지 예증을 위한 것임이 강조된다. 스크리닝되는 길항제 후보의 유형 (예를 들어 폴리펩티드, 펩티드, 비-펩티드 소형 유기 분자, 핵산 등)에 따라 선택될 수 있는 다양한 또다른 분석법들이 당업자에게 주지되어 있고, 본 발명의 목적에 동등하게 적절하다.
- [0075] 본원에 기술된 분석법은 화학적 라이브러리, 천연 생성물 라이브러리 (예를 들어, 미생물, 동물, 식물 등의 수집물), 및 무작위 펩티드, 올리고뉴클레오타이드 또는 소형 유기 분자로 구성된 조합형 라이브러리가 비제한적으로 포함되는, 화합물들의 라이브러리를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서의 분석법은 천연 인간, 재조합, 합성 및 반합성 항체 라이브러리가 비제한적으로 포함되는 항체 라이브러리를 스크리닝하는데 사용된다. 항체 라이브러리는, 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있고, 여기에는 파지 입자 당 평균적으로 1개의 단일쇄 항체 또는 항체 단편을 디스플레이하는 1가 라이브러리, 및 바이러스 입자 당

평균적으로 2개 이상의 항체 또는 항체 단편을 디스플레이하는 다가 라이브러리가 포함된다. 그러나, 본 발명에 따라 스크리닝될 항체 라이브러리는 과다 디스플레이 라이브러리에 한정되지 않는다. 기타 디스플레이 기술에는, 예를 들어, 리보솜 또는 mRNA 디스플레이 ([Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026 (1994)]; [Hanes and Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942 (1997)]), 미생물 세포 디스플레이, 예컨대 박테리아 디스플레이 ([Georgiou et al., Nature Biotech. 15:29-34 (1997)]), 또는 효모 세포 라이브러리 ([Kieck et al., Protein Eng. 10:1303-1310 (1997)]), 포유류 세포 상의 디스플레이, 포자 디스플레이, 바이러스 디스플레이, 예컨대 레트로바이러스 디스플레이 ([Urban et al., Nucleic Acids Res. 33:e35 (2005)]), 단백질-DNA 연결을 기초로 하는 디스플레이 ([Odegrip et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 101:2806-2810 (2004)]; [Reiersen et al., Nucleic Acids Res. 33:e10 (2005)]), 및 마이크로비드 디스플레이 ([Sepp et al., FEBS Lett. 532:455-458 (2002)])가 포함된다. 또다른 분자들의 라이브러리, 예컨대 합성 소형 분자들의 조합형 라이브러리를 유사한 방식으로 또한 스크리닝할 수 있다.

[0076] CRIG가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하는 후보 길항제의 능력을 세포-기반 분석법에서 평가할 수 있다. 따라서, CRIG-발현 세포, 예컨대 CRIG 핵산으로 형질감염되고 이를 발현하는 재조합 CHO 세포를 C3b/iC3b 및 하나 이상의 후보 길항제 (이전의 실험에서 CRIG에 결합하는 것으로 나타났거나 그렇지 않을 수 있음)와 함께 인큐베이션하고, 당업계에 공지된 방법, 예컨대 실시예 2에 기술된 바와 같은 FACScan에 의해 결과를 분석할 수 있다. 별법적으로 또는 추가적으로, 천연적으로 CRIG를 발현하는 세포, 예컨대 복막 대식세포를 사용하는 분석법에서 CRIG가 C3b 및/또는 iC3b에 결합하는 것을 차단하는 후보 길항제의 능력을 테스트할 수 있다.

[0077] 본원에서의 1차 결합/상호작용 분석법에서 수득된 결과를 각종 감염의 시험관내 및/또는 생체내 분석법에서 확인 및 보충할 수 있다. 별법적으로, 감염 또는 감염성 질환의 치료에서의 효능의 시험관내 및/또는 생체내 분석법을 본원에서의 CRIG 길항제를 확인하기 위한 1차 분석법으로 사용할 수 있다. 따라서, 생체내에서 감염성 작용제, 예컨대 리스테리아 모노사이토제네스가 CRIG-발현 복막 대식세포에 결합하는 것의 억제 실험을 실시예 2에 기술된 바와 같이 테스트할 수 있다.

[0078] 동물 모델을 또한 사용하여, 본원에서의 항체 및 기타 CRIG 길항제를 테스트할 수 있다. 마우스의 순환으로부터의 리스테리아 및 스타필로코쿠스 아우레우스의 소거의 억제가 실시예 2에서 기술된다.

[0079] 항-CRIG 길항제 항체의 제조

[0080] (i) 항원 제조

[0081] 가용성 항원 또는 이의 단편 (임의적으로 또다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막형단 분자, 예컨대 수용체에 대해서는, 이의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 별법적으로, 막형단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이같은 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막형단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 기타 항원 및 이의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0082] (ii) 폴리클로날 항체

[0083] 관련 항원 및 애주번트(adjuvant)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 폴리클로날 항체가 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (라이신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (식중, R 및 R_1 은 상이한 알킬기이다)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0084] 예를 들어, 100 μg 또는 5 μg 의 단백질 또는 접합체 (각각 토끼 또는 마우스에 대해)를 3배 용량의 프로인트 (Freund) 완전 애주번트와 합하고, 이 용액을 다중 부위에 진피내 주사함으로써, 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 동물들을 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 애주번트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅시킨다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 혈청을 분석한다. 역가가 정체기(plateau)에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅시킨다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 백반과 같은 응집제

를 적절하게 사용하여 면역 응답을 강화시킨다.

[0085] (iii) 모노클로날 항체

[0086] 모노클로날 항체를 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 짧은꼬리 원숭이를 상기 기술된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 별법적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 그 후, 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시킨다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0087] 바람직하게는 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 어버이 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적절한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 어버이 골수종 세포에 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0088] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선별된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 것이다. 특히 바람직한 골수종 세포주는 뮌헨 골수종 세포주, 예컨대 <Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California USA)>로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 <American Type Culture Collection (Rockville, Md. USA)>으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 기술되어 있다 ([Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0089] 하이브리도마 세포가 성장되는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 분석법, 예컨대 방사선면역분석법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의해 결정할 수 있다.

[0090] 원하는 특이성, 친화력 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 확인된 후, 클론을 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 ([Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp.59-103 (1986)]). 이러한 목적에 적절한 배양 배지에는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0091] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 면역글로불린 정제 절차, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적절하게 분리된다.

[0092] 통상적인 절차 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 쉽게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이같은 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내에 놓을 수 있고, 그 후 이러한 벡터를 형질감염되지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 생산을 수득한다. 항체의 재조합 생산은 하기에 더욱 상세하게 기술될 것이다.

[0093] 추가적인 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기술된 기술을 사용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0094] [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에는 파지 라이브러리를 사용한 뮌헨 및 인간 항체의 단리가 각각 기술되어 있다. 후속 간행물들에는 사슬 셔플링 (shuffling)에 의한 고친화력 (nM 범위) 인간 항체의 생산 ([Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합형 감염 및 생체내 재조합

([Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993)])이 기술되어 있다. 따라서, 이러한 기술들은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.

[0095] 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 상동성 뮤린 서열 대신 치환함으로써 (미국 특허 번호 4,816,567; [Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851 (1984)]), 또는 면역글로불린 코딩 서열을 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부에 공유결합에 의해 연결시킴으로써, DNA를 또한 변형시킬 수 있다.

[0096] 전형적으로, 이같은 비-면역글로불린 폴리펩티드가 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 또는 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여 항원에 대한 특이성을 갖는 한 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대해 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체가 생성된다.

[0097] (iv) 인간화 및 인간 항체

[0098] 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 내에 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입" 잔기로 지칭되고, 이는 전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써, Winter 및 공동 연구원의 방법 ([Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen, et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 인간화를 본질적으로 수행할 수 있다. 따라서, 이같은 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0099] 인간화 항체를 제조하는데 사용되는 인간 가변 도메인 (경쇄 및 중쇄 모두)을 선택하는 것은 항원성을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "베스트-핏(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 받아들여진다 ([Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]). 또다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 사용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).

[0100] 항원에 대한 높은 친화력 및 기타 유리한 생물학적 성질을 유지시키면서 항체를 인간화시키는 것이 또한 중요하다. 이러한 목적을 이루기 위해, 바람직한 방법에 따라, 어버이 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하는 어버이 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 인간화 항체가 제조된다. 3차원 면역글로불린 모델은 통상적으로 입수가능하고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 설명하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이러한 디스플레이들의 정밀검사로 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 자신의 항원에 결합하는 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화력이 달성되도록 수용자 및 수입 서열로부터 FR 잔기들을 선택하고 조합시킬 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 수반된다.

[0101] 별법적으로, 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉(trnasgenic) 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기술되었다. 인간 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 이같은 생식계열 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접종시 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)]; 및 [Duchosal et al. Nature 355:258 (1992)] 참조. 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체가 또한 유래될 수 있다 ([Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]; [Vaughan et al., Nature Biotech 14:309 (1996)]). 항체 파지 디스플레이로부터의 인간 항체의 생성이 하기에 추가로 기술된다.

[0102] (v) 항체 단편

[0103] 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이러한 단편들은 무손상 항체의 단백질 분해성 분해를 통해 유래되었다 (예를 들어, [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리될 수 있다. 별법적으로, Fab'-SH 단편이 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편이 형성될 수 있다 ([Carter et al, Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 하기 실시예에 기술된 바와 같은 또다른 실시양태에서, F(ab')₂ 분자의 어셈블리를 촉진하도록 류신 지퍼 GCN4를 사용하여 F(ab')₂가 형성된다. 또다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편이 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 기타 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 또다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185 참조.

[0104] (vi) 다중특이적 항체

[0105] 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성이 있고, 이때 에피토프들은 일반적으로 상이한 항원들로부터의 것이다. 이같은 분자들은 일반적으로는 2개의 상이한 에피토프에만 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가적인 특이성이 있는 항체 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에서 사용되는 경우의 이러한 표현에 포함된다. BsAb의 예로는 CR1g에 대해 지시된 한쪽 팔, 및 면역 복합체 소거에서 역할을 하는 또다른 단백질, 예컨대 CR1, CR2, CR3 및 CR4의 군으로부터 선택된 대식세포 수용체에 대해 지시된 또다른 팔이 있는 것들이 포함된다.

[0106] 이중특이적 항체의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동-발현을 기초로 하고, 이때 두 사슬은 특이성이 상이하다 ([Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 배열(assortment)로 인해, 이러한 하이브리도마 (쿼드로마(quadroma))는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하고, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829 및 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다. 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)이 있는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합은 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부분을 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합물 중 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합물, 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA들을 별도의 발현 벡터들에 삽입하고, 적절한 숙주 세포 내로 내강-형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3개의 폴리펩티드 사슬의 동등하지 않은 비율이 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 2개 이상의 폴리펩티드 사슬의 발현으로 높은 수율이 초래되는 경우 또는 비율이 특별한 의미가 없는 경우, 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0107] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 팔 내의 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른쪽 팔 내의 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성 제공)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 사슬 조합물로부터의 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 발견되었다. 이러한 접근법이 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성을 위한 추가적인 상세한 내용은, 예를 들어, [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)] 참조.

[0108] WO 96/27011에 기술된 또다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 경계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄 (예를 들어, 타이로신 또는 트립토판)로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "내강(cavity)"이 제2 항체 분자의 경계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.

[0109] 이중특이적 항체에는 가교된 또는 "이중접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나

는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이같은 항체들은, 예를 들어, 원치 않는 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/20373)를 위해서 제안되었다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이중접합체 항체를 제조할 수 있다. 다수의 가교 기술과 함께, 적절한 가교제가 당업계에 주지되어 있고, 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0110] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단시켜 F(ab')₂ 단편을 생성시키는 방법이 기술되어 있다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체들 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 작용체로서 사용될 수 있다.

[0111] Fab'-SH 단편을 대장균으로부터 또한 직접 회수할 수 있고, 화학적으로 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성시킬 수 있다. [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에는 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산이 기술되어 있다. 각각의 Fab' 단편이 대장균으로부터 별도로 분리되었고, 시험관내에서 지향성으로 화학적 커플링되어, 이중특이적 항체가 형성되었다.

[0112] 제조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. [Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결시켰다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. [Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기술된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 별법적인 제조 메커니즘을 제공하였다. 이 단편은 동일한 사슬 상의 두 도메인이 쌍을 이루게 하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또다른 단편의 상보적인 VH 및 VL 도메인과 쌍을 이루도록 강요됨으로써, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또다른 전략이 또한 보고되었다. [Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참조.

[0113] 2가지를 초과하는 특이성이 있는 항체가 구현된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. [Tuft et al., J. Immunol. 147:60 (1991)]. 또한, 동일한 항원에 대한 1가지를 초과하는 결합 특이성이 있는 다가 (예를 들어, 2가) 항체가 본원에서의 범주 내에 또한 속한다.

[0114] (vii) 이펙터 기능 조작

[0115] 항체의 유효성을 강화하도록, 이펙터 기능과 관련하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입함으로써, 이러한 영역 내에 사슬간 디설피드 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이렇게 생성된 동종이량체 항체는 내재화 능력이 개선되고/되거나 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존적 세포형 세포독성 (ADCC)이 증가될 수 있다. [Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)] 참조. [Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)]에 기술된 바와 같은 이중이관능성 가교제를 사용하여 항종양 활성이 강화된 동종이량체 항체를 또한 제조할 수 있다. 별법적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 항체의 보체 용해 및 ADCC 능력이 강화될 수 있다. [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)] 참조.

[0116] (viii) 항체-샐비지(salvage) 수용체 결합 에피토프 융합물

[0117] 본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어, 종양 투과를 증가시키기 위해, 무손상 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는, 예를 들어, 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 단편 내로 혼입시킴으로써 (예를 들어, 항체 단편 내의 적합한 영역의 돌연변이에 의해, 또는 에피토프를 펩티드 태그 내로 혼입시킨 후, 태그를 항체 단편의 어느 한쪽 말단 또는 중간에 (예를 들어, DNA 또는 펩티드 합성에 의해) 융합시킴으로써) 달성될 수 있다.

- [0118] 바람직하게는, 셀비지 수용체 결합 에피토프는 Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 옮겨진 영역을 구성한다. 더욱 더 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 옮겨진다. 더더욱 바람직하게는, 에피토프가 Fc 영역 (예를 들어, IgG의 것)의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체의 CH1, CH3, 또는 V_H 영역, 또는 하나를 초과하는 이같은 영역에 옮겨진다. 별법적으로, 에피토프가 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체 단편의 CL 영역 또는 VL 영역, 또는 양쪽 모두로 옮겨진다.
- [0119] (ix) 항체의 기타 공유결합 변형
- [0120] 항체의 공유 결합 변형이 본 발명의 범주 내에 포함된다. 이는 화학적 합성에 의해 또는 적용가능하다면 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 항체의 또다른 유형의 공유결합 변형이 분자 내로 도입된다. 공유결합 변형의 예가 미국 특허 번호 5,534,615 (거명에 의해 본원에 명확하게 포함됨)에 기술되어 있다. 항체의 바람직한 유형의 공유결합 변형은 항체를 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방식으로 다양한 비-단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 연결시키는 것을 포함한다.
- [0121] (x) 합성 항체 파지 라이브러리로부터의 항체의 생성
- [0122] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 독특한 파지 디스플레이 접근법을 사용하여 신규 항체를 생성시키고 선별하는 방법을 제공한다. 이 접근법은 단일 프레임워크 주형을 기초로 하는 합성 항체 파지 라이브러리의 생성, 가변 도메인 내의 충분한 다양성의 디자인, 다양화된 가변 도메인이 있는 폴리펩티드의 디스플레이, 항원을 표적화하는 높은 친화력이 있는 후보 항체의 선별, 및 선별된 항체의 단리를 수반한다.
- [0123] 파지 디스플레이 방법의 상세사항을, 예를 들어, WO03/102157 (2003년 12월 11일 공개)에서 확인할 수 있고, 상기 문헌의 전체 내용은 거명에 의해 본원에 명확하게 포함된다.
- [0124] 한 양상에서, 본 발명에서 사용된 항체 라이브러리는 항체 가변 도메인의 하나 이상의 CDR 내의 용매가 접근가능하고/하거나 고도로 다양한 위치를 돌연변이시킴으로써 생성될 수 있다. 본원에서 제공된 방법을 사용하여 일부 또는 모든 CDR을 돌연변이시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 다양한 항체 라이브러리를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0125] 예를 들어, CDRH1, CDRH2 및/또는 CDRH3의 용매가 접근가능하고/하거나 고도로 다양한 위치에 돌연변이가 있는 항체 가변 도메인의 라이브러리가 생성될 수 있다. CDRL1, CDRL2 및/또는 CDRL3 내에 돌연변이가 있는 또다른 라이브러리가 생성될 수 있다. 또한 이러한 라이브러리들은 원하는 친화력의 결합체를 생성시키기 위해 서로 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 항원에 대한 결합에 대한 중쇄 라이브러리의 1회 이상의 라운드의 선별 후에, 결합체의 친화력을 증가시키기 위한 추가적인 라운드의 선별을 위해 경쇄 라이브러리가 중쇄 결합체의 집단 내로 교체될 수 있다.
- [0126] 바람직하게는, 중쇄 서열의 가변 영역의 CDRH3 영역에서 원래의 아미노산을 변이체 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 생성된 라이브러리는 서열 다양성이 주로 중쇄 서열의 CDRH3 영역 내에 있는 다수의 항체 서열을 함유할 수 있다.
- [0127] 한 양상에서, 인간화 항체 4D5 서열, 또는 인간화 항체 4D5 서열의 프레임워크 아미노산의 서열의 정황에서 라이브러리가 생성된다. 바람직하게는, 중쇄의 적어도 잔기 95-100a를 *DIVK* 코돈 세트에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성되고, 이때 *DIVK* 코돈 세트는 이러한 위치의 모든 개개에 대한 변이체 아미노산의 세트를 코딩하도록 사용된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예는 서열 (*DIVK*)₇을 포함한다. 일부 실시양태에서, 잔기 95-100a를 *DIVK* 및 *NNK* 코돈 세트 양쪽 모두에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예는 서열 (*DIVK*)₆(*NNK*)을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 적어도 잔기 95-100a를 *DIVK* 및 *NNK* 코돈 세트 양쪽 모두에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 예는 서열 (*DIVK*)₅(*NNK*)을 포함한다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 세트의 또다른 예는 서열 (*NNK*)₆을 포함한다. 본원에 기술된 기준에 따라 당업자가 적절한

올리고뉴클레오타이드 서열의 또다른 예를 결정할 수 있다.

- [0128] 또다른 실시양태에서, 상이한 CDRH3 디자인들이 고친화력 결합체의 단리 및 다양한 에피토프에 대한 결합체의 단리를 위해 이용된다. 이러한 라이브러리 내에 생성된 CDRH3의 길이의 범위는 아미노산 11개 내지 13개이지만, 이와 상이한 길이가 또한 생성될 수 있다. *NNK*, *DVK* 및 *NVK* 코돈 셋트, 뿐만 아니라 N 및/또는 C-말단에서의 더욱 제한된 다양성을 사용함으로써 H3 다양성이 확장될 수 있다.
- [0129] CDRH1 및 CDRH2에서 다양성이 또한 생성될 수 있다. CDR-H1 및 H2 다양성의 디자인은 이전의 디자인보다 천연 다양성에 더욱 밀접하게 매칭되는 다양성에 초점을 맞추는 변형과 함께 기술된 바와 같은 천연 항체 레퍼토리를 모방하기 위한 표적화 전략을 따른다.
- [0130] CDRH3에서의 다양성을 위해, H3의 길이가 상이한 다수의 라이브러리들을 따로따로 구축한 후 조합하여 표적 항원에 대한 결합체를 선별할 수 있다. 기존에 기술되어 있고 본원에서 하기에 기술된 바와 같은 고체 지지체 선별 및 용액 분류 방법을 사용하여 다수의 라이브러리들을 풀링(pooling) 및 분류할 수 있다. 다중 분류 전략을 사용할 수 있다. 예를 들어, 한 변형은 고체에 결합된 표적 상에서 분류한 후, 융합 폴리펩티드 상에 존재할 수 있는 태그 (예를 들어, 항-gD 태그)에 대해 분류하고, 고체에 결합된 표적 상에서 또다르게 분류하는 것을 수반한다. 별법적으로, 먼저 라이브러리 고체 표면에 결합된 표적 상에서 분류할 수 있고, 이어서 용출된 결합체를 표적 항원의 농도를 감소시키면서 용액 상 결합을 사용하여 분류한다. 상이한 분류 방법들의 조합을 이용하는 것은 고도로 발현된 서열만 선별되는 것의 최소화를 제공하고, 다수의 상이한 고친화력 클론의 선별을 제공한다.
- [0131] 표적 항원에 대한 고친화력 결합체를 라이브러리로부터 단리할 수 있다. H1/H2 영역에서의 다양성을 제한하는 것은 다의성을 약 10^4 배 내지 10^5 배 감소시키고, H3 다양성을 더욱 허용하는 것은 더욱 높은 친화력의 결합체를 제공한다. CDRH3에서의 다양성의 유형이 상이한 라이브러리들의 이용 (예를 들어, *DVK* 또는 *NVT*의 이용)은 표적 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 결합체의 단리를 제공한다.
- [0132] 상기 기술된 바와 같이 풀링된 라이브러리로부터 단리된 결합체들 중에서, 경쟁에서의 제한된 다양성을 제공함으로써 친화력이 추가로 개선될 수 있다는 것이 발견되었다. 이러한 실시양태에서 경쟁 다양성이 하기와 같이 생성된다: CDRL1에서는, 아미노산 위치 28이 RDT에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 29가 RKT에 의해 코딩되며, 아미노산 위치 30이 RVW에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 31이 ANW에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 32가 THT에 의해 코딩되고, 임의적으로, 아미노산 위치 33이 CTG에 의해 코딩되고; CDRL2에서는, 아미노산 위치 50이 KBG에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 53이 AVC에 의해 코딩되고, 임의적으로, 아미노산 위치 55가 GMA에 의해 코딩되고; CDRL3에서는, 아미노산 위치 91이 TMT 또는 SRT 또는 양쪽 모두에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 92가 DMC에 의해 코딩되며, 아미노산 위치 93이 RVT에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 94가 NHT에 의해 코딩되고, 아미노산 위치 96이 TWT 또는 YKG 또는 양쪽 모두에 의해 코딩된다.
- [0133] 또다른 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역에서의 다양성이 있는 라이브러리 또는 라이브러리가 생성된다. 이러한 실시양태에서, 다양한 길이의 H3 영역을 사용하여, 그리고 주로 코돈 셋트 *XYZ* 및 *NNK* 또는 *NNS*를 사용하여 CDRH3에서의 다양성이 생성된다. 개별적인 올리고뉴클레오타이드들을 사용하여 라이브러리들이 형성되어 풀링될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드들이 풀링되어 라이브러리의 서브셋트가 형성될 수 있다. 이러한 실시양태의 라이브러리를 고체에 결합된 표적에 대해 분류할 수 있다. 다중 분류로부터 단리된 클론을 특이성 및 친화력에 대해 ELISA 분석법을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 특이성에 대해, 원하는 표적 항원, 뿐만 아니라 다른 비-표적 항원에 대해 클론을 스크리닝할 수 있다. 그후, 표적 항원에 대한 결합체를 용액 결합 경쟁 ELISA 분석법 또는 스팟(spot) 경쟁 분석법에서 친화력에 대해 스크리닝할 수 있다. 상기 기술된 바와 같이 제조된 *XYZ* 코돈 셋트를 이용하여 라이브러리로부터 고친화력 결합체를 단리할 수 있다. 이러한 결합체는 세포 배양에서 높은 수율로 항체 또는 항원 결합 단편으로 쉽게 생산될 수 있다.
- [0134] 일부 실시양태에서, CDRH3 영역의 길이에서의 다양성이 더 큰 라이브러리들을 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 약 7개 내지 19개 범위의 CDRH3 영역이 있는 라이브러리들을 생성시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0135] 이러한 실시양태의 라이브러리로부터 단리된 고친화력 결합체는 높은 수율로 박테리아 및 진핵생물 세포 배양에서 쉽게 생산된다. gD 태그, 바이러스 코트 단백질 성분 서열과 같은 서열을 쉽게 제거하고/하거나 높은 수율의 전장 항체 또는 항원 결합 단편의 생산을 제공하기 위해 불변 영역 서열을 포함하도록 벡터를 디자인할 수 있다.

[0136] CDRH3 내에 돌연변이가 있는 라이브러리가 다른 CDR, 예를 들어 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 및/또는 CDRH2의 변이체 버전을 함유하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 한 실시양태에서, CDRH3 라이브러리가 미리 정해진 코돈 셋트를 사용하여 위치 28, 29, 30, 31, 및/또는 32에 변이체 아미노산이 있는 인간화 4D5 항체 서열의 정황에서 생성된 CDRL3 라이브러리와 조합된다. 또다른 실시양태에서, CDRH3에 대한 돌연변이가 있는 라이브러리가 변이체 CDRH1 및/또는 CDRH2 중쇄 가변 도메인을 포함하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 한 실시양태에서, 위치 28, 30, 31, 32 및 33에 변이체 아미노산이 있는 인간화 항체 4D5 서열로 CDRH1 라이브러리가 생성된다. 미리 정해진 코돈 셋트를 사용하여 위치 50, 52, 53, 54, 56 및 58에 변이체 아미노산이 있는 인간화 항체 4D5의 서열로 CDRH2 라이브러리가 생성될 수 있다.

[0137] (xi) 항체 돌연변이체

[0138] 과거 라이브러리로부터 생성된 신규 항체를 추가로 변형시켜, 어버이 항체에 비해 물리적, 화학적 및/또는 생물학적 성질이 개선된 항체 돌연변이체를 생성시킬 수 있다. 사용된 분석법이 생물학적 활성 분석법인 경우, 바람직하게는, 선택된 분석법에서의 항체 돌연변이체의 생물학적 활성이 이러한 분석법에서의 어버이 항체의 생물학적 활성보다 적어도 약 10배 더 양호하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 양호하며, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50배 더 양호하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 양호하다. 예를 들어, 바람직하게는, 항-CRIg 항체 돌연변이체는 CRIg에 대한 결합 친화력이 어버이 항체의 결합 친화력보다 적어도 약 10배 더 강하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 강하며, 더욱 바람직하게는 적어도 약 50배 더 강하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 강하다.

[0139] 항체 돌연변이체를 생성시키기 위해, 하나 이상의 아미노산 변경 (예를 들어, 치환)이 어버이 항체의 초가변 영역 중 하나 이상에 도입된다. 별법적으로, 또는 추가적으로, 프레임워크 영역 잔기의 하나 이상의 변경 (예를 들어, 치환)이 어버이 항체에 도입될 수 있고, 이는 제2 포유류 종으로부터의 항원에 대한 항체 돌연변이체의 결합 친화력에서의 개선을 초래한다. 변형된 프레임워크 영역 잔기의 예로는 비-공유결합적으로 항원에 직접적으로 결합하고/하거나 ([Amit et al. (1986) Science 233:747-753]); CDR의 입체형상과 상호작용하거나 이를 일으키고/키거나 ([Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917]); $V_L - V_H$ 계면에 참여 (EP 239 400B 1)하는 것들이 포함된다. 특정 실시양태에서, 이같은 프레임워크 영역 잔기들 중 하나 이상의 변형은 제2 포유류 종으로부터의 항원에 대한 항체의 결합 친화력의 강화를 초래한다. 예를 들어, 약 1개 내지 약 5개의 프레임워크 잔기가 본 발명의 이러한 실시양태에서 변경될 수 있다. 때때로, 이는, 초가변 영역 잔기가 변경되지 않은 경우에도, 임상전 실험에서 사용하기에 적절한 항체 돌연변이체를 산출시키는데 충분할 수 있다. 그러나, 일반적으로, 항체 돌연변이체는 추가적인 초가변 영역 변경(들)을 포함할 것이다.

[0140] 변경되는 초가변 영역 잔기는, 특히 어버이 항체의 출발 결합 친화력이 무작위로 생산된 항체 돌연변이체가 쉽게 스크리닝될 수 있도록 하는 경우에, 무작위로 변화될 수 있다.

[0141] 이같은 항체 돌연변이체를 생성시키기 위한 한 유용한 절차가 "알라닌-스캐닝 돌연변이유발"로 칭해진다 ([Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085]). 여기서, 초가변 영역 잔기(들) 중 하나 이상이 알라닌 또는 폴리알라닌 잔기(들)로 치환되어, 제2 포유류 종으로부터의 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 초가변 영역 잔기(들)를 치환 부위에서 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 돌연변이를 도입함으로써 정련한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질이 미리 결정될 필요는 없다. 이러한 방식으로 생산된 ala-돌연변이체를 본원에 기술된 바와 같이 이의 생물학적 활성에 대해 스크리닝한다.

[0142] 일반적으로, 보존적 치환 예컨대 "바람직한 치환"의 표제 하에 하기에 제시된 것들로 치환이 시작될 것이다. 이같은 치환으로 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화력)에서의 변화가 초래되면, 하기 표에서 "예시적 치환"으로 명명된 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기술되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입되고, 생성물이 스크리닝된다.

[0143] 바람직한 치환:

[0144]

본래의 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu

Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0145] 항체의 생물학적 성질에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상과 같은, 치환 영역 내의 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피(bulk)를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기초로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0146] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0147] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr, asn, gln;

[0148] (3) 산성: asp, glu;

[0149] (4) 염기성: his, lys, arg;

[0150] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0151] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0152] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0153] 또다른 실시양태에서, 변형을 위해 선택된 부위가 과거 디스플레이 (상기 참조)를 사용하여 친화력 성숙된다.

[0154] 당업계에서 공지된 다양한 방법에 의해 아미노산 서열 돌연변이체를 코딩하는 핵산 분자가 제조된다. 이러한 방법에는 어버이 항체의 앞서 제조된 돌연변이체 또는 비-돌연변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 돌연변이체를 제조하기 위한 바람직한 방법은 부위 지정 돌연변이유발이다 (예를 들어, [Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488] 참조).

[0155] 특정 실시양태에서, 항체 돌연변이체에서 단일 추가변 영역 잔기만이 치환될 것이다. 또다른 실시양태에서, 어버이 항체의 추가변 영역 잔기들 중 2개 이상, 예를 들어 약 2개 내지 약 10개의 추가변 영역이 치환될 것이다.

[0156] 통상적으로, 생물학적 성질이 개선된 항체 돌연변이체는 어버이 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성이 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상인 아미노산 서열을 가질 것이다. 이러한 서열에 관한 동일성 또는 유사성은 서열들을 정렬하고, 필요하다면 갭(gap)을 도입하여, 최대 백분율의 서열 동일성을 달성한 후의 어버이 항체 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 동일한 잔기) 또는 유사한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 공통적인 측쇄 성질을 기초로 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기 (상기 참조))의 백분율로 본원에서 정의된다. N-말단, C-말단 또는 내부 확장, 결실, 또는 가변 도메인 바깥쪽에서의 항체 서열 내로의 삽입 중 어떤 것도 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0157] 항체 돌연변이체의 생산 후, 어버이 항체와 비교하여 이러한 분자의 생물학적 활성을 결정한다. 상기 언급된 바와 같이, 이는 항체의 결합 친화력 및/또는 기타 생물학적 활성을 결정하는 것을 수반할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 항체 돌연변이체들의 패널을 제조하여, 항원 또는 이의 단편에 대한 결합 친화력에 대

해 스크리닝한다. 이러한 초기 스크리닝으로부터 선별된 항체 돌연변이체들 중 하나 이상에 하나 이상의 추가적인 생물학적 활성 분석법을 임의적으로 적용하여, 결합 친화력이 강화된 항체 돌연변이체(들)이, 예를 들어 임상전 연구에, 실제로 유용한지를 확인한다.

[0158] 이렇게 선별된 항체 돌연변이체(들)에, 종종 항체의 의도된 용도에 따라, 추가적인 변형을 적용할 수 있다. 이 같은 변형은 추가적인 아미노산 서열 변경, 이중 폴리펩티드(들)에의 융합 및/또는 공유결합 변형 예컨대 하기에 상세히 설명되는 것들을 수반할 수 있다. 아미노산 서열 변경과 관련하여, 예시적인 변형이 상기에 상세하게 설명되어 있다. 예를 들어, 항체 돌연변이체의 적합한 입체형상을 유지하는데 수반되지 않는 임의의 시스템인 잔기가 또한 치환되어 (일반적으로는 세린으로 치환됨), 분자의 산화 안정성을 개선시키고, 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 역으로, 시스템인 결합(들)이 항체에 부가되어 이의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우). 아미노산 돌연변이체의 또다른 유형에서는 글리코실화 패턴이 변경된다. 이는 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 모이어티(moiety)를 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 부가함으로써 달성될 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (식중 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 자일로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시라이신 또한 사용될 수 있다. 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 하나 이상의 상기 기술된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 또한 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0159] (xii) 항체의 재조합 생산

[0160] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하여, 추가적인 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입할 수 있다. 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써), 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 쉽게 단리되고 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 일반적으로 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다 (예를 들어, 거명에 의해 본원에 명확하게 포함된 미국 특허 번호 5,534,615에 기술되어 있음).

[0161] 본원에서의 벡터 내의 DNA의 클로닝 또는 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 상기 기술된 원핵생물, 효모, 또는 고급 진핵생물 세포이다. 이러한 목적을 위한 적절한 원핵생물에는 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그람 (Gram)-음성 또는 그람-양성 생물, 예를 들어, 장내세균 예컨대 에셰리키아(*Escherichia*), 예를 들어, 대장균, 엔테로박테르(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실러스(*Bacillus*) 예컨대 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, DD 266,710 (1989년 4월 12일 공개)에 개시된 바실러스 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 예컨대 슈도모나스 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)가 포함된다. 한 바람직한 대장균 클로닝 숙주는 대장균 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 대장균 B, 대장균 X1776 (ATCC 31,537), 및 대장균 W3110 (ATCC 27,325)도 적절하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.

[0162] 원핵생물에 더하여, 진핵생물 미생물 예컨대 필라멘트형 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 대한 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상적인 베이커(baker) 효모가 저급 진핵생물 숙주 미생물들 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어, 클루이베로마이세스 락티스(*K. lactis*), 클루이베로마이세스 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 클루이베로마이세스 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 클루이베로마이세스 위케라미이(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 클루이베로마이세스 왈티이(*K. waltii*) (ATCC 56,500), 클루이베로마이세스 드라소필라룸(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906), 클루이베로마이세스 테르모톨레란스(*K. Thermotolerans*), 및 클루이베로마이세스 마르시아누스(*K.*

marxianus); 야로위아(*Yarrowia*) (EP 402,226); 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코테르마 리시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오마이세스(*Schwanniomyces*) 예컨대 슈완니오마이세스 오시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 필라멘트형 진균, 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주 예컨대 아스페르길루스 니둘란스(*A. nidulans*) 및 아스페르길루스 니게르(*A. niger*)와 같은 다수의 또다른 속, 종, 및 계통이 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

[0163] 글리코실화 항체의 발현을 위한 적절한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에테스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에테스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*) (과일파리), 및 bombyx 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 수많은 배콜로바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 증식허용성 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어, 오토그래파 칼리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 bombyx 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 입수가가능하고, 이같은 바이러스들은, 특히 스포도테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 면, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0164] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁액 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, [Graham, et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, 예를 들어, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 (TM4, [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트(buffalo rat) 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 ([Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다.

[0165] 숙주 세포를 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터 유도, 형질전환체 선별 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적합하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0166] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판되는 배지 예컨대 햄(Ham) F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 및 둘베코 변형 이글 배지 ((DMEM), Sigma)가 숙주 세포를 배양하는데 적절하다. 또한, [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 1990/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re.30,985에 기술된 배지들 중 임의의 것을 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이러한 배지에 필요하다면 호르몬 및/또는 기타 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 GENTAMYCIN™), 미량원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 일반적으로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지 공급원이 보충될 수 있다. 임의의 또다른 필요한 보충물이 당업자에게 공지된 적합한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현에 선택된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 것들이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0167] 제조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포 내에서 생산되거나, 원형질막 주위공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 입상물질 잔해물을, 예를 들어, 원심분리 또는 초여과에 의해 제거한다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 일반적으로 이같은 발현 시스템으로부터의 상등액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 사용하여 먼저 농축한다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF가 임의의 상기 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제가 포함될 수 있다.

- [0168] 세포로부터 제조된 항체 조성물을, 예를 들어, 히드록실 아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 좌우된다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$, 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제할 수 있다 ([Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 감마3에 대해 권장된다 ([Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 거의 대부분 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정적인 매트릭스 예컨대 제어형 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 유속을 더 빠르게 하고 처리 시간을 더 짧게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker (Phillipsburg, N.J.))가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라 기타 단백질 정제 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 해파린 SEPHAROSE™ 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.
- [0169] CRIg 길항제의 용도
- [0170] 차단 항-CRIg 항체 및 이의 단편이 포함되는 본 발명의 CRIg 길항제는 세포내 병원체의 세포 진입을 억제하고/하거나 순환으로부터 병원체를 소거하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서의 CRIg 길항제는 이같은 병원체에 의해 야기되는 감염성 질환을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다. 이같은 감염성 질환에는 바이러스 질환, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), A형, B형 및 C형 간염 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 (HSV), 사이토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인-바르 바이러스 (EBV), 또는 인간 유두종 바이러스 (HPV) 감염; 기생충, 예컨대 플라즈모디아 종, 리슈만편모충 종, 예를 들어 큰 리슈만편모충, 주혈흡충 종, 파동편모충 종에 의해 야기되는 질환; 및 박테리아 감염, 예컨대 마이코박테리아, 특히 결핵균, 나병균, 예르시니아 슈도투베르쿨로시스, 살모넬라 타이피무리움, 리스테리아 모노사이토제네스, 연쇄구균, 대장균, 포도알균에 의해 야기되는 감염; 진균 감염, 예컨대 칸디다 종, 아스페르길루스 종, 및 폐포자충에 의해 야기되는 감염이 비제한적으로 포함된다.
- [0171] 또한, 차단 항-CRIg 항체 및 이의 단편이 포함되는 본 발명의 CRIg 길항제는 보체 수용체 CRIg를 통한 적혈구 또는 혈소판의 원치않는 소거를 방지하는데 사용될 수 있다. 결과적으로, 본원에서의 길항제는 용혈 빈혈 및/또는 저혈소판증의 예방 또는 치료에서 유용성이 발견된다.
- [0172] 원하는 정도의 순도를 갖는 확인된 화합물 (예컨대 항체)를 임의적인 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 ([Remington's Pharmaceutical Sciences, 상기 문헌])와 혼합함으로써 본원에서의 화합물의 치료 제형이 동결건조 케이크 또는 수용액의 형태로 보관용으로 제조된다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산이 포함되는 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기)의 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린이 포함되는 당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 알콜 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 카운터 이온 예컨대 나트륨; 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronic) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.
- [0173] 생체내 투여에 사용될 화합물은 반드시 무균성이어야 한다. 이는 동결건조 및 재구성 전 또는 후의 무균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0174] 치료 조성물은 무균성 접근 포트(port)가 있는 용기, 예를 들어, 피하주사 바늘이 관통가능한 마개가 있는 정맥내 용액 팩 또는 바이알 내에 놓일 수 있다.
- [0175] 투여 경로는 공지된 방법에 따르고, 예를 들어, 정맥내, 복강내, 뇌내, 근육내, 안내, 동맥내 또는 병변내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 또는 서방성 방출 시스템에 의한 것이다.
- [0176] 뇌내 사용을 위해, CNS의 뇌척수액 저장소 내로의 주입에 의해 연속적으로 화합물이 투여될 수 있지만, 볼루스(bolus) 주입이 허용가능하다. 바람직하게는 화합물이 뇌실 내로 투여되거나, 다른 방식으로 CNS 또는 척수액 내로 도입된다. 연속 투여 수단 예컨대 펌프를 사용하여 유치 카테터(indwelling catheter)에 의해 투여가 수행될 수 있거나, 또는 서방성 비히클의 이식, 예를 들어, 뇌내 이식에 의해 투여될 수 있다. 더욱 구체적으로,

화합물이 만성적으로 이식된 삽입관을 통해 주사될 수 있거나, 또는 삼투압 미니펌프의 보조로 만성적으로 주입될 수 있다. 소형 튜빙(tubing)을 통해 뇌실에 단백질을 전달하는 피하 펌프가 이용가능하다. 고도로 정교한 펌프가 피부를 통해 재충전될 수 있고, 이의 전달 속도는 수술을 시술하지 않으면서 설정될 수 있다. 피하 펌프 기구 또는 완전 이식형 약물 전달 시스템을 통한 연속적인 뇌실내 주입을 수반하는 적절한 투여 프로토콜 및 전달 시스템의 예는 [Harbaugh, J. Neural Transm. Suppl., 24:271 (1987)]; 및 [DeYebenes, et al., Mov. Disord. 2:143 (1987)]에 기술된, 알츠하이머 환자 및 파킨슨병용 동물 모델에 대한 도파민, 도파민 작동제, 및 콜린작용성 작동제의 투여에 사용되는 것들이다.

[0177] 서방성 제제의 적절한 예에는 성형품, 예를 들어 필름, 또는 마이크로캡슐 형태의 반투과성 중합체 매트릭스가 포함된다. 서방성 매트릭스에는 폴리에스테르, 히드로젤, 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919, EP 58,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 ([Sidman, et al., 1983, Biopolymers 22:547]), 폴리 (2-히드록시에틸-메타크릴레이트) ([Langer, et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167]; [Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98]), 에틸렌 비닐 아세테이트 ([Langer, et al., 동일문헌]) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988A)이 포함된다. 서방성 조성물은 리포솜으로 포획된 화합물을 또한 포함하고, 이는 공지된 방법으로 제조될 수 있다. ([Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:3688 (1985)]; [Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545; 및 EP 102,324A). 통상적으로, 리포솜은 지질 함량이 약 30 몰% 콜레스테롤을 초과하는 소형 (약 200-800 옹스트롬)의 단층 유형이고, 선택된 비율은 최적의 치료법을 위해 조정된다.

[0178] 치료적으로 사용될 활성 화합물의 유효량은, 예를 들어, 치료 목적, 투여 경로, 및 환자의 용태에 좌우될 것이다. 따라서, 최적의 치료 효과를 수득하기 위해 필요한대로 치료사가 투여량을 적정하고 투여 경로를 변형시키는 것이 필요할 것이다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 요인들에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 에서 100 mg/kg 이상까지의 범위일 것이다. 전형적으로, 임상적은 뉴런 기능을 회복, 유지, 그리고 임의적으로는 재확립시키는 투여량에 도달할 때까지 활성 화합물을 투여할 것이다. 통상적인 분석법에 의해 이러한 치료법의 진행이 쉽게 모니터링된다.

[0179] 본 발명의 추가적인 상세사항이 하기의 비제한적인 실시예에 의해 예시된다.

실시예

[0180] 실시예 1

[0181] muCRIG 및 huCRIG-short에 대한 모노클로날 항체의 생성

[0182] 모노포스포릴 지질 A/트레할로스 디코리노미콜레이트 애쥬번트 (Corixa (Hamilton, MT)) 내의 2 μg 의 면역어드헤신 마우스 (mu) CRIG-mFc (PUR 9465, 마우스 IgG1의 C-말단 Fc 부분에 융합된 마우스 CRIG)를 B6 (KO) 마우스 Jam4 6E3 (Genentech, Inc.)의 발바닥 내에 11번 주사함으로써 무린 CRIG (muCRIG)에 대한 모노클로날 항체가 생성되었다. 마우스로부터의 오금 림프절을 P3X63Ag.U.1 (ATCC #CRL-1957) 골수종 세포와 융합시켰다. 하이브리도마 세포를 muCRIG에 대한 결합 친화력에 대해 muCRIG-LFH (PUR 9052, 류신 지퍼, 플러그 및 (8x) 히스티딘 태그에 접합된 마우스 CRIG)에 대해 스크리닝하였다. 항체를 생산하는 세포주를 제한 희석에 의해 클로닝하였다.

[0183] 또다른 연구에서, muCRIG-hFc (PUR 9460, 마우스 IgG1의 C-말단 Fc 부분이 있는 마우스 CRIG) 및 huCRIG-short-huFc (PUR 10125, 인간 IgG1의 C-말단 Fc 부분이 있는 인간 CRIG 단축형)의 공동-면역화에 의해 모노포스포릴 지질 A/트레할로스 디코리노미콜레이트 애쥬번트 (Corixa (Hamilton, MT)) 내의 각각의 2 μg 의 muCRIG 및 huCRIG-short-huFc를 B6 (KO) 마우스 Jam4 6E3의 발바닥 내에 11번 주사함으로써 muCRIG 및 huCRIG-short에 대한 모노클로날 항체가 생성되었다. 마우스로부터의 오금 림프절을 P3X63Ag.U.1 골수종 세포와 융합시켰다. 하이브리도마 세포를 muCRIG, huCRIG-short, 또는 양쪽 모두에 대한 결합 친화력에 대해 muCRIG 및 huCRIG-short 양쪽 모두에 대해 스크리닝하였다. 항체를 생산하는 세포주를 제한 희석에 의해 클로닝하였다.

[0184] 마우스 CRIG-iC3b/C3b 또는 인간 CRIG-iC3b/C3b 결합을 차단하는 능력에 대한 하이브리도마 상등액의 특성화도 4 및 5에 제시된다.

[0185] 실시예 2

[0186] muCRIG 및 huCRIG-short에 대한 모노클로날 항체의 추가적인 특성화

- [0187] 항-CRIg 차단 항체와 함께 인큐베이션된 CRIg-발현 CHO 세포에 대한 iC3b 결합의 억제: 400,000개의 CHO 세포를 항체로 25분 동안 4℃에서 코팅하고, 1× 세정하였다. 5 µg/ml (27 nM) iC3b를 30분 동안 4℃에서 첨가하고, 세정하고, FACScan에서 분석하였다. 결과가 도 6에 제시된다.
- [0188] iC3b가 CRIg+ 복막 대식세포에 결합하는 것의 차단: 복막 세포를 세척하고, 한번 천공시키고, 1% 젤라틴, 1 mM Ca⁺⁺ 및 1 mM Mg⁺⁺ (GVB⁺⁺)를 함유하는 베로날(veronal) 완충제에 재현탁시켰다. 세포를 내독소가 없는 모노클로날 항체 (항-CRIg mAb, 클론 2H1, 및 이소타입 대조군)과 함께 또는 이러한 항체 없이 인큐베이션하였다. 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 상이한 농도의 A488-표지 iC3b (Advanced Research Technologies Inc.)와 함께 인큐베이션하였다. 그후, 세포를 FcR-매개 결합에 대해 차단하고 (상기와 같이), 17C9-A647 및 F4/80-PE에 대해 염색하였다. CRIg^{high} F4/80^{high} 및 CRI^{neg} F4/80^{high} 세포에 대한 보체 단백질의 결합을 평가하였다. 결과가 도 7에 제시된다.
- [0189] 시험관내에서의 CRIg+ 복막 대식세포에 대한 리스테리아 모노사이토제네스의 결합의 억제: 복막 세포를 세척하고, M1/70 또는 2H1 모노클로날 항체와 함께 또는 이러한 항체 없이 인큐베이션하였다. LM-A488를 행크(Hank) 균형 염 용액 (HBSS)에 현탁시키고, C3 녹아웃(knock out) 또는 야생형 마우스 혈청 (10%)과 혼합하고, 37℃에서 30분 동안 회전시켰다. 그후, 혈청 옵소닌화-LM-A488를 RPM에 첨가하고, 로커(rocker)에서 37℃에서 30분 동안 혼합하였다. 세포를 얼음 상에서 냉각시키고, FcR-매개 결합에 대해 차단하고, 17C9-A647 및 F4/80-PE에 대해 염색하였다. 세포를 추가로 7-AAD와 함께 인큐베이션하여, 죽은 세포 및 잔해물을 검출하였다. 얼음 상에서 수분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 2회 세정하여, 임의의 결합되지 않은 7-AAD 및 항체를 제거하였다. 세포를 HBSS에 재현탁시키고, 1% 포름알데히드로 16시간 동안 고정된 후, 4색 유동 세포측정 기구에 러닝(running)시켰다. 결과가 도 8에 제시된다.
- [0190] 순환으로부터 리스테리아 모노사이토제네스의 소거의 억제: 리스테리아 모노사이토제네스 감염 전날 마우스에게 100 µg 14G8 차단 항체를 2회 주사하였다. 6시간 간격으로 주사하였다. 하루 후, 마우스를 2×10⁷ CFU 리스테리아 모노사이토제네스로 감염시켰다. 10분 후에 채혈하여, 뇌-심장 주입 플레이트 상에서 하룻밤 동안 성장된 콜로니를 카운팅함으로써 박테리아의 존재에 대해 분석하였다. 결과가 도 9에 제시된다.
- [0191] 순환으로부터 스타필로코쿠스 아우레우스 균주 M의 소거의 억제: 리스테리아 모노사이토제네스 대신 2×10⁷ CFU 스타필로코쿠스 아우레우스 균주 M을 정맥내 주사한 것을 제외하고는 이러한 실험에서 사용된 방법은 상기와 같았다. 도 10에 기재된 결과는 테스트된 CRIg 차단 항체가 순환으로부터의 스타필로코쿠스 아우레우스 균주 M의 소거를 억제하여 간에서의 감소된 박테리아 부하 및 심장, 비장 및 신장에서의 증가된 박테리아 부하를 유도한다는 것을 나타낸다.
- [0192] 차단 마우스 CRIg 항체로의 처치가 마우스 모델에서 앞발 종창을 억제한다 (도 11A, B.). 모든 동물을 병원체가 없는 무균성 조건 하에 유지시켰고, Genentech의 <Institutional Animal Care and Use Committee>에 의해 동물 실험이 허가되었다. 관절염유발성 모노클로날 항체 혼합물 (Chemicon)을 6주령 Balb/c 마우스 (The Jackson Laboratory)에 주사함으로써 관절염을 유도하였다. 간략하게, 2 mg의 항-콜라겐 유형 II 항체를 마우스에 정맥내 주사하고, 3일 후에 25 µg의 LPS를 복강내 주사하였다. 항체 주사 전일부터 시작하여 마우스를 4 mg/kg의 CRIg-Fc 또는 gp-120에 대한 항체 (IgG1 이소타입, 대조군-Fc)로 처치하였다. 처치의 성질에 대해 알지 못하는 숙련자들에 의해 임상 채점을 수행하였다.
- [0193] 마우스 및 인간 CRIg 양쪽 모두에 결합하는 차단 항체. 뮤린 CRIg (muCRIg) 또는 짧은 버전 또는 긴 버전의 인간 CRIg (huCRIg(S), huCRIg(L))를 발현하는 CHO 세포를 Alexa-488-접합 항체와 함께 25분 동안 4℃에서 인큐베이션하고, 세정하고 FACScan에서 분석하였다. 결과가 도 12에 제시된다..
- [0194] 교차-차단 모노클로날 항체로의 C3 단편에 대한 마우스 및 인간 CRIg 결합의 억제. 항-CRIg 차단 항체와 함께 인큐베이션된 뮤린 CRIg-발현 CHO 세포 및 인간 CRIg-발현 THP-1 세포에 대한 iC3b 결합의 억제: 400,000개의 CHO 세포 또는 THP-1을 항체로 25분 동안 4℃에서 코팅하고, 1× 세정하였다. 5 µg/ml (27 nM) iC3b를 30분 동안 4℃에서 첨가하고, 세정하고, FACScan에서 분석하였다. 결과가 도 13에 제시된다.
- [0195] 표 1은 맥시소프(maxisorp) 플레이트에 코팅된 CRIg 용합 단백질에 대한 결합, 유동 세포측정에 의해 모니터링된 세포 표면 상의 CRIg에 대한 결합, 및 CRIg-C3b/iC3b 상호작용의 차단을 기초로 하는 CRIg 항체의 특성화를 요약한다.
- [0196] 항-CRIg 항체를 코딩하는 cDNA들이 부다페스트 조약의 조건 하에 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC) (10801

University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)에 기탁되었다.

[0197]

물질	ATCC 기탁 번호	기탁일
14G8	PTA-8298	2007년 3월 27일
3D10	PTA-8299	2007년 3월 27일
2H1	PTA-8300	2007년 3월 27일

[0198]

이러한 기탁은 특허 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약 및 이의 규정 (부다페스트 조약)의 조항 하에 이루어졌다. 이는 기탁일로부터 30년 동안 기탁물의 생육성 배양물의 유지를 보장한다. 기탁물은 부다페스트 조약의 조건 하에, 그리고 Genentech, Inc.와 ATCC 간의 협약을 조건으로 ATCC로부터 입수가 가능할 것이고, 상기 협약은 관련된 미국 특허의 허여 시 또는 임의의 미국 또는 외국 특허 출원의 공개 시 (어느 쪽이든 더 빠른 것), 기탁물의 배양물의 자손을 영구적이고 비제한적으로 일반인이 입수할 수 있는 것을 보장하고, 35 USC § 122 및 이에 따른 미국 특허상표청장의 규칙 (886 OG 638에 대한 특정 참조와 함께 37 CFR § 1.14 포함)에 따라 자격이 있는 것으로 미국 특허상표청장에 의해 결정된 이가 자손을 입수할 수 있는 것을 보장한다. 본 출원의 특허권자는 기탁된 물질의 배양물이 적절한 조건 하에 배양되었을 때 사망하거나, 손실되거나 파괴되면, 물질이 공고시에 즉시 동일한 또다른 것으로 대체될 것이라는 것에 동의하였다. 기탁된 물질의 입수가능성은 임의의 정부의 권한 하에 이의 특허법에 따라 수여된 권리를 위반하여 발명을 실행하는 자격증으로 해석되지 않아야 한다.

[0199]

본 명세서에 언급된 모든 특허 및 문헌은 전체적으로 거명에 의해 본원에 명확하게 포함된다.

[0200]

본 발명이 특정 실시양태로 간주되는 것을 참조로 기술되었지만, 본 발명이 이같은 실시양태에 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 이와 반대로, 본 발명은 첨부된 청구항의 취지 및 범주 내에 포함되는 다양한 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

표 1

항체 특성들의 요약

정제된 클론	이소타입	FACS mCRlg CHO	FACS hCRlg(S) THP-1	FACS hCRlg(L) THP-1	iC3b 차단 mCRlg CHO	iC3b 차단 hCRlg(S) THP-1	iC3b 차단 hCRlg(L) THP-1
3D10	mlgG1	++	++	++	+	+	+
2H1	mlgG1	++	-	-	+	-	-
14G8	mlgG1	++	-	-	+	-	-

[0201]

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1A-1B는 아미노산 399개의 전장 길이 형태의 천연 인간 CRlg의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다 (huCRlg, 각각 서열 1 및 2).

[0032]

도 2A-2B는 아미노산 305개의 짧은 형태의 천연 인간 CRlg의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다 (huCRlg-short, 각각 서열 3 및 4).

[0033]

도 3A-3C는 아미노산 280개의 천연 뮤린 CRlg의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸다 (muCRlg, 각각 서열 5 및 6).

[0034]

도 4 및 5는 muCRlg-iC3b/C3b 또는 huCRlg-iC3b/C3b 결합을 차단하는 능력에 대한 하이브리도마 상등액의 특성화를 나타낸다.

[0035]

도 6. 항-CRlg 항체 2H1 및 14G8가 뮤린 CRlg-발현 CHO 세포에 대한 iC3b 결합을 차단한다.

[0036]

도 7. 항-CRlg 항체 2H1이 CRlg+ 복막 대식세포에 대한 iC3b의 결합을 차단한다.

[0037]

도 8. 항-CRlg 차단 항체 2H1이 시험관내에서 CRlg+ 복막 대식세포에 대한 리스테리아 모노사이토제네스의 결합을 억제한다.

- [0038] 도 9. CRiG 항체 14G8이 순환으로부터의 리스테리아 모노사이토제네스의 소거를 억제한다.
- [0039] 도 10. 항-CRiG 항체 14G8이 순환으로부터의 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 균주 M의 소거를 억제하여, 간에서의 감소된 박테리아 부하 및 심장, 비장 및 신장에서의 증가된 박테리아 부하를 유도한다.
- [0040] 도 11A 및 B. 항원-유도 관절염 (AIA)에서의 항-CRiG 항체 14G8의 역할.
- [0041] 도 12. CRiG-발현 세포에 대한 항-CRiG 항체 3D10의 결합.
- [0042] 도 13. 항-CRiG 항체 3D10이 인간 및 뮤린 CRiG를 발현하는 세포에 대한 iC3b 결합을 차단한다.
- [0043] 표 1은 항-CRiG 항체 3D10, 2H1 및 14G8의 특성들의 요약을 제공한다.

도면

도면1A

```

1  CCACTGAC CTGGTCTTCTA TGGATAGAG GGTGGAGGA AGGACAGAG TACCTCTGAC TGTGATGGG ATCTTACTG GCGTGTACT CCGTGGGAC
  GGTGGAGTG GAGCGAGAT AGCTATCTCT GAGCTCTT TCGTCTCTC ATGGAGACG ACACCTACCC TAGATGACD CGAGGATGA GGAACCGTTC
1  M G I L L G L L L G H
   MET
101 CTACAGTGG AACCTATGG CGGTGCGATC CTGGAGTGC CAGAGAGTGT AACAGAGCTT TGGAAAGGG ATGGATGCT TCGTGGACC TATGACCCG
  GATTGACG TGTGATACG GCGAGGTAG GACCTTACG GTCTCTACA TTGTCTGGA ACCTTTCCG TACCTTGA AGGAGGTGG ATACTGGGG
13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L
201 TGGAGGTGA CAGCGAGTC TTGTGAGT GAGTGTGACA AGTGTGTGA GACCTGTCT ACATCTTCT AGTGTACTCT TGTGGAGCC ATATCGACA
  AGGTTCGAT GTGGGTGAG AACACTTCA CGAGCATGT TCGACGAGT GTGGAGACGT GGTAGAGGA TGCATGAGA AGACTCTGG TATAGTGT
47  Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q
301 GGGAAAGTAC CAGGGCGGCC TGCATGTGAG CGACAGGTT CGAGGAGTG TATCGCTTCA ATTGAGCAC CTGGAGTGG ATGACCGGAG CGACTACAG
  CGSTTTGATG GTCCCGCGCG AGTACACTTC GGTGTGTACA GTCTCTCTAC ATAGGAGGT TAACTGTGG GACCTTACC TACTGGCTTC GGTGATGTG
80  A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
401 TGTGAAGTCA CCGGAGAC TCGTGTATGC AACCAAGTGG TGGAGATTA GATTACTGAG CTGGTGTGC AGAACCTTC TGTCTCAAG CGCACAGTGA
  AACCTTCAGT GGAACGCTTG AGGACTACCG TTGGTTCAGC ACTCTCTATT CTATGACTTC GAGCGACAGG TCTTTGAGG ACAGAGGTTG GGGTGTACT
113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T
501 CAACTGGGAG CGSTTATGCG TTGACGCTGC CGAGGGAAT GAGGATTAAC CTTCATGCG AGGCTCGGGG TTCTCTCCG ATCAGTTATA TTGGTATTA
  GTTGACGCTC GGCATACCG AGGTGCGACG GGGTCTCTTA CTCTATATGG GAGTTACCG TCGAGCGCC AGAGAGAGGG TAGTCAATAT AACCATATT
147 T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C A R G S P P I S Y I W Y K

```

도면1B

601 GCACGACACT AATACACAGS AACCATCGAA AGTACAGAC CTAAGTACT TACTCTTCAA GCTTGGGCTG ATAGGCGACT CAGGCTCTTA TTCTGCACT
 GGTGTCTGA TTATGTGTC TTGGGTAACT TCATGTGTGG GATTCATGGA ATGGAGAGTT CGAGCGCCAG TATCGGTCTGA GTCCAGAGAT AAGAGCTGTA
 180 Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T

701 CCCAAGCCGC AGGTTGGCTC TGACGAGAC AGCGACATG TGAGTTGT GGTCCAGAC TCCTCAGAC TACTCAGAC CAGACTGAG GCACCTTACAA
 CGGTTCGCGS TCCAGCGAG ACTGTGTGTG TCCGTGAC ACTTGACA CCAGTTCTG AGGAGTTGS ATGAGTCTG GTTCTGACTC CGTGGATGTT
 213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T

801 CCATGACATA CCCTTGGAAA GCACATCTA CAGTGAAGA GTCTGTGGAC TGACGACTG ACATGGATGS CTACCTTGA GAGACGAGS CTGGGCCAGS
 GGTACGTGAT GGGGACCTT GGTGTAACT GTACTGTGT CAGGACCTG ACTGTGTAC TGTACTACG GATGGACCT CTGTGTGAC GACCGGCTC
 247 M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G

901 AAGAGGCTG CGTGTCTTG CCATCATCT CACTATCTC TTGTCTGTA TGGTGGTTTT TAACATGGC TATATCATG TCCTGTGGAA GACATCCAA
 TTCTGTGGAC GCACAGAAC GGTAGTAGA GTAGTAGAGS AACAGACAT ACCACGAAA ATGGACCGS ATATAGTAGS AGACAGCTT CTGTAGGTT
 280 K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q

1001 CAGAGCATG TCTACGAGC AGCGAGGGA CATTCCAGAG AGGCCAGAA CTGTGGAGA ACAAAGAGS TGCCATCTT CCAGAGTGC TGCTCAGTG
 GTTCTGTAC ACATGCTTGS TGCTGCGCT GTAGCTGTC TCGGTGTGT GAGACCTCTT TGCTACTGC ACCGTAGAA GCGTTCAAGS AGCAGTCTAC
 313 Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D

1101 ATGAGCCAG TTCCAGAAAT CTGGCCAGCA ACTACTTGA TGACCCCTGC ATAGAGAGAG AGTACAGAT CATGGCCGAG ATCAATGGA ACTAGCCCGS
 TACTGGTTG AAGGTCCTTA GACCGTGTG TGAATGAGCT ACTGGGAGCS TATCTGTGC TCATGTCTA GTAGCGGCTC TAGTACCGT TGATGCGGCTC
 347 E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R

1201 CCTGTGGAC ACAGTCTC TGATTAATGA GTTTCTGCC ACTGAGGGA AAGTGTCTG TTAAAAATG CCATTTAGGC CAGGATCTG TGACATATC
 GCAGAGCTG TGTCAGAGS ACCTAACT CAAAGACGS TGACTGCGT TTTCAGAGC AATTTTAAQS GGGTAATCGS GTCTAGAGS ACTGATTAG
 380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

1301 TAGGTGAC CTGCGAGAC TTGGCGCCA TGCGCCAGT TGTATTATG ACCTTATAT GGTTAACAT AA
 ATCTAGCTG GAGTCTTGS AAGCGCGCT ACAGGCTGA ACAATTAQS TGAAATATTA CCATGTGTTA TT

도면2A

1 GTCCACCTGC ACCCTGGCTTC TATGCATAGG AGGCTGGAG AAGGACAGA AGTACTCTG GCTGTGATGG GCACTTACT GGGCTTGCTA CTCTGGGCC
 CAGGTTGAG TGGAGCCAG ATAGCTATCC TCCGACTTTC TTCTGTCT TCAAGAGC GAGCACTAAC CCTAGATGA CCGGAGCAT GAGGACCCG
 1
 M G I L L G L L L G H
 *이곳에서 읽음이 시작됨
 101 ACCTAACGT GCACTTAT GGGGTGCCA TCCTGAGGT GCAAGAGT GTACAGGAC CTGGAGAG GATGTGAA CTTCCTGCA CCTATGACC
 TGAATGTCA CCTGTGATA CCGGACAGGT AGGACTTCA GGTGTCTA CATGTCTG GAACTTTCC CCTACTTA GAGGAGCAT GGAATCTGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P
 201 CCTGCAGGC TACGCCAG TCTTGTGTA GTGCTGTGA GAGGTGGT GAGACCTGT CACCATCTT CTAGGTACT CTTCGGAGA CCATATCCAG
 GAGGTTCG ATGTGGTTC AGAGCAGCT CAGGACCAT GTTGACCGA GTCTGGACA GTGTAGAA GATGACTGA GAACTCTCT GGTATAGTTC
 46 L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I D
 301 CAGGCAAGT ACCAGGGCGG GCTGATGTG AGCCAGAGG TTCCAGAGA TGTATCCCTC CAATTGACA CCGCTGAGAT GATGACCGG AGCCACTACA
 GTCCCTTTCA TGGTCCCGGC GAGGTACAC TGGTGTTC AGGTCTCT ACATAGGGAG GTTACTGT GGGACTCTA CCTACTGGC TGGTGATGT
 79 Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 CGTGTAGT CACTGGAG ACTCTGATG GAAACAGT GTGAGGAT AGATTACTG ACCTGGTGT CCGAAGAC TCCTCAMGC TACTCAGAC
 GCACTTCA GTGACGCTC TGGAGCTAC GATGTGTA TTCTATGAC TGGAGGACA GGTCTTGIG AGGAGTTGG ATGAGTCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T
 501 CAGACTGAG GCACTTACA CCATGACATA CCGCTTGA GCAACTCA CAGTGAGCA GTCTGGAC TGGACACTG ACATGATGG CTACTTGA
 GTCTGACTC GATGATGTT GATAGTAT GGGGACCTT GATGTAGAT GTCACTTGT CAGGACCTG ACCGTGTGAC TGTACTTACC GATGAACT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

1001 GAGCATTGCG TGACATATATC TAGAGTGCAC CTCACAGAGC TTGGGCGGCA TGGTATTATCG AGCTATATAT GGGTACACATA
GTCTGAGAGC ACCTGATATAG ATCTGACGTC GAGGCTCTTGS AACGGGCGGGT AACAAATATAG TGGAATATTA CCATATGTTAT

901 ATCAATGCGA ACTATGSGGGG CGTGGTGGAC AGAGTTGCTG TGGAATATGA GTTCTGTGGC ACTGAGGCGCA AAAGTGCTG TTAAAAATGC CCACATTAGGC
TAGTTACGGT TGAATGGGCGGC GAGAGACGTC TGTCAAAGGAC AACTATTAAT CAAGACACGGG TGACCTCGGGT TTTCACAGAC AATTTTATAG GGGTAAATCGG

279 I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

246 A S G C S S D E P T S O N L G N N Y S D E P C I G O E Y Q I I A Q

801 GCGACAGTGGC TGCTGCAAGTG ATGAGCGMAC TTGGCAGAAAT CTGGGCGACA ACTACTGCA TGAGCGCTGC ATAGAGCAGG AGTACCAAT CATGGCGGAC
GGGTTGACGG AGGAGGTGCAC TACTGGGTTG AAGGGTCTTGA GAGCGGTTGT TGATAGAACT ACTGCGGAGG TATCTGTGTC TGATGGTCTGA GAGCGGGTTC

213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F

701 TGTGTGGGAA GACATTCGCA CAGAGCAATG TCTAGGAGGC AGCGAGGCGCA CATGGCAGAG AGGCGCAAGCA CTCTGAGAAA ACCTATGAGGG TGCGCATCTT
AGACAGCTT CTGAGAGGTT GTTCTGTGAC AGATGACTTGS TGGGTGGGTT GTAGAGGCTTC TGCGGTTGCT GAGAGCTCTT TGSTACTGCG ACCGGTAAAA

179 E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L

601 GAGACCAAGTG CTGGGCGGAGG AAGAGGCTTG CGTGCTTTTG CCATCATCTCT CATCATCTGC TTGTGTGCTA TGSGTGGTTTT TACATGCGCC TATATCATGCG
CTCTGTGCAC GAGCGGGGCTC TTCTCTGGAC GAGAGGAAAC GGGTATGAGA GATGTAGAGG AAGACAGCAAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTAAAG

도면3A

```

1  GTCCACTGC ACCTCGATC TATCGATTG AATTGCGCC CACTGCGCG ATCTCTTACA GATCCCTGCA CCTCGACCA CCGGTCGAG CAGCAAGAG
CAGGTGAGG TGAGCGAGG ATAGCTAAC TTAGCGCGG GTGACCGCC TAGAGATCT CTAGCGAGCT GAGCTCGCG GCGCAGGCTC GTGCTCTTC

101 ATGAGAGAT GATAGAGAT AGCTGAAT AGGATGAGA TCTATCAGG CTTCCTGTC CTGCGCCACC TAAATGCTT CACTATGCG CACCCACCC
TACCTCTCA CTATCTTCA TGAGATTTA TCTACTCTT AGAGTATCC GAGCGAGAG GACCGGTTG ATTATCAGA GTGATTAAGG GTGCGGTGCG
1
M E I S S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
*MET

201 TAAAAAGC TGAGGTGCG ACAGCGACT GGAAGGAGA TGTGAGATT CAGTGCATCT ATGATCCCT GAGAGCTTAC AGCGAGTTT TGTGAATG
ATTGTGTG ACTCTCAC TGTGCTGGA CTTTCTCTT ACAGCTTAA GTCACTTACA TACTAGGGA CTCCTCGATG TCGTTCAA ACGACTTAC
24 K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GCTGTATACA CAGGCTCTG ACTCGCTAC CACTTCTCA GGTACTTCA CTGAGTACA TATCGAGAG GGAAGTACA GAGCGCGCTT GAAAGTACG
GAGCATCTT GTGCGAGAG TGAGCGAGT GTAGAGGAT GCACTGAGT GACTCTGCT ATAGTGTGTC GATTCAATG CTCGCGCGGA CTTTACTCG
57 L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CACAAAGTC CAGGATGAT GTCCCTCAA ATAAATACC TGACATGGA TGACAGGAT CACTATACAT GTGAGTAC CTGCGAGCT CCTGATGAA
GTGTTGAG GTCTCTTACA CAGGAGGTT TATTATGCG AGGTGACTT ACTGTCTTA GTGATATGA CACTCGAGT GACGCTCTGA GAGTACTT
90 H K V P G D V S L Q I N T L Q M D D R N H Y T C E V T W Q T P D G N

```

501 ACCAGATAT AAGAGTAG ATGATTGAGC TGGTGTGGS GAATATAT CCACCTAGAA TGAATAGTA AGCACTTACA ACCCTGCACI CCTCTTTGSA
 TGGTCAITTA TTCTCTATG TACTACTG AGCAACAGC CTTATATTA GGTGATCTT AGTATAGCT TGGTGAATGT TGGGAGGTGA GAGGAAACT
 124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E
 601 AGCAACACI ATATGAGT CAACCTGTA CTGACACI ATGGGACTG GAACCTTGA GAGAGACATT GGTGTTGAG GAGGAGACI GGCATCTTT
 TGGTGTGA TATTACTGA GTGGAGACI GAACCTGTA TTACCTGAC CTTTGACI CCTCTGTAA GAGACAGTC CCTCTTGA CCGTTAGAA
 157 A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F
 701 GGCATATCT TCATANTCT CCTTGTCTC ATAGTACTG TCACATACC TTATATCTTG TTGGCTGCA GGCATTTCA ACAAGATAT GTCTATGAG
 CGATATTAGA AGTAGTAGG GGAAGAGAG TATCATGAC AGTGTATGZ AATATAGAC AAGGAGAGT CCGTAAAGT TGTCTCATTA CAGATACCTC
 190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q Q E Y V Y G V
 801 TGACAGGCT GTTGGCAGG AAGACAGCA ACTGTGAGA AACACAGG GTGACTACCA TGGCACTGA TGAACAGAT TGGAGGCTC TGATTAGTGA
 ACTGTGCCA GAAAGGCTC TTCTGTGTG TGAGACTTCT TTGGTGTCC CACTGATGCT AGCGTGGACT ACTTGTCTTA AGGTTCCAG ACTAATCACT
 224 S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T D E P D S Q A L I S D
 901 CTACTGAT GATCCTGCC TGAGCCAGCA GTACCAATA ACCATGAT CAACATGTC TATTCTCTGCC TACTGACAC AGTTTCCAGA AACTAAGAG
 GATGAGCTA CTAGGAGAG AGTGGTCTC CATGTTTAT TGTAGCTTA GTTGTAAGG ATAGGAGAG AGCACTGTG TGAAGGTCT TTGATTCCTC
 257 Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O
 1001 TTCTTCTTAC TGAAGAAAT AACATGCTI AAAATGGGCC TACTAGTCA AGGTACTG GCGTAAITTAC CTGTACTTA TTACTACTI GCGTTGAA
 AAGAGGATG ACTTCTTTA TTGTAGAGCA TTTAAGGAG ATGATGAGT TCGAGTAGC CGATTATAG GACATGAT AATGATGAA CGAGATTTGT

도면3C

1101 TACCTTCTC CCGTGCCTTC TTCTCTCTA GACACCTAA AGTATCTATC TAGCTGCCA ATTCTGGGCC CATTGAGAA TCCTGGGTTT GCGTAAGMAT
 ATCGAMGAG GAGCGGAGAG AAGGAGMAT CTGTGGATT TCATAGTAG ATCGAGGSGT TAWGACCGCG GTACCTCTTT AGGACCGAAA CGGATTCCTTA

1201 ATACTACATG CAGCTCAGA MATCTAGCTT CTGGGCTTCA CGGAGACAA TTTCTTCTC AGGCGCTTCA CAGCTCTCT CGAACAGCA GAGAAATTC
 TAGATGTAC GTGGAGTCTT TTAGATCGAA GACCGGAGGT GGGTCTTGTT AAAAGAGGA TCCCGGAGT GTTGAGAGGA GGTTTGTCTT CTCTTTAAGG

1301 ATACGAGTAG AGGTCTTTA TCATGCTCTC AGACAGGSGT AGTCTCAGTC CTACAACTC AGACAAQCAC ATGGGCTTAG GATTACTCTT CTTCTCTAG
 TATGTCATC TCGAGGMAAT AGTACGAGG TCTGTGCGAC TCGAGGTGAG GATGTTTGAG TCTGTGSGT TACCGAGATC CTATGAGGA GAAAGCATC

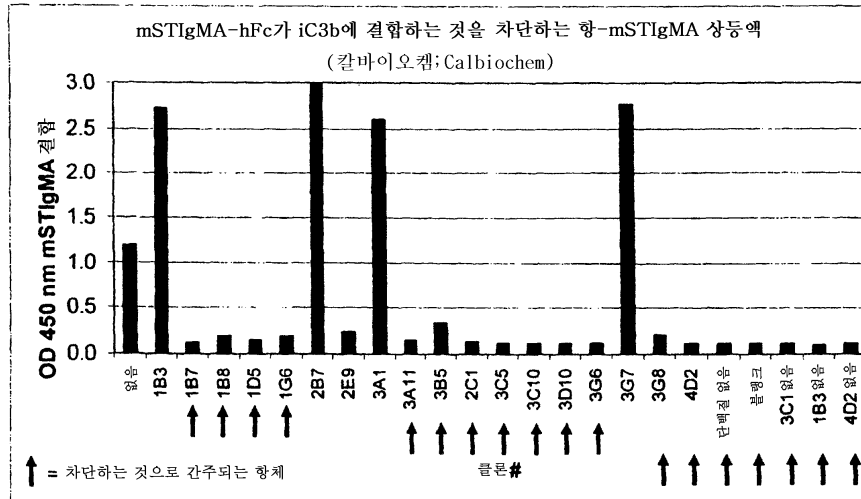
1401 GCGCAGATGA CTTTAAATG ATATTACTAT TCGTACATTA TGAATCTAAT GCACATGAT TCTTTGTTG TTAAATATG TTAAATCATG ACATCAAAAA
 CGGCTTACT GAAATTTAC TATATGATA AGATGTAACT ACTTAGATTA CGTGTACATA AGAAACAC ACATATTTAC AAATTAGTAC TGTAGTTTTT

1501 AAAAAA AAAAGGCGGCC GCGACTTAG AGTGCAGCTG CAGTAGGAT AACAGGTA TACCTTGGC CGCATGGCC CAGCTGTTT
 TTTTCTTTT TTGCGCGCGG CGCTGAGATC TCAGCTGAC GTCATCCCTA TTGTCCATT ATTGAGAGG GGGTACCGG GTTGACAAA

*이곳에서 박스가 계속됨

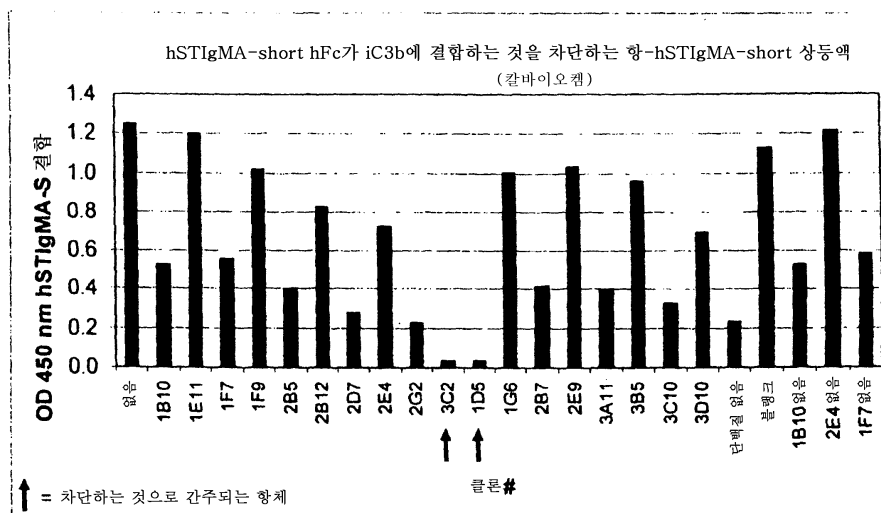
도면4

iC3b에 대한 뮤린 STIgMA 결합을 차단하는
항체의 평가



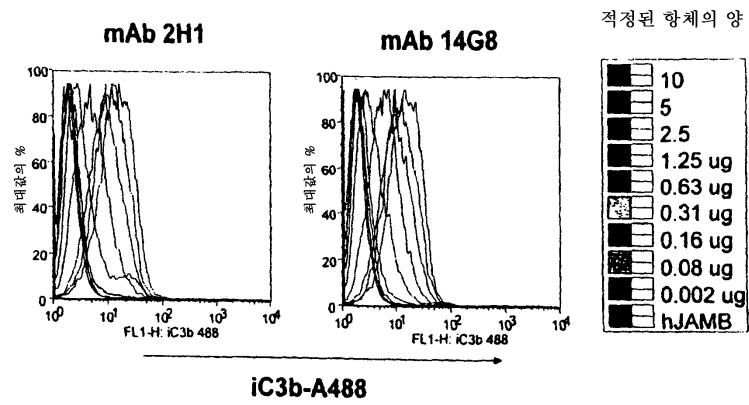
도면5

iC3b에 대한 인간 STIgMA 결합을 차단하는
항체의 평가



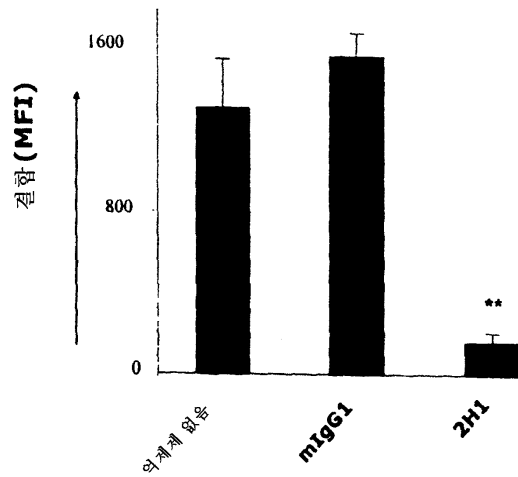
도면6

muCRIg-발현 CHO 세포에 대한 iC3b 결합의
mAb 차단



도면7

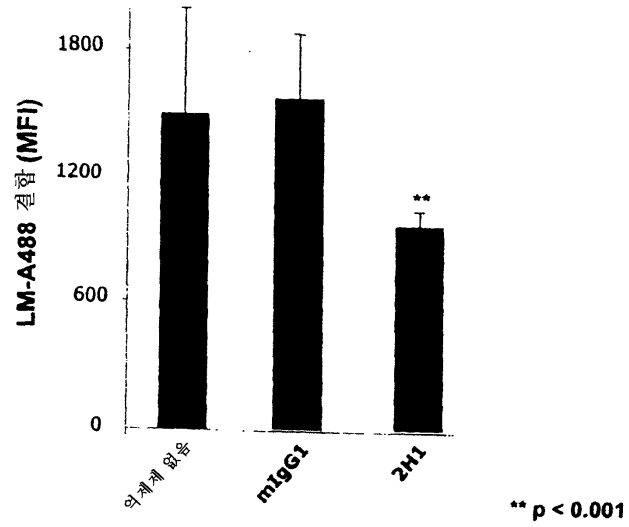
항체 2H1이 CRIg+ 복막 대식세포에 대한 iC3b의
결합을 차단한다



** p < 0.001

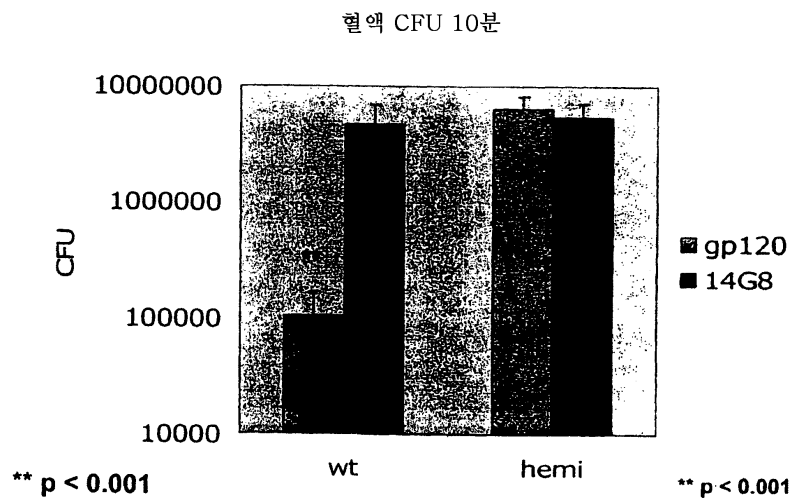
도면8

항체 2H1이 복막 대식세포에 대한 리스테리아
모노사이토제네스의 결합을 차단한다



도면9

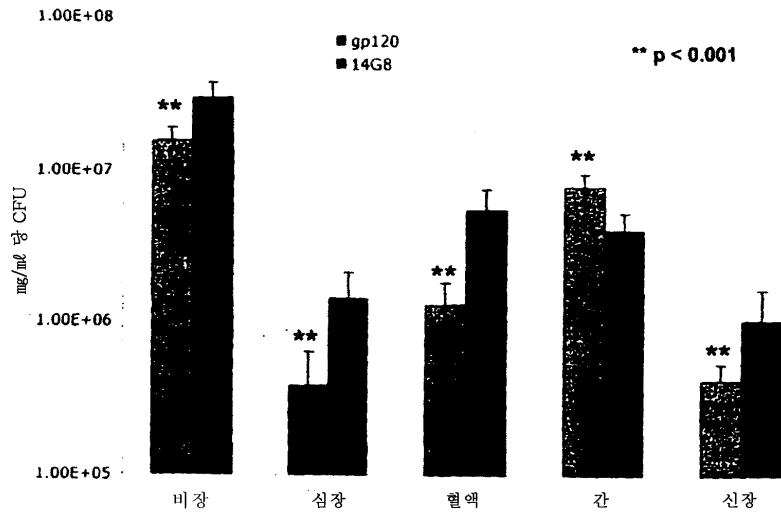
항체 14G8이 순환으로부터의 리스테리아
모노사이토제네스의 흡수를 차단한다



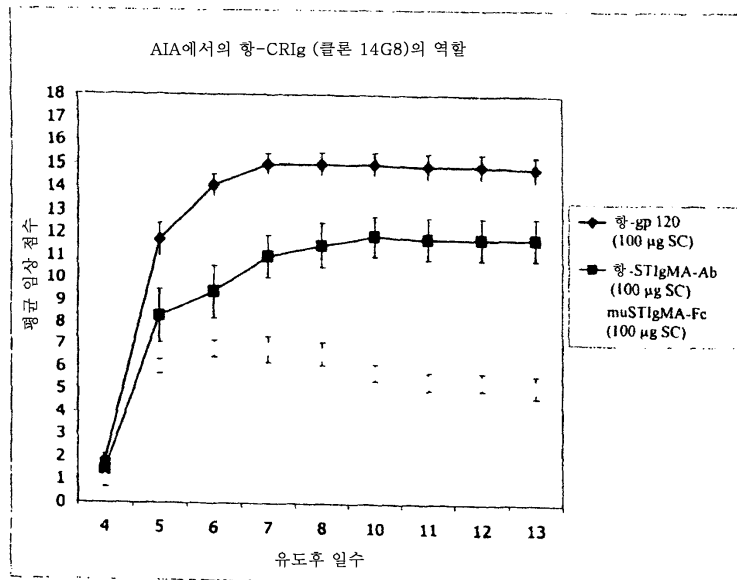
도면10

항체 14G8이 순환으로부터의 스태필로코쿠스 아우레우스 균주 M의 흡수를 차단한다

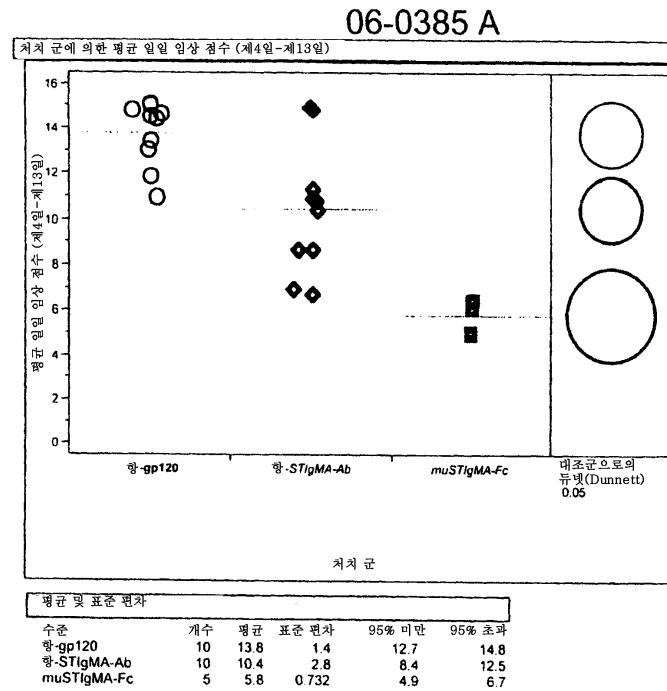
기관으로부터 회수된 스태필로코쿠스 아우레우스 CFU - 10분
(2X10e7 용량)



도면11A

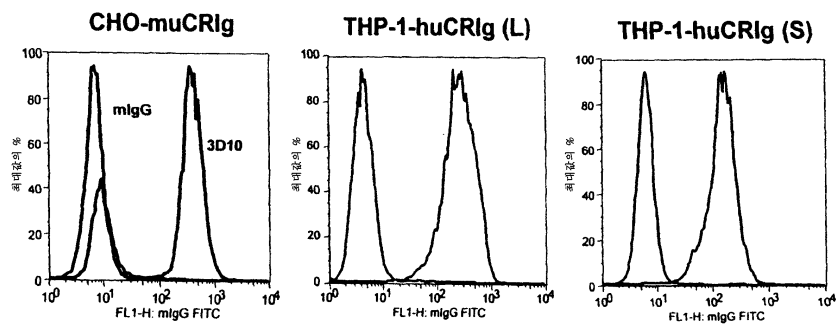


도면11B



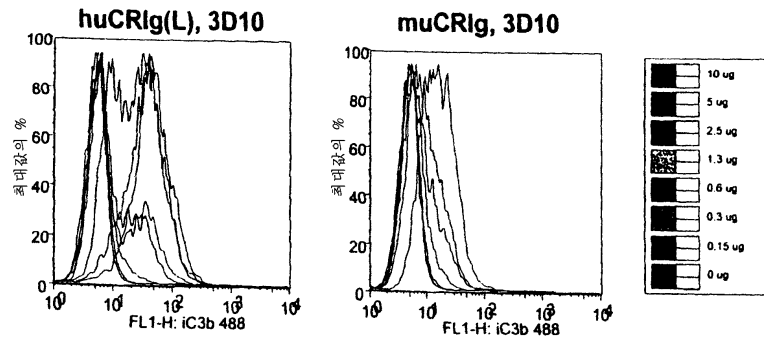
도면12

CRlg-발현 세포에 대한 3D10 결합



도면13

mAb 3D10이 인간 및 무린 CRiG를 발현하는
세포에 대한 iC3b 결합을 차단한다



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO

<120> CRIG ANTAGONISTS

<130> GNE-0211.PCT

<140> Not yet Assigned

<141> Herewith

<150> 60/915,340

<151> 2007-05-01

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1261)

<400> 1

ccaactgcac ctcggttcta tcgataggag gctggaagaa aggacagaag tagctctggc 60

tgtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca gtg 109
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val
1 5 10 15

gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca gga 157
Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly
20 25 30

cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg caa 205
Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln
35 40 45

ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca gac 253
Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp
50 55 60

cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag cag 301
Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln
65 70 75

gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga gat 349
Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp
80 85 90 95

gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac tac 397
Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr
100 105 110

acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg aga 445
Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg
115 120 125

gat aag att act gag ctc cgt gtc cag aaa ctc tct gtc tcc aag ccc 493
Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro
130 135 140

aca gtg aca act ggc agc ggt tat ggc ttc acg gtg ccc cag gga atg 541
Thr Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met
145 150 155

agg att agc ctt caa tgc cag gct cgg ggt tct cct ccc atc agt tat 589
Arg Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr
160 165 170 175

att tgg tat aag caa cag act aat aac cag gaa ccc atc aaa gta gca 637
Ile Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala
180 185 190

acc cta agt acc tta ctc ttc aag cct gcg gtg ata gcc gac tca ggc 685
Thr Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly
195 200 205

tcc tat ttc tgc act gcc aag ggc cag gtt ggc tct gag cag cac agc 733
Ser Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser
210 215 220

gac att gtg aag ttt gtg gtc aaa gac tcc tca aag cta ctc aag acc 781
Asp Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr
225 230 235

aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa gca aca tct 829
Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser
240 245 250 255

aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat ggc tac ctt 877
Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu
260 265 270

gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct gtc ttt gcc atc 925
Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile
275 280 285

atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc atg gcc tat 973
Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr
290 295 300

atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat gtc tac gaa gca 1021
Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala
305 310 315

gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa acc atg agg 1069
Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg
320 325 330 335

gtg gcc atc ttc gca agt ggc tgc tcc agt gat gag cca act tcc cag 1117
Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln
340 345 350

aat ctg ggc aac aac tac tct gat gag ccc tgc ata gga cag gag tac 1165
Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr
355 360 365

cag atc atc gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg ctg gac aca 1213
Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr
370 375 380

gtt cct ctg gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa agt gtc tgt 1261
Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
385 390 395

taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct agagtcgacc tgcagaagct 1321

tggccgccat ggcccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata a 1372

<210> 2
<211> 399
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro
20 25 30

Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly
35 40 45

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

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
65 70 75 80

Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
85 90 95

Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
100 105 110

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
115 120 125

Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
130 135 140

Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg
145 150 155 160

Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
165 170 175

Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
180 185 190

Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
195 200 205

Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
210 215 220

Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
225 230 235 240

Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
245 250 255

Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
260 265 270

Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
275 280 285

Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
290 295 300

Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
305 310 315 320

Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
325 330 335

Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln Asn
340 345 350

Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr Gln
355 360 365

Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
370 375 380

Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
385 390 395

<210> 3
<211> 1090
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(981)

<400> 3
gtccaactgc acctcgggttc tatcgatagg aggctggaag aaaggacaga agtagctctg 60

gctgtg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca 108
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr
1 5 10

gtg gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca 156
Val Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr
15 20 25 30

gga cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg 204
Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu

35

40

45

caa ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca 252
Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser
50 55 60

gac cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag 300
Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln
65 70 75

cag gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga 348
Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly
80 85 90

gat gta tcc ctc caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac 396
Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His
95 100 105 110

tac acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg 444
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val
115 120 125

aga gat aag att act gag ctc cgt gtc cag aaa cac tcc tca aag cta 492
Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu
130 135 140

ctc aag acc aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa 540
Leu Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys
145 150 155

gca aca tct aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat 588
Ala Thr Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp
160 165 170

ggc tac ctt gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct gtc 636
Gly Tyr Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val
175 180 185 190

ttt gcc atc atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc 684
Phe Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr
195 200 205

atg gcc tat atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat gtc 732
Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val

210 215 220

tac gaa gca gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa 780
Tyr Glu Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu
225 230 235

acc atg agg gtg gcc atc ttc gca agt ggc tgc tcc agt gat gag cca 828
Thr Met Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro
240 245 250

act tcc cag aat ctg ggc aac aac tac tct gat gag ccc tgc ata gga 876
Thr Ser Gln Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly
255 260 265 270

cag gag tac cag atc atc gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg 924
Gln Glu Tyr Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu
275 280 285

ctg gac aca gtt cct ctg gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa 972
Leu Asp Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys
290 295 300

agt gtc tgt taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct 1021
Ser Val Cys
305

agagtcgacc tgcagaagct tggccgccat ggcccaactt gtttattgca gcttataatg 1081

gttacaata 1090

<210> 4
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro
20 25 30

Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly

35 40 45
 Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro
 50 55 60
 Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
 65 70 75 80
 Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 105 110
 Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu Leu Lys
 130 135 140
 Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr
 165 170 175
 Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala
 180 185 190
 Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala
 195 200 205
 Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu
 210 215 220
 Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met
 225 230 235 240
 Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser
 245 250 255

Gln Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu
260 265 270

Tyr Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp
275 280 285

Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val
290 295 300

Cys
305

<210> 5
<211> 1590
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (134)..(973)

<400> 5
gtccaactgc acctcgggtc tategattcg aattcggcca cactggccgg atcctctaga 60

gatacctcga cctcgaccca cgcgtccgag cagcaagagg atggaaggat gaatagaagt 120

agcttcaaat agg atg gag atc tca tca ggc ttg ctg ttc ctg ggc cac 169
Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His
1 5 10

cta ata gtg ctc acc tat ggc cac ccc acc cta aaa aca cct gag agt 217
Leu Ile Val Leu Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser
15 20 25

gtg aca ggg acc tgg aaa gga gat gtg aag att cag tgc atc tat gat 265
Val Thr Gly Thr Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp
30 35 40

ccc ctg aga ggc tac agg caa gtt ttg gtg aaa tgg ctg gta aga cac 313
Pro Leu Arg Gly Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His
45 50 55 60

ggc tct gac tcc gtc acc atc ttc cta cgt gac tcc act gga gac cat 361

Gly Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His	
65 70 75	
atc cag cag gca aag tac aga ggc cgc ctg aaa gtg agc cac aaa gtt	409
Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val	
80 85 90	
cca gga gat gtg tcc ctc caa ata aat acc ctg cag atg gat gac agg	457
Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg	
95 100 105	
aat cac tat aca tgt gag gtc acc tgg cag act cct gat gga aac caa	505
Asn His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln	
110 115 120	
gta ata aga gat aag atc att gag ctc cgt gtt cgg aaa tat aat cca	553
Val Ile Arg Asp Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro	
125 130 135 140	
cct aga atc aat act gaa gca cct aca acc ctg cac tcc tct ttg gaa	601
Pro Arg Ile Asn Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu	
145 150 155	
gca aca act ata atg agt tca acc tct gac ttg acc act aat ggg act	649
Ala Thr Thr Ile Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr	
160 165 170	
gga aaa ctt gag gag acc att gct ggt tca ggg agg aac ctg cca atc	697
Gly Lys Leu Glu Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile	
175 180 185	
ttt gcc ata atc ttc atc atc tcc ctt tgc tgc ata gta gct gtc acc	745
Phe Ala Ile Ile Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr	
190 195 200	
ata cct tat atc ttg ttc cgc tgc agg aca ttc caa caa gag tat gtc	793
Ile Pro Tyr Ile Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val	
205 210 215 220	
tat gga gtg agc agg gtg ttt gcc agg aag aca agc aac tct gaa gaa	841
Tyr Gly Val Ser Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu	
225 230 235	
acc aca agg gtg act acc atc gca act gat gaa cca gat tcc cag gct	889
Thr Thr Arg Val Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala	

240 245 250

ctg att agt gac tac tct gat gat cct tgc ctc agc cag gag tac caa 937
 Leu Ile Ser Asp Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln
 255 260 265

ata acc atc aga tca aca atg tct att cct gcc tgc tgaacacagt 983
 Ile Thr Ile Arg Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys
 270 275 280

ttccagaaac taagaagttc ttgctactga agaaaataac atctgctaaa atgccctac 1043

taagtcaagg tciactggcg taattaccig tiacttattt actacttgcc ttcaacatag 1103

ctttctccct ggcttccttt cttcttagac aacctaaagt atctatctag tctgccaatt 1163

ctggggccat tgagaaatcc tgggtttggc taagaatata ctacatgcac ctcaagaaat 1223

ctagcttctg ggcttcaccc agaacaattt tcttctagg gccttcacaa ctcttctcca 1283

aacagcagag aaattccata gcagtagagg ttctttatca tgcctccaga cagcgtgagt 1343

ctcagtccta caaactcaga caagcacatg ggtctaggat tactcctctt tctctagggc 1403

cagatgactt ttaattgata ttactattgc tacattatga atctaataca catgtattct 1463

tttgttgta ataatgttt aatcatgaca tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaag ggcggccgcg 1523

actctagagt cgacctgcag tagggataac agggaataa gcttgccgc catggcccaa 1583

cttgttt 1590

<210> 6
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr
20 25 30

Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly
35 40 45

Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser
50 55 60

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
65 70 75 80

Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
85 90 95

Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg Asn His Tyr Thr
100 105 110

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Ile Arg Asp
115 120 125

Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro Pro Arg Ile Asn
130 135 140

Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu Ala Thr Thr Ile
145 150 155 160

Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr Gly Lys Leu Glu
165 170 175

Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile Phe Ala Ile Ile
180 185 190

Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr Ile Pro Tyr Ile
195 200 205

Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val Tyr Gly Val Ser
210 215 220

Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu Thr Thr Arg Val

225	230	235	240
Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala Leu Ile Ser Asp 245 250 255			
Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln Ile Thr Ile Arg 260 265 270			
Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys 275 280			