



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월03일
(11) 등록번호 10-1722261
(24) 등록일자 2017년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7008520
(22) 출원일자(국제) 2007년10월01일
심사청구일자 2012년09월28일
(85) 번역문제출일자 2009년04월24일
(65) 공개번호 10-2009-0064589
(43) 공개일자 2009년06월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/021152
(87) 국제공개번호 WO 2008/060367
국제공개일자 2008년05월22일
(30) 우선권주장
60/827,851 2006년10월02일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02005077981 A1
W02003105898 A1
Critical Reviews in Oncology,Hematology,
Vol.40, pp.25-35 (2001)

(73) 특허권자
메다텍스, 엘.엘.시.
미국, 08540 뉴저지, 프린스턴, 루트 206 앤드 프
로빈스 라인 로드
(72) 발명자
쿤 미셸
미국 94116 캘리포니아주 샌 프란시스코 21번 애
버뉴 2368
브람스 피터
미국 95815 캘리포니아주 새크라멘토 11번 애버뉴
2740
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 62 항

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 C X C R4에 결합하는 인간 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 높은 친화도로 CXCR4에 특이적으로 결합하는 분리된 단일클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자, 발현 벡터, 숙주 세포, 및 본 발명의 항체를 발현하는 방법을 또한 제공한다. 본 발명의 항체를 포함하는 면역접합체, 이중특이성 분자 및 약제학적 조성물을 또한 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항-CXCR4 항체를 이용하여 다양한 암, 염증성 질환 및 HIV 감염을 치료하는 방법뿐만 아니라 CXCR4를 검출하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

타나마치 던 엠

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 사이카모어
스트리트 409

쿨만 알랜

미국 94611 캘리포니아주 피에드몬트 엘 세리토 애
버뉴 301

칼다렐리 조세핀 엠

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 레슬리 드라
이브 126

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- (b) 서열번호 2의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 6의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 10의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 14의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 18의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 22의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- (c) 서열번호 3의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 7의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 11의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 15의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 19의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 23의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3; 또는
- (d) 서열번호 4의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 8의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 12의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 16의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 20의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 24의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

를 포함하며, 인간 C-X-C 케모카인 수용체 타입 4(CXCR4)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- (b) 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- (c) 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- (d) 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- (e) 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- (f) 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3

를 포함하는 단일클론 항체.

청구항 3

- (a) 서열번호 25-28 및 41-44로부터 선택되는 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열번호 29-32 및 45-48로부터 선택되는 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하며, 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체.

청구항 4

제3항에 있어서,

- (a) 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 단일클론 항체.

청구항 5

제3항에 있어서,

- (a) 서열번호 25 또는 41의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 29 또는 45의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- (b) 서열번호 26 또는 42의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 30 또는 46의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- (c) 서열번호 27 또는 43의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 31 또는 47의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- (d) 서열번호 28 또는 44의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 32 또는 48의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 단일클론 항체.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 (a) 내지 (h)의 특징들 중 하나 이상을 나타내는 단일클론 항체.

- (a) 5×10^{-8} M 이하의 K_D 로, 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합;
- (b) 기질 세포-유래 요소 1(SDF-1)이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제;
- (c) SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제하지 않음;
- (d) 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도된 칼슘 플럭스를 억제;
- (e) 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도된 이동을 억제;
- (f) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제;
- (g) 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸(apoptosis)을 유도; 및
- (h) IgG1 또는 IgG4 이소타입의 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 하기 (i) 내지 (k)의 특징들 중 하나 이상을 나타내는 단일클론 항체.

- (i) 생체내에서(in vivo) CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제하거나 또는 세포사멸을 유도;
- (j) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제; 및
- (k) CXCR4⁺ 종양을 지닌 대상체의 생존 시간을 증가.

청구항 9

제7항에 있어서, 하기 (a) 내지 (c)의 특징들 중 하나 이상을 나타내는 단일클론 항체.

- (a) 50 nM 이하의 EC_{50} 으로, SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제;
- (b) 3 nM 이하의 EC_{50} 으로, 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제; 및
- (c) 50 nM 이하의 EC_{50} 으로, 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제.

청구항 10

제7항에 있어서,

- (a) 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하고;
 - (b) SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제하며;
 - (c) 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하고;
 - (d) 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하며;
 - (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제하는,
- 단일클론 항체.

청구항 11

제7항에 있어서, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv 및 dAb 단편, 나노바디 및 단일 사슬 Fv (scFv)로부터 선택된 항체의 항원-결합부인 단일클론 항체.

청구항 12

치료제에 연결된, 제7항의 단일클론 항체를 포함하는 면역접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 치료제가 사이토크신 또는 방사성 동위원소인 면역접합체.

청구항 14

제7항의 단일클론 항체와 상이한 결합 특이성을 갖는 제 2 기능적 분절에 연결되어 있는, 상기 단일클론 항체를 포함하는 이중특이성 분자.

청구항 15

- (a) 제7항의 단일클론 항체; 또는
 - (b) 치료제에 연결된, 제7항의 단일클론 항체를 포함하는 면역접합체, 또는 사이토크신 또는 방사성 동위원소에 연결된, 제7항의 단일클론 항체를 포함하는 면역접합체; 또는
 - (c) 제7항의 단일클론 항체와 상이한 결합 특이성을 갖는 제 2 기능적 분절에 연결되어 있는, 상기 단일클론 항체를 포함하는 이중특이성 분자,
- 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 암, 종양 전이, HIV 감염, 염증 또는 신혈관형성 (angiogenesis)을 치료 또는 예방하기 위한 제약 조성물.

청구항 16

제7항의 단일클론 항체를 암호화하는, 단리된(isolated) 핵산.

청구항 17

제16항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제17항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 19

항-CXCR4 항체를 제조하는 방법으로서, 제18항의 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시키는 단계 및 상기 숙주 세포에서 상기 항체를 단리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 20

세포 내에서 CXCR4 활성을 조정하기 위하여 상기 세포를 제7항의 단일클론 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, CXCR4 수용체를 발현하는 세포 내에서 CXCR4 활성을 조정하는 시험관내(in vitro) 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 세포가 CXCR4를 발현하는 종양 세포이고, 상기 방법이 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제시키는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 세포가 CXCR4를 발현하는 T 세포이고, 상기 방법이 HIV가 상기 세포에 진입하는 것을 억제시키는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 세포가 염증성 질환 내의 림프구이고, 상기 방법이 염증을 억제시키는 것인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 세포가 혈관신생(vascularization)에 관련되어 있고, 상기 방법이 신혈관형성을 조절하는 것인 방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

제8항의 단일클론 항체를 포함하는, 대상체에서 CXCR4를 발현하는 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 종양 세포가 B 세포주, 림프종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 소세포 폐종양, 비-소세포 폐암, 유방암, 난소암, 전립선암, 췌장암, 갑상선암, 상인두암, 흑색종, 신장 세포암, 신경아세포종, 교모세포종, 횡문근육종, 결장암, 신장암, 골육종 및 전이 폐암의 세포로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 28

제7항의 단일클론 항체를 포함하는, 대상체에서 CXCR4를 발현하는 T 세포의 HIV 감염을 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 29

제7항의 단일클론 항체를 포함하는, 대상체에서 염증을 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 30

제7항의 단일클론 항체를 포함하는, 대상체에서 신혈관형성을 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 31

제7항의 단일클론 항체를 포함하는, 대상체에서 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 32

제7항에 있어서, 전장(full-length) 항체인 단일클론 항체.

청구항 33

제8항의 단일클론 항체 및 추가적 치료제를 포함하는, 대상체에서 CXCR4를 발현하는 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 추가적 치료제가 CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 항체인 제약 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 종양 세포가 췌장암 또는 소세포 폐 종양의 세포인 제약 조성물.

청구항 38

제33항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 함께 대상체에 동시 투여하기 위한 단일 제형으로 제형화되는 것인 제약 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

제8항의 단일클론 항체를 포함하는, 추가적 치료제와 병용하여 대상체에서 CXCR4를 발현하는 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 추가적 치료제가 CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 항체인 제약 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 종양 세포가 췌장암 또는 소세포 폐 종양의 세포인 제약 조성물.

청구항 47

삭제

청구항 48

제42항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제 전에 대상체에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 49

제42항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제 후에 대상체에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 50

제42항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 동시에 대상체에 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 51

제8항의 단일클론 항체 및 추가적 치료제를 동시에, 별도로 또는 순차적으로 사용하여 대상체에서 CXCR4를 발현하는 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한, 상기 단일클론 항체 및 상기 추가적 치료제를 포함하는 조합물.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 조합물.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 조합물.

청구항 54

제51항에 있어서, 상기 추가적 치료제가 CTLA-4, PD-1, 또는 PD-L1에 결합하는 항체인 조합물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 종양 세포가 췌장암 또는 소세포 폐 종양의 세포인 조합물.

청구항 56

제51항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 함께 대상체에 동시 투여하기 위한 단일 제형으로 제형화되는 것인 조합물.

청구항 57

제51항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제 전에 대상체에 투여되는 것인 조합물.

청구항 58

제51항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제 후에 대상체에 투여되는 것인 조합물.

청구항 59

제51항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 별도로 제형화되는 것으로서 상기 단일클론 항체가 상기 추가적 치료제와 동시에 대상체에 투여되는 것인 조합물.

청구항 60

제8항의 단일클론 항체 및 PD-1에 결합하는 항체를 포함하는, 대상체에서 CXCR4를 발현하며 췌장암의 세포인 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 63

제8항의 단일클론 항체를 포함하는, PD-1에 결합하는 항체와 병용하여 대상체에서 CXCR4를 발현하며 췌장암의 세포인 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한 제약 조성물.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 제약 조성물

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 제약 조성물

청구항 66

제8항의 단일클론 항체 및 PD-1에 결합하는 항체를 동시에, 별도로 또는 순차적으로 사용하여 대상체에서 CXCR4를 발현하며 췌장암의 세포인 종양 세포의 성장 또는 전이를 억제하기 위한, 상기 단일클론 항체 및 상기 PD-1에 결합하는 항체를 포함하는 조합물.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 1의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 5의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2; 서열번호 9의 서열을 갖는 아미노산을 포

합하는 중쇄 가변 영역 CDR3; 서열번호 13의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1; 서열번호 17의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및 서열번호 21의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3를 포함하는 것인 조합물.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 서열번호 25의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 서열을 갖는 아미노산을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 조합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 분리된 단일클론 항체, 특히 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체에 관한 것이다. 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 특별한 중쇄 및 경쇄 생식세포계열 서열로부터 유래되고 및/또는 특별한 아미노산 서열을 포함하는 CDR 영역과 같은 특별한 구조적 특징을 포함한다. 본 발명은 분리된 항체, 그러한 항체, 면역접합체 및 그러한 항체를 포함하는 이중특이성 분자를 제조하는 방법 그리고 본 발명의 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 암, 종양 전이, HIV 감염, 염증 및 신혈관형성과 같이, CXCR4의 발현과 관련된 또는 CXCR4/SDF-1 경로를 수반하는 질병 또는 장애에서 CXCR4 활성을 조절할 뿐만 아니라 CXCR4를 탐지하는 것과 같은, 항체를 이용하는 방법과 관련한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 암을 치료하기 위하여, 예를 들어 유방암, 난소암, 전립선암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 갑상선암, 흑색종, 상인두암, 신세포암, 림프종, 신경모세포종, 교모세포종, 횡문근육종, 직장암, 신장암, 골육종, 급성 림프구성 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병과 같은 암을 치료하기 위하여 본 발명의 항-CXCR4 항체를 이용하는 방법을 제공한다. 덧붙여, 본 발명은 종양 전이를 억제하기 위하여 본 발명의 항-CXCR4 항체를 이용하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002]

케모카인은 세포 수송 및 신혈관형성을 조절하고 또한 종양 미세환경에서 중요한 역할을 하는 약 50개의 소 단 백질의 군이다(Vicari, A.P. 및 Caux, C. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:143-154). 그들의 구조에 따라, 케모카인은 C-C 케모카인(시스테인-시스테인 모티프를 함유함) 또는 C-X-C 케모카인(시스테인-X-시스테인 모티프를 함유함)으로 분류된다. 따라서 그러한 케모카인에 결합하는 수용체들은 각각 CCR군 또는 CXCR군의 멤버로 분류된다. CXCR군의 한 멤버는 CXCR4로, 림프구 상에서 우세하게 발현되고 주화성을 활성화시키는 7 트랜스멤브레인 G-단백질 결합 수용체(seven transmembrane G-protein coupled receptor)이다. CXCR4는 케모카인 CXCL12(SDF-1)에 결합한다.

[0003]

CXCR4는 배발생, 항상성 및 병리적 염증에서 역할을 한다. CXCR4 또는 SDF-1이 결핍되도록 조작된 쥐의 연구는 면역 및 조혈 시스템은 물론 기관 혈관신생에서 CXCR4/SDF-1 경로를 함축한다(Tachibana, K. 등 (1998) *Nature* 393:591-594). 또한, CXCR4가 T 백혈병 HIV-1 분리체의 공수용체로서 기능하는 것으로 알려졌다(Feng, Y. 등 (1996) *Science* 272:872-877). CXCR4은 또한 다양한 암 세포 타입에서 발현되는 것으로 알려졌다. 덧붙여, CXCR4/SDF-1 경로는 많은 상이한 종양에서의 전이 과정을 자극하는 것과 관련되는 것으로 알려졌다(Murphy, P.M. (2001) *N. Engl. J. Med.* 345:833-835). 예를 들어, CXCR4 및 SDF-1은 주요 종양 부위와 전이 부위 사이에 주화성 구배를 야기함으로써 기관-특이성 전이를 전달하는 것으로 알려졌다(Muller, A. 등 (2001) *Nature* 410:50-56; Murakami, T. 등 (2002) *Cancer Res.* 62:7328-7334; Hanahan, D. 등 (2003) *Cancer Res.* 63:3005-3008).

발명의 상세한 설명

[0004]

<발명의 개요>

[0005]

본 발명은 인간 CXCR4에 결합하고 수많은 원하는 성질을 보이는, 분리된 단일 클론 항체, 특히 인간 단일클론 항체를 제공한다. 이러한 성질은 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합하는 능력, SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제하는 능력, CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하는 능력, CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하는 능력, 인간 체대 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells, HuVECs)에 의한 모세관 형성을 억제하는 능력, CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도

하는 능력, 시험관내 종양 세포 증식을 억제하는 능력, 생체내 종양 세포 증식을 억제하는 능력, CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제하는 능력 및/또는 CXCR4⁺ 종양을 지닌 대상체의 생존 시간을 증가시키는 능력을 포함한다.

- [0006] 한 관점에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부에 관한 것으로, 상기 항체는 세포 표면에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합한다. 한 실시예에서, 상기 항체는 또한, 바람직하게는 50 nM 이하, 또는 30 nM 이하, 또는 15 nM 이하, 또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 3 nM 이하의 억제에 대한 EC₅₀(예컨대, 28.60 nM 이하, 또는 12.51 nM 이하, 또는 2.256 nM 이하의 억제에 대한 EC₅₀)으로, SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제한다. 다른 실시예에서, 상기 항체는 세포 표면에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합하지만, SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제하지 않는다. 또 다른 실시예에서, 상기 항체는 또한, 바람직하게는 3 nM 이하, 또는 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.9 nM 이하, 또는 0.8 nM 이하, 또는 0.7 nM 이하, 또는 0.6 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하, 또는 0.4 nM 이하 (예컨대, 0.9046 nM 이하, 0.5684 nM 이하, 또는 0.3219 nM 이하)의 억제에 대한 EC₅₀으로, 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제한다. 또 다른 실시예에서, 상기 항체는 또한, 바람직하게는 50 nM 이하, 또는 30 nM 이하, 또는 20 nM 이하, 또는 15 nM 이하 (예컨대, 18.99 nM 이하, 또는 12.44 nM 이하)의 억제에 대한 EC₅₀으로, 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제한다. 또 다른 실시예에서, 상기 항체는 또한, HuVECs 에 의한 모세관 형성을 억제하고, CXCR4를 발현하는 세포의 세포사멸을 유도하며, 시험관내 종양 세포 증식을 억제하고, 생체내 종양 세포 증식을 억제하거나 종양 세포의 세포사멸을 유도하며, CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제하고 및/또는 CXCR4⁺ 종양을 지닌 대상체의 생존 시간을 증가시킨다.
- [0007] 바람직하게, 상기 항체는 고친화도, 예컨대 1×10^{-7} M 이하의 K_D 또는 5×10^{-8} M 이하의 K_D로 인간 CXCR4에 결합한다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 항체는 전장(full-length) 항체(즉, 가변 및 불변 부위를 포함)이다. 또한, 본 발명의 항체는 바람직하게 숙주 세포 상의 또는 인공 멤브레인 내의 고유 형태에서 발현되는 전장 인간 CXCR-4에 대하여 키워진다.
- [0008] 바람직한 관점에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부에 관한 것으로, 상기 항체는:
- [0009] (a) 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합하고;
- [0010] (b) SDF-1이 인간 CXCR4에 결합하는 것을 억제하며;
- [0011] (c) 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하고;
- [0012] (d) 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하며; 및
- [0013] (e) 인간 제대 정맥 내피 세포에 의한 모세관 형성을 억제한다.
- [0014] 더 바람직하게는, 상기 항체는 또한 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 세포사멸을 유도하고 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제하며 및/또는 생체내 종양 세포의 세포사멸을 유도한다.
- [0015] 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 인간 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부에 관한 것으로, 상기 항체는 CXCR4에 결합하는 것에 대하여 기준 항체와 교차-경쟁하며, 상기 참조 항체는:
- [0016] (a) 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0017] (b) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0018] (c) 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0019] (d) 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0020] 소정의 실시예에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 이것은 인간 V_H 3-

48 유전자의 산물인 또는 그로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 이것은 인간 $V_k L 15$ 유전자의 산물인 또는 그로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 이것은 인간 $V_h 3-48$ 유전자의 산물인 또는 그로부터 유래되는 중쇄 가변 영역 및 인간 $V_k L 15$ 유전자의 산물인 또는 그로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다.

- [0021] 다른 관점에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하는데,
- [0022] CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며;
- [0023] (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 9-12의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
- [0024] (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 21-24의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 및
- [0025] (c) 상기 항체는 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합한다.
- [0026] 바람직한 실시예에서, 이 항체는 또한 다음의 특징들 중 한가지 이상을 가진다: SDF-1가 CXCR4에 결합하는 것을 억제, CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제, CXCR-4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제, HuVECs에 의한 모세관 형성을 억제, CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도(시험관내 및/또는 생체내에서), 시험관내 및/또는 생체내에서 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제, 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제한다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 5-8의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 상기 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 17-20의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 1-4의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 상기 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 13-16의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0028] 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0029] (a) 서열번호 1을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0030] (b) 서열번호 5를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0031] (c) 서열번호 9를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0032] (d) 서열번호 13을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0033] (e) 서열번호 17을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0034] (f) 서열번호 21을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0035] 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0036] (a) 서열번호 2를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0037] (b) 서열번호 6을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0038] (c) 서열번호 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0039] (d) 서열번호 14를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0040] (e) 서열번호 18을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0041] (f) 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0042] 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:

- [0043] (a) 서열번호 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0044] (b) 서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0045] (c) 서열번호 11을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0046] (d) 서열번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0047] (e) 서열번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0048] (f) 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0049] 다른 바람직한 조합은 다음을 포함한다:
- [0050] (a) 서열번호 4를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0051] (b) 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0052] (c) 서열번호 12를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0053] (d) 서열번호 16을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0054] (e) 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0055] (f) 서열번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0056] 본 발명의 다른 바람직한 항체, 또는 이의 항원 결합부는, (a) 서열번호 25-28 및 서열번호 41-44로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 29-32 및 서열번호 45-48로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며; 상기 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합한다.
- [0057] 바람직한 조합은 (a) 서열번호 25 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 29 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0058] 다른 바람직한 조합은 (a) 서열번호 26 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 30 또는 46의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0059] 다른 바람직한 조합은 (a) 서열번호 27 또는 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 31 또는 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0060] 다른 바람직한 조합은 (a) 서열번호 28 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 32 또는 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0061] 본 발명의 다른 관점에서, CXCR4에 결합하는 데에 있어서 임의의 상술된 항체와 경쟁하는, 항체, 또는 이의 항원-결합부가 제공된다.
- [0062] 본 발명의 항체는, 예를 들어 IgG1 또는 IgG4 이소타입의, 예를 들어, 전장 항체일 수 있다. 대안적으로, 상기 항체는, Fab, Fab' 또는 Fab' 2 단편과 같은, 항체 단편 또는, 단일 사슬 항체일 수 있다.
- [0063] 본 발명은 또한 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체를 제공하며, 이는 사이토톡신 또는 방사성 동위원소와 같이, 치료제에 연결되어 있다. 본 발명은 또한, 본 발명의, 항체, 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 이중특이성 분자를 제공하는데, 이는 상기 항체, 또는 이의 항원 결합부와는 다른 결합 특이성을 갖는 제 2 기능적 분절에 연결되어 있다.
- [0064] 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합부, 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.
- [0065] 본 발명의, 상기 항체, 또는 이의 항원-결합부를 암호화하는 핵산 분자 또한 본 발명에 포함되며, 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터 및 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포 역시 본 발명에 포함된다. 또한 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 이용하여 항-CXCR4 항체를 제조하는 방법이 제공되고, 이 방법은 (i) 상기 숙주 세포 내에서 상기 항체를 발현시키는 단계 및 (ii) 상기 숙주 세포로부터 상기 항체를 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명이 다른 관점은 세포에서 CXCR4 활성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 상기 세포는, 본 발명의 항체, 또

는 이의 항원-결합부에 접촉된다. 상기 세포를 상기 항체와 함께 배양함으로써 시험관내에서 상기 세포를 접촉시킬 수 있고 대상체에 상기 항체를 투여함으로써 생체내에 상기 세포를 접촉시킬 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 세포는 CXCR4를 발현하는 종양 세포이고 상기 방법으로써 종양 세포의 성장을 억제 및/또는 상기 종양 세포의 전이를 억제한다. 다른 실시예에서, 상기 세포는 CXCR4를 발현하는 T 세포이고 상기 방법으로써 HIV가 상기 세포에 진입하는 것을 억제한다. 또 다른 실시예에서, 상기 세포는 염증성 질환 내의 림프구이고 상기 방법으로써 염증을 억제한다. 또 다른 실시예에서, 상기 세포는 혈관신생에 관련되어 있고 상기 방법으로써 신혈관형성을 조절한다.

[0067] 다른 관점에서, 본 발명은 대상체의 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 자극하는 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 자극하기 위하여 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합부를 상기 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 예를 들어 자가조직 줄기 세포 이식에서 이용하기 위하여, 상기 말초 혈액으로부터 상기 CD34⁺ 줄기 세포를 모으는 것을 더 포함한다.

[0068] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 제한적으로 해석되어서는 안 될 하기의 상세한 설명 및 실시예로부터 명확해질 것이다. 본 명세서 전체에 인용된 모든 참조 문헌, 진뱅크(Genbank) 등록 번호, 특허 및 공개 특허 출원서의 내용은 참조를 위하여 본 명세서에 명백히 포함된다.

[0069] <상세한 설명>

[0070] 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 특히 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체에 관한 것이다. 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 특별한 중쇄 및 경쇄 생식세포계열 서열로부터 유래되고 및/또는 특별한 아미노산 서열을 포함하는 CDR 영역과 같은 특별한 구조적 특징을 포함한다. 본 발명은 분리된 항체, 그러한 항체, 면역접합체 및 그러한 항체를 포함하는 이중특이성 분자를 제조하는 방법 그리고 본 발명의 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 암, 종양 전이, HIV 감염, 염증 및 신혈관형성과 같이, CXCR4의 발현과 관련된 또는 CXCR4/SDF-1 경로를 수반하는 질병 또는 장애에서 CXCR4 활성을 조절할 뿐만 아니라 CXCR4를 탐지하는 것과 같은, 항체를 이용하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 암을 치료하기 위하여, 예를 들어 유방암, 난소암, 전립선암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 갑상선암, 흑색종, 상인두암, 신세포암, 림프종, 신경모세포종, 교모세포종, 횡문근육종, 직장암, 신장암, 골육종, 급성 림프구성 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병과 같은 암을 치료하기 위하여 본 발명의 항-CXCR4 항체를 이용하는 방법을 제공한다. 덧붙여, 본 발명은 종양 전이를 억제하기 위하여 본 발명의 항-CXCR4 항체를 이용하는 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명이 더욱 쉽게 이해될 수 있게 하기 위하여, 소정의 용어가 우선 정의된다. 추가적 정의가 상세한 설명 전체에 걸쳐 기술되어 있다.

[0072] 용어 "CXCR4"는 변이체(variants), 이소형태(isoforms), 상동체(homologs), 오르토로그(orthologs) 및 파라로그(paralogs)를 포함한다. 예를 들어, CXCR4에 특이적인 항체는, 어떤 경우에서, 인간 이외의 종으로부터의 CXCR4와 교차-반응한다. 다른 실시예에서, 인간 CXCR4에 특이적인 항체는 인간 CXCR4에 완전하게 특이적일 수 있고 종 또는 다른 타입의 교차 반응성을 보일 수 없다. 용어 "인간 CXCR4"는 진뱅크(Genbank) 기탁 번호 P61073 (서열번호 51)을 갖는 인간 CXCR4의 완전한 아미노산 서열과 같은, 인간 서열 CXCR4를 지칭한다. CXCR4는 또한, 예를 들어, LESTR, Fusin 또는 CD184와 같이 당해 분야에서 알려져 있다. 인간 CXCR4 서열은, 예를 들어, 보존적 돌연변이 또는 비-보존 영역 내 돌연변이를 가짐으로써 서열번호 51의 인간 CXCR4와는 다를 수 있고 CXCR4는 본질적으로 서열번호 51의 인간 CXCR4과는 동일한 생물학적 기능을 가진다. 예를 들어, 인간 CXCR4의 생물학적 기능은 본 발명의 항체에 의하여 특이적으로 결합된 CXCR4의 세포 밖 도메인 내에 에피토프(epitope)를 가지는 것이거나 또는 인간 CXCR4의 생물학적 기능은 전이 과정에서 케모카인 결합 또는 관여이다.

[0073] 특정한 인간 CXCR4 서열은 일반적으로 서열번호 51의 인간 CXCR4와 아미노산 서열에 있어서 적어도 90%가 동일할 것이고 다른 종(예컨대 쥐와 동물)의 CXCR4 아미노산 서열과 비교할 때 인간이라는 것으로서의 아미노산 서열을 정의하는 아미노산 잔기들을 함유한다. 어떤 경우에서, 인간 CXCR4는 아미노산 서열에 있어서 서열번호 51의 CXCR4와 적어도 95%, 또는 심지어는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99%가 동일할 수 있다. 어떤 실시예에서, 인간 CXCR4 서열은 서열번호 51의 CXCR4와는 단지 10 개의 아미노산 차이를 보일 수 있다. 어떤 실시예에서, 인간 CXCR4는 서열번호 51의 CXCR4와는 단지 5, 또는 심지어 4, 3, 2, 또는 1 개의 아미노산 차이를 보일 수 있다. 퍼센트 동일성은 본 명세서에서 설명한 바와 같이 결정될 수 있다.

- [0074] 용어 "SDF-1"는 CXCR4의 리간드인 기질 세포-유래 요소 1을 지칭한다. 용어 "SDF-1"는 SDF-1 α 및 SDF-1 β 와 같은, SDF-1의 상이한 이소형태를 포함한다. 인간 SDF-1 α 의 아미노산 서열은 진뱅크(Genbank) 기탁 번호 NP_954637을 가진다. 인간 SDF-1 β 의 아미노산 서열은 진뱅크(Genbank) 기탁 번호 NP_000600을 가진다. 인간 SDF-1은 또한 미국 특허 제5,756,084호에 기술되어 있다. SDF-1은 또한 CXCL12로서 알려져 있다. 인간 SDF-1의 아미노산 서열은, 본 명세서에 CXCR4를 기술한 바와 같이, NP_954637 또는 NP_000600의 SDF-1과 다를 수 있다.
- [0075] 용어 "면역 반응"은 예를 들어, 림프구, 항원 제시 세포, 식세포, 과립구, 및 상기 세포들 또는 간(항체, 사이토카인(cytokines) 및 보체를 포함)에 의하여 생산되는 가용성 거대분자의 거동을 말하는데, 이것은 침입 병원체, 병원체에 감염된 세포 또는 조직, 암세포, 또는 자가면역 또는 병리적 염증의 경우에서 있어서, 보통 인간 세포 또는 조직에 손상을 주거나 그것을 파괴하거나 또는 그것을 인간 신체로부터 제거하는 결과를 가져온다.
- [0076] "신호 전달 경로"는 세포의 한 부분에서 세포의 또 다른 부분으로의 신호 전달에 있어서 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. 본원에서 사용되는 어구 "세포 표면 수용체"는 예를 들어, 신호를 받고 그 신호를 세포의 원형질 막을 가로질러 전달할 수 있는 분자 및 분자의 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예는 CXCR4 수용체이다.
- [0077] 본 명세서에서 지칭되는 용어 "항체"는, 온전한 항체 및 이의 항원 결합 단편(즉, "항원-결합부") 또는 단일 사슬을 포함한다. "항체"는 이항화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 두개의 중쇄(H) 및 적어도 두개의 경쇄(L), 또는 이의 항원 결합부를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(V_H 로 약자화) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 이러한 중쇄 불변 영역은 세가지 도메인, C_H1 , C_H2 및 C_H3 으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(V_L 로 약자화) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 이러한 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역들은, 상보성 결정부위(CDR)로 불리워지는, 추가변 영역들로 더 나눌 수 있는데, 이들은 골격부(framework region, FR)로 불리우는 더 보존적인 부위와 섞여있다. 각 V_H 및 V_L 은 세 개 CDR과 네 개 FR로 구성되고, 이들은 아미노 말단에서부터 카르복시 말단방향으로 하기 순서로 정렬되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 상기 항체들의 불변 영역은, 면역계(예, 작동(effector) 세포) 및 전통적인 보체계(classical complement system)의 제 1 요소(C1q)를 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 면역글로불린을 결합시키는 것을 매개할 수 있다.
- [0078] 용어 항체의 "항원-결합부"(간단히 "항원부")는, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 항원(예컨대, CXCR4)에 특이하게 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편들을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의하여 수행될 수 있음을 보여 주었다. 용어 항체의 "항원-결합부" 내에 포함되는 결합 단편들의 예는, (i) Fab 단편, 즉 V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인으로 구성되는 1가 단편; (ii) F(ab')₂ 단편, 즉, 힌지 부위에서 이항화 다리(disulfide bridge)에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (iii) Fab' 단편, 즉, 힌지 부위의 일부를 가지는, 본질적으로 Fab(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993) 참조); (iv) V_H 및 C_H1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (v) 항체의 단일 팔(arm)의 V_L 와 V_H 도메인으로 구성되는 Fv 단편; (vi) V_H 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward 등, (1989) *Nature* 341:544-546); (vii) 분리된 상보성 결정 부위(CDR); 및 (viii) 나노바디, 즉 단일 가변 도메인 및 두 개의 불변 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 개 도메인, V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의해 암호화 되어 있지만, 그것들은 재조합 방법들을 사용하여, 합성 링커에 의해 결합되어 단일 단백질 사슬로서 만들어 질 수 있고, 여기서 V_L 및 V_H 부위들은 짝을 이뤄 단일가 분자를 형성하게 된다(단일 사슬 Fv (scFv)로서 공지됨; 예, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조). 그러한 단일 사슬 항체들은 또한 항체의 "항원-결합부" 용어의 범위내에 내포되는 것으로 의도된다. 이러한 항체 단편들은 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 기술을 사용하여 얻을 수 있고, 상기 단편들을 본래의 항체들과 동일한 방식으로 검출하여 이용할 수 있다.
- [0079] "분리된 항체"는, 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 상이한 항원 특이성들을 가지는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, CXCR4와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 CXCR4 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체들이 실질적으로 없다). 그러나 CXCR4에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터 유래한 CXCR4 분자와 같은 다른 항원에 교차 반응성(cross-reactivity)을 가진다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포성 물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없을 수 있다.

- [0080] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"은, 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다. 용어 "인간 항체"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 골격 부위 및 CDR 부위 양쪽 다 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래한 가변 영역을 가지는 항체들을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 상기 항체가 불변 영역을 포함한다면, 그 불변 영역 또한 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 본 발명의 인간 항체들은 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기들(예, 시험관 내 랜덤 또는 부위-특이적(site-specific) 돌연변이생성(mutagenesis)에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 유도된 돌연변이들)을 포함할 수 있다. 그러나, 본 명세서에서 사용되는, 용어 "인간 항체"는, 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 이식된 항체들을 포함하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0081] 용어 "인간 단일클론 항체"는 골격 부위 및 CDR 부위 둘 다가 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래된 가변 부위를 가지는 단일 결합 특이성을 보이는 항체들을 지칭한다. 일 실시예에서, 상기 인간 단일클론 항체들은, 무한증식 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스유전자 및 경쇄 트랜스유전자를 포함하는 계능을 가지는, 유전자이식 비인간 동물, 예를 들어, 유전자이식 쥐로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.
- [0082] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "재조합 인간 항체"는, 재조합 수단에 의해 제조되고, 발현되며, 만들어지고 또는 분리된 모든 인간 항체들, 예를 들어, (a) 인간 면역글로불린 유전자들에 대하여 트랜스유전자성(transgenic) 이거나 트랜스염색체성(transchromosomal)인 동물(예, 마우스)로부터 또는 이로부터 제조된 하이브리도마(후속적으로 설명됨)로부터 분리된 항체들, (b) 형질전환되어 인간 항체를 발현하는 숙주세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 분리된 항체들, (c) 재조합, 조합성 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열들을 다른 DNA 서열들로 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되고, 발현되며, 만들어지거나 분리된 항체들을 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체들은 골격 부위 및 CDR 부위가 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래되는 가변 부위를 가지고 있다. 그러나 어떤 실시예에서, 그러한 재조합 인간 항체들은 시험관 내 돌연변이생성(mutagenesis) (또는 인간 Ig 서열들에 대해 유전자이식된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이생성)으로 처리될 수 있고, 따라서 재조합 항체들의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열들은, 인간 생식세포계열 V_H 및 V_L 서열들로부터 유래되고 이에 관련된 것이지만, 생체 내에서 인간 항체 생식세포계열 원천에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열들이다.
- [0083] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자들에 의해 암호화되는 항체 등급 (예, IgM 또는 IgG1)을 지칭한다.
- [0084] 어구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환적으로 사용된다.
- [0085] 용어 "인간 항체 유도체"는 인간 항체의 임의의 변이형태, 예를 들어, 항체 및 다른 제제나 또는 항체의 접합체를 지칭한다.
- [0086] 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 접합된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 추가의 골격 부위 변형이 인간 골격 서열내에서 이루어질 수 있다.
- [0087] 용어 "키메릭 항체"는 가변 영역 서열들이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 다른 종으로부터 유래된 항체들, 예를 들어, 가변 영역 서열들이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는, "인간 CXCR4에 특이적으로 결합하는" 항체는 인간 CXCR4 (및 가능하면 하나 이상의 비-인간 종으로부터의 CXCR4)에 결합하나 본질적으로 비-CXCR4 단백질에 결합하지 않는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 서열번호 51의 인간 CXCR4 또는 이의 변형체에 특이적으로 결합한다. 항체는, 바람직하게는 1×10^{-7} M 이하, 더 바람직하게는 5×10^{-8} M 이하, 더 바람직하게는 3×10^{-8} M 이하, 더 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하의 K_D 로, 인간 CXCR4에 결합한다.
- [0089] 본 명세서에서 사용되는, 단백질 또는 세포에 "실질적으로 결합하지 않는"이라는 용어는, 단백질 또는 세포에

결합하지 않거나 또는 높은 친화도로 결합하지 않는 것, 즉, 단백질 또는 세포에 1×10^{-6} M 이상, 더 바람직하게는 1×10^{-5} M 이상, 더욱 바람직하게는 1×10^{-4} M 이상, 더욱더 바람직하게는 1×10^{-3} M 이상, 더욱더 바람직하게는 1×10^{-2} M 이상의 K_D 로 결합하는 것을 의미한다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는, 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는, 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도(association rate)를 지칭하는 것이고, 본 명세서에서 사용되는, 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d "는, 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 " K_D "는, K_d 대 K_a 의 비율(즉, K_d/K_a)로부터 얻어지고, 몰 농도(M)로 표시되는 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체들에 대한 K_D 값은 당해 분야에 설정된 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하는 바람직한 방법은 표면 플라즈몬(plasmon) 공명, 바람직하게, Biacore®시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는, IgG 항체에 대한 "고친화도"라는 용어는 타겟 항원에 대하여 1×10^{-7} M 이하, 더 바람직하게는 5×10^{-8} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 1×10^{-8} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 5×10^{-9} M 이하, 그리고 및 더욱 더 바람직하게는 1×10^{-9} M 이하의 K_D 를 가지는 항체를 지칭한다. 그러나, "고친화도"결합은 다른 항체 이소타입(isotypes)에 대하여 다양해질 수 있다. 예를 들어, IgM에 대한 "고친화도"결합은 10^{-6} M 이하, 더 바람직하게는 10^{-7} M 이하, 더욱 더 바람직하게는 10^{-8} M 이하의 K_D 를 가지는 항체를 지칭한다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 예를 들어, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 어류, 파충류 등과 같은, 포유 동물 및 비포유 동물의 모든 척추동물을 포함한다.

[0093] 본 발명의 다양한 양상들을 하기 소단락에서 더 상세하게 설명한다.

[0094] 항-CXCR4 항체

[0095] 본 발명의 항체는 항체의 특정한 기능적 특징 또는 성질을 특징으로 하고 있다. 예를 들어, 항체는 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합한다. 바람직하게, 본 발명의 항체는 고친화도, 예컨대 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 CXCR4에 결합한다. 본 발명의 항-CXCR4는 바람직하게는 다음의 특징 중 하나 이상을 보여준다:

- [0096] (a) 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합하는 것;
- [0097] (b) SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제하는 것;
- [0098] (c) CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하는 것;
- [0099] (d) CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하는 것;
- [0100] (e) 인간 제대 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells)에 의한 모세관 형성을 억제하는 것;
- [0101] (f) 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하는 것;
- [0102] (g) CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도하는 것;
- [0103] (h) 시험관 내 종양 세포 증식을 억제하는 것;
- [0104] (i) 생체 내에서 종양 세포 증식을 억제하는 것 및/또는 종양 세포의 세포사멸을 유도하는 것;
- [0105] (j) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제하는 것; 및/또는
- [0106] (k) CXCR4⁺ 종양을 지닌 대상체의 생존 시간을 늘리는 것.

[0107] 어떤 실시예에서, 본 발명의 항체는 세포 표면 상에서 천연 인간 CXCR4에 결합하지만 SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제하지 않으며 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하지 않고 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하지 않는다. 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 세포 표면 상에서 천연 인간 CXCR4에

결합하며 SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제하고 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하지만 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하지 않는다. 또한 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 세포 표면 상에서 천연 인간 CXCR4에 결합하며 SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제하고 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하며 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제한다. 또한 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 세포 표면 상에서 천연 인간 CXCR4에 결합하며, SDF-1의 CXCR4에의 결합을 억제하고, CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제하며, CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제하고, HuVECs 에 의한 모세관 형성을 억제한다.

[0108] 바람직하게, 본 발명의 항체는 5×10^{-8} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하거나, 2×10^{-8} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하거나, 5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하거나, 4×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하거나, 3×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하거나, 또는 2×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합한다.

[0109] 바람직하게, 본 발명의 항체는 50 nM 이하, 더 바람직하게 30 nM 이하, 또는 15 nM 이하, 또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 3 nM 이하의 억제에 대한 EC_{50} (예컨대, 28.60 nM 이하, 또는 12.51 nM 이하, 또는 2.256 nM 이하의 억제에 대한 EC_{50})으로 SDF-1의 인간 CXCR4에의 결합을 억제한다.

[0110] 바람직하게, 본 발명의 항체는 3 nM 이하, 더 바람직하게 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.9 nM 이하, 또는 0.8 nM 이하, 또는 0.7 nM 이하, 또는 0.6 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하, 또는 0.4 nM 이하(예컨대, 0.9046 nM 이하, 0.5684 nM 이하, 또는 0.3219 nM 이하)의 억제에 대한 EC_{50} 으로 인간 CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스를 억제한다.

[0111] 바람직하게, 본 발명의 항체는 50 nM 이하, 더 바람직하게 30 nM 이하, 또는 20 nM 이하, 또는 15 nM 이하(예컨대, 18.99 nM 이하, 또는 12.44 nM 이하)의 억제에 대한 EC_{50} 으로 인간 CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1-유도 이동을 억제한다.

[0112] 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 대한 항체들의 결합 능력을 평가하기 위한 표준 분석법은, 예를 들어, 자연적으로 천연 CXCR4를 발현하거나 또는 천연 CXCR4를 발현하기 위하여 감염된 세포주를 이용하는 유세포 분석법(flow cytometry analysis)을 포함하여 당해 분야에 공지되어 있다. 적절한 분석법은 실시예에 자세히 기술되어 있다. 천연 CXCR4를 발현하는 바람직한 세포주는 CEM T 세포주이다. SDF-1의 결합의 억제, SDF-1 유도 칼슘 플럭스의 억제, SDF-1 유도 세포 이동의 억제, HuVECs 에 의한 모세관 형성의 억제, 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸의 유도, 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장의 억제, 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포의 전이의 억제를 평가하기 위한 적절한 분석법 또한 실시예에 자세히 기술되어 있다. 항체의 결합 친화도 또한, 스캐차드(Scatchard) 분석과 같은, 표준 방법에 의하여 결정할 수 있다.

[0113] 단일클론 항체 F7, F9, D1 및 E2

[0114] 본 발명의 바람직한 항체는 실시예 1 및 2에 기술된 바와 같이 분리되고 구조적으로 특징된, 인간 단일클론 항체 F7, F9, D1 및 E2이다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H 아미노산 서열은 각각 서열번호 25, 26, 27 및 28에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_L 아미노산 서열은 각각 서열번호 29, 30, 31 및 32에 보인다. 덧붙여, 소정의 골격 잔기가 생식세포계열 잔기로 치환된 F7, F9, D1 및 E2의 대안적 형태가 만들어졌고 본 명세서에서 F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL로 지칭된다. F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL의 V_H 아미노산 서열은 각각 서열번호 41, 42, 43 및 44에 보인다. F7GL, F9GL, D1GL 및 E2GL의 V_L 아미노산 서열은 각각 서열번호 45, 46, 47 및 48에 보인다.

[0115] 이러한 항체의 각각이 CXCR4에 결합할 수 있다면, V_H 및 V_L 서열은 "혼합되고 짝지워져서" 본 발명의 다른 항-CXCR4 결합 분자를 만들 수 있다. 그러한 "혼합되고 짝지워진" 항체의 CXCR4 결합은 상기 및 실시예에서 기술된 결합 분석법(예컨대, CEM 세포를 이용하는 유세포 분석법)을 사용하여 검사할 수 있다. 바람직하게, V_H 및 V_L 사슬이 혼합되고 짝지워질 때, 특정 V_H/V_L 접합으로부터의 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 마찬가지로, 바람직하게 특정 V_H/V_L 접합으로부터의 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다.

- [0116] 따라서, 일 관점에서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하고:
- [0117] (a) 서열번호 25-28 및 41-44로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- [0118] (b) 서열번호 29-32 및 45-48로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0119] 여기에서 항체는 CXCR4, 바람직하게는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다.
- [0120] 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은 다음을 포함한다:
- [0121] (a) 서열번호 25 또는 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 29 또는 45의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0122] (b) 서열번호 26 또는 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 30 또는 46의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0123] (c) 서열번호 27 또는 43의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 31 또는 47의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0124] (d) 서열번호 28 또는 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 32 또는 48의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0125] 다른 관점에서, 본 발명은 F7, F9, D1 또는 E2의 중쇄 및 경쇄 CDR1들, CDR2들 및 CDR3들 또는 이의 조합물들을 포함하는 항체를 제공한다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR1들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1-4에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR2들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 5-8에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H CDR3들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 9-12에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR1들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 13-16에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR2들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 17-20에 보인다. F7, F9, D1 및 E2의 V_K CDR3들의 아미노산 서열은 각각 서열번호 21-24에 보인다. CDR 영역은 카밧 시스템(Kabat system)을 이용하여 그 윤곽이 그려져 있다(Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).
- [0126] 이러한 항체 각각이 CXCR4에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 CDR1, CDR2, 및 CDR3 영역에 의하여 일차적으로 제공된다면, V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열과 V_K CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은 "혼합되고 짝지어져서" (즉, 비록 각 항체가 V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열과 V_K CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하더라도 상이한 항체들의 CDR들이 혼합되고 짝지어질 수 있음), 본 발명의 다른 항-CXCR4 결합 분자를 만들 수 있다. 그러한 "혼합되고 짝지어진" 항체의 CXCR4 결합은 상기 및 실시예에서 기술된 결합 분석법(예컨대, ELISAs, Biacore[®] 분석)을 이용하여 검사할 수 있다. 바람직하게, V_H CDR 서열이 혼합되고 짝지어질 때, 특정 V_H 서열의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, V_K CDR 서열이 혼합되고 짝지어질 때, 특정 V_K 서열의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 영역 서열을 단일클론 항체 F7, F9, D1 및 E2의 본 명세서에 공지된 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 신규한 V_H 및 V_L 서열을 만들 수 있다는 것은 통상적으로 숙련된 기술자에게는 확실히 명백하다.
- [0127] 따라서, 다른 관점에 있어서, 본 발명은 다음을 포함하는 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공한다:
- [0128] (a) 서열번호 1-4로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0129] (b) 서열번호 5-8로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0130] (c) 서열번호 9-12로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0131] (d) 서열번호 13-16으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0132] (e) 서열번호 17-20으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0133] (f) 서열번호 21-24로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3;

- [0134] 여기에서 항체는 CXCR4, 바람직하게는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다.
- [0135] 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- [0136] (a) 서열번호 1을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0137] (b) 서열번호 5를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0138] (c) 서열번호 9를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0139] (d) 서열번호 13을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0140] (e) 서열번호 17을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0141] (f) 서열번호 21을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0142] 다른 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- [0143] (a) 서열번호 2를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0144] (b) 서열번호 6을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0145] (c) 서열번호 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0146] (d) 서열번호 14를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0147] (e) 서열번호 18을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0148] (f) 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0149] 다른 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- [0150] (a) 서열번호 3을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0151] (b) 서열번호 7을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0152] (c) 서열번호 11을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0153] (d) 서열번호 15를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0154] (e) 서열번호 19를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0155] (f) 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0156] 다른 바람직한 실시예에서, 상기 항체는 다음을 포함한다:
- [0157] (a) 서열번호 4를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- [0158] (b) 서열번호 8을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- [0159] (c) 서열번호 12를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- [0160] (d) 서열번호 16을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- [0161] (e) 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- [0162] (f) 서열번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3.
- [0163] CDR3 도메인은, CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과 독립적으로, 단독으로 동족체 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정지을 수 있다는 것과 공통의 CDR3 서열에 근거하여 동일한 결합 특이성을 가지는 다중 항체들이 발생될 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Klimka 등, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (쥐 항-CD30 항체 Ki-4의 중쇄 가변 영역 도메인 CDR3만을 사용한 인간화된 항-CD30의 생산을 설명함); Beiboer 등, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (부모 쥐 MOC-31 항-EGP-2 항체의 중쇄 CDR3 서열만을 사용한 재조합 상피 당단백질-2 (EGP-2) 항체를 설명함); Rader 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (쥐 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체 LM609의 중쇄 및 경쇄 가변 CDR3 도메인을 사용한 인간화된 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체들의 패널을 설명하고 있고 여기서 각 항체 구성원은 CDR3 도메인 외부에 있고 부모 쥐 항체와 동일하거나 더 높은 친화도를 가지고 부모 쥐 항체와 동일한 에피토프를 결합할 수 있는 고유의 서열을 포함함);

Barbas 등, *J. Am. Chem. Soc.* **116**:2161-2162 (1994) (CDR3 도메인은 항원 결합에 가장 중대한 공헌을 한다는 것을 설명함); Barbas 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:2529-2533 (1995) (인간 태반 DNA에 대한 세 개 Fab (SI-1, SI-40, 및 SI-32)의 중쇄 CDR3 서열들을 항-파상풍 유독소(toxoid) Fab의 중쇄에 접합하고 이로써 기존의 중쇄 CD3를 대체하는 것을 설명하고, CDR3 도메인 단독으로 결합 특이성을 부여한다는 것을 증명함); Ditzel 등, *J. Immunol.* **157**:739-749 (1996) (부모 다중특이성 Fab LNA3의 중쇄 CDR3 만을 단일특이적인 IgG 파상풍 유독소-결합 Fab p313 항체의 중쇄에 전달하는 것으로도 부모 Fab의 결합 특이성을 유지하는 데 충분하다는 결과를 나타낸 이식 연구를 설명함); Berezov 등, *BIAjournal* **8**:Scientific Review 8 (2001) (항-HER2 단일클론 항체의 CDR3에 근거한 펩티드 유사체를 설명함); Igarashi 등, *J. Biochem (Tokyo)* **117**:452-7 (1995) (항-포스포티딜세린 항체의 CDR3 도메인에 해당하는 12 아미노산 합성 폴리펩티드를 설명함); Bourgeois 등, *J. Virol* **72**:807-10 (1998) (항-호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 항체의 중쇄 CDR3 도메인으로부터 유래된 단일 펩티드가 시험관내에서 바이러스를 중화할 수 있다는 것을 보여줌); Levi 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:4374-8 (1993) (쥐 항-HIV 항체의 중쇄 CDR3 도메인에 근거한 펩티드를 설명함); Polymenis와 Stoller, *J. Immunol.* **152**:5218-5329 (1994) (Z-DNA-결합 항체의 중쇄 CDR3 영역을 접합함으로써 scFv의 결합을 가능하게 함을 설명함), 및 Xu와 Davis, *Immunity* **13**:37-45 (2000) (중쇄 CDR3에서의 다양성이 동일한 IgM 분자가 다양한 합텐(hapten)과 단백질 항원을 구별하도록 하는데 충분하다는 것을 설명함)을 참조. 또한, 단일 CDR 도메인에 의하여 정의된 특허된 항체를 설명하는, 미국 특허 번호 제6,951,646호; 제6,914,128호; 제6,090,382호; 제6,818,216호; 제6,156,313호; 제6,827,925호; 제5,833,943호; 제5,762,905호 및 제5,760,185호를 참조. 이러한 참고 문헌 각각은 전체적으로 본 명세서 상에 참조로서 통합되어 있다.

[0164] 따라서, 본 발명은 인간 또는 비-인간 동물로부터 유래되는 항체로부터 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 여기서 단일클론 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있다. 어떤 관점 내에서, 본 발명은 마우스 또는 래트 항체와 같은, 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 여기에서 단일클론 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있다. 어떤 실시예 내에서, 비-인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 그러한 독창적인 항체는 (a) 결합을 위한 경쟁을 할 수 있고; (b) 기능적 특징을 보유하고; (c) 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 해당 부모 비-인간 항체와 유사한 결합 친화도를 가진다.

[0165] 다른 관점 내에서, 본 발명은 인간 항체, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 상기 인간 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있다. 다른 관점 내에서, 본 발명은, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체와 같은, 제 1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론 항체를 제공하는데, 상기 제 1 인간 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있고 제 1 인간 항체로부터의 상기 CDR3 도메인은 CXCR4에 대한 결합 특이성이 부족한 인간 항체에서 CDR3 도메인을 교환하여 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있는 제 2 인간 항체를 생성한다. 어떤 실시예 내에서, 제 1 인간 항체로부터의 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 그러한 독창적인 항체는 (a) 결합을 위한 경쟁을 할 수 있고; (b) 기능적 특징을 보유하고; (c) 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 해당 모체 제 1 인간 항체와 동일한 결합 친화도를 가진다.

[0166] 특정 생식세포계열 서열을 가지는 항체

[0167] 소정 실시예에서, 본 발명의 항체는 특정 생식세포계열 중쇄 면역글로불린 유전자로부터의 중쇄 가변 영역 및/또는 특정 생식세포계열 경쇄 면역글로불린 유전자로부터의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0168] 예를 들어, 바람직한 실시예에서, 본 발명은, 인간 V_H 3-48 유전자의 생산물 또는 상기 유전자로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 실시예에서, 본 발명은, 인간 V_K L15 유전자의 생산물 또는 상기 유전자로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 CXCR4에 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 본 발명은 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는데, 상기 항체는 인간 V_H 3-48 유전자의 생산물 또는 상기 유전자로부터 유래되는 중쇄 가변 영역을 포함하고 인간 V_K L15 유전자의 생산물 또는 상기 유전자로부터 유래되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 CXCR4, 바람직하게는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합한다. 그러한 항체는 또한, 세포 표면에 발현되는 천연 CXCR4에의 결합, CXCR4로의 SDF-1 결합의 억제, CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1 유도 칼슘 플럭스의 억제, CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1 유도 이동의 억제, HuVECs에 의한 모세관 형성의 억제, 시험관내 및

/또는 생체내 CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸의 유도, 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장의 억제, 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포의 전이의 억제와 같이, 상기에서 상세히 기술된 하나 이상의 기능적 특징을 가질 수 있다.

[0169] V_H 3-48 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 가지는 항체의 예들은, 각각, F7, F9, D1 및 E2 항체이다.

[0170] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인간 항체는, 항체의 가변 영역들이 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어진다면, 특정 생식세포계열 서열의 "생성물" 또는 "이로부터 유래된" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템들은 인간 면역글로불린 유전자를 가지는 유전자 이식 마우스를 관심의 항원으로 면역화하거나 또는 파지 상에 전시된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 관심의 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열의 "생성물" 또는 "이로부터 유래된" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 면역글로불린의 아미노산 서열들과 비교하고 서열에 있어서 인간 항체의 서열과 가장 가까운(즉, 최대 % 상동성) 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열을 선택함으로써 그러한 것으로 확인될 수 있다. 특정 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열의 "생성물"이거나 또는 "이로부터 유래된" 인간 항체는, 예를 들어, 자연발생적 체세포 변이 또는 부위-지정 돌연변이(site-directed mutation)의 인위적 도입으로 인해 생식세포계열 서열과 비교하여 상이한 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 일반적으로는 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 아미노산 서열에 있어서 적어도 90% 동일하고 다른 종의 생식세포계열 면역글로불린 아미노산 서열들(예, 쥐의 생식세포계열 서열들)과 비교할 때, 인간 항체를 인간이라는 것으로 확인하는 아미노산 잔기들을 포함한다. 특정 경우, 인간 항체는, 아미노산 서열에 있어서, 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과, 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일할 수 있다. 일반적으로, 특정 인간 생식세포계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 10개 아미노산 차이만을 보인다. 특정의 경우, 상기 인간 항체는 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 5 개, 또는 심지어 4, 3, 2, 또는 1 개 아미노산 차이만을 보인다.

[0171] 상동성 항체들

[0172] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 항체는 본 명세서에서 설명된 바람직한 항체들의 아미노산 서열들에 상동성인 아미노산 서열들을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 항체들은 본 발명의 항-CXCR4 항체들의 소망의 기능적 성질을 보유한다.

[0173] 예를 들어, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 여기에서:

[0174] (a) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 25-28 및 41-44로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하고;

[0175] (b) 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 29-32 및 45-48로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하며;

[0176] (c) 상기 항체는 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합한다.

[0177] 추가적으로 또는 대안적으로, 항체는 하나 이상의 다음의 기능적 성질을 가질 수 있다: (i) 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하고; (ii) CXCR4에의 SDF-1 결합을 억제하며; (iii) CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1 유도 칼슘 플럭스를 억제하고; (iv) CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1 유도 이동을 억제하며; (v) HuVECs에 의한 모세관 형성을 억제하고; (vi) 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도하며; (vii) 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제하고; 및/또는 CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제한다.

[0178] 다양한 실시예들에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화된 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0179] 다른 실시예에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열들은 상기 설명된 서열들에 대하여 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성일 수 있다. 상기 설명된 서열들의 V_H 및 V_L 영역에 대하여 높은(즉, 80% 이상) 상동성을 가지는 V_H 및 V_L 영역을 가지는 항체는 서열번호 25-32 또는 41-48을 암호화하는 핵산 분자의 돌연변이생성(예컨

대, 부위-지정 또는 PCR-매개 돌연변이생성)에 의하여 얻은 후, 본 명세서에서 설명된 기능적 분석법을 사용하여 보유된 기능(즉, 상기에서 설명된 기능)에 대하여 상기 암호화된 변형된 항체를 테스트할 수 있다.

[0180] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 두 개의 아미노산 서열 간의 상동성 백분율은 두 서열 간의 동일성 백분율에 대응된다. 두 서열 간의 동일성 백분율은, 두 서열의 최적 정렬에 대하여 도입될 필요가 있는, 간격들의 수 및 각 간격의 길이를 고려하여, 상기 서열들에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100). 두 서열 간 서열의 비교 및 백분율 동일성의 결정은, 하기 비-제한적 실시예에서 설명된 바와 같이, 수학적 알고리즘을 사용하여 이를 수 있다.

[0181] 두 개 아미노산 서열간의 동일성 백분율은 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘 (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 포함되어 있으며, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 간격 길이 페널티 및 4의 간격 페널티를 사용한다. 또한, 두 개 아미노산 서열 간의 동일성 백분율은 Needleman 및 Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램에 포함되어 있으며, 블로섬(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스와, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4의 간격 가중치와 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 사용한다.

[0182] 추가로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열들을 "조회(query) 서열"로 사용하여 공공 데이터베이스에 대하여 검색을 수행함으로써, 예를 들어, 연관 서열들을 확인할 수 있다. 그러한 검색은 Altschul, 등 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10의 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어길이= 3을 사용하여 BLAST 단백질 검색을 수행하여 본 발명의 항체 분자와 상동인 아미노산 서열들을 얻을 수 있다. 비교 목적상 이격된 정렬들을 얻기 위해, Gapped BLAST를 Altschul 등, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402에서 설명된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램 (예, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 변수들이 유용하다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참조.

[0183] 보존적 변형물을 갖는 항체

[0184] 소정의 실시예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는데, 이러한 CDR 서열들의 하나 이상은 본 명세서에서 설명된 바람직한 항체들(예컨대, F7, F9, D1 또는 E2) 또는 이의 보존적 변형물에 기초한 특정 아미노산 서열을 포함하며, 그리고 상기 항체는 본 발명의 항-CXCR4 항체들의 소망의 기능적 성질을 보유한다. 항원 결합을 제거하지 않는 소정의 보존적 서열 변형물이 만들어질 수 있다는 것은 당해 분야에서 이해되고 있다. 예를 들어, Brummell 등. (1993) *Biochem* 32:1180-8 (살모넬라에 특이적인 항체의 CDR3 중쇄 도메인에서 돌연변이 분석법을 설명함); de Wildt 등. (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41 (항-UA1 항체에서 돌연변이 연구를 설명함); Komissarov 등. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870 (HCDR3의 중앙부에서의 돌연변이가 친화도를 없애거나 감소시켰음을 보여줌); Hall 등. (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12 (CDR3 영역에서의 단일 아미노산 변화가 결합 활성도를 없앴음을 설명함); Kelley와 O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35 (항원 결합에서 Tyr 잔기의 기여를 설명함); Adib-Conquy 등. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 (결합에서 소수성의 영향을 설명함) 및 Beers 등. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43 (HCDR3 아미노산 돌연변이를 설명함)을 참조.

[0185] 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하며:

[0186] (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 9-12의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

[0187] (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 21-44의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 및

[0188] (c) 상기 항체는 세포 표면 상에 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합한다.

[0189] 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 항체는 하나 이상의 다음의 기능적 성질을 가질 수 있다: (i) 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하고; (ii) CXCR4에의 SDF-1 결합을 억제하며; (iii) CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1 유도 칼슘 플럭스를 억제하고; (iv) CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1 유도 이동을 억제하며; (v) HuVECs에 의한 모세관 형성을 억제하고; (vi) 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도하며;

(vii) 시험관내 및/또는 생체내 CXCR4⁺ 종양 세포의 성장을 억제하고; 및/또는 (viii) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제한다.

[0190] 바람직한 실시예에서, 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 5-8의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 및 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 17-20의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 바람직한 실시예에서, 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 1-4의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 13-16의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0191] 다양한 실시예에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체들, 인간화된 항체들 또는 키메라 항체들일 수 있다.

[0192] 본 명세서에서 사용되는, 용어 "보존적 서열 변형물"은 그 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성을 유의하게 변화 또는 변경하지 않는 아미노산 변형체를 지칭하는 것으로 의도된다. 그러한 보존적 변형물은 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 부위-지정 돌연변이 생성법 및 PCR-매개 돌연변이 생성법과 같이, 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 본 발명의 항체에 변형을 유도할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 일 군은 당해 분야에 정의되어 있다. 이러한 군들은 염기성 측쇄(예, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지 측쇄(예, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 부위내에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 군으로부터 나온 다른 아미노산 잔기와 대체될 수 있고, 이러한 변형된 항체는 본 명세서에서 설명된 기능 분석 방법을 사용하여 보유된 기능(즉, 상기에서 설명된 기능들)에 대하여 테스트할 수 있다.

[0193] 항-CXCR4 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체

[0194] 다른 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 항-CXCR4 단일클론 항체(즉, CXCR4에 결합하는 것에 대하여 본 발명의 임의의 단일클론 항체와 교차-경쟁하는 능력을 가진 항체)와 동일한 인간 CXCR4 상의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 바람직한 실시예에서, 교차-경쟁 연구를 위한 기준 항체는 단일클론 항체 F7(서열번호 25 및 29에서 각각 보여주는 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐) 또는, 단일클론 항체 F9(서열번호 26 및 30에서 각각 보여주는 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐) 또는, 단일클론 항체 D1(서열번호 27 및 31에서 각각 보여주는 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐) 또는, 단일클론 항체 E2(서열번호 28 및 32에서 각각 보여주는 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐)일 수 있다.

[0195] 그러한 교차-경쟁하는 항체들은 표준 CXCR4 결합 분석법에서 F7, F9, D1 또는 E2와 교차-경쟁하는 그들의 능력에 기초하여 확인될 수 있다. 예를 들어, CEM 세포를 이용한 유세포 분석법은 본 발명의 항체들과의 교차-경쟁을 증명하기 위하여 이용될 수 있는데, 상기 기준 항체는 FITC로 표지되어 있고 FITC-표지된 기준 항체의 CEM 세포에의 결합을 억제하는 테스트 항체의 능력이 평가된다. 예를 들어, F7, F9, D1 또는 E2의 인간 CXCR4에의 결합을 억제하는 테스트 항체의 능력은 인간 CXCR4에 결합하는 데 있어서 테스트 항체가 F7, F9, D1 또는 E2와 경쟁할 수 있고 그에 따라서 F7, F9, D1 또는 E2와 인간 CXCR4 상의 동일한 에피토프에 결합한다는 것을 증명한다. 바람직한 실시예에서, F7, F9, D1 또는 E2와 CXCR4 상의 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 인간 단일클론 항체이다. 그러한 인간 단일클론 항체들은 실시예에서 설명한 바와 같이 제조 및 분리될 수 있다.

[0196] 조작되고 변형된 항체

[0197] 본 발명의 항체는 본 명세서에서 공지된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열들을 가지는 항체를 출발 물질로 사용하여, 이러한 출발 항체로부터 변형된 특성을 가지는, 변이된 항체를 조작함으로써 제조될 수 있다. 하나 또는 양쪽 가변 영역(즉, V_H 및/또는 V_L) 내의, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 부위 내 및/또는 하나 이상의 골격 부위 내의 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 항체를 조작할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 불변 영역(들) 내의 잔기들을 변형함으로써, 항체를 조작하여, 예를 들어, 항체의 작용(effector) 기능(들)을 바꿀 수 있다.

[0198] 소정의 실시예에서, CDR 접합은 항체의 가변 영역을 조작하는 데 사용될 수 있다. 항체들은 주로, 여섯 개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 부위(CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통해서 타겟 항원과 상호작용한다. 이러한 이

유로, CDR 내에 있는 아미노산 서열들은 CDR바깥의 서열들보다 개별적 항체들 간에 있어서 더욱 다양하다. CDR 서열들이 대부분 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터 유래된 골격 서열들에 접합된, 특이적 자연발생 항체들로부터 나온 CDR 서열들을 포함하는 발현 벡터들을 제작함으로써 특이적 자연 발생 항체들의 특성을 담은 재조합 항체들을 발현하는 것이 가능하다 (예, Riechmann, L. 등 (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. 등 (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. 등 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter의 미국 특허 제 5,225,539 호, 및 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

[0199] 따라서, 본 발명의 다른 실시예는 각각 서열번호 1-4, 서열번호 5-8, 및 서열번호 9-12로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 13-16, 서열번호 17-20, 및 서열번호 21-24로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부와 관련이 있다. 따라서, 그러한 항체들은 단일클론 항체 F7, F9, D1 또는 E2의 V_H 및 V_L CDR 서열들을 포함하나, 이러한 항체들로부터의 상이한 골격 서열들을 포함할 수 있다.

[0200] 그러한 골격 서열들은, 생식세포계열 항체 유전자 서열들을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참조 문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식세포계열 DNA 서열들은 Kabat, E. A., 등 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 등 (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836에서는 물론 "VBase" 인간 생식세포계열 서열 데이터베이스(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 인터넷 상으로 이용가능)에서 발견될 수 있고, 이들 각각의 내용은 참조문헌으로 본 명세서에 명백하게 병합된다. 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자들에 대한 생식세포계열 DNA 서열들은 진뱅크(Genbank) 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식세포계열 서열들은 첨부한 진뱅크(Genbank) 기탁 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 3-33 (NG_0010109 및 NT_024637) 및 3-7 (NG_0010109 및 NT_024637)에서 입수할 수 있다. 다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식세포계열 서열들은 첨부한 진뱅크(Genbank) 기탁 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 5-51 (NG_0010109 및 NT_024637), 4-34 (NG_0010109 및 NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) 및 3-23 (AJ406678)에서 입수할 수 있다. 그러나 인간 중쇄 및 경쇄 생식세포계열 서열의 다른 소스는 IMGT (<http://imgt.cines.fr>)로부터 입수할 수 있는 인간 면역 글로불린 유전자의 데이터베이스이다.

[0201] 항체 단백질 서열들은 축적된 단백질 서열 데이터베이스와 비교하는 데 있어서 당해 분야의 숙련자들에게는 잘 알려진, 서열 유사성 검색 방법들 중 하나인, Gapped BLAST으로 불리는 방법을 사용할 수 있다(Altschul 등 (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402). BLAST는 발견적(heuristic) 알고리즘으로, 여기서 항체 서열 및 데이터베이스 서열 간의 통계적으로 유의한 정렬은 정렬된 단어들의 고-득점 분절 쌍 (high-scoring segment pairs (HSP))을 포함할 수 있을 것이다. 연장 또는 가지치기(trimming)에 의해서 그 득점을 향상시키지 못하는 분절 쌍(segment pair)을 히트(hit)라고 칭한다. 간략하게, VBASE 유래의 뉴클레오타이드 서열들 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)은 번역되어 있고, FR1 내지 FR3 골격 부위간 및 이를 포함하는 부위는 유지되어 있다. 상기 데이터베이스 서열들은 평균 98 잔기의 길이를 가진다. 단백질의 전체 길이에 걸쳐서 정확히 들어맞는 이중 서열들은 제외된다. 저 복잡도 필터(complexity filter)를 정지시킨 것을 제외하고는 기설정된(default), 표준 변수들을 가지고 blastp 프로그램 및 BLOSUM62의 치환 매트릭스를 사용하여 단백질들에 대하여 BLAST 검색을 실시하여 5 등까지의 히트를 걸러내어, 서열 짝(match)들을 생성하였다. 그 뉴클레오타이드 서열들을 6 개 모든 프레임에서 번역하고 상기 데이터베이스 서열의 매칭 분절에서 정지 코돈이 없는 프레임이 잠재적인 히트로 고려된다. 이를, 다음, BLAST 프로그램 tblastx를 사용하여 확정하였고, 이것은 상기 항체 서열을 6 개 모든 프레임에서 번역하며 이러한 번역물을 6 개 모든 프레임에서 동적으로 번역된 VBASE 뉴클레오타이드 서열들과 비교한다. IMGT(<http://imgt.cines.fr>)로부터 입수할 수 있는 것과 같은, 다른 인간 생식세포계열 서열 데이터베이스는 상기에서 설명된 VBASE와 유사하게 검색될 수 있다.

[0202] 동일한 것들은 서열의 전체 길이에 걸쳐서 항체 서열과 단백질 데이터베이스 간의 아미노산이 정확하게 들어맞는 것들이다. 양성적인 것들(동일한 것들+치환 짝)은 일치하지는 않으나 BLOSUM62 치환 매트릭스에 의해 가이드

되는 아미노산 치환물이다. 만약 항체 서열이 동일한 동일성을 가진 두 데이터베이스 서열과 매치된다면, 가장 양성적인 것들을 가지는 히트는 매칭 서열 히트(matching sequence hit)인 것으로 결정될 수 있다.

[0203] 본 발명의 항체에 사용하기에 바람직한 골격 서열들은 본 발명의 선택된 항체들에 의해 사용된 골격 서열들과 구조적으로 유사한데, 예를 들어, 본 발명의 바람직한 단일클론 항체들에 의해 사용되는 V_H 3-48 골격 서열들(서열번호 49) 및/또는 V_K L15 골격 서열들(서열번호 50)에 유사하다. V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 V_K CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은, 골격 서열이 유래하는 생식세포계열 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 가지는 골격 부위 상에 접합될 수 있거나, 또는 상기 CDR 서열들은 생식세포계열 서열들에 비하여 하나 이상의 변이를 포함하는 골격 부위 상에 접합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 경우, 골격 부위 내의 잔기를 변이시켜 항체의 항원 결합능을 유지 또는 강화시키는 것이 유익한 것으로 알려져 있다(예를 들어, Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

[0204] 다른 유형의 가변 영역 변이는 V_H 및/또는 V_K CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 변이시켜 관심의 항체의 하나 이상의 결합 성질(예, 친화도)을 향상시키는 것이다. 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성을 수행하여 변이(들)를 도입하고 항체 결합, 또는 다른 관심의 기능적 성질에 대한 효과는 명세서에서 설명되고 실시예에서 제공된 바와 같이, 시험관내 또는 생체내 분석법으로 평가할 수 있다. 바람직하게는, 보존적 변이(상기에서 기술된 바와 같이)가 도입된다. 이러한 변이는 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실일 수 있지만, 바람직하게는 치환이다. 더욱이, 일반적으로, 하나의 CDR 부위 내에서 단지 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 잔기만이 변형된다.

[0205] 따라서, 다른 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 항-CXCR4 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공한다: (a) 서열번호1-4로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 1-4에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 부위; (b) 서열번호5-8로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 5-8에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 부위; (c) 서열번호 9-12로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 9-12에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 부위; (d) 서열번호13-16으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 13-16에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR1 부위; (e) 서열번호17-20으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 17-20에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR2 부위; (f) 서열번호21-24로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 21-24에 비하여 한 개, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개의 아미노산 치환들, 결실들 또는 첨가들을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR3 부위.

[0206] 본 발명의 조작된 항체들은, 예를 들어, 항체의 성질을 향상시키기 위하여, V_H 및/또는 V_K 내의 골격 잔기에 변이가 만들어진 것을 포함한다. 일반적으로 그러한 골격 변이들은 항체의 면역원성을 감소시키도록 만들어진다. 예를 들어, 하나의 접근 방법은 하나 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이"시키는 것이다. 더욱 상세하게는, 체세포 변이된 항체는 항체가 유래되는 생식세포계열 서열과는 상이한 골격 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 잔기는 항체 골격 서열들을 항체가 유래되는 생식세포계열 서열들을 비교함으로써 확인할 수 있다.

[0207] 예를 들어, F7 V_H 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들(카뱃 계수 시스템을 사용함)은 생식세포계열과는 다르다: 1, 6 및 25. 이러한 위치들의 하나, 둘 또는 셋 모두는 다음 치환기의 하나, 둘 또는 셋 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: Q1E, Q6E 및 A25S. F7 V_H 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 F7GL V_H (도 5A 및 서열 번호 41에서 보인 아미노산 서열)이다: Q1E 및 Q6E.

[0208] 또한, F7 V_K 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들(카뱃 계수 시스템을 사용함)은 생식세포계열과는 다르다: 1, 3 및 84. 이러한 위치들의 하나, 둘 또는 셋 모두는 다음 치환기의 하나, 둘 또는 셋 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: A1D, R3Q 및 V84A. F7 V_K 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의

골격 치환기를 갖는 F7GL V_k (도 5B 및 서열 번호 45에서 보인 아미노산 서열)이다: A1D 및 R3Q.

- [0209] 또한, F9 V_H 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들 (카뱃 계수 시스템을 사용함)은 생식세포계열과는 다르다: 1, 6 및 25. 이러한 위치들의 하나, 둘 또는 셋 모두는 다음 치환기의 하나, 둘 또는 셋 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: Q1E, Q6E 및 A25S. F9 V_H 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 F9GL V_H (도 6A 및 서열 번호 42에서 보인 아미노산 서열)이다: Q1E 및 Q6E.
- [0210] 또한, F9 V_k 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들 (카뱃 계수 시스템을 사용함)은 생식세포계열과는 다르다: 1, 3, 4 및 60. 이러한 위치들의 하나, 둘, 셋 또는 넷 모두는 다음 치환기의 하나, 둘, 셋 또는 넷 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: E1D, V3Q, L4M 및 P60S. F9 V_k 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 F9GL V_k (도 6B 및 서열 번호 46에서 보인 아미노산 서열)이다: E1D, V3Q 및 L4M.
- [0211] 또한, D1 V_H 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들은 (카뱃 계수 시스템을 사용함) 생식세포계열과는 다르다: 6, 25 및 76. 이러한 위치들의 하나, 둘 또는 셋 모두는 다음 치환기의 하나, 둘 또는 셋 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: Q6E, A25S 및 R76K. D1 V_H 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 D1GL V_H (도 7A 및 서열 번호 43에서 보인 아미노산 서열)이다: Q6E.
- [0212] 또한, D1 V_k 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들은 (카뱃 계수 시스템을 사용함) 생식세포계열과는 다르다: 1, 3, 4, 45 및 46. 이러한 위치들의 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 모두는 다음 치환기의 하나, 둘, 셋, 넷 또는 다섯 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: V1D, W3Q, V4M, E45K 및 L46S. D1 V_k 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 D1GL V_k (도 7B 및 서열 번호 47에서 보인 아미노산 서열)이다: V1D, W3Q 및 V4M.
- [0213] 또한, E2 V_H 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들은 (카뱃 계수 시스템을 사용함) 생식세포계열과는 다르다: 6 및 25. 이러한 위치들의 하나 또는 둘 모두는 다음 치환기의 하나 또는 둘 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: Q6E 및 A25S. E2 V_H 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 E2GL V_H (도 8A 및 서열 번호 44에서 보인 아미노산 서열)이다: Q6E.
- [0214] 또한, E2 V_k 부위에서, 다음의 골격 부위 아미노산 위치들은 (카뱃 계수 시스템을 사용함) 생식세포계열과는 다르다: 1, 3 및 4. 이러한 위치들의 하나, 둘 또는 셋 모두는 다음 치환기의 하나, 둘 또는 셋 모두를 만듦으로써 생식세포계열 서열로 복귀돌연변이될 수 있다: E1D, V3Q 및 L4M. E2 V_k 부위의 바람직한 변이 형태는 다음의 골격 치환기를 갖는 E2GL V_k (도 8B 및 서열 번호 48에서 보인 아미노산 서열)이다: E1D, V3Q 및 L4M.
- [0215] 다른 유형의 골격 변이는 골격 부위내 또는 심지어는 하나 이상의 CDR 부위 내에 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거하고 그것에 의하여 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키는 것을 수반한다. 이러한 접근방식은 또한 "탈면역화"로 칭하여지고 Carr 등의 미국 특허 공개 번호 제20030153043호에 보다 상세히 설명되어 있다.
- [0216] 골격 또는 CDR 부위 내에서 만들어진 변이에 더하여 또는 대안적으로, 본 발명의 항체들을 조작하여 Fc 부위 내에서 변이를 만들어, 일반적으로 항체의 하나 이상의 기능적 성질, 예를 들어, 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포 독성과 같은 기능적 성질을 변경할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체를 화학적으로 변이시키고(예, 하나 이상의 화학적 분체를 항체에 붙일수 있다) 또는 글리코실화를 변경하는 것으로 변이시켜 항체의 하나 이상의 기능적 성질을 변경할 수 있다. 이러한 실시예들 각각이 하기에 더 상세히 설명되어 있다. Fc 부위에서의 잔기의 번호매김은 카뱃의 EU 인덱스의 것과 같다.
- [0217] 하나의 실시예에서, CH1의 힌지 부분을 변이시켜 힌지 부위에서의 시스테인 잔기들의 수를 변경, 예를 들어 증가시키거나 감소시킨다. 이러한 접근 방법은 Bodmer 등의 미국 특허 제 5,677,425 호에 더 설명되어 있다. CH1의 힌지 부위에서의 시스테인 잔기의 수를 변경하여, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄들의 조합을 용이하게 하거나 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시킨다.
- [0218] 다른 실시예에서, 항체의 Fc 힌지 부위를 변이시켜 항체의 생물학적 반감기를 감소시킨다. 더욱 상세하게는, 하

나 이상의 아미노산 변이를 Fc-헨지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 부위에 도입하여 상기 항체가, 천연 Fc-헨지 도메인 SpA 결합에 비하여, 손상된 포도상구균 단백질 A (SpA) 결합을 가지게 된다. 이러한 방법은 Ward 등의 미국 특허 제 6,165,745 호에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0219] 다른 실시예에서, 상기 항체를 변이시켜 생물학적 반감기를 증가시킨다. 다양한 접근 방식이 가능하다. 예를 들어, Ward의 미국 특허 제6,277,375호에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 하기 변이를 도입할 수 있다: T252L, T254S, 및 T256F. 대안적으로, 생물학적 반감기를 연장시키기 위해, Presta 등의 미국 특허 제5,869,046호 및 제6,121,022호에서 설명된 바와 같이, 항체를 CH1 또는 CL 부위에서 변경시켜 IgG의 Fc 부위의 CH2 도메인의 두 개 루프로부터 얻은 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 포함할 수 있다.

[0220] 다른 실시예에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 치환하여 항체의 작용(effector) 기능(들)을 변경하도록 Fc 부위를 변경할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 상이한 아미노산 잔기로 치환하여 항체가 작용(effector) 리간드에 대한 변경된 친화도를 가지지만, 부모 항체의 항원-결합 능력을 보유하게 한다. 친화도가 변경되는 상기 작용 리간드는, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근 방법은 Winter 등의 미국 특허 제5,624,821호 및 제5,648,260호에 더 상세히 기술되어 있다.

[0221] 다른 실시예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 아미노산 잔기로 치환하여 항체가 변경된 C1q 결합 및/또는 감소되거나 폐지된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 가지게 된다. 이러한 접근 방법은 Idusogie 등의 미국 특허 제6,194,551호에 더 상세히 설명되어 있다.

[0222] 다른 실시예에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변경하여 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경한다. 이러한 접근 방법은 Bodmer 등의 PCT 공개 제WO 94/29351호에 더 기술되어 있다.

[0223] 다른 실시예에서, 다음의 위치에서 하나 이상의 아미노산들을 변이시킴으로써 Fc 부위를 변이시켜 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 조정하는 항체의 능력을 증가시키고 및/또는 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 접근 방법은 Presta의 PCT 공개 번호 제WO 00/42072호에 더 상세히 기술되어 있다. 더욱이, Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 위치가 지도화되어 있고 향상된 결합을 가지는 변이체들이 기술되어 있다 (Shields, R.L. 등 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특이적 변이는 Fc γ RIII에 대한 결합을 향상시키는 것으로 나타났다. 추가로, 다음의 조합 돌연변이체는 Fc γ RIII 결합을 향상시키는 것으로 나타났다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

[0224] 또 다른 실시예에서, 항체의 글리코실화를 변이시킨다. 예를 들어, 비글리코실화된 항체를 만들 수 있다(즉, 항체는 글리코실화를 결여한다). 글리코실화를 변경하여, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 탄수화물 변이는, 예를 들어, 항체 서열 내에서 하나 이상의 글리코실화 위치를 변경함으로써 성취될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 골격 글리코실화 위치를 제거하도록 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환을 만들어서 그 위치에서 글리코실화를 없애버릴 수 있다. 그러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 접근 방법은 Co 등의 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0225] 추가적으로 또는 대안적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 가지는 항체, 예를 들어, 감소된 양의 퓨코실 잔기를 가지는 저퓨코실화 항체, 또는 증가된 두갈래 GlcNAc 구조를 가지는 항체를 만들 수 있다. 그러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체들의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러한 탄수화물 변이는, 예를 들어, 변경된 글리코실화 기계(machinery)를 가진 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시킴으로써 이루어질 수 있다. 변경된 글리코실화 기계를 가진 세포들은 당해 분야에 공지되어 있고 본 발명의 재조합 항체들을 발현하여 변경된 글리코실화를 가지는 항체를 생성하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705, 및 Ms709는 퓨코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8(알파 (1,6) 퓨코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705, 및 Ms709 세포주에서 발현되는 항체들은 그들 탄수화물 상에서 퓨코스가 결여되어 있다. Ms704, Ms705, 및 Ms709 FUT8^{-/-} 세포주들은 두 개의 대체 백터를 사용하여 CHO/DG44 세포에서 FUT8 유전자를 타겟 파괴함으로써 만들 수 있다 (Yamane 등의 미국 특허 공개 제20040110704호 및 Yamane-Ohnuki 등 (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 참조). 다른 예로서, Hanai 등의 EP 제1,176,195호에는 퓨코실 트랜스퍼라제를 암호화하고 있는 FUT8 유전자가

기능적으로 파괴되어 있는 세포주가 기술되어 있고, 그러한 세포주에서 발현되는 항체들은 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소시키거나 제거함으로써 저퓨코실화를 나타내게 된다. Hanai 등은 또한 항체의 Fc 부위에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 퓨코스를 첨가하는데 낮은 효소 활성을 가지는 또는 그러한 효소 활성을 가지지 않는 세포주, 예를 들어, 래트 골수종 세포주 YB2/O(ATCC CRL 1662)를 기술하고 있다. Presta의 PCT 공개번호 제WO 03/035835호는 변형 CHO 세포주인 Lec13 세포에 대해서 기술하고 있는 데, 이 세포들은 Asn(297)-연결 탄수화물에 퓨코스를 첨부하는 능력이 감소되어 있어서, 그러한 숙주 세포에서 발현된 항체들에 저퓨코실화를 야기하게 된다(또한 Shields, R.L. 등 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참조). 변이된 글리코실화 프로파일을 갖는 항체는 또한, 미국 특허 출원 번호 제 PCT/US06/05853호에 설명된 바와 같이, 닭의 알에서 생산할 수 있다. 대안적으로, 변이된 글리코실화 프로파일을 갖는 항체는, 렘나(*Lemna*.)와 같은, 식물 세포에서 생산될 수 있다. 식물 시스템에서 항체의 생산을 위한 방법은 2006년 8월 11일에 출원된, Alston & Bird LLP attorney docket No. 040989/314911에 해당하는 미국 특허 출원에 공지되어 있다. Umana 등의 PCT 공개번호 제WO 99/54342호는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기술하고 있고, 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체들은 증가된 양갈래 GlcNAc 구조를 보이고, 결과적으로 상기 항체들의 증가된 ADCC 활성을 나타낸다 (참고, Umana 등 (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). 대안적으로, 퓨코시다제 효소를 사용하여 상기 항체의 퓨코스 잔기를 절단할 수 있다. 예를 들어, 퓨코시다제 알파-L-퓨코시다제는 항체들에서 퓨코실 잔기를 제거한다 (Tarentino, A.L. 등 (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

[0226] 본 발명에 의하여 고려될 수 있는 본 발명의 항체들의 다른 변이방법은 PEG화(pegylation)이다. 항체를 PEG화시켜, 예를 들어, 항체의 생물학적(예, 혈청) 반감기를 늘릴 수 있다. 항체를 PEG화 시키기 위해, 항체, 또는 이의 단편을 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어, PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와, 하나 이상의 PEG 군이 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서, 반응시킨다. 바람직하게는, PEG화는 반응성 PEG 분자(또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "폴리에틸렌글리콜"은 다른 단백질들, 예를 들어, 모노(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 유도하는 데 사용된 PEG의 임의의 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 어떤 실시예에서, PEG화된 항체는 비글리코실화된 항체이다. 단백질을 PEG화시키는 방법은 당해 분야에 알려져 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, Nishimura 등의 유럽 특허 제0 154 316호 및 Ishikawa 등의 유럽 특허 제0 401 384호 참조.

[0227] 항체 단편 및 항체 의태체(mimetics)

[0228] 본 발명은 전통적인 항체에 한정되지 않고, 항체 단편 및 항체 의태체를 사용하여 실행될 수 있다. 후술하는 바와 같이, 다양한 항체 단편 및 항체 의태 기술이 개발되었고 당해 업계에 널리 공지되어 있다. 도메인 항체, 나노바디 및 유니바디와 같이, 이러한 많은 기술들은 통상적인 항체 구조의 단편 또는 다른 변형물을 이용하며, 또한 통상적인 항체 결합을 의태하지만, 구별되는 기작으로부터 발생되고 이를 통해 기능하는 결합 구조를 사용하는 어피바디(Affibodies), 디에이알핀(DARPins), 안티칼린(Anticalins), 아비머(Avimers), 및 베르사바디(Versabodies)와 같은 대안적 기술도 있다.

[0229] 도메인 항체(dAbs)는 항체의 가장 작은 기능적 결합 유닛으로서, 인간 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL)의 가변 영역에 상응한다. 도메인 항체는 약 13 kDa의 분자량을 가진다. 도만티스(Domantis)는 완전 인간 VH 및 VL dAb들의 일련의 크고 높은 기능적 라이브러리(각 라이브러리당 백여개 이상의 상이한 서열)를 개발하였고, 이러한 라이브러리를 사용하여 치료적 타겟에 특이한 dAb를 선택한다. 많은 통상적인 항체들과는 달리, 도메인 항체들은 박테리아, 효모, 및 포유동물 세포 시스템에서 잘 발현된다. 도메인 항체들 및 이의 제조방법에 대한 상세 설명은 미국 특허 번호 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 제6,696,245호; 미국 출원 일련번호 제2004/0110941호; 유럽 특허 출원번호 제1433846호 및 유럽 특허 제0368684호 및 제0616640호; 제W005/035572호, 제W004/101790호, 제W004/081026호, 제W004/058821호, 제W004/003019호 및 제W003/002609호에서 찾을 수 있고, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합되어 있다.

[0230] 나노바디는 천연적으로 발생하는 중쇄 항체의 유일한 구조적 및 기능적 성질을 포함하는 항체-유도 치료 단백질이다. 이들 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 두 개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함한다. 중요한 것은, 클론화되고 분리된 VHH 도메인은 원래 중쇄 항체의 전체 항원-결합 능력을 보유하고 있는 완벽하게 안정된 폴리펩티드이다. 나노바디들은 인간 항체들의 VH 도메인과 높은 상동성을 가지며 활성의 임의의 손실 없이 더 인간화될 수 있다. 중요한 것은 나노바디가 낮은 면역원성 잠재능을 가지며, 이는 나노바디가 주된 화합물로 사용된

영장류 실험에서 확인되었다.

- [0231] 나노바디는 통상적인 항체들의 장점과 작은 분자 약물의 중요한 성질을 조합한다. 통상적인 항체들과 같이, 나노바디들은 높은 타겟 특이성, 이들 타겟에 대한 높은 특이성 및 낮은 내재적 독성을 보인다. 그러나, 작은 분자 약물과 같이, 이들은 효소를 억제하며 수용체 틈에 용이하게 접근할 수 있다. 또한, 나노바디들은 매우 안정하고, 주사의 다른 방식으로 투여될 수 있고 (예, 제W0 04/041867호 참조, 본 명세서에 참조문헌으로 기입) 제조하기 쉽다. 나노바디의 다른 장점은 그들의 작은 크기의 결과로서, 공통적이지 않거나 숨겨진 에피토프를 인식하고, 그들의 유일한 삼차원적, 약물 포켓 유연성으로 인하여 높은 친화도 및 선택성으로 단백질 타겟의 빈공간 또는 활성 부위에 결합하며, 약물 전달의 수명, 용이성과 속도를 맞추는 것을 포함한다.
- [0232] 나노바디는 단일 유전자에 의해 암호화되며 거의 모든 원핵 및 진핵 숙주, 예를 들어, *E. coli* (예, 미국 특허 번호 제6,765,087호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합됨), 곰팡이(molds) (예, 아스파질러스 또는 트리코데마) 및 효소 (예, 사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 한세놀라 또는 피키아) (미국 특허 번호 제6,838,254호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에서 참조문헌으로 통합됨)에서 효과적으로 생성된다. 제조 공정은 증감될 수 있고 수 킬로그램 양의 나노바디들을 생산하였다. 나노바디들이 통상적인 항체에 비하여, 뛰어난 안정성을 나타내므로, 이들은 긴 보관 수명, 즉시 사용되는 용액으로서 배합될 수 있다.
- [0233] 나노클론 방법 (예, 제W0 06/079372호 참조, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합됨)은 B-세포의 자동화된 고출력 선택에 기초하여, 바람직한 타겟에 대하여 나노바디를 생성하는 독점적 방법으로서 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.
- [0234] 유니바디는 또 다른 항체 단편 기술이지만, 이러한 것은 IgG4 항체들의 힌지 부위를 제거하는 것에 기초한다. 힌지 부위를 삭제하면 통상적인 IgG4 항체들의 크기에 본질적으로 절반인 분자가 생성되고, IgG4 항체들의 이가 결합 부위보다는 일가 결합 부위를 가진다. IgG4 항체들이 비활성적이고 따라서 면역계와 상호작용하지 않으며, 이는 면역 반응을 원치 않는 질병 치료에 장점일 수 있고, 및 이러한 장점은 유니바디에 있음이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 유니바디들은 그들이 결합된 세포를 억제하거나 침묵시키게, 그러나 죽이지는 않게 기능할 수 있다. 부가적으로, 암세포에 결합하는 유니바디는 증식하도록 이들을 자극하지 않는다. 더구나, 유니바디는 통상적IgG4 항체의 크기의 반 정도이기 때문에, 더 큰 고형암에 걸쳐 잠재적으로 유리한 효능으로 더 좋은 분포를 나타낼 수 있다. 유니바디들은 온전한 IgG4 항체들과 유사한 속도로 신체에서 제거되며 온전한 항체들과 유사한 항원 친화도로 결합할 수 있다. 유니바디의 상세 설명은 특허 제W02007/059782호를 참조할 수 있고, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합된다.
- [0235] 어피바디 분자는 58-아미노산 잔기 단백질 도메인에 기초한 새로운 형태의 친화성 단백질을 나타내며, 포도상구균의 단백질 A의 IgG-결합 도메인들 중 하나로부터 유래된 것이다. 이러한 세 개 나선 묶음 도메인은 조합성 파지미드 라이브러리 제작용 골격으로 사용될 수 있고, 이로부터, 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 소정의 분자를 타겟하는 어피바디 변이들을 선택할 수 있다 (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55.). 어피바디 분자의 간단하고, 견고한 구조는 이들의 저분자량 (6 kDa)과 조합되어 이들을 다양한 적용에, 예를 들어, 검출 시약에 적절하게 하고 (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, 등, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211) 수용체 상호작용을 억제한다 (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). 어피바디 및 이의 제조 방법의 상세 설명은 미국 특허 번호 제 5831012호를 참조할 수 있고, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로 통합되어 있다.
- [0236] 표지된 어피바디는 또한 다량의 이소형태의 풍부함을 결정하기 위한 이미징 어플리케이션에 유용하다.
- [0237] 디에이알핀(DARPin, Designed Ankyrin Repeat Proteins)은 항체 외태 DRP (Designed Repeat Protein) 기술의 한 예이고 이는 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하기 위해 개발되었다. 안키린 또는 류신이 많은 반복 단백질과 같은 반복 단백질은 편재되어 있는 결합 분자이고, 이는 항체와는 달리, 세포 내 및 세포외적으로 발생한다. 이들의 유일한 모듈식 건축구조는 반복되는 구조적 단위체 (반복체)를 특징으로 하고, 이것들은 함께 쌓여져서 가변성 및 모듈식의 타겟-결합 표면을 나타내는 연장된 반복체 도메인을 형성한다. 이러한 모듈성에 근거하여, 고도로 다양화된 결합 특이성을 가지는 폴리펩티드들의 조합적 라이브러리들을 생성할 수 있다. 이러

한 전략은 가변적인 표면 잔기 및 이들이 무작위적으로 반복체 도메인으로 회합되는 것을 나타내는 자가-양립성 반복체들의 일치된 구성을 포함한다.

- [0238] 디에이알핀은 고효율로 박테리아성 발현 시스템에서 생산될 수 있고, 알려진 가장 안정한 단백질에 속한다. 인간 수용체, 사이토카인, 키나아제, 인간 프로테아제, 바이러스 및 막 단백질을 포함한 광범위한 타겟 단백질에 대한 매우 특이적이고, 고친화도 디에이알핀들을 선택하였다. 단단위 나노물 내지 피코몰 범위의 친화도를 가지는 디에이알핀들을 얻을 수 있다.
- [0239] 디에이알핀은 ELISA, 샌드위치 ELISA, 유세포 분석 측정기(FACS), 면역조직화학(IHC), 칩 응용, 친화도 정제 또는 웨스턴 블랏팅을 포함하여, 광범위한 범위의 어플리케이션에 사용되어 왔다. 디에이알핀은 또한, 예를 들어, 녹색 형광 단백질 (GFP)에 융합된 세포내 마커 단백질로서 세포내 분획에서 매우 활성적이라는 것이 증명되었다. 디에이알핀은 또한 pM 범위 내에 있는 IC50으로 바이러스 입장을 억제하는 데 사용되었다. 디에이알핀은 단백질-단백질 상호작용을 차단하는 데 이상적일 뿐 아니라, 효소를 억제하는 데에도 이상적이다. 프로테아제, 키나아제 및 운반자가 가장 일반적으로 알로스테릭 억제 방식으로 성공적으로 억제되었다. 종양 상에 매우 빠르고 특이적으로 농축되는 것과 매우 양호한 종양 대 혈액 비율로 인하여, 디에이알핀은 생체내 진단 또는 치료 방법에 매우 적절하다.
- [0240] 디에이알핀 및 다른 DRP 기술에 관한 추가의 정보는 미국 특허 출원 공개번호 제2004/0132028호 및 국제 특허 출원 공개번호 제WO 02/20565호에서 발견될 수 있고, 둘 다 본 명세서에 전체적으로 참조문헌으로서 병합된다.
- [0241] 안티칼린은 추가적인 항체 의태 기술이나, 이 경우, 결합 특이성은 리포칼린, 즉 인간 조직 및 체액에서 자연적으로 및 풍부하게 발현되는 저분자량 단백질의 군으로부터 유래된다. 리포칼린은 생체 내에서 생리적 수송 및 화학적으로 민감하거나 불용성 화합물의 저장과 관련된 일단의 기능들을 수행하기 위해 발달하였다. 리포칼린은 단백질의 하나의 말단에서 네 개 루프를 지지하는 고도로 보존된 β -배럴을 포함하는 견고하고 고유한 구조를 가진다. 이러한 루프들은 결합 포켓의 입구를 형성하고, 분자의 이러한 부분에서의 형태적 차이는 개별 리포칼린 간의 결합 특이성에서의 다변화를 설명한다.
- [0242] 보존된 β -시트 골격에 의해 지지되는 초가변성 루프의 전체 구조는 면역글로불린의 흔적이지만, 리포칼린은 크기에서 항체들과 상당히 상이하며, 단일 면역글로불린 도메인보다 약간 더 큰 160-180 아미노산들의 단일 폴리펩티드 사슬로 구성된다.
- [0243] 리포칼린을 클론화하고 이들의 루프를 조작하여 안티칼린을 생성한다. 구조적으로 다양한 안티칼린들의 라이브러리를 생성하였고 안티칼린 디스플레이는 결합 기능의 선택 및 스크리닝을 가능하게 하며, 용해성 단백질을 발현하고 생성하여 원핵 또는 진핵 시스템에서 더 분석할 수 있다. 연구에 따르면, 실질적으로 임의의 인간 타겟 단백질에 특이적인 안티칼린을 개발할 수 있고 분리할 수 있으며, 나노몰 또는 그 이상의 범위의 결합 친화도를 얻을 수 있다는 것이 성공적으로 밝혀졌다.
- [0244] 안티칼린은 또한, 소위 듀오칼린으로 불리는, 이중 타겟팅 단백질로서 형성될 수 있다. 듀오칼린은 표준 제조방법으로 용이하게 제조되는 하나의 단량체성 단백질에서 두 개의 분리된 치료적 타겟에 결합하며, 그의 두개 결합 도메인의 구조적 방향과는 관계없이 타겟 특이성 및 친화도를 유지한다.
- [0245] 단일 분자를 통하여 다중 타겟들을 조정하는 것은 특히 단일 원인 인자 이상을 포함하는 것으로 알려진 질병에 유리하다. 더욱이, 듀오칼린과 같은 이중 또는 다중 결합 형식은 질병에서 세포 표면 분자를 타겟팅하는데, 신호 전달 경로 상에 작용효과(agonistic effect)를 매개하는 데 또는 세포 표면 수용체들을 결합하고 클러스터링하는 것을 통해 향상된 내부화 효과를 유도하는 데 있어서 상당한 능력을 가진다. 더구나, 듀오칼린의 높은 고유 안정성은 단량체성 안티칼린과 비견되며, 듀오칼린에게 유연한 배합 및 전달 능력을 제공하게 된다.
- [0246] 안티칼린에 대한 추가 정보는 미국 특허 번호 제7,250,297호 및 국제 특허 출원 공개번호 제WO 99/16873호에서 발견되며, 이 둘은 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.
- [0247] 본 발명의 맥락에 유용한 또 다른 항체 의태 기술은 아비머이다. 아비머는 시험관내 엑손 서플링 및 파지 디스플레이에 의해 인간 세포의 수용체 도메인의 거대 군으로부터 유도되었고, 결합 및 억제 특성을 가진 다중도메인 단백질을 생성한다. 다중 독립적 결합 도메인들을 연결하면, 결합활성(avidity)을 생성하고 통상적인 단일-에피토프 결합 단백질에 비하여 향상된 친화도 및 특이성을 생성하게 된다. 다른 잠재적 장점은 대장균 (*Escherichia coli*) 내에서 다중타겟-특이성 분자를 간단하고 효율적으로 생성하고, 프로테아제에 대하여 향상된 열안정성 및 저항성을 가지게 한다. 나노몰 이하의 친화도를 가지는 아비머는 다양한 타겟에 대하여 수득되

었다.

- [0248] 아비머에 대한 추가 정보는 미국 특허 출원번호 제2006/0286603호, 제2006/0234299호, 제2006/0223114호, 제2006/0177831호, 제2006/0008844호, 제2005/0221384호, 제2005/0164301호, 제2005/0089932호, 제2005/0053973호, 제2005/0048512호, 제2004/0175756호에서 발견되며, 이 모두는 전체적으로 본 명세서에 참조문헌으로서 병합된다.
- [0249] 베르사바디(Versabodies)는 본 발명에 사용될 수 있는 다른 항체 의태 기술이다. 베르사바디는 >15% 시스테인 함량을 가지는 3-5 kDa의 소 단백질이고, 높은 이황화물 밀도 골격을 형성하여, 통상적인 단백질이 가지는 소수성 코어를 대신한다. 소수성 코어를 포함하는 많은 수의 소수성 아미노산을 작은 수의 이황화물로 대체하면, 더 작고, 더 강한 친수성 (덜 회합되고 비-특이성 결합)이고, 프로테아제와 열에 더 저항성이 있으며, 더 낮은 밀도의 T-세포 에피토프를 가지는 단백질을 생성하게 되는데 이는, MHC 발현에 대부분 기여하는 잔기가 소수성이기 때문이다. 이러한 네가지 성질 모두는 면역원성에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있고, 이들은 같이, 면역원성을 크게 저하시키게 하는 것으로 예상된다.
- [0250] 베르사바디 대한 영감은 거머리, 뱀, 거미, 전갈, 달팽이, 및 말미잘에 의해 생성되는, 예상되지 못한 낮은 면역원성을 보이는 것으로 알려진 천연적 주입성 생약학물로부터 온 것이다. 모양에 의해서 및 크기를 스크리닝함으로써, 선택된 천연 단백질 군으로 시작하여, 소수성, 단백질 가수분해성 항원 가공 및 에피토프 밀도를 천연적 주입성 단백질에 대한 평균보다 훨씬 낮은 수준으로 최소화하였다.
- [0251] 베르사바디의 구조가 주어지면, 이러한 항체 의태물들은 다가, 다중 특이성, 다양한 수명 기작, 조직 타겟팅 모듈 및 항체 Fc 부위의 부재를 포함하는 다양한 형식을 제공한다. 더구나, 베르사바디들은 *E. coli* 에서 고효율로 제조되며, 이들의 친수성 및 작은 크기 때문에, 베르사바디는 고도로 용해성이고 고 농도로 배합될 수 있다. 베르사바디는 뛰어나게 열에 안정성이고(이들은 끓일 수도 있다) 보관 수명이 길다.
- [0252] 베르사바디에 대한 추가 정보는 미국 특허 출원 번호 제2007/0191272호에서 발견되며, 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.
- [0253] 상기에서 제공된 항체 단편 및 항체 의태 기술의 상세한 설명은 본 명세서의 맥락에서 사용될 수 있는 모든 기술에 포함된 목록인 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 그리고 비제한적인 방식으로, 다양한 추가 기술이 본 발명의 맥락에서 사용할 수 있는 데, 이는 대안적 폴리펩티드-근거 기술, 예를 들어, 상보적 결정 부위의 융합은, Qui 등, *Nature Biotechnology*, 25(8) 921-929 (2007)에 설명되어 있고 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기입되며, 핵산-근거 기술, 예를 들어, RNA 애플타머 기술은 미국 특허번호 제5,789,157호, 제5,864,026호, 제5,712,375호, 제5,763,566호, 제6,013,443호, 제6,376,474호, 제6,613,526호, 제6,114,120호, 제6,261,774호, 및 제6,387,620호에 기술되어 있고, 이들 모두 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다.
- [0254] 항체 물리적 성질
- [0255] 본 발명의 항체들은 항-CXCR4 항체의 다양한 물리적 성질에 의해 더 특성화될 수 있다. 다양한 분석 방법들을 사용하여 이러한 물리적 성질에 근거하여 항체들의 상이한 부류를 검출 및/또는 분화시킬 수 있다.
- [0256] 다른 실시예에서, 본 발명의 항체들은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 장소를 가질 수 있다. 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 위치가 존재하는 것은 변경된 항원 결합으로 인하여 항체의 면역원성을 높이거나 또는 항체의 pK를 변경하는 결과를 가져올 수 있다(Marshall 등 (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA 및 Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick 등 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh 등 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura 등 (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). 글리코실화는 N-X-S/T 서열을 포함하는 모티프(motifs)에서 발생한다고 알려져 있다. 가변 영역 글리코실화는 글로코블랏(Glycoblots) 분석법을 사용하여 테스트할 수 있는 데, 이는 항체를 절단하여 Fab를 생성한 후, 과요오드산 산화 및 슈프(Schiff) 염기 형성을 측정하는 분석법을 사용하여 글리코실화를 테스트한다. 대안적으로, 가변 영역 글리코실화는 다이오넥스 광 크로마토그래피(Dionex-LC)를 사용하여 테스트할 수 있고, 이는 Fab로부터 당류를 단당류로 절단하고 개별적인 당 함유량을 분석한다. 특정 예에서, 가변 영역 글리코실화를 포함하지 않는 항-CXCR4 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 가변 영역에서 글리코실화 모티프를 포함하지 않는 항체들을 선택함으로써 또는 글리코실화 모티프 내에 잔기를 돌연변이화함으로써 성취될 수 있다.
- [0257] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 항체들은 아스파라긴 이성화 위치를 포함하지 않는다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는 각각 N-G 또는 D-G 서열들에서 발생할 수 있다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는

이소아스파르트 산의 생성을 야기하며, 이는 주 사슬보다는 측쇄 카르복시 말단의 얽힘 구조(kinked structure)를 생성함으로써 항체의 안정성을 저하시킨다. 이소아스파르트 산의 생성은 역상 HPLC를 사용하여 이소아스파르트 산에 대하여 테스트하는 등량분석법(iso-quant assay)을 사용하여 측정될 수 있다.

- [0258] 각 항체는 고유의 등전위점 (pI)을 가지나, 일반적으로 항체들은 6 및 9.5 사이의 pH 범위안에 거한다. IgG1 항체에 대한 pI는 대표적으로 7-9.5의 pH 범위에 있고, IgG4 항체에 대한 pI는 대표적으로 6-8의 pH 범위에 거한다. 항체들은 이러한 범위 외에 있는 pI를 가질 수 있다. 비록 상기 효과들이 일반적으로 공지되어 있지 않더라도, 정상적인 범위의 pI를 가진 항체들이 생체 내 조건 하에서 폴립(unfolding) 및 불안정성을 가질 수 있다고 생각된다. 상기 등전점은 모세관 등전위 초점 분석법(capillary isoelectric focusing assay)을 사용하여 시험될 수 있고, 이는 pH 구배를 만들고 레이저 포커싱을 사용하여 정확성을 높일 수 있다(Janini 등 (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma 등 (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt 등 (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). 어떤 경우, 정상 범위에 들어가는 pI 값을 포함하는 항-CXCR4 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위 내의 pI를 가지는 항체를 선택함으로써, 또는 해당 분야에서 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 하전된 표면 잔기를 변이시킴으로써 이를 수 있다.
- [0259] 각 항체는 열 안정성을 나타내는 용융점을 가질 수 있다(Krishnamurthy R 및 Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). 더 높은 열적 안정성은 생체 내에서 더 큰 전체적인 항체 안정성을 나타낸다. 항체의 용융점은 차등 스캐닝 열량계와 같은 기술을 사용하여 측정될 수 있다(Chen 등 (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando 등 (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_m 은 항체의 초기 폴립의 온도를 나타낸다. T_{m2} 는 항체의 완전한 폴립의 온도를 나타낸다. 일반적으로, 본 발명의 항체의 T_m 은 60°C 이상, 바람직하게는 65°C 이상, 더욱 바람직하게는 70°C 이상이다. 대안적으로, 항체의 열적 안정성은 원편광 이색성 분석(circular dichroism)을 사용하여 측정될 수 있다(Murray 등 (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).
- [0260] 바람직한 실시예에서, 빠르게 분해되지 않는 항체들을 선택한다. 항-CXCR4 항체의 단편화는 당해 분야에 공지된 모세관 전기영동(CE) 및 MALDI-MS를 이용하여 측정될 수 있다(Alexander AJ 및 Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).
- [0261] 다른 바람직한 실시예에서, 최소 결집 효과를 가지는 항체들을 선택한다. 결집되면 원치 않는 면역 반응 및/또는 변형되거나 바람직하지 않은 약물동력학 특성을 개시하게 할 수 있다. 일반적으로, 25% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 더욱 바람직하게는 15% 이하, 더 더욱 바람직하게는 10% 이하, 또는 더욱 더 바람직하게는 5% 이하로 결집하는 항체가 허용된다. 결집은, 크기 배제 컬럼(SEC) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 광 분산을 포함한, 당해 분야에 공지된 몇가지 기술을 사용하여 단량체, 이량체, 삼량체 또는 다량체를 확인하여 측정될 수 있다.
- [0262] 항체를 조작하는 방법
- [0263] 전술한 바와 같이, 본 명세서에서 공지된 V_H 및 V_K 서열들을 가지는 항-CXCR4 항체를 사용하여 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이에 부착된 불변 영역(들)을 변형함으로써 새로운 항-CXCR4 항체들을 만들 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 관점에서, 본 발명의 항-CXCR4 항체, 예컨대 F7, F9, D1 또는 E2의 구조적 특징을 이용하여, 인간 CXCR4에 결합하는 것과 같은, 본 발명의 항체의 적어도 하나의 기능적 성질을 보유하는, 구조적으로 관련된 항-CXCR4 항체를 만들 수 있다. 예를 들어, F7, F9, D1 또는 E2, 또는 이의 돌연변이들의 하나 이상의 CDR 부위를 공지된 골격 부위 및/또는 다른 CDR과 재조합적으로 조합하여, 상기에 검토한 바와 같이, 추가의 재조합적으로 조작된 본 발명의 항-CXCR4 항체를 만들 수 있다. 변이의 다른 유형은 앞 부분에서 설명되었던 것들을 포함한다. 이러한 조작 방법에 사용되는 개시 물질은 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 부위이다. 조작된 항체를 만들기 위해, 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 부위를 가지는 항체를 실제적으로 제조하는(즉, 단백질로서 발현시키는) 것은 필요치 않다. 그보다는, 그 서열(들)에 포함된 정보를 개시 물질로 사용하여 원래 서열(들)로부터 유래된 "2 세대" 서열(들)을 생성한 후, 상기 "2 세대" 서열(들)을 제조하고 단백질로서 발현시킨다.
- [0264] 따라서, 다른 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 항-CXCR4 항체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0265] (a) (i) 서열번호 1-4로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 5-8로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 9-12로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및/또는 (ii) 서열번호 13-16로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 17-20로 구성되는

군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 21-24로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하고;

[0266] (b) 상기 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 상기 경쇄 가변 영역 항체 서열 내에서의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변형하여 적어도 하나의 변형된 항체 서열을 생성하고; 및

[0267] (c) 상기 변형된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 것.

[0268] 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 상기 변형된 항체 서열을 제조하고 발현시킬 수 있다.

[0269] 바람직하게, 변형된 항체 서열(들)에 의하여 암호화된 항체는 본 명세서에서 기술된 항-CXCR4 항체의 기능적 성질들의 하나, 몇 개 또는 모두를 보유하는 항체이며, 상기 기능적 성질들은 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다:

[0270] (i) 세포 표면 상에서 발현되는 천연 인간 CXCR4에 결합하고;

[0271] (ii) CXCR4에의 SDF-1의 결합을 억제하며;

[0272] (iii) CXCR4를 발현하는 세포에서 SDF-1 유도 칼슘 플럭스를 억제하고;

[0273] (iv) CXCR4를 발현하는 세포의 SDF-1 유도 이동을 억제하며;

[0274] (v) HuVECs에 의한 모세관 형성을 억제하고;

[0275] (vi) 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 CXCR4에 결합하며;

[0276] (vii) CXCR4를 발현하는 세포에서 세포사멸을 유도하고;

[0277] (viii) 시험관내에서 종양 세포 증식을 억제하며;

[0278] (ix) 생체내에서 종양 세포 증식을 억제 및/또는 종양 세포의 세포사멸을 유도하고;

[0279] (x) CXCR4⁺ 종양 세포의 전이를 억제하며; 및/또는

[0280] (xi) CXCR4⁺ 종양을 함유하는 대상체의 생존 시간을 증가시키는 것.

[0281] 상기 변형된 항체들의 기능적 성질들은, 실시예에 설명(예컨대, 유세포 분석법, 결합 분석, 기능적 분석법)된 바와 같이, 당해 분야에서 이용가능하고 및/또는 본 명세서에 기술된 표준 분석법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0282] 본 발명의 항체를 조작하는 방법에 관한 소정의 실시예에서, 항-CXCR4 항체 암호화 서열의 전체 또는 일부를 따라서 돌연변이를 무작위적으로 또는 선택적으로 도입할 수 있고, 그 결과의 변형된 항-CXCR4 항체들을 본 명세서에 설명된 바와 같이, 결합 활성에 대하여 및/또는 다른 기능적 성질들에 대하여 스크리닝할 수 있다. 돌연변이 방법은 당해 분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, Short의 PCT 공개번호 제WO 02/092780호는 포화 돌연변이 생성법, 합성 결찰 조립법(synthetic ligation assembly) 또는 이의 조합 방법을 사용하여 항체 돌연변이를 생성하고 검출하는 방법을 기술하고 있다. 대안적으로, Lazar 등의 PCT 공개번호 제WO 03/074679호는 컴퓨터화된 스크리닝 방법을 사용하여 항체들의 생리학적 성질을 최적화시키는 방법들을 기술하고 있다.

[0283] 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자

[0284] 본 발명의 다른 관점은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 핵산은 온전한 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태 내에 존재할 수 있다. 핵산은, 알카라인/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동 및 당해 업계에 공지된 다른 기술을 포함한 표준 기술을 사용하여, 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때, "분리"되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. F. Ausubel 등, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 참조. 본 발명의 핵산은, 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고 인트론성 서열들을 포함할 수도 안할 수도 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 핵산은 cDNA 분자이다.

[0285] 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마(예, 후술하는 바와 같은 인간 면역글로불린 유전자를 지닌 유전자이식 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체의 경우, 하이브리도마에 의해 만들어진 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에

의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻어진(예, 파지 디스플레이 기술을 사용함) 항체의 경우, 그러한 항체를 암호화하는 핵산은 유전자 라이브러리로부터 회수할 수 있다.

[0286] 본 발명의 바람직한 핵산 분자들은 F7, F9, D1 및 E2 단일클론 항체들의 V_H 및 V_L 서열들을 암호화하는 것들이다. F7, F9, D1 및 E2의 V_H 서열들을 암호화하는 DNA 서열들은 각각 서열번호 33-36에 나타나 있다. F7, F9, D1 및 E2의 V_L 서열들을 암호화하는 DNA 서열은 각각 서열번호 37-40에 나타나 있다.

[0287] 일단 V_H 및 V_L 분절을 암호화하는 DNA 단편들을 얻는다면, 이러한 DNA 단편들은 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 더 조작하여, 예를 들어 가변 부위 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 변환시킬 수 있다. 이러한 조작에서, V_L - 또는 V_H -암호화 DNA 단편은 항체 불변 영역이나 유연한 링커와 같은, 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편과 작동적으로 연결되어 있다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "작동적으로 연결된"은, 두 개 DNA 단편들이 연결되어서 그 두 개 DNA 단편들에 의해 암호화된 아미노산 서열들이 프레임 내에 남아있는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0288] V_H 부위를 암호화하는 분리된 DNA는 V_H - 암호화 DNA를 중쇄 불변 영역들(CH1, CH2, 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써 전장 중쇄 유전자로 변환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자들의 서열은 당해 분야에 공지되어 있고(예를 들어, Kabat, E. A. 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조), 이러한 부위들을 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭으로 얻을 수 있다. 상기 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 부위일 수 있으나, 가장 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 불변 부위이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, V_H -암호화 DNA를 중쇄 CH1 불변 부위만을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결할 수 있다.

[0289] V_L 부위를 암호화하는 분리된 DNA는 V_L -암호화 DNA를 경쇄 불변 부위, C_L 을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써, 전장 경쇄 유전자(Fab 경쇄 유전자는 물론)로 변환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열들은 당해 분야에 공지되어 있고(예를 들어, Kabat, E. A. 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 참조), 이러한 부위들을 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭으로 얻을 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다.

[0290] scFv 유전자를 만들기 위해, V_H - 및 V_L -암호화 DNA 단편들을 유연한 링커를 암호화하는, 예를 들어, 아미노산 서열 $(Gly_4-Ser)_3$ 을 암호화하는 다른 단편과 작동적으로 연결시켜서, V_H 및 V_L 서열들을 상기 유연한 링커로 연결된 V_L 및 V_H 를 가지는 연속적인 단일 사슬 단백질로서 발현하게 할 수 있다(예를 들어, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty 등 (1990) *Nature* 348:552-554 참조).

[0291] 본 발명의 단일클론 항체의 생산

[0292] 본 발명의 단일클론 항체(mAbs)를 통상적인 단일클론 항체 방법, 예를 들어, Kohler 및 Milstein (1975) *Nature* 256:495 의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술로 생산할 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화 과정이 바람직하다 하더라도, 원칙적으로, 단일클론 항체를 생산하는 다른 기술, 예를 들어, B 림프구의 바이러스성 또는 종양원성적 형질전환을 사용할 수 있다.

[0293] 하이브리도마를 제조하기 위한 바람직한 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생산은 매우 잘 확립된 방법이다. 면역화 프로토콜 및 융합용 면역화된 비장세포의 분리 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. 융합 파트너들(예를 들어, 쥐의 골수종 세포) 및 융합 방법이 또한 공지되어 있다.

[0294] 본 발명의 키메라 또는 인간화된 항체들은 전술한 대로 제조된 비-인간 단일클론 항체의 서열에 근거하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린들을 암호화하는 DNA는 관심의 비-인간 하이브리도마로부터 얻을 수 있고, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 비-쥐(예, 인간) 면역글로불린 서열을 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성하기 위해, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 쥐의 가변 영역을 인간 불변 영역에 연결시킬 수 있다(예, Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호 참조). 인간화된 항체를 만들기 위해, 업계에 공지된 방법을 사용하여 쥐의 CDR 부위들을 인간 골격으로 삽입할 수 있다(예, Winter의 미국 특허 제5,225,539호

및 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

- [0295] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 항체들은 인간 단일클론 항체들이다. CXCR4에 대하여 지정된 그러한 인간 단일클론 항체들은 마우스 시스템보다는 인간 면역 시스템의 부분을 지닌 트랜스유전자성 또는 트랜스염색체성 마우스를 사용하여 생산할 수 있다. 이러한 트랜스유전자성 및 트랜스염색체성 마우스는 각각 본 명세서에서 HuMAb Mouse[®] 및 KM Mouse[®]로 지칭되는 마우스를 포함하고, 총칭하여 본원에서 "인간 Ig 마우스"라고 한다.
- [0296] HuMAb Mouse[®] (Medarex[®] 사)는 정렬되지 않은 인간 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열들을, 내인성 μ 및 κ 사슬 좌위를 불활성화시키는 타겟된 돌연변이와 함께 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 미소좌위(miniloci)를 포함한다(예, Lonberg, 등 (1994) *Nature* 368(6474):856-859 참조). 따라서, 그 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자들은 유형 전환(switching)과 체세포 돌연변이를 겪게되어 고 친화도 인간 IgG 단일클론 항체를 생성한다(Lonberg, N. 등, (1994) 위 문헌; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. 및 Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 및 Harding, F. 및 Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546에서 검토됨). HuMAb 마우스(HuMAb Mouse[®])의 제조와 사용, 및 이러한 마우스에 의한 게놈 변형은 Taylor, L. 등 (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. 등 (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi 등 (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. 등 (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon 등 (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. 등 (1994) *International Immunology* 6: 579-591; 및 Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851에 더 설명되어 있고, 이 모든 내용은 전체적으로 참조 문헌으로서 본 명세서에 특별히 병합된다. Lonberg 및 Kay의 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호; Surani 등의 미국 특허 제5,545,807호; Lonberg 및 Kay의 PCT 공개번호 제WO 92/03918호, 제WO 93/12227호, 제WO 94/25585호, 제WO 97/13852호, 제WO 98/24884호 및 제WO 99/45962호; 및 Korman 등의 PCT 공개번호 제WO 01/14424호를 더 참조.
- [0297] 다른 실시예에서, 인간 중쇄 트랜스유전자 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 지닌 마우스와 같은, 트랜스유전자 및 트랜스염색체상에 인간 면역글로불린 서열을 지닌 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체들을 만들 수 있다. 이러한 마우스는 본 명세서에서 "KM mouse[®]"로 지칭되며, Ishida 등의 PCT 공개번호 제WO 02/43478호에 더 상세하게 설명되어 있다.
- [0298] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 유전자이식 동물 시스템이 당해 분야에서 이용가능하고 본 발명의 항-CXCR4 항체를 키우는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제노마우스(Abgenix 사)로 지칭되는 대안적 유전자이식 시스템을 사용할 수 있는데; 그러한 마우스는, 예를 들어, Kucherlapati 등의 미국 특허 제5,939,598호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6, 150,584호 및 제6,162,963호에 설명되어 있다.
- [0299] 더구나, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스염색체성 동물 시스템은 당해 분야에서 이용가능하고 본 발명의 항-CXCR4 항체를 키우는데 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"로 지칭되는, 인간 중쇄 트랜스염색체 및 인간 경쇄 트랜스염색체 둘 다를 지닌 마우스를 사용할 수 있는데; 그러한 마우스는 Tomizuka 등 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727에 설명되어 있다. 또한, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스염색체를 지닌 소는 당해 분야에서 설명되어 있고(예컨대, Kuroiwa 등 (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894 및 PCT 출원 번호 제 WO 2002/092812호) 본 발명의 항-CXCR4 항체를 키우는데 사용될 수 있다.
- [0300] 본 발명의 인간 단일클론 항체들은 또한 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하는 파지 디스플레이 방법들을 사용하여 제조할 수 있다. 인간 항체들을 분리하는 이러한 파지 디스플레이 방법들은 당해 분야에 확립되어 있다. 예를 들어: Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; 제5,403,484호; 및 제5,571,698호; Dower 등의 미국 특허 제5,427,908호 및 제5,580,717호; McCafferty 등의 미국 특허 제5,969,108호 및 제6,172,197호; 및 Griffiths 등의 미국 특허 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호 및 제6,593,081호 참조.
- [0301] 본 발명의 인간 단일클론 항체들은 또한 인간 면역 세포가 재구성되어 인간 항체 반응이 면역화시 발생할 수 있는 SCID 마우스를 사용하여 제조할 수 있다. 그러한 마우스는, 예를 들어, Wilson 등의 미국 특허 제5,476,996호 및 제5,698,767호에 설명되어 있다.

- [0302] 특히 바람직한 실시예에서, Buechler 등의 미국 특허 제 6,794,132호에 기술된 바와 같이, 인간 항-CXCR4 항체는 인간 Ig 마우스 및 파지 디스플레이 기법의 조합을 이용하여 제조된다. 더구나 특히, 그 방법은 우선 인간 Ig 마우스(상기한 HuMab 마우스 또는 KM 마우스와 같은)를 CXCR4 항원으로 면역화시킴으로써 상기 마우스에 항-CXCR4 항체 반응을 키우고, 이어서 핵산 암호화 인간 항체 사슬을 마우스의 림프 세포로부터 분리하고 이러한 핵산을 디스플레이 벡터(예컨대, 파지)에 도입하여 디스플레이 패키지의 라이브러리를 제공하는 것을 포함한다. 따라서, 각 라이브러리 멤버는 인간 항체 사슬을 부호화하는 핵산을 포함하고 각 항체 사슬은 디스플레이 패키지로부터 나타내어진다. 그 다음 라이브러리를 CXCR4 항원으로 스크린하여 CXCR4에 특이적으로 결합하는 라이브러리 멤버를 분리한다. 그 후 선택된 라이브러리 멤버의 핵산 삽입물(inserts)을 표준 방법에 의하여 분리하고 배열하여 선택된 CXCR4 바인더의 경쇄 및 중쇄 가변 서열을 결정한다. 가변 부위는, VH 부위가 CH 부위에 작동적으로 연결되고 VL 부위가 작동적으로 CL 부위에 작동적으로 연결될 수 있도록 가변 부위를 인간 중쇄 및 경쇄 불변 부위를 지니는 발현 벡터로 클론화하는 것과 같은, 표준 재조합 DNA 기법에 의하여 전장 항체 사슬로 전환될 수 있다. 이 조합된 트랜스유전자 마우스/파지 디스플레이 시스템을 이용한 인간 항-CXCR4 항체의 제조에 대한 더 자세한 설명을 위하여, 실시예 1을 참조.
- [0303] 인간 Ig 마우스의 면역화
- [0304] 인간 Ig 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체를 키울 때, Lonberg, N. 등 (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; 그리고 및 PCT 공개 번호 제WO 98/24884호 및 제WO 01/14424호에 의하여 설명된 바와 같이, 그러한 마우스를 CXCR4 항원 및/또는 재조합 CXCR4의 정제되거나 농축된 제조물, 또는 CXCR4를 발현하는 세포, 또는 CXCR4 융합 단백질로 면역화할 수 있다. 바람직하게는, 상기 마우스는 첫 주입시가 6-16 주령일 것이다, 예를 들어, CXCR4 항원의 정제되거나 재조합 제조물 (5-50 μ g)은 복강내로 인간 Ig 마우스를 면역화시키는데 사용될 수 있다. 가장 바람직하게, 본 발명의 항체를 키우는 데 사용되는 면역원은 멤브레인 내의 면역원 본래의 형태 안에 인간 CXCR4를 포함하는데, 이의 제한되지 않는 예는 감염되어 감염된 세포 표면 상에 CXCR4를 발현하는 세포, CXCR4를 자연적으로 발현하는 세포(예컨대, CEM 세포), 및 CXCR4를 포함하는 자성적 프로테오리포솜(magnetic proteoliposomes, MPLs)(실시예 1에서 더 자세히 설명함)과 같이, CXCR4가 포함된 인공 멤브레인(예컨대, 리포솜)을 포함한다.
- [0305] CXCR4에 대한 인간 단일클론 항체를 충분히 생성하는 상세 과정이 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 다양한 항원들과의 축적된 실험에 따르면, 트랜스유전자 마우스는, 프로인트 완전 항원보강제(complete Freund's adjuvant) 내의 항원으로 복강내 (IP)로 처음 면역화시킨 후, 프로인트 불완전 항원보강제(incomplete Freund's adjuvant)의 항원으로 2 주마다 (총 6 번까지) IP 면역화시키면, 반응하는 것으로 나타났다. 그러나, 프로인트 이외의 다른 항원보강제도 효과적이라는 것이 발견되었다. 또한, 보강제 부재시 온전 세포가 높은 항원성이라는 것도 발견되었다. 안화후방 혈액(retroorbital bleed)에 의하여 얻은 혈장 샘플을 이용한 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐서 면역반응을 모니터링할 수 있다. 혈장을 ELISA로 스크린할 수 있고, 항-CXCR4 인간 면역글로불린의 충분한 역가를 가진 마우스를 융합에 사용할 수 있다. 비장을 희생 및 제거하기 3일 전에 마우스를 항원으로 정맥내 증폭시킨다. 각 면역화에 대하여 2-3 개 융합이 수행되는 것이 필요한 것으로 예상된다. 일반적으로, 각 항원에 대하여 6 내지 24 마리 마우스를 면역화시킨다. 통상, HCo7 및 HCo12 세포주 둘 다가 사용된다. 또한, HCo7 및 HCo12 트랜스유전자 둘 다를 두 개의 상이한 인간 중쇄 트랜스유전자 (HCo7/HCo12)를 가진 단일 마우스내로 함께 배양할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 실시예 1에 보인 바와 같이, KM Mouse[®] 세포주를 사용할 수 있다.
- [0306] 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성
- [0307] 본 발명의 인간 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마를 생성하기 위해, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포 및/또는 림프절 세포를 분리하고 적절한 무한증식 세포주, 예를 들어, 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 결과로 생성된 하이브리도마를 항원-특이성 항체들의 생성을 위하여 스크린할 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장 림프구들의 단일 세포 현탁액을 50% PEG를 사용하여, P3X63-Ag8.653을 분비하지 않는 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)의 수의 6분의 1에 융합시킬 수 있다. 대안적으로, 사이토플스(CytoPulse) 대형 챔버 세포 융합 전기천공기(CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Maryland)를 사용하여, 전기장에 근거한 전기융합 방법을 사용함으로써 면역화된 마우스의 비장 림프구의 단일세포 현탁액을 융합시킬 수 있다. 세포를 평평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에 약 2×10^5 으로 도달한 후, 20% 태아 클론 혈청, 18% "653" 조건 배양액, 5% origen (IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 units/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 겐타마이신 및 1X HAT (Sigma; HAT는 융합 24 시간 후에 첨가)를 함유하는 선택 배지에 2주일 배양한다. 약 2 주일 후에는, 세포를 HAT가 HT로 치환

된 배지에서 배양할 수 있다. 그 다음, 개별 웰을 인간 단일클론 IgM 및 IgG 항체들에 대하여 ELISA에 의하여 스크린할 수 있다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 일어나면, 통상 10-14 일후에 배지를 관찰할 수 있다. 하이브리도마를 분비하는 항체를 재도말하고, 다시 스크린하고 나서, 인간 IgG에 대하여 여전히 양성이면, 단일클론 항체들을 제한 희석법으로 적어도 두 번 서브클론화할 수 있다. 그 다음 안정된 서브클론들을 시험관 내에서 배양하여 특성화용 조직 배양 배지에서 소량의 항체를 생성할 수 있다.

[0308] 인간 단일클론 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제용 2 리터 스피너-플라스크에서 키울 수 있다. 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, N.J.)를 사용한 친화 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축할 수 있다. 용출된 IgG를 겔 전기영동과 고성능 액체 크로마토그래피로 점검하여 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충액을 PBS로 교환할 수 있고, 농도를 1.43 흡광계수를 사용하는 OD280으로 결정할 수 있다. 상기 단일클론 항체들을 분주하고 -80℃에 보관할 수 있다.

[0309] 본 발명의 단일클론 항체를 생산하는 트랜스펙토마의 생성

[0310] 본 발명의 항체들은 또한, 예를 들어, 당해 분야에 공지된 바와 같은 재조합 DNA 기술의 조합과 유전자 형질감염 방법을 사용하여, 숙주 세포 트랜스펙토마에서 생산할 수 있다(예, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

[0311] 예를 들어, 상기 항체 또는 이의 항체 단편을 발현하기 위해, 일부 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA는 표준 분자 생물학 기술(예, PCR 증폭 또는 관심의 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 클로닝)로써 수득할 수 있고 이러한 DNA들을 발현 벡터들에 삽입하여 그 유전자가 전사 및 번역 조절 서열에 작동적으로 연결되게 할 수 있다. 이러한 맥락에서, 용어 "작동적으로 연결된"은 항체 유전자가 벡터로 결합되어 벡터내의 전사 및 번역 조절 서열들이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그의 의도된 기능을 행하도록 하는 것을 의미한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열들은 사용되는 발현 숙주 세포에 사용할 수 있도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별개의 벡터로 삽입될 수 있거나, 더욱 일반적으로는 양쪽 유전자들이 동일한 발현 벡터로 삽입된다. 상기 항체 유전자는 표준 방법으로(예, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보 제한 위치의 절찰, 또는 제한 위치가 없는 경우 blunt 말단 절찰) 발현 벡터에 삽입될 수 있다. 본 명세서에서 설명된 항체들의 경쇄 및 중쇄 가변 영역들은, 이들을 원하는 이소타입의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 암호화하고 있는 발현 벡터 내로 삽입하여, 상기 벡터 내에서 V_H 분절이 C_H 분절(들)과 작동적으로 연결되고 벡터 내에서 V_L 분절이 C_L 분절과 작동적으로 연결되게 하여, 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성하는데 사용될 수 있다. 추가적으로, 또는 대안적으로, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포로부터 상기 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 상기 항체 사슬 유전자를 벡터로 클론화하여 신호 펩티드가 인-프레임으로 항체 사슬 유전자의 아미노산 말단에 연결되게 할 수 있다. 상기 신호 펩티드는 번역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드(즉, 비-번역글로불린 단백질로부터 유래된 신호 펩티드)일 수 있다.

[0312] 상기 항체 사슬 유전자에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열들을 운반한다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열들은, 예를 들어, Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 설명되어 있다. 조절 서열들의 선택을 포함하는, 발현 벡터의 구성은 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요소에 달려있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 이해될 것이다. 포유 숙주 세포 발현에 대한 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 계도하는 바이러스성 요소, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미언 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스 및 폴리오마 바이러스로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서(예, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(major late promoter (AdMLP)))를 포함한다. 대안적으로, 비바이러스성 조절 서열들, 예를 들어, 유비퀴틴 프로모터 또는 b-글로빈 프로모터를 사용할 수 있다. 또한, 조절 요소들은, SV40초기 프로모터로부터 유래된 서열들 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1의 긴 말단 반복체를 포함하는 SR α 프로모터 시스템과 같이, 상이한 소스로부터 얻어진 서열들로 구성될 수 있다(Takebe, Y. 등, (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

[0313] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열들에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가 서열, 예를 들어, 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예, 복제 개시점) 및 선택 마커 유전자와 같은 서열들을 운반할 수 있다. 상기 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, Axcl 등의 미국 특허 제 4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 일반적으로, 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에, G418, 하이그로마이신 또는 메토평렉세이트와 같은 약물에 대한 저항성을 부여한다. 바람직

한 선택 마커 유전자는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(메토틱렉세이트 선택/증폭으로 dhfr- 숙주 세포에서 사용) 및 네오(neo) 유전자(G418 선택용으로)를 포함한다.

[0314] 경쇄 및 중쇄를 발현하기 위해, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)를 표준 기술로써 숙주 세포로 형질감염시킨다. 용어 "형질감염"의 다양한 유형은 외부 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 도입하는 데 공통적으로 사용되는 기술, 예를 들어, 전기천공, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 내포하는 것으로 의도된다. 비록 본 발명의 항체들을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현하는 것이 이론적으로 가능하다고 할지라도, 진핵 세포, 및 가장 바람직하게는 포유 동물 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 것이 가장 바람직한데, 이는 그러한 진핵 세포, 및 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다, 적절히 폴딩되고 면역적으로 활성인 항체를 더 잘 모으고 분비할 것 같기 때문이다. 항체 유전자의 원핵성 발현은 활성 항체를 높은 효율로 생산하는 것에 비효율적이라는 것이 보고되었다(Boss, M. A. 및 Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

[0315] 본 발명의 제조항 항체들을 발현하기 위한 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난소(CHO 세포) (Urlaub 및 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216-4220 에서 설명된 dhfr⁻ CHO 세포를 포함, R. J. Kaufman 및 P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621 에서 설명된 바와 같이, DHFR 선택 마커와 같이 사용), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포와 같이 사용하기 위해, 다른 바람직한 발현 시스템은 제WO 87/04462호(Wilson), 제WO 89/01036호(Bebbington) 및 EP 제338,841 호(Bebbington)에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 암호화하는 제조항 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포로 도입될 때, 숙주 세포에서 항체가 발현하기에, 더 바람직하게는 항체가 숙주세포가 성장되는 배양 배지로 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 항체를 생산할 수 있다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 항체를 회수할 수 있다.

[0316] 항원에 결합하는 항체의 특징화

[0317] 본 발명의 항체를, 예를 들어, 표준 유세포 분석법에 의하여, CXCR4에 결합하는 것에 대하여 테스트할 수 있다. 본 발명의 항체가 바람직하게는 멤브레인 내의 그의 고유 형태 안에서 CXCR4를 인식하므로, CXCR4에 결합하는 것을 테스트하는 것을 바람직하게는 고유 형태 CXCR4를 발현하는 시약을 이용하는 분석법(예컨대, 유세포 분석법)으로 실시할 수 있다. 결합 분석법에 사용될 수 있는 고유 형태 CXCR4를 발현하는 시약의 제한되지 않는 예들은 CXCR4를 본래 발현하는 세포(예컨대, CEM 세포), 감염되어 CXCR4를 발현하는 세포(예컨대, CXCR4 발현 벡터로 감염된 R1610세포) 및 CXCR4가 혼입된 리포솜(예컨대, CXCR4를 혼입한 자성 프로테오리포솜)을 포함하는데, 이들 각각을 실시예들에서 좀 더 자세히 설명한다. 간략하게는, 유세포 분석법에서, CXCR4를 발현하는 세포를 테스트 항체로 배양하고, 세정하고, 상기 테스트 항체에 결합할 수 있는 표지된 2차 시약으로 배양하고, 다시 세정하고, 2차 시약의 세포에의 결합을 검출하는 분석을 한다(예컨대, FACS 기계를 사용). 바람직하게는, 유세포 분석법에 의하여 측정된 최고 역가를 전개한 마우스를 융합 또는 나아가 항체의 선택에 사용할 수 있다 (예컨대, 마우스의 B 세포로부터 만들어진 항체 라이브러리의 파지 디스플레이 스크리닝에 의하여).

[0318] 상술한 바와 같은 유세포 분석법을 또한 사용하여 CXCR4 면역원과의 양성 반응성을 보여주는 하이브리도마를 스크리닝할 수 있다. 높은 결합력으로 CXCR4에 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마를 서브클론화하고 나아가 특정할 수 있다. 부모 세포의 반응성을 보유하는(유세포 분석법에 의하여), 각 하이브리도마로부터 하나의 클론이, -140℃에서 저장된 5-10 바이얼 세포 은행(vial cell bank)을 만들고 항체를 정제하기 위하여 선택될 있다.

[0319] 항-CXCR4 항체를 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 단일클론 항체 정제용 2-리터 스피너-플라스크에서 키울 수 있다. 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 사용한 친화 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축할 수 있다. 용출된 IgG를 젤 전기영동과 고성능 액체 크로마토그래피로 점검하여 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충액을 PBS로 치환할 수 있고, 농도를 1.43 흡광계수를 사용하는 OD280으로 결정할 수 있다. 상기 단일클론 항체들을 분주하고 -80 °C에 보관할 수 있다.

[0320] 선택된 항-CXCR4 단일클론 항체가 특이한 에피토프에 결합하고 있는지를 판단하기 위하여, 각 항체를 시판되는 시약(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 비오틴화할 수 있다. 비표지된 단일클론 항체와 비오틴화된 단일클론 항체를 이용한 경쟁 연구를 ELISA 플레이트가 CXCR4를 발현하는 세포로 코팅되는 전체 세포 ELISA 분석법을 이용하여 실시할 수 있고, CXCR4를 발현하는 세포에 결합하는 것에 대하여 비오틴화된 항체와 경쟁하는 비표지된 항체의 능력을 점검한다. 비오틴화된 mAb 결합을 스트렙-아비딘-알카라인 포스파타제 탐침자(strep-avidin-alkaline phosphatase probe)로 검출할 수 있다.

- [0321] 정제된 항체들의 이소타입을 결정하기 위해, 특정 이소타입의 항체들에 특이적인 시약을 사용하여 이소타입 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들어, 인간 단일클론 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-인간 면역글로불린으로 밤새 4°C에서 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후, 플레이트를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 테스트 단일클론 항체들 또는 정제된 이소타입 대조군과 주변 온도에서 1 내지 2 시간 반응시킨다. 다음, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이성 알카라인 포스파타제-접합 탐침자와 반응시킬 수 있다. 플레이트를 발색시키고 진술한 바와 같이 분석한다.
- [0322] 웨스턴 블랏팅에 의하여, CXCR4 항원과의 반응성에 대하여 항-CXCR4 인간 IgG를 더 분석할 수 있다. 간략하게, CXCR4를 준비하고, 여기에 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한다. 전기영동 후, 분리된 항원들을 니트로셀룰로오스 막에 옮기고, 10% 태아 소혈청으로 차단하고, 테스트될 단일클론 항체들로 탐침한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알카라인 포스파타제를 사용하여 검출하고 BCIP/NBT 기질 타블렛으로 발색할 수 있다(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).
- [0323] 본 발명의 항체의 결합 특이성 또한, 예를 들어 유세포 분석법에 의하여, CXCR4를 발현하는 세포에 대한 항체의 결합을 모니터링함으로써 결정할 수 있다. 일반적으로, CHO 세포주와 같은, 세포주를 CXCR4의 트랜스멤브레인 형태를 암호화하는 발현 벡터로 감염시킬 수 있다. 감염된 단백질은, 태그에 대한 항체를 이용한 탐지용으로서, 바람직하게는 N-말단에서의, myc-태그와 같은, 태그를 포함할 수 있다. CXCR4에 대한 본 발명의 항체의 결합은 감염된 세포를 항체로 배양하고, 결합한 항체를 탐지함으로써 결정할 수 있다. 감염된 단백질 상에서 태그에 대한 항체의 결합은 양성 대조군으로 이용될 수 있다.
- [0324] 면역접합체
- [0325] 다른 관점에서, 본 발명은 세포독소, 약물 (예, 면역억제제) 또는 방사능독소와 같은 치료적 분체에 접합된, 항-CXCR4 항체, 또는 이의 단편을 특징으로 한다. 본원에서 그러한 접합체를 "면역접합체"로 지칭한다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 지칭한다. 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 해로운 (예, 죽음) 임의의 제제를 포함한다. 그 예는 택솔, 사이토킨라신(cytochalasin) B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에머틴, 마이토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 이의 유사체나 동족체를 포함한다. 치료제는 또한, 예를 들어, 항대사제(예, 메토타렉세이트, 6-메르캅토피리딘, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루로우라실 데카르바진), 알킬화제(예, 메크로레타민, 티오테파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 마이토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 플라티넘 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예, 다우노루비신(이전 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예, 닥티노마이신 (이전 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신(AMC)), 및 항-유사분열 제제(예, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 포함한다.
- [0326] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 치료적 세포독소의 다른 바람직한 예는 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 메이트산 및 오리스타틴 및 이의 유도체를 포함한다. 칼리케아미신 항체 접합체의 예는 상업적으로 입수할 수 있다(MyloTarg[®]; American Home Products).
- [0327] 당해 분야에 이용가능한 링커 기술을 사용하여 세포독소를 본 발명의 항체에 접합할 수 있다. 항체에 세포독소를 접합하는데 사용된 링커 유형의 예는, 하이드라존, 티오에테르, 에스테르, 이황화물 및 펩티드-함유 링커를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 리소좀 구획 내에서 저 pH에 의해 절단되거나, 카텝신(예, 카텝신 B, C, D)과 같이 종양 조직에서 선택적으로 발현되는 프로테아제와 같은 프로테아제에 절단되기 쉬운 링커를 선택할 수 있다.
- [0328] 치료제를 항체에 접합시키는 세포 독소, 링커 및 방법들에 대한 더 상세한 논의를 위하여, Saito, G. 등 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. 등 (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. 및 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. 및 Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264를 참조.
- [0329] 본 발명의 항체를 또한 방사능 동소체에 접합시켜 세포독성 방사능약물을 생성할 수 있고, 또한 이를 방사능 면역접합체로 지칭한다. 진단적으로 또는 치료적으로 사용하기 위한 항체들에 접합될 수 있는 방사능 동소체의 예는, 요오드¹³¹, 인듐¹¹¹, 이트륨⁹⁰ 및 루테튬¹⁷⁷을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 방사능 면역접합체를 제조하

는 방법은 당해 분야에 확립되어 있다. 방사능 면역접합체의 예는 상업적으로 입수할 수 있는, Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) 및 Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals)을 포함하며, 유사 방법을 사용하여 본 발명의 항체를 이용하는 방사능 면역접합체를 제조할 수 있다.

[0330] 본 발명의 항체 접합체를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 변경할 수 있고, 약물 분체는 전통적인 화학 요법 제제에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 상기 약물 분체는 원하는 생물학적 활성을 지닌 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질들은, 예를 들어, 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 활성 단편, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어, 종양괴사인자 또는 인터페론- γ ; 또는, 생물학적 반응 전환제, 예를 들어, 림포카인, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0331] 그러한 치료적 분체를 항체들에 접합하는 기술은, 예를 들어, Arnon 등, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 등 (eds.), pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 등, "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 등 (eds.), pp. 623-53 Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 등 (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 등 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 및 Thorpe 등, *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)에서 잘 개시되어 있다.

[0332] 이중특이성 분자

[0333] 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항-CXCR4 항체, 또는 이의 단편을 포함하는 이중 특이성 분자를 특징으로 한다. 본 발명의 항체, 또는 이의 항원-결합부는, 다른 기능성 분자, 예컨대, 다른 펩티드 또는 단백질(예, 다른 항체 또는 수용체에 대한 리간드)로 유도되거나 연결되어 적어도 두 개 상이한 결합 위치 또는 타겟 분자에 결합하는 이중특이성 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 사실상 하나 이상의 다른 기능성 분자에 유도되거나 연결되어 두 개 이상의 상이한 결합 위치 및/또는 타겟 분자들에 결합하는 다중특이성 분자를 생성하는데; 그러한 다중특이성 분자들은 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중특이성 분자"에 내포되는 것으로 의도된다. 본 발명의 이중특이성 분자를 만들기 위해, 본 발명의 항체를, 다른 항체, 항체 단편, 펩티드 또는 결합의 대체와 같은, 하나 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 연결시키는데(예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 연합 또는 기타 등등), 그렇게 하여 이중특이성 분자를 만들어낸다.

[0334] 따라서, 본 발명은 CXCR4에 대한 적어도 하나의 제 1 결합 특이체 및 제 2 타겟 에피토프에 대한 제 2 결합 특이체를 포함하는 이중특이성 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 실시예에서, 상기 제 2 타겟 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 Fc γ RI (CD64) 또는 인간 Fc α 수용체 (CD89)이다. 따라서, 본 발명은 Fc γ R 또는 Fc α 발현 작용 세포(예, 단핵구, 대식세포 또는 다형핵 세포(PMN)), 및 CXCR4를 발현하는 타겟 세포 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이성 분자를 포함한다. 이러한 이중특이성 분자들은 CXCR4 발현 세포를 작용 세포에 타겟시키고 Fc 수용체-매개 작용세포 활성화, 예를 들어, CXCR4 발현 세포의 대식작용, 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 사이토카인 분비, 또는 슈퍼옥사이드 음이온의 발생을 개시한다.

[0335] 이중특이성 분자가 다중특이성인 본 발명의 일 실시예에서, 상기 분자는 항-Fc 결합 특이체 및 항-CXCR4 결합 특이체에 더하여 제 3 결합 특이체를 더 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 제 3 결합 특이체는 항-증진 인자(EF) 부, 예를 들어, 세포독성 활성화에 수반된 표면 단백질에 결합하여 타겟 세포에 대하여 면역 반응을 증가시키는 분자이다. 상기 "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들어 항원 또는 수용체에 결합하는 항체, 기능적 항체 단편 또는 리간드일 수 있고, 따라서 Fc 수용체 또는 타겟 세포 항원에 대한 결합 결정자의 작용을 향상시키는 결과를 낳는다. 상기 "항-증진 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 타겟 세포 항원과 결합할 수 있다. 대안적으로, 상기 항-증진 인자 부분은 제 1 및 제 2 결합 특이체들이 결합하는 독립체와는 다른 독립체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포와 결합할 수 있다(예를 들어, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는, 타겟 세포에 대하여 면역 반응을 증진시키는 결과를 가져오는 다른 면역 세포를 통해서).

[0336] 일 실시예에서, 본 발명의 이중특이성 분자는 결합 특이체로서, 적어도 하나의 항체, 또는 이의 항체 단편을 포

함하고, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb 또는 단일 사슬 Fv를 포함한다. 상기 항체는 또한 경쇄 또는 중쇄 이량체, 또는 이의 임의의 최소 단편일 수 있고, 예를 들어 Fv 또는 단일 사슬 작제물일 수 있고, 이는 Ladner 등의 미국 특허 제 4,946,778 호에 기술되어 있고, 이의 내용은 참조문헌으로서 명백히 본 명세서에 병합된다.

[0337] 한 실시예에서, Fc γ 수용체에 대한 결합 특이체가 단일클론 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 인간 면역글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "IgG 수용체"는 염색체 1 상에 위치한 8 개 γ -사슬 유전자들 중의 임의의 것을 지칭한다. 이러한 유전자들은 총 12 개의 트랜스멤브레인 또는 용해성 수용체 이소유형을 암호화하고 있고 이들은 세 가지 Fc γ 수용체 군으로 나뉜다: Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32), 및 Fc γ RIII(CD16). 바람직한 일 실시예에서, Fc γ 수용체는 인간 고친화성 Fc γ RI이다. 인간 Fc γ RI은 72 kDa 분자이고, 단량체성 IgG에 대하여 높은 친화도를 나타낸다(10^8 - 10^9 M⁻¹).

[0338] 소정의 바람직한 항-Fc γ 단일클론 항체들의 생산 및 특성화는 Fanger 등의 PCT 공개번호 제WO 88/00052호 및 미국 특허 제4,954,617호에 기술되어 있고, 이의 교시는 본 명세서에 참조문헌으로서 완전히 병합된다. 이러한 항체들은 수용체의 Fc γ 의 결합 위치와 구별되는 위치에서 Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII의 에피토프에 결합하고, 따라서, 그 결합은 IgG의 생리적 수준에 의해서 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이성 항-Fc γ RI 항체들은 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32 를 생산하는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection), ATCC 기탁번호 HB9469로부터 입수가능하다. 다른 실시예에서, 상기 항-Fc γ 수용체 항체는 단일클론 항체 22의 인간화 형태이다 (H22). H22 항체의 생산과 특성화는 Graziano, R. F. 등 (1995) *J. Immunol* 155 (10):4996-5002 및 Tempest 등의 PCT 공개번호 제WO 94/10332호에 기술되어 있다. H22 항체 생산 세포주는 HA022CL1의 지정하에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁되었고 및 기탁번호 CRL 11177을 가진다.

[0339] 다른 바람직한 실시예에서, Fc 수용체에 대한 결합특이성이 인간 IgA 수용체, 예를 들어, Fc α RI (CD89)에 결합하는 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 바람직하게는 인간 면역글로불린 A(IgA)에 의해 차단되지 않는다. 용어 "IgA 수용체"는 염색체 19 상에 위치한 하나의 α -유전자(Fc α RI)의 유전자 산물을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 유전자는 55 내지 110 kDa의 수 개의 교호적으로 스플라이스된 트랜스멤브레인 이소형태를 암호화하는 것으로 알려져 있다. Fc α RI(CD89)은 단핵구/대식세포, 호산구 및 호중구 과립세포 상에 구조적으로 발현되나, 비작용(non-effector) 세포군 상에서는 아니다. Fc α RI은 IgA1 및 IgA2 둘 다에 대하여 중간 정도의 친화도($\approx 5 \times 10^7$ M⁻¹)를 가지며, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF와 같은 사이토카인에 노출시 증가된다 (Morton, H. C. 등 (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). A3, A59, A62 및 A77로서 동정된, IgA 리간드 결합 도메인 외부의 Fc α RI과 결합하는, 4 개 Fc α RI-특이성 단일클론 항체가 설명된다(Monteiro, R. C. 등 (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

[0340] Fc α RI 및 Fc γ RI은 본 발명의 이중특이성 분자에 사용하기에 바람직한 개시 수용체인데, 이는 이들이 (1) 면역 작용세포, 예를 들어, 단핵구, PMN, 대식세포 및 수지상 세포 상에서 일차적으로 발현되고; (2) 높은 수준(예, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되며; (3) 세포독성 활성의 매개자이고(예, ADCC, 대식작용); 및 (4) 이들에 타겟된, 자체-항원을 포함한, 항원의 향상된 항원 제시를 매개하기 때문이다.

[0341] 인간 단일클론 항체가 바람직하지만, 본 발명의 이중특이성 분자에 사용될 수 있는 다른 항체는 쥐, 키메릭 및 인간화 단일클론 항체이다.

[0342] 본 발명의 이중특이성 분자는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여, 구성적 결합 특이체, 예를 들어, 항-FcR 및 항-CXCR4 결합 특이체들을 접합함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 이중특이성 분자의 각 결합 특이체는 분리적으로 생성되고 이후에 서로 접합될 수 있다. 상기 결합 특이체들이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링 또는 교차결합 제제가 공유결합성 접합에 사용될 수 있다. 교차결합 제제의 예는 단백질 A, 카보디이미드, N-석신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이미드(oPDM), N-석신이미딜-3-(2-피리디닐티오)프로피오네이트(SPDP), 및 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트(sulfo-SMCC)를 포함한다(예, Karpovsky 등 (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA 등 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648 참조). 다른 방법들은 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan 등 (1985) *Science* 229:81-83, 및 Glennie 등 (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375 참조). 바람직한 접합 제제는 SATA 및 sulfo-SMCC이고, 둘 다 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)에서 입수할 수 있다.

- [0343] 결합 특이체들이 항체인 경우, 이들은 두 개 중쇄의 C-말단 힌지 부위의 설피드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특히 바람직한 실시예에서, 접합 전에, 힌지 부위는 변형되어 홀수의 설피드릴 잔기, 바람직하게는 하나를 포함한다.
- [0344] 대안적으로, 양 쪽 결합 특이체들이 동일 벡터에서 암호화되어 있고, 동일한 숙주 세포에서 발현되고 회합될 수 있다. 이러한 방법은 상기 이중특이성 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 용합 단백질인 경우 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 분자는 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 분자, 또는 두 개 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 이중특이성 분자일 수 있다. 이중특이성 분자는 적어도 두 개 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 분자를 제조하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제5,260,203호; 제5,455,030호; 제4,881,175호; 제5,132,405호; 제5,091,513호; 제5,476,786호; 제5,013,653호; 제5,258,498호; 및 제5,482,858호에 설명되어 있고, 이들 모두는 본 명세서에 참조문헌으로서 명백히 병합된다.
- [0345] 이중특이성 분자가 그의 특이성 타겟에 결합하는 것은, 예를 들어, 효소연관 면역흡착법(ELISA), 방사능면역분석(RIA), FACS 분석, 생체분석(예, 성장 억제), 또는 웨스턴 블랏 분석으로 확인될 수 있다. 이러한 분석법의 각각은 일반적으로, 관심의 복합체에 특이성인 표지된 시약(예, 항체)을 사용함으로써, 특정 관심의 단백질-항체 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, FcR-항체 복합체는 항체-FcR 복합체를 인식하고 특이적으로 결합하는, 예컨대 효소-연계 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출될 수 있다. 대안으로, 상기 복합체는 다양한 다른 면역분석법 중 임의의 것을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 방사능으로 표지되고 방사능면역분석(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986 참조, 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기재됨). 방사능 동위원소는 γ 계수기 또는 신틸레이션 카운터와 같은 수단을 사용하여 또는 자가방사기록법(autoradiography)으로 검출될 수 있다.
- [0346] 약제학적 조성물
- [0347] 다른 관점에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 본 발명의 단일클론 항체, 또는 이의 항원-결합부(들) 중 하나 또는 조합물을 포함하고, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 배합된 약제학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물들은 본 발명의 (예를 들어, 두 개 이상의 상이한) 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자의 하나 또는 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 타겟 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 또는 상보적 활성을 가지는 항체(또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함할 수 있다.
- [0348] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 조합 요법, 즉 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 적어도 하나의 다른 항-염증성 또는 면역억제제와 조합된 본 발명의 항-CXCR4 항체를 포함할 수 있다. 조합 요법에 사용될 수 있는 치료제의 예들은 본 발명의 항체의 용도에 대한 부분에서 더 자세히 후술한다.
- [0349] 본 명세서에서 사용되는, "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리학적으로 양립할 수 있는, 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅물, 항박테리아성 및 항균성 제제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 바람직하게는, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구적, 척추 또는 표피 투여(예, 주사 또는 주입으로)에 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체, 또는 이중특이성 분자는 산의 작용 및 화합물을 불활성화시키는 다른 자연적 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅할 수 있다.
- [0350] 본 발명의 약제학적 화합물은 하나 이상의 약제학적 허용염을 포함할 수 있다. "약제학적 허용염"은 부모 화합물의 바람직한 생물학적 활성을 유지하고 임의의 바람직하지 않은 독소학적 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예, Berge, S. M. 등 (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 참조). 그러한 염의 예는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산 부가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 비독성 무기산으로부터 유도된 것은 물론, 지방족 모노- 및 디카르복실산, 페닐-치환된 알카노산, 하이드록시 알카노산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것을 포함한다. 염기 부가 염은, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알칼리 토금속으로부터 유도된 것은 물론 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 비독성 유기아민류로부터 유도된 것을 포함한다.
- [0351] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 약제학적 허용가능 항산화제를 포함할 수 있다. 약제학적 허용가능 항산화제의 예는: (1) 아스코르브산, 시스테인 염산염, 소듐 비셀레이트, 소듐 메타비셀파이트, 소듐 셀파이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코빌 팔미테이트, 부틸레이티드 하이드록시아니솔(BHA), 부틸레이티드 하이드록시

톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 시트르 산, 에틸렌 디아민 테트라아세트 산(EDTA), 소르비톨, 타르타르 산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트화제를 포함한다.

[0352] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올류(글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은) 및 이의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르류를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0353] 이러한 조성물은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 미생물 존재의 예방은 전술한 살균 공정 및, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브 산 등과 같은 다양한 항박테리아 및 항진균성 제제 주입으로 확립할 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제제를 조성물에 포함하는 것이 또한 바람직하다. 이에 더하여, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함하여 주사 약제학적 형태의 흡수를 연장할 수 있다.

[0354] 약제학적 허용가능 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용액이나 분산액의 임시 제조물용 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질용으로 그러한 매체 및 제제를 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매체 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고는, 본 발명의 약제학적 조성물에 이를 사용하는 것이 포함된다. 보조적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0355] 치료적 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 환경하에서 반드시 멸균적이고 안정적이어야 한다. 상기 조성물을 용액, 미소유화액, 리포솜, 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 구조로서 배합할 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물을 포함하는 용매나 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 등장제제, 예를 들어, 당, 폴리알코올류, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 바람직하다. 예를 들어 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 조성물에 포함시킴으로써 주사 약제학형태의 흡수를 연장할 수 있다.

[0356] 멸균된 주사가능한 용액은, 활성 화합물을 적절한 용매에 요구되는 양으로, 필요한 경우, 상기 설명된 성분 중 하나 또는 조합물과 같이 배합하고, 멸균 마이크로정제하여 제조될 수 있다. 일반적으로 분산액은 상기 활성 화합물을, 염기성 분산매 및 상기 설명된 것의 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 용액(vehicle)에 배합하여 제조된다. 멸균된 주사용 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(lyophilization)이고 이는 활성 성분에 더하여 이의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 산출한다.

[0357] 담체 물질과 조합하여 단일 투약 형태를 생성하는 활성 성분의 양은 처리될 대상체 및 투여의 특정 방식에 따라 변할 것이다. 단일 투약 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타내는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중에, 이러한 양은 활성 성분의 약 0.01 % 내지 약 99%, 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 70%, 더 바람직하게는 활성 성분의 약 1% 내지 약 30%가 약제학적 허용되는 담체와 조합되어 있다.

[0358] 투약 섭생은 최적의 원하는 반응(예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될 수 있고, 수 개 분리된 투약물이 여러 번 투여될 수 있고 또는 투여량은 치료 상태의 긴급성에 의해 지시되는 바와 같이, 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이함 및 투여의 일관성을 위해 비경구 조성물을 투약 단위 형태로 배합하는 것이 특히 유리하다. 투약 단위 형태는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 치료될 대상체에 단일성 투약물로서 적절한 물리적으로 분리된 단위체를 지칭하고, 각 단위체는 요구되는 약제학적 담체와 연합하여 요구되는 치료 효과를 생성하는 데 계산된 활성 화합물의 소정의 양을 포함한다. 본 발명의 투약 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 고유의 특성 및 이루어지는 특정 치료효과, 및 (b) 개인에게서 민감성의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 조제하는 당해 분야에 고유한 제한에 의해 지시되고 및 직접적으로 의존한다.

[0359] 항체의 투여의 경우, 투여량은 숙주 체중 kg 당 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중이거나 1-10 mg/kg의 범위에 있다. 예증적인 치료 섭생은 일 주에 한번, 이 주에 한번, 삼 주에

한번, 사 주에 한번, 한 달에 한 번, 세 달에 한번, 또는 삼 내지 육 개월에 한 번 투여될 수 있다. 본 발명의 항-CXCR4 항체에 대한 바람직한 투여 섭생은 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중 정맥 내 투여를 포함하고, 상기 항체는 하기 투여 스케줄 중 하나를 이용한다: (i) 4 주마다 6 번 투여 후, 3 달 마다 투여; (ii) 3 주 마다; (iii) 3 mg/kg 체중 한 번 투여 후, 매 3 주 마다 1 mg/kg 체중 투여.

[0360] 어떤 방법에서, 상이한 결합 특이성을 가지는 두 개 이상의 단일클론 항체를 동시에 투여하며, 이 경우, 투여되는 각 항체의 투여량은 지시된 범위에 속한다. 항체는 통상적으로 여러 번 투여된다. 단일 투여 간의 간격은, 예를 들어, 주간, 월간, 삼개월 또는 연간일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 타겟 항원에 대한 항체의 혈중 농도를 측정하여 지시되는 바에 따라, 불규칙할 수 있다. 어떤 방법에서, 투여량은 약 1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 혈장 항체 농도, 및 특정의 방법에서는 약 25-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 얻도록 조절한다.

[0361] 대안적으로, 항체는 지속 방출(sustained release) 배합물로서 투여될 수 있고, 이 경우, 투여 횟수가 줄어든다. 투여량 및 횟수는 환자에서 항체의 반감기에 의존하여 변한다. 일반적으로, 인간 항체들은 가장 긴 반감기를 보이며, 인간화된 항체들, 키메라 항체들, 및 비인간 항체들이 그 뒤를 따른다. 투여량 및 투여 횟수는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 변할 수 있다. 예방적 적용에서는, 상대적으로 적은 투여량이 긴 시간에 걸쳐서 상대적으로 적은 횟수로 투여된다. 특정 환자는 그들 수명의 남은 기간 동안 치료를 계속 받는다. 치료적 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지 및 바람직하게, 환자가 질병의 증상의 부분적으로 또는 완전한 개선을 보일 때까지 상대적으로 낮은 투여량으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자는 예방적 섭생 방식으로 투여될 수 있다.

[0362] 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은, 특정 환자에 대하여, 환자에게 독성이 없이, 바람직한 치료 반응을 얻는 데 효과적인 활성성분의 양, 조성, 및 투여 방식을 얻도록, 변화시킬 수 있다. 선택된 투약 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물, 또는 이의 에스테르, 염이나 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강과 이전 의료 기록, 및 의료 분야에 공지된 다른 요인들을 포함하는 다양한 약물동력학 요인들에 의존할 것이다.

[0363] 본 발명의 항-CXCR4 항체의 "치료적으로 유효한 투여량"은 바람직하게는 질병 증상의 중증도를 감소시키고, 무증상질환 기간의 빈도 및 기간을 증가시키고, 또는 질병 고통으로 인한 장애나 불능을 방지하는 결과를 가져온다. 예를 들어, CXCR4⁺ 종양의 치료의 경우, "치료적으로 유효한 투여량"은, 미치료 대상체에 비하여, 세포 성장 또는 종양 성장을 바람직하게는 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 60%, 및 더더욱 바람직하게는 적어도 약 80% 만큼 억제한다. 종양 성장을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예시하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 이러한 조성물의 성질은 세포 성장을 억제하는 화합물의 능력을 조사함으로써 평가될 수 있고, 그러한 억제는, 숙련된 실험자에 공지된 분석 방법으로 시험관 내에서 측정될 수 있다. 치료 화합물의 치료적 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감소시키거나, 다르게는 증상을 개선시킨다. 당해 분야의 통상적인 숙련자는 대상체의 크기, 대상체 증상의 중증도, 및 선택된 투여의 특정 조성물이나 경로와 같은 요인에 근거하여 그러한 양을 결정할 수 있을 것이다.

[0364] 본 발명의 조성물을 당해 분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여의 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 의존하여 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는, 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척추 또는 다른 비경구 투여, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 투여를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는, 어구 "비경구 투여"는, 장 및 국소 투여외의 투여 방식, 통상적으로는 주사에 의한 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 관절낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피부내, 복강내, 경기관(transtracheal), 피하, 표피하(subcuticular), 관절내, 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내, 경막외(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0365] 대안적으로, 본 발명의 항체는 국소, 표피 또는 점막 투여경로와 같은, 비경구가 아닌 경로, 예를 들어, 비강내, 경구적으로, 질내로, 직장내로, 설하내로 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0366] 활성 화합물은 조절된 분비 배합물과 같이, 이식물, 경피 패치, 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 빠른 분비에 대하여 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드류, 폴리글리콜 산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르류, 및 폴리락트 산과 같은, 생체분해성, 생체양립성 중합체를 사용할 수 있다. 그러한 배합물을 제조하기 위한 많은 방법은 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson ed.,

Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 참조.

- [0367] 치료 조성물은 당해 분야에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 실시예에서, 본 발명의 치료 조성물은 미국 특허 번호 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 개시된 장치와 같이 바늘없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유효한 공지된 이식물 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 미국 특허 번호 제4,487,603호, 조절된 속도로 약물을 분배하는, 이식될 수 있는 마이크로-주입 펌프를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,486,194호, 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 장치를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,447,233호, 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,447,224호, 연속적인 약물 전달용, 가변성 흐름 이식성 주입 장치를 보여줌; 미국 특허 번호 제4,439,196호, 다중-챔버 구획을 가지는 삼투압성 약물 전달 시스템을 보여줌; 및 미국 특허 번호 제4,475,196호, 삼투압성 약물 전달 시스템을 보여줌. 이러한 특허들은 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다. 많은 다른 그러한 이식물, 전달 시스템, 및 모듈은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.
- [0368] 소정 실시예의 경우, 본 발명의 인간 단일클론 항체들을 배합하여 생체 내에서 적절히 분포하게 할 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽(BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제시킨다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 확실하게 하기 위해(필요시), 상기 화합물은, 예를 들어, 리포솜 내에 배합될 수 있다. 리포솜 제조 방법에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조. 리포솜들은 선택적으로 특정 세포 또는 기관으로 운반되는 하나 이상의 분체를 포함하며, 따라서 타겟된 약물 전달을 향상시킬 수 있다(예컨대, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685 참조). 타겟 분체들의 예는 폴레이트 또는 비오틴(예컨대, Low 등의 미국 특허 번호 제 5,416,016호 참조); 만노시드(Umezawa 등 (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 항체(P.G. Bloeman 등 (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais 등 (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 계면활성제 단백질 A 수용체(Briscoe 등 (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier 등 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); 또한 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273 참조)을 포함한다.
- [0369] 용도 및 방법
- [0370] 항체, 특히 본 발명의 인간 항체, 항체 조성물 및 방법은 CXCR4 매개 질환의 진단 및 치료를 포함한 수 많은 시험관내 및 생체내 진단과 치료 유용성을 가진다. 예를 들어, 시험관내 또는 생체외, 또는 인간 대상체, 예컨대 생체내로, 이러한 분자들을 배양중인 세포로 투여하여, 다양한 질환을 치료, 예방 및 진단할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 비-인간 동물은 모든 척추동물들, 예를 들어, 포유동물, 및 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류, 및 파충류와 같은 비포유동물을 포함한다. 바람직한 대상체는 CXCR4 활성화에 의해 매개되거나 또는 조절되거나 CXCR4/SDF-1 경로를 수반하는 질환을 가지는 인간 환자를 포함한다. CXCR4에 대한 항체를 다른 제제와 함께 투여할 때, 이 둘은 순차적으로 또는 동시에 투여할 수 있다.
- [0371] 본 발명의 항체가 CXCR4에 대하여 특이적 결합하는 경우, 본 발명의 항체를 사용하여 세포 표면 상에 CXCR4 발현을 특이적으로 검출할 수 있고, 또한, 면역친화성 정제를 통해 CXCR4를 정제할 수 있다.
- [0372] 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 단일클론 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)의 적절한 생체내 및 시험관 내 투여 경로는 당해 분야에 공지되어 있고, 통상의 기술을 가진자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 조성물을 주사로 투여할 수 있다(예, 정맥내 또는 피하내). 상기 사용되는 분자의 적절한 투여량은 대상체의 나이와 체중, 및 항체 조성물의 농도 및/또는 배합에 의존할 것이다.
- [0373] 전술한 바와 같이, 본 발명의 인간 항-CXCR4 항체는 하나 이상의 다른 치료제제, 예를 들어, 세포독성 제제, 방사성독성 제제 또는 면역억제제와 공동 투여될 수 있다. 상기 항체는 상기 제제에 연결될 수 있거나(면역복합체로서) 또는 상기 제제와 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우(별도 투여), 상기 항체는 상기 제제 투여 전, 후 또는 동시에 투여할 수 있거나, 다른 공지된 요법, 예를 들어, 항암 요법, 예를 들어 방사선 요법과 공동투여될 수 있다. 그러한 치료제들은, 특히, 항-종양 제제, 예를 들어, 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴, 블레오마이신 설페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 시클로포스파미드 하이드록시우레아를 포함하며, 이들은 그 자체로, 환자에 독성이거나 약독성(subtoxic)인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 4주에 한번씩 100 mg/kg 투여량으로 정맥내 투여되며 아드리아마이신은 21일 마다 한번씩 60-75 mg/ml 투여량으로 정맥내 투여된다. 본 발명의 인간 항-CXCR4 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 화학요법제를 공동 투여하면, 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 나타내는 상이한 가작을 통해 작동하는 두 개의 항암제를 제공하게 된다. 그러한 공동 투여는, 약물에

대한 저항성의 발달로 인한 문제점 또는 종양세포가 상기 항체에 비반응적이 되도록 하는, 종양 세포의 항원성에서의 변화로 인한 문제점을 해결할 수 있다.

- [0374] 타겟-특이성 작용 세포, 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)에 연결된 작용세포(effector cell)들을 또한 치료제로서 사용할 수 있다. 타겟팅용 작용 세포는 대식세포, 호중구 또는 단핵구와 같은 인간 백혈구일 수 있다. 다른 세포들은 호산구, 중성 살해 세포 및 다른 IgG- 또는 IgA-수용체 함유 세포를 포함한다. 필요시, 작용 세포들은 처리될 대상체로부터 얻을 수 있다. 타겟-특이성 작용 세포들을 생리적 허용 용액에서 세포 현탁액으로서 투여할 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약 10^8 - 10^9 이나, 치료 목적에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 그 양은 타겟 세포, 예를 들어, CXCR4를 발현하는 종양 세포에서 국소화되고 그리고 예를 들어, 대식 작용에 의해 세포 살해를 수행하기에 충분할 정도이다. 투여 경로는 또한 변할 수 있다.
- [0375] 타겟-특이성 작용 세포를 사용한 요법은 타겟된 세포를 제거하는 다른 기술과 연계하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)을 사용한 항-종양 요법 및/또는 이러한 조성물로 무장한 작용 세포를 화학요법과 연계하여 사용할 수 있다. 추가로, 조합 면역요법을 사용하여 두 개의 구별되는 세포독성 작용 세포군을 종양 세포 격퇴에 향하게 할 수 있다. 예를 들어, 항-Fc-감마 RI 또는 항-CD3에 연결된 항-CXCR4 항체를 IgG- 또는 IgA-수용체 특이성 결합 제제와 연계하여 사용할 수 있다.
- [0376] 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자를 사용하여 또한, 예를 들어, 세포 표면 상에 있는 수용체를 캡핑하거나 제거함으로써, 작용 세포 상의 Fc γ R 또는 Fc γ R 수준을 조절할 수 있다. 항-Fc 수용체들의 혼합물을 또한 이 목적에 사용할 수 있다.
- [0377] 보체와 결합하는 IgG1, IgG2, 또는 IgG3, 또는 IgM의 부분과 같이, 보체 결합 위치를 가지는, 본 발명의 조성물(예, 인간, 인간화된 또는 키메라 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)을 또한 보체 존재 하에서 사용할 수 있다. 일 실시예에서, 타겟 세포를 포함하는 일 군의 세포를 본 발명의 결합제 및 적절한 작용 세포로 생체 외 처리에, 보체 또는 보체 함유 혈청을 첨가하는 것이 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코팅된 타겟 세포의 대식 작용은 보체 단백질의 결합으로 향상될 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)로 코팅된 타겟 세포는 또한 보체에 의해 용해될 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명의 조성물은 보체를 활성화시키지 않는다.
- [0378] 본 발명의 조성물(예, 인간, 인간화된, 또는 키메라 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)은 또한 보체와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위 내에서, 인간 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자 및 혈청이나 보체를 포함하는 조성물들은 본 발명의 범위내에 있다. 이러한 조성물들은 보체가 인간 항체, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들 바로 가까이에 위치한다는 점에서 유리하다. 대안적으로, 본 발명의 인간 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자 및 보체나 혈청은 따로 투여될 수 있다.
- [0379] 본 발명의 항체는 또한 하나 이상의 추가적 치료 항체 또는, Ig 융합 단백질과 같은, 다른 결합제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 항-CXCR4 항체를 투여할 때 조합하는 다른 항체 또는 결합제의 비-제한적 예들은 CTLA-4, PSMA, CD30, IP-10, IFN- γ , CD70, PD-1, PD-L1, TNF, TNF-R, VEGF, VEGF-R, CCR5, IL-1, IL-18, IL-18R, CD19, Campath-1, EGFR, CD33, CD20, Her-2, CD25, gpIIb/IIIa, IgE, CD11a, α 4 integrin, IFN α 및 IFNAR1에 대한 항체 또는 결합제를 포함한다.
- [0380] 또한 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 항체들, 이중특이성 또는 다중특이성 분자, 또는 면역접합체) 및 이의 용도에 대한 설명서를 포함하는 키트 또한 본 발명의 범위에 속한다. 상기 키트는 하나 이상의 추가적인 시약, 예를 들어, 면역억제제, 세포독성제 또는 방사능독성제, 또는 본 발명의 하나 이상의 추가적인 인간 항체(예, 상기 제 1 인간 항체와는 구별되는, CXCR4 항원의 에피토프에 결합하는 상보성 활성을 가지는 인간 항체)를 더 포함할 수 있다.
- [0381] 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 치료된 환자는 다른 치료제, 예를 들어, 상기 인간 항체들의 치료 효과를 향상시키거나 증폭하는 세포독성 또는 방사능독성 제제가 추가로(본 발명의 인간 항체 투여 전에, 동시에, 또는 그 후에) 투여될 수 있다.
- [0382] 다른 실시예에서, 상기 대상체는 Fc γ 또는 Fc γ 수용체의 발현 또는 활성을 변경하는, 예를 들어, 향상시키거나 억제하는 제제로, 예를 들어, 사이토카인으로 대상체를 처리함으로써 추가로 치료될 수 있다. 다중특이성 분자로 치료 중 투여될 수 있는 바람직한 사이토카인은 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니

-자극 인자(GM-CSF), 인터페론- γ (IFN- γ), 및 종양괴사인자(TNF)를 포함한다.

[0383] 또한 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)은 CXCR4를 발현하는 세포를 타겟하는데, 예를 들어, 그러한 세포를 표지하는데 사용될 수 있다. 그러한 용도로, 상기 결합체는 검출될 수 있는 분자와 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명은 CXCR4를 발현하는 세포를 생체 외 또는 시험관 내에서 국소화시키는 방법을 제공한다. 상기 검출될 수 있는 표지는, 예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자(co-factor)일 수 있다.

[0384] 특정 실시예에서, 본 발명은 샘플 내에서 CXCR4 항원의 존재를 검출하는, 또는 CXCR4 항원의 양을 측정하는 방법을 제공하며, 상기 항체 또는 이의 결합부와 CXCR4 간에 복합체를 형성하도록 허용하는 조건 하에서, 샘플, 및 대조군 샘플을, CXCR4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론 항체, 또는 이의 항원 결합부에, 접촉시키는 것을 포함한다. 그 다음, 복합체의 형성을 검출하는데, 여기서, 샘플과 대조군 샘플 사이의 복합체 형성 차이는 샘플에서의 CXCR4 항원 존재를 나타낸다.

[0385] 또 다른 실시예에서, 본 발명의 면역결합체를 사용하여 화합물(예, 치료제, 표지체, 세포독소, 방사능독소, 면역억제제, 등)을 상기 항체에 연결시킴으로써, CXCR4 세포 표면 수용체를 가지는 세포로 상기 화합물을 타겟할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 CXCR4를 발현하는 세포를 생체외 또는 생체내에서 국소화시키는 방법을 제공한다(예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조인자와 같은 검출할 수 있는 표지를 사용함). 대안적으로, 상기 면역결합체를 사용하여, 세포독소 또는 방사능독소를 CXCR4에 타겟시킴으로써 CXCR4 세포 표면 수용체를 가지는 세포를 살해할 수 있다.

[0386] CXCR4는 넓고 다양한 종양 세포 타입에서 발현되는 것으로 알려져 있고 또한 종양 전이에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 더구나, T 세포로의 HIV 진입을 위한 공수용체로서, CXCR4는 HIV 감염에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 추가적으로, CXCR4/SDF-1 경로는 염증성 조건과 관련이 있는 것으로 보여진다. 더 나아가, CXCR4/SDF-1 경로는 신혈관형성 또는 혈관신생과 관련있는 것으로 보여진다. 따라서, 본 발명의 항-CXCR4 항체 (그리고 면역결합체 및 이중특이성 분자)는 다음과 같이, 이러한 임상적 상황 각각에서 CXCR4 활성을 조절하는데 사용될 수 있다.

[0387] A. **암**

[0388] CXCR4는 다양한 암 타입에 의하여 발현되는 것으로 보여지고, 소정의 경우에 환자 예후 또는 생존과 CXCR4 발현 사이에 역상관이 성립된다. CXCR4 발현과 관련된 암 유형의 비-제한적 예는 다음을 포함한다: 유방암 (Muller, A. 등 (2001) *Nature* 410:50-56); 난소암 (Scotton, C. 등 (2001) *Br. J. Cancer* 85:891-897); 전립선암 (Taichman, R.S. 등 (2002) *Cancer Res.* 62:1832-1837); 비-소 세포 폐암 (Spano J.P. 등 (2004) *Ann. Oncol.* 15:613-617); 췌장암 (Koshiba, T. 등 (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:3530-3535); 갑상선암 (Hwang, J. H. 등 (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:408-416); 상인두암 (Wang, N. 등 (2005) *J. Transl. Med.* 3:26-33); 흑색종 (Scala, S. 등 (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:1835-1841); 신장 세포암 (Staller, P. 등 (2003) *Nature* 425:307-311); 림프종 (Bertolini, F. 등 (2002) *Cancer Res.* 62:3530-3535); 신경아세포종 (Geminder, H. 등 (2001) *J. Immunol.* 167:4747-4757); 교모세포종 (Rempel, S.A. 등 (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:102-111); 횡문근육종 (Libura, J. 등 (2002) *Blood* 100:2597-2606); 결장암 (Zeelenberg, I.S. 등 (2003) *Cancer Res.* 63:3833-3839); 신장암 (Schrader, A.J. 등 (2002) *Br. J. Cancer* 86:1250-1256); 골육종 (Laverdiere, C. 등 (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:2561-2567); 급성 림프구성 백혈병 (Crazzolaro, R. 등 (2001) *Br. J. Haematol.* 115:545-553); 및 급성 골수성 백혈병 (Rombouts, E.J.C. 등 (2004) *Blood* 104:550-557).

[0389] 앞에서 본 바와 같이, 본 발명의 항-CXCR4 항체는 유방암, 난소암, 전립선암, 비-소 세포 폐암, 췌장암, 갑상선암, 상인두암, 흑색종, 신장 세포암, 림프종, 신경아세포종, 교모세포종, 횡문근육종, 결장암, 신장암, 골육종, 급성 림프구성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병으로 구성되는 군으로부터 선택된 암을 포함하나 이에 제한받지 않는 암의 치료에 사용될 수 있다. 항체는 단독으로, 또는 수술 및/또는 방사선과 같은 다른 암 치료법, 및/또는 화학 요법 약물 및 CD20, Her2, PSMA, Campath-1, EGFR, 등등에 결합하는 것들과 같은 다른 항-암 항원 항체를 포함하여, 상기에 검토되고 서술된 항-종양제와 같은 다른 항-종양제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0390] B. **Hiv 감염을 포함하는, 바이러스 감염**

[0391] CXCR4는 T 세포로의 HIV 진입을 위한 공수용체라 보여지고, 추가적으로, 소정의 쥐 항-CXCR4 항체가 T 세포로의 HIV 분리체의 진입을 억제할 수 있음이 증명되었다(Hou, T. 등 (1998) *J. Immunol.* 160:180-188; Carnec, X. 등 (2005) *J. Virol.* 79:1930-1938 참조). 따라서, CXCR4는 바이러스에 의하여 세포로의 진입을 위한 수용체로

서 사용될 수 있고 CXCR4에 대한 항체는 수용체로서 CXCR4를 사용하는 상기 바이러스의 세포 진입을 억제하는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 인간 항-CXCR4 항체는 바이러스가 세포로 진입하는 것을 억제하는데 사용될 수 있는데, 상기 바이러스는 세포 진입용 수용체로서 CXCR4를 이용하여 바이러스 감염을 억제한다. 바람직한 실시예에서, 항체는, 예컨대, HIV/AIDS의 치료 또는 예방에서, HIV가 T 세포로 진입하는 것을 억제하는데 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 또는 AZT 또는 프로테아제 억제제와 같은 항-레트로바이러스 약물과 같은 다른 항-바이러스제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0392] C. 염증 상태

[0393] CXCR4/SDF-1 경로는 염증성 간 질환 (Terada, R. 등 (2003) *Lab. Invest.* 83:665-672); 자가면역 관절 염증 (Matthys, P. 등 (2001) *J. Immunol.* 167:4686-4692); 알러지성 기도 질환 (Gonzalo, J.A. 등 (2000) *J. Immunol.* 165:499-508); 및 치주 질환 (Hosokawa, Y. 등 (2005) *Clin. Exp. Immunol.* 141:467-474)을 포함하나 이에 한정되지 않는, 다양한 염증 상태에서 역할을 하는 것으로 보여진다.

[0394] 따라서, CXCR4에 대한 SDF-1의 결합을 억제하는 본 발명의 인간 항-CXCR4 항체는, 염증성 간 질환, 자가면역 관절 염증, 알러지성 기도 질환, 치주 질환, 류마티스 관절, 염증성 장 질환, 전신 홍반성 낭창, I형 당뇨병, 염증성 피부 질환 (예, 건선, 편평 태선), 자가면역 갑상선 질환, 쇼그렌 증후군, 폐 염증 (예, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐의 유육종증(pulmonary sarcoidosis), 림프성 폐포염) 및 염증성 신장 질환 (예, IgA 신염, 사구체신염)으로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 포함하는, 염증성 질환에서의 염증을 억제하는데 사용될 수 있다. 항체는 단독으로 또는, 비-스테로이드성 항-염증 약물(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 코르티코스테로이드 (예, 프레드니손(prednisone), 하이드로코르티손(hydrocortisone)), 메토트렉세이트(methotrexate), COX-2 억제제, TNF 길항제 (예, 에타네르셉트(etanercept), 인플릭시맵(infliximab), 아말리무맵(adalimumab)) 및 면역억제제 (6-메르캅토피린(6-mercaptopurine), 아자티오피린(azathioprine) 및 사이클로스포린 A(cyclosporine A))와 같은, 다른 항-염증제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0395] D. 신혈관형성

[0396] SDF-1이 CXCR4-발현 혈관종의 모집을 통하여 혈관신생을 유도한다는 것이 증명되었다 (Jin, D.K. 등 (2006) *Nat. Med.* 12:557-567). 더구나, SDF-1/CXCR4의 차단은 VEGF-비의존성 방식으로 신혈관형성을 억제함으로써 생체내 종양 성장을 약화시킬 수 있다(Guleng, B. 등 (2005) *Cancer Res.* 65:5864-58-71). 나아가, 실시예 2에서 증명되는 바와 같이, 본 발명의 항체는 시험관 내에서 모세관 형성을 억제할 수 있다. 따라서, CXCR4으로의 SDF-1의 결합을 억제하는 본 발명의 항-CXCR4 항체는 SDF-1/CXCR4 경로를 간섭함으로써 신혈관형성을 억제하는데 사용될 수 있다. 신혈관형성의 억제는, 예를 들어, 종양 성장 또는 종양 전이를 억제하는데 사용될 수 있다 (종양이 CXCR4⁺ 인지 아닌지에 관계없이). 항체는 단독으로 또는, 항-VEGF 항체와 같은, 다른 항-신혈관형성제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0397] E. 자기조직 줄기 세포 이식

[0398] 말초 혈액 줄기 세포는 자기조직 줄기 세포 이식, 예를 들어 소정의 혈액학적 악성종양의 치료에 사용되는 줄기 세포의 바람직한 소스(source)이다. 말초 혈액에서의 줄기 세포의 수집은 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 요구한다. 다양한 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokines) 및 접착 분자가, CXCR4 및 SDF-1의 상호작용을 포함하는, 이 과정의 조절에 관련되어 있다(Gazitt, Y. (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:229-236에서 검토됨). 또한, 작은 분자 CXCR4 길항제는 골수부터 말단에 이르기까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 신속한 이동을 자극하는 것으로 증명되었다(예컨대, Devine, S.M. 등 (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:1095-1102; Broxmeyer, H.E. 등 (2005) *J. Exp. Med.* 201:1307-1318; Flomenberg, N. 등 (2005) *Blood* 106:1867-1874 참조). 따라서, CXCR4 활성을 억제하는 본 발명의 항-CXCR4 항체(즉, 길항제 항체)는 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 자극하여 이식(예, 자기조직 이식), 예를 들어, 다발성 골수종 및 비-호지킨 림프종과 같은, 혈액 질환의 치료에 그러한 줄기 세포를 사용할 수 있게 한다. 항체는 단독으로 또는 G-CSF 및/또는 GM-CSF와 같은, 줄기 세포의 이동을 자극하는데 사용되는 다른 제제와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 대상체에 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 자극하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 골수부터 말초 혈액까지의 CD34⁺ 줄기 세포의 이동을 자극하기 위하여 본 발명의 항-CXCR4 항체를 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 이 방법은, 예를 들어 자기조직 줄기 세포 이식에 사용하기 위

하여, 말초 혈액으로부터 CD34+ 줄기 세포를 모으는 것을 더 포함할 수 있다.

[0399] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 더 자세히 설명될 것이고, 이는 본 발명을 더 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에서 인용된 모든 도면 및 모든 참조물, 특허, 그리고 및 공개된 특허 출원서는 참조문헌으로 본 명세서에 명백히 병합된다.

실시예

[0424] 실시예 1: CXCR4에 대한 인간 단일클론 항체의 생성

[0425] 첫번째로, 인간 항체 유전자를 발현하는 마우스를 면역화시켜서 이 마우스에 인간 CXCR4에 특이적인 인간 면역글로불린의 레퍼토리를 키우는, 조합 접근법을 이용하여 항-CXCR4 인간 단일클론 항체를 생성하였고, 이후에, 두번째로, 인간 항체 라이브러리를 이 마우스의 비장 세포로부터 제조하고 파지 상에 디스플레이하여 이후에 CXCR4에 대한 특이성을 가지는 항체의 발현용으로 상기 파지를 스크리닝하였다. 이 조합 접근법은 Buechler 등의 미국 출원 번호 제 20030091995호에 일반적으로 기술되어 있다.

[0426] 항원

[0427] R1610 세포 (Thirion, J.P. 등 (1976) *Genetics* 83:137-147에 처음으로 기술된 중국 햄스터 폐 세포주)를 전장 인간 CXCR4 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 이용하여 감염시켜서 상기 단백질을 세포의 표면 상에 발현시켰다. CXCR4 cDNA의 코돈-최적화형을, Mirzabekov, T. 등 (1999) *J. Biol. Chem.* 274:28745-28750에 기술된 바대로 제조한 상기 발현 벡터에 사용하였다. 세포의 면역원성을 강화시키기 위하여, 5% 용액(Sigma, Cat. #P2297)으로서 상업적으로 입수할 수 있는, 트리니트로벤젠설폰산(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)의 수용액을 이용한 배양에 의하여, 상기 세포를 트리니트로페놀(trinitrophenol, TNP)로 코팅하였다. 보다 명확하게는, 1×10^8 의 세포를 무균의 PBS로 일단 세정하였고, 어둠속 실온온도에서 한시간 동안 50 μ l의 상업용 5% TNBS 용액에 배양한 다음, PBS로 세 번 세정하였다. 그 결과의 TNP로 코팅된 CXCR-4-발현 R1610 세포를 면역용 항원으로 사용하였다. 최종 면역원은 100 μ l의 TNP로 코팅되고 세정된 세포(1×10^7 의 세포)에 100 μ l의 리비(Ribi) 보조제를 더한 혼합물이었다. 마우스는 시간에 걸쳐 6회분의 면역원을 받았다.

[0428] 트랜스유전자성 트랜스염색체성 KM Mouse[®] 스트레인

[0429] 처음에, 인간 항체 유전자를 발현하는, 트랜스유전자성 트랜스염색체성 마우스의 KM스트레인을 면역화함으로써 CXCR4에 대한 완전 인간 단일클론 항체를 제조하였다. 이 마우스 스트레인에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 Chen 등 (1993) *EMBO J.* 12:811-820에 기술된 바와 같이 동종접합적으로 분열되었고 내인성 마우스 중쇄 유전자는 PCT 공개번호 제WO 01/09187호의 실시예 1에 기술된 바와 같이 동종접합적으로 분열되었다. 추가적으로 이러한 마우스종은 인간 카파 경쇄 트랜스유전자, KCo5(Fishwild 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851에 설명된 바와 같은)를 지니며, 또한 PCT 공개번호 제WO 02/43478호에 설명된 바와 같이, 인간 Ig 중쇄 유전자 좌위를 지니는, SC20 트랜스염색체를 함유한다. KM 마우스는 또한 미국 출원 제 20020199213호에 자세히 기술되어 있다.

[0430] KM 면역화

[0431] CXCR4에 대한 완전 인간 단일클론 항체를 키우기 위해, KM Mouse[®] 스트레인의 마우스를, CXCR4 발현을 위하여 감염된 R1610 세포로 면역화시키고 TNP(항원으로서 상기에 기술된 바와 같은)로 코팅하였다. 인간 항체 유전자를 지닌 마우스 스트레인에서 인간 항체를 키우기 위한 일반적인 면역 기법은 Lonberg, N. 등 (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 및 PCT 공개 번호 제 WO 98/24884호에 기술되어 있다. 상기 마우스는 항원의 첫번째 주입시 6-16 주령이었다.

[0432] KM 마우스를 복강내(intraperitoneally, IP)로, 피하내(subcutaneously, Sc)로, 또는 발바닥(footpad, FP)을 통하여 리비 보조제 내의 항원으로 면역화시키고, 이어서 리비 보조제 내의 항원으로 3-21일의 IP, Sc 또는 FP 재면역화를 실시하였다. 안와후(방) 출혈을 이용하여 면역 반응을 모니터링하였다. CXCR4-발현 R1610 세포(비감염된 부모 R1610 세포에 대비하여)의 FACS 염색에 의하여 혈장을 스크린하였다. 항-CXCR4 인간 면역글로빈의 충분한 역가를 가진 마우스를 사용하여 비장을 수확하였다.

[0433] 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 및 항-CXCR4 항체를 위한 스크리닝

[0434] 상기에 설명한 면역화된 마우스로부터 획득한 비장을 사용하여 인간 항체 중쇄 및 경쇄를 발현하는 파지 디스플레이

레이 라이브러리를 만들었다. 더 명확하게는, Buechler 등의 미국 특허 출원 제 20030091995호에 본질적으로 기술된 바와 같이, 총 RNA를 비장에서 분리시켰고, cDNA는 RNA로부터 제조하였으며, 인간 항체 가변 부위 cDNA를 특허 PCR로 증폭시켰다. 다시 Buechler 등의 미국 특허 출원 제 20030091995호에 본질적으로 기술된 바와 같이, 인간 항체 가변 부위의 라이브러리를 파지 발현 벡터로 클론화하였다. 파지 디스플레이 라이브러리를 자성 프로테오리소스에 혼입된 인간 CXCR4(CXCR4-MPL)와 함께 회전시킴으로써 CXCR4에 대한 친화도를 가지는 라이브러리 멤버를 스크리닝하였다. 7 트랜스멤브레인(seven transmembrane, 7TM) 수용체의 고유 형태를 유지하기 위한, CXCR4를 발현하는 MPL, 또는 다른 7TM 수용체(예, CCR5)는 이전에 기술하였다(예컨대, Mirzabekov, T. 등 (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:649-654; Babcock, G.J. 등 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:38433-38440; PCT 공개 번호 제 WO 01/49265호; 미국 특허 출원 번호 제 20010034432호 참조). 간략히, 에피토프 태그를 포함한 재조합 인간 CXCR4를 세정제 CHAPS를 이용하여 감염된 CXCR4-발현 세포주로부터 용해시켰고, 단백질을 상기 에피토프 태그를 통하여 자성 구슬 상에 포획하였다. CXCR4의 고유 멤브레인 형태가 유지되도록, 지질막을 세정제를 제거하는 동안 재구성하여, CXCR4-MPLs를 만들었다. CXCR4-MPLs 상에서 파지 디스플레이 라이브러리를 세 바퀴 회전시켜 CXCR4-바인더를 종래의 비하여 30-배 농축시켰다. 관심의 가변 부위 단편을 Fab 발현 벡터 및 감염된 CXCR4-발현 세포에 대하여 항원 결합을 재테스트한 Fab로 재클론화하였다. 그 다음 표준 분자 생물학 기법을 이용하여 상기 Fab로부터 완전한 항체를 생산하였다.

- [0435] Fab 클론 F7, F9, D1 및 E2를 더 많은 분석을 위하여 선택하였다.
- [0436] 실시예 2: 인간 항-CXCR4 단일클론 항체 F7, F9, D1 및 E2의 구조적 특징화
- [0437] 실시예 1에서 기술된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리 스크리닝에 의하여 얻은, F7, F9, D1 및 E2 Fab 클론의 중쇄 및 경쇄 가변 부위를 암호화하는 cDNA 서열을 표준 DNA 서열화 기법을 이용하여 서열화하였다,
- [0438] F7의 중쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1A 및 서열번호 33 및 25에서 각각 보여준다.
- [0439] F7의 경쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 1B 및 서열번호 37 및 29에서 각각 보여준다.
- [0440] F7 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 F7 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 3-48로부터의 V_H 분절, 인간 생식세포계열 4-23으로부터의 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH 6B로부터의 JH 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 F7 V_H 서열을 더 분석하여 도 1A 및 서열번호 1, 5 및 9에 각각 나타난 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0441] F7 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열에 비교하여 F7 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K L15로부터의 V_L 분절 및 인간 생식세포계열 JK 1으로부터의 JK 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 F7 V_L 서열을 더 분석하여 도 1B 및 서열번호 13, 17 및 21에 각각 나타난 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0442] F9의 중쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 2A 및 서열번호 34 및 26에서 각각 보여준다.
- [0443] F9의 경쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 2B 및 서열번호 38 및 30에서 각각 보여준다.
- [0444] F9 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 F9 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 3-48로부터의 V_H 분절, 인간 생식세포계열 4-23으로부터의 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH 6B로부터의 JH 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 F9 V_H 서열을 더 분석하여 도 2A 및 서열번호 2, 6 및 10에 각각 나타난 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0445] F9 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 F9 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K L15로부터의 V_L 분절 및 인간 생식세포계열 JK 1으로부터의 JK 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 F9 V_L 서열을 더 분석하여 도 2B 및 서열번호 14, 18 및 22에 각각 나타난 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0446] D1의 중쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3A 및 서열번호 35 및 27에서 각각 보여준다.
- [0447] D1의 경쇄 가변 부위의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 도 3B 및 서열번호 39 및 31에서 각각 보여준다.

- [0448] D1 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 D1 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 3-48로부터의 V_H 분절, 인간 생식세포계열 4-23으로부터의 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH 6B로부터의 JH 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 D1 V_H 서열을 더 분석하여 도 3A 및 서열번호 3, 7 및 11에 각각 나타낸 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0449] D1 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 D1 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K L15로부터의 V_L 분절 및 인간 생식세포계열 JK 1으로부터의 JK 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 D1 V_L 서열을 더 분석하여 도 3B 및 서열번호 15, 19 및 23에 각각 나타낸 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0450] E2의 중쇄 가변 부위의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 도 4A 및 서열번호 36 및 28에서 각각 보여준다.
- [0451] E2의 경쇄 가변 부위의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 도 4B 및 서열번호 40 및 32에서 각각 보여준다.
- [0452] E2 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열과 비교하여 E2 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 3-48로부터의 V_H 분절, 인간 생식세포계열 4-23으로부터의 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH 6B로부터의 JH 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 E2 V_H 서열을 더 분석하여 도 4A 및 서열번호 4, 8 및 12에 각각 나타낸 바와 같은 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0453] E2 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열과 비교하여 E2 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K L15로부터의 V_L 분절 및 인간 생식세포계열 JK 1으로부터의 JK 분절을 이용한다는 것을 증명하였다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 E2 V_L 서열을 더 분석하여 도 4B 및 서열번호 16, 20 및 24에 각각 나타낸 바와 같은 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 윤곽지어 나타내었다.
- [0454] 그것들이 유래한 생식세포계열 서열과 비교한 바와 같이, F7, F9, D1 및 E2의 V_H 및 V_L 부위의 골격 서열을 분석하여, 생식세포계열과는 다른 다양한 골격 아미노산 잔기를 확인하였다. V_H 및 V_L 분절의 N-단말 부위내의 소정의 골격 잔기를 "역-돌연변이"를 위하여 선택하여 생식세포계열 서열로 골격 잔기를 복귀시켰는데, 이는 N-말단 부분내의 이러한 비-생식세포계열 잔기를 실시예 1에 기술된 파지 디스플레이 라이브러리를 만드는데 사용된 프라이어에 의하여 암호화했기 때문이다. 특히, F7, F9, D1 및 E2의 V_H 및 V_L 분절의 다음의 변형된 유형(생식세포계열에서, "GL"형으로 지칭됨)을 표준 분자 생물학 기법을 이용하여 만들어 지시된 골격 위치에 생식세포계열 아미노산 잔기를 치환하였다:
- [0455] F7GL V_H : Q1E, Q6E
- [0456] F7GL V_K : A1D, R3Q
- [0457] F9GL V_H : Q1E, Q6E
- [0458] F9GL V_K : E1D, V3Q, L4M
- [0459] D1GL V_H : Q6E
- [0460] D1GL V_K : V1D, W3Q, V4M
- [0461] E2GL V_H : Q6E

- [0462] E2GL V_k: E1D, V3Q, L4M
- [0463] 도 5A는 F7 (서열번호 25) 및 F7GL (서열번호 41) 중쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_H 3-48 암호화 아미노산 서열 (서열번호 49)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0464] 도 5B는 F7 (서열번호 29) 및 F7GL (서열번호 45) 경쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_k L15 암호화 아미노산 서열 (서열번호 50)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0465] 도 6A는 F9 (서열번호 26) 및 F9GL (서열번호 42) 중쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_H 3-48 암호화 아미노산 서열 (서열번호 49)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0466] 도 6B는 F9 (서열번호 30) 및 F9GL (서열번호 46) 경쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_k L15 암호화 아미노산 서열 (서열번호 50)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0467] 도 7A는 D1 (서열번호 27) 및 D1GL (서열번호 43) 중쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_H 3-48 암호화 아미노산 서열 (서열번호 49)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0468] 도 7B는 D1 (서열번호 31) 및 D1GL (서열번호 47) 경쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_k L15 암호화 아미노산 서열 (서열번호 50)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0469] 도 8A는 E2 (서열번호 28) 및 E2GL (서열번호 44) 중쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_H 3-48 암호화 아미노산 서열 (서열번호 49)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0470] 도 8B는 E2 (서열번호 32) 및 E2GL (서열번호 48) 경쇄 가변 아미노산 서열을 생식세포계열 V_k L15 암호화 아미노산 서열 (서열번호 50)과 정렬시킨 것을 보여준다. CDR1, CDR2 및 CDR3 부위를 윤곽지어 나타냈다.
- [0471] F7, F9, D1 및 E2 Fab 단편을 표준 제조합 DNA 기법을 이용하여 전장 항체로 변환한다. 예를 들어, Fab 단편 중의 하나의 V_H 및 V_k 부위를 암호화하는 DNA를 중쇄 및 경쇄 불변 부위를 지니는 발현 벡터로 클론화하여 가변 부위를 불변 부위에 작동적으로 연결할 수 있다. 대안적으로, 별도의 벡터를 전장 중쇄 및 전장 경쇄의 발현을 위하여 사용할 수 있다. 전장 항체를 만드는데 사용되는 적절한 발현 벡터의 비-제한 예들은 Black의 미국 특허 출원 번호 제 20050153394호에 기술된 pIE 벡터를 포함한다.
- [0472] 실시예 3: 항-CXCR4 인간 단일클론 항체의 결합 특성
- [0473] 이 실시예에서, 항-CXCR4 항체의 결합 특성을 유세포 분석법에 의하여 테스트하였다.
- [0474] 그의 세포 표면에서 천연 인간 CXCR4를 발현하는, 인간 T 세포주 CEM을 사용하여 천연, 세포-표면 CXCR4에 대한 F7, F9, D1 및 E2 항체의 결합 능력을 테스트하였다. 전장 F7, F9, D1 및 E2를 1:3 계열 희석 시리즈로 적정하여, 300 nM 내지 5 pM의 농도 범위로 만들었다. 다음에 항체를 CEM 세포와 혼합하고 FITC-접합 항-인간 IgG 2차 항체로 검출하기 전에 결합하게 하였다. 다음에, 세포를 형광세포 분석법에 의하여 분석하였다. 그 결과의 평균 형광 세기가 도 9의 그래프에 보여지는데, 이는 모든 4개의 항-CXCR4 항체들이 CEM 세포에 결합하는 것을 증명한다. F7, F9, D1 및 E2결합에 대한 EC₅₀은 각각 21 nM, 14 nM, 80 nM 및 290 nM이다,
- [0475] CXCR4에 결합하는 것에 대한 항-CXCR4 항체의 관별의 경쟁 능력을 결정하기 위하여, 경쟁 연구를 실시하였다. 4개의 인간 항-CXCR4 항체 F9, F7, E2 및 D1을, 4개의 상업적으로 입수할 수 있는 쥐 단일클론 항-CXCR4 항체(각각, 12G5, 708, 716 및 717; R&D Systems catalog #s: MAB170, MAB171, MAB172 및 MAB173)와 함께, 사용하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3 계열 희석 시리즈로 적정하여, FITC-표지 항-CXCR4 항체 F9의 일정한 농도의 존재하에 300 nM 내지 5 pM의 농도 범위로 만들었다. 다음에 항체의 혼합물을 CEM 세포에 첨가하고 결합하게 하였다. CEM 세포에 결합하는 것에 대하여 각 항체가 F9와 경쟁하는 능력은 형광세포 분석법 및 FITC의 탐지에 의하여 평가되었다. 결과의 평균 형광 세기가 도 10의 그래프에 보여지는데, 이것은 E2 항체가 다른 항체에 비하여 고농도에서 부분적으로 억제한다는 것을 증명할지라도, 테스트된 모든 7개의 항체(F7, E2, D1, 12G5, 708, 716 및 717)가 CEM 세포에 결합하는 것에 대하여 F9와 경쟁할 수 있다는 것을 증명한다.
- [0476] 다른 실험 세트에서, F7 mAb가 다양한 상이한 세포주에 결합하는 능력을 FACS 적정을 실행함으로써 유세포 분석

법으로 테스트하였다. mAb의 양을 증가(0.001 μ g/ml 이하에서부터 100 μ g/ml 이상까지)시키면서 mAb를 100,000 세포로 배양하였고, 유세포 분석법에 의하여 결합을 평가하였다. Bmax 값 또한 결정하였는데, 이는 각 세포에 얼마나 많은 CXCR4가 존재하는지 대략적으로 나타낸다. 결합 곡선에 기초하여, 항체 결합에 대한 EC₅₀을 결정하였고, 그 결과를 하기 표 1에 정리하였다:

표 1

[0477] 상이한 세포주에 대한 mAb F7 결합에서의 FACS 적정 결과

세포 유형	EC ₅₀ (g/ml)	Bmax
라모스(Ramos)	0.48	106,000
라지(Raji)	0.34	52,536
나말와(Namalwa)	1.57	116,000
L540	3.69	31,868
DMS79	3.99	24,587
MDA-MB-231	9.24	14,186

[0478] Bmax = 최대 결합(GMFI units)

[0479] 상기 결과는, 라모스(Ramos) 및 라지(Raji) 세포주로 관찰된 최저 EC₅₀s으로 인하여, F7 mAb가 테스트된 6개의 세포주 각각에 효과적으로 결합할 수 있음을 보여준다. 이들 데이터는 또한 CXCR4 수용체의 발현이 라모스(Ramos) 및 나말와(Namalwa) 세포에서 최고이며 MDA-MB-231 세포 및 DMS79 세포에서는 최저임을 보여준다.

[0480] 또 다른 결합 실험에서, F7 mAb가 인간 말초 혈액 단일핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)의 상이한 서브세트에 결합하는 능력을 테스트하였다. 인간 PBMCs를 표준 방법에 의하여 분리하였고 상이한 세포 서브세트를 FACS에 의하여 분리하였다. 특히, 다음의 세포 서브세트를 분리하였다: (i) CD3⁺, (ii) CD20⁺; (iii) CD11b⁺ 및 (iv) CD14⁺. F7 mAb (33 g/ml에서)를 이용한 유세포 분석법 실험은, 이소타입-매칭 대조군 항체(isotype-matched control antibody)에 비하여, F7 mAb가 4개의 서브세트 각각에 효과적으로 결합할 수 있다는 것을 증명하였다.

[0481] 실시예 4: 항-CXCR4 항체에 의하여 CXCR4 대한 SDF-1 결합의 억제

[0482] CXCR4에 대한 SDF-1의 결합을 억제하는 항-CXCR4 인간 항체의 능력을 결정하기 위하여, ¹²⁵I-표지 SDF-1 그리고 및 본래 CXCR4를 발현하는 CEM 세포를 이용하여 경쟁 연구를 실시하였다. 표준 방사-표지 리간드 결합 분석법을 이용하여, SDF-1 결합을 억제하는 것에 대하여 항-CXCR4 항체를 CEM 세포와 비교하였다. 항-CXCR4 항체를 연속적으로 1:3으로 희석하여 300 nM 부터 137 pM까지의 농도 범위로 만들었다. 항체를 2000 Ci/mmol (Amersham, catalog #IM314-25UCI)의 특이적 활성을 지닌 100 pM의 ¹²⁵I-SDF-1의 존재하에서 100 μ l내의 750,000 CEM 세포에 첨가하였다. 동일한 이소타입의 무관계한 항체들을 음성 대조군으로서 사용하였다. ¹²⁵I-SDF-1을 4°C에서 2시간 동안 항체 없이 CEM 세포에 결합하게 함으로써 총 결합 가능 방사-표지 리간드를 결정하였다. 1 μ M의 비표지 SDF-1(Peprotech, catalog # 300-28A)의 존재하에 ¹²⁵I-SDF-1을 결합하게 함으로써 방사-표지 리간드의 비-특이적 결합을 결정하였다. 세포-관련 ¹²⁵I-SDF-1의 양을 표준 방법에 의하여 결정하였다. 그 결과를 도 11에서 보여주는데, 이는 SDF-1이 CEM 세포 상에서 발현되는 CXCR4에 결합하는 것을, F7 항체가 가장 효과적으로 차단한다는 것을 증명한다. F9 및 D1 항체 또한, F7보다 더 완화하게 일지라도, SDF-1 결합을 차단하였다. E2 항체는, 비록 그것이 CEM 세포 상에서 CXCR4에 결합한다고 할지라도(실시예 3에 증명된 바와 같다), CEM 세포 상에서 SDF-1이 CXCR4에 결합하는 것을 효과적으로 차단하지 못하였다. F7, F9 및 D1에 의한 SDF-1 차단에 대한 EC₅₀은 각각 2.3 nM, 12.5 nM 및 28.6 nM이었다.

[0483] 실시예 5: 항-CXCR4 항체에 의한 SDF-1-유도 칼슘 플럭스의 억제

[0484] 항-CXCR4 인간 항체가 SDF-1에 의하여 유도된 CEM 세포내의 칼슘 플럭스를 억제하는 능력을 결정하기 위하여, 첫번째로, CEM 세포를 형광 염료 Calcium 3 (Molecular Devices)로 표지하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3 계열 희석 시리즈로 적정하여 100 nM 부터 1 pM까지의 농도 범위로 만들고 200 μ l 내의 200,000 CEM 세포에 결합하게 하

였으며 플렉스스테이션 기계(Flexstation machine)(Molecular Devices)로 로딩하기 전에 실온에서 10분동안 배양하였다. 음성 대조군으로서, 동일한 이소타입의 무관계한 항체를 사용하였다. 그 후 세포를 최종 농도 50 nM의 재조합 인간 SDF-1 α (Peprotech)로 자극시켰고, 22 μ l의 부피에 500nM을 첨가하여 222 μ l의 최종 부피를 만들었다. 결과의 칼슘 플럭스를 웰당 200초동안 측정하였다. 양성 대조군으로서, 항체 없이 세포를 SDF-1 α (0.1 % BSA가 있는 HBS(Hank's buffered saline) 또는 HBS로 만들어짐)로 자극하여 최대 가능 칼슘 플럭스 신호를 얻었다. 기준을 결정하기 위하여, 세포를 0.1 % BSA가 있는 HBS로 자극하였다. 칼슘의 SDF-1 α -자극 방출을 시간에 따라 칼슘-의존성 형광의 발색에 의하여 측정하였다. 결과의 형광 흔적의 곡선 아래의 면적을 칼슘 플럭스의 표시로서 기록하였다. 항-CXCR4 항체에 의한 칼슘 플럭스의 결과적인 억제에는 도 12에 나타난다. 데이터를 기입하였고 EC₅₀을 GraphPad Prism 소프트웨어 및 비-선형 곡선 피트, 즉 에스자형 투여 응답 식(sigmoidal dose response formular)을 이용하여 계산하였다. 항체 F7, F9 및 D1이 SDF-1 α -유도 칼슘 플럭스를 억제하였다. 항체 E2는, 비록 그것이 CXCR4에 결합했다고 할지라도(실시에 3에 증명된 바와 같이), SDF-1 α -유도 칼슘 플럭스를 유의하게 억제하지 못했다. F7, F9 및 D1에 의한 SDF-1-유도 칼슘 플럭스의 억제에 대한 EC₅₀은 각각 0.90 nM, 0.32 nM 및 0.57 nM이었다.

[0485] 실시예 6: 항-CXCR4 항체에 의한 CEM 세포의 SDF-1-유도 이동의 억제

[0486] 항-CXCR4 인간 항체가 SDF-1에 의하여 유도된 CEM 세포의 이동을 억제하는 능력을 결정하기 위하여, 첫번째로 CEM 세포를 BATDA 시약(Perkin Elmer)으로 표지하였다. 항-CXCR4 항체를 1:3 계열 희석 시리즈로 적정하여 100 nM 부터 1 pM까지의 농도 범위로 만들고 ml당 1000 만 세포의 농도로 표지한 CEM 세포에 결합하게 하였다. 음성 대조군으로서, 동일한 이소타입의 무관계한 항체들을 사용하였다. 재조합 인간 SDF-1 α (Peprotech)를 웰당 5.7 mm 직경 필터를 가지는 96 웰 신경침 이동 플레이트의 하부 챔버에 웰당 30 μ l로 5nM로 첨가하였다. 각 웰은 5 μ m의 기공을 함유한다. 항체와 함께 혹은 및 항체 없이 표지한 CEM 세포를 50 μ l의 부피에서 웰당 50만 세포의 농도로 필터 상에 로딩시켰다. 이동 플레이트를 37 °C에서 2.5 시간동안 배양하였다. 이동된 세포를 플레이트의 하부 챔버 내에 포획하였고 유로퓸(Europium) 탐지 용액 (Perkin Elmer)으로 용해시키고 검출하였다, 화학-발광 신호를 Fusion 기구 상에 기록하였다. 항-CXCR4 항체에 의한 SDF-1 α -유도 이동의 결과적 억제가 도 13에 보여진다. 그 결과는 항체 D1 및 E2가 유의하게 이동을 억제하지 않은 반면에 항체 F7 및 F9는 효과적으로 이동을 억제하였다는 것을 증명하였다. F7 및 F9에 의한 SDF-1-유도 CEM 세포 이동의 억제에 대한 EC₅₀은 각각 12.44 nM 및 18.99 nM이었다.

[0487] 실시예 7: 항-CXCR4 항체에 의한 HuVEC 모세관 형성의 억제

[0488] 이 실시예에서, 인간 제대 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells, HuVEC)에 의한 모세관 형성을 항-CXCR4 인간 항체가 억제하는 능력을 검사하였다. 매트릭젤(Matrigel)을 RPMI로 1:1 희석하였고, 96 웰 플레이트의 웰 상에 도말하였으며 37°C에서 30분동안 중합하도록 하였다. 80% 합류점에서 HuVEC(Cambrex로부터 입수, cat. # CC-2519)를 트립신처리하였고 0.5% FBS로 RPMI 내에서 ml당 1×10^6 세포로 재현탁시켰다. 항체를 3 μ g/ml의 최종 농도로 HuVEC와 잘 혼합하였고 실온에서 30분동안 배양하도록 하였다. 동일한 이소타입의 무관계한 항체 또는 매질 단독을 음성 대조군으로서 사용하였다. 관 형성 억제의 양성 대조군으로서, 마우스 항-인간 α v β 3(CD51/CD61) 항체(R&D Systems, cat. # MAB3050)를 사용하였다. 항체와 함께 또는 항체 없이 HuVEC를 매트릭젤-코팅 웰 상에 도말하였고 37°C에서 18시간동안 배양하였다.

[0489] 이소타입-매칭 대조군 항체와 함께 또는 매질 단독으로 배양된 HuVEC는 모세관을 형성하였고, 그 결과로 세포당 3-5 지점의 접점 또는 가지점을 가지는 플레이트를 가로질러 연결된 세포들이 나타났다. 항-CXCR4 인간 항체 또는 항- α v β 3 항체중의 하나로 배양된 HuVEC는 모세관을 형성하지 않았다. 세포는 분리되었고 약간의 가지점이 나타났거나 또는 가지점은 없었다. SDF-1 결합, SDF-1-유도 칼슘 플럭스 및 SDF-1-유도 이동을 차단하는데에 가장 효과적이었던 항-CXCR4 항체, 즉 F7 및 F9는 또한 모세관 형성을 억제하는데에도 가장 효과적이었다. CXCR4에 결합하나 SDF-1 결합 또는 SDF-1-유도 효과를 차단하지 않는, 항-CXCR4 항체 E2는 모세관 형성을 억제하지 않는다.

[0490] 실시예 8: 항-CXCR4 항체에 의한 시험관내 종양 세포 증식의 억제

[0491] 이 실시예에서, 항-CXCR4 인간 항체가 라모스(Ramos) 종양 세포 (인간 부르키트 림프종 세포주(human Burkitt's lymphoma cell line))를 시험관 내에서 증식하는 것을 억제하는 능력을 검사하였다. 이 분석에서, 1×10^4 세포/웰을 F7 IgG4 항체, F9 IgG1 항체, E2 IgG1 항체, F9 Fab' 항체 또는 이소타입 대조군의 희분량을 증가(10^{-3}

에서 300 nM까지)시키면서 배양하였다. 상기 세포를 72 시간동안 항체와 함께 배양하였는데, ^3H -티미딘을 최종 24 시간의 배양동안 첨가하여 세포 증식을 모니터하도록 하였다. 배양 후에, 세포에 의한 ^3H -티미딘의 혼입을 표준 기법에 의하여 측정하였다. 그 결과는 도 14의 그래프에 보인다. 그 결과는 ^3H -티미딘이 F7 IgG4, F9 IgG1 및 E2 IgG1 항체와 함께 배양할 때 감소된 ^3H -티미딘 혼입에 의하여 지시된 바와 같이, 이들 항체 각각이 라모스(Ramos) 세포 증식을 억제할 수 있고, 반면에 F9 Fab' 단편은 세포 증식을 억제하지 않는다는 것을 증명한다. 이러한 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 시험관 내에서 직접 항-증식 효과를 가지며 그 결과 항-증식 효과를 달성하기 위하여 2차 교차-연결을 필요로 하지 않는다는 것을 알려준다.

[0492] 실시예 9: 항-CXCR4 항체에 의한 생체내 고체 종양 세포 증식의 억제

[0493] 이 실시예에서, 항-CXCR4 인간 항체가 확립된 고체 종양이 생체내에서 증식하는 것을 억제하는 능력을 라모스(Ramos) 피하 종양 세포 모델을 이용하여 검사하였다. 이 분석에서, 10×10^6 라모스(Ramos) 세포/마우스를 각 마우스의 옆구리 부분에 주입하였고, 40 mm³의 평균 사이즈로 성장시켰는데, 이는 종양의 길이 x 너비 x 높이/2로 계산된 것이다. 그 다음 마우스는 항체의 제1 투여량의 복강내(intraperitoneal, i.p.) 주사를 받았고(0일에 치료하는 것으로 함) 7일에 항체의 제2 투여량의 복강내 주사를 받았다. Fab' 단편 항체로 치료된 마우스는 또한 3일 및 10일에 복강내 항체 투여량을 받았다. 마우스의 그룹(n=8)을 (i) 부형약(vehicle); (ii) 이소타입 대조군(15 mg/kg); (iii) F7 IgG4 (15 mg/kg); (iv) F9 IgG1 (15 mg/kg); (v) F9 Fab' (10 mg/kg); 또는 (vi) 항-CD20 양성 대조군 (15 mg/kg) 중의 하나로 치료하였다. 종양 부피 및 마우스 중량을 투여 후 0일과 30일 사이에 일정한 간격(약 2-3번/주)으로 측정하였다. 실험의 결과가 도 15A, 15B 및 15C에 나타내었는데, 이것은 평균 종양 부피(도 15A), 중간 종양 부피(도 15B) 및 중간% 체중 변화(도 15C)를 보여준다. 이 결과는, 양성 대조군 같이, F7 IgG4 및 F9 IgG1 항체가 증가된 종양 부피에 의하여 측정된 바와 같이 종양 세포 성장을 유의하게 억제하였고, 반면에 F9 Fab' 단편 이소타입 대조군에 비하여 종양 세포 성장을 억제하지 않았다는 것을 증명하였다. 모든 치료는 유의하지 않은 체중 변화가 나타내는 바와 같이 잘 다루어졌다. 치료 동안의 체중의 차이는 아마도 종양의 중량에 기인한 것 같다. 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 생체내에서 확립된 고체 종양의 성장을 억제할 수 있다는 것을 알려준다.

[0494] 실시예 10: 항-CXCR4 항체를 이용한 치료에 의하여 마우스 전신성 종양 세포 모델에서의 생존 시간 증가

[0495] 이 실시예에서, 항-CXCR4가 마우스의 생존 시간을 증가시키는 능력을 라모스(Ramos) 전신 종양 세포 모델을 이용하여 검사하였다. 이 분석에서, 1×10^6 라모스(Ramos) 세포/마우스를 0일에 각 마우스에 정맥내(intravenously, i.v.)로 주입하였다. 그 다음 마우스에 1일(즉, 종양 세포의 정맥내 투여 후 첫 날)에 제1 회분의 항체의 복강내 주사를 실시하였고 5일, 8일, 15일 및 22일에 4번 더 항체의 복강내 주사를 실시하였다(양성 대조군 항체로 치료받은 마우스는 1일에만 처리했음). 마우스의 그룹(n=8)을 (i) 부형약; (ii) 이소타입 대조군(15 mg/kg); (iii) F9 IgG1 (15 mg/kg); 또는 (iv) 항-CD19 양성 대조군(15 mg/kg) 중의 하나로 치료하였다. 퍼센트 생존률을 투여 후 0일과 50일 사이(뒷다리 마비를 실험의 종점으로 이용했음)에 일정한 간격으로 측정하였다. 실험의 결과는 도 16에 나타내었으며, 이것은 시간에 따른 퍼센트 생존률을 보여준다. 부형약 또는 이소타입 대조군으로 치료된 마우스에서의 중간 생존 일수는 각각 23 및 25.5일이었는데, 반면에, 1회분의 항-CD19 양성 대조군으로 치료된 마우스의 중간 생존 일수는 39일이었다. 유의하게, 5회분의 F9 IgG1 항체로 치료된 그룹의 마우스의 100%는 실험의 끝까지 생존하였다. 이러한 결과는 항-CXCR4 인간 항체가 전신 종양 세포 모델에서 마우스의 생존 시간을 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다.

[0496] 실시예 11: 항-CXCR4 단일클론 항체 F7에 의한 세포사멸의 유도

[0497] 이 실시예에서, 항-CXCR4 mAb F7이 상이한 세포에서 세포사멸을 유도하는 능력을 검사하였다. 세포사멸 분석에서, 10² μg/ml의 F7 mAb을 라모스(Ramos) 세포 (500,000 세포), 나말와(Namalwa) 세포(500,000 세포), 또는 CXCR4를 발현하기 위하여 감염된 R1610 세포(100,000 세포) 중의 하나로 배양하였다. 비감염된 R1610 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. 항-CXCR4 mAb F7 또는 이소타입 대조군 항체를 37 °C에서 세포와 함께 배양하였고 250 μl의 샘플을 24, 48 및 72 시간에 제거하였다. 세포사멸을 평가하기 위하여, 다양한 시간 지점으로부터 세포를 아넥신(Annexin) V-FITC-FL1 및 프로피디움 요오드화물(Propidium Iodide)-FL3으로 배양하였고, 유세포 분석법을 실시하였다. FL1, FL3 및 FL1-FL3 더블 양성 쿼드런트(quadrants)에 모인 세포의 조합 퍼센트는 세포사멸이라고 간주하였다. 배경을 없애기 위하여, 이소타입 항체-유도 사멸 세포의 퍼센트를 F7 mAb-유도 사멸 세포

의 퍼센트에서 차감하였다.

[0498] 그 결과는 하기 표 2에 정리되어 있다.

표 2

[0499] 항- CXCR4 mAb F7에 의한 세포사멸의 유도

세포	시간(Hours)	% 세포사멸
R1610	72	<1
R1610-CXCR4	24	39
R1610-CXCR4	48	58
R1610-CXCR4	72	46
라모스(Ramos)	24	22
라모스(Ramos)	48	31
라모스(Ramos)	72	22
나말와(Namalwa)	24	17
나말와(Namalwa)	48	24
나말와(Namalwa)	72	44

[0500] 총 % 세포사멸 값을 이소타입 대조군 항체에 의하여 유도된 기준 변화에서 수정함

[0501] 상기 결과는, 응답이 CXCR4-특이적이다라는 것을 나타내는 부모 R1610 세포의 사멸을 유도하는데 F7이 영향을 주지 않고 있는 반면에 F7 mAb는 라모스(Ramos), 나말와(Namalwa) 및 R1610-CXCR4 세포에서 세포사멸을 유도할 수 있다는 것을 증명한다.

[0502] 실시예 12: 항-CXCR4 항체에 의하여 생체내 고체 종양 세포 증식의 억제를 보여주는 추가 연구

[0503] 이 실시예에서, 항-CXCR4 인간 항체가 생체 내에서 확립된 고체 종양의 증식을 억제하거나 또는 그의 세포사멸을 유도하는 능력을 실시예 9에서 상술된 라모스(Ramos) 모델과 유사한 추가 종양 세포 모델을 사용하여 검사하였다. 다양한 종양 세포주를 검사하였다. 대표적 실험 및 결과는 다음과 같다.

[0504] 한 실시예에서, 7.5×10^6 MDA-MB231 인간 유방암 세포/마우스를 각 마우스의 옆구리 부분에 주입하였고, 주입 후 7일에, 종양의 길이 x 너비 x 높이/2 로 계산된, 100 mm^3 의 평균 사이즈로 성장시켰다. 마우스를 상이한 치료 그룹으로 무작위로 분배하였고, 상기 마우스에 주입 후 7일에 제1 회분 항체의 복강내 주사를 놓았고 주입 후 14일에 제 2 회분 항체의 복강내 주사를 놓았으며, 다음에 주입 후 46일에 제 3회분을 놓았다. 마우스의 그룹(n=9)을 (i) 부형약(PBS); (ii) IgG1이소타입 대조군(15 mg/kg); (iii) IgG4 이소타입 대조군(15 mg/kg); (iv) F7 IgG1 (15 mg/kg); 또는 (v) F7 IgG4 (15 mg/kg) 중의 하나로 치료하였다. 종양 부피를 일정한 간격으로 측정하였고 평균 및 중간 종양 부피를 각 간격으로 각 치료 그룹에서 결정하였다. 이 실험의 결과는 하기 표 3에 정리되어 있는데, 이는 주입 후 52일에서의 평균 종양 부피(mm^3 로) 및 종양 성장 억제 (tumor growth inhibition, TGI), 및 주입 후 59일에서의 중간 종양 부피(mm^3 로) 및 % TGI를 보여준다:

표 3

[0505] mAb F7에 의한 생체내 MDA-MB231 세포의 종양 성장 억제

치료	52일		59일	
	평균 (Mean)	TGI (%)	중간 (Median)	TGI(%)
부형약	154		187	
IgG1 이소타입 대조군	172		216	
IgG4 이소타입 대조군	188		226	
F7 항-CXCR4 IgG1	86	50	130	40
F7 항-CXCR4 IgG4	79	58	108	52

[0506] 추가적으로, F7 IgG4 치료 그룹 내의 한 마우스는 59일에 종양이 없었다. 이 결과는 F7 mAb이 생체 내에서 MDA-

MB231 유방암 세포의 성장을 억제할 수 있다는 것을 증명한다.

[0507] 제2 실시예에서, 5×10^6 DMS79 인간 소세포 폐 종양 세포/마우스 를 각 마우스의 옆구리 부분에 주입하였고, 주입 후 7일에, 종양의 길이 x 너비 x 높이/2 로 계산된, 160 mm^3 의 평균 사이즈로 성장시켰다. 마우스를 상이한 치료 그룹으로 무작위로 분배하였고, 상기 마우스에 Q3Dx5의 투여 계획(3일마다 한 번씩 5번)으로 항체의 복강내 주사를 놓았다. 마우스의 그룹(n=10)을 (i) 부형약(PBS); (ii) IgG4 이소타입 대조군(10 mg/kg); 또는 (iii) F7 IgG4 (10 mg/kg) 중의 하나로 치료하였다. 종양 부피를 일정한 간격으로 측정하였고 평균 및 중간 종양 부피를 각 간격으로 각 치료 그룹에서 결정하였다. 이 실험의 결과는 하기 표 4에 정리되어 있는데, 이는 주입 후 34일에서의 평균 및 중간 종양 부피(mm^3 로), 및 % 종양 성장 억제 (TGI)를 보여준다:

표 4

[0508] mAb F7에 의한 생체내 DMS79 세포의 종양 성장 억제

치료	34일			
	평균	TGI (%)	중간	TGI(%)
부형약	900		882	
IgG4 이소타입 대조군	992		903	
F7 항-CXCR4 IgG4	620	38	599	34

[0509] 이 결과는 F7 mAb가 생체 내에서 DMS79 인간 소세포 폐 종양 세포의 성장을 억제할 수 있다는 것을 증명한다.

[0510] 상기 및 실시예 9에서 기술된 바와 같은 것들에 유사한 실시예에서, 항-CXCR4 항체가 종양 성장을 억제하는 능력에서 추가의 피하성 이종이식 종양 모델을 조사하였다. SU-DHL-6 B 세포 림프종 세포를 이용하는 실험에서, 그 결과는 15 mg/kg의 F7 IgG4 mAb로 인한 치료는 약 60% 종양 성장 억제를 가져왔다는 것을 보여주었다. 유사하게, 나말와 부르크이트(Namalwa Brukitt)의 림프종 세포를 이용하는 실험에서, 그 결과는 3 mg/kg의 F7 IgG4 mAb로 인한 치료는 약 70% 종양 성장 억제를 가져왔다는 것을 보여주었다. 대조적으로, F7 mAb에 의한 종양 성장 억제를 NIH-H226 폐 종양 세포 또는 HPAC 인간 췌장 선암 세포를 이용하는 실험에서 관찰하지 못했다. 그러나, 유세포 분석 실험에서 F7 mAb에 의한 이러한 세포의 변형은 최소의 시험관내 발현을 보여주었다. 생체내 종양 세포가 면역조직화학염색법으로 mAb에 의하여 염색될 수 있더라도, 그들의 종양 성장 CXCR4의 어떤 단계가 발현되기 시작하는지가 불확실하다. 이것은 두 세포주에 의한 CXCR4의 발현은 항-CXCR4 치료에 의하여 생체내에 종양 성장 억제 또는 세포사멸의 유도를 이루는데 불충분하다는 것을 시사한다.

[0511] 실시예 13: 항-CXCR4 항체에 의한 생체내 폐 전이의 억제

[0512] 이 실시예에서, F7 항-CXCR4 mAb가 폐 전이를 억제하는 능력을 C57 마우스 전신 종양 모델을 이용하여 조사하였다. 더 명확하게는, 0.4×10^6 B16-CXCR4 세포(인간 CXCR4를 발현하기 위하여 감염된 B16 세포)를 C57종의 30 마리의 마우스의 각각에 정맥내로 주입하였다. 마우스를 각각 10 마리의 마우스가 있는 세 그룹으로 무작위하게 분배하였고, 그 다음 (i) 부형약(PBS); (ii) IgG4 이소타입 대조군(5 mg/kg); 또는 (iii) F7 IgG4 (5 mg/kg) 중의 하나로 치료하였다. B16-CXCR4 세포를 정맥 내로 주입한 후에 항체 또는 부형약을 복강내로 30분동안 주입하였다. 폐는 14일에 수확하였고 폐 전이 결절의 수를 정량하였다. 그 결과는 하기 표 5에 정리되어 있는데, 이는 각 그룹에서의 평균 및 중간 폐 전이의 횟수를 보여준다:

표 5

[0513] mAb F7에 의한 생체내 폐 전이의 억제

치료	폐 전이의 수		폐 전이의 % 억제 (평균)
	평균	중간	
부형약	364	397	
IgG4 이소타입 대조군	309	294	15%
F7 항-CXCR4 IgG4	157	186	56%

[0514] 상기 결과는 F7 mAb로의 치료가 56%의 폐 전이 결절의 평균 수를 감소시켰고, 반면에 이소타입 대조군 항체로는 15%만 감소시켰음을 보여주는데, 이는 F7 mAb가 전신 종양 모델에서 폐 전이를 억제할 수 있다는 것을 증명한다.

도면의 간단한 설명

- [0400] 도 1A는 F7 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 33) 및 아미노산 서열(서열번호 25)을 보여준다. CDR1 (서열번호 1), CDR2 (서열번호 5) 및 CDR3 (서열번호 9) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V, D 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0401] 도 1B는 F7 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 37) 및 아미노산 서열(서열번호 29)을 보여준다. CDR1 (서열번호 13), CDR2 (서열번호 17) 및 CDR3 (서열번호 21) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0402] 도 2A는 F9 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 34) 및 아미노산 서열(서열번호 26)을 보여준다. CDR1 (서열번호 2), CDR2 (서열번호 6) 및 CDR3 (서열번호 10) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V, D 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0403] 도 2B는 F9 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 38) 및 아미노산 서열(서열번호 30)을 보여준다. CDR1 (서열번호 14), CDR2 (서열번호 18) 및 CDR3 (서열번호 22) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0404] 도 3A는 D1 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 35) 및 아미노산 서열(서열번호 27)을 보여준다. CDR1 (서열번호 3), CDR2 (서열번호 7) 및 CDR3 (서열번호 11) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V, D 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0405] 도 3B는 D1 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 39) 및 아미노산 서열(서열번호 31)을 보여준다. CDR1 (서열번호 15), CDR2 (서열번호 19) 및 CDR3 (서열번호 23) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0406] 도 4A는 E2 인간 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 36) 및 아미노산 서열(서열번호 28)을 보여준다. CDR1 (서열번호 4), CDR2 (서열번호 8) 및 CDR3 (서열번호 12) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V, D 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0407] 도 4B는 E2 인간 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 40) 및 아미노산 서열(서열번호 32)을 보여준다. CDR1 (서열번호 16), CDR2 (서열번호 20) 및 CDR3 (서열번호 24) 영역들은 윤곽으로 그려져 있고 V 및 J 생식세포계열 유도체들이 표시되어 있다.
- [0408] 도 5A는 F7 (서열번호 25) 및 F7GL (서열번호 41)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_H 3-48 아미노산 서열(서열번호 49)(서열번호 52에서 공개된 JH6b 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0409] 도 5B는 F7 (서열번호 29) 및 F7GL (서열번호 45)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_K L15 아미노산 서열(서열번호 50)(서열번호 53에서 공개된 JK1 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0410] 도 6A는 F9 (서열번호 26) 및 F9GL (서열번호 42)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_H 3-48 아미노산 서열(서열번호 49)(서열번호 52에서 공개된 JH6b 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0411] 도 6B는 F9 (서열번호 30) 및 F9GL (서열번호 46)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_K L15 아미노산 서열(서열번호 50)(서열번호 53에서 공개된 JK1 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0412] 도 7A는 D1 (서열번호 27) 및 D1GL (서열번호 43)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_H 3-48 아미노산 서열(서열번호 49)(서열번호 52에서 공개된 JH6b 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0413] 도 7B는 D1 (서열번호 31) 및 D1GL (서열번호 47)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_K L15 아미노산 서열(서열번호 50)(서열번호 53에서 공개된 JK1 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0414] 도 8A는 E2 (서열번호 28) 및 E2GL (서열번호 44)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_H

3-48 아미노산 서열(서열번호 49)(서열번호 52에서 공개된 JH6b 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.

- [0415] 도 8B는 E2 (서열번호 32) 및 E2GL (서열번호 48)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 V_k L15 아미노산 서열(서열번호 50)(서열번호 53에서 공개된 JK1 생식세포계열)과 정렬시킨 것을 보여준다.
- [0416] 도 9는 항-CXCR4 인간 항체 F7, F9, D1 및 E2의 세포 표면 상에서 천연 인간 CXCR4를 발현하는 CEM 세포로의 결합을 보여 주는 그래프이다.
- [0417] 도 10은 FITC-표지 항-CXCR4 항체 F9와 비표지된 항-CXCR4 인간 항체의 판넬 사이에 CEM 세포로의 결합을 위한 항체 경쟁을 보여주는 그래프이다.
- [0418] 도 11은 항-CXCR4 인간 항체 F7, F9 및 D1에 의하여 ¹²⁵I-표지 SDF-1의 CEM 세포로의 결합을 억제하는 것을 보여주는 그래프이다.
- [0419] 도 12는 항-CXCR4 인간 항체 F7, F9 및 D1에 의하여 CEM 세포에서 SDF-1-유도 칼슘 플럭스의 억제를 보여주는 그래프이다.
- [0420] 도 13은 항-CXCR4 인간 항체 F7 및 F9에 의하여 CEM 세포의 SDF-1-유도 이동의 억제를 보여주는 그래프이다.
- [0421] 도 14는 항-CXCR4 인간 항체 F7, F9 및 E2에 의하여 시험관 내에서의 라모스(Ramos) 종양 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다.
- [0422] 도 15A 내지 15C는 항-CXCR4 인간 항체 F7 및 F9에 의하여 피하 종양 모델에서 생체내에서의 라모스(Ramos) 종양 세포 증식의 억제를 보여주는 그래프이다. 도 15A는 평균 종양 부피 성장 곡선을 보여주고; 도 15B는 중간 종양 부피 성장 곡선을 보여주며; 도 15C는 중간 % 체중 변화를 보여준다.
- [0423] 도 16은 라모스(Ramos) 전신 종양 세포 모델에서 항- CXCR4 인간 항체 F9로 치료한 쥐의 생존 %를 보여주는 그래프이다.

도면

도면1A

항-CXCR4 Fab F7 VH

V 분절 : 3-48
D 분절 : 4-23
J 분절 : JH6b

```

      Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

                                CDR2
                                -----
      S R T I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

                                CDR3
                                -----
      Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면1B

항-CXCR4 Fab F7 VK

V 분절 : L15
J 분절 : JK1

A I R M T Q S P S S L S A S V G D R
1 GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

L T I S S L Q P E D F V T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

도면2A

항-CXCR4 Fab F9 VH

V 분절 : 3-48
D 분절 : 4-23
J 분절 : JH6b

Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GIT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

CDR2

S R S I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

도면2B

항-CXCR4 Fab F9 VK

V 분절 : L15
J 분절 : JK1

```

      E I V L T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

      CDR1
      -----
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

      CDR2
      -----
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q S G V P P R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA CCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

도면3A

항-CXCR4 Fab D1 VH

V 분절 : 3-48
D 분절 : 4-23
J 분절 : JH6b

```

      E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

      CDR1
      -----
      R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

      CDR2
      -----
      V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT CGT

      CDR2
      -----
      S K T I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AAA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N A R N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AGG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

      CDR3
      -----
      T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

      CDR3
      -----
      Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면3B

항-CXCR4 Fab D1 VK

V 분절 : L15
J 분절 : JK1

V I W V T Q S P S S L S A S V G D R
1 GTC ATC TGG GTG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

V T I T C R T S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

Q Q K P E K A P E L L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT GAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

CDR3

Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

도면4A

항-CXCR4 Fab E2 VH

V 분절 : 3-48
D 분절 : 4-23
J 분절 : JH6b

E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

CDR1

R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

CDR2

V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

CDR2

S R T I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

CDR3

T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y H Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC CAC TAC

CDR3

Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

도면4B

항-CXCR4 Fab E2 VK

V 분절 : L15
J 분절 : JK1

```

      E I V L T Q S P S S L S A S V G D R
1 GAA ATT GTG CTC ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAC AGA

      CDR1
      V T I T C R A S Q G I S N W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AAC TGG TTA GCC TGG TAT

      CDR2
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

      CDR3
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

도면5A

항-CXCR4 Fab F7 VH 부위

```

      CDR1
3-48 생식세포계열 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPSSYSMNW
F7 VH Q-----Q-----A-----
F7GL VH -----A-----

      CDR2
3-48 생식세포계열 VRQAPGKGLEWVSYSISSSSSTIYYADSVKGRFTISR
F7 VH -----R-----R-----
F7GL VH -----R-----R-----

      CDR3
3-48 생식세포계열 DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
JH6b 생식세포계열 -----Y Y Y
F7 VH -----D Y G G Q P P-----
F7GL VH -----D Y G G Q P P-----

      CDR3
JH6b 생식세포계열 Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
F7 VH -----(JH6b)
F7GL VH -----(JH6b)
  
```

도면5B

항-CXCR4 Fab F7 VK 부위

	CDR1
L15 생식세포계열	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
F7 VK	A - R -
F7GL VK	- -
	CDR2
L15 생식세포계열	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
F7 VK	- -
F7GL VK	- -
	CDR3
L15 생식세포계열	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
F7 VK	- -
F7GL VK	- -
L15 생식세포계열	Y P
JK1 생식세포계열	T F G Q G T K V E I K
F7 VK	- - R - {JK1}
F7GL VK	- - R - {JK1}

도면6A

항-CXCR4 Fab F9 VH 부위 ...

	<u>CDR1</u>
3-48 생식세포계열	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S N N W
F9 VH	- - - - - Q - - - - - - - - - - A - - - - -
F9GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - - A - - - - -
	<u>CDR2</u>
3-48 생식세포계열	V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R
F9 VH	- - - - - - - - - - - R - R S - - - - -
F9GL VH	- - - - - - - - - - - R - R S - - - - -
	<u>CDR3</u>
3-48 생식세포계열	D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R
JH6b 생식세포계열	- - - - - - - - - - - - - - - - Y Y Y
F9 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - -
F9GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - -
	<u>CDR3</u>
JH6b 생식세포계열	Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
F9 VH	- - - - - - - - - - - (JH6b)
F9GL VH	- - - - - - - - - - - (JH6b)

도면 6B

항-CXCR4 Fab F9 vK 부위

[illegible]

도면7B

항 -CXCR4 Fab D1 VK 부위

L15 생식세포계열	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
D1 VK	V - W V - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - -	
D1GL VK	- - - - - - - - - - - - - - - T - - - - -	
L15 생식세포계열	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F	CDR2
D1 VK	- - - - - - - - - - - E L - - - - - - - - - - -	
D1GL VK	- - - - - - - - - - - E L - - - - - - - - - - -	
L15 생식세포계열	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S	CDR3
D1 VK	- -	
D1GL VK	- -	
L15 생식세포계열	Y P	CDR3
JK1 생식세포계열	T F G Q G T K V E I K	
D1 VK	- - R - - - - - - - - - - (JK1)	
D1GL VK	- - R - - - - - - - - - - (JK1)	

도면8A

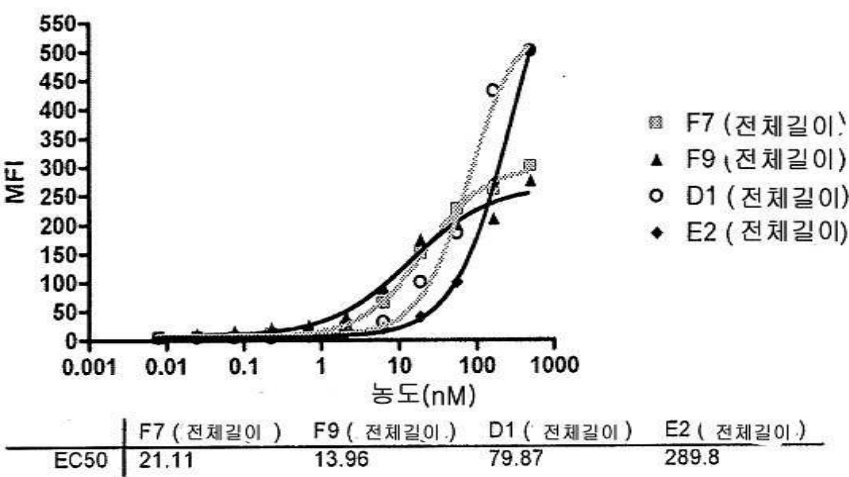
항 -CXCR4 Fab E2 VH 부위

3-48 생식세포계열	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W	CDR1
E2 VH	- - - - - Q - - - - - - - - - - - A - - - - -	
E2GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - A - - - - -	
3-48 생식세포계열	V R Q A P G K G L E W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S R	CDR2
E2 VH	- - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - -	
E2GL VH	- - - - - - - - - - - R - R - - - - - - - - -	
3-48 생식세포계열	D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V Y Y C A R	CDR3
JH6b 생식세포계열	- - - - - - - - - - - - - - - - - Y Y Y	
E2 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - H -	
E2GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - D Y G G Q P P - H -	
JH6b 생식세포계열	Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S	CDR3
E2 VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)	
E2GL VH	- - - - - - - - - - - - - - - - - (JH6b)	

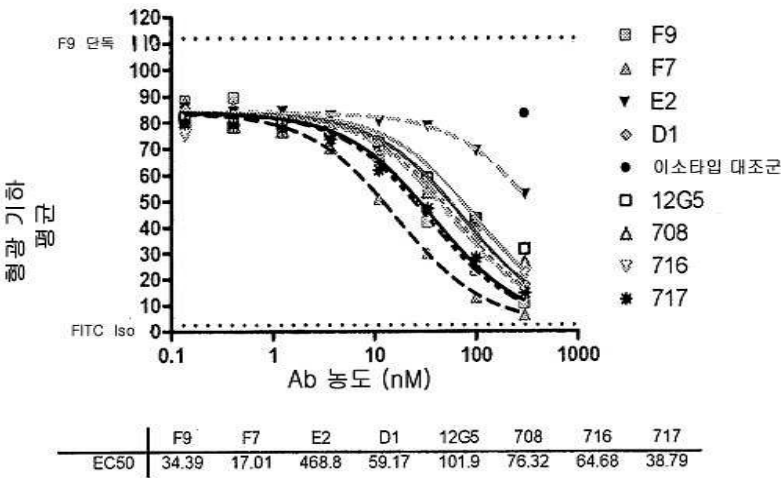
도면8B

항-CXCR4 Fab E2 VK 부위	
	CDR1
L15 생식세포계열	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S
E2 VK	E - V L - N
E2GL VK	- N
	CDR2
L15 생식세포계열	W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F
E2 VK	- -
E2GL VK	- -
	CDR3
L15 생식세포계열	S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S
E2 VK	- -
E2GL VK	- -
	CDR3
L15 생식세포계열	Y P
JK1 생식세포계열	T F G Q G T K V E I K
E2 VK	- - R - (JK1)
E2GL VK	- - R - (JK1)

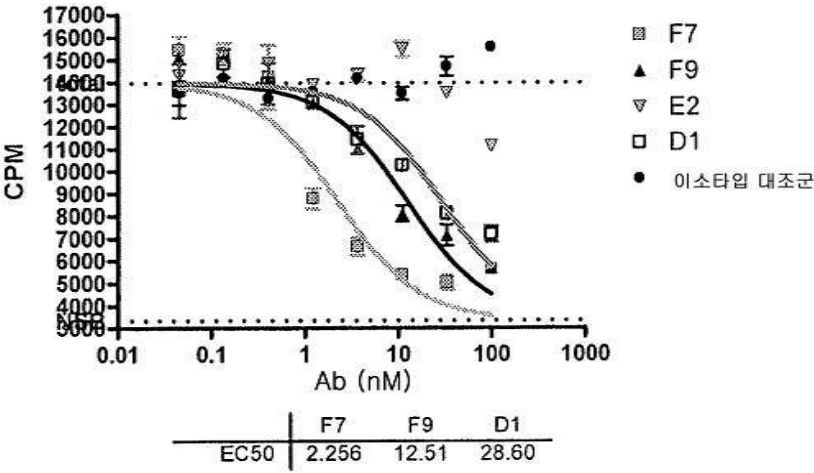
도면9



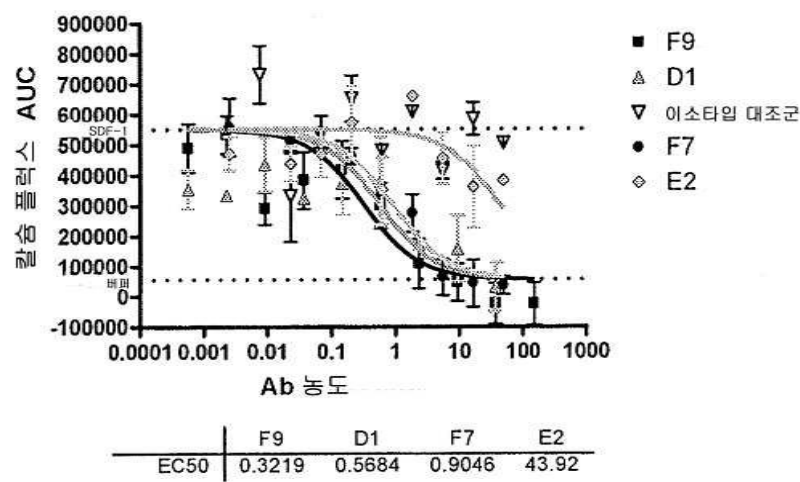
도면10



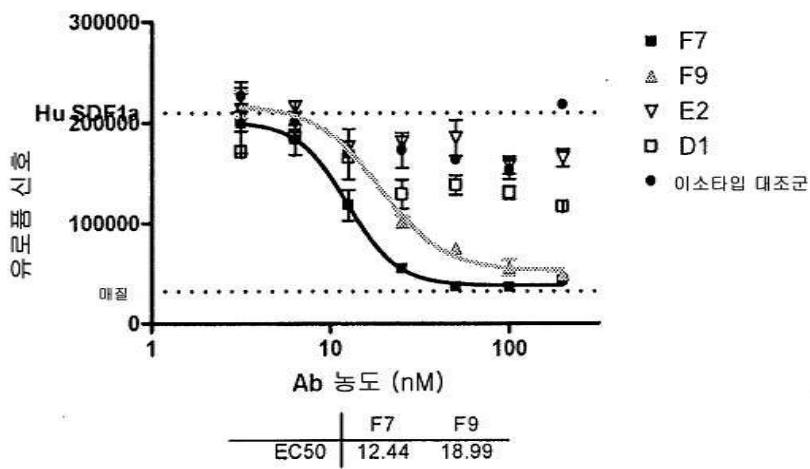
도면11



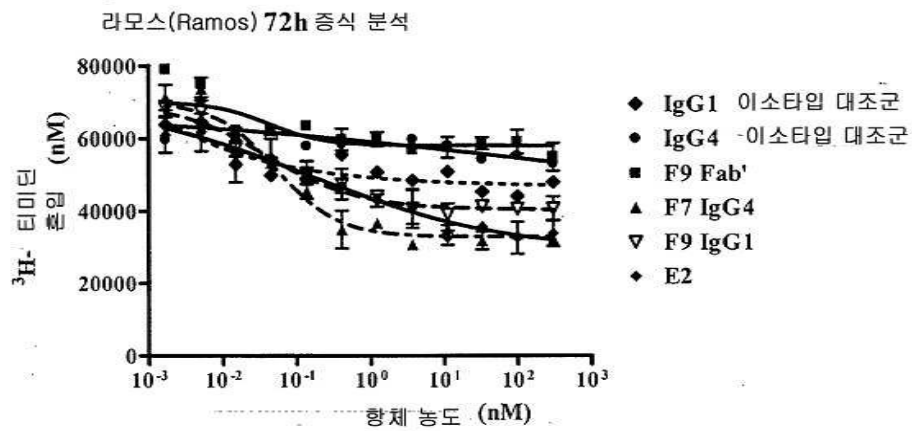
도면12



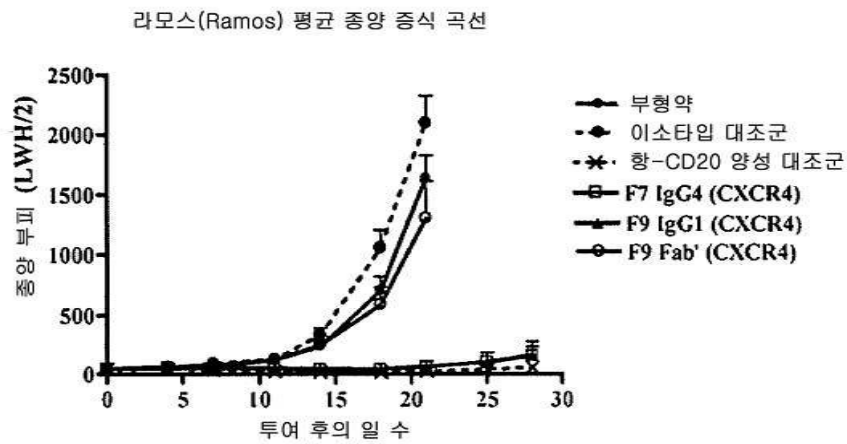
도면13



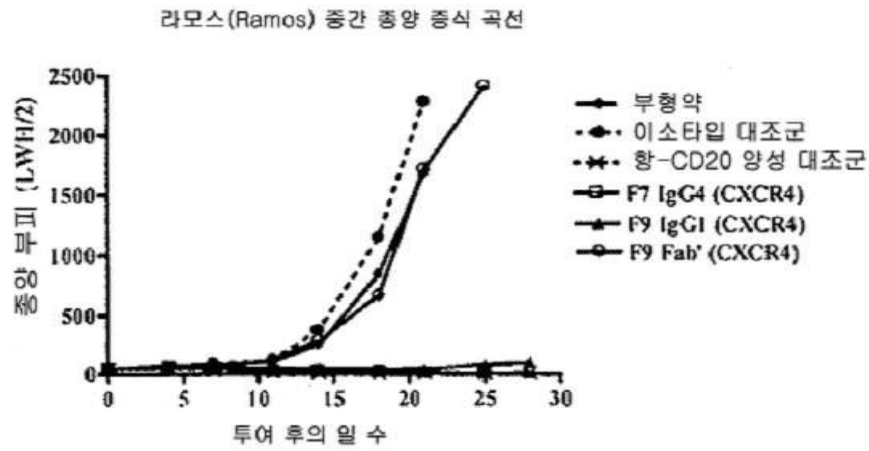
도면14



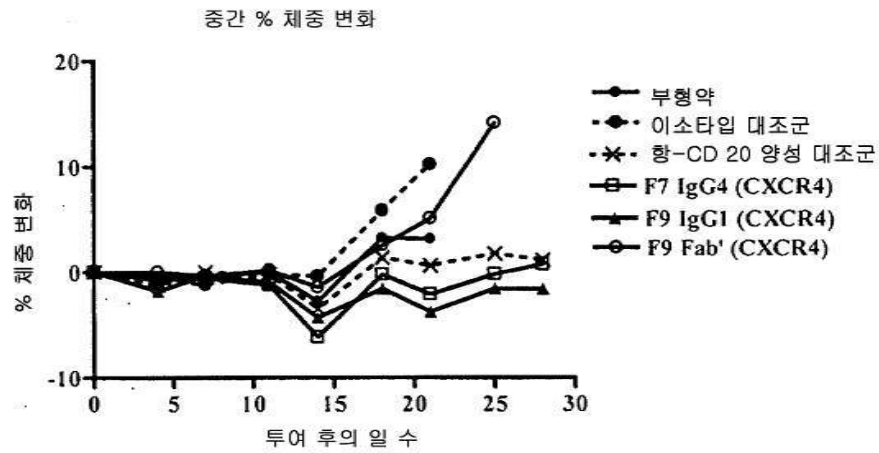
도면15A



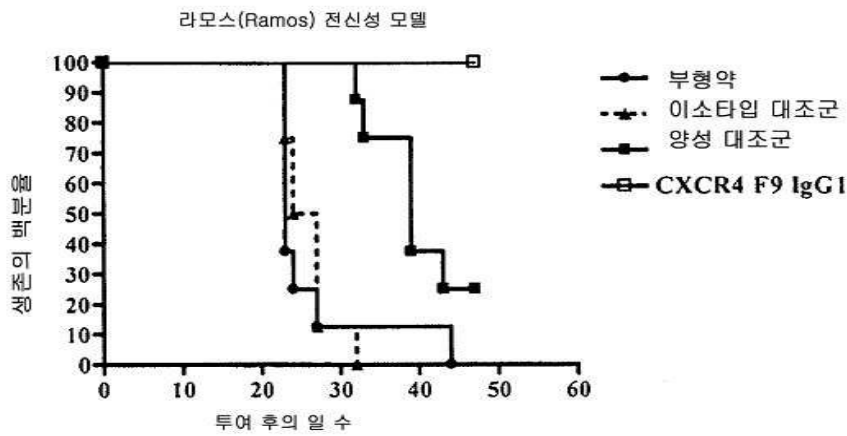
도면15B



도면15C



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MEDAREX, INC.
- <120> HUMAN ANTIBODIES THAT BIND CXCR4 AND USES THEREOF
- <130> MXI-375PC
- <140>
- <141>
- <150> 60/827,851
- <151> 2006-10-02
- <160> 53
- <170> PatentIn Ver. 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 1
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 11

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65						70						75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90						95		
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met		
			100					105						110			
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120					125					
<210>	29																
<211>	107																
<212>	PRT																
<213>	Homo sapiens																
<400>	29																
Ala	Ile	Arg	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp		
			20					25					30				
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile		
		35					40					45					
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
	50					55					60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Phe	Val	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Arg		
				85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
		100						105									

<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 33

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5						10					15	

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
		20							25						30	

agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35						40						45		

tca	tac	att	agt	agt	aga	agt	aga	acc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60				

aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	tca	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65						70				75					80	

ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85							90					95	

gcg	aga	gat	tac	ggg	ggg	caa	ccc	cct	tac	tac	tac	tac	tac	ggg	atg	336
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100					105						110		

gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115					120					125				

<210> 34

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 34

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	gct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			

agc	atg	aac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtt	144
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				

tca	tac	att	agt	agt	aga	agt	aga	agc	ata	tac	tac	gca	gac	tct	gtg	192
Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55				60						

aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	tca	ctg	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
65					70					75				80		

ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gac	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85					90					95			

gcg	aga	gat	tac	ggt	ggt	caa	ccc	cct	tac	tac	tac	tac	tac	ggt	atg	336
Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Gly	Gln	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	
			100				105							110		

gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca				375
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115				120						125				

<210> 35

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 35

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca tac att agt agt cgt agt aaa acc ata tac tac gca gac tct gtg 192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Lys Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc agg aac tca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac tac tac tac tac ggt atg 336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 36

<211> 375

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(375)

<400> 36

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc gct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca tac att agt agt aga agt aga acc ata tac tac gca gac tct gtg 192
Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gat tac ggt ggt caa ccc cct tac cac tac tac tac ggt atg 336
Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 37

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 37

gcc atc cgg atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gta act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 38

gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca cca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 39
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 39
 gtc atc tgg gtg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
 Val Ile Trp Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgt cgg acg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct gag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 40
 gaa att gtg ctc acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc aac tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
 20 25 30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gcg act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac cct cgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

 <210> 44
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr His Tyr Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 48
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 50

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 51

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn

180	185	190
Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu		
195	200	205
Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser		
210	215	220
Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr		
225	230	235
Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr		
245	250	255
Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln		
260	265	270
Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu		
275	280	285
Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe		
290	295	300
Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val		
305	310	315
Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly		
325	330	335
His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser		
340	345	350
<210> 52		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 52		
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val		
1	5	10
		15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10