



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월26일
(11) 등록번호 10-2774146
(24) 등록일자 2025년02월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61P 37/06 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-7021353
(22) 출원일자(국제) 2019년12월13일
심사청구일자 2021년07월07일
(85) 번역문제출일자 2021년07월07일
(65) 공개번호 10-2021-0100688
(43) 공개일자 2021년08월17일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/060802
(87) 국제공개번호 WO 2020/121282
국제공개일자 2020년06월18일
(30) 우선권주장
62/779,102 2018년12월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2014189378 A1
US09944717 B

(73) 특허권자
아르제넥스 비브이
벨기에, 주에나르드 9052, 인더스트리파크 7
(72) 발명자
블란체토트, 크리스토프
벨기에, 데스텔베르겐 9070, 불더레데 49
드 하르트, 한스
네덜란드, 아우드란데 4436 엔에이, 1, 헛'즈윈트
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 이미경

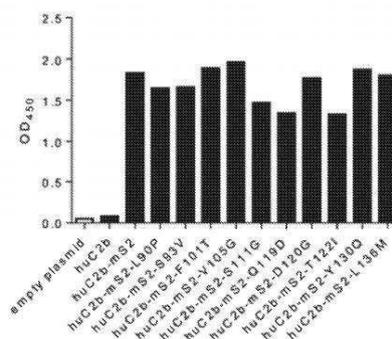
(54) 발명의 명칭 인간 보체 인자 C2B 에 대한 항체 및 이의 사용방법

(57) 요약

제공되는 것은 인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하고 및 보체 시스템의 고전적 및 렉틴 경로의 활성화를 억제할 수 있는 항체 및 항원-결합 단편이다. 이 항체 및 항원-결합 단편은 개선된 제조가능성, 약동학, 및 항원 스위핑 (antigen sweeping) 을 보인다. 또한, 제공되는 것은 항체 및 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물, 항체 및 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 및 벡터, 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 항체 및 항원-결합 단편을 만들고 및 사용하는 방법이다. 항체 및 항원-결합 단편은 대상체, 예를 들어, 인간에서, 보체 활성화의 고전적인 경로를 억제하는데 사용될 수 있다. 항체 및 항원-결합 단편은, 또한 대상체, 예를 들어, 인간에서, 보체 활성화의 렉틴 경로를 억제하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도14

Anti-FLAG ELISA on fine mapping mutants



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로, 상기 언급된 단일클론 항체 또는 이의 단편은:

서열 번호 3으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및

서열 번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 전장-단일클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 인간 IgG 중쇄 고정 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인은 서열번호 29로 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 4로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 중쇄 고정 도메인은

EU 숫자매김계획(EU numbering scheme)에 따른 L234A 및 L235A 치환;

EU 숫자매김계획(EU numbering scheme)에 따른 H433K 및 N434F 치환; 또는

둘 모두를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 5로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 서열 번호 6으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제3항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 서열 번호 8로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 7로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용할 만한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 언급된 단일클론 항체 또는 이의 단편은:

서열 번호 3로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및

서열 번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는,

자가면역 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 전장-단일클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 단일클론 항체는 인간 IgG 중쇄 고정 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 실험적 알레르기성 신경염 (experimental allergic neuritis), 타입-II 콜라겐-유도된 관절염 (type II collagen-induced arthritis), 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 사구체신염 (glomerulonephritis), 특발성 막성 신장병(idiopathic membranous nephropathy), 류머티스성 관절염 (rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus), 면역-복합체-유도된 맥관염 (immune complex-induced vasculitis), 성인 호흡 장애 증후군 (adult respiratory distress syndrome), 이종이식 (xenotransplantation)의 거부반응, 동종이식 (allograft transplantation)의 거부반응, 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 체외 투석 및 혈액 산소공급 (extracorporeal dialysis and blood oxygenation)의 거부반응, 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 사이토카인 또는 mAbs의 투여에 의해 유도되는 독성, 신장 동종이식과 같은 동종이식의 항체-매개하는 거부, 또는 허혈 재관류 손상 (ischemia-reperfusion injuries) 인, 약학적 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 정맥 투여 또는 피하 투여되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제1항의 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제2항의 단일클론 항체를 암호화하는 것을 특징으로 하는, 핵산 분자.

청구항 17

제16항의 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector), 아데노-연관된 바이러스 벡터(aden-associated viral vector) 또는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)인 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 20

제16항의 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 21

제1항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역 또는 중쇄를 암호화하는 제1 핵산 분자; 및

제1항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄 가변 영역 또는 경쇄를 암호화하는 제2 핵산 분자;를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 22

제17항의 벡터를 포함하는 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 23

제1항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 가변 영역 또는 중쇄를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 벡터; 및

제1항에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄 가변 영역 또는 경쇄를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 벡터;를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 24

제20항의 숙주 세포에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유류 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 숙주 세포는 하이브리도마(hybridoma) 세포, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포, NSO 세포, 또는 인간 배아 신장(human embryonic kidney, HEK293) 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유류 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 숙주 세포는 하이브리도마(hybridoma) 세포, 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포, NSO 세포, 또는 인간 배아 신장(human embryonic kidney, HEK293) 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 28

- 1)제20항의 숙주 세포 집단(population of host cells)을 배양하는 단계; 및
- 2)단계 1)에 의해 얻은 세포로부터 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만드는 방법.

청구항 29

- 1)제21항의 숙주 세포 집단(population of host cells)을 배양하는 단계; 및
- 2)단계 1)에 의해 얻은 세포로부터 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 만드는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련된 출원
- [0002] 본 출원은 2018년 12월 13일에 출원된 미국 가 특허출원 번호 No. 62/779,102로부터 우선적 이익 점을 청구하며, 그 전문이 여기에 참고 문헌으로 병합되어 있다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 즉석 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며 및 여기에 그 전문이 참고 문헌으로 병합되어 있다. 2019년 11월 22일에 만들어진 상기 ASCII 카피는, 618634_AGX5-048PC_ST25.txt로 명명 되었으며 그 크기는 94,329 바이트(bytes) 다.
- [0005] 본 발명은 면역 및 분자 생물학 분야에 관련된 것이다. 좀 더 특별하게는, 현 발명은 보체계 (complement

system)의 고전적 및 렉틴 경로(classical and lectin pathway)의 활성화를 억제하는 조성물 및 방법과 이들을 인간의 컨디션 치료에 사용하는 것과 관련된다.

배경 기술

- [0006] 보체 시스템(complement system)은 일련의 혈장 효소, 조절 단백질, 및 세포 용해 능력이 있는 단백질들의 캐스케이드가 관여한다. 활성화되기 전에, 여러 다양한 보체 인자들이 불활성화된 전구 단백질로서 순환된다. 시스템의 활성화는 캐스케이드의 활성화를 초래하며 여기서 한 인자는 캐스케이드의 더 나아가 아래쪽에 있는 보체 단백질의 특이적 단백질 분해로 그 후속 인자를 활성화한다.
- [0007] 보체 시스템의 활성화는 고전적인(또는 고전의) 경로((classical (or classic) pathway)), 대체 경로(alternative pathway), 및 렉틴 경로(lectin pathway)의 세 가지 경로를 통해 일어날 수 있다. 고전적인 경로는 항원과 IgM, IgG1, Ig G2, 또는 IgG3 항체의 상호 작용으로 면역 복합체를 형성하여 보체 성분 C1(complement component C1)의 서브유닛, C1q에 결합하여 활성화된다. 대체 경로는 IgA-함유하는 면역 복합체에 의하거나 또는 박테리아 및 다른 활성화 표면의 인식에 의해 활성화된다. 렉틴 경로는 보체 활성화에서 항체와는 무관한 경로이고, 만노즈-결합하는 렉틴(mannose-binding lectin) 또는 만난-결합하는 단백질(mannan-binding protein) (MBP) 이라고도 또한 알려진, 만난-결합 렉틴(mannan-binding lectin) (MB)이 여러 병원균의 표면에 있는 탄수화물과 결합에 의하여 시작된다.
- [0008] 고전적인 경로의 활성화는 C1, C4, 및 C2의 순차적인 활성화로 시작되며; C2는 이어서 C2a 및 C2b로 절단된다. 대체 경로의 활성화는 보체 성분 D, C3, 및 B의 순차적인 활성화로 시작된다. 각 경로는 공통의 중앙 성분 C3, 또는 세 번째 보체 인자를 절단하고 및 활성화하며, 이는 공통의 말단 경로의 활성화 결과를 초래하여 맴브레인-공격 복합체(membrane-attack complex) (MAC, 보체 성분 C5b-9를 포함하며; Muller-Eberhard, *Annu Rev Biochem* 1988, 57:321) 형성을 유도한다. 보체 활성화 동안에, 아나필라톡신(anaphylatoxins) C3a 및 C5a와 같은 몇 가지 염증성 펩티드는 물론 MAC가 생성된다. 이러한 활성화 생산물은 백혈구의 주화성(chemotaxis), 포식세포(phagocytic cells), 비만 세포(mast cells) 및 호염기성 세포(basophils)의 탈과립화, 평활근 수축, 맥관 투과성(vascular permeability)증가, 및 세포 용해와 같은 다양한 생물학적 효과를 끌어낸다(Hugh, *Complement* 1986, 3:111). 보체 활성화 생산물은 또한 독성 산소 라디칼 생성을 유도하며 및 아라키도닉 산(arachidonic acid) 대사물 및 사이토카인의 합성 및 방출을, 특히 포식세포에 의해, 유도하며, 이는 더 나아가 염증 반응을 증폭한다.
- [0009] 보체가 병원성 개체에 대항하는 중요한 방어 라인이긴 하나, 이의 활성화는 또한, 달리 건강한 숙주 세포에 손상을 끼칠 수도 있다. 보체 활성화의 억제는 그러므로 보체-매개하는 조직 손상을 치료 및 예방하는 데 유익하다고 생각될 수 있다. 따라서, 이 분야 기술에서는, 보체 캐스케이드에서 중요한 성분 하나 또는 그 이상을 억제하는 새로운 치료 제제가 긴급히 필요한 것으로 남아 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 제공되는 것은 기존의 항체에 비교하여 개선된 특징을 가진 새로운 단일클론 항-인간 C2b 항체 및 이의 항원-결합 단편이다. 새로운 항체의 특징은 중쇄 가변 도메인(heavy chain variable domain) (VH)의 프레임워크 부위 3 (framework region 3) (FR3)에 있는 당화 부위(glycosylation site)의 삭제이다. 주목할 만하게도, 새로운 항체는 개선된 균질성을 제공하며, 따라서, 기존의 항체에 비교하여, 개선된 제조가능성은 물론, 뜻밖에도, 개선된 기능성을 제공한다. 개선된 기능성에는, 예를 들어, 증가 된 pI 및 소위 말하는 항원 스위핑(antigen sweeping)에 대한 증강된 잠재력이 포함된다. 이 항체 및 이의 항원-결합 단편은 인간 치료에서 용도가 발견될 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이 발명의 한 관점은 인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며, 상기 언급된 단일클론 항체 또는 이의 단편은:
- [0012] 서열 번호 1로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및
- [0013] 서열 번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하며;

- [0014] 상기 VH 도메인의 아미노산 잔기 72-74 ((카벳 숫자 메깅(Kabat numbering))는 각각 $X_1X_2X_3$, 로 구성되며, 상기 X_2 는 임의의 아미노산이고, 및 $X_1X_2X_3$ 는 NX_2S 또는 NX_2T 는 아니다.
- [0015] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 부합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 약학적으로 허용할 만한 담체를 포함하는 약학적 조성물이다.
- [0016] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 부합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자이다.
- [0017] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 따른 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자를 포함하는 벡터 또는 복수의 벡터들이다.
- [0018] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포이다.
- [0019] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 따른 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자를 포함하는 벡터 또는 복수의 벡터를 포함하는 숙주 세포이다.
- [0020] 이 발명의 한 관점은 이 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법이고, 이 방법은 이 발명에 따른 세포의 집단을 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현이 허용되는 컨디션 하에서 배양을 포함하는 방법이다.
- [0021] 이 발명의 한 관점은 대상체에서 고전적인 경로 또는 렉틴 경로의 활성화를 억제하는 방법이며, 이를 필요로 하는 대상체에게 이 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 효과적인 양의 투여를 포함한다.
- [0022] 하기의 실시 예는 본 발명의 모든 관점에 적용된다.
- [0023] 어떤 실시 예에서, $X_1X_2X_3$ 는 DX_2S 로 구성된다.
- [0024] 어떤 실시 예에서, $X_1X_2X_3$ 는 DKS 로 구성된다.
- [0025] 어떤 실시 예에서, VH 도메인은 서열번호 3으로 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0026] 어떤 실시 예에서, VL 도메인은 서열번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0027] 어떤 실시 예에서, VH 도메인은 서열번호 3으로 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 및 VL 도메인은 서열번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0028] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 전장 단일클론 항체를 포함한다.
- [0029] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체는 인간 IgG 중쇄 고정 도메인을 포함한다.
- [0030] 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 4로 제시된 아미노산 서열은 포함한다.
- [0031] 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 5로 제시된 아미노산 서열은 포함한다.
- [0032] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체는 서열번호 6으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 7로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0033] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체는 서열번호 8로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 7로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

발명의 효과

- [0034] 제공되는 것은 기존의 항체에 비교하여 개선된 특징을 가진 새로운 단일클론 항-인간 C2b 항체 및 이의 항원-결합 단편이다. 이 항체 및 이의 항원-결합 단편은 인간 치료에서 용도가 발견될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1 은 제시된 샘플이 올려진 폴리아크릴아마이드 겔을 나타낸다. 레인 4, 5, 8 및 9 (화살표)에 있는 샘플의

커다란 분자량의 밴드는 VH3 및 VH4를 가진 항체의 분열 되고 및 이동된 밴드를 보여준다.

도 2는 시아노몰구스 원숭이 (cynomolgus monkeys) 에서 31일 동안에 걸친 제시된 항체의 총 수준을 나타내는 그래프이다. 하기의 항체가 검사되었다: BR02-glyc-IgG4 (원숭이 1 및 2, 당화된 VH) 및 BR02-IgG4 (원숭이 5 및 6, 당화되지 않은 VH).

도 3A-3I는 시아노몰구스 원숭이에게 여러 가지 단일클론 항체들을 투여한 날로부터 31일 동안에 걸쳐 혈청에 있는 유리 C2 (free C2) (시간에 따른 OD450nm로서의 플롯) 의 수준을 나타내는 그래프이다. 하기의 항체들이 검사되었다: BR02-glyc-IgG4 (도 3A; 원숭이 1 및 2), 음성 대조군 (도 3B; 원숭이 3 및 4), BR02-IgG4 (도 3C; 원숭이 5 및 6), BR02-IgG4-NH (도 3D; 원숭이 7 및 8), BR02-IgG1-LALA-NH (도 3E; ARGX-117; 원숭이 9 및 10), His1-IgG4 (도 3F; 원숭이 11 및 12), His1-IgG4-NH (도 3G; 원숭이 13 및 14), His1-IgG1-LALA-NH (도 3H; 1 원숭이 15 및 16), 및 His2-IgG4 (도 3I; 원숭이 17 및 18).

도 4 는 여러 가지 제시된 단일클론 항체를 투여받은 시아노몰구스 원숭이로부터 31일에 동안에 걸쳐 혈청에 있는 평균 유리 C2 수준 (시간에 따른 OD450nm로서의 플롯) 을 나타내는 그래프이다.

도 5는 제시된 당화되지 않은 항체로 처치한 시아노몰구스 원숭이의 혈청에 있는 유리 C2 수준 (시간에 따른 OD450nm로서의 플롯) 을 나타내는 그래프이다.

도 6A-6D는 항체를 투여하기 전 또는 후에 제시된 시간에 측정된 대로 시아노몰구스 원숭이의 혈청에 있는 유리 C2 수준 (OD450nm로서의 플롯) 을 나타내는 그래프 시리즈이다. 원숭이들은 도 3A-3I와 같다. 도 6A, 전 (pre) 대비 전 플러스 (pre plus) 500mg/ml BRO-2; 도 6B, 4시간 대비 1일; 도 6C, 4시간 대비 2일; 도 6D, 11일 대비 27일이다. ADA, 항-약물 항체.

도 7A-7P는 시아노몰구스 원숭이에 투여된 항-C2 항체 또는 음성 대조군 단일클론 항체의 30일 동안에 걸친 면역성 (OD450 nm로서의 플롯) 을 나타낸 그래프 시리즈이다. 원숭이들은 도 3A-3I와 같다. 도 7A, 원숭이 1; 도 7B, 원숭이 2; 도 7C, 원숭이 5; 도 7D, 원숭이 6; 도 7E, 원숭이 7; 도 7F, 원숭이 8; 도 7G, 원숭이 9; 도 7H, 원숭이 10; 도 7I, 원숭이 11; 도 7J, 원숭이 12; 도 7K, 원숭이 13; 도 7L, 원숭이 14; 도 7M, 원숭이 15; 도 7N, 원숭이 16; 도 7O, 원숭이 17; 도 7P, 원숭이 18.

도 8A-8F 시아노몰구스 원숭이에 투여된 항-C2 단일클론 항체의 60일 동안의 면역성 (OD450 nm로서의 플롯) 을 나타낸 그래프 시리즈이다. 원숭이들은 도 3A-3I와 같다. 도 8A, 원숭이 5; 도 8B, 원숭이 6; 도 8C, 원숭이 9; 도 8D, 원숭이 10; 도 8E, 원숭이 15; 도 8F, 원숭이 16. ADA, 항-약물 항체.

도 9A-9D는 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis) 및 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance) (SPR)으로 평가된 ARGX-117의 C2에의 결합을 나타낸다. 도 9A는 ARGX-117로 혈청에 대한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다 (대표적인 결과): 레인 1: 분자량 (MW) 크기 마커; 레인 2: 재조합 인간 C2 대조군 (크기는 약 100 kDa); 레인 3: 혈청; 레인 4: 혈청에 응집된 IgG의 첨가 및 37° C에서의 배양으로 보체 활성화의 유도; 레인 5: C2-결핍 혈청.

도 9B는 칩에 고정 시킨 C2 및 다른 ARGX-117 Fabs을 용출물로 한 SPR 분석을 나타낸다.

도 9C는 스트렙타비딘-칩에 고정시킨 바이오틴-C4b 및 mAb를 용출물로서 또는 용출물 없이 인간 C2로 분석한 SPR을 나타낸다; 흑색: 전-배양 없이 (no pre-incubation); 회색: 항-FXI; 대조군 인간 IgG4 mAb; 청록색 (turquoise): 비-억제적 항-C2 클론 항-C2-63, 즉 C2의 큰 서브 유닛을 (C2a) 인식하는 클론 63; 적색: AG-117; 모두 5대 1의 분자 비율; 커브는 C2를 C4b 칩에 주사하기 바로 전에 시그날에 대비하여 정상화시켰다.

도 9 D는 스트렙타비딘-칩에 고정시킨 바이오틴-C4b 및 인간 C2 및 mAb를 연속적으로 용출물로서 하여 분석한 SPR을 나타낸다; 흑색: 흐르는 버퍼; 회색: 항-FXI; 대조군 인간 IgG4mAb; 청록색: 비-억제적 항-C2 클론 항-C2-63; 적색: ARGX-117; 커브는 mAbs를 첨가하기 바로 전에 정상화시켰다.

도 10은 C2 (서열 번호 21) 및 보체 인자 B (FB) (서열 번호 50) 사이에 도메인 스와프 돌연변이 (domain swap mutants) 개략적인 표시를 나타낸다. 이 두 단백질에서 작은 단편 (보체 C2에서 C2b; 서열 번호 44 또는 보체 인자 B에서 Fba; 서열 번호 51) 은 세 개의 스시 (Sushi) ((또는 보체 조절 단백질 (complement control protein) (CCP)) 도메인으로 구성되며, 반면에 큰 단편은 본 윌리브랜드 인자 타입 A (von Willebrand Factor type A) (VWFA) 도메인 및 펩티다제 S1 (peptidase S1) 도메인으로 구성된다. 개별 도메인 사이에 있는 서열들은 이들 변이에서 함께 가지는 않으나 그러나 예외적으로 또한, 구성될 수 있다는 것을 주목한다. 추가적인 서열에는 C2a, 서열 번호 43; C2b S1, 서열 번호 45; C2b S2, 서열 번호 46; C2b S3, 서열 번호 47; C2 VWFA, 서

열 번호 48; C2 펩티다제 S1 (C2 peptidase S1), 서열 번호49; FBb, 서열 번호 52; FBa S1, 서열 번호 53; FBa S2, 서열 번호 54; FBa S3, 서열 번호 55; FB VWFA, 서열 번호 56; 및 FB 펩티다제 1 (FB peptidase 1), 서열 번호 57이 포함 된다.

도 11은 도메인 스와프 돌연변이에서 수행된 항-FLAG ELISA로부터 얻은 결과를 나타낸다. 형질감염시킨 HEK293 세포로부터의 상등액을 5-배 희석시켜 코팅에 사용하였으며, 및 항-FLAG 생쥐 단일클론 AB를 HARP-라벨 된 항-생쥐 IgG와 조합하여 검출하는데 사용되었다.

도 12는 항-C2-5F2.4로 수행된 도메인 스와프 ELISA로부터 얻은 결과를 나타낸다. 항-C2-5F2.4 mAb ((인간IgG4 S241P VH4/VL3 LC-13/03-163A 바이오세로스 (Bioceros))가 코팅에 사용되었으며, 플레이트는 HEK293 형질감염체 상등액을 20-배 희석시킨 상등액으로 배양시켰으며, 및 결합은 항-FLAG Ab로 검출하였다. 두 번의 독립적인 실험으로부터 얻은 대표적인 결과는 비슷한 결과이다.

도 13은 인간 및 생쥐의 C2b의 스시2 (S2) 도메인의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 인간 S2, 서열 번호 46; 생쥐 S2, 서열 번호 58. 별표는 서열 상동성을 표시한다.

도 14는 미세 지도 작성된 돌연변이에서 항-FLAG ELISA로 얻은 결과를 나타낸다. 형질감염시킨 HEK293 세포로부터의 상등액을 희석시키지 않고 코팅에 사용하였으며, 및 바이오틴-라벨 된 항-FLAG 생쥐 단일클론 Ab를 HRP-라벨 된 SA 접합체와 조합하여 검출에 사용하였다.

도 15는 미세 지도 작성된 돌연변이의 결과를 나타낸다. 항- C2-5F2.4 mAb ((인간IgG4 S241P VH4/VL3 LC-13/03-163A 바이오세로스 (Bioceros))가 코팅에 사용되었으며, 플레이트는 HEK293 형질감염체 상등액을 20-배 희석시킨 상등액으로 배양시켰으며, 및 결합은 항-FLAG Ab로 검출하였다.

도 16은 각 클러스터에 세 개의 아미노산 돌연변이를 사용하여 클러스터 지도작성 돌연변이 계획을 나타내며, 이의 위치는 인간 서열에서 굵은 글씨체로 표시되었다. 각 인간 서열은 해당하는 생쥐 아미노산 서열을 굵은 글씨체로 보인 인간 서열로 치환되도록 돌연변이 시켰다. 인간 S2, 서열 번호 46; 생쥐 S2, 서열 번호 58. 별표는 서열 상동성을 표시한다.

도 17A 및 17B는 클러스터 지도작성 돌연변이에 항-FLAG ELISA를 나타낸다. 도 17A는 형질감염시킨 HEK293 세포로부터의 상등액을 5-배 희석시켜 코팅에 사용하였으며 및 항-FLAG 생쥐 단일클론 Ab를 HRP-라벨 된 항-생쥐 IgG와 조합하여 검출하는데 사용되었음을 나타낸다. GFP, 초록 형광 단백질 (green fluorescent protein).

도 17B는 항- C2-5F2.4의 클러스터 돌연변이에의 결합을 나타낸다. 항- C2-5F2.4 mAb ((인간IgG4 S241P VH4/VL3, LC-13/03-163A, 바이오세로스(Bioceros)) 가 코팅으로서 사용되었으며, 플레이트는 HEK293 형질감염체 상등액을 20-배 희석시킨 상등액으로 배양시켰으며, 및 결합은 항-FLAG Ab로 검출하였다. GFP, 초록 형광 단백질 (green fluorescent protein).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 항체 (Antibody) " 또는 "면역글로불린 (Immunoglobulin) "- 여기서 사용된 대로, "면역글로불린 (Immunoglobulin)" 이란 용어는 임의의 해당하는 특정 면역반응성을 소유하든 또는 아니든 간에 두 개의 중쇄 및 두 개의 경쇄의 조합을 가진 폴리펩티드를 포함한다. 여기서 사용된 대로, "항체 (Antibody)" 라는 용어는 관심 있는 항원 (예를 들어, C2를 포함하는 보체 단백질의 복합체)에 대한 의미 있는 특이적인 면역반응성인 활성을 가진 그러한 집합체를 의미한다. "C2 항체"라는 용어는 여기서 C2를 포함하는 보체 단백질의 복합체, 특히 인간 C2 단백질 및 C2의 절단을 통해 형성된 도메인, 및 어떤 경우에는 이들의 종 호모로그 (species homologues)에 대한 면역학적 특이성을 보여주는 항체를 의미하는 것으로서 사용된다. 항체 또는 면역글로불린은, 이들 사이에 상호 체인 간 공유 결합을 가지든 또는 아니든, 경쇄 및 중쇄를 포함한다. 척추동물 시스템에서 기본적인 면역글로불린 구조는 상대적으로 잘 이해되고 있다.

[0037] 다섯 가지 뚜렷한 부류의 항체 (IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE)는 생화학적으로 구별될 수 있다. 다섯 가지 부류의 항체 모두는 현 발명의 범위 내에 있다. 하기의 논의는 일반적으로 IgG 부류의 면역글로불린 분자 부류에 대한 것일 것이다. IgG에 관한 한, 면역글로불린은 전형적으로 대략 23,000 달톤 분자량의 두 개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 분자량 53,000-70,000의 두 개의 동일한 중쇄를 포함한다. 이 4개의 체인은 "Y" 형태로 이황화 결합으로 연결되어 있으며 상기 경쇄는 "Y" 형태의 입에서 시작하는 중쇄를 괄호로 묶고 (bracket) 및 계속하여 가변 부위를 통과한다.

- [0038] 항체의 경쇄는 카파 (kappa) (κ) 또는 람다 (lambda) (λ)로서 분류된다. 각 중쇄 클래스는 (class)는 카파 또는 람다와 결합될 수 있다. 일반적으로, 경쇄 또는 중쇄는 서로 공유결합으로 결합되며, 및 두 개의 중쇄의 "꼬리 (tail)" 부위는 면역글로불린이 하이브리도마, B 세포 또는 유전적으로 제조된 숙주 세포에 의해 제조될 때 공유적 이황화 결합에 의해 또는 비-공유 결합에 의해 서로 결합된다. 중쇄에서, 아미노산 서열은 Y 구조의 포크 끝에 있는 N-말단으로부터 각 체인의 밑에 있는 C-말단으로 흐른다. 이 분야 기술 전문가들은 중쇄는 감마 (gamma), 뮤 (mu), 알파 (alpha), 델타 (delta), 또는 엡실론 (epsilon), (γ , μ , α , δ , 또는 ϵ) 으로서 분류되며 이들 중에는 아 부류 (subclasses)(예를 들어, $\gamma 1$ - $\gamma 4$)를 가지고 있다는 것을 알 것이다. 항체의 "클래스 (class)"를 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 로서 결정하는 것은 이 체인의 성질이다. 면역글로불린 아 부류 (아이소타입), 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 등은 잘 규명되어 있으며 및 기능적인 특성이 부여되는 것으로 알려졌다. 이 클래스 및 아이소타입 각각의 수정된 형태는 전문가들에게는 즉석 공개 (instant disclosure)의 관점에서 쉽게 구별될 수 있으며, 및 따라서 즉석 발명 (instant invention)의 범위내에 있다.
- [0039] 위에서 제시된 대로, 항체의 가변 부위는 항체가 항원의 에피토프를 선택적으로 인식하고 및 특이적으로 결합하도록 한다. 즉 항체의 VL 도메인과 VH 도메인은 합쳐져서 3차원적인 항원-결합 부위를 규정하는 가변부위를 형성한다. 이 4급 항체 구조는 Y의 각 팔 끝에 있는 항원-결합 부위를 형성한다. 좀 더 특별히, 항원-결합 부위는 각 VH 및 VL 체인에 있는 세 개의 보체성 결정 부위 (complementary determining regions) (CDRs) 에 의해 규정 된다.
- [0040] "결합 분자 (Binding Molecule)"- 여기서 사용된 대로, "결합 분자 (binding molecule)" 라는 용어는 현 공개에 따른 항체 및 이의 항원-결합하는 절편을 포함하려는 의도가 있는 포괄적인 용어이다.
- [0041] "결합 부위 (Binding Site)"- 여기서 사용된 대로, "결합 부위 (Binding Site)" 라는 용어는 관심 있는 타겟 항원에 선택적으로 결합하는데 책임이 있는 폴리펩티드의 부위를 포함한다. 결합 도메인은 적어도 하나의 결합 부위를 포함한다. 예시적인 결합 도메인에는 항체 가변 도메인을 포함한다. 이 발명의 항체 분자는 단일 결합 부위 또는 다중 (예를 들어, 두 개, 세 개 또는 네 개) 결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0042] "가변 부위 (Variable region)" 또는 "가변 도메인 (variable domain)"- "가변 (variable)"이라는 용어는 VH 및 VL의 가변 도메인의 어떤 부분이 항체 중의 서열과 현저히 다르고 및 이의 타겟 항원에 대한 각 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나 가변성은 항체의 가변 도메인을 통해 동등하게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 항원-결합 부위의 일부를 형성하는 각 VL 도메인 및 VH 도메인에 있는 소위 "최고의 가변 루프 (hypervariable loops)" 라고 불리는 세 부분에 집중되어 있다. V람다(Vlambda) 경쇄 도메인의 첫 번째, 두 번째, 및 세 번째 최고 가변 루프는 여기서 L1(λ), L2 (λ) 및 L3(λ)로서 언급되며 및 VL 도메인에서 잔기 24-33 ((L1(λ), 9, 10, 또는 11 아미노산 잔기로 구성되고)), 49-53 ((L2 (λ), 3 잔기로 구성되고)) 및 90-96 ((L3(λ), 5 잔기로 구성되고))를 포함하는 것으로서 정의될 수 있다 (Morea et al., *Methods* 20:267-279 (2000)). V카파(Vkappa) 경쇄 도메인의 첫 번째, 두 번째, 및 세 번째 최고 가변 루프는 여기서 L1(κ), L2(κ) 및 L3(κ)로서 언급되며 및 VL 도메인에서 잔기 25-33 ((L1(κ), 6, 7, 8, 11, 12 또는 13 아미노산 잔기로 구성되고)), 49-53 ((L2 (κ), 3 잔기로 구성되고)) 및 90-97 ((L3(κ), 6 잔기로 구성되고))를 포함하는 것으로서 정의될 수 있다 (Morea et al., *Methods* 20:267-279 (2000)). VH 도메인의 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 최고 가변 루프는 여기서 H1, H2 및 H3로서 언급되며 및 VH 도메인에서 잔기 25-33 (H1, 7, 8, 또는 9 잔기로 구성되고), 52-56 (H2, 3 또는 4 잔기로 구성되고) 및 91-105 (H3, 길이가 매우 가변적이다)를 포함하는 것으로 정의될 수 있다 (Morea et al., *Methods* 20:267-279 (2000)).
- [0043] 달리 제시되지 않는 한, L1, L2 및 L3란 용어는 각각 VL 도메인의 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 최고 가변 루프를 의미하며, 및 V카파 및 V람다 아이소타입 둘 다로부터 얻은 최고 가변 루프를 포함한다. H1, H2 및 H3란 용어는 각각 VH 도메인의 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 최고 가변 루프를 의미하며, 및 γ , μ , α , δ 또는 ϵ 를 포함하는, 임의의 알려진 중쇄 이소 타입으로부터 얻은 최고 가변 루프를 포함한다.
- [0044] "최고 가변 루프 (hypervariable loop)" L1, L2, L3, H1, H2 및 H3는 하기에 정의한 대로 각각 "보체성 결정 부위 (complementarity determining region)" 또는 "CDR"의 일부를 포함할 수 있다. "최고 가변 루프 (hypervariable loop) " 및 "보체성 결정 부위 (complementarity determining region)" 라는 용어는 엄밀하게는 동의어가 아니다, 왜냐하면, "최고 가변 루프(HVs)는 구조에 근거하여 정의되고, 반면에 보체성 결정 부위 (CDRs) 는 서열 가변성에 근거하여 정의되었기 때문이며 (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) 및 이 HVs 및 이 CDRs의 한계는 어떤 VH 및 VL 도메인에서는 다를 수 있기 때문이다.

- [0045] VL 및 VH 도메인 CDRs은 전형적으로 다음의 아미노산을 포함하는 것으로서 정의될 수 있다: 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) 및 89-97 (LCDR3), 및 중쇄 가변 도메인에서 잔기 31-35 또는 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) 및 95-102 (HCDR3); (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 그러므로, HV는 해당하는 CDRs 내에서 포함될 수 있으며 및 여기서 VH 및 VL 도메인의 "최고 가변 루프"의 언급은 해당하는 CDRs을 또한, 포함하는 것으로서 해석되어야 하며 및 달리 제시되지 않는 한 그 반대도 마찬가지다.
- [0046] 가변 도메인의 좀 더 높게 보존된 부분은, 하기에 정의된 대로, 프레임워크 부위 (framework region) (FR)라고 불린다. 자연적인 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 네 개의 FRs (각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)를 포함하고, 대개 β -시트 (β -sheet) 모양을 취하며, 세 개의 최고 가변 루프에 의해 연결된다. 각 체인의 최고 가변 루프는 FRs에 의해 서로 가깝게 붙어 있으며 및 다른 체인으로부터의 최고 가변 루프는 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. 항체의 구조적 분석으로 서열과 보체성 결정 부위에 의해 형성된 결합 부위의 모양 간에 연관성이 있음이 나타났다 (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., *J. Mol. Biol.*, 215:175-182 (1990)). 이들의 높은 서열 가변성에도 불구하고, 6개 루프 중 다섯 개는 "정통적 구조 (canonical structures)" 라고 불리는, 단지 작은 레파토아의 주-체인 구조 (main-chain conformations)를 가진다. 이들의 구조는 우선 루프의 길이에 의해 결정되고 및 두 번째로 이들의 패키징, 수소 결합 또는 특이한 주-체인 구조를 추측할 수 있는 능력을 통해 구조를 결정하는 루프 및 프레임 워크 부위의 어떤 위치에 있는 핵심 잔기의 존재에 의해 결정 된다.
- [0047] "프레임워크 부위 (Framework region)"-"프레임워크 부위 (Framework region)" 또는 "FR 부위"라는 용어는 여기서 사용된 대로, 가변 부위의 일부인 아미노산 잔기를 포함하나, CDRs (예를 들어, 카벳 정의의 CDRs을 사용)의 일부는 아니다. 그러므로 가변 부위 프레임워크는 그 길이가 약 100-130 아미노산 사이이지만 CDRs 밖의 아미노산만을 포함한다. 중쇄 가변 도메인의 특별한 예시 및 CDRs을 위해 카벳 등에 (Kabat et al.) 의해 정의된 대로, 프레임워크 부위 1은 아미노산 1-30을 포함하는 가변 부위의 도메인에 해당하고; 프레임워크 부위 2는 아미노산 36-49를 포함하는 가변 부위의 도메인에 해당하고; 프레임워크 부위 3은 아미노산 66-94를 포함하는 가변 부위의 도메인에 해당하고; 및 프레임워크 부위 4는 아미노산 103으로부터 가변부위 끝까지의 가변 부위의 도메인에 해당한다. 경쇄의 프레임워크 부위는 각 경쇄 가변 부위 CDRs에 의해 비슷하게 분리된다. 비슷하게, 초티아 등 (Chothia et al.) 또는 맥칼럼 등 (McCallum et al.)에 의한 CDRs의 정의를 사용하여 프레임워크 부위 경계들은 상기 서술된 대로 각각의 CDR 말단에 의해 분리된다. 바람직한 실시 예에서, CDRs은 카벳 (Kabat)에 의해 정의한 대로이다.
- [0048] 자연적으로 존재하는 항체들에서, 각 단량체 항체에 존재하는 6개 CDRs은 항체가 수용성 환경에서 3차원 모양을 가정할 때 항원-결합 부위를 형성하도록 특이적으로 위치하는 짧고, 비-연속적인 아미노산 서열이다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지는 아미노산 서열에서 분자-내 가변성을 덜 보여주고 및 프레임워크 부위라고 불린다. 프레임워크 부위는 주로 β -시트 구조를 취하며 및 CDRs는 β -시트 구조를 연결하는, 및 어떤 경우에는 이의 한 부분을 형성하는, 루프를 형성한다. 그러므로 이들 프레임워크 부위는 체인-간, 비-공유적인 상호작용으로 이 6개의 CDRs이 올바른 방향에서 자리 잡도록 제공하는 스케폴드를 형성하도록 작용한다. 자리가 잡힌 CDRs에 의해 형성된 항원-결합 부위는 면역활성적인 항원에 있는 에피토프에 보체적인 표면을 정의한다. 이 보체적인 표면은 항체가 면역활성적인 항원 에피토프에 비-공유적인 결합을 하도록 촉진한다. CDRs의 위치는 이 분야 기술의 한 통상 전문가에 의해 쉽게 동정 될 수 있다.
- [0049] "비-당화 (Non-glycosylated)"-여기서 사용된 대로, "비-당화 (Non-glycosylated)" 라는 용어는 항체 또는 항원-결합 단편에서 잠재적인 당화 부위에 당화가 결핍된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 형태를 의미한다. 어떤 실시 예에서, "비-당화"라는 용어는 항체 또는 항원-결합 단편에서 잠재적인 N-링크된 당화 부위에 당화가 결핍된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 형태를 의미한다. 어떤 실시 예에서, "비-당화" 라는 용어는 중쇄의 가변 부위에서 잠재적인 N-링크된 당화 부위에 당화가 결핍된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 형태를 의미한다.
- [0050] "고정 부위 (Constant region)"-여기서 사용된 대로, "고정 부위 (Constant region)" 는 가변 도메인 또는 가변 부위 밖의 항체 분자의 부분을 의미한다. 면역글로불린 경쇄는 전형적으로 "CL 또는 CL1 도메인"으로서 불리는데, 단일 도메인 "고정 부위"를 갖는다. 이 도메인은 VL 도메인에 C-말단에 놓여 있다. 면역글로불린 중쇄는 면역글로불린의 클래스에 (γ , μ , α , δ , ϵ) 따라 이의 고정 부위가 다르다. 중쇄 γ , α , 및 δ 는 CH1과 CH2 도메인을 분리하는 유연한 힌지 부위를 가진 세 개의 면역글로불린 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3라고 불리는)으로 구성된 고정 부위를 갖는다. 중쇄 μ 및 ϵ 는 4개의 도메인 (CH1-CH4)으로 구성된 고정 부위를 갖는다. 중쇄의

고정 부위는 VH 도메인에 C-말단에 위치하여 있다.

[0051] 중쇄 및 경쇄 면역글로불린에서 아미노산 숫자 매김은 Y 모양의 포크 끝에 N-말단으로부터 각 체인의 밑에 있는 C-말단으로 흐른다. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 고정 도메인을 정의하기 위하여 다른 숫자 매김 계획이 사용된다. EU 숫자 매김 계획에 따라, IgG 분자의 중쇄 고정 도메인은 다음과 같이 동정된다: CH1-아미노산 잔기 118-215; CH2-아미노산 잔기 231-340; CH3-아미노산 잔기 341-446. "힌지부위 (hinge region)"에는 CH1 도메인을 CH2 도메인에 결합시키는 중쇄 분자의 일부가 포함된다. 이 힌지 부위는 대략 25 잔기를 포함하며 및 유연하다, 그러므로 두 개의 N-말단 항원-결합 부위가 독립적으로 움직이게 한다. 힌지 부위는 세 개의 뚜렷한 도메인으로 다시 나눌 수 있다: 위, 중간, 및 아래 힌지 도메인 (Roux K.H. et al. *J. Immunol.* 161:4083-90 1998). "전적으로 인간 (fully human)" 힌지 부위를 포함하는 본 발명의 항체들은 하기 표 1 에서 보여준 힌지 부위 서열 중 하나를 함유한다.

표 1. 인간 힌지 서열

IgG	위 힌지 (Upper hinge)	중간 힌지 (Middle hinge)	아래 힌지 (Lower hinge)
IgG1	EPKSCDKTHT (서열 번호 9)	CPPCP (서열 번호 10)	APELLGGP (서열 번호 11)
IgG2	ERK (서열 번호 12)	CCVECPPPCP (서열 번호 13)	APPVAGP (서열 번호 14)
IgG3	ELKTPGLDTTHT (서열 번호 15)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (서열 번호 16)	APELLGGP (서열 번호 17)
IgG4	ESKYGPP (서열 번호 18)	CPSCP (서열 번호 19)	APEFLGGP (서열 번호 20)

[0052]

[0053] "단편 (fragment)"-"단편 (fragment)"이라는 용어는, 본 발명의 항체의 맥락에서 사용된 대로, 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체 체인보다 더 적은 아미노산을 포함하는 항체 또는 항체 체인의 일부 또는 한 부분을 의미한다. "항원-결합 단편 (antigen-binding fragment)"이라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하거나 또는 온전한 항체와 (즉, 이들이 유래된 온전한 항체와) 항원-특이적 결합 (예를 들어, C2 단백질 또는 이의 한 부분에 특이적으로 결합)에 대해 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 의미한다. 여기서 사용된 대로, 항체 분자의 "단편"이라는 용어는 항체의 항원-결합 단편, 예를 들어, 항체 경쇄 가변 도메인 (VL), 항체 중쇄 가변 도메인 (VH), 단일 체인 항체 (single chain antibody)(scFv), F(ab')₂ 단편, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, 팔-하나 (단일가) 항체 ((one-armed (monovalent) antibody)), 디아바디 (diabodies), 트리아바디 (triarboies), 테트라바디 (tetraabodies) 또는 그러한 항원-결합 단편의 조합, 조립 또는 접합에 의해 형성된 임의의 항원-결합 분자를 포함한다. "항원-결합 단편 (antigen-binding fragment)"이라는 용어는 여기서 사용된 대로 더 나아가 유니바디 (unibodies), 도메인 항체 (domain antibodies) 및 나노바디 (nanobodies)로 구성된 군으로부터 선택되는 항체 단편을 포함하려는 의도이다. 단편은, 예를 들어, 온전한 또는 완전한 항체 또는 항체 체인의 화학적 또는 효소적인 처리를 통해, 또는 재조합 방법으로 얻을 수 있다.

[0054] **보체 성분 C2 (Complement Component C2)**

[0055] 인간 보체의 두 번째 성분 (the second component of human complement) (C2)은 90-100 kDa 당단백질로 보체 활성화의 고전적인 및 렉틴 경로에 관여한다. C2는 고전적인 경로의 C1s에 의해 또는 렉틴 경로의 활성화된 MASP2에 의해 활성화될 수 있다. C2는 표면-결합된 C4b (Mg²⁺ 존재하에)에 결합하여 C4bC2 복합체를 형성하며, 이는 그 후 활성화된 C1s 또는 MASP2 에 의해 두 개의 단편으로 절단된다: 더 큰 70 kDa 단편은, 전통적으로 C2a 로 지정하며, 이는 C4b에 부착된 상태로 남아 C3-컨버타제 (convertases) C4bC2a를 형성하고, 및 더 적은 30 kDa N-말단 단편은, 전통적으로 C2b로 지정하며, 이는 액체 상으로 방출된다. 어떤 저자들은 최근 C2a 및 C2b 지정을 뒤집어, C2b는 더 큰 70 kDa 단편으로 언급하고, 및 C2a는 더 작은 30 kDa 단편으로 언급한다. 여기

서 사용된 대로, C2a는 더 큰 70 kDa 단편으로 언급할 것이며, 및 C2b는 더 작은 30 kDa 단편으로 언급할 것이다. 일단 활성화되고 및 C4b에 결합되면, C2a는 C3 및 C5를 각각 절단할 수 있는 C3 및 C5 컨버타제 (convertases)의 촉매적 서브유닛을 구성한다.

[0056] 인간 C2의 아미노산 서열이 알려졌으며 (GenBank 접근번호 NM_000063) 및 서열 번호 21로 보여준다.

[0057] 인간 C2의 아미노산 서열 (서열 번호 21):

```

MGPLMVLFCLLFLYPGLADSAPSCPQNVNISGGTFTLSHGWPAGSLLTYS
CPQGLYPSPASRLCKSSGQWQTPGATRSLSKAVCKPVRCPAPVSFENGIY
TPRLGSYPVGGNVSFECEDGFILRGSPVRQCRPNGMWDGETAVCDNGAGH
CPNPGISLGAVRTGFRFGHGDKVRYRCSSNLVLTGSSERECQNGVWSGT
EPICRQPYSYDFPEDVAPALGTSFSHMLGATNPTQKTKESELGRKIQIQRS
GHLNLYLLLLDCSQSVSENFLLIFKESASLMVDRIFFSFEINVSVAIITFAS
EPKVLMSVLNDNSRDMTEVISSLENANYKDHENGTGTNTYAALNSVYLLMM
NNQMRLGEMETMAWQEIRHAIILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQ
KRNDYLDIYAIGVGKLDVDWRELNELGSKKDGERRHAFILQDTKALHQVFE
HMLDVSKLTDITCGVGNMSANASDQERTPWHVTIKPKSQETCRGALISDQ
WVLTAAHCFRDGNDHSLWRVNVGDPKSQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKK
NQGILEFYGDDIALLLKLAQKVKMSTHARPICLPCTMEANLALRRPQGSTC
RDHENELLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMGEVWTSCAEVVSQEKTMFP
NLTDVREVVDQFLCSGTQEDESCKGESGGAVFLERRFRFFQVGLVSWG
LYNPCLGSADKNSRKRAPRSKVPVPPRDFHINLFRMQPWLQRHLGDVNLNFL
PL
    
```

[0058]

[0059] 많은 다른 혈장 단백질과 같이, C2는 모듈 구조 (modular structure) 를 가진다. 이의 N-말단으로부터 시작하여, C2는 세 개의 보체 조절 단백질 모듈 ((CCP1-3, 또한, 짧은 합의 반복 (short consensus repeats) (SCR) 또는 스시-도메인 반복으로도 알려짐)), 금속-이온-의존성 부착 부위를 함유하는 본 윌레브란드 인자 타입 A (von Willebrand factor type A) (vWFA) 도메인, 및 세린 프로테아제 (serine protease) (SP) 도메인으로 구성된다 (Maraud et al., *Adv Immunol* 1998, 69: 249). 전자 현미경 연구에서 C2가 세 개의 도메인으로 구성됨을 보여주었다. 세 개의 CCP 모듈 (CCP1-3) 은 함께 N-말단 도메인을 형성하며, 이는 C2b에 해당한다. vWFA 도메인은 두 번째 도메인을 구성하며, 및 SP 도메인은 세 번째 도메인을 만든다. 두 번째 및 세 번째 도메인은 함께 분자의 더 큰 C2a 부분을 구성한다.

[0060] CCP 모듈은 다수의 단백질에서 일어나는 흔한 구조적 모티프이다. 이러한 공모양의 유닛은 대략 60 아미노산 잔기로 구성되며 및 4개의 불변의 이황화-결합된 시스테인 잔기 주변에 형성된 촘촘한 6- 내지 8-선의 β-쉬트 구조로 접혀진다 (Norman et al., *J Mol Biol* 1991, 219: 717). 이웃하는 CCP 모듈은 보전성이 적은 링커에 의해 공유적으로 붙어있다.

[0061] 표면-결합한 C4b에의 C2의 초기 결합은 두 개의 낮은-친화력 부위, 하나는 C2b에 있고 (Xu & Volanakis, *J Immunol* 1997, 158: 5958) 및 다른 하나는 C2a의 vWFA 도메인 (Horiuchi et al., *J Immunol* 1991, 47: 584)에 있는 부위에, 의해 중개 된다. C2b 및 C2a의 결정 구조가 1.8Å 해상도로 결정되었지만 ((Milder et al., *Structure* 2006, 14: 1587; Krishnan et al., *J Mol Biol* 2007, 367: 224; Krishnan et al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009, D65: 266), C2에서 C4 및 C3의 접촉 부위 (들) 를 구성하는 아미노산 잔기들의 정확한 위상 (토폴로지) 및 구조는 알려지지 않았다. 그러므로 C4와의 상호 작용에 관여하는 C2의 아미노산 잔기는 결정되어 져야 한다 (Krishnan et al., *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr* 2009, D65: 266).

[0062] **항-C2 항체**

[0063] 본 발명의 한 관점은 인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편이며,

상기 언급된 단일클론 항체 또는 이의 단편은 :

- [0064] 서열 번호 1로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및
- [0065] 서열 번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하며;
- [0066] 상기 VH 도메인의 아미노산 잔기 72-74 (카벳 숫자 매김)는 $X_1X_2X_3$ 로 각각 구성되고, 상기 X_2 는 임의의 아미노산이고, 및 $X_1X_2X_3$ 는 NX_2S 또는 NX_2T 는 아니다.
- [0067] VH 도메인은 보체성 결정 부위 (complementarity determining regions) (CDRs) HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3를 포함한다. VL 도메인은 CDRs LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3를 포함한다. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3의 아미노산 서열은 표 2에 보여준다.

표 2 CDRs

HCDR1	DYNMD	(서열 번호 22)
HCDR2	DINPNYESTGYNQKFKG	(서열 번호 23)
HCDR3	EDDHDAFAY	(서열 번호 24)
LCDR1	RASKSVRTSGYNYMH	(서열 번호 25)
LCDR2	LASNLKS	(서열 번호 26)
LCDR3	QHSRELPYT	(서열 번호 27)

- [0068]
- [0069] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합한다. 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 보체 인자 C2b에 해당하는 인간 보체 인자 C2의 한 부분에 있는 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0070] 어떤 실시 예에서, 중쇄의 가변 도메인은 비-당화 (non-glycosylated) 된다.
- [0071] 어떤 실시 예에서, 중쇄의 가변 도메인의 아미노산 서열은 서열 N-X-S/T로 특징지어진 잠재적인 당화 부위 (glycosylation site) 를 포함하지 않으며, 여기서 N은 아스파라긴, X는 임의의 어느 아미노산, 및 S/T는 세린 (serine) 또는 트레오닌 (threonine) 을 나타낸다. 따라서, 어떤 실시 예에서, N-X-S/T 서열을 포함하는 VH 도메인을 가진 항체는 이들 잔기가 $X_1X_2X_3$ 로 각각 구성되도록 수정될 수 있으며, 상기 X_2 는 임의의 어느 아미노산이고, 및 $X_1X_2X_3$ 는 NX_2S 또는 NX_2T 는 아니다. 즉, X_1 은 N이 아닌 임의의 어느 아미노산이 될 수 있고, 및/또는 X_3 는 S 또는 T가 아닌 임의의 어느 아미노산이 될 수 있다. 어떤 실시 예에서 N-X-S 또는 N-X-T 서열을 포함하는 VH 도메인을 가진 항체는 이 세 잔기들이 각각 D-X-S로 구성되도록 수정될 수 있다. 어떤 실시 예에서 N-X-S 또는 N-X-T 서열을 포함하는 VH 도메인을 가진 항체는 이 세 잔기들이 각각 D-X-T 로 구성되도록 수정될 수 있다.
- [0072] 어떤 실시 예에서, 중쇄 아미노산 잔기 72-74 (카벳 숫자 매김)는 $X_1X_2X_3$ 로 각각 구성되고, 상기 X_2 는 임의의 어느 아미노산이고, 및 $X_1X_2X_3$ 는 NX_2S 또는 NX_2T 는 아니다.
- [0073] 어떤 실시 예에서, 중쇄 잔기 72-74 (카벳 숫자 매김)에의 아미노산은 DX_2S 로 구성된다.
- [0074] 어떤 실시 예에서, 중쇄 잔기 72-74 (카벳 숫자 매김)에의 아미노산은 DKS로 구성된다.
- [0075] 어떤 실시 예에서, VH 도메인은 서열 번호 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0076] 어떤 실시 예에서, VH 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 3에서 제시된 서열로 구성된다.
- [0077] 어떤 실시 예에서, VL 도메인은 서열 번호 2에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0078] 어떤 실시 예에서, VL 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 2에서 제시된 서열로 구성된다.
- [0079] 어떤 실시 예에서, VH 도메인은 서열 번호 3에서 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 및 VL 도메인은 서열 번호 2에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0080] 어떤 실시 예에서, VH 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 3에서 제시된 서열로 구성되고, 및 VL 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 2에서 제시된 서열로 구성된다.
- [0081] 서열 번호 3 및 서열 번호 2의 아미노산 서열이 표 3에 보여준다. 서열 번호 2는 미국 특허 번호 9,944,717

(U.S. Patent No. 9,944,717) 에서 공개된 부로테오 파마 B.V (Broteio Pharma B.V) 의 인간화된 5F2.4 (BR02)의 VL (VK3) 도메인에 해당한다. 또한, 표3에서 보여준 대로, 서열 번호 28은 여기서 참고문헌으로 병합된 미국 특허 번호 9,944,717에서 공개된 인간화된 5F2.4 (BR02)의 VH (VH4) 도메인에 해당한다.

표 3. VH 및 VL 도메인

ID	서열	서열 번호
5F2.4 VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVNKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTVTVSS	28
VH4.2 generic	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVX ₂ X ₂ ISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DHDAFAYWGQGLTVTVSS	1
VH4.2 ARGX- 117	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTVTVSS	3
5F2.4 VK3	DNVLTQSPDLSAVSLGERATISCRASKSVRISGYNMHWYQQKPKGPPKLL IYLASNLKSGVPPDRFSGSGSGTDFTLTITSSIQAEADAATYYCQHSRELPTTF GQGTKLEIK	2

[0082]

[0083]

어떤 실시 예에서, 본 발명의 단일클론 항체는 인간 항체의 CH1 도메인, 힌지 도메인 (hinge domain), CH2 도메인 및 CH3 도메인, 특히 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4를 포함한다.

[0084]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG1의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH2 도메인에 있는 L234A 및 L235A 치환을 포함한다.

[0085]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG1의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH3 도메인에 있는 H433K 및 N434F 치환을 포함한다.

[0086]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG1의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH2 도메인에 있는 L234A 및 L235A 치환, 및 CH3 도메인에 있는 H433K 및 N434F 치환을 포함한다.

[0087]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 및 힌지 도메인에 있는 S228P 치환을 포함한다.

[0088]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH3 도메인에 있는 L445P 치환을 포함한다.

[0089]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하고 및 힌지 도메인에 있는 S228P 치환과 CH3 도메인에 있는 L445P 치환 둘 다를 포함한다.

[0090]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH3 도메인에 있는 H433K 및 N434F 치환을 포함한다.

[0091]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하고 및 힌지 도메인에 있는 S228P 치환, 및 CH3 도메인에 있는 H433K 및 N434F 치환을 포함한다.

[0092]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하고 및 CH3 도메인에 있는 H433K, N434F, 및 L445P 치환을 포함한다.

[0093]

어떤 실시 예에서, 항체는 인간 IgG4의 CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 포함하고 및 힌지 도메인에 있는 S228P 치환, 및 CH3 도메인에 있는 있는 H433K, N434F, 및 L445P 치환을 포함한다.

[0094]

어떤 실시 예에서, 단일클론 항체는 인간 IgG 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인으로 구성된다.

[0095]

어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 29로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG1 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 29로서 제시된 아미노산 서열로 구성된다.

[0096]

어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 4로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG1 중쇄 고정

도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호4로서 제시된 서열로 구성된다.

[0097] 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 30으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호 30으로서 제시된 서열로 구성된다.

[0098] 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 31로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호31로서 제시된 서열로 구성된다.

[0099] 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인은 서열 번호 5로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 인간 IgG4 중쇄 고정 도메인을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 중쇄 고정 도메인의 아미노산 서열은 서열 번호5로서 제시된 서열로 구성된다.

[0100] 서열 번호 4, 5, 및 29-31의 아미노산 서열은 표 4에 보여준다.

표 4. 중쇄 고정 도메인 (Heavy Chain Constant Domains)

ID	서열	서열 번호
인간 IgG1 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK	29
인간 IgG1 LALA NHance (ARGX-117)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHCTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALKPHYHTQKSLSLSPG	4
인간 IgG4 (UniProt)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTRKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRILTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNYHTQKSLSLSLGK	30
인간 IgG4 S228P L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTRKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRILTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNYHTQKSLSLSPGK	31
인간 IgG4 S228P NHance L445P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTRKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRILTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALKPHYHTQKSLSLSPGK	5

[0101] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 전장 단일클론 항체를 포함한다.

[0102] 어떤 실시 예에서, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 전장 단일클론 항체로 구성된다.

[0103] 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 32로서 보여준 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 가진 중쇄를 포함하는 단일클론 항체이다. 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 32로서 보여준 아미노산 서열과 100% 서열 상동성을 가진 중쇄를 포함하는 단일클론 항체이다. 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 7로서 보여준 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 가진 경쇄를 포함하는 단일클론 항체이다. 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 7로서 보여준 아미노산 서열과 100% 서열 동일성을 가진 경쇄를 포함하는 단일클론 항체이다. 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 32로서 보여준 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 가진 중쇄를 포함하고, 및 서열 번호 7로서 보여준 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 상동성을 가진 경쇄를 포함하는 단일클론 항체이다. 어떤 실시 예에서, 여기서 제공되는 것은 서열 번호 32로서 보여준 아미노산 서열과 100% 서열 상동성을 가진 중쇄, 및 서열 번호 7로서 보여

[0110] 표5. 중쇄 및 경쇄 (Heavy Chains and Light Chains)

ID	서열	서열 번호
인간 IgG1 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	32
인간 IgG1 LALA Mhance (ARGX-117)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPG	6
인간 IgG4 (UniProt)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	33
인간 IgG4 S228P I445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	34
인간 IgG4 S228P Mhance I445P	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMDWVRQATGQGLEWIGDI NPNYESTGYNQKFKGRATMTVDKSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDDH DAFAYWGQGLTIVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	8
경쇄 (ARGX-117)	DNVLTQSPDLSAVLSGERATISCRASKSVRTSGYNYMHYQQKPGQPPKLL IYLASNLKSGVPRDFSGSGSDIDFTLTISLQAEDAATYYCQHSRELPYTF GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTITLSKAADYEKHKVYACEVTHQG LSSPEVTKSFNRGEC	7

[0111]

[0112]

항체의 중쇄 및/또는 경쇄가 참조 서열에 대비하여 특정한 퍼센트 서열 상동성으로서 정의되는 실시 예에서, 중쇄 및/또는 경쇄는 참조 서열에 존재하는 동일한 CDR 서열을 유지할 수 있고 이로써 변이는 단지 CDR 부위 밖에만 존재한다.

[0113]

현 출원에서 달리 언급하지 않는 한, 아미노산 서열 사이의 % 서열 상동성은 이 두 서열을 최적의 방법으로 정렬하여 비교하여 결정할 수 있으며 및 여기서 비교될 아미노산 서열은 이 두 아미노산 사이에 최적의 정렬을 위해 참조 서열에 대비하여 삽입 또는 삭제를 포함할 수 있다. 상동성 퍼센트는 두 서열 사이에 아미노산 잔기가 동일한 똑같은 자리의 수를 결정하고, 이 같은 자리의 수를 비교 창에 있는 총 자리의 수로 나누고 및 이들 두 서열 사이의 퍼센트 상동성을 얻기 위하여 얻은 이 결과를 100으로 곱하여 계산한다. 예를 들어, BLAST 프로그램, "브라스트 2 서열 (BLAST 2 sequences)" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol Lett.* 174:247-250) 를 사용하는 것도 가능하며, 사용된 계수 (parameter)는 디폴트로 주어진 그것들이며 ((특히 "열린 갭 페널티 (open gap penalty) 계수: 5, 및 "연장 갭 페널티 (extension gap penalty)" 계수: 2; 선택된 매트릭스는, 예를 들어, 프로그램에 의해 제안된 매트릭스 "BLOSUM 62"이다)), 비교될 두 서열 사이의 퍼센트 상동성은 프로그램에 의해 직접 계산된다.

[0114]

비-제한적인 실시 예에서, 현 발명의 항체는 CH1 도메인 및/또는 CL 도메인 (각각 중쇄 및 경쇄로부터)을 포함할 수 있으며, 이의 아미노산 서열은 전적으로 또는 상당히 인간의 것이다. 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편이 인간 치료에 사용될 의도가 있는 곳에서는, 항체의 전체 고정 부위, 또는 적어도 이의 일부분이 전적으로 또는 상당한 정도로 인간 아미노산 서열을 가지는 것이 전형적이다. 그러므로, CL 도메인, CH1 도메인, 힌지 부

위 (hinge region), CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 (만약 존재한다면)의 하나 또는 그 이상 또는 임의의 조합은 이의 아미노산 서열에 관한 한 전적으로 또는 상당히 인간의 것일 수 있다.

[0115] 유리하게도, CL 도메인, CH1 도메인, 힌지 부위 (hinge region), CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 (만약 존재한다면)은 모두 전적으로 또는 상당한 정도의 인간 아미노산 서열을 가질 수 있다. 인간화된 또는 키메라 (chimeric) 항체의 고정 부위, 또는 항체 단편의 맥락에서, "상당한 정도로 인간 (substantially human)" 이란 용어는 인간 고정 부위와 적어도 90%, 또는 적어도 92%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 상동성을 의미한다. 이 맥락에서 "인간 아미노산 서열 (human amino acid sequence)" 이란 용어는 인간 면역글로불린 유전자에 의하여 암호화되는 아미노산 서열을 의미하며, 여기에는 생식세포계열, 재정렬된 및 체세포적으로 돌연변이 된 유전자를 포함한다. 본 발명은 "전적으로 인간 (fully human)" 힌지 부위의 존재가 특별히 요구되는 그러한 실시 예를 제외하고는, 인간 서열에 관한 한 하나 또는 그 이상의 아미노산의 첨가, 삭제, 또는 치환에 의해 변경된 "인간" 서열의 고정 부위를 포함하는 폴리펩티드도 또한 고려한다.

[0116] 본 발명의 C2-결합하는 항체에 "전적으로 인간" 힌지 부위의 존재는 면역성을 최소화하고 및 항체의 안정성을 최적화하는데 둘 다 유익할 수 있다.

[0117] C2-결합하는 항체는 신생아 Fc 수용체 FcRn에 대한 결합 친화력을 증가시키기 위하여 Fc 부위 내에서 수정될 수 있다. 증가 된 결합 친화력은 산성 pH에서 측정될 수 있다 (예를 들어, 약 대략 pH 5.5에서부터 대략 pH 6.0). 증가 된 결합 친화력은 또한, 중성 pH에서 측정될 수 있다 (예를 들어 대략 pH 6.9로부터 대략 pH 7.4). 이 실시 예에서, "증가 된 결합 친화력 (increased binding affinity)"은 수정되지 않은 Fc 부위의 결합 친화력에 비해 FcRn에 대한 증가 된 결합 친화력을 의미한다. 전형적으로 수정되지 않은 Fc 부위는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 야생-형 아미노산 서열을 소유할 것이다. 그러한 실시 예에서, 수정된 Fc 부위를 가진 항체 분자의 FcRn에 대한 증가 된 결합 친화력은 FcRn에 대한 야생형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 결합 친화력에 대비하여 측정될 것이다.

[0118] C2-결합하는 항체는 신생아 Fc 수용체 FcRn에 대한 결합 친화력을 증가시키기 위하여 Fc 부위 내에서 수정될 수 있다. 증가 된 결합 친화력은 산성 pH에서 측정될 수 있다 (예를 들어, 약 대략 pH 5.5에서부터 대략 pH 6.0). 증가 된 결합 친화력은 또한, 중성 pH에서 측정될 수 있다 (예를 들어 대략 pH 6.9로부터 대략 pH 7.4). 이 실시 예에서, "증가 된 결합 친화력 (increased binding affinity)"은 수정되지 않은 Fc 부위의 결합 친화력에 비해 FcRn에 대한 증가 된 결합 친화력을 의미한다. 전형적으로 수정되지 않은 Fc 부위는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 야생-형 아미노산 서열을 소유할 것이다. 그러한 실시 예에서, 수정된 Fc 부위를 가진 항체 분자의 FcRn에 대한 증가 된 결합 친화력은 FcRn에 대한 야생형 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 결합 친화력에 대비하여 측정될 것이다.

[0119] **약학적 조성물 (Pharmaceutical Compositions)**

[0120] 본 발명의 한 관점은 인간 보체 인자 C2에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물, 및 약학적으로 허용할 만한 담체 이며, 상기 언급된 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

[0121] 서열 번호 1로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인; 및

[0122] 서열 번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하며;

[0123] 상기 VH 도메인의 아미노산 잔기 72-74 ((카벳 숫자 메깅) 는 각각 $X_1X_2X_3$, 로 구성되며, 상기 X_2 는 임의의 아미노산이고, 및 $X_1X_2X_3$ 는 NX_2S 또는 NX_2T 는 아니다.

[0124] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용할 만한 담체 또는 희석제는 물론 임의의 다른 알려진 아주벤트 (adjuvants) 및 부형제와 함께 레밍톤 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995) 에서 공개된 것과 같은 전통적인 기술에 따라 제형화 될 수 있다.

[0125] "약학적으로 허용할 만한 담체 (pharmaceutically acceptable carrier)"라는 용어는 본질적으로 비-독성적인, 담체 또는 부형제와 관련된다. 그러한 부형제의 예는, 이것에만 국한하지 않으나, 생리 식염수, 링거 용액 (Ringer's solution), 덱스트로즈 용액 (dextrose solution) 및 항크스 용액 (Hanks' solution) 이다. 고정된 오일 (fixed oils) 및 에틸 올레에이트 (ethyl oleate)와 같은 비-수용성 부형제도 또한 사용될 수 있다.

- [0126] 약학적 조성물은 전형적으로 멸균되어야 하고 및 제조 및 저장 컨디션 하에서 안정하여야 한다. 조성물은 용액으로서, 마이크로-에멀전 (micro-emulsion), 리포솜 (liposome)으로서, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 질서정연한 구조로서 제형화 될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 적용될 수 있는 적절한 수용성 및 비-수용성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(polyols) ((글리세롤 (glycerol), 프로필렌 글라이콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글라이콜 (polyethylene glycol), 및 이와 유사한 것과 같은)), 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레에이트 (ethyl oleate) 와 같은, 주사 가능한 유기 에스터 (organic esters)가 포함된다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴 (lecithin) 과 같은 코팅 재료의 사용, 분산의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지, 및 표면 활성제(surfactants)의 사용으로 유지될 수 있다.
- [0127] 약학적 조성물은 방부제, 습윤제, 유화제, 및 분산제와 같은 아주벤트를 또한 포함할 수 있다. 미생물 존재의 예방은 멸균 과정 및, 예를 들어, 파라벤 (paraben), 클로로부탄올 (chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르빅 에시드(sorbic acid), 및 이와 유사한 여러 가지 항 박테리아 및 항 곰팡이 제제의 포함 둘 다에 의해 확실히 할 수 있다. 또한, 조성물에 설탕, 만니톨 (mannitol), 소르비톨 (sorbitol), 글리세롤 (glycerol) 과 같은 폴리알코올 (polyalcohols) 또는 소듐 클로라이드 (sodium chloride)와 같은 등장액 제제들을 포함하는 것도 바람직할 수 있다. 약학적으로-허용할 만한 항산화제 (antioxidants)도 또한 포함될 수 있다, 예를 들어, (1) 아스코르빅 에시드 (ascorbic acid), 시스테인 하이드로클로라이드 (cysteine hydrochloride), 소듐 바이설피에이트 (sodium bisulfate), 소듐 메타바이설피트(sodium metabisulfite), 소듐 설피트(sodium sulfite), 및 이와 같은 것과 같은, 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸레이티드 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole) (BHA), 부틸레이티드 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene) (BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트(propyl gallate), 알파-토코페롤(alpha-tocopherol), 및 이와 유사한 것과 같은, 오일-용해성 항산화제 (oil-soluble antioxidants), 및 (3) 구연산(citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트 에시드 (ethylenediamine tetraacetic acid) (EDTA), 소르비톨(sorbitol), 주석산 (tartaric acid), 인산 (phosphoric acid), 및 이와 유사한 것과 같은 금속 킬레이팅 제제 (metal chelating agents).
- [0128] 멸균된 주사 가능한 용액은 단일클론 항체를 요구되는 양으로 적절한 용매에, 예를 들어, 위에서 열거한 대로, 요구되는 대로의 하나 또는 이들의 조합으로 함께 병합시키고, 이어서 멸균 미세여과로 제조되게 할 수 있다. 일반적으로, 분산 (dispersion)은 활성 화합물을 기본 분산 배지 및 요구되는 다른 성분을, 예를 들어, 상기 열거된 그런 성분들로부터, 를 함유하는 멸균 담체에 병합하여 제조한다. 멸균된 주사 가능한 용액을 제조하기 위한 멸균 파우더의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 (냉동건조) 로서 활성 성분과 미리 멸균-여과된 이들의 용액으로부터의 추가의 임의의 바람직한 성분의 파우더를 만들어 내는 방법이다.
- [0129] 약학적 조성물은 바람직하게 비경구로 투여되고, 바람직하게는 정맥(i.v) 또는 피하 (s.c) 주사 또는 주입으로 투여된다.
- [0130] "비경구 투여 (parenteral administration)" 및 "비경구적으로 투여(administered parenterally)" 라는 구절은 여기서 사용된 대로 장관 및 국부적 투여가 아닌 투여 방식, 일반적으로 주사에 의한 것을 의미하며, 및 제한 없이 정맥 내 (intravenous), 복강 내 (intraperitoneal), 피하, (subcutaneous), 근육 내 (intramuscular), 동맥 내 (intraarterial), 척추강 내 (intrathecal), 피막 내 (intracapsular), 안와 내 (intraorbital), 심장 내 (intracardiac), 피내 (intradermal), 기관경유(transtracheal), 표피하 (subcuticular), 관절 내 (intraarticular), 피막 밑(subcapsular), 지주막 아래 (subarachnoid), 척수 내 (intraspinal), 경막 외 (epidural) 및 흉골 내 (intrasternal) 주사 및 주입을 포함한다.
- [0131] 주사 가능한 항-C2 mAbs 또는 이의 단편의 지속적인 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 (monostearate salts) 및 젤라틴을 포함 시켜 (gelatin) 달성시킬 수 있다.
- [0132] mAbs 또는 이의 단편은, 임플란트, 피부 경유 패치 (transdermal patches), 및 마이크로 캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 조절되는 방출 제형과 같은, 빠르게 방출되는 것으로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제조할 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트 (ethylene vinyl acetate), 폴리안하이드라이드(polyanhydrides), 폴리글라이콜릭 에시드(polyglycolic acid), 콜라겐 (collagen), 폴리ortho에스터(polyorthoesters), 및 폴리락티드 에시드 (polylactic acid)와 같은, 생물학적으로 분해가능하고, 생체에 적합한 중합체들이 사용될 수 있다. 그러한 제형을 제조하는 방법은 일반적으로 이 분야 기술의 전문가에게는 알려졌다. 예를 들어, 지속적 및 조절적 약물 전달 시스템 (Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 197) 을 참조.

- [0133] 약학적 조성물은 이 분야 기술에서 알려진 의료용 도구로 투여될 수 있다.
- [0134] 투약 용법은 최적의 바람직한 반응 (예를 들어, 치료적 반응)을 제공하기 위하여 조정될 수 있다. 예를 들어, 한 번의 일 회분이 투여될 수 있으며, 몇 번으로 나눈 용량이 시간에 걸쳐서 투여될 수 있으며, 또는 치료적 상황의 긴급 사태에 의해 제시된 대로 용량이 비례적으로 감소되거나 또는 증가 될 수 있다.
- [0135] 현 발명의 약학적 조성물에서 mAbs 또는 이의 단편의 실제의 용량 수준은 특정한 환자에서 환자에게 독성이 없이 바람직한 치료적 반응을 달성하기 위하여 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위하여 변경할 수 있다.
- [0136] 한 실시 예에서, 결합분자, 본 발명에 따른 특정한 항체, 는 200으로부터 400mg/m²까지와 같은, 10으로부터 500mg/m²의 매주의 용량을 주입으로 투여할 수 있다. 그러한 투여는, 예를 들어, 3에서 5번과 같은 1에서 8번 반복할 수 있다. 투여는 2에서 12시간과 같이, 1에서 24시간의 기간에 걸쳐서 연속적으로 주입으로 수행될 수 있다. 어떤 실시 예에서, 투여는 한 번 또는 그 이상의 일 회분 주사로 수행될 수 있다.
- [0137] 한 실시 예에서, 결합분자, 본 발명에 따른 특정한 항체, 는 5에서 25mg/kg 와 같은, 몸무게 kg 당 1에서 50mg (mg/kg)의 매주 용량으로 주입으로 투여될 수 있다. 그러한 투여는, 예를 들어, 3에서 5번과 같은 1에서 8번 반복할 수 있다. 투여는 2에서 12시간과 같이, 1에서 24시간의 기간에 걸쳐서 연속적으로 주입으로 수행될 수 있다. 어떤 실시 예에서, 투여는 한 번 또는 그 이상의 일 회분 주사로 수행될 수 있다.
- [0138] 그 외 또 다른 실시 예에서, mAbs 또는 이의 단편 또는 이 발명에서 공개되는 임의의 다른 결합 분자는, 예를 들어, 6개월 또는 그 이상의 기간에 일주일에 한번과 같은, 유지 치료 (maintenance therapy)로서 투여될 수 있다.
- [0139] **핵산 분자 및 벡터**
- [0140] 본 발명의 한 관점은 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 한 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자이다. 어떤 실시 예에서, 단일 핵산 분자는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH 및 VL도메인 둘 다를 암호화한다. 어떤 실시 예에서, 단일 핵산 분자는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 둘 다를 암호화한다. 어떤 실시 예에서, 첫 번째 핵산 분자는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH 도메인을 암호화하고, 및 두 번째 핵산 분자는 VL 도메인을 암호화한다. 어떤 실시 예에서, 첫 번째 핵산 분자는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 (HC)를 암호화하고, 및 두 번째 핵산 분자는 경쇄 (LC)를 암호화한다.
- [0141] 어떤 실시 예에서, VH 도메인을 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 35로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0142] 어떤 실시 예에서, VL 도메인을 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 36으로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0143] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 37로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0144] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 38로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0145] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 39로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0146] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 40으로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0147] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 41로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0148] 어떤 실시 예에서, LC도메인을 암호화하는 핵산 분자는 서열 번호 42로서 제시된 핵산 서열을 포함한다.
- [0149] 어떤 실시 예에서, VH 도메인을 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 35로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.
- [0150] 어떤 실시 예에서, VL 도메인을 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 36으로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.
- [0151] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 37로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.
- [0152] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 38로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.
- [0153] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 39로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.
- [0154] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 40으로서 제시된 핵산 서열로

구성된다.

[0155] 어떤 실시 예에서, HC를 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 41로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.

[0156] 어떤 실시 예에서, LC도메인을 암호화하는 핵산 분자의 핵산 서열은 서열 번호 42로서 제시된 핵산 서열로 구성된다.

[0157] 서열 번호 35-42에 해당하는 핵산 서열이 표 6에 보여준다.

[0158] 표 6. VH, VL, HC, 및 LC의 핵산 서열

ID	서열	서열 번호
BRO2-IgG4 VH.4.2	gaagtgcagctgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaaggtgtcctgcaaggcttccggctacacctttaccgactacaacatggactgggtgcgacaggctaccggccagggcctggaatggatcggcgacatcaaccccaactacgagctccaccggctacaaccagaagtccaagggcagagccacctgaccgtggacaagtccatctccaaccgctacatggaactgtcctcctgcgagcgaggacaccgctgtactactgcccagagaggacaccacgacgctttgcttattggggccagggcacccctcgtgaccgtgtcctct	35
BRO2 VL	gacaacgtgctgaccagtcctcctgactccctggctgtgtctctggcgagagagccaccatctcttggccggcctctaagtccgtgaggacctccggctacaactacatgcaactggatcagcagaagccggccagcccccaagctgctgatacactggcctccaacctgaagtcggcgctgcccagacagattctccggctctggctctggcaaccgactttaccctgacatcagctccctgacggccaggatgcccaccctactactgcccagcactccagagagctgcccatacactttggccagggcaccagctggaaatcaag	36
BRO2-hlgG1 HC	gaagttcagctgggttcagttctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctctgtgaaggtgtcctgcaaggcttctggctacacctttaccgactacaacatggactgggtccgacaggctaccggacagggacttgatggatcggcgacatcaaccccaactacgagctccaccggctacaaccagaagtccaagggcagagccacctgaccgtggacaagtccatctccaaccgctacatggaactgtccagcctgagatctgaggacaccgctgtactactgcccagagaggtgatcacgacgctttgcttattggggccagggcacactgttcaccgtgtcctctgccaagtacaaaaggtccaagtggtttccctcttgcctccctcaacaaggtaccagtggaggccaccgctcttggctgcttgggttaaggattatcccagagcctgtcactgtttcatggaactccggcgcttgacatctggtgtgcataccttccagccgtgctcagtcgaagtggcctctacagcctcagtagcgtggtcactgtgcccagcagctctctcggcaacacaaacttatctgtaatgtgaatcataagccttcaaatccaaggtggataaagaagtggaaacaaaatcatgtgacaagacacacctggcctccttgtccagccccgaactgctgggtgggcccagcgtgtcctgtttcctcctaaacccaagacactctgatgattagtaggaccccagaagtcacttgcgtgggtggttgactgttcacatgaagatcccagggtcaagttcaattgggtatggtgacggggtcgaagttcaacaacgctaaaactaaaccaagagaggaaacagtataaactcactaccgggtgggtgagtggtctgactgtcctccatcaagactggctgaaatggcaagaatacaagtgtaaggtgagcaacaaagcctgcccgtcctatagagaaaacaatatccaagccaaaggtcaacctcggagccacaggtgtacacctcccacaagccggcatgaaactactaagaaccaagctctcttacttgcctgggttaaggggtctatccatccgacattgcagtgagtgaggatctaagggacagcctgagaaacaactacaaaaccaccctcctgtctggattctgacggatcttctctcctttatcttaactcaccgtggataaaaagcaggtggcagcagggcaacgtgtcagctgttccgttatgcatgagccctgcataaccattatacccagaagctttgtccctcagtcaccaggaag	37

[0159]

BRO2-hlgG4-S228P-L445P HC	gaagtgacgctggtgcagtcctggcgcgaagtgaaaaaacctggcgcctcc gtgaaggtgtcctgcaaggctagcggctacacctttaccgactacaacatg gactgggtccgacagggccacaggacagggactcgagtggttcggcgacatc aaccccaactacgagagcaacggctacaaccagaagtccaagggcagagcc accatgacogtggacaagagcatcagcaccgctacatggaaactgagcagc ctgagaagcagaggaacacggcctgtactactgcgccagagaggatgatcac gacgctttgctcattggggccagggcacactggtcacogttagctctgct agcacaagggcccatcggctctccccctggcgcctgctccagggagcacc tccgagagcacagccgctgggctgctggtcaaggactacttccccgaa ccggtgacggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc tccccggtgctcactacagtcctcaggactcactcctcagcagcgtggtg accgtgcccctccagcagcttgggacagaaacacctacacctgcaacgtgat cacaagcccagcaacaccaaagtggaacaagagagtgagtcctcaaatatggt cccccatgcccaccatgcccagcaactgagttcctggggggaccatcagtc ttctgtttcccccaaaaacccaaggacactctcatgatctccggaccct gaggtcacgtgctggtggtggagcgtgagccaggaagaccccagggtccag ttcaactggtacgtggtggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagttcaacagcagctaccgtggtcagcgtcctcaccgtc ctgaccacaggaactggctgaacggcgaagaggtacaagtgcaaggttccccaac aaaggcctccgctcctccatcgagaaaaacctctccaagccaaagggcag ccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatgacc aagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagcttctaccaccagcagc atcgccgtggagtgaggagcaaatggcagccggagacaactacaagacc acgctcccgctgctggactccgacggctcctctctcctctacagcaggtcc accgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtctctcatgctccgtg atgcatgaggtctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtct ccgggtaaatgagtcctagctgg	40
BRO2-hlgG4-S228P-NH-L445P HC	gaagtgacgctggtgcagtcctggcgcgaagtgaaaaaacctggcgcctcc gtgaaggtgtcctgcaaggctagcggctacacctttaccgactacaacatg gactgggtccgacagggccacaggacagggactcgagtggttcggcgacatc aaccccaactacgagagcaacggctacaaccagaagtccaagggcagagcc accatgacogtggacaagagcatcagcaccgctacatggaaactgagcagc ctgagaagcagaggaacacggcctgtactactgcgccagagaggatgatcac gacgctttgctcattggggccagggcacactggtcacogttagctctgct agcacaagggcccatcggctctccccctggcgcctgctccagggagcacc tccgagagcacagccgctgggctgctggtcaaggactacttccccgaa ccggtgacggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacc tccccggtgctcactacagtcctcaggactcactcctcagcagcgtggtg accgtgcccctccagcagcttgggacagaaacacctacacctgcaacgtgat cacaagcccagcaacaccaaagtggaacaagagagtgagtcctcaaatatggt cccccatgcccaccatgcccagcaactgagttcctggggggaccatcagtc ttctgtttcccccaaaaacccaaggacactctcatgatctccggaccct gaggtcacgtgctggtggtggagcgtgagccaggaagaccccagggtccag ttcaactggtacgtggtggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagttcaacagcagctaccgtggtcagcgtcctcaccgtc ctgaccacaggaactggctgaacggcgaagaggtacaagtgcaaggttccccaac aaaggcctccgctcctccatcgagaaaaacctctccaagccaaagggcag ccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatgacc aagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagcttctaccaccagcagc atcgccgtggagtgaggagcaaatggcagccggagacaactacaagacc acgctcccgctgctggactccgacggctcctctctcctctacagcaggtcc accgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtctctcatgctccgtg atgcatgaggtctgaagttccactacacacagaagagcctctccctgtct ccgggtaaa	41
BRO2 LC	gacaacgtgctgacccagtcctcctgactcctggctgtgtctctggggcag agagccaccatctctggcggcctctaaagtcctgcccagcctccggctac aactacatgcaactggtatcagcagaagccggccagcccccaagctgctg atctactggcctccaacctgaagtccggcgtgcccagacagattctccggc tctggctctggcaccgactttaccctgaccatcagctccctgcaggccgag gatggcccaactactactgcccagcactccagagagctgcccctacaccttt ggccagggcaccagctggaaatcaagcggacccgtggcgcctcctccogt tcatcttccaccttccgacgagcagctgaagtctggcagcagcctccgtc gtgtcctgctgaacaacttctaccocccggagggccaaaggtgagtggaag gtggacaacggcctgagtcgggcaactcccaggaatccgtgaccgagcag gactccaaggaacagcactactcctgctcctccacctgaccctgtccaag gccgactacgagaagacaaaggtgtacgctgcaaggtgaccaccagggc ctgtctagcccctgacccaagcttccaacggggcggagtg	42

[0161]

[0162]

[0163]

[0164]

[0165]

[0166]

서열번호 35 및 39에, a217g는 N72D 돌연변이를 만든다.

본 발명은 더 나아가 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달 담체 또는 벡터를 제공한다. 유전자 전달 담체 또는 벡터는 플라스미드 또는 다른 박테리아 적으로 복제되는 핵산일 수 있다. 그러한 유전자 전달 담체 또는 벡터는 예를 들어, 생산자 세포로 쉽게 전달될 수 있다. 유전자 전달 담체는 바이러스 벡터일 수 있다. 바람직한 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터 (adenoviral vectors), 렌티바이러스 벡터 (lentiviral vectors), 아데노-연관된 바이러스 벡터 (adeno-associated viral vectors) 및 레트로바이러스 벡터 (retroviral vectors) 이다.

본 발명은 더 나아가 본 발명에 따른 한 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 어떤 실시 예에서, 단일 벡터는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH 및 VL도메인 둘 다를 암호화하는 단일 핵산 분자를 포함한다. 어떤 실시 예에서, 단일 벡터는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 (HC) 및 경쇄 (LC) 둘 다를 암호화하는 단일 핵산 분자를 포함한다.

어떤 실시 예에서, 첫 번째 벡터는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH 도메인을 암호화하는 첫 번째 핵산 분자를 포함하고, 및 두 번째 벡터는 VL 도메인을 암호화하는 두 번째 핵산 분자를 포함한다. 어떤 실시 예에서, 첫 번째 벡터는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄 (H

C)를 암호화하는 핵산 분자를 포함하고, 및 두 번째 벡터는 경쇄 (LC)를 암호화하는 두 번째 핵산 분자를 포함한다.

[0167] 본 발명에 따른 벡터는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 숙주 세포에서 발현하는데 사용하기 적절한 발현 벡터를 포함한다. 숙주 세포는 진핵 세포 또는 비진핵 세포가 될 수 있다.

[0168] 본 발명은 즉각적인 발명에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 한 분자의 핵산 분자 또는 복수의 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 다른 한편으로 또는 추가로, 본 발명은 즉각적인 발명에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 한 벡터 또는 복수의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 핵산 분자 또는 분자들은, 또는 비슷하게 벡터 또는 벡터들은, 예를 들어 및 제한 없이, 형질주입 (transduction), 형질 전환 (transformation), 형질감염 (transfection), 및 주사 (injection)를 포함하는 적절한 기술 어느 것을 사용하여 숙주 세포에 도입시킬 수 있다. 이런 방법들의 여러 가지 형태들, 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 칼슘 포스페이트 형질 감염 (calcium phosphate transfection), 리포펙션 (lipofection), 세포 압박 (cell squeezing), 초음파천공 (sonoporation), 광학적 형질감염 (optical transfection), 및 유전자 총 (gene gun)을 포함하는 형태들이 이 분야 기술에 잘 알려져 있다.

[0169] 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 진핵 세포다. 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 이스트 (yeast) 세포다. 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 곤충 세포다. 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 포유류 세포다. 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 인간 세포다. 어떤 실시 예에서, 숙주 세포는 하이브리도마 세포 (hybridoma cells), 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary) (CHO) 세포, NSO 세포, 인간 배아 신장 (human embryonic kidney) (HEK293) 세포, 및 PER.C6™ 세포로 구성된 군으로부터 선택된 포유류 세포다. 본 발명은 더 나아가 상기 언급된 것들에 추가하여 다른 숙주 세포도 고려한다. 숙주 세포는 더 나아가 본 발명에 따른 항체 및 이의 항원-결합 단편의 상업적 생산을 위하여 개발된 세포주들을 포함한다.

[0170] 핵산이 제공된 세포주는 연구실 또는 생산 공장에서 결합 분자/항체를 생산할 수 있다. 다른 한편으로, 핵산은 이를 필요로 하는 동물의 몸에 있는 세포에 전달되며 및 결합 분자/항체는 형질전환된 세포에 의해 생체 내에서 생산된다. 본 발명의 핵산 분자는 결합 분자를 세포 내에서 발현시키기 위하여 전형적으로 조절 서열과 함께 제공된다. 그러나 오늘날의 동종 재조합 기술 (homologous recombination techniques)은 훨씬 더 효과적으로 되어왔다. 이 기술들은 예를 들어, 부위-특이적인 이중 가닥 브레이크를 유도하는 TALEN 과 같은 뉴클레아제 (nuclease)를 사용하여 이중 가닥 브레이크 도움의 동종 재조합이 관여한다. 그러한 또는 유사한 동종 재조합 시스템은 핵산 분자를 하나 또는 그 이상의 시스로 (*in cis*) 필요로 하는 조절 서열을 제공하는 부위에 삽입할 수 있다.

[0171] 본 발명은 더 나아가 본 발명에 따른 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 분리된 또는 재조합된 세포, 또는 시험관 내 세포 배양된 세포를 제공한다. 본 발명은 더 나아가 본 발명에 따른 결합 분자를 포함하는 분리된 또는 재조합된 세포, 또는 시험관 내 세포 배양된 세포를 제공한다. 바람직하게는 상기 세포는 상기 결합 분자를 생산한다. 어떤 실시 예에서, 상기 세포는 상기 결합 분자를 분비한다. 바람직한 실시 예에서 상기 세포는 하이브리도마 세포 (hybridoma cell), CHO 세포, NSO 세포, HEK293 세포, 또는 PER-C6™ 세포이다. 특정한 바람직한 실시 예에서 상기 세포는 CHO 세포다. 더 나아가 제공되는 것은 본 발명에 따른 세포를 포함하는 세포 배양이다. 다양한 기관 및 회사에서, 예를 들어 임상적 사용을 위하여, 항체의 대규모 생산을 위해 세포주를 개발하였다. 그러한 세포주의 비-제한적인 예들은 CHO 세포, NSO 세포 또는 PER.C6™ 이다. 이 세포들은 또한 단백질 생산과 같은 다른 목적을 위하여도 사용된다. 단백질 및 항체의 산업적 규모의 생산을 위하여 개발된 세포주는 더 나아가 여기서 산업용 세포주라고 불린다. 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자, 결합 분자 및/또는 항체를 포함하는 산업용 세포주를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 결합 분자 또는 항체를 포함하는 단백질 및/또는 항체의 대규모 생산을 위해 개발된 세포주를 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 결합 분자 및/또는 항체의 대규모 생산을 위해 개발된 세포주의 용도를 제공한다.

[0172] **항체 제작 방법 (Methods of Making Antibodies)**

[0173] 본 발명은 더 나아가, 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건하에서 본 발명에 따른 숙주 세포 집단의 배양을 포함하는, 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제작하는 방법을 제공한다. 어떤 실시 예에서, 그 방법은 더 나아가 상기 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 배양액으로부터 수확하는 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 세포는 무-혈청 배지에서 배양된다. 바람직하게, 상기 세포는 부유 성장 (suspension growth)에 적응하게 한다. 더 나아가 제공되는 것은 본 발명에 따른 항체를 생산하

는 방법에 의해 얻을 수 있는 항체이다. 항체는 바람직하게 배양 배지로부터 정제된다. 바람직하게 상기 항체는 친화력으로 정제된 것이다.

[0174] **사용 방법 (Methods of Use)**

[0175] 본 발명의 한 관점은 대상체에서 고전적인 또는 렉틴 경로의 활성화를 억제하는 방법으로, 이를 필요로하는 대상체에게 효과적인 양의 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 실시 예에서, 대상체는 포유류이다. 어떤 실시 예에서, 대상체는 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 햄스터 (hamster), 기니피그 (Guinea pig), 토끼 (rabbit), 염소 (goat), 양 (sheep), 돼지 (pig), 고양이 (cat), 개 (dog), 말 (horse), 또는 소 (cow) 이다. 어떤 실시 예에서, 대상체는 비-인간 영장류, 예를 들어, 원숭이이다. 어떤 실시 예에서, 대상체는 인간이다.

[0176] 항체 또는 항원-결합 단편의 억제적 효과는, 예를 들어, 총 보체 활성 (total complement activity) 측정, 혈청 샘플에서 항-양 항체 (anti-sheep antibodies) 로 코팅된 양의 적혈구를 용해하는 능력에 근거한 용혈 활성 검사를 포함하는, 임의의 적절한 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 처리하지 않은 대조군 샘플에 비교하여 감소된 용혈은 항체 또는 항원-결합 단편의 억제적 효과를 제시한다. 한 실시 예에서, 처리하지 않은 대조군 샘플은 항체 또는 항원-결합 단편으로 처치를 시작하기 전에 얻은 역사적 샘플이 될 수 있다. 일반적으로, 대조군에 비교하여 적어도 5%의 총 보체 활성의 감소는 효력이 있음을 제시한다. 어떤 실시 예에서, 대조군에 비교하여 적어도 10%의 총 보체 활성의 감소는 효력이 있음을 제시한다.

[0177] 본 발명에 따른 방법 또는 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 의해 처치되거나 또는 예방될 수 있는 질병은 실험적 알레르기성 신경염 (experimental allergic neuritis) 과 같은 자가면역 질환들, 타입-II 콜라겐-유도된 관절염 (type II collagen-induced arthritis), 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 용혈성 빈혈 (hemolytic anemia), 사구체신염 (glomerulonephritis), 특발성 막성 신장병(idiopathic membranous nephropathy), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus), 면역-복합체-유도된 맥관염 (immune complex-induced vasculitis), 성인 호흡 장애 증후군 (adult respiratory distress syndrome), 스트로크 (stroke), 이종 기관이식 (xenotransplantation), 동종이식 (allograft transplantation), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 화상 (burn injuries), 체외 투석 및 혈액 산소 공급 (extracorporeal dialysis and blood oxygenation), 패혈증 및 패혈성 쇼크를 포함하는 염증성 장애 (inflammatory disorders), 사이토카인 또는 mAbs의 투여에 의해 유도되는 독성, 신장 동종이식과 같은 동종이식의 항체-매개하는 거부, 다발성 상해 (multiple trauma), 허혈 재관류 손상 (ischemia-reperfusion injuries), 및 심근 경색(myocardial infarction)이다.

[0178] 보체-매개하는 상해 또는 그러한 보체-매개하는 상해가 전개될 위험이 관련된 질환으로부터 고통을 받고 있는 개인은 이를 필요로하는 개인에게 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 효과적인 양을 투여하여 치료할 수 있다. 이로써 생물학적으로 활성인 보체-유래 펩티드는 개체에서 감소 되고 및 보체의 세포 및 조직에 대한 용해 및 다른 상해 효과가 약화 되거나 또는 예방된다. "효과적인 양 (effective amount)" 이란 바람직한 생물학적 반응을 달성하기에 충분한 양을 의미한다. 한 실시 예에서, "효과적인 양"이란 개인에서 보체 활성화를 억제할 수 있는 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양을 의미한다.

[0179] 처치는 (예방적 또는 치료적) 일반적으로 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 비 경구적으로 약학적 담체와 함께, 예를 들어, 정맥으로, 피하로, 또는 국부적으로 투여하는 것으로 구성될 것이다. 투여는 전형적으로 주사 또는 주입으로 성취될 수 있다. 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용량 및 투여 용법은 목표로 하는 보체 활성화 억제의 정도에 의존할 것이다. 전형적으로, 본 발명의 단일클론 항체를 위하여, 그 양은 kg 몸무게당 2 에서 20mg의 범위에 있을 것이다. 비 경구 투여를 위하여, 본 발명에 따른 단일클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 약학적으로 허용할 만한 비 경구 담체와 조합하여 주사할 수 있는 형태로 제형화 될 것이다. 그러한 담체는 이 분야 기술에서 잘 알려졌으며 및 예시에는 생리 식염수 (saline), 덱스트로즈 용액 (dextrose solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 및 소량의 인간 혈청 알부민을 포함하는 용액이 포함된다.

[0180] 약학적 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건하에서 멸균되고 및 안정적이어야만 한다. 조성물은 용액으로, 마이크로-에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 적용될 수 있는 적절한 수용성 및 비-수용성 담체의 예시에는 물, 에탄올, 폴리올(polyols) ((글리세롤 (glycerol), 프로필렌 글라이콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글라이콜 (polyethylene glycol), 및 이와 유사한 것과 같은)), 및 이의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트

(ethyl oleate)와 같은 주사 가능한 유기 에스터 (organic esters)가 포함된다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴 (lecithin)과 같은 코팅 재료의 사용으로, 분산의 경우 요구되는 입자 크기의 유지로, 및 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다.

- [0181] 약학적 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 아주벤트를 함유할 수 있다. 미생물의 존재를 예방하는 것은 멸균과정과 여러 가지 항 박테리아제 및 항곰팡이 제제, 예를 들어, 파라벤(paraben), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르빅 에시드(sorbic acid), 및 이와 같은 것들을 포함 시켜 확실하게 할 수 있다. 이는 또한 설탕, 만니톨 (mannitol), 소르비톨 (sorbitol), 글리세롤 (glycerol) 과 같은 폴리알코올 (polyalcohols) 또는 소듐 클로라이드 (sodium chloride)와 같은 등장액 제제들을 포함하는 것도 바람직할 수 있다. 약학적으로-허용할 만한 항산화제 (antioxidants)도 또한 포함될 수 있다, 예를 들어, (1) 아스코르빅 에시드 (ascorbic acid), 시스테인 하이드로클로라이드 (cysteine hydrochloride), 소듐 바이설파이트 (sodium bisulfate), 소듐 메타바이설파이트(sodium metabisulfite), 소듐 설파이트(sodium sulfite), 및 이와 같은 것과 같은, 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트 (ascorbyl palmitate), 부틸레이티드 하이드록시아니솔 (butylated hydroxyanisole) (BHA), 부틸레이티드 하이드록시톨루엔 (butylated hydroxytoluene) (BHT), 레시틴 (lecithin), 프로필 갈레이트(propyl gallate), 알파-토코페롤(alpha-tocopherol), 및 이와 유사한 것과 같은, 오일-용해성 항산화제 (oil-soluble antioxidants), 및 (3) 구연산(citric acid), 에틸렌디아민 테트라아세트 에시드 (ethylenediamine tetraacetic acid) (EDTA), 소르비톨(sorbitol), 주석산 (tartaric acid), 인산 (phosphoric acid), 및 이와 유사한 것과 같은 금속 킬레이팅 제제 (metal chelating agents).
- [0182] 멸균된 주사 가능한 용액은 mAb 또는 이의 단편을 필요로하는 양으로 적절한 용매에, 예를 들어, 상기 열거한 대로, 하나 또는 조합의 성분을 필요한 대로 함께 병합하고, 이어서 멸균 마이크로여과 (sterilization microfiltration)로 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산은 기본 분산 배지 및 필요로 하는 다른 성분, 예를 들어 상기 열거한 것로부터 성분을 함유하는 멸균 담체에 활성 성분을 병합시켜 제조한다. 멸균된 주사 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 플러스 이전에 멸균-여과된 이의 용액으로부터 임의의 추가의 바람직한 성분의 분말을 만들게 하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.
- [0183] 주사 가능한 항-C2 mAbs 또는 이의 단편의 지속적인 흡수는 조성물에 흡수를 지연하는 제제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 (monostearate salts) 및 젤라틴 (gelatin) 을 포함시켜 가져올 수 있다.
- [0184] mAb 및 이의 단편은, 임플란트, 피부 경유 패치 (transdermal patches), 및 마이크로캡슐에 쌓인 전달 시스템을 포함하는, 조절된 방출 제형과 같은, 빠른 방출에 대항하여 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트 (ethylene vinyl acetate), 폴리안하이드라이드 (polysaccharides), 폴리글라이콜릭 에시드 (polyglycolic acid), 콜라겐(collagen), 폴리ortho에스터 (polyorthoesters), 및 폴리락틱 에시드 (polylactic acid) 와 같은, 생체분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 그러한 제형의 제조 방법은 일반적으로 이 분야 기술의 전문가에게 알려졌다. 지효성 및 조절성 약물 전달 시스템 (Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978) 참조.
- [0185] 약학적 조성물은 이 분야 기술에서 알려진 의학적 장치로 투여될 수 있다.
- [0186] 복용법은 최적의 바람직한 반응 (예를 들어, 치료적 반응)을 제공하기 위하여 조절된다. 예를 들어, 단일 일회 분 용량이 투여될 수 있으며, 몇 번의 나누어진 용량을 시간에 걸쳐서 투여될 수 있으며, 또는 용량은 치료적 상황의 긴급성에 의해 제시된대로 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다
- [0187] 현 발명의 약학적 조성물에 있는 mAbs 또는 이의 단편의 실제의 용량 수준은 특정한 환자에서 환자에게 독성이 없이 바람직한 치료적 반응을 달성하기에 효과적인 활성적인 성분의 양을 얻기 위하여 가변적일 수 있다.
- [0188] 한 실시 예에서, 본 발명에 따른 단일클론 항체는 200 에서부터 400mg/m²에서와 같은, 일주일마다 10에서부터 500mg/m²의 용량으로 주입으로 투여될 수 있다. 그러한 투여는, 예를 들어, 3에서 5번과 같은, 1 에서 8번 반복될 수 있다. 투여는 2에서 12시간과 같은, 2에서 24시간의 기간에 걸쳐 연속적인 주입으로 수행될 수 있다.
- [0189] 또한, 다른 실시 예에서, mAbs 또는 이의 단편 또는 이 발명에서 공개된 임의의 다른 결합 분자들은, 예를 들어, 6개월 또는 그 이상 기간에 일주일에 한번과 같은, 유지 치료로서 투여될 수 있다.
- [0190] 현 발명은 지금 특히 유리한 실시 예로 제시된, 하기의 예시를 참조로 제시될 것이다. 그러나 이들 실시 예는 단지 예시적일 뿐이고 및 본 발명을 어느 방법으로나 제한하려는 것으로 해석되어서는 아니라는 것을 주목하여야 한다.

[0191] 실시 예시
 [0192] 실시 예시 1: 항-C2b 단일클론 항체로부터 당화 부위(Glycosylation Site) 제거

[0193] BR02-glyc-IgG4

[0194] 미국 특허 번호 9,944,717는 쥐의 억제적 항-C2b 단일클론 항체(mAb)를 공개한다. 이 리드 (lead)로 부터, 다른 중쇄 가변 도메인 (VH1, VH2, VH3, 또는 VH4) 및 카파 경쇄 가변 도메인(VK1, VK2, VK3, 또는 VK4)을 포함하는, 4개의 인간화된 변이체가 안티토프 회사 (Antitope Ltd) (Cambridge, UK)의 합성물 인간 항체 기술 (Composite Human Antibody technology)을 사용하여 생성되었다. 가상 환경 (*in silico*) 분석에 근거하여, 각 인간화된 VH 및 VK 서열의 면역성 위험이 예측되었다. 표 7에서 보여준 대로, VH4가 VK3 또는 VK4와 쌍을 이룰 때, 가장 가까운 인간 생식계열 변이체에 가장 높은 퍼센트 상동성과 함께, 가장 낮은 면역성 위험이 예측되었다. 이 관찰은 인간 MHC 클래스 II에 대한 잡다한 결합 펩티드의 수가 가장 낮은 것에 근거한다. 가장 가까운 인간 생식계열에 대하여 VH4가 더 높은 퍼센트 상동성을 가지므로 VH4가 바람직하다. 추가로, 결합 및 효능에 근거하여, VH4/VK3가 항-인간 C2b 인간화 리드 항체로서 선택되었으며 및 여기서 BR02-glyc-IgG4로서 언급된다.

[0195] 표 7. 1 (=가장 낮음) 에서 5 (=가장 높음) (높은 친화력 우선권 대비 중간정도 친화력) 등급의 면역성 위험도 및 가장 가까운 인간 생식계열에 대한 서열 상동성

VH	높은 친화력 (High Affinity)	중등 친화력 (Moderate Affinity)	등급 (Ranking)	IGHV1-8*01에 대한 상동성	VL	높은 친화력 (High Affinity)	중등 친화력 (Moderate Affinity)	등급 (Ranking)	IGKV4-1*01에 대한 상동성
WT	1	2	5	79.3%	WT	6	5	5	80.0%
VH1	0	3	4	86.2%	VK1	3	3	3	92.5%
VH2	0	2	1	90.8%	VK2	3	3	3	95.0%
VH3	0	2	1	93.1%	VK3	3	2	1	96.3%
VH4	0	2	1	95.4%	VK4	3	2	1	97.5%

[0196]
 [0197] BR02-glyc-IgG4 변이체의 SDS-PAGE 분석은 이중 밴드를 보였으며 및 VH3 및 VH4 변이체에서 밴드 이동을 보였다. 이 이동은 VH3 및 VH4의 프레임 워크 부위 3 (FR3)에서 잔기 72-74 (카벳 번호 매김)의 잠재적인 당화 부위 (NXS 모티브)로부터 일어난다고 가정된다. 이 잠재적인 당화 부위는 포유류 세포주로부터 발현되는 항체 생산물에 이질성의 결과를 가져오는 물론이고, 항체 기능의 이질성을 가져올 수 있으므로, 이 잠재적인 당화 부위는 제거되었다. 이 당화 부위는 부위- 특이적인 돌연변이화 (site-directed mutagenesis)로 제거되어 VH에 N72D 변이체를 생성하였으며, 이는 여기서 VH3.2 또는 VH4.2로서 언급된다. N72D 돌연변이는 VH3 및 VH4에서 관찰된 변화된 밴드 패턴 (도 1) 을 제거하였으며, 이중 밴드 및 밴드 이동은 중쇄에서 당화 및 이질성에 의해 원인이 됨이 확인되었다.

[0198] BR02-glyc-IgG4와 같은 VH 이나 FR3에 당화 부위가 없는, 변이체 VH4.2, 가 이질적으로 당화된 모체 mAb BR02-glyc-IgG4에 비교하여 개선된 특성을 보이는지 결정하기 위하여, 각 항체의 열 내성을 측정하였다.

[0199] 열 내성을 검사하기 위하여, 인간화된 변이체를 터머사이클러 (Thermocycler)(Biometra)로 55° C 에서 75° C 까지 온도를 증가시키면서 처치하였다. 잔기 결합 능력은 혈청에서부터 분리한 인간 C2 (3500 RU, Complement Technologies Cat#A112, lot#20) 로 직접적으로 코팅된 CM5 칩에서 비아코아 3000 (Biacore 3000) 에서 분석되었다. 데이터는 BIA 평가 소프트웨어 (BIAevaluation software)를 사용하여 분석되었다. 각 변이체의 특이 결합의 기울기는 BIA 평가 소프트웨어, 센서 그램 (sensorgram) (주사 후 5초에 시작하고 및 11초 후에 멈춤)의 선상으로부터 일반적인 맞춤으로 결정되었다. 그 후 59° C, 56.9° C, 55° C 및 4° C 온도에서 얻은 기울기의 평균을 100% 활성으로 사용하여 활성의 퍼센트가 계산되었다. 최종으로, 활성 퍼센트는 반응, 가변 기울기 (4 계수) 대비하여 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism) (로그 아고니스트) (Log agonist)에 플롯 되었다. 항체가 이의 결합 능력을 50% 잃은 온도 (TM50)가 하기 표 8에 보여준다.

[0200] BR02-IgG4

[0201] BR02-glyc-IgG4에 존재하는 당화 부위가 없는 변이체 둘 다에서 개선된 열 내성을 보였다 (표 8). BR02-glyc-IgG4 는 TM50가 64.0 ° C임을 보여 주었다. VH4.2/VK3 (여기서 BR02-IgG4로서 또한 언급된다)는 두 번의 독립적인 실험에서 TM50가 65.0 또는 65.1 ° C임을 보여주었다. VH4.2/VK4는 두 번의 독립적인 실험에서 TM50가

65.2 또는 65.4 ° C임을 보여주었다.

[0202] 표 8. 항-C2 단일클론 항체들의 인간 생식라인 서열에 가장 가까운 퍼센트 상동성 및 열 내성

	BRO2-glyc-IgG4	VH4.2/VK3 (BRO2-IgG4)	VH4.2/VK4
인간 생식라인 서열에 가장 가까운 퍼센트 상동성 (% Identity to closest human germline sequences)	95.8	95.3	95.9
인간 생식라인 서열에 가장 가까운 호모로지 (Homology to closest human germline sequences)	97.0	97.0	97.6
열 내성 (Thermotolerance)(TM50, °C)	64.0	65.0; 65.1	65.2; 65.4

[0203]

[0204] 실시 예시 2: 비-당화된 IgG4 및 비-당화된 IgG1 변이체의 제조

[0205]

BRO2-IgG4-NH

[0206]

pH-의존성 항원 결합을 가진 항체들은 세포로 내부화된 후에 산성 엔도솜 (acidic endosomes) 에서 결합된 항원을 분리한다. 따라서, 방출된 항원은 라이소좀 (lysosome)으로 이동되고 및 분해되며, 반면에 항원이 없는, 해리된 항체는 FcRn에 의해 혈장으로 도로 재활용된다. 재활용된 유리 항체 (free antibody)는 다른 타겟 항원에 결합할 수 있다. 이 사이클을 반복하면서, pH-의존성 항원-결합 항체는 타겟 항원에 한번 이상 결합할 수 있으며 및 그러므로 항체의 중화하는 능력을 개선한다. 더 나아가 항체가 중성 pH (pH 7.4)가 아닌 산성 엔도솜 pH (pH 6.0) 에서 FcRc에 결합하는 것을 증강시키는 NHance® (NH) 기술 (argenx, Belgium)로 항체가 장치되었을 때 이 과정은 개선될 수 있다. 그러므로 BRO2-IgG4의 Fc 부위에 있는 아미노산은 pH-의존적인 FcRn 결합이 변경되도록 돌연변이 시켰다 (H433K, N434F). 결과의 항체는 여기서 BRO2-IgG4-NH로서 언급된다.

[0207]

BRO2-IgG1-NH 및

[0208]

BRO2-IgG1-LALA-NH (ARGX-117)

[0209]

효능에 대한 면역글로불린 서브클래스의 효과가 또한 조사되었다. 더 나아가 NHance® 변이체가 인간 IgG1 배경 (BRO2-IgG1-NH)에서 제조되었다. 항체 효능제 기능은 더 나아가 항체의 Fcγ 수용체에의 결합을 변경하는 Fc 부위의 돌연변이로 감소시킬 수 있다. 그러므로 아미노산 치환 L 234A 및 L 235A ("LA")는 BRO2-IgG1-NH로 병합되어 BRO2-IgG1-LA-NH가 생산되고, 여기서 또한 ARGX-117로서 언급된다.

[0210]

His1-IgG1-LALA-NH

[0211]

생체 내에서 약동학 및 약력학 (pharmacokinetic and pharmacodynamic) (PK/PD) 효과를 연장하기 위하여 만약 BRO2-IgG1-LALA-NH의 pH 의존성이 개선될 수 있는지를 결정하기 위하여, BRO2-IgG1-LALA-NH 항체의 VK에 있는 아미노산을 히스티딘으로 돌연변이 시켰다 (G29H, 돌연변이VK는 여기서 Vk3m3으로서 언급된다). 결과로 얻어진 항체는 여기서 His1-IgG1-LALA-NH로서 언급된다.

[0212]

His1-IgG4

[0213]

비슷하게, 생체 내에서 PK/PD 효과를 연장하기 위하여 만약 BRO2-IgG4의 pH 의존성이 개선될 수 있는지를 결정하기 위하여, BRO2-IgG4 항체의 VK에 있는 아미노산을 히스티딘으로 돌연변이 시켰다 (G29H, 돌연변이VK는 여기서 Vk3m3으로서 언급된다). 결과로 얻어진 항체는 (VH4.2/Vk3m3)는 여기서 His1-IgG4로서 언급된다.

[0214]

His1-IgG4-NH

[0215]

항체 효능에서의 재활용 효과를 조사하기 위하여, NHance® 돌연변이가 His1-IgG4 (VH4.2/Vk3m3) 항체에 병합되었다. 결과로 얻어진 항체는 여기서 His1-IgG4-NH로서 언급된다.

[0216]

His2-IgG4-NH

[0217]

생체 내에서 PK/PD 효과를 연장하기 위하여 만약 BRO2-IgG4-NH의 pH 의존성이 개선될 수 있는지를 결정하기 위하여, BRO2-IgG4-NH 항체의 VH4에 있는 아미노산을 히스티딘으로 돌연변이 시켰다 (K26H, VH 돌연변이는 여기서

VH4.2m12로서 언급된다). 추가로, BRO2-IgG4-NH 항체의 VK 3경쇄는 상기 언급된 VK4 경쇄로 대체시켰으며, 두 번째 아미노산은 히스티딘으로 돌연변이 시켰다. (G29H, VK4 돌연변이는 VK4m3로서 언급된다). 결과로 얻어진 항체 (VH4.2m12/VK4m3)는 여기서 His2-IgG4-NH로서 언급된다.

[0218] 실시 예시 3: 비-당화된 BRO2 변이체에서 효능 개선

[0219] 총 약동학 (PK)

[0220] 시아노몰구스 원숭이 (Cynomolgus monkeys) (n=2, 그룹 당 1 남성 및 1 여성)를 하기 표 9에 따라 별개의 처치 그룹으로 임의적으로 지정했다.

[0221] 표 9. 처치 그룹 지정

그룹	항체	동물번호
1	BRO2 glyc-IgG4	1
		2
2	Negative Control	3
		4
3	BRO2-IgG4	5
		6
4	BRO2-IgG4-NH	7
		8
5	BRO2-IgG1-LALA-NH	9
		10
6	His1-IgG4	11
		12
7	His1-IgG4-NH	13
		14
8	His1-IgG1-LALA-NH	15
		16
9	His2-IgG4-NH	17
		18

[0222]

[0223] 혈청 샘플은 검사 항체를 받기 하루 전에 ((-1일, 또는 "전 (PRE)") 각 원숭이로부터 얻었다. 그 후, 1일에 (d1), 각 원숭이는 표 9에 따라 5mg/kg의 검사 항체를 단일 정맥주사로 받았다. 혈청 샘플은 그 후 각 원숭이로부터 연속적으로 60일에 걸쳐서 (d60 까지) 얻었다.

[0224]

총 항체의 PK (총 PK)를 위하여, 마이크로타이터 플레이트 (microtiter plate)를 5 µg/mL 농도의 100 µL의 염소 항-인간 IgG (Bethyl; A80-319A)로 하룻밤 동안 4° C에서 코팅시켰다. 플레이트는 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 3번 세척하였으며 및 이어서 200 µL PBS-2% BSA로 실온(RT)에서 2시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 3번 세척한 후에, 혈청 샘플, 표준 및 QC 샘플들은 ((합친 자연 시아노몰구스 원숭이 혈청 (pooled naive cynomolgus monkey serum)에 제조))복수로 100-배 또는 그 이상의 희석으로 적용하였으며 및 100 µL PBS-0.2% BSA-1% 합친 자연 시아노몰구스 원숭이 혈청에 희석시켰다. 각 항체를 위해, 자체의 동결된 표준 및 QC 샘플은 복수로 적용되었다 (원숭이에 주사된 배치와 똑같은 배치의 항체가 사용되었다). 음성 대조군 항체는 비-C2 보체 성분에 결합하는 항체이다. 배양은 플레이트를 흔들면서 RT에서 2시간 동안 수행되었다. 플레이트를 적어도 200 µL PBS-0.05% Tween 20으로 5번 세척한 후에, 100 µL의 호스레디쉬 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase) (HRP)-라벨 된 생쥐 항-인간 IgG 카파 ((Southern Biotech, 9230-05) 를 PBS 0.2% BSA에 260,000-배 희석시키고 및 각 웰에 1시간 동안 실온에서 적용하였다. 플레이트는 적어도 200 µL PBS-0.05% Tween 20으로 5번 세척시켰고 및 염색은 100 µL의 3,3',5,5'-테트라 메틸 벤지딘 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)(TMB)으로 수행하였으며 및 10분 후에 100 µL의 0.5 M H₂SO₄ (CHEM LAB, Cat#CL05-2615-1000) 로 정지시켰다. OD는 450nm에서 측정하였으며 및 그래패드 프리즘 (GraphPad Prism)이 샘플의 농도를 거꾸로 계산하기 (back calculate)위하여 (각각은 그 자체의 표준을 사용) 사용되었다.

[0225]

결과는 표 10에 보여주며 및 당화된 BRO2-glyc-IgG4와 비-당화된 BRO2-IgG4의 비교는 도 2에서 보여준다. 총 PK 에세이에서, 비-당화된 BRO2-IgG4의 농도는 당화된 BRO2-glyc-IgG4의 농도보다 일반적으로 더 크다. 총 PK에서

의 이러한 개선은 완전히 기대하지 않은 것이며 및 비-당화된 항체의 중요한 더 나아간 장점을 대표한다.

표 10. 총PK

	총 PK (µg/mL)							
	BRO2-glyc-IgG4				BRO2-IgG4			
	원숭이 1	원숭이 2	평균 M±M2	표준편차 (Std. Dev)	원숭이 5	원숭이 6	평균 M±M2	표준편차 (Std. Dev)
15 분	107.1	99.9	103.4	5.3	167.0	166.7	162.5	5.6
1 h	103.9	99.9	102.2	1.7	172.9	158.4	168.1	13.3
2 h	95.4	89.0	94.8	2.8	151.1	150.9	147.6	3.8
4 h	91.4	92.2	90.0	2.5	134.6	132.3	132.7	1.2
6 h	86.5	86.0	85.4	1.6	134.3	128.9	133.6	5.5
24 h	56.1	55.5	58.3	1.2	99.6	97.6	85.9	1.9
Day 2	47.9	47.2	47.3	0.6	77.6	78.3	68.7	9.3
Day 4	34.8	39.8	34.1	2.7	58.4	55.8	60.8	4.8
Day 7	26.6	25.1	26.0	0.6	41.5	33.6	34.9	7.6
Day 11	16.3	14.1	16.2	1.3	28.1	20.9	24.5	5.1
Day 15	9.8	8.1	9.3	0.9	18.1	11.2	13.0	5.1
Day 19	6.7	5.1	6.5	1.1	12.8	6.5	8.3	2.5
Day 23	4.4	3.2	4.4	0.8	9.8	4.3	7.1	3.9
Day 27	3.2	1.9	3.1	0.7	6.5	2.2	3.9	3.0
Day 31	2.2	1.5	2.3	0.4	4.7	1.0	2.9	2.6

유리 C2 (free C2)

시아노몰구스 원숭이 (Cynomolgus monkeys) (n=2, 그룹당 1 남성 및 1 여성)는 상기 서술된 대로, 5mg/kg의 검사 항체를 단일 정맥 주사로 받았다.

이 에세이에서, 마이크로타이터 플레이트는 100 µL 2.5 µg/mL의 생쥐 항-인간 C2 단일클론 항체 mAb32를(항-C2 #32 m-IgG @ 3.31 mg/mL, 0.2 µm PBS, LC-12/05-166, 12-apr-13) 를 하룻밤 동안 4° C에서 코팅시켰다. 이 항체는 BRO2보다는 C2의 다른 에피토프에 결합한다. 플레이트는 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 3번 세척시켰으며 및 이어서 200 µL PBS-2% BSA (pH 7.4)로 RT에서 2시간 동안 차단시켰다. 그러는 동안에, 샘플, 냉동된 표준 (각 항체에 특이적이고, 합친 자연 시아노몰구스 원숭이 혈청에 제조) 및 냉동 QC 샘플은 (합친 자연 시아노몰구스 원숭이 혈청에 제조) 녹이고 및 80 µL PBS-0.2% BSA에 6.7-배 희석시켰다. 40 µL의 바이오티닐화된 항-C2 VH4/VK3 (biotinylated anti-C2 VH4/VK3)를 0.6 µg/mL로 첨가시켰다. 각 샘플은 복수로 만들었다. 바이오티닐화된 항체 첨가 후 세척시킨 코팅된 플레이트로 100 µL의 혼합물을 즉시 옮겼다. 플레이트는 RT에서 2시간 동안 배양시키고, 적어도 200 µL PBS-0.02% Tween 20으로 5번 세척시키고, 및 100 µL strep-HRP (Jackson, 016-030-084) 를 PBS-0.2% BSA에 300,000-배 희석시켜 첨가시켰다. RT에서 1시간 배양한 후, 플레이트는 적어도 200 µL PBS-0.05% Tween 20으로 5번 세척시키고 및 염색은 100 µL TMB (Calbiochem, CL07)로 수행 하였으며 및 10분 후에 100 µL의 0.5 M H₂SO₄ (CHEM LAB, Cat#CL05-2615-1000) 로 정지시켰다. OD는 450nm에서 측정하였으며 및 C2 수준을 결정하는데 사용되었다.

하기의 원숭이로부터의 혈청은 먼저 다른 날에 수행된 유리 C2 에세이를 사용하여 함께 검사 되었다: 원숭이 1 및 2; 원숭이 3 및 4; 원숭이 5 및 6; 원숭이 7, 8, 9, 및 10; 원숭이 11, 12, 15, 및 16; 및 원숭이 13, 14, 17, 및 18.

모든 원숭이에 대한 유리 C2의 수준이 도 3A-3I 및 표 11에 보여준다.

예측한 대로, 원숭이 3 및 4는 음성 대조군 항체로 투여되었으므로, 이들 원숭이 3 및 4에서는 유리 C2의 감소는 보이지 않았다. BRO2 변이체로 처리된 모든 원숭이에서, 유리 C2 수준은 2일 후 까지 매우 낮았다.

BRO2-glyc-IgG4를 받은 원숭이 (원숭이 1 및 2) 및 BRO2-IgG4를 받은 원숭이 (원숭이 5 및 6) 에서, C2 수준은 4일째를 시작으로 올라왔으며 및 31일에는 다시 베이스라인 수준으로 돌아갔다. 비-당화된 항체로 처리된, 원숭이 5 및 6은, BRO2-glyc-IgG4로 처리된 것보다 더 낮은 유리 C2 수준을 일정하게 보여준다 (도 3C, 표 11).

항-약물 항체로 처리된 것 (ADA, 도 3D-3I에서 *로 표시) 을 제외하고, 다른 모든 원숭이에서, C2 수준은 훨씬 더 천천히 증가 되었으며, 및 C2 수준은 31일까지에도 베이스라인으로 되돌아오지 않았다.

도 4는 각 그룹의 두 원숭이의 평균 유리 C2 수준 (OD 450nm) 의 확대 (로그 스케일) 를 보여준다. 유리 C2 수준은 His 변이체에서보다 BRO2 변이체에서 더 낮았다.

BRO2-IgG1-LALA-NH (ARGX-117) 로 주사된, 원숭이 10은, 검사된 모든 시간 포인트에서 가장 낮은 C2 수준을 가졌다. 원숭이 5 및 6, 9 및 10, 및 15 및 16으로부터의 유리 C2 수준의 비교는 60일까지 도 5에서 볼 수 있다.

원숭이 10은 또한 가장 좋은 총 PK를 가졌다 (상기 참조). 가공하지 않은 데이터는 표 11에 보여주며, 및 당화된 및 비-당화된 변이체를 비교하는 평균 데이터는 표 12에 보여준다.

[0238] 표 11. 모든 항체에 대한 유리 C2 (OD450nm)

시간포인트 (Time Point)	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12	M 13	M 14	M 15	M 16	M 17	M 18
Day -5	0.773	0.770	0.797	0.930	0.696	0.705	0.439	0.532	0.602	0.626	0.656	0.643	0.824	0.805	0.756	0.755	0.789	0.935
Day 0	0.707	0.716	0.813	0.907	0.740	0.657	0.507	0.531	0.578	0.604	0.620	0.667	0.847	0.792	0.772	0.750	0.834	1.043
15 m	0.031	0.028	0.879	0.979	0.016	0.018	0.016	0.014	0.015	0.013	0.029	0.033	0.032	0.036	0.033	0.028	0.050	0.055
1 h	0.033	0.028	0.914	1.055	0.017	0.021	0.014	0.013	0.014	0.013	0.030	0.033	0.035	0.037	0.034	0.031	0.050	0.062
2 h	0.034	0.030	0.874	0.997	0.018	0.020	0.016	0.014	0.015	0.015	0.031	0.031	0.034	0.043	0.034	0.030	0.052	0.063
4 h	0.033	0.027	0.887	1.000	0.017	0.020	0.017	0.015	0.016	0.016	0.037	0.034	0.036	0.044	0.037	0.032	0.054	0.062
6h	0.034	0.030	0.958	1.035	0.015	0.019	0.015	0.014	0.015	0.017	0.032	0.034	0.035	0.043	0.034	0.034	0.052	0.071
Day 1	0.046	0.045	0.917	0.923	0.021	0.025	0.019	0.018	0.020	0.020	0.041	0.038	0.046	0.054	0.048	0.044	0.064	0.084
Day 2	0.060	0.061	0.872	0.920	0.027	0.030	0.021	0.018	0.023	0.022	0.075	0.040	0.050	0.052	0.053	0.043	0.068	0.090
Day 4	0.125	0.102	0.833	0.886	0.037	0.048	0.026	0.021	0.035	0.024	0.088	0.056	0.063	0.064	0.056	0.055	0.080	0.096
Day 7	0.174	0.169	0.853	0.899	0.072	0.110	0.033	0.025	0.050	0.028	0.119	0.085	0.075	0.075	0.070	0.071	0.080	0.099
Day 11	0.257	0.265	0.862	0.847	0.127	0.193	0.050	0.033	0.092	0.033	0.172	0.105	0.088	0.088	0.090	0.087	0.102	0.134
Day 15	0.364	0.375	0.840	0.834	0.177	0.290	0.065	0.043	0.138	0.043	0.315	0.138	0.086	0.096	0.094	0.109	0.133	0.147
Day 19	0.418	0.471	0.807	0.864	0.256	0.406	0.083	0.031	0.194	0.051	0.289	0.157	0.157	0.106	0.113	0.127	0.143	0.167
Day 23	0.517	0.562	0.820	0.897	0.327	0.469	0.100	0.059	0.255	0.062	0.351	0.225	0.339	0.133	0.126	0.148	0.176	0.192
Day 27	0.597	0.633	0.818	0.921	0.378	0.537	0.124	0.146	0.292	0.071	0.418	0.230	0.492	0.255	0.140	0.170	0.199	0.231
Day 31	0.633	0.663	0.841	0.934	0.431	0.599	0.153	0.125	0.364	0.098	0.511	0.280	0.605	0.522	0.163	0.205	0.238	0.244

[0239]

[0240] 표 12. 당화된 및 비-당화된 항체의 평균 유리 C2

	유리 C2 (Free C2) (OD 450nm)							
	BRO2-glyc-IgG4				BRO2-IgG4			
	원숭이 1	원숭이 2	평균 M1&M2	표준 편차 (Standard Deviation)	원숭이 5	원숭이 6	평균 M5&M6	표준편차 (Standard Deviation)
Day -5	0.773	0.77	0.772	0.002	0.696	0.705	0.701	0.006
Day 0	0.707	0.716	0.712	0.006	0.74	0.657	0.699	0.059
15 분	0.031	0.028	0.030	0.002	0.016	0.018	0.017	0.001
1 h	0.033	0.028	0.031	0.004	0.017	0.021	0.019	0.003
2 h	0.034	0.03	0.032	0.003	0.018	0.02	0.019	0.001
4 h	0.033	0.027	0.030	0.004	0.017	0.02	0.019	0.002
6 h	0.034	0.03	0.032	0.003	0.015	0.019	0.017	0.003
Day 1	0.046	0.045	0.046	0.001	0.021	0.025	0.023	0.003
Day 2	0.06	0.061	0.061	0.001	0.027	0.03	0.029	0.002
Day 4	0.125	0.102	0.114	0.016	0.037	0.048	0.043	0.008
Day 7	0.174	0.169	0.172	0.004	0.072	0.11	0.091	0.027
Day 11	0.257	0.265	0.261	0.006	0.127	0.193	0.160	0.047
Day 15	0.364	0.375	0.370	0.008	0.177	0.29	0.234	0.080
Day 19	0.418	0.471	0.445	0.037	0.256	0.406	0.331	0.106
Day 23	0.517	0.562	0.540	0.032	0.327	0.469	0.398	0.100

[0241]

[0242] 바로 서술된 다른 원숭이에 대한 이 에세이들은 다른 날에 수행되었으므로, 분석은 선택된 수의 시간 포인트에서 (pre, 4시간, 1, 2, 4, 11일, 27일) 반복되었으며 여기서 모든 원숭이로부터의 혈청은 단일 플레이트에 놓였다 (도 6A-6D). 전-샘플 (pre-sample)은 또한 과량의 BRO2 (500 µg/mL)을 첨가하고 및 하지 않고 검사되었다.

[0243] 전-샘플의 ODs는 모든 원숭이에서 비교될 만하였으며, 이는 다른 원숭이에서 C2 수준이 비교할 만함을 제시한다 (도 6A). 전-샘플이 500 µg/mL BRO2로 미리-배양되었을 때, 모든 신호는 OD 0.013-0.015로 떨어졌다 (도 6A 및 6B). 그러한 낮은 OD 수준은 PK 샘플 어느 것에서도 얻어지지 않았으며, 이는 어느 시간 포인트에서도 유리 C2는 완전히 고갈되지 않는 것을 제시한다. 가장 낮은 수준은 4시간에 얻어졌으며, 및 이는 BRO2 변이체에서 (원숭이 5, 6, 7, 8, 9, 및 10, 도 6C) 가장 낮았다 (OD 0.02에서 0.03 사이). 11 및 27일에 이 결과의 해석은 몇 마리 원숭이에서 관찰된 ADA (항-약물 항체) (anti-drug antibodies) 에 의해 방해가 되었다 (도 6D).

[0244] 면역성 (Immunogenicity)

[0245] 시아노필구스 원숭이 (Cynomolgus monkeys) (n=2, 그룹당 1 남성 및 1 여성)는 상기 서술된 대로, 5mg/kg의 검사 항체를 단일 정맥 주사로 받았다. 모든 원숭이로부터 얻은 혈청 샘플은 베이스라인에서부터 (노출-전) 31일 까지 ADA (항-약물 항체) (anti-drug antibodies) 에 대한 검사를 하였으며 (도 7A-7P), 및 원숭이 5 및 6, 9 및 10, 및 15 및 16으로부터 얻은 혈청 샘플은 더 나아가 59일까지 검사되었다 (도 8A-8F).

[0246] 면역성은 마이크로타이터 플레이트를 100 µL의 1 µg/mL의 해당하는 항체를 4° C에서 하룻밤 동안 코팅하여 측정되었다. 플레이트는 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 3번 세척하였으며 및 이어서 200 µL PBS-1% 카제인 (casein)으로 실온(RT)에서 2시간 동안 차단시켰다. 플레이트를 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 3번 세척한 후에, 혈청 샘플은 20-배 또는 그 이상으로 100 µL PBS-1% 카제인 에 희석시키고 및 코팅된 웰에서 실온 (RT) 에서 2시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 적어도 200 µL의 PBS-0.05% Tween 20으로 5번 세척

한 후, 100 μ L 항-원숭이 IgG-HRP (anti-monkey IgG-HRP) (Southern Biotech #4700-05) 을 웰에 8000-배 희석으로 RT에서 1시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 적어도 200 μ L의 PBS-0.05% Tween 20으로 5번 세척하고 및 염색은 100 μ L TMB로 수행되었으며 및 10분 후에 100 μ L의 0.5 M H₂SO₄ (CHEM LAB, Cat#CL05-2615-1000) 로 중지시켰다. OD는 450nm에서 측정되었다. 대표적인 결과가 도 7A-7P에 보여준다.

[0247] 원숭이 8 (BR02-IgG4-NH), 11(His1-IgG4), 13 및 14 (His1-IgG4-NH), 및 16 (His1-IgG1-LALA-NH) 에서 명확한 ADA 반응이 관찰되었다 (도 7F, 7I, 7K 및 7L, 및 7N, 각각). 정말로, 베이스라인 ("PRE") 신호 (항체 주사 전에)에 비교하여 항체 주사 후에 ELISA에서 얻은 신호는 적어도 2-배 증가 되었다.

[0248] 원숭이 11, 13 및 16 (도 7I, 7K, and 7N, 각각) 에서, ADA는 11일로 관찰되었고; 원숭이 8 (도 7F) 은 15일로; 및 원숭이 14는 (도 7L) 19일로 관찰되었다.

[0249] 원숭이 9 ((BR02-IgG1-LALA-NH) (도 7G) 에서, 항체 주사후 모든 샘플에서 신호의 증가가 관찰되었으나, 그러나 베이스라인 샘플에서 신호는 이미 높고 및 시간에 따른 증가는 낮았다 (약 1.5-배).

[0250] 원숭이 5 (도 7C)에서 항체 주사 전의 베이스라인 샘플에서 특이하게 높은 신호가 관찰되었다. 이 신호는 또한 더 후의 시간 포인트에서의 신호보다 더 높았다. 이는 에세이에서 항체 (혈청에 존재하는) 의 방해에 의한 것으로 설명될 수 있다. 이는 그러므로 이 원숭이에서 ADA 반응이 있는지 측정하기가 가능하지 않았다.

[0251] 실시 예시 4: 등전 점 (Isoelectric Point) (pI)

[0252] 이가와 등은 (Igawa et al.) (*Protein Eng Des Sel* 2010, 23(5):385-392), 특정한 IgG1 단일클론 항체의 VH 변이체를 연구하면서, 등전 점 (isoelectric point) (pI) 과 단일클론 항체의 제거 사이에 강한 양성 상호관계 및 pI와 단일클론 항체의 반감기 사이의 음성적 상호관계를 보고하였다. 이 예시에서, 항-인간 C2b의 여러 형태의 pI가 측정되었다. 결과는 표 13에서 보여준다.

[0253] 표 13. 항-인간 C2b 단일클론 항체의 명확한 pI

	피크	VH4.2-IgG4-IAP2VK3	VH4.2-IgG4-HN-IAP2VK3	VH4.2-IgG1-LALA-HN-IAP2VK3 (ARGX-117)
계산된 명확한 pI (Calculated Apparent pI) n = 3	산성 3 (Acidic 3)	7.02	7.14	
	산성 2 (Acidic 2)	7.10	7.24	
	산성 1 (Acidic 1)	7.16	7.32	8.29
	주 피크 (Main Peak)	7.20	7.35	8.43
	염기성 1 (Basic 1)	7.30	7.45	8.57
	염기성 2 (Basic 2)	7.42	7.58	

[0254]

[0255] 검사된 세 항체 모두는 다 VH에 당화가 안되었다. 표 13에서 보는 바와 같이, ARGX-117 의 pI는 가깝게 관련된 IgG4 항체의 pI 보다 의미있게 더 큰것으로 나타났다. ARGX-117의 관찰된 pI는 소위-말하는 항원-스위핑 (antigen sweeping) 에 대한 증강된 잠재력으로서 나타나기가 기대된다.

[0256] 실시 예시 5: 웨스턴 블롯팅 (Western Blotting) 및 표면 플라즈몬 자기공명 (Surface Plasmon Resonance) (SPR) 분석에 의한 도메인 맵핑 (Domain Mapping)

[0257] ARGX-117의 결합 특징이 도 1에 묘사된 대로 웨스턴 블롯팅 (Western Blotting) 및 표면 플라즈몬 자기공명 (Surface Plasmon Resonance) (SPR) 분석에 의해 평가되었다. 웨스턴 블롯팅 결과는, 도 9A에 묘사된 대로, ARGX-117가 C2 및 C2b에 결합하는 것으로 나타났다. ARGX-117의 결합 특징은 더 나아가, 도 9B에서 묘사된 대로, 비아코아 300을 사용하여 SPR에 의해, C2(서열 번호 21)를 고체 상에 코팅하고 다른 농도의 ARGX-117의 Fab를 용출액으로 사용하여 더 연구되었다. 친화력은 Fb 및 C2 사이의 1:1 결합을 가정하여 계산되었으며 및 Kd 는 약 0.3 nM로 나타났다. ARGX-117에 의한 작용 기전을 연구하기 위하여, SPR 분석이 수행되었으며, 도 9C에 묘사된 대로, 스트랩타비딘-코팅된 칩에 고정시킨 바이오티닐화된 C4와 C3 컨버타제 (C3 convertase)(C4bC2a)의

형성을 모방한다. C2가 흐르는 버퍼에, 단독으로 첨가되거나 또는 대조군 mAb와 미리 배양되었을 때, 칩에 C2 결합이 관찰되었다. 항-C2 클론 63 (즉, 항-C2-63) 와의 미리-배양은 좀 더 높은 신호의 결과가 되었으며, 이는 아마도 이 mAb가 C2에 복합체를 형성했기 때문이며 및 C2: mAb 복합체는 함께 결합하여 좀 더 높은 분자 질량 및 좀 더 높은 SPR 신호를 가져오는 결과가 된다. C2가 ARGX-117와 미리-배양되면, C2의 C4b에의 결합은 크게 감소되었다. C2의 C4b에의 초기 결합은 C2b 도메인 (서열 번호 44) 에 의해 시작되는 것으로 생각된다. 그 후에는 큰 C2a 도메인 (서열 번호 43) 이 이어받고 및 이 상호 작용은 C3 컨버타제 복합체의 형성에 결정적이다. 이 실험으로부터의 결과는 ARGX-117는 C2가 C4b에 결합하는 것을 억제함으로써 C2를 억제한다고 암시한다.

[0258] ARGX-117에 의한 C2 억제의 작용 기전을 더 나아가 이해하기 위하여, C2는 먼저, 스트랩타빈 칩에 고정된 C4b에 결합되게 하였으며, 버퍼만 흘려보내 안정화시킨 후, 도 9D에 묘사된 대로 샘플을 흘려보냈다. 흐르는 버퍼 또는 상관없는 용해성 항원을 ((즉, 항-Factor XI(anti-Factor XI) (anti-FXI)) 타겟으로 하는 대조군 인간 IgG4 mAb는 어느 정도의 신호 감소의 결과가 되며, 이는 주사가 멈춘 후 정상화되었다. 항-C2-63의 주사는 증가된 신호의 결과가 되었으며, 이는 이 mAb가 C3 컨버타제(C4bC2a)에 결합할 수 있음을 제시한다. 이는 예측된 C2의 C4b에의 결합 모델과 같은 맥락이며, 이는 C2에 결합한 후에, C2a 도메인은 아직도 주로 사용 가능함을 제시한다. 흥미롭게도, ARGX-117은 C3 컨버타제에 강하게 결합하고 이어서 빠르게 분리되는 것을 보여 주었다. 이 결과들은 ARGX-117가 C2에 결합할 수 있으나, 이 결합은 매우 불안정하고, 아마도 활성을 촉진하는 방식으로 C2에 영향을 주는 것을 암시한다. 이 결과들은 또한 ARGX-117은 C2 분자로부터 C2b와 함께 방출될 수 있음을 암시한다

[0259] 실시 예시 6: C2 및 팩터 B (Factor B) 의 도메인 스와프 돌연변이들 (Domain Swap Mutants)을 사용한 도메인 지도작성 (domain mapping)

[0260] 항-C2-5F2.4의 에피토프 지도작성을 하기 위하여, 항-C2-5F2.4가 팩터 B (Factor B) (FB; 서열 번호50) 와 교차-반응하지 않고 및 C2 및 FB가 비슷한 도메인 구조를 갖는 매우 상동한 단백질이라는 사실의 장점을 이용한다. 두 단백질은 둘 다 작은 단편, 및 큰 단편을 포함한다. 보체 C2에 있는 작은 단편은 C2b (서열 번호 44) 라고 불리며, 및 팩터 B (Factor B) 에 있는 작은 단편은 FBa (서열 번호 51) 라고 불린다. 각각에 있는 작은 단편은 세 개의 스시 도메인 (Sushi domains) (CCP 도메인)을 포함한다. 각각에 있는 큰 단편은 도 10에서 보여준 대로, 본 윌리브란드 팩터 타입 A 도메인 (von Willebrand Factor type A domain) (VWFA) 및 펩티데이즈 S1 도메인 언 (Peptidase S1 domain on)을 포함한다. 도메인 스와프 돌연변이들은 C-터미널 FLAG 태그 (C-terminal FLAG tag) 를 포함한다.

[0261] 다양한 스와프 돌연변이를 만들기 위하여, C2, FB, 및 10개의 도메인 스와프 돌연변이를 위한 DNA 구조체 (DNA constructs)를 진스크립트 (GenScript)로 부터 구했다. DNA는 컴피턴트 대장균 세포 (competent *E. coli* cells) (ThermoFisher)에 열 쇼크 (heat shock)로 형질 전환 시켰다. 세포는 아가 (agar) 플레이트에 도말하였고 및 37° C에서 16시간 동안 키웠다. 13병의 200mL LB (루리아 브로스) (Luria Broth) 배지를 준비하였고 (MP Bio) 및 고압증기 멸균시켰다. 300 µL 앰피실린 (ampicillin) (100 mg/mL)을 각 병에 첨가하였다. 사전-배양 (pre-cultures) 은 각 구조체를 위해 3mL LB 배지로 시작하였다. 6시간 후에, 사전-배양액을 각 병으로 옮기고 및 37° C에서 16시간 동안 교반 하면서 키웠다. DNA는 박테리아 펠릿으로부터 제조사의 안내에 따라 플라스미드 DNA 정제 키트로 정제하였으며 (MaxiPrep, NucleoBond PC 500, Macherey-Nagel) 및 TE 버퍼에 재구성하였다. 플라스미드 DNA 농도는 나노드롭 (NanoDrop)으로 결정하였으며 및 1 µg/µL로 맞추었다. 플라스미드의 온전성은 제한 효소 분석으로 증명되었다. 각 구조물을 위해 1 µL 플라스미드 DNA 및 9 µL 제한 효소-믹스 (PstI 및 PvuII)를 혼합하고 및 37° C에서 2시간 동안 배양시켰다. DNA는 1% 아가로즈 젤에서 Bio-Rad ChemiDoc MP 시스템을 사용하여 100V로 1시간 동안 작동시킨 후 분석하였다. 상세한 지도작성 (fine mapping)(하기 참조)을 위한 DNA 구조물은 같은 방법으로 처리하였으나 이들의 온전성은 서열 분석으로 확인하였다.

[0262] 돌연변이 단백질들은 HEK293T 세포에 일시적으로 형질감염시켜 만들었다. HEK 세포는 완전한 DMEM ((10% 태아 송아지 혈청 (fetal calf serum) (FCS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin) (P/S)이 보충된 DMEM (Gibco)) 에서 배양시켰다. 형질감염시키기 하루 전에, 두 개의 플라스크에 있는 세포를 15개의 10cm²의 배양 접시 (Greiner Bio-One)에 접종시켰다. 형질감염 하기 전에, 21mL의 빈 DMEM 배지를 630 µL의 폴리에틸렌아민 (polyethylenimine) (P-Pei, Polysciences, Inc.) 과 함께 혼합하였다. 대조군으로서, 빈 플라스미드 (empty plasmid) PF45 pcDNA3.1 및 PF146 H2B GFP를 형질감염시켰다. 15 µg의 플라스미드 DNA는 1500 µL의 빈 배지-P-Pei 믹스 (empty medium-P-Pei mix)에 20분 동안 에펜도르프 튜브 (Eppendorf-tubes)에서 배양시켰다. 형질감염 믹스 (transfection mix)를 세포에 조심히 첨가하고 및 배지를 파이펫으로 옮기고 및 내리면서

혼합하였다. 8시간 후에 배지는 15mL 빈 배지 (empty medium)로 변경하였다. 3일 후에 형광 현미경으로 세포는 GFP 발현에 대해 조사하였다. 4일째 날에 상등액을 모으고 및 0.22 μm 필터 (filter) (Sartorius) 로 필터-멸균 하였으며 및 비바스핀 컬럼 (Vivaspin column) (Sartorius)으로 원래의 부피의 대략 1/3로 농축시켰다. 도메인 스와프 돌연변이들은 30,000 MWCO 컬럼으로 농축시키고, 및 상세 지도작성을 위한 C2b 돌연변이는 10,000 MWCO 컬럼으로 농축시켰다. 모든 상등액은 -20° C에 저장시키고 및 또한, SDS-PAGE 및 항-FLAG 웨스턴 블롯 (anti-FLAG Western Blot)로 분석하였다.

[0263] 다양한 구조체의 발현을 입증하기 위하여, 항-FLAG-태그 ELISA (anti-FLAG-tag ELISA) 에세이가 수행되었다. 마이크로플레이트 (Microplates) (Maxisorp, NUNC, Cat# 439454) 를 PBS에 5X 희석하거나 또는 희석하지 않은 (각각 도메인 스와프 돌연변이 및 상세 지도작성 돌연변이를 위하여) 100 μL의 HEK293T 상등액으로 하룻밤 동안 코팅시켰다. PBS 및 0.05% Tween-20으로 4번 세척한 후, PBS 및 0.1% Tween-20 (PBST)에 있는 1 μg/mL 항-FLAG Ab (clone M2, Sigma-Aldrich) 100 μL/웰을 첨가시키고 및 실온 (RT)에서 1시간 동안 교반 시키면서 배양시켰다. 검출 Ab 로서, 100 μL/웰의 호스레디쉬 퍼옥시다제 (HRP)-라벨된 염소 항-쥐-IgG ((horseradish peroxidase(HRP)-labeled goat anti-mouse-IgG)) (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-2005, 1000x 희석)를 PBST에 첨가시키고 및 RT에서 1시간 동안 배양시켰다. 최종 세척 단계 후에, 100 μL/웰의 TMB (Invitrogen, Cat# SB02) 를 기질로서 첨가시키고, 반응은 몇 분 후에 100 μL/웰의 HCl(Fischer, Cat# J/4320/15) 로 중지시켰으며 및 흡광도는 450nm에서 읽었다 (BioRad, iMark Microplate reader).

[0264] 항- FLAG ELISA는, 도 11에서 묘사된 대로, C2-(FB-Pep1) 를 제외한 모든 돌연변이들의 상등액에서 단백질을 검출하였다. 돌연변이들 사이에서의 차이는 다른 생산 또는 코팅 후 항- FLAG mAb 에 의한 다른 검출 효능에 의한 것으로 설명될 수 있다.

[0265] 다음으로, 항-C2-5F2.4 항체에 의한 스와프 돌연변이의 인식이 조사되었다. 이 효과에서, 마이크로플레이트 (Maxisorp, NUNC, Cat# 439454) 는 100 μL의 PBS에서 2 μg/mL 항-C2-5F2.4로 하룻밤 동안 코팅되었다. 플레이트는 0.05% Tween-20 가 있는 PBS로 4번 세척시키고 및 0.1% Tween-20 와 1% 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin) (BSA) (PBST-BSA) 이 있는 PBS 200 μL로 RT에서 1시간 동안 차단 시켰다. 세척 후, 돌연변이를 함유하는 배양 상등액 100 μL 를 PBST-BSA에 20x 희석하여 첨가하고 및 RT에서 2시간 동안 교반시키면서 배양시켰다. 세척 후, 검출 항체로서, 1 μg/mL의 바이오티닐화된 항-FLAG (biotinylated anti-FLAG) (clone M2, Sigma-Aldrich) 를 PBST-BSA에 1시간 동안 RT에서 첨가하였다. 플레이트는 세척시키고 및 1 μg/mL의 스트렙타비딘-POD 접합체 (streptavidin-POD conjugate) (Roche, Cat# 11089153001)를 첨가시키고 및 어두운 곳에서 30분 동안 배양시켰다. 플레이트는 세척시키고 및 100 μL/웰의 TMB (Invitrogen, Cat# SB02) 를 기질로서 첨가시키고, 및 반응은 몇 분 후에 100 μL/웰의 HCl(Fischer, Cat# J/4320/15) 로 중지시켰다. 흡광도는 450nm에서 마이크로플레이트 리더기 (BioRad, iMark Microplate reader)로 측정하였다.

[0266] 야생형 C2는 명확한 결합을 보였으며, 및 결합의 상실은 단지 보체 C2 S2 도메인 (서열 번호 46) 이 팩터 B S2 도메인 (Factor B S2 domain) (서열 번호 54)으로 치환된 C2-(FB-S2) 에서만 보였다. 반대로, 야생형 FB에서는 결합이 보이지 않았으나, 그러나 도 12에 묘사된 대로 팩터 B S2 도메인 (서열 번호 54) 이 보체 C2 S2 도메인 (서열 번호 46) 으로 치환된 돌연변이 FB-(C2-S2)에서는 강한 결합이 보였다. 이 결과들은 항-C2-5F2.4가 C2b에 S2 (스시 도메인 2) 에피토프를 인식하는 것을 분명히 보여 준다. 이 결과는 또한 C2-(FB-Pep1)가 충분한 양으로 생산됨을 보여준다. 비슷한 결과가 생쥐 IgG2a 항-C2-5F2.4를 사용했을 때에 얻어졌다. 추가로, 버퍼에 1.25 mM Ca⁺⁺ 존재하에서 결합이 조사되었을 때 비슷한 결과가 얻어졌다. 인간 C2 및 생쥐 C2 사이에 도메인 스와프 돌연변이를 사용하여, Bioceros BV에 의해 에피토프 지도작성이 수행되었을 때, 또한 비슷한 결론이 유도되었다. 더 나아가, 시아노몰구스 C2의 스시 도메인의 아미노산 서열은 인간 C2의 스시 도메인과 완전히 동일하다.

[0267]

[0268] 실시 예시 7: 스시 도메인 2 내에 항-C2-5F2.4의 에피토프 상세 지도 작성

[0269] 항-C2-5F2.4는 생쥐 C2와 교차-반응하지 않으며, 및 도 13 에서 묘사된 대로, 생쥐 S2 도메인 (서열 번호 58) 은 인간 S2 도메인 (서열 번호 46) 과 10개 아미노산 위치에서 다르다. 이들 10개의 아미노산 중 어느 것이 mAb 결합에 책임이 있는지를 조사하기 위하여, 상세 지도작성 돌연변이 (fine mapping mutants)가 만들어졌다. 상세 지도작성 구조체 (fine mapping constructs)는 인간 C2b 단편 (huC2b)이나, 생쥐 S2 (huC2b-mS2)를 가진 huC2b, 및 10개 돌연변이를 포함하며, 각 작은 생쥐 서열에서부터 인간 서열로 백-돌연변이 (back-mutation)된 하나의 아미노산을 함유한다. 돌연변이 C2b 단백질은 HEK293 세포로의 일시적 형질감염에 의한 도메인 스와프

돌연변이와 비슷하게 만들어진다.

[0270] 모든 돌연변이들은 도 14에서 묘사된 대로, 항-FLAG ELISA에 의해 생산되고 및 검출된다. 항-C2-5F2.4는, 기대한 대로, huC2b에는 결합하나 생쥐 S2를 가진 huC2b (huC2b-mS2)에는 결합하지 않았다. 복귀 점 돌연변이 (reverse point mutations) 중 아무것도. 항-C2-5F2.4의 결합을 회복시키지 못했으며, 이는 이 mAb의 에피토프는, 도 15에서 묘사된 대로, S2 도메인에 적어도 2개의 아미노산 서열로 구성됨을 암시한다. 버퍼에 1.25 mM Ca⁺⁺ 존재하에서 결합이 조사되었을 때 비슷한 결과가 얻어졌다.

[0271] 인간 C2b에 대하여 공적으로 얻을 수 있는 구조 데이터를 사용하여, 항-C2-5F2.4의 에피토프에 기여할 수도 있는 10개의 가능한 아미노산의 서열의 위치가, 도 16에 묘사된 대로, 분석되었다. 이 분석은 세 곳의 가능한 클러스터 (cluster) 를 보여 주며, 각각은 에피토프에 기여할 수 있는 세 개의 아미노산으로 구성된다. 이 클러스터 돌연변이는 인간 C2b S2 아미노산을 해당하는 생쥐 C2b S2 아미노산으로 돌연변이시켜 만들었다. 만약 이 세 개의 아미노산들이 항-C2-5F2.4의 에피토프에 기여한다면 결합의 손실이 예측되었다. 도 17A는 클러스터 1 돌연변이는 잘 발현되었고 및 결합은 영향을 받지 않았으며, 및 그러므로 이 아미노산들은 결합에 기여하지 않음을 보여준다. 항-FLAG ELISA에 근거하여, 클러스터 2 돌연변이의 발현은 더 낮았으며, 및 이는 항-C2-5F2.4에 의한 결합이 없는 결과가 되었다. 클러스터 3 돌연변이도 또한 잘 발현되지 않았으며, 및 이는 도 17B에 묘사된 대로, 항-C2-5F2.4에 의한 결합이 없음을 아마도 설명한다. 버퍼에 1.25 mM Ca⁺⁺ 가 존재할 할 때 결합이 조사되었을 때 비슷한 결과가 얻어졌다. 이 분석으로부터, 클러스터 1에 있는 아미노산들은 제외될 수 있으며, 클러스터 2 및 클러스터 3에 있는 4개의 가능한 아미노산을 남겨둔다.

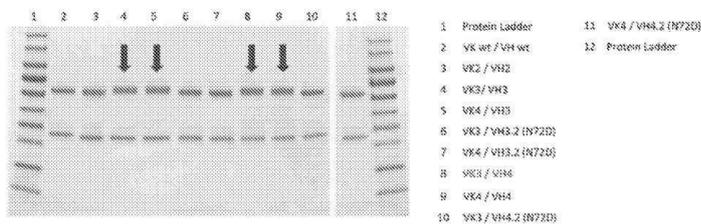
[0272] 도메인 스와프 돌연변이들은 C2에서 항-C2-5F2.4 에 의해 인식되는 에피토프는 C2b의 스시 도메인 2에 위치한다는 강한 증거를 제공한다. 추가로, 이 실험들은 FB에 그런 도메인의 존재는 항-C2-5F2.4 에 의한 인식에 충분함을 제시한다. 항-C2-5F2.4가 생쥐 C2와 반응하지 않음을 고려하면, 인간 및 생쥐 스시 2 도메인 사이에서 다른 10개 아미노산 중 하나 또는 그 이상은 에피토프에 필수적이어야만 한다. 단일 아미노산 백-돌연변이 (back-mutations)를 사용하여, 우리는 스시 2 도메인에 있는 단일 아미노산은 결합을 회복시킬 수 없다는 것을 보였다. 클러스터 돌연변이로 수행된 실험으로부터, 클러스터 1에 있는 아미노산들은 항-C2-5F2.4의 에피토프에 기여하지 않는다고 결론지어졌다. 클러스터 2의 아미노산은 항-C2-5F2.4의 에피토프에 기여할 수 있으나, 그러나 이 돌연변이의 발현은 클러스터 1 돌연변이보다 더 낮아, 클러스터 2 돌연변이의 폴딩 (folding) 은 최적이지 아니라는 것이 배제될 수 없다. 클러스터 3 돌연변이는 잘 발현되지 않았기 때문에, 돌연변이는 폴딩에 영향을 주는 것 같고 및 그래서 클러스터 3에 있는 아미노산의 역할이 모호한 것으로 남아 있다.

[0273] 참고 문헌 병합 (INCORPORATION BY REFERENCE)

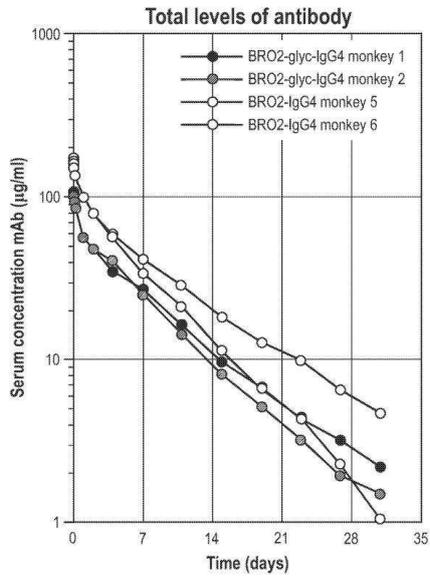
[0274] 여기서 인용된 모든 논문 및 특허 서류는 그 전문이 참고문헌으로 여기서 병합되었다.

도면

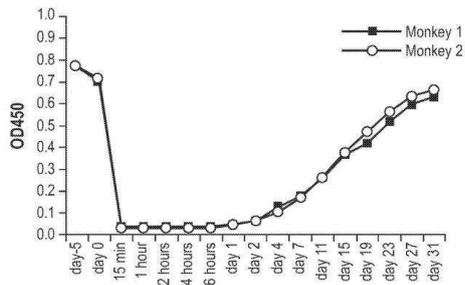
도면1



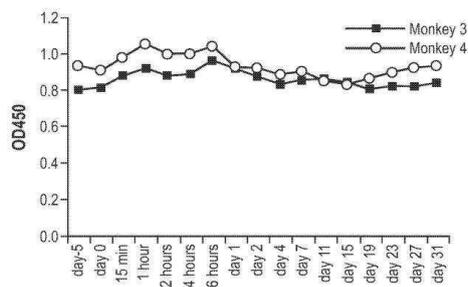
도면2



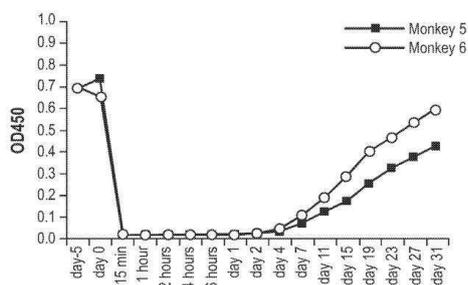
도면3a



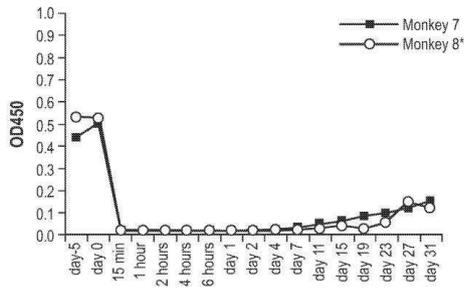
도면3b



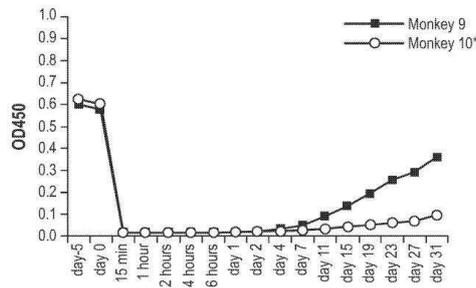
도면3c



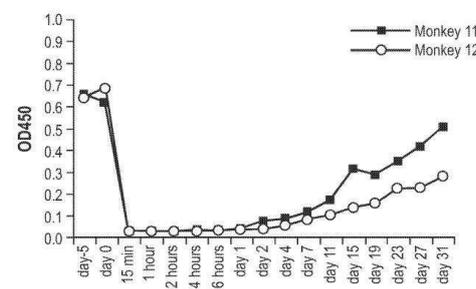
도면3d



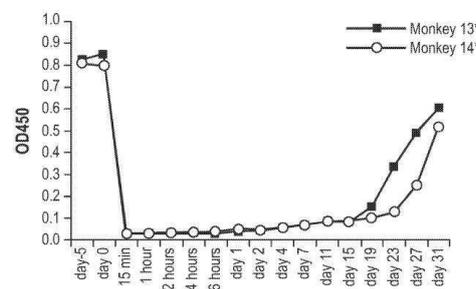
도면3e



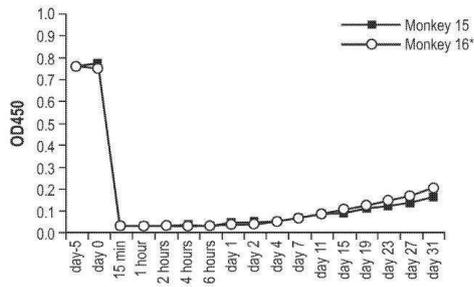
도면3f



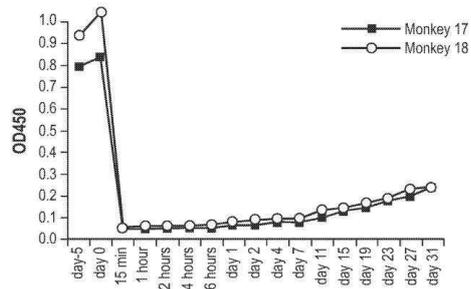
도면3g



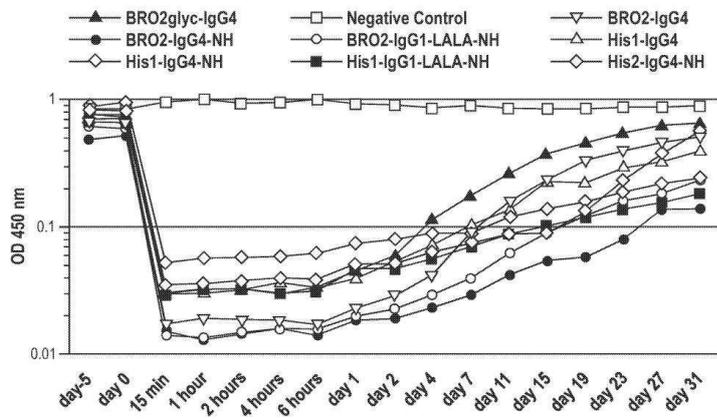
도면3h



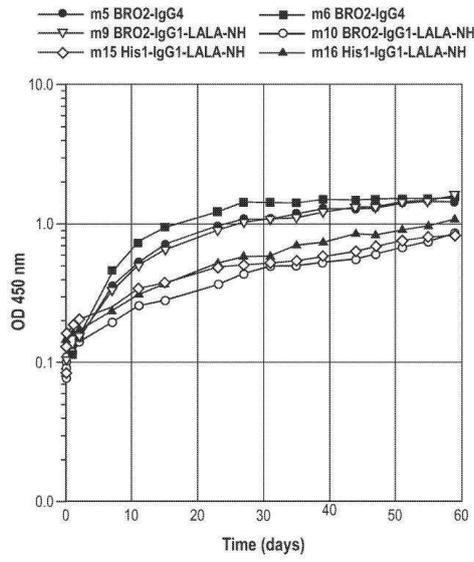
도면3i



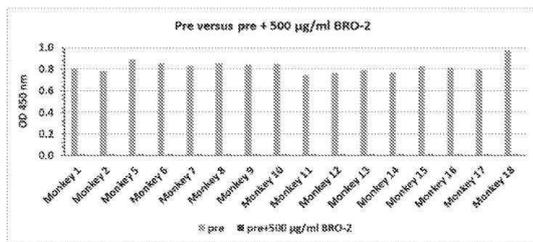
도면4



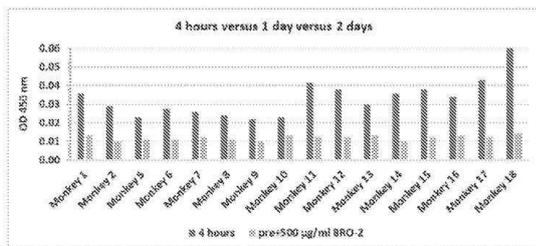
도면5



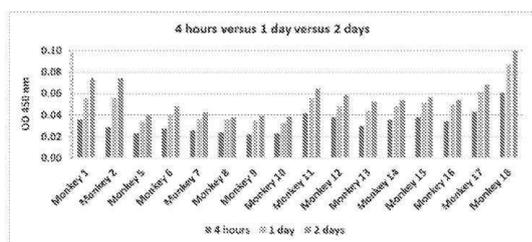
도면6a



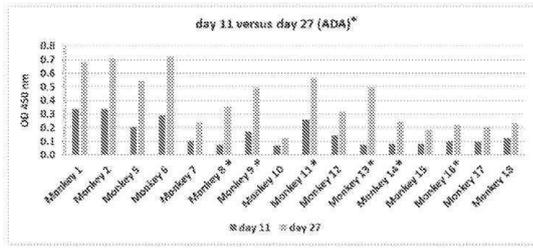
도면6b



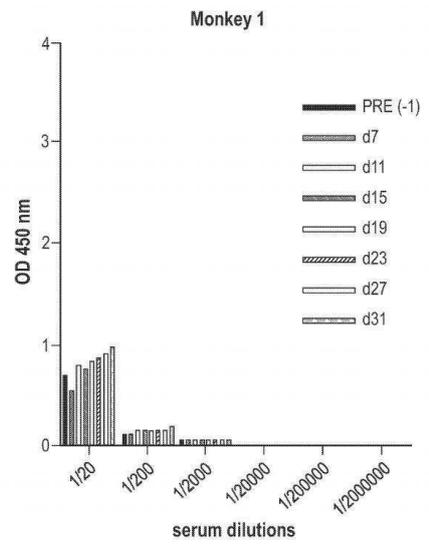
도면6c



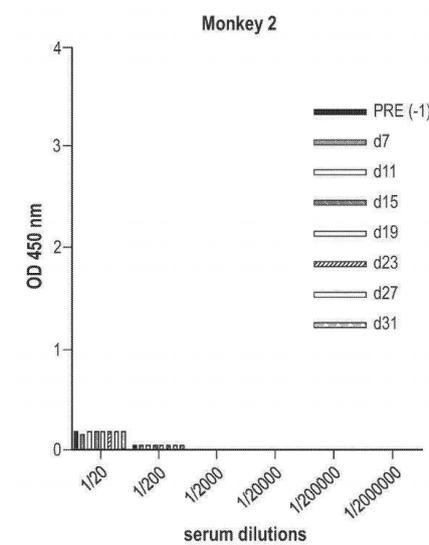
도면6d



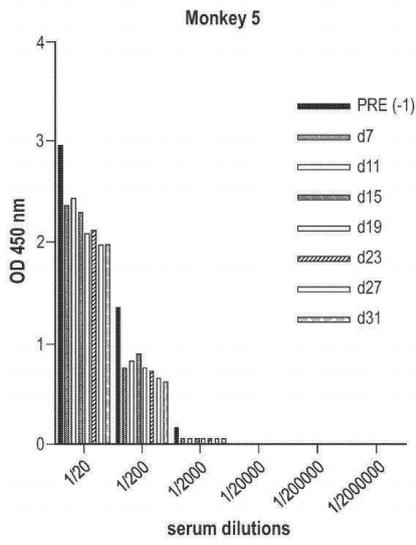
도면7a



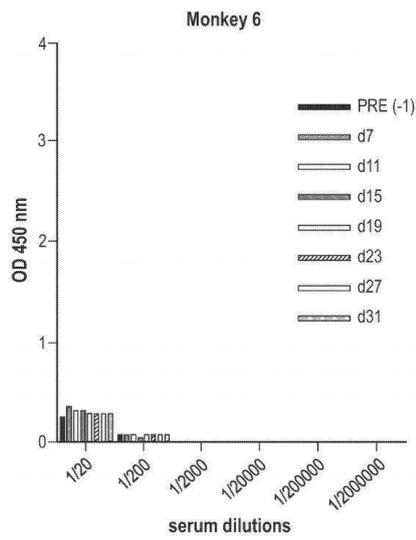
도면7b



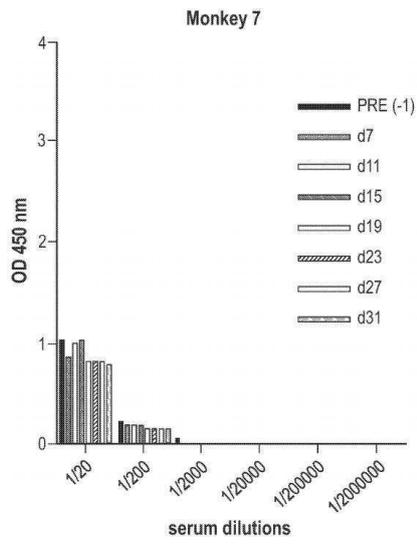
도면7c



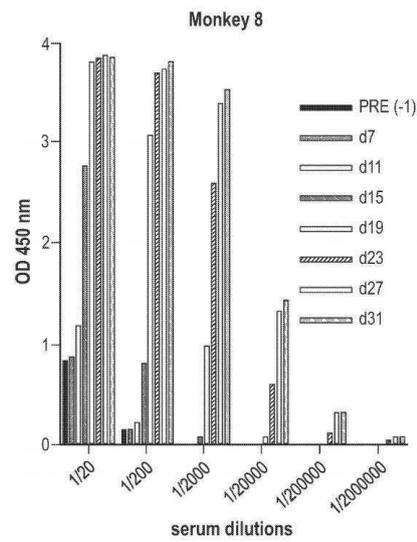
도면7d



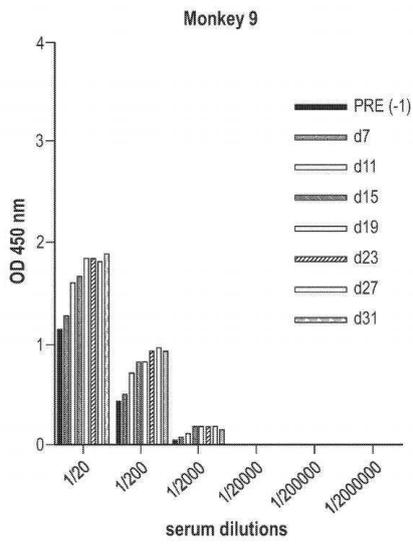
도면7e



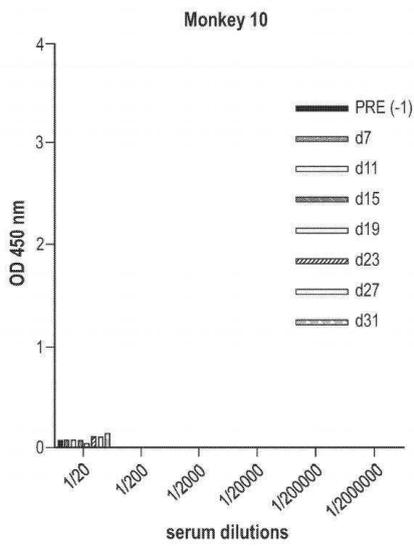
도면7f



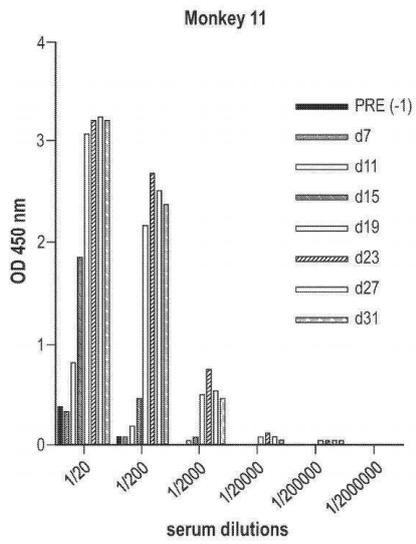
도면7g



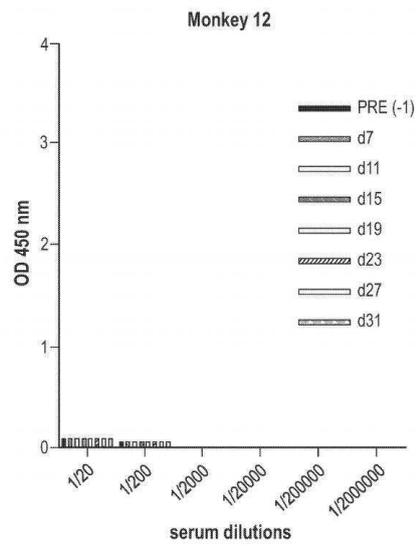
도면7h



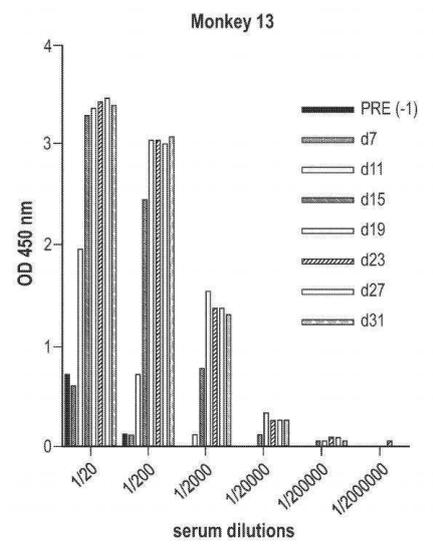
도면7i



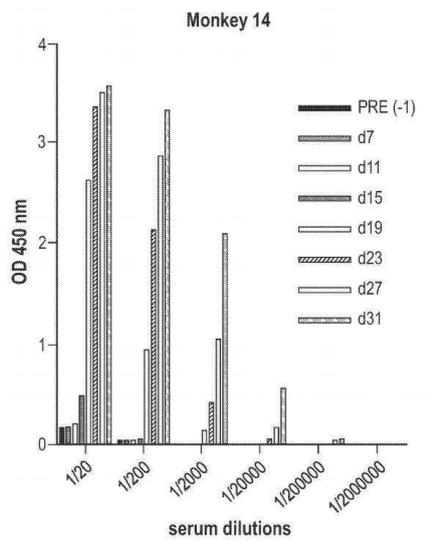
도면7j



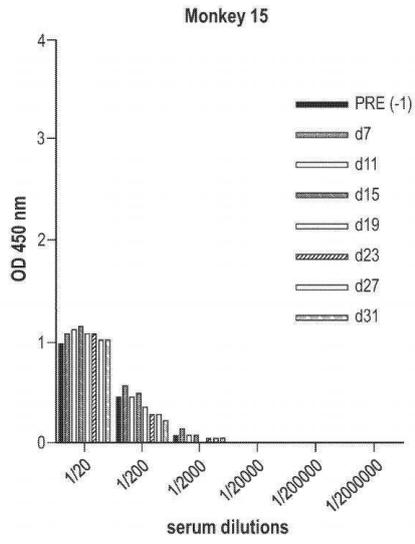
도면7k



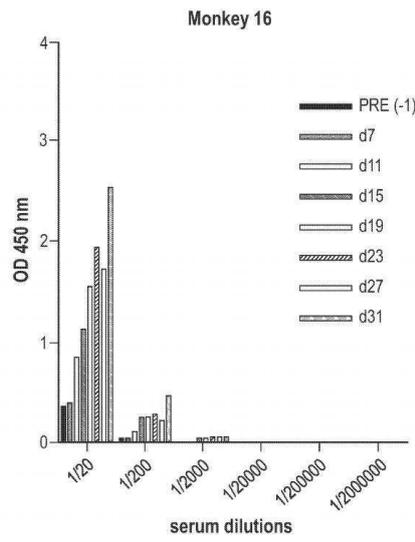
도면7l



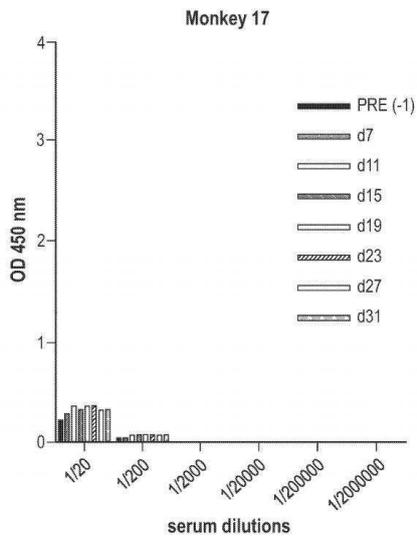
도면7m



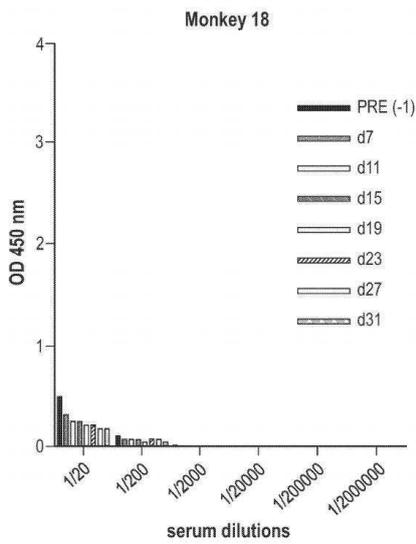
도면7n



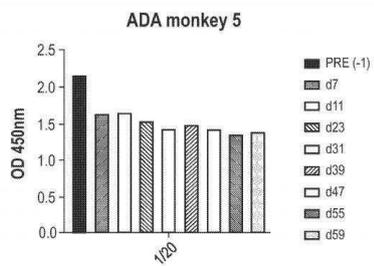
도면7o



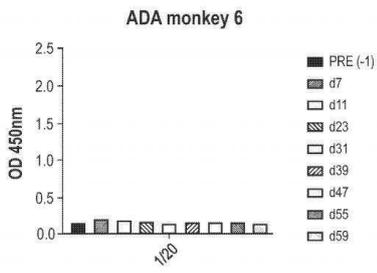
도면7p



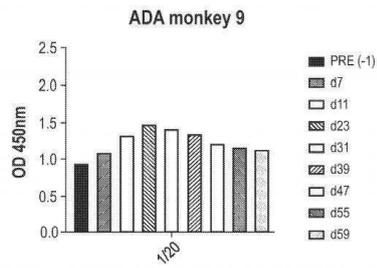
도면8a



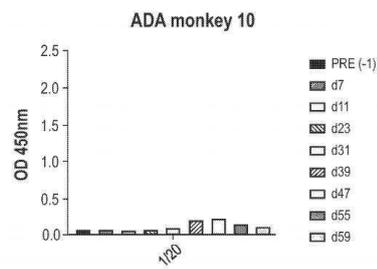
도면8b



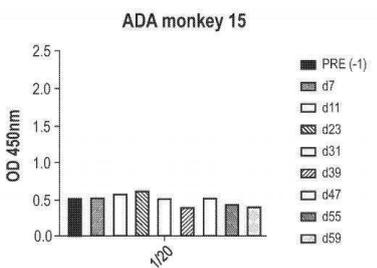
도면8c



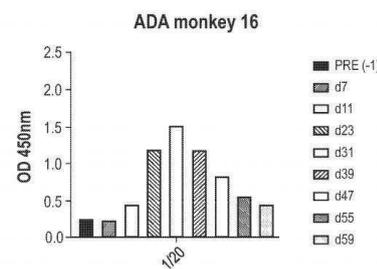
도면8d



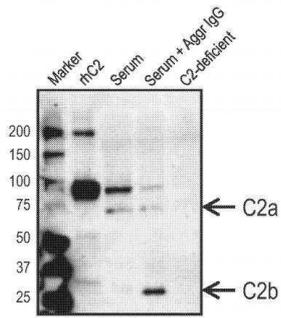
도면8e



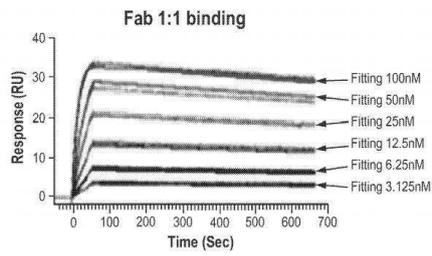
도면8f



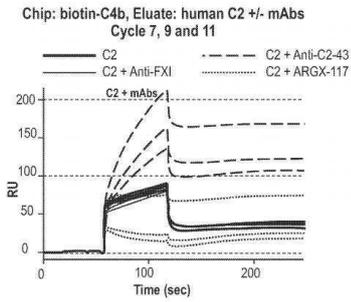
도면9a



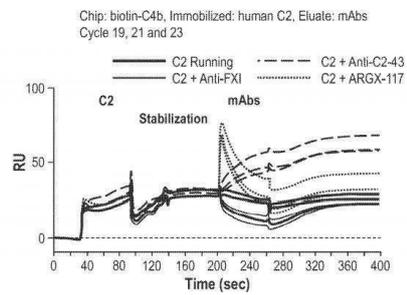
도면9b



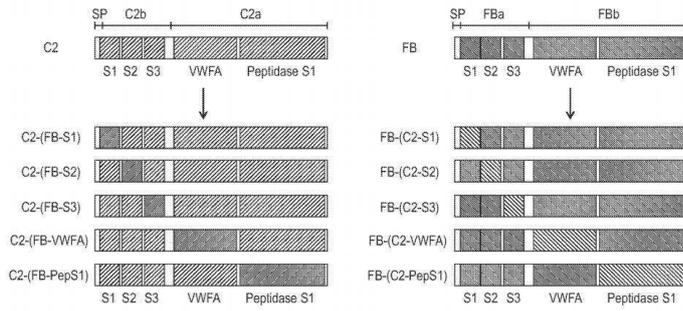
도면9c



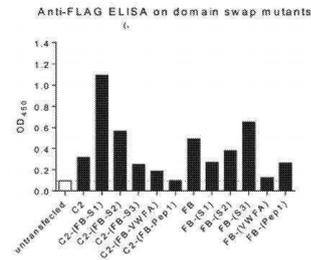
도면9d



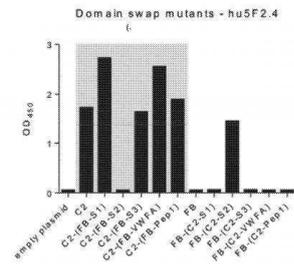
도면10



도면11



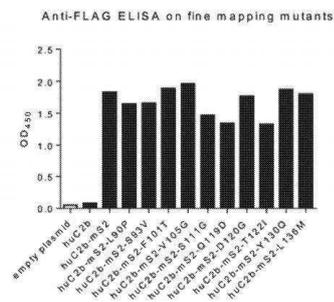
도면12



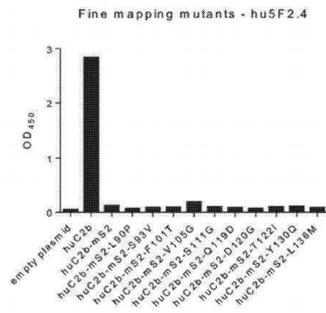
도면13

Human S2 VRCAPAVSFENGIYTPRLGSPVGGNVSFCECDGFILRGSFVRQCRPNGMWDGETAVCDNG
 Mouse S2 VRCIAPSSFENGIYFPRLVSYVGGSNVSFCEQDFTLRGSFVRYCRPNGLWDGETAVCDNG
 *** ** ***** ** * ***** * ***** *****

도면14



도면15



도면16

Cluster 1

Human C2 VRC**P**APVSFENGIY**T**PRLG**S**YPVGG**N**VSFE**C**D**G**F**I**LRG**S**PVR**Q**CR**P**NGM**W**D**G**ETAV**C**D**N**G
 Mouse C2 VR**C**L**A**P**S**S**F**ENGIY**F**PR**L**V**S**YPV**G**SN**V**S**F**E**C**Q**D**F**L**R**G**S**P**V**R**Y**C**R**P**N**L**W**D**G**E**TAV**C**D**N**G
 *** *

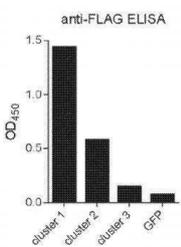
Cluster 2

Human C2 VRC**P**APVSFENGIY**T**PRLG**S**YPV**G**GN**V**SFE**C**D**G**F**I**LRG**S**PVR**Q**CR**P**NC**M**W**D**G**E**TAV**C**D**N**G
 Mouse C2 VR**C**L**A**P**S**S**F**ENGIY**F**PR**L**V**S**YPV**G**SN**V**S**F**E**C**Q**D**F**L**R**G**S**P**V**R**Y**C**R**P**N**L**W**D**G**E**TAV**C**D**N**G
 *** *

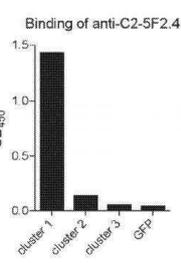
Cluster 3

Human C2 VRC**P**APVSFENGIY**T**PRLG**S**YPV**G**GN**V**SFE**C**D**G**F**I**LRG**S**PVR**Q**CR**P**NGM**W**D**G**ETAV**C**D**N**G
 Mouse C2 VR**C**L**A**P**S**S**F**ENGIY**F**PR**L**V**S**YPV**G**SN**V**S**F**E**C**Q**D**F**L**R**G**S**P**V**R**Y**C**R**P**N**L**W**D**G**E**TAV**C**D**N**G
 *** *

도면17a



도면1b



서열목록

<110> argenx BVBA

Blanchetot, Christophe

de Haard, Hans

<120> ANTIBODIES TO HUMAN COMPLEMENT FACTOR C2b AND METHODS OF USE
 <130> 618634: AGX5-048PC
 <150> US 62/779,102
 <151> 2018-12-13
 <160> 58
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(75)
 <223> Any amino acid, provided amino acids 73-75 are not NXS or NXT.

<400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Ser Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Xaa Xaa Xaa Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Asp His Asp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Arg Thr Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 5
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu Lys Phe His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 <210> 7
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 7
 Asp Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Arg Thr Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

 85 90 95
 Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Arg Lys

1

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro

1 5

<210> 15

<211

> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 16

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys

1 5 10 15

Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro

20 25 30

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

35 40 45

Cys Pro

50

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Cys Pro Ser Cys Pro

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

1 5

<210> 21

<211> 752

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Gly Pro Leu Met Val Leu Phe Cys Leu Leu Phe Leu Tyr Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Asp Ser Ala Pro Ser Cys Pro Gln Asn Val Asn Ile Ser Gly
 20 25 30
 Gly Thr Phe Thr Leu Ser His Gly Trp Ala Pro Gly Ser Leu Leu Thr
 35 40 45
 Tyr Ser Cys Pro Gln Gly Leu Tyr Pro Ser Pro Ala Ser Arg Leu Cys
 50 55 60
 Lys Ser Ser Gly Gln Trp Gln Thr Pro Gly Ala Thr Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Lys Ala Val Cys Lys Pro Val Arg Cys Pro Ala Pro Val Ser Phe Glu
 85 90 95
 Asn Gly Ile Tyr Thr Pro Arg Leu Gly Ser Tyr Pro Val Gly Gly Asn
 100 105 110
 Val Ser Phe Glu Cys Glu Asp Gly Phe Ile Leu Arg Gly Ser Pro Val
 115 120 125
 Arg Gln Cys Arg Pro Asn Gly Met Trp Asp Gly Glu Thr Ala Val Cys
 130 135 140
 Asp Asn Gly Ala Gly His Cys Pro Asn Pro Gly Ile Ser Leu Gly Ala
 145 150 155 160
 Val Arg Thr Gly Phe Arg Phe Gly His Gly Asp Lys Val Arg Tyr Arg
 165 170 175
 Cys Ser Ser Asn Leu Val Leu Thr Gly Ser Ser Glu Arg Glu Cys Gln
 180 185 190
 Gly Asn Gly Val Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ile Cys Arg Gln Pro Tyr
 195 200 205
 Ser Tyr Asp Phe Pro Glu Asp Val Ala Pro Ala Leu Gly Thr Ser Phe
 210 215 220

465 470 475 480
 His Val Thr Ile Lys Pro Lys Ser Gln Glu Thr Cys Arg Gly Ala Leu
 485 490 495
 Ile Ser Asp Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Asp Gly
 500 505 510
 Asn Asp His Ser Leu Trp Arg Val Asn Val Gly Asp Pro Lys Ser Gln
 515 520 525
 Trp Gly Lys Glu Phe Leu Ile Glu Lys Ala Val Ile Ser Pro Gly Phe
 530 535 540

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

 610 615 620
 Leu Asn Ile Asn Leu Lys Met Gly Val Glu Trp Thr Ser Cys Ala Glu
 625 630 635 640
 Val Val Ser Gln Glu Lys Thr Met Phe Pro Asn Leu Thr Asp Val Arg
 645 650 655
 Glu Val Val Thr Asp Gln Phe Leu Cys Ser Gly Thr Gln Glu Asp Glu
 660 665 670
 Ser Pro Cys Lys Gly Glu Ser Gly Gly Ala Val Phe Leu Glu Arg Arg
 675 680 685

 Phe Arg Phe Phe Gln Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Leu Tyr Asn Pro
 690 695 700
 Cys Leu Gly Ser Ala Asp Lys Asn Ser Arg Lys Arg Ala Pro Arg Ser
 705 710 715 720
 Lys Val Pro Pro Pro Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Arg Met Gln

<220><223> Synthetic peptide

<400> 25

Arg Ala Ser Lys Ser Val Arg Thr Ser Gly Tyr Asn Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 26

Leu Ala Ser Asn Leu Lys Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 27

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Ser Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 30

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

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

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

 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 31

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325
 <210> 32
 <211> 448

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 32

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

 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 33
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 33
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Glu Ser Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Glu Asp Asp His Asp Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 <210> 34
 <211> 445

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 35

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 35

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaac ctggcgctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ctccggcta caccttacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggct 120

accggccagg gcctggaatg gatcggcgac atcaacccca actacgagtc caccggctac 180

aaccagaagt tcaagggcag agccaccatg accgtggaca agtccatctc caccgcctac 240

atggaactgt cctccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcbc cagagaggac 300
gaccacgacg cctttgctta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctct 354
<210> 36
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polynucleotide
<400> 36
gacaacgtgc tgacceagtc ccctgactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagagccacc 60
atctcttgcc gggcctctaa gtccgtgcbg acctccggct acaactacat gcactggtat 120
cagcagaagc cgggccagcc cccaagctg ctgatctacc tggcctccaa cctgaagtcc 180
ggcgtgcccc acagattctc cggctctggc tctggcaccg actttaccct gaccatcagc 240
tccctgcagg ccgaggatgc cgccacctac tactgccagc actccagaga gctgcctac 300
acctttggcc agggcaccaa gctggaaatc aag 333
<210> 37
<211> 1344
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400>
> 37
gaagttcagc tggttcagtc tggcggcga gtgaagaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60
tcttgcaagg ctcttgctca cacctttacc gactacaaca tggactgggt ccgacaggct 120
accggacagg gacttgagtg gatcggcgac atcaaccca actacagatc caccggctac 180
aaccagaagt tcaaggcgag agccacatg accgtggaca agtccatctc caccgcctac 240
atggaactgt ccagcctgag atctgaggac accgccgtgt actactgcbc cagagaggat 300
gatcacgacg cctttgctta ttggggccag ggcacactgg tcaccgtgtc ctctgccagt 360
acaaaaggtc caagtgtgtt ccctcttctt ccctcatcca agagtaccag tggaggcacc 420
gccgctcttg gctgcttggg taaggattat ttcccagagc ctgtcactgt ttcattggaac 480
tccggcgcct tgacatctgg tgtgcatacc tttccagccg tgctgcagtc aagtggcctc 540
tacagcctca gtagcgtggg cactgtgccc agcagctctc tcggcacaca aacttatatc 600
tgtaatgtga atcataagcc ttcaaatacc aaggtggata agaaagtgga accaaaatca 660
tgtgacaaga cacacacctg ccctccttgt ccagccccg aactgctggg tgggcccagc 720

ggtttcctgt ttctcctaa acccaaagac actctgatga ttagtaggac cccagaagtc 780
 acttgcgtgg tggttgacgt gtcacatgaa gatcccagg tcaagttcaa ttggtatgtt 840

 gacggggtcg aagttcacia cgctaaaact aaaccaagag aggaacagta taactctacc 900
 taccgggtgg tgagtgttct gactgtcctc catcaagact ggctgaatgg caaagaatac 960
 aagtgtgaag tgagcaacia agccctgccc gctcctatag agaaaacaat atccaaagcc 1020
 aaaggtcaac ctgcgagcc acaggtgtac accctccac caagccgca tgaacttact 1080
 aagaaccaag tctctcttac ttgcctggtt aagggttct atccatccga cattgcagtc 1140
 gagtgggagt ctaatggaca gcctgagaac aactacaaaa ccaccctcc tgttctggat 1200
 tctgacggat ctttcttct ttattctaaa ctaccgtgg ataaaagcag gtggcagcag 1260

 ggcaactgt tcagctgttc cgttatgcat gaggccctgc ataaccatta taccagaag 1320
 tctttgtccc tcagtcagg aaag 1344

 <210> 38
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 38

 gaagttcagc tggttcagtc tggcggcga gtgaagaac ctggcgcctc tgtgaaggtg 60
 tcttcaagg cttctggcta cacctttacc gactacaaca tggactgggt ccgacaggct 120
 accggacagg gacttgagtg gatcggcgac atcaaccca actacgagtc caccggctac 180

 aaccagaagt tcaaggcag agccaccatg accgtggaca agtccatctc caccgcctac 240
 atggaactgt ccagcctgag atctgaggac accgctgt actactgcgc cagagaggat 300
 gatcacgacg ctttgccta ttggggccag ggcacactgg tcaccgtgtc ctctgcttct 360
 accaaggac ccagcgtgtt cctctggct cttccagca agtctacctc tggcggaaaca 420
 gctgctctgg gctgcctggt caaggactac tttcctgagc ctgtgaccgt gtcttggaa 480
 tctggcgtc tgacatctgg cgtgcacacc ttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540
 tactctctgt cctctgtctg gaccgtgct tccagctctc tgggaacca gacctacatc 600

 tgcaatgtga accacaagcc ttccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tcttccatgt cctgctccag aagctgctgg cggcccttc 720
 ggtttctgt tcctcacia gcctaaggac accctgatga tctctggac cctgaagtg 780
 acctgcgtgg tggggatgt gtctcacgag gaccagaag tgaagttcaa ttggtactg 840

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcctagag aggaacagta caactccacc 900
 tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggatt ggctgaacgg caaagagtac 960
 aagtgaagg tgtccaacaa ggccctgcct gctcctatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1020

aaggccagc ctagggaacc ccaggtttac accttgctc catctcggga cgagctgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctcgtg aagggttctt acccctccga tatcgccgtg 1140
 gaatgggagt ctaatggcca gccagagaac aactacaaga caaccctcc tgtgctggac 1200
 tccgacggct cattctttct gtactccaag ctgacagtgg ataagtcccg gtggcagcag 1260
 ggcaactgt tctcctgttc tgtgatgcac gaggccctga agttccacta cacacagaag 1320
 tctctgtctc tgagccccgg c 1341

<210> 39
 <211> 1335
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 39

gaagtgcagc tggatgcagtc tggcgcgaa gtgaagaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ctcccgcta cacctttacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggt 120
 accggccagg gcctggaatg gatcggcgac atcaaccca actacgagtc caccggctac 180
 aaccagaagt tcaagggcag agccaccatg accgtggaca agtccatctc caccgectac 240
 atggaactgt cctccctcgc gagcaggac accgccgtgt actactgcbc cagagaggac 300
 gaccagcag cctttgctta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc ctctgcttct 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttgctcca gatccacctc cgagtctacc 420
 gccgctctgg gctgcctcgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 480
 tctggcgcce tgacctcgg cgtgcacacc ttccagctg tgtctcagtc ctccggcctg 540
 tactcctgt cctccgtcgt gactgtgecc tccagctctc tgggcaccaa gacctacacc 600
 tgtaactgg accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agcgggtgga atctaagtac 660
 ggccctccct gccctccttg cccagccct gaatttctgg gcggaccag cgtgttctc 720
 ttcccccaa ageccaagga caccctgatg atctcccga ccccgaagt gacctgcgtg 780

gtggtggatg tgtcccagga agatcccag gtgcagttca attggtactg ggacggcgtg 840
 gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt tcaactccac ctaccgggtg 900
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgaag 960

gtgtccaaca agggcctgcc ttccagcatc gaaaagacca tctccaaggc caagggccag 1020
 ccccgggaac ccaggtgta cacactgcct ccaagccagg aagagatgac caagaaccag 1080
 gtgtccctga cctgtctcgt gaaaggcttc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1140
 tccaacggcc agcctgagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga ctccgacggc 1200

 tccttcttcc tgtactctcg cctgaccgtg gataagtccc ggtggcagga aggcaactg 1260
 ttctctgct cegtgatgca cgaggccctg cacaaccact ataccagaa gtccctgtcc 1320
 ctgtctctgg gaaag 1335
 <210> 40
 <211> 1349
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 40
 gaagtgcagc tggcgcagtc tggcggcga gtaaaaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ctagcggcta cacctttacc gactacaaca tggactgggt cgcacaggcc 120

 acaggacagg gactcgagtg gatcggcgac atcaacccca actacgagag caccggctac 180
 aaccagaagt teaagggcag agccacatg accgtggaca agagcatcag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcaggac accgccgtgt actactgcmc cagagaggat 300
 gatcacgacg cctttgccta ttggggccag ggcacactgg tcaccgttag ctctgctagc 360
 accaagggcc catcggcttt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccttg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc 540

 tactcctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaactgag atcacaagc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtccccat gccaccatg cccagcacct gaggctctgg ggggaccatc agtcttctg 720
 ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccag gtccagtca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccggg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaacg gcaaggagta caagtcaag 960

 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccagagc cacaggtgta caccctgcc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gacccctccc 1320
 ctgtctccgg gtaaatgagt cctagctgg 1349

<210> 41

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 41

gaagtgcagc tggatgagtc tggcggcga gtgaaaaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60
 tcctgcaagg ctacgggcta cacctttacc gactacaaca tggactgggt ccgacaggcc 120
 acaggacagg gactcgagt gatcggcgac atcaacccca actacgagag caccggctac 180
 aaccagaagt tcaagggcag agccaccatg accgtggaca agagcatcag caccgcctac 240
 atggaactga gcagcctgag aagcaggac accgccgtgt actactgccc cagagaggat 300

gatcacgagc cctttgccta ttggggccag ggcaactgg tcaccgttag ctctgctagc 360
 accaagggcc catcggcttt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgctggt caaggactac ttccccgaac cggatgacgt gtcgtggaac 480
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctgaggactc 540
 tactcctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gtccaaatat 660
 ggtccccat gccaccatg cccagcacct gatttctgg ggggaccatc agtcttctg 720

ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtgagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag 1020
 ccccagagc cacaggtgta caccctgcc ccatccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtgagcctga cctgctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tcctttcttc tctacagcag gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg aagttccact acacacagaa gaccctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

- <210> 42
- <211> 654
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic polypeptide
- <400> 42

gacaacgtgc tgaccagtc ccctgactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagagccacc 60

atctcttgcc gggcctctaa gtccgtgctg acctccggct acaactacat gcaactggtat 120
 cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctacc tggcctccaa cctgaagtcc 180
 ggctgcccc acagattctc cggtctggc tctggcaccg actttaccct gaccatcagc 240
 tccttgagg ccgaggatgc gcgcaactac tactgccagc actccagaga gctgccttac 300
 acctttggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcggaccg tggccgctcc ctccgtgttc 360
 atcttccac cttccgacga gcagctgaag tctggcacag cctccgtcgt gtgcctgctg 420
 aacaacttct acccccgcga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtec 480

ggcaactccc aggaatccgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 540
 tccaccctga cctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg 600
 acccaccagg gcctgtctag ccccgtagc aagtctttca accggggcga gtgc 654

- <210> 43
- <211> 509
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 43

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

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

1 5 10 15

Leu Ser His Gly Trp Ala Pro Gly Ser Leu Leu Thr Tyr Ser Cys Pro

20 25 30

Gln Gly Leu Tyr Pro Ser Pro Ala Ser Arg Leu Cys Lys Ser Ser Gly

35 40 45

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

50 55 60

Lys Pro Val Arg Cys Pro Ala Pro Val Ser Phe Glu Asn Gly Ile Tyr

65 70 75 80

Thr Pro Arg Leu Gly Ser Tyr Pro Val Gly Gly Asn Val Ser Phe Glu

85 90 95

Cys Glu Asp Gly Phe Ile Leu Arg Gly Ser Pro Val Arg Gln Cys Arg

100 105 110

Pro Asn Gly Met Trp Asp Gly Glu Thr Ala Val Cys Asp Asn Gly Ala

115 120 125

Gly His Cys Pro Asn Pro Gly Ile Ser Leu Gly Ala Val Arg Thr Gly

130 135 140

Phe Arg Phe Gly His Gly Asp Lys Val Arg Tyr Arg Cys Ser Ser Asn

145 150 155 160

Leu Val Leu Thr Gly Ser Ser Glu Arg Glu Cys Gln Gly Asn Gly Val

165 170 175

Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ile Cys Arg Gln Pro Tyr Ser Tyr Asp Phe

180 185 190

Pro Glu Asp Val Ala Pro Ala Leu Gly Thr Ser Phe Ser His Met Leu

195 200 205

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

210 215 220

<210> 45

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 45
 Pro Ser Cys Pro Gln Asn Val Asn Ile Ser Gly Gly Thr Phe Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser His Gly Trp Ala Pro Gly Ser Leu Leu Thr Tyr Ser Cys Pro Gln
 20 25 30
 Gly Leu Tyr Pro Ser Pro Ala Ser Arg Leu Cys Lys Ser Ser Gly Gln
 35 40 45
 Trp Gln Thr Pro Gly Ala Thr Arg Ser Leu Ser Lys Ala Val Cys Lys
 50 55 60

Pro
 65
 <210> 46
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Val Arg Cys Pro Ala Pro Val Ser Phe Glu Asn Gly Ile Tyr Thr Pro
 1 5 10 15
 Arg Leu Gly Ser Tyr Pro Val Gly Gly Asn Val Ser Phe Glu Cys Glu
 20 25 30
 Asp Gly Phe Ile Leu Arg Gly Ser Pro Val Arg Gln Cys Arg Pro Asn
 35 40 45
 Gly Met Trp Asp Gly Glu Thr Ala Val Cys Asp Asn Gly
 50 55 60

<210> 47
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Gly His Cys Pro Asn Pro Gly Ile Ser Leu Gly Ala Val Arg Thr Gly
 1 5 10 15
 Phe Arg Phe Gly His Gly Asp Lys Val Arg Tyr Arg Cys Ser Ser Asn

20 25 30
 Leu Val Leu Thr Gly Ser Ser Glu Arg Glu Cys Gln Gly Asn Gly Val
 35 40 45

Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ile Cys Arg Gln
 50 55

<210> 48
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48

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

Pro Lys Val Leu Met Ser Val Leu Asn Asp Asn Ser Arg Asp Met Thr
 50 55 60
 Glu Val Ile Ser Ser Leu Glu Asn Ala Asn Tyr Lys Asp His Glu Asn
 65 70 75 80
 Gly Thr Gly Thr Asn Thr Tyr Ala Ala Leu Asn Ser Val Tyr Leu Met
 85 90 95
 Met Asn Asn Gln Met Arg Leu Leu Gly Met Glu Thr Met Ala Trp Gln
 100 105 110

Glu Ile Arg His Ala Ile Ile Leu Leu Thr Asp Gly Lys Ser Asn Met
 115 120 125
 Gly Gly Ser Pro Lys Thr Ala Val Asp His Ile Arg Glu Ile Leu Asn
 130 135 140
 Ile Asn Gln Lys Arg Asn Asp Tyr Leu Asp Ile Tyr Ala Ile Gly Val
 145 150 155 160
 Gly Lys Leu Asp Val Asp Trp Arg Glu Leu Asn Glu Leu Gly Ser Lys
 165 170 175

Lys Asp Gly Glu Arg His Ala Phe Ile Leu Gln Asp Thr Lys Ala Leu
 180 185 190

His Gln Val Phe Glu His Met
 195

<210> 49

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Val Gly Asn Met Ser Ala Asn Ala Ser Asp Gln Glu Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Trp His Val Thr Ile Lys Pro Lys Ser Gln Glu Thr Cys Arg Gly Ala
 20 25 30

Leu Ile Ser Asp Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Asp
 35 40 45

Gly Asn Asp His Ser Leu Trp Arg Val Asn Val Gly Asp Pro Lys Ser
 50 55 60

Gln Trp Gly Lys Glu Phe Leu Ile Glu Lys Ala Val Ile Ser Pro Gly
 65 70 75 80

Phe Asp Val Phe Ala Lys Lys Asn Gln Gly Ile Leu Glu Phe Tyr Gly
 85 90 95

Asp Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gln Lys Val Lys Met Ser Thr
 100 105 110

His Ala Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Met Glu Ala Asn Leu Ala
 115 120 125

Leu Arg Arg Pro Gln Gly Ser Thr Cys Arg Asp His Glu Asn Glu Leu
 130 135 140

Leu Asn Lys Gln Ser Val Pro Ala His Phe Val Ala Leu Asn Gly Ser
 145 150 155 160

Lys Leu Asn Ile Asn Leu Lys Met Gly Val Glu Trp Thr Ser Cys Ala
 165 170 175

Glu Val Val Ser Gln Glu Lys Thr Met Phe Pro Asn Leu Thr Asp Val

Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp
 355 360 365
 Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile
 370 375 380
 Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr
 385 390 395 400

 Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys
 405 410 415
 Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro
 420 425 430
 Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn
 435 440 445
 Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val
 450 455 460
 Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met

 465 470 475 480
 Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln
 485 490 495
 Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met
 500 505 510
 Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe
 515 520 525
 Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu
 530 535 540

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

Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro

610 615 620

Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu

625 630 635 640

Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys

645 650 655

Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile

660 665 670

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

675 680 685

Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile

690 695 700

Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly

705 710 715 720

Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala

725 730 735

His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu

740 745 750

Lys Glu Lys Leu Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu

755 760

<210> 51

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr

35 40 45

Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
 50 55 60
 Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
 65 70 75 80
 Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
 85 90 95
 Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
 100 105 110
 Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
 115 120 125

 Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
 130 135 140
 Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
 165 170 175
 Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
 180 185 190
 Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
 195 200 205
 Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
 210 215 220
 Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg
 225 230
 <210> 52
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu
 1 5 10 15

Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys
 20 25 30
 Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro
 35 40 45
 Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys
 50 55 60
 Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu
 65 70 75 80
 Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr
 85 90 95

 Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp
 100 105 110
 Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met
 115 120 125
 Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp
 130 135 140
 Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn
 165 170 175
 Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His
 180 185 190
 Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln
 195 200 205
 Met Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu
 210 215 220
 His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile
 225 230 235 240

 Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val
 245 250 255
 Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp

<211> 66
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg

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

65
 <210> 54
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400>
 > 54

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

<210> 55
 <211> 58
 <212>
 > PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly
 20 25 30
 Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser
 35 40 45
 Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser Cys Gln Asp
 50 55
 <210> 56

 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56

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

 Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu
 65 70 75 80
 Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met
 85 90 95
 Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg
 100 105 110
 His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp
 115 120 125
 Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys
 130 135 140
 Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly

145 150 155 160
 Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys
 165 170 175
 Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu
 180 185 190
 Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile
 195 200
 <210> 57

 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

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

 Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His
 65 70 75 80
 Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe
 85 90 95
 Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr
 100 105 110
 Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr
 115 120 125
 Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu

 130 135 140
 Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu
 145 150 155 160

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

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

 275 280
 <210> 58
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 58
 Val Arg Cys Leu Ala Pro Ser Ser Phe Glu Asn Gly Ile Tyr Phe Pro
 1 5 10 15
 Arg Leu Val Ser Tyr Pro Val Gly Ser Asn Val Ser Phe Glu Cys Glu
 20 25 30
 Gln Asp Phe Thr Leu Arg Gly Ser Pro Val Arg Tyr Cys Arg Pro Asn
 35 40 45
 Gly Leu Trp Asp Gly Glu Thr Ala Val Cys Asp Asn Gly

 50 55 60