



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월28일

(11) 등록번호 10-1486183

(24) 등록일자 2015년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/24 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7029090(분할)

(22) 출원일자(국제) 2007년02월08일

심사청구일자 2013년11월01일

(85) 번역문제출일자 2013년11월01일

(65) 공개번호 10-2013-0124420

(43) 공개일자 2013년11월13일

(62) 원출원 특허 10-2008-7021791

원출원일자(국제) 2007년02월08일

심사청구일자 2012년02월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/061874

(87) 국제공개번호 WO 2007/092939

국제공개일자 2007년08월16일

(30) 우선권주장

60/771,251 2006년02월08일 미국(US)

60/774,500 2006년02월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004046330 A2*

Growth Factors 1990 vol. 3, pp. 159-169

EP1593690 A

US20020010126 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

모르포테크, 인크.

미국 19341 펜실베이니아주 엑스톤 웰시 폴 로드 210

(72) 발명자

사쓰, 필립, 엠.

미국 19403 펜실베이니아주 오두본 블랙 호크 서클 1903

니콜라이데스, 니콜라스, 이.

미국 19061 펜실베이니아주 가넷 밸리 사이더 밀 코트 4

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 17 항

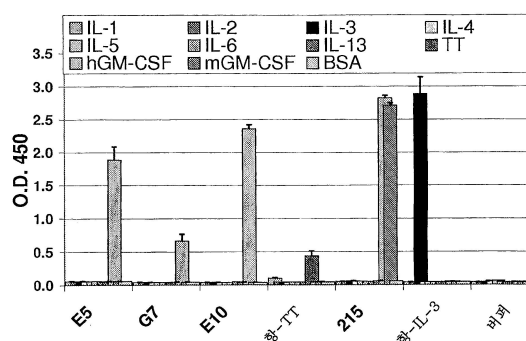
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 항원성 GM-CSF 펩티드 및 GM-CSF에 대한 항체

(57) 요약

높은 결합 특이성 및 생물학적 활성, 특히 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자에 대한 중화 활성을 갖는 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주, 및 상기 하이브리도마 세포주를 생성하는 방법을 제공한다. 표적 항원 및 에피토프가 또한 제공된다. 항체는 치료 방법에서, 예를 들어 암, 감염성 질병 또는 자가면역 질병의 치료에서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

그라쑈, 루이지

미국 19010 펜실베이니아주 브린 모어 바바라 레인
403

리, 지안

미국 19034 펜실베이니아주 포트 워싱턴 엘보우 레인
105

차오, 쿼민

미국 19083 펜실베이니아주 하버타운 워포드 로드
206

로우티에르, 에릭

미국 19342 펜실베이니아주 글렌 밀즈 콩고드 로드
547

에벨, 볼프강

미국 19119 펜실베이니아주 필라델피아 와즈워스 애
비뉴 421

특허청구의 범위

청구항 1

서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및 서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, GM-CSF에 특이적으로 결합하는 재조합적으로 발현된 모노클로날 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 서열 16의 아미노산 1 내지 114를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 18의 아미노산 1 내지 97을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체가 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 항체의 친화도가 1×10^{-8} M 미만인 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 2개의 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 2개의 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및 서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, GM-CSF에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 류마티스 관절염, 다발경화증, 천식 또는 폐포 단백증인 GM-CSF 매개 염증성 질병 치료용 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및

서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, GM-CSF에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

제13항에 있어서, 중쇄를 코딩하는 핵산 서열이 서열 17을 포함하거나, 경쇄를 코딩하는 핵산 서열이 서열 19를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

청구항 15

제13항의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 16

서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및 서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, GM-CSF에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 발현하는 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 하이브리도마인 세포.

청구항 18

제약상 허용되는 담체 및 GM-CSF 매개 염증성 질병의 치료에 효과적인 양의 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체를 포함하고, 여기서 상기 항체가 서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및 서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인, 대상에서 류마티스 관절염, 다발경화증, 천식 또는 폐포 단백증인 GM-CSF 매개 염증성 질병 치료용 제약 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 대상이 인간인 제약 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 항체가 서열 16의 아미노산 1 내지 114를 포함하는 중쇄 가변 도메인 및 서열 18의 아미노산 1 내지 97을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 항체가 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

제16항의 세포를 항체 생산에 적합한 조건 하에 배양하고, 세포 배양액으로부터 항체를 회수하는 것을 포함하는, 서열 46의 CDR1, 서열 47의 CDR2 및 서열 48의 CDR3을 포함하는 중쇄 및 서열 49의 CDR1, 서열 50의 CDR2 및 서열 51의 CDR3을 포함하는 경쇄를 포함하는, GM-CSF에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 제조하는 방법.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 교차 참조

본원은 각각 그 전문을 본원에 참고로 포함시킨 미국 특허 가출원 60/771,251 (2006년 2월 8일 출원) 및 60/774,500 (2006년 2월 17일 출원)을 기초로 한 우선권을 주장한다.

본 발명은 일반적으로 면역요법의 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 모노클로날 항체를 생성하기 위한 항원, 및 자가면역 및 암 세포를 중화할 수 있고 염증 반응을 중화할 수 있는 모노클로날 항체에 관한 것이다.

배경 기술

특히, 공개 출원, 기술 문헌 및 학술 문헌을 포함한 다양한 공개문헌이 명세서 전체에서 인용된다. 상기 인용된 공개문헌은 각각 그 전부가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

몇몇 질병-연관 항원은 현재 그들의 독특한 약물학 및 안전성 프로파일 때문에 치료 모노클로날 항체 (MAb)를 사용한 표적이 되고 있다. 질병-연관 표적 항원 중에 CD20, 종양 괴사 인자 알파 (TNF- α), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자가 있다.

과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF)는 원래 마우스 골수에서 전구 세포로부터 과립구 및 대식세포 콜로니 모두를 생성하는 능력을 갖는 단백질로서 발견되었고, 그에 따라 명명되었다 (Burgess et al., (1980) Blood 56:947-58). 후속 연구에서는 성숙 대식세포 및 과립구의 기능을 강화시키는데 있어서 GM-CSF의 역할을 입증하여 ([Handman and Burgess (1979) J. Immunol. 122:1134-1137]; [Hamilton et al., (1980) J. Cell Physiol. 103:435-445]; [Gamble et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8667-8671]), 염증 반응에서 GM-CSF의 역할을 제안하였다 (Hamilton et al., (1980) J. Cell Physiol. 103:435-445). 분자를 연구함에 따라, GM-CSF가 과립구, 대식세포 및 호산구와 같은 보다 성숙한 골수 세포의 특성에 영향을 미치는 그의 능력에서 발생하는 다른 기능을 갖는 것이 명백해지고 있다. GM-CSF의 기능은 GM-CSF에 낮은 친화도로 결합하는 CD116 (과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 수용체; 콜로니 자극 인자 2 수용체 알파로도 알려짐)에 결합함으로써 매개된다. IL3 및 IL5 수용체와 또한 공유되는 CD131로 불리는 베타 서브유닛은 그 자체로는 GM-CSF에 대한 검출가능한 결합 활성을 갖지 않지만, 알파 서브유닛과 연관될 때 높은 친화도 결합을 위해 필요하고, 신호 전달에서 기초적인 역할을 수행한다. GM-CSF 수용체는 골수 전구세포 및 성숙 골수 세포, 예를 들어 중성구, 호산구, 단핵 식세포 및 단핵구에서 발견된다. 또한, GM-CSF 수용체 서브유닛은 정상 비-조혈 조직, 예를 들어 인간 태반, 내피, 및 중추신경계의 회소돌기아교세포에 존재하는 것으로 나타났다.

GM-CSF는 골수 내에서 초기 골수 전구세포로부터 과립구 및 대식세포의 생성에서 주요한 생물학적 역할을 한다. 외부 자극에 대한 숙주 반응에서 및 염증 및 자가면역 병태에서 GM-CSF의 추가의 생리학적 기능이 처음에는 이해되지 않았지만 나중에 밝혀졌다. 매우 이른 연구에서, GM-CSF는 마우스에 지질다당류 (LPS) 주입 후 폐 조직-조건화된 배지로부터 정제되었다 (Burgess et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:1998-2003). 많은 연구자들은 GM-CSF를 과립구, 대식세포 및 호산구 계통 세포수 및 정상 생리학 조건 하의 활성화 상태의 주요 조절인자 중 하나인 것으로 여긴다. 그러나, GM-CSF의 이상 발현이 연관된 병리학적 결과를 갖는 변경된 면역 및 염증 반응을 일으킬 수 있는 것으로 또한 가정되었다. 수년 전에, GM-CSF를 전염증성 시토킨으로서 볼 수 있음이 제안되었다 (Hamilton et al., 1980, J. Cell Physiol. 103:435-445). 또한, GM-CSF는 다수의 인간 염증 질병, 예를 들어 류마티스 관절염, 자가면역 질병, 염증성 신장 질병 및 염증성 폐 질환, 예를 들어 천식 및 만성 폐쇄 폐 질환 (COPD)의 체질에서 역할을 할 수 있다. 흥미롭게도, 다발경화증과 GM-CSF 사이에 연관성이 있는 것으로 제안되었다 (McQualter et al., (2001) J. Exp. Med., 194:873-881). 다발경화증에 대한 모델인 자가면역 뇌척수염의 실험 모델에서, GM-CSF는 자가면역-매개 탈수초에 관련되는 것으로 밝혀졌다.

GM-CSF로 단핵구, 대식세포 및 중성구를 처리한 후에 생체내 연구는 GM-CSF가 상기 세포 종류를 활성화시키고

그들의 생존 특징을 연장시킬 수 있음을 입증하였다. 또한, GM-CSF 노출은 상기 세포 종류로부터 염증 매개체의 방출을 일으키고, 추가의 연구에서는 특정 유도체 및 심지어 종양 세포를 치사시키는 상기 세포의 능력을 입증하였다 ([Hamilton (1993) Immunol. Today 14:18-24]; [Hamilton (1993) Lancet 342:536-539]; [Takahashi (1993) Blood 81:357-364]). 생체 내 연구가 생체 내에서 GM-CSF의 기능을 표시하는지 결정하기 위해, 설치류를 사용하여 전신 투여를 수행하였다. 단백질의 복강내 투여에 의해 GM-CSF의 순환 수준을 인공적으로 증가시키면 순환 중성구 및 순환 복막 대식세포의 수를 모두 증가시켰고, 설치류의 복강에서 CD5+ 대식세포의 발생 및 분화가 증가하였음이 나타났다 (Metcalf et al., (1987) Exp. Hematol. 15:1-9).

[0009]

GM-CSF는 제2 자극, 예를 들어 LPS 또는 인터페론-감마에 대해 보다 강건하고 상승적인 방식으로 반응하도록 세포를 "초회 감작시킬 (priming)" 수 있는 것으로 또한 나타났다 (Hart et al., 1988, J. Immunol. 141: 1516-1521). 마우스는 GM-CSF로 시험관 내에서 및 생체 내에서 모두 초회 감작될 수 있어서, LPS 또는 TNF-알파로 후속 접종한 후 증가된 수준의 순환 전염증성 시토킨을 생산한다.

[0010]

임상 현장에서, 복막 투석 환자에게 GM-CSF를 투여하면 대식세포의 현저한 동원을 일으켰다 (Selgas et al., 1996, Kidney Int. 50:2070-2078). 놀랍게도, 설치류 연구로부터 예측되는 바와 같이, 임상 현장에서 GM-CSF의 투여는 염증성 시토킨 및 잠재적인 원치않는 부작용의 생산을 가중시킬 수 있다. 예를 들어, 펠티 (Felty) 증후군과 연관된 호중구 감소증을 정정하기 위해 류마티스 관절염의 환자를 GM-CSF로 치료할 때, 그들의 관절염은 악화되었다 (Hazenberg et al., 1991, Blood 74:2769-2770). 다른 임상 현장에서, 암 화학요법 이후, GM-CSF 처리는 류마티스 관절염을 악화시켰다 (de Vries et al., (1991) J. Immunol. 163: 4985-4993). 인간 공여자에게 GM-CSF를 전신 투여하면 수피옥사이드를 생산하는 단리된 과립구의 능력을 증가시키고, 순환 단핵구의 세포독성을 가중시키고 또한 단핵구 수를 증가시켰다 (Perkins et al., 1993, Am J. Hematol. 43:279-285). GM-CSF의 이상 발현은 또한 인간에서 폐의 질병과 연관된다. 예를 들어, 작은 자극물질, 내독소 또는 감염에 의한 폐에서 GM-CSF의 상향조절은 TH2 면역 왜곡 및 천식에 걸리게 하는 것으로 나타난다 (Eisenbarth et al., (2002) J. Exp. Med. 196:1645-1651). 상기 요약된 연구는 GM-CSF는 세포 동원, 증가된 세포 생존 및/또는 활성화를 위한 초회 감작을 통해 염증 과정의 활성화에서 역할을 하는 것으로 제안한다.

[0011]

몇몇 연관 및 실험 데이터는 천식에서 GM-CSF에 대한 역할을 제안한다. 천식의 마우스 모델에서 중화 항체의 사용은 천식 표현형을 억제하는 능력을 입증하였고 (Yamashita (2002) Cell Immunol. 219:92), 천식 환자의 BAL 유체 내의 시토킨을 측정하는 몇몇 연구에서는 GM-CSF의 증가를 밝혀내었다 (Gajewska (2003) Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2:279).

[0012]

류마티스 관절염 (RA)은 GM-CSF가 관여될 수 있다는 풍부한 증거가 존재하는 만성 염증성 자가면역 질병이다. GM-CSF는 RA 병변에서 상승된 수준으로 발견되었고 (Xu et al., (1989) J. Clin. Invest. 83:876), 염증성 시토킨, 예를 들어 IL-1 및 TNF-알파로 자극한 후 정주 관절 세포 (연골세포 및 윤활 섬유모세포)에 의해 시험관 내에서 생산된다 (Leizer et al., (1990) Blood 76:1989). 마우스에서 콜라겐-유발 관절염 (CIA)은 타입 II 콜라겐 (CII)에 대한 체액성 및 세포성 면역 반응에 의존적인 RA의 자가면역 모델이다 (Seki et al., (1988) J. Immunol. 140, 1477). 역사적으로, 상기 RA 표현형은 H-2q 또는 H-2r 반수체를 갖는 마우스 균주에 제한되고, 일반적으로 DBA/1 마우스에서 수행된다 (Wooley (1988) Methods Enzymol. 162:361). 뮤린 GM-CSF 로커스에 대해 동종적합성의 존재하지 않는 (null) 형질전환 마우스에서 일련의 연구를 수행하였다 (Stanley et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5592). 놀랍게도, GM-CSF-결핍 마우스는 그들의 야생형 대조 한배새끼에 비해 콜라겐-유발 관절염의 유도에 대해 내성이다 (Campbell et al., (1998) J. Immunol. 161:3639-3644).

[0013]

GM-CSF가 존재하지 않는 마우스가 계면활성제 청소율이 손상되어, 본원에 설명된 인간 병태를 근접하게 모방하는 뮤린 폐포 단백증 (PAP)을 일으키는 것이 더욱 흥미롭다. 더욱이, PAP 표현형은 GM-CSF 유전자의 폐-특이적 전달 (Zsengaller et al., (1998) Hum. Gene Ther. 9:2101-2109), GM-CSF의 에어로졸 적용 또는 조혈 재구성을 위한 골수 이식 ([Reed et al., (1999) Am. J. Physiol. 276:L556-L563]; [Nishinakamura et al., (1996) J. Exp. Med. 183:2657-2662])에 의해 정정될 수 있다.

[0014]

성인 인간 폐포 단백증 (PAP)은 폐포 내에 인지질 및 계면활성 단백질의 축적을 특징으로 하는 희귀 질병이다. PAP는 과도한 계면활성제를 청소하는 폐포 대식세포 및 타입 II 상피 세포의 기능 불능으로 인한 것으로 가정되었다 (Mazzone et al (2001) Clev. Clin. J. Med. 68:977-992). PAP의 진단에는 일반적으로 개흉 폐생검이 필요하고, 질병에 대한 표준 치료는 전폐 세척술에 의한 축적된 계면활성제의 물리적 제거이다 (Shah et al., (2000) Thorax 55:67-77). 또한, PAP 환자는 GM-CSF에 대한 순환하는 중화 항체를 갖는 것으로 나타났고, 이는 상기 시토킨을 질병의 원인으로서 시사한다. 상기 자가면역 반응이 GM-CSF에 특이적인지 여부는

불분명하다. 그러나, PAP 환자의 하위집단이 GM-CSF 요법으로 개선되는 것으로 나타났고, 이는 유전자 파괴 또는 항체-매개 중화에 의한 GM-CSF의 부재가 PAP를 발병시킨다는 가설을 지지한다.

[0015]

암에서 GM-CSF에 대한 역할을 제안하는 증거가 또한 존재한다. 예를 들어, GM-CSF는 백혈병, 예를 들어 소아 골수단구성 백혈병 (JMML)의 발생 및 진행에서 일정 역할을 한다 (Emanuel PD (2004) Curr. Hematol. Rep. 3:203-209). JMML은 골수에서 미성숙 골수 세포의 과도한 부적절한 증식을 일으키는 정상 조혈의 파괴를 특징으로 한다. 상기 증식하는 조혈 암 세포는 비장 및 간으로 전이할 수 있다. 흥미롭게도, JMML 환자는 GM-CSF에 과민성이고, GM-CSF를 과다발현하는 형질전환 마우스에서와 유사한 병리학적 특징을 나타낸다 (Lang et al., (1987) 51:675-86). 또한, GM-CSF는 JMML 세포 성장 및 생존을 촉진하는 것으로 나타났다 (Emanuel et al., (1991) Blood 77:925-9). JMML의 형질전환 마우스 모델에서, GM-CSF를 차단하면 골수, 혈액 및 비장에서 JMML 세포 부하 (burden)를 감소시켰다 (Iversen et al., (1997) Blood, 90:4910-7).

[0016]

GM-CSF가 낙아웃된 (knock-out) 무린 질병 모델뿐만 아니라 순환 항체가 GM-CSF에 대하여 전신 혈류 내에 생성되는 인간 질병, 예를 들어 PAP로부터, 상기 시토킨이 병리학의 중요한 매개체임이 명백하다. 따라서, 시토킨 자체에 대한 항체를 개발함으로써 또는 GM-CSF 수용체의 차단에 의해 GM-CSF의 활성을 길항할 수 있는 약물을 개발하는 방안은 매우 유용한 인간 치료법일 수 있다. 몇몇 폴리클로날 및 모노클로날 항체가 재조합 GM-CSF 분자에 대해 생성되었다. 예를 들어, 문헌 [Befly et al., (1994), Hybridoma 13:457-468]에서는 뉴질랜드 화이트종 토끼에서 재조합 인간 GM-CSF에 대한 폴리클로날 항체 및 Balb/c 마우스에서 모노클로날 항체를 생성하였다. 상기 토끼 및 일부 무린 모노클로날 항체는 MO7e 세포를 사용하는 시험관 내 세포 증식 분석에서 GM-CSF의 활성을 중화할 수 있었다. 추가의 연구에서, 문헌 [Nice et al., (1990), Growth Factors 3,159-169]에서는 하나의 중화 무린 항-GM-CSF 항체, LMM 102의 결합 부위를 에피토프-매핑하였다. 잘 규정된 에피토프는 단편을 분리하기 위해 역상 HPLC 분획화를 이용하여 재조합 인간 GM-CSF로부터 일련의 소화 산물을 생성한 후, 디술파이드 결합에 의해 연결된 2개의 펩티드를 포함하는 산물을 규정하도록 트립신 분해 단편의 추가의 에스. 아우레우스 (*S. aureus*) V8 소화함으로써 묘사되었다. GM-CSF를 시험관 내 분석 시스템에서 0.1 내지 1.7 나노몰 범위의 EC50으로 중화시키는 인간 GM-CSF에 대한 3개의 무린 항체가 문헌 [Dempsey et al., (1990), Hybridoma 9, 545-558]에 의해 생성되었다. 상기 항체들은 무린 GM-CSF 또는 다른 관련 시토킨과 반응하지 않았다. 상기 기재된 항체는 모두 인간 혈청에서 GM-CSF의 검출을 위해 및 GM-CSF 신호전달을 억제하기 위한 시험관 내 분석을 위해 유용한 시약이다. 그러나, 상기 모든 항체는 무린 또는 토끼계에서 유래한다는 사실 때문에 치료제로서 가치가 없다. 무린 항-GM-CSF 항체로부터의 가변 도메인을 인간 백본 내로 서브클로닝함으로써 무린 대용물로부터 키메라 항체를 생성하기 위한 시도가 이루어졌다. 상기 전략을 이용하여 시험관 내에서 GM-CSF를 중화할 수 있고 치료제로서 유용할 수 있는 키메라 항체를 생성하였다 (WO 03/068924 A2).

[0017]

치료 항체의 중요한 측면은 면역 효과기 기능, 예를 들어 항체 의존 세포성 세포독성 (ADCC)을 유도하는 그의 능력이다. 예를 들어, 설치류 MAbs는 Fc 구역에서 서열 차이 때문에 인간에서 효과기 기능을 불완전하게 매개하는 것으로 나타났고, 따라서 적합한 약물학적 특성을 얻기 위해 키메라화 또는 인간화가 요구된다. 또한, 완전 인간 서열을 갖는 MAbs는 MAbs의 천연 글리코실화 패턴을 변경시킬 수 있는 비-인간 숙주 세포 내에서 생산되면 여전히 ADCC를 지지하지 못할 수 있다 (Shinkawa et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:3466-73).

[0018]

이들 사실에 비추어, 인간 B-세포에 의한 치료 항체의 생산이 바람직하다. 인간 MAbs를 분비하는 하이브리도마의 생성 방법은 이전에 보고되었다 (WO2004/046330). 인간 B-세포에 의해 생성된 치료 MAbs는 인간 효과기 기능을 발휘할 수 있고, 그들의 천연 인간 구조로 인해 매우 제한된 면역원성을 갖는다. 인간 B-세포로부터 유래된 하이브리도마 또는 엡스타인-바아 (Epstein-Barr) 바이러스 (EBV)-형질전환된 림프아구 세포주의 생성이 이전에 보고되었지만 ([Kirman et al., (2002) Hybrid Hybridomics 21:405-14]; [Boerner et al. (1991) J. Immunol. 147:86-95]; [Zafiroopoulos et al., (1997) J. Immunol. Methods 200:181-90]); 장기간 안정성, 제조 공정에 대한 적합성, 및 항체의 약물학적 특성에 관한 상기 항체 및 세포주의 특성에 대한 정보는 제한된다 (van Dijk et al., (2001) Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-74).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019]

따라서, 감염성, 염증성 질병, 자가면역 질환, 및 암과 같은 다른 질병과 연관된 염증의 치료를 위한 치료 인간 항체가 필요하다. 상기 항체가 면역 효과기 기능을 발휘할 뿐만 아니라, 인간 환자에서 잘 허용되는 것이 추가로 요망된다. 본 발명은 상기 필요성 및 오랫동안 요구된 다른 필요성을 해결한다.

과제의 해결 수단

[0020]

<발명의 개요>

[0021]

본 발명은 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 단리된 인간 항체를 특징으로 한다. 항체는 서열 42 또는 48을 갖는 중쇄 CDR3을 포함할 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 8 또는 16을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 12 또는 18을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 항체는 2개의 중쇄를 갖는다. 일부 실시태양에서, 항체는 2개의 경쇄를 갖는다. 항체는 고친화도 항체이고, 친화도가 약 1×10^{-8} M 미만일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 모노클로날 항체이고, 보다 바람직하게는 인간 모노클로날 항체이다. 매우 바람직한 실시태양에서, 항체는 아미노산 서열 3, 4, 5, 35, 36, 37, 38 또는 39를 포함하는 폴리펩티드 상의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 상기 항체를 발현하는 세포, 예를 들어 하이브리도마 세포가 또한 제공된다.

[0022]

본 발명은 또한 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 특징으로 한다. 일부 바람직한 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 10 또는 17의 중쇄 서열을 포함한다. 일부 바람직한 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 14 또는 19의 경쇄 서열을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 또한 제공한다.

[0023]

본 발명은 또한 치료를 요하는 대상에서 GM-CSF-매개 염증성 질병을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 대상에게 제약상 허용되는 담체, 및 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물을 GM-CSF-매개 염증성 질병 치료에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법의 바람직한 측면에서, 항체는 서열 42 또는 48을 갖는 중쇄 CDR3을 포함할 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 8 또는 16을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 12 또는 18을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 항체는 고친화도 항체이고, 친화도가 약 1×10^{-8} M 미만일 수 있다.

발명의 효과

[0024]

본 발명은 높은 결합 특이성 및 생물학적 활성, 특히 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자에 대한 중화 활성을 갖는 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주, 및 상기 하이브리도마 세포주를 생성하는 방법을 제공한다. 표적 항원 및 에피토프가 또한 제공된다. 항체는 치료 방법에서, 예를 들어 암, 감염성 질병 또는 자가면역 질병의 치료에서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 항원-특이적 인간 MAb의 선택을 위한 항원 패널 ELISA를 예시한다. 3개의 GM-CSF-특이적 인간 MAb (E5, G7, E10)는 인간 GM-CSF와 반응하였고, 패널 내의 다른 항원과는 반응하지 않았다. 항체 215는 인간 GM-CSF (hGM-CSF) 및 뮤린 GM-CSF (mGM-CSF)에 결합하는 뮤린 MAb이다.

도 2A 및 2B는 천연 인간 GM-CSF에 대한 인간 MAb의 높은 특이성을 설명한다. 도 2A에 도시된 바와 같이, 가용형 인간 GM-CSF는 인간 GM-CSF에 대한 세포 표면 면역글로불린 (Ig)을 제시하는 뮤린 하이브리도마 세포에 결합되었다. MAb E5를 후속적으로 반응물에 첨가하고, 인간 GM-CSF에 대한 그의 결합을 FITC-컨쥬게이팅된 염소 항-인간 Ig를 사용하여 측정하였다. E5는 뮤린 하이브리도마 세포에 의해 발현된 임의의 표면 단백질에 결합하지 않았지만 (중간 패널), 세포 표면 Ig에 의해 포획된 가용형 GM-CSF에 결합하였다 (하부 패널). 도 2B에 도시된 바와 같이, 피코에리트린 (PE)-표지된 인간 GM-CSF (PE-GM)는 E10 세포 표면 상에 발현된 Ig에 반응할 수 있다. 과도한 비표지된 GM-CSF (저변 패널)는 PE-GM 결합에 대해 경쟁하였다.

도 3은 클래스-스위칭된 (switched) 하이브리도마 세포에 의한 항원-결합 IgG의 분비를 증명한다. 하이브리도마 E5 세포 (모체)를 물질 및 방법에 설명된 바와 같이 처리하였다. 클래스-스위칭된 하이브리도마 클론을 ELISPOT-기반 스크리닝 방법을 이용하여 확인하였다. IgM 또는 IgG의 결합을 평가하기 위해, 플레이트 상에 코팅된 인간 GM-CSF에 대한 특이적 결합을 측정하는 ELISA를 수행하였다. 스위칭된 IgG MAb는 모 IgM에 상당하는 항원에 대한 결합을 나타냈다.

도 4는 완전 인간 MAb를 사용하는 TF-1 세포주의 GM-CSF-의존 성장 억제를 설명한다. 인간 GM-CSF-의존 인간 적백혈병 세포주 TF-1 (ATCC, 미국 버지니아주)을 10 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (페프로테크 (PeproTech), 미국 뉴저지주)를 함유하는 완전 RPMI 1640 내에서 성장시켰다. 실험 전일에, TF-1 세포를 0.1% FBS 내에서 GM-

CSF의 부재 하에 성장시켰다. 영양을 공급하지 않은 (starved) TF-1 세포를 수확하고, 분석 배지 (0.5% BSA가 존재하는 보통 (plain) RPMI)로 2회 세척하였다. 세포를 분석 배지에 재현탁하고, 96-웰 마이크로플레이트 내에 10,000 세포/웰의 농도로 접종하였다. 분석 배지, 100 pg/mL GM-CSF, 또는 GM-CSF를 함유하는 웰을 1시간 동안 시험 또는 이소형 대조군 Ig와 함께 도면에 표시된 농도로 예비인큐베이팅하였다. 3일 후, 40 μ L의 Cell Titer 시약 (프로메가 (Promega, 미국 위스콘신주))을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이팅하였다. 광학 밀도 (O.D.)를 분광광도계에서 490 nm에서 측정하고, 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. GM-CSF 중화의 백분율은 다음과 같이 계산한다: $100 - [(Ig\text{ 존재시의 } O.D./Ig\text{ 비존재시의 } O.D.) \times 100]$.

도 5a는 시험된 모든 E5-3D2 서브클론이 고수준의 Ig를 분비하는 것을 입증하는 ELISA 결과를 예시한다. 하이브리도마주 E5-3D2를 60 세대 동안 성장시킨 후, 세포를 생산하는 빈도를 분석함으로써 생산의 안정성을 평가하였다. 제한 희석을 통해 3D2 세포로부터 유래된 서브클론 (X1-X10)을 무작위로 선택하고, 그들의 Ig 생산을 ELISA-기반 분석을 사용하여 측정하였다. 405 nm에서 흡광도를 세포-함유 웰의 시각적 검사에 의해 콜로니 크기에 대해 표준화하였다. 도 5b는 대수 증식기 동안 측정된 특이적 생산성이 1 리터의 무혈청 배지를 함유하는 교반 생물반응기 (bioreactor) 내에 3D2 세포의 접종하고 1일 내지 5일에 Ig 생산 및 생존 세포 수를 기록한 후 24 pg/세포/일이었음을 입증한다.

도 6A는 미스매치 수복 (mismatch repair) 억제제로 처리된 E5 하이브리도마 세포에서 발견된 BAT 마커에서 단일 뉴클레오타이드 결실의 예의 결과를 도시한 것이다. 막대그래프에서 중심 피크를 가로지르는 점선은 야생형 (wt) 또는 단축된 (-1 nt) 단편의 크기를 나타낸다. 도 6B에서, 모세포 및 미스매치 수복-억제된 세포를 마이크로플레이트 내에 접종하여, 각각 3,763 및 2,437 Ig-분비 클론 (O.D. >0.2)을 얻었다. Ig 농도는 ELISA에 의해 결정되고, 1을 초과하는 O.D. 값을 갖는 클론의 빈도를 기록하고 스크리닝된 클론의 총 수의 백분율로서 표현하였다.

도 7은 완전 인간 하이브리도마 세포주의 생성을 위한 각 단계를 설명하는 개략적 흐름도를 제공한다.

도 8은 항원-특이적 인간 MAb의 선택을 위한 항원 패널 ELISA를 예시한 것이다. 3개의 GM-CSF 특이적 huMAb, 즉, E10, G9 및 E5 (설명하지 않음)는 인간 GM-CSF와 반응하였고 패널 내의 다른 항원과 반응하지 않았다. 효율적인 항원 코팅은 보다 큰 분석 감도를 위해 다양한 항원에 대한 특이적 MAb를 사용하여 최적화시켰다. 615 및 215는 2개의 항-인간 GM-CSF 무관 MAb이다.

도 9는 MAb E10의 이소형 결정을 설명한다. E10의 이소형을 결정하기 위해, 이소형을 유도하기 위해 항-인간 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, L κ 및 L λ Fc 특이적 항체를 사용하여 표준 분석을 수행하였다.

도 10은 E10 및 G9 MAb를 사용하는 웨스턴 (Western) 분석을 도시한 것이다. 항체가 인간 재조합 GM-CSF와 교차반응할지 여부를 결정하기 위해 E10 및 G9를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. mAb215는 양성 대조군으로서 마우스 항-인간 GM-CSF 중화 모노클로날 항체이고, 레인 1은 음성 단백질 대조군으로서 종양 세포 용해물을 로딩하였고, 레인 2는 500 ng rh GM-CSF (케프로테크)를 로딩하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, E10 및 G9는 인간 GM-CSF와 반응하였다.

도 11은 E10에 대한 BIACORE 분석을 도시한 것이다. E10.20의 회합속도 상수 (k_a)는 2.47×10^4 , 해리속도 상수 (k_d)는 2.16×10^{-5} , 총 친화도 (K_D)는 0.87 nM이었다.

도 12는 MAb G9의 이소형 결정을 설명한다. G9의 이소형을 결정하기 위해, 이소형을 유도하기 위해 항-인간 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, L κ 및 L λ 특이적 항체를 사용하여 표준 분석을 수행하였다 (이중 샘플 사용, 도 3).

도 13은 G9에 대한 BIACORE 분석을 도시한 것이다. 10G9.1의 회합속도 상수 (k_a)는 8.47×10^6 , 해리속도 상수 (k_d)는 9.27×10^{-5} , 총 친화도 (K_D)는 0.87 nM이었다.

도 14는 G9 에피토프를 매핑하기 위한 전략을 예시한다. G9 에피토프 결합 위치를 매핑하기 위해 사용된 겹치는 펩티드는 서열 35-38, 및 64-85의 아미노산 서열에 대응한다.

도 15는 서열 35-38, 및 65-86의 아미노산 서열에 대응하는 인간 GM-CSF 단백질 서열을 포함하는 겹치는 펩티드를 사용하는 웨스턴 블롯 분석을 사용하는 G9 에피토프 매핑 분석을 도시한 것이다. 항체 양성 펩티드는 서열

35-38을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명의 방법 및 다른 측면에 관련하여 다양한 용어가 명세서와 청구의 범위 전체에서 사용된다. 상기 용어는 달리 나타내지 않으면 당업계에서 사용되는 그들의 통상적인 의미를 갖는 것이다. 다른 구체적으로 정의된 용어는 본원에 제시된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.
- [0027] 본 발명이 물론 변할 수 있는 특정 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시태양을 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본원 명세서 및 첨부되는 청구의 범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 (부정관사) 및 "그" (정관사)는 문맥에서 분명하게 다르게 언급되지 않으면 복수 형태를 포함한다. 따라서, 예를 들어 "세포"에 대한 언급은 2 이상의 세포의 조합을 포함한다.
- [0028] 본원에서 언급된 각각의 범위는 그 범위 내의 구체적인 숫자뿐만 아니라 범위의 모든 조합 및 하위 조합을 포함한다.
- [0029] 양, 기간 등과 같은 측정가능한 값을 언급할 때 본원에서 사용될 때 용어 "약"은 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 훨씬 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 편차를 포함하는 의미이고, 상기 편차는 개시된 방법의 수행에 적합한 것이다.
- [0030] "감염성 질병"은 병원체, 바이러스, 세균, 진균 또는 기생충의 감염을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바이러스의 예는 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS; SARS-연관 코로나바이러스에 의해 유발됨), B형 또는 C형 간염, 인플루엔자, 수두, 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 타입 I 또는 타입 II, 우역, 리노바이러스, 에코바이러스, 로타바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스, 유두종 바이러스, 파포바 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 에키노바이러스, 아르보바이러스, 한타바이러스, 콕사키 바이러스, 볼거리 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 폴리오 바이러스, 및 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 타입 I 또는 타입 II를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 세균의 예는 에볼라 (Ebola), 스태필로코커스 (Staphylococcus) A-E, 플라스모듐 (Plasmodium) (말라리아), 엠. 투베르쿨로시스 (M. tuberculosis), 미코박테리움 (mycobacterium), 미코플라스마 (mycoplasma), 나이세리아 (neisseria) 및 레지오넬라를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기생충의 예는 리케차 및 클라미디아를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0031] "염증성 질병"은 급성 및 만성 면역 및 자가면역 질병, 예를 들어 류마티스 관절염, 자가면역 질병, 염증성 신장 질병 및 염증성 폐 질환, 예를 들어 천식 및 만성 폐쇄 폐 질환 (COPD), 다발경화증 및 자가면역 뇌척수염을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0032] "자가면역 질병"은 개체의 자기 자신의 조직 또는 동시 분리계 (co-segregate)로부터 발생하고 자기 조직 또는 동시 분리계에 대해 유도되는 질병 또는 질환 또는 그의 증상 또는 그로부터 발생하는 병태이다. 자가면역 질병의 예는 관절염 (류마티스 관절염, 예를 들어 급성 관절염, 만성 류마티스 관절염, 통풍 또는 통풍성 관절염, 급성 통풍성 관절염, 급성 면역학적 관절염, 만성 염증성 관절염, 퇴행성 관절염, 타입 II 콜라겐-유발 관절염, 감염성 관절염, 라임 (Lyme) 관절염, 증식성 관절염, 건선 관절염, 스틸 (Still) 질병, 척추 관절염, 및 소아-발병 류마티스 관절염, 골관절염, 만성 진행성 관절염, 변형성 관절염, 만성 원발성 다발성 관절염, 반응성 관절염, 및 강직성 척추염), 염증성 과다증식성 피부 질병, 건선, 예를 들어 판상 건선, 적상 건선, 농포성 건선, 및 손발톱의 건선, 아토피 질병을 포함하는 아토피, 예를 들어 건초열 및 욱 (Job) 증후군, 피부염, 예를 들어 접촉 피부염, 만성 접촉 피부염, 탈락 피부염, 알레르기 피부염, 알레르기 접촉 피부염, 포진 피부염, 화폐상 (nummular) 피부염, 지루 피부염, 비-특이적 피부염, 원발 자극 접촉 피부염, 및 아토피 피부염, X염색체 연관 고 IgM 증후군, 알레르기성 안내 염증성 질병, 두드러기, 예를 들어 만성 알레르기 두드러기 및 만성 특발성 두드러기, 예를 들어 만성 자가면역 두드러기, 근육염, 다발성 근육염/피부근육염, 소아 피부근육염, 독성 표피 괴사 용해, 공피증 (전신 공피증 포함), 경화증, 예를 들어 전신 경화증, 다발경화증 (MS), 예를 들어 척수-눈 MS, 원발성 진행성 MS (PPMS), 및 재발 완화성 MS (RRMS), 진행성 전신 경화증, 즉상동맥경화증, 동맥경화증, 범발성 경화증, 실조성 경화증, 시각 신경척수염 (NMO), 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론 (Crohn) 병, 자가면역-매개 위장관 질환, 대장염, 예를 들어 궤양 대장염, 궤양성 대장염, 현미경적 대장염, 괴원질성 대장염, 용종 대장염, 괴사소장대장염, 및 경벽성 대장염, 및 자가면역 염증성 장 질환), 장염, 괴저농피증, 결절홍반, 원발성 경화증개관염, 호흡 곤란 증후군, 예를 들어 성인 또는 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 수막염, 포도막의 전부 또는 일부의 염증, 홍채염, 맥락막염, 자가면역 혈액학적 질환, 류마티스양 척추염, 류마티스양 윤

활막염, 유전성 혈관부종, 수막염에서와 같은 뇌신경 손상, 임신성 포진, 임신성 유전포창, 음낭 소양증, 자가면역 조기 난소 부전증, 자가면역 병태에 의한 급성 난청, IgE-매개 질환, 예를 들어 아나필락시스 및 알레르기 및 아토피 비염, 뇌염, 예를 들어 라스무센 (Rasmussen) 뇌염 및 변연 및/또는 뇌간 뇌염, 포도막염, 예를 들어 앞포도막염, 급성 앞포도막염, 육아종성 포도막염, 비육아종성 포도막염, 수정체항원성 (phacoantigenic) 포도막염, 뒤포도막염, 또는 자가면역 포도막염, 신 증후군이 있거나 없는 사구체신염 (GN), 예를 들어 만성 또는 급성 사구체신염, 예를 들어 원발성 GN, 면역 매개 GN, 막 GN (막 신병증), 특발성 막 GN 또는 특발성 막 신병증, 막- 또는 막 증식성 GN (MPGN), 예를 들어 타입 I 및 타입 II, 및 급속 진행성 GN, 증식성 신장염, 자가면역 다선성 내분비 기능부전, 귀두염, 예를 들어 국한성 형질 세포 귀두염, 귀두포피염, 중심 원심성 윤상 홍반, 지속성 피부이색성 홍반, 다형 홍반, 환상 육아종, 광택 태선, 경화위축성 태선, 만성 단순 태선, 극상 태선, 편평 태선, 증판성 비늘증, 표피박리성 과각화증, 전암성 각화증, 괴저농피증, 알레르기 질환 및 반응, 알레르기 반응, 습진, 예를 들어 알레르기 또는 아토피 습진, 건성 습진, 발한 장애성 습진, 및 수포성 손발바닥 습진, 천식, 예를 들어 기관지성 천식, 기관지 천식, 및 자가면역 천식, T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응, 외래 항원, 예를 들어 임신 동안 태아 A-B-O 혈액형에 대한 면역 반응을 수반하는 질환, 만성 폐 염증성 질환, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍, 루푸스, 예를 들어 신장염 루푸스, 뇌염 루푸스, 소아 루푸스, 비-신장 루푸스, 신장의 루푸스, 원관양 루푸스 및 원관양 홍반성 루푸스, 탈모 루푸스, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 예를 들어 피부 SLE, 아급성 피부 SLE, 신생아 루푸스 증후군 (NLE), 및 파종성 홍반성 루푸스, 소아 발병 (타입 I) 당뇨병, 예를 들어 소아 인슐린-의존형 당뇨병 (IDDM), 성인 발병 당뇨병 (타입 II 당뇨병), 자가면역 당뇨병, 특발성 요붕증, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 신장병증, 당뇨병 대형 동맥 질환, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 사코이드증, 육아종증, 예를 들어 림프종모양 육아종증, 베게너 (Wegener) 육아종증, 무과립구증, 혈관염, 예를 들어 맥관염, 대혈관 맥관염 (예를 들어 류마티스성 다발성 근육통 및 거대세포 (Takayasu) 동맥염 포함), 중형 혈관 맥관염 (예를 들어 가와사키 (Kawasaki) 병 및 다발성 결절 동맥염/결절동맥주위염 포함), 현미경적 다발성 동맥염, 면역 혈관염, CNS 혈관염, 피부 혈관염, 과민성 맥관염, 괴사 혈관염, 예를 들어 전신성 괴사 맥관염, 및 ANCA-관련 맥관염, 예를 들어 처크-스트라우스 (Churg-Strauss) 혈관염 또는 증후군 (CSS)), 및 ANCA-연관 소혈관 혈관염, 일시적 동맥염, 재생불량 빈혈, 자가면역 재생불량 빈혈, 콕스 (Coombs) 양성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 (Diamond Blackfan) 빈혈, 용혈 빈혈 또는 면역 용혈 빈혈, 예를 들어 자가면역 용혈 빈혈 (AIHA), 악성 빈혈, 애디슨 (Addison)병, 진정 적혈구계 빈혈 또는 무형성 (PRCA), 팩터 VIII 결핍증, A형 혈우병, 자가면역 호중구 감소증, 범혈구감소증, 백혈구 감소증, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질병, CNS 염증성 질환, 다발성 장기 손상 증후군, 예를 들어 패혈증, 외상 또는 출혈에 2차적인 질환, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기 신경염, 베체트 (Bechet) 질병/증후군, 캐슬만 (Castleman) 증후군, 굿파스처 (Goodpasture) 증후군, 레이노 (Reynaud) 증후군, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 스티븐스-존슨 (Stevens-Johnson) 증후군, 천포창, 예를 들어 낙엽상 천포창 및 피부 유전포창, 천포창 (심상성 천포창, 낙엽상 천포창, 점막 유전포창 및 홍반 천포창 포함), 자가면역 다발성 내분비 장애, 라이터 (Reiter) 병 또는 증후군, 열 손상, 자간전증, 면역 복합체 질환, 예를 들어 면역 복합체 신장염, 항체-매개 신장염, 다발 신경병증, 만성 신경병증, 예를 들어 IgM 다발 신경병증 또는 IgM-매개 신경병증, 저혈소판증 (예를 들어 심근경색 환자에 의해 발생), 예를 들어 혈전성 혈소판 감소성 자반병 (TTP), 수혈후 자반병 (PTP), 헤파린-유발 저혈소판증, 및 자가면역 또는 면역-매개 저혈소판증, 예를 들어 특발성 혈소판 감소 자반병 (ITP), 예를 들어 만성 또는 급성 ITP, 공막염, 예를 들어 특발성 하공막염, 상공막염, 정소 및 난소의 자가면역 질병, 예를 들어 자가면역 고환염 및 난소염, 원발성 갑상선 기능 저하증, 부갑상선 기능 저하증, 자가면역 내분비 질환, 예를 들어 갑상선염, 예를 들어 자가면역 갑상선염, 하시모토 (Hashimoto) 병, 만성 갑상선염 (하시모토 갑상선염), 또는 아급성 갑상선염, 자가면역 갑상선 질환, 특발성 갑상선 기능 저하증, 그레이브 (Grave) 병, 다분비선 증후군, 예를 들어 자가면역 다분비선 증후군 (또는 다분비선 내분비병증 증후군), 부신생물 증후군, 예를 들어 신경학적 부신생물 증후군, 예를 들어 램버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력증 증후군 또는 이튼-램버트 증후군, 근강직 증후군, 뇌척수염, 예를 들어 알레르기 뇌척수염 및 실험적 알레르기성 뇌척수염 (EAE), 중증 근육 무력증, 예를 들어 흥선종-관련 중증 근육 무력증, 소뇌변성, 신경근강직증, 안진전 또는 안진전 근경련 증후군 (OMS), 및 감각 신경병증, 다소성 운동 신경병증, 쉬한 (Sheehan) 증후군, 자가면역 간염, 만성 간염, 루푸스양 간염, 거대세포 간염, 만성 활성 간염 또는 자가면역 만성 활성 간염, 림프양 간질 폐렴 (LIP), 폐쇄세기관지염 (비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 버거 (Berger) 병 (IgA 신병증), 특발성 IgA 신병증, 선상 IgA 피부병, 급성 발열성 중성구성 피부병, 각질층하 농포 피부병, 일과성 극세포해리 피부병, 경화증, 예를 들어 원발성 담관 경화증, 폐경화, 자가면역 장병증 증후군, 복강 질환, 비열대 스프루 (글루텐 장병증), 불응성 스프루, 특발성 스프루, 한랭글로불린혈증, 근위축 측삭 경화증 (ALS; 루게릭 (Lou Gehrig) 병), 관상동맥 질환, 자가면역 귀 질환, 예를 들어 자가면역 내

이 질환 (AIED), 자가면역 난청, 다발연골염, 예를 들어 불응성 또는 재발된 또는 재발성 다발연골염, 폐포단백증, 코간 (Cogan) 증후군/비매독성 실질 각막염, 벨 (Bell) 마비, 스위트 (Sweet) 질병/증후군, 장미증 자가면역, 대상포진 (zoster)-연관 통증, 아밀로이드증, 비-암성 림프구 증가증, 모노클로날 B 세포 림프구 증가증 (예를 들어, 양성 모노클로날 감마글로불린병증 및 유의성 비결정 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS))을 포함하는 원발성 림프구 증가증, 말초 신경병증, 부신생물 증후군, 채널병증, 예를 들어 간질, 편두통, 부정맥, 근육 질환, 난청, 실명, 주기적 마비, 및 CNS의 채널병증, 자폐증, 염증성 근염, 국소 분절 사구체 경화증 (FSGS), 내분비 눈병증, 포도막막염, 맥락막막염, 자가면역 간질환, 섬유근육통, 다발성 내분비 부전, 슈미트 (Schmidt) 증후군, 부신염, 위 위축, 초로 치매, 탈수초성 질환, 예를 들어 자가면역 탈수초성 질환 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 드레슬러 (Dressler) 증후군, 원형탈모증, 범발성 탈모증, CREST 증후군 (석회증, 레이노드 (Raynaud) 현상, 식도 운동이상, 손발가락경화증, 및 모세혈관확장증), 예를 들어 항-정자 항체에 의한 남성 및 여성 자가면역 불임, 혼합결합조직병, 샤가스 (Chagas) 병, 류마티스열, 습관성 유산, 농부폐, 다형 홍반, 심장절개술후 증후군, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 새 사육가 폐, 알레르기 육아종 혈관염, 양성 림프구 혈관염, 알포트 (Alport) 증후군, 폐포염, 예를 들어 알레르기 폐포염 및 섬유화 폐포염, 간질 폐 질환, 수혈 반응, 나병, 말라리아, 기생충 질병, 예를 들어 리슈만편모충증, 파동편모충증, 주혈흡충증, 회충증, 아스페르길루스증, 샘터 (Sampter) 증후군, 카플란 (Caplan) 증후군, 뎅기, 심내막염, 심내막 심근섬유증, 미만성 간질성 폐섬유증, 간질 폐 섬유증, 폐섬유증, 특발성 폐섬유증, 낭성 섬유증, 안구내염, 장기 용기성 홍반, 태아적모구증, 호산구성 근막염, 술만 (Shulman) 증후군, 펠티 (Felty) 증후군, 사상충증, 섬모체염, 예를 들어 만성 섬모체염, 이시성 섬모체염, 홍채섬모체염 (급성 또는 만성), 또는 푸크 (Fuch) 섬모체염, 헤노흐-셴라인 (Henoch-Schonlein) 자색반, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염, SCID, 후천적 면역 결핍 증후군 (AIDS), 에코바이러스 감염, 패혈증, 내독소혈증, 체장염, 갑상선 중독증, 파보바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 백신 처리후 증후군, 선천 풍진 감염, 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스 감염, 볼거리, 에반 (Evan) 증후군, 자가면역 생식선 부전, 시덴함 (Sydenham) 무도병, 연쇄상구균 감염후 신장염, 폐쇄성 혈전혈관염 (thromboangitis obliterans), 갑상선 기능 항진증, 척수매독, 맥락막염, 거대세포 다발근육통증, 만성 과민성 폐렴, 건조 각막결막염, 유행성 각막결막염, 특발성 신장염 증후군, 미소 병변 신병증, 양성 가족성 및 허혈-재관류 손상, 이식 장기 재관류, 망막 자가면역, 관절 염증, 기관지염, 만성 폐쇄 기도/폐 질환, 규폐증, 아프타, 아프타 구내염, 동맥경화성 질환, 아스페르미오게네스 (aspermio-genese), 자가면역 용혈, 보크 (Boeck) 질병, 한랭글로불린혈증, 뒤푸트렌 경축 (Dupuytren's contracture), 수정체 과민 안내염, 알레르기성 장염, 나병결절홍반, 특발성 안면마비, 만성 피로 증후군, 류마티스성 열, 해먼-리치 (Hamman-Rich) 병, 감각신경성 난청, 발작성 혈색소뇨증, 성선 기능저하증, 국한성 회장염, 백혈구 감소증, 전염 단핵구증, 횡단척수염, 원발성 특발성 점액부종, 신장증, 교감성 안염, 육아종성 고환염, 체장염, 급성 다발 신경근염, 괴저농피증, 퀴베인 (Quervain) 갑상선염, 후천성 비장 위축, 비-악성 흉선종, 백반증, 독성 쇼크 증후군, 식중독, T 세포 침윤, 백혈구-부착 결핍, 시토킨 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련된 면역 반응을 수반하는 병태, 백혈구 혈구 누출을 수반하는 질병, 다발성 장기 손상 증후군, 항원-항체 복합체 매개 질환, 항사구체 기저막 질환, 알레르기 신경염, 자가면역 다발성 내분비 장애, 난소염, 원발성 점액부종, 자가면역 위축 위염, 교감성 안염, 류마티스병, 혼합결합조직 질환, 신 증후군, 체도염, 다발성 내분비 부전, 자가면역 다분비선 증후군 타입 I, 성인 발병 특발성 부갑상선 기능 저하증 (AOIH), 심근병증, 예를 들어 확장 심근병증, 후천적 수포성 표피박리증 (EBA), 혈색소침착증, 심근염, 신 증후군, 원발성 경화성관염, 화농성 또는 비화농성 부비동염, 급성 또는 만성 부비동염, 사골동염, 전두동염, 상악동염, 또는 접형 동염, 호산구-관련 질환, 예를 들어 호산구 증가증, 폐 침윤 호산구 증가증, 호산구 증가증-근육통 증후군, 로플러 (Loffler) 증후군, 만성 호산구성 폐렴, 열대성 폐 호산구 증가증, 기관지폐렴성 아스페르길루스증, 아스페르길루스증, 또는 호산구를 포함하는 육아종, 아나필락시스, 음성혈청 척추관절염, 다발성 내분비 자가면역 질환, 경화성관염, 공막, 상공막, 만성 점막 피부 칸디다증, 브루톤 (Bruton) 증후군, 유아의 일과성 감마글로불린저혈증, 위스코트-올드리히 (Wiskott-Aldrich) 증후군, 운동실조 모세혈관확장증, 교원병과 연관된 자가면역 질환, 류마티스, 신경학적 질환, 림프절염, 혈압 반응의 감소, 혈관 기능이상, 조직 손상, 심혈관 허혈, 통각과민, 신허혈, 뇌 허혈, 및 혈관 형성을 수반하는 질병, 알레르기 과민성 질환, 사구체신염, 재관류 손상, 허혈 재관류 질환, 심근 또는 다른 조직의 재관류 손상, 림프종성 기관기관지염, 염증성 피부병, 급성 염증성 성분을 갖는 피부병, 다발성 장기 부전, 수포성 질환, 심피질 괴사, 급성 화농성 수막염 또는 다른 중추신경계 염증성 질환, 안 및 안와 염증성 질환, 과립구 수혈-연관 증후군, 시토킨 유발 독성, 기면증, 급성 중증 염증, 만성 난치성 염증, 신우염, 말단동맥 과다증식 (endarterial hyperplasia), 소화 궤양, 판막염 및 자궁내막증을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0033]

"보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 및 핵산 서열 모두에 적용된다. 특정 핵산 서열에 대해서, 보존적으로

변형된 변이체는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, 또는 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우에는 본질적으로 동일한 서열을 의미한다. 유전자 코드의 다의성 (degeneracy) 때문에, 다수의 기능상 동일한 핵산이 임의의 주어진 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서 코돈은 코딩되는 폴리펩티드를 변경시키지 않으면서 상기 제시된 임의의 대응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 상기 핵산 변이는 보존적으로 변형된 변이의 한 종류인 "침묵 (silent) 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 본원의 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 포함한다. 당업자는 핵산 내의 각각의 코돈 (통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG 제외)을 변형시켜 기능상 동일한 분자를 생성시킬 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 발현 산물에 대해서는 각각의 제시된 서열에 내재하지만, 실제 프로브 서열에 대해서는 그렇지 않다.

[0034] 예를 들어 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터에 대해 사용될 때 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변경되었거나 또는 세포가 상기과 같이 변형된 세포로부터 유도됨을 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 천연 (비-재조합) 형태의 세포 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되거나 과소발현되거나 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.

[0035] 구문 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드 서열"은 5' 말단으로부터 3' 말단의 관독되는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일 가닥 또는 이중 가닥 중합체를 의미한다. 또한, 핵산은, 폴리머라제에 의한 정확한 판독을 가능하게 하고 예를 들어 보존적으로 변형된 변이체를 포함하여 핵산에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 발현을 변경시키지 않는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0036] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하기 위해 본원에서 상호 교환가능하게 사용된다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체 및 비-자연 발생 아미노산 중합체뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 대응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체 (mimetic)인 아미노산 중합체에 적용된다. 본 발명의 폴리펩티드는 보존적으로 변형된 변이체를 포함한다. 당업자는 코딩되는 서열에서 단일 아미노산 또는 작은 비율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질 서열에 대한 치환, 결실 또는 부가가, 변경에 의해 아미노산이 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환된 "보존적으로 변형된 변이체"를 생성시킴을 인식할 것이다. 기능상 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 일람표는 당업계에 잘 공지되어 있다. 상기 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 중간 상동체, 및 대립유전자에 추가되는 것으로, 이들을 배제하지 않는다. 다음 8개의 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환된 아미노산을 포함한다: 1) 알라닌 (A), 글라이신 (G); 2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q); 4) 아르가닌 (R), 라이신 (K); 5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V); 6) 페닐알라닌 (F), 타이로신 (Y), 트립토판 (W); 7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및 8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M) (33). 또한, 용어 "보존적 치환"은 폴리펩티드가 또한 필수적인 결합 활성을 제공할 경우에, 비치환된 모 아미노산 대신에 치환 아미노산의 사용을 포함한다.

[0037] "아미노산"은 자연 발생 및 합성 아미노산, 및 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 의미한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드에 의해 코딩되는 아미노산, 및 추후 변형되는 아미노산, 예를 들어 히드록시프롤린, γ -카복시글루탐에이트, 및 0-포스포세린이다. "아미노산 유사체"는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학적 구조, 즉, 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기에 결합된 α 탄소를 갖는 화합물, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 메틸 술포늄을 의미한다. 상기 유사체는 변형된 R기 (예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 백본을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본적인 화학적 구조를 유지한다. "아미노산 모방체"는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 의미한다.

[0038] 아미노산은 그의 통상적으로 알려진 3 문자 기호 또는 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission에 의해 권장되는 1 문자 기호에 의해 언급될 수 있다 (하기 표 1 참조). 마찬가지로, 뉴클레오티드는 그의 통상적으로 허용되는 1 문자 코드에 의해 언급될 수 있다.

표 1

[0039] 기호

1 문자	3 문자	아미노산
Y	Tyr	L-타이로신
G	Gly	L-글라이신
F	Phe	L-페닐알라닌
M	Met	L-메티오닌
A	Ala	L-알라닌
S	Ser	L-세린
I	Ile	L-이소류신
L	Leu	L-류신
T	Thr	L-트레오닌
V	Val	L-발린
P	Pro	L-프롤린
K	Lys	L-라이신
H	His	L-히스티딘
Q	Gln	L-글루타민
E	Glu	L-글루탐산
W	Trp	L-트립토판
R	Arg	L-아르기닌
D	Asp	L-아스파르트산
N	Asn	L-아스파라긴
C	Cys	L-시스테인

[0040] 본원에서 모든 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽으로의 배향이 아미노-말단에서 카르복시-말단의 통상적인 방향인 화학식으로 제시됨을 유의해야 한다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시험관 내에서" 또는 "생체 외에서"는 인공 환경, 및 인공 환경, 예를 들어 시험관 및 세포 배양액 (이로 제한되지 않음) 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 지칭하는 것이다. 용어 "생체 내에서"는 천연 환경 (예를 들어, 동물 또는 세포), 및 천연 환경 내에서 발생하는 과정 또는 반응을 지칭하는 것이다.

[0042] "제약상 허용되는", "생리학상 허용되는" 및 그의 문법적 변형 표현은 조성물, 담체, 희석제 및 시약을 언급할 때 상호 교환가능하게 사용되고, 물질이 조성물의 투여를 금지시킬 정도의 바람직하지 않은 생리학적 효과를 생성시키지 않으면서 인간에 대해 투여될 수 있음을 나타낸다.

[0043] 용어 "제약상 허용되는 담체"는 합리적인 이익/위험 비율에 적합하게 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 합병증을 발생시키지 않으면서 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기 적합한, 올바른 의학적 판단 범위 내의 시약, 부형제, 세포, 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여형을 의미한다. 본원에 보다 상세히 설명된 바와 같이, 본 발명에 사용하기에 적합한 제약상 허용되는 담체는 기체, 액체, 및 반고체 및 고체 물질을 포함한다.

[0044] 언급된 경우를 제외하고, "대상" 또는 "환자"는 상호 교환가능하게 사용되고, 포유동물, 예를 들어 인간 환자 및 비-인간 영장류, 및 실험 동물, 예를 들어 토끼, 개, 고양이, 래트, 마우스, 및 다른 동물을 의미한다. 따라서, 본원에서 사용될 때 "대상" 또는 "환자"는 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상을 의미한다. 본 발명의 일부 실시태양에서, 환자는 감염성 또는 염증성 질병, 또는 자가면역 질병으로 고통받을 것이다. 본 발명의 일부 실시태양에서, 환자는 암으로 진단되었을 것이다. 본 발명의 예시적인 실시태양에서, 본 발명에 따른 치료를 위한 후보 환자를 확인하기 위해서, 허용되는 스크리닝 방법을 사용하여 대상의 기존의 질병 또는 병태의 상태 또는 표적화되거나 의심되는 질병 또는 병태와 연관된 위험 인자를 결정한다. 상기 스크리닝 방법은 예를 들어 대상이 감염성 질병, 염증성 질병, 암, 또는 자가면역 질병에 걸렸는지 여부를 결정하기 위해 조사하는 것을 포함한다. 상기 및 다른 통상적인 방법을 사용하여 임상적인 치료를 요하는 대상을 선택할 수 있다.

[0045] "치료"는 임의의 객관적인 또는 주관적인 파라미터, 예를 들어 감퇴; 완화; 증상의 감소 또는 질병 상태를 환자에게 보다 허용성이 되도록 만들기; 퇴행 또는 감퇴 속도의 지연; 또는 최종 퇴행 지점에서 덜 쇠약하게 만들기 를 포함하여, 예를 들어 감염성 질병, 염증성 질병, 예를 들어 GM-CSF-매개 염증성 질병, 암, 또는 자가면역 질

병의 성공적인 치료 또는 개선에 대한 임의의 표시를 의미한다. 증상의 치료 또는 개선은 검사의 결과를 포함하여 객관적인 또는 주관적인 파라미터를 기초로 하여 실시될 수 있다. 따라서, 용어 "치료"는 암, 감염성 질병, 염증성 질병, 예를 들어 GM-CSF-매개 염증성 질병, 또는 자가면역 질병과 연관된 증상 또는 상태의 발생을 지연, 개선, 또는 정지 또는 억제하기 위해 본 발명의 화합물 또는 물질을 투여하는 것을 포함한다. 치료는 예를 들어 이형성 세포의 성장 억제, 암 또는 신생물성 질병의 진행 억제, 억제된 종양 성장의 유지, 및 완화 유도를 포함한다.

[0046] 본원에서 사용될 때 "치료 화합물"은 질병 또는 병태, 예를 들어 암, 감염성 질병, 염증성 질병, 또는 자가면역 질병의 예방 또는 치료에 유용한 화합물을 의미한다.

[0047] "치료 효과"는 대상에서 질병, 질병의 증상, 또는 질병의 부작용의 감소, 제거 또는 예방을 의미한다. "유효량"은 목적하는 효과를 생성시키기 위해 필요한 양을 의미한다. "치료 유효량"은 질병, 병태 또는 질환을 치료하기 위해 대상에게 투여될 때 질병 치료에 충분한 양을 의미한다.

[0048] 본원에서 사용될 때 "동시적인 투여", "병행 투여", 또는 "동시투여"는 활성제들 (예를 들어, MAbs, 화학치료제, 생체분자)을 함께 서로 또는 조합하여, 또는 어느 하나의 전 또는 후에 투여하는 것을 포함한다. 모든 활성제가 작용 부위에서 효과적인 농도를 달성하기에 충분한 방식으로 제공되는 한, 다수의 활성제(들)을 동일한 또는 상이한 경로에 의해, 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 당업자는 본 발명의 특정 약물 및 조성물의 투여를 위한 적절한 타이밍, 순서, 및 투여량을 어렵지 않게 결정할 수 있을 것이다.

[0049] "공여 세포"는 하이브리도마를 생성시키기 위해 인간 B-세포에 융합된 세포를 의미하기 위해 널리 사용된다. 세포는 당업자에 의해 이해되는 설치류 골수종; 설치류 세포주; 인간 세포주; 조류 세포주를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 세포주는 당업자에게 알려진 임의의 수단에 의해 유도될 수 있다.

[0050] "면역글로불린" 또는 "항체"는 항체 분자 및 다양한 항체-유래 분자를 의미하기 위해 널리 사용되고, 보다 고등한 포유동물에서 발생하는, 면역계의 주성분인 당단백질 집단의 임의의 멤버를 포함한다. 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체, 다중에피토프 (polyepitopic) 특이성을 갖는 항체 조성물, 이중특이적 항체, 디아바디 (diabody), 및 단일쇄 분자, 및 목적하는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv)를 포함한다. 면역글로불린 분자는 각각 경쇄 및 중쇄의 말단-중결 부분, 및 다양한 기능, 예를 들어 보체 결합 (complement fixation)에 필요한 Fc 구역을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 면역글로불린의 5개의 클래스가 존재하고, 여기서 Fc 구역에서 중쇄의 1차 구조가 면역글로불린 클래스를 결정한다. 구체적으로, 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤 사슬이 각각 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM에 대응한다. 본원에서 사용되는 "면역글로불린" 또는 "항체"는 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤의 모든 서브클래스를 포함하고, 또한 4-사슬 면역글로불린 구조의 임의의 천연 (예를 들어, IgA 및 IgM) 또는 합성 다량체를 의미한다. 항체는 비공유결합에 의해, 특이적으로 및 가역적으로 항원에 결합한다.

[0051] 본원에서 사용될 때 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질 항체의 집단으로부터 얻은 항체를 의미한다. 즉, 집단을 이루는 개별 항체들은 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 항체-생산 세포의 단일 클론에 의해 생산될 수 있다. 폴리클로날 항체와는 달리, 모노클로날 항체는 단일특이적이다 (예를 들어, 단일 항원의 단일 에피토프에 특이적이다). 수식어 "모노클로날"은 실질적으로 균질한 항체 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정 방법에 의해 항체를 생산할 것을 필요로 하는 것으로 생각되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256: 495, 1975]에 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991]에 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이 "키메라 (chimerized)"는 중쇄 및 경쇄 가변 구역이 인간 기원의 것이 아니고 중쇄 및 경쇄의 불변 구역이 인간 기원의 것인 면역글로불린을 의미한다.

[0053] "인간화"는 항원 결합에 직접적으로 관여하는 아미노산인 중쇄 및 경쇄의 상보성 결정 구역 (CDR)이 인간 기원의 것이 아니고, 면역글로불린 분자의 나머지, 즉 가변 중쇄 및 경쇄의 프레임워크 구역 및 중쇄 및 경쇄의 불변 구역이 인간 기원의 것인 항체와 같은 면역글로불린을 의미한다.

[0054] "완전 인간"은 전체 분자가 인간 기원의 것이거나 또는 항체의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 구성된 항체와 같은 면역글로불린을 의미한다.

[0055] "에피토프"는 항체-결합 부위로서 기능하는 항원의 면역학적 결정자를 의미한다. 본원에서 사용되는 바와

같이, 용어 "입체형태적 에피토프"는 파괴되지 않은 일련의 아미노산 이외의 다른 항원의 아미노산들 사이의 공간적 관계에 의해 형성된 불연속적인 에피토프를 의미한다.

[0056] "하이브리도마"는 배양된 신생물성 림프구와 모 세포의 특이적 면역 효능을 보이는 감작된 B- 또는 T-림프구 사이의 세포 융합 산물을 의미한다.

[0057] "GM-CSF"는 과립구 및 단핵구-대식세포의 생산, 분화, 및 기능을 제어하는 당단백질 성장 인자의 패밀리를 나타낸다. 상기 분자의 예시적인 형태는 그 전부가 참고로 포함된 미국 특허 5,602,007 (34)에서 확인할 수 있다.

[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "생체분자"는 항체에 컨주게이팅되거나, 항체와 함께 동시에 투여되거나, 항체 투여 전 또는 후에 투여될 수 있거나, 또는 본 발명의 항체와 함께 다른 방식으로 사용될 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 생체분자는 효소, 단백질, 펩티드, 아미노산, 핵산, 지질, 탄수화물, 및 이들의 단편, 상동체, 유사체, 또는 유도체, 및 조합물을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 생체분자의 예는 인터류킨-2, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 리톡산, 제발린, 헤르셉틴, 에르비투스, 및 아바스틴을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 생체분자는 천연, 재조합 분자이거나, 또는 합성될 수 있고, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 미리스틸화 등을 사용하여 그의 천연 형태로부터 변형될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 용어 생체분자는 자연 발생 분자로 제한되지 않고, 생물학적으로 기원되지 않는 합성 분자를 포함한다.

[0059] 본 발명에 따른 폴리펩티드는 폴리펩티드 분야의 숙련인에게 공지된 기술에 의해 아미노산으로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 상기 방법은 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 적합하게 보호된 아미노산 잔기를 성장하는 펩티드 사슬에 순차적으로 첨가하는 것을 포함한다. 통상적으로, 제1 아미노산 잔기의 아미노 또는 카르복실기는 선택적으로 제거가능한 적합한 보호기로 보호된다. 선택적으로 제거가능한 상이한 보호기가 반응성 측쇄기를 포함하는 아미노산 (예를 들어, 라이신)을 위해 사용된다.

[0060] 본 발명의 폴리펩티드를 제조하는 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (WO 89/06657; WO 92/22315; WO 98/49191; 미국 특허 5,260,273; 5,164,369; 5,407,914; 5,789,381; 5,952,303; 6,013,619; 6,013,764; 6,120,795; 6,613,734).

[0061] 예를 들어, 그에 의해 폴리펩티드가 표지 또는 고체 매트릭스, 또는 캐리어에 편리하게 부착될 수 있는 "링커"를 제공하기 위해 추가의 잔기가 본 발명의 폴리펩티드의 양 말단에 추가될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있는 표지, 고체 매트릭스 및 캐리어는 당업계에 공지되어 있고; 일부 예를 또한 본원에 기재한다.

[0062] 아미노산 잔기 링커는 대체로 적어도 하나의 잔기이고, 40개 이상의 잔기, 보다 종종 1 내지 10개의 잔기일 수 있다. 연결에 사용되는 전형적인 아미노산 잔기는 타이로신, 시스테인, 라이신, 글루탐산 및 아스파르트산 등이다. 또한, 본 발명의 폴리펩티드 서열은 말단-NH₂ 아실화, 예를 들어, 아세틸화, 또는 티오글리콜산 아미드화, 말단-카르복실아미드화, 예를 들어, 암모니아, 메틸아민 등에 의해 변형된 서열에 의해 천연 서열과 상이할 수 있다.

[0063] 많은 유용한 폴리펩티드, 예를 들어, 서열 1-5가 본원에 개시되었지만, 혼하지는 않지만 자연 발생하는 아미노산, 천연 아미노산의 대사체 및 이화대사체, 치환 아미노산, 및 아미노산 유사체, 및 "D" 형상의 아미노산을 포함하여 매우 다양한 다른 분자가 본 발명의 분자 및 조성물에 유용하다는 것도 사실이다. 또한, "설계된 (designed)" 아미노산 유도체, 유사체 및 모방체도 본 발명의 각종 화합물, 조성물 및 방법, 및 비-아미드 연결로 이루어진 백본 구조를 포함하는 중합체에 유용하다.

[0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 및 아미노산 잔기의 "유사체" 및 "유도체"는 아미노산의 대사체 및 이화대사체, 및 "자연 발생" L형 아미노산으로 명명된 아미노산에서 통상적으로 발견되는 것과 상이한 연결, 백본, 측쇄 또는 측쇄기를 포함하는 분자를 포함하고자 한 것이다 (용어 "유사체" 및 "유도체"는 또한 편리하게 본원에서 상호 교환가능하게 사용될 수 있다). 따라서, D-아미노산, 아미노산을 모방하는 분자 및 "설계된" 측쇄 (즉, 계면활성제 활성을 갖는 분자에서 하나 이상의 아미노산을 치환할 수 있는)를 갖는 아미노산도 본원에서 용어 "유사체" 및 "유도체"에 포함된다.

[0065] 예를 들어, 표 1에 나열된 L-아미노산에 추가하여, 아미노산 대사체, 예를 들어 호모아르기닌, 시트룰린, 오르니틴, 및 α-아미노부탄산이 또한 본 발명의 분자 및 조성물에서 유용하다.

[0066] 다른 변형에서, 보다 "단단한 (rigid)" 입체형태를 채용하는 분자를 제조하기를 원할 수 있고; 이를 달성하는 한 수단은 아미노산의 α 탄소 원자에 메틸 또는 다른 기를 추가하는 것일 수 있다.

- [0067] 추가로, 일반적으로 단백질로부터 유래하지 않지만, 현재 알려져 있는 치환 아미노산이 본원에 개시된 바와 같이 유용하고, 예를 들어 L-카나바닌; 1-메틸-L-히스티딘; 3-메틸-L-히스티딘; 2-메틸 L-히스티딘; α , ϵ -디아미노피델산 (L형, 메소 (meso) 형, 또는 둘 모두); 사르코신; L-오르니틴 베타인; 히스티딘의 베타인 (헤르지닌); L-시트룰린; L-포스포아르기닌; D-옥토판; α -카르바밀-D-세린; γ -아미노부탄산; 및 β -라이신을 포함한다. D-알라닌, D-세린, D-발린, D-류신, D-이소류신, D-알로이소류신, D-페닐알라닌, D-글루탐산, D-프롤린, 및 D-알로히드록시프롤린 등을 포함하는 D-아미노산 및 D-아미노산 유사체도 본 발명의 단백질, 펩티드 및 조성물에 유용하다. 상기한 것은 또한 본 발명에 따라 GM-CSF 폴리펩티드에서 사용될 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명은 변형이 일어나는 시간 또는 위치에 상관 없이 유사체, 대사체, 이화대사체, 및 유도체를 포함하여 매우 다양한 변형 아미노산을 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 본질적으로, 변형 아미노산을 다음과 같은 3개의 카테고리로 나눌 수 있다: (1) 아미노산의 이화대사체 및 대사체; (2) 번역후 변형 (예를 들어, 측쇄의 변형)을 통해 생성된 변형 아미노산; 및 (3) 비-대사 또는 비-이화대사 과정을 통해 아미노산에 대해 실시된 변형 (예를 들어, 실험실에서 변형 아미노산 또는 유도체의 합성).
- [0069] 본 발명은 또한 선형, 분지쇄, 또는 탄화수소 또는 헤테로시클릭 고리 배열에서 메틸렌기를 부가하거나 제거하여 보다 길거나 단축된 측쇄를 포함하는 잔기 단위의 아미노산의 측쇄를 쉽게 설계할 수 있음도 고려한다. 선형 및 분지쇄 구조는 또한 비-탄소 원자, 예를 들어 S, O, 또는 N을 함유할 수 있다. 지방산이 또한 본원에서 계면활성제 분자의 유용한 구성분일 수 있다. 설계된 측쇄는 (R')로 종결되거나 또는 (R) 대전된 또는 극성 부속기 없이 종결될 수 있다.
- [0070] 상이한 링커를 사용하여 생성되는 분자를 포함하는 유사체도 본 발명의 펩티드에서 유용하다. 아미드 연결 이외의 다른 연결을 통해 함께 연결된 측쇄를 갖는 분자, 예를 들어, 아미노산 측쇄 또는 다른 측쇄 (R- 또는 R'-)를 포함하는 분자 (여기서, 성분은 예를 들어 카르복시- 또는 포스포-에스테르, 에틸렌, 메틸렌, 케톤 또는 에테르 연결을 통해 연결된다)가 본원에 개시된 바와 같이 유용하다. 본질적으로, 임의의 아미노산 측쇄, R 또는 R' 기-함유 분자가 본원에 개시된 바와 같이 유용할 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또한 적절한 링커에 의해 연결된 펩티드 이량체, 예를 들어, 시스테인 분자에 의해 연결된 펩티드 이량체를 포함하는 분자를 고려한다 (당업자가 알고 있는 바와 같이, 2개의 시스테인 분자는 그들의 티올기의 산화에 형성되는 디설파이드 가교에 의해 함께 연결될 수 있다). 따라서, 상기 링커 또는 가교는 상이한 폴리펩티드 사슬, 이량체, 삼량체 등과 가교결합할 수 있다. 펩티드 이량체 및/또는 다른 펩티드 다량체를 연결하기 위해 사용될 수 있는 다른 유용한 링커는 상기 나열된 것, 예를 들어, 카르복시- 또는 포스포-에스테르, 에틸렌, 메틸렌, 케톤 또는 에테르 연결 등을 포함한다.
- [0072] 당업자는 생성되는 분자가 본원에 설명된 바와 같은 생물학적 (예를 들어, 항원) 활성을 갖는 한 본 발명의 범위 내에 포함되는 분자를 생성시키는, 개별 아미노산, 연결, 및/또는 사슬 자체에 대한 다양한 변형을 만들 수 있음을 이해할 것이다.
- [0073] 본 발명의 바람직한 항원성 폴리펩티드는 GM-CSF (서열 1), 및 바람직하게는 성숙 GM-CSF (서열 2)의 항원성 펩티드이다. 일부 실시태양에서, 항원성 펩티드는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 항원성 펩티드는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 10개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 항원성 펩티드는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 15개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 면역원성 부분은 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 20개의 연속 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 면역원성 부분은 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 25개의 연속 아미노산을 포함한다. 본 발명의 특정한 바람직한 실시태양에서, GM-CSF 단백질의 항원성 펩티드는 성숙 GM-CSF (서열 2)의 아미노산 서열의 아미노산 14-28 (서열 3), 아미노산 9-23 (서열 4), 또는 아미노산 80-94 (서열 5)이다.
- [0074] 본 발명의 일부 실시태양에서, GM-CSF 또는 그의 항원성 펩티드는 항원의 면역원성을 향상시키기 위해서 면역원성 단백질에 컨쥬게이팅된다. 면역원성 단백질은 세포의 면역 반응을 향상시키는 임의의 단백질, 예를 들어 파상풍 독소이드 C (TT), 키폴 림팻 헤모시아닌 (KLH), 알부민, 난알부민, 병아리 알부민 (CAB), 소 혈청 알부민, 갑상선 글로불린, 디프테리아 독소이드, BCG, 콜레라 독소 등일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시태양에서, 항원은 성숙 단백질을 변형시켜 생성된다.
- [0075] 1차 인간 B-세포를 사용하여 인간 MAb를 분비하는 하이브리도마를 생성하는 이전에 보고된 방법 (W02004/046330)이 본원에서 사용되었다. 말초혈 단핵 세포, 바람직하게는 인간 PBMC를 표적 항원의 존재 하에

생체 외에서 면역화한 후, 공여 세포와의 세포 융합을 통해 불멸화시킨다. 별법으로, 선택된 PBMC에 대해, 그 혈청이 관심있는 항원에 대한 높은 면역 반응성을 갖는지를 확인한다.

[0076]

공여 세포로부터 유도된 하이브리드 세포를 표적 항원-특이적 MAb의 분비에 대해 스크리닝한다. 일부 실시태양에서, (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 생체 외에서 표적 항원과 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 공여 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체에 의한 항원의 결합을 결정하고; (d) 표적 항원에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선택하여 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생성하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 표적 항원에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생산하기 위한 방법이 제공된다. 한 바람직한 실시태양에서, PBMC는 건강한 공여자로부터의 것이다. 표적 항원은 바람직하게는 GM-CSF이고, 보다 바람직하게는 서열 35-38 중의 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0077]

별법으로, 표적 질병-연관 항원에 대한 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성하기 위한 방법은 (a) 질병에 걸린 환자 또는 항원-노출된 공여자로부터 유래된 면역글로불린-생산 B-세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 생체 외에서 공여 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (b) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체의 표적 항원에 대한 결합을 결정하고; (c) 표적 항원에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선택하여 표적 질병에 대한 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 생성하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 표적 항원은 질병-연관 항원이고, 바람직하게는 암, 감염성 질병, 또는 자가면역 질병과 연관된다. 보다 바람직하게는, 질병 연관 항원은 GM-CSF이다. 표적 항원은 바람직하게는 GM-CSF이고, 보다 바람직하게는 서열 35-38 중의 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 항원-노출된 공여자는 GM-CSF에 노출되었거나, 폐포 단백증 (PAP)에 걸렸을 수 있다.

[0078]

본 발명은 (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 표적 항원과 생체 외에서 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 공여 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포에 의해 생산된 면역글로불린의 표적 항원에 대한 결합을 스크리닝하여 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생산하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 표적 항원 (예를 들어, GM-CSF 또는 그의 항원성 펩티드)에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, PBMC는 건강한 공여자의 것이다. 일부 실시태양에서, 표적 항원은 본 발명의 항원성 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원은 바람직하게는 서열 1-5 중의 하나, 바람직하게는 서열 3-5 중의 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0079]

별법으로, 본 발명은 (a) 항원-노출된 공여자로부터 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 선택하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포에 의해 생산된 면역글로불린의 표적 항원에 대한 결합을 스크리닝하여 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생산하는 것을 포함하는, 표적 항원 (예를 들어, GM-CSF, 또는 그의 항원성 펩티드)에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 표적 항원은 본 발명의 항원성 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원은 바람직하게는 서열 1-5, 보다 바람직하게는 서열 3-5 중의 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 공여자는 GM-CSF 또는 그의 항원성 펩티드에 노출되었거나, 폐포 단백증 (PAP)에 걸렸을 수 있다.

[0080]

일부 실시태양에서, 공여 (예를 들어, 골수종) 세포는 미스매치 수복의 단백질 억제제를 발현한다. 일부 측면에서, 하이브리도마 세포는 미스매치 수복의 단백질 억제제를 발현한다. 본 발명의 방법의 일부 실시태양에서, 미스매치 수복의 단백질 억제제는 골수종과 면역글로불린-생산 세포의 융합 후에 하이브리도마 세포 내로 도입된다. 다른 실시태양에서, 미스매치 수복의 단백질 억제제는 면역글로불린-생산 세포와의 융합 전에 공여 또는 골수종 세포 내로 도입된다. 또 다른 실시태양에서, 공여 또는 골수종 세포 또는 항체 생산 세포는 미스매치 수복이 본래 결여되어 있다.

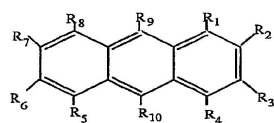
[0081]

미스매치 수복의 단백질 억제제는 미스매치 수복 유전자의 우성 음성 대립유전자를 포함한다. 미스매치 수복 유전자의 우성 음성 대립유전자는 PMS2, PMS1, PMSR3, PMSR2, PMSR6, MLH1, GTBP, MSH3, MSH2, MLH3, 또는 MSH1의 우성 음성 대립유전자, 및 mutL 및 mutS 유전자의 상동체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 또한, 미스매치 수복을 간접할 수 있는 폴리펩티드가 사용될 수 있다. 예를 들어, mutL PMS2의 우성 음성 대립유전자는 제1의 133개의 아미노산의 PMS2를 포함한다. mutL 상동체의 아미노산에 대한 추가의 설명은 아미노산 LSTAVKELVENS LDAGATNID LKLKDYGV DLI EVSDNGCGVEEENFE (서열 6) 및 LRQVL SNLLDNAIKYTP EGGEITVSLERDGDHLEITVEDNGPGIPEEDLE (서열 7) 또는 그의 단편을 보여준다. 따라서, 미스매

치 수복의 단백질 억제제는 서열 6 및 7의 폴리펩티드 및 그의 단편을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 미스매치 수복의 단백질 억제제는 불활성화된다. 예를 들어, 미스매치 수복의 단백질 억제제는 표적 항원에 대한 모노클로날 항체를 생성시키는 하이브리도마 세포의 확인 전 또는 후에 불활성화될 수 있다. 미스매치 수복의 단백질 억제제의 불활성화는 당업계에 공지된 임의의 수단, 예를 들어, 세포로부터 인두서의 제거 또는 미스매치 수복의 단백질 억제제의 제거 (즉, 세포에서 미스매치 수복의 단백질 억제제의 제거)에 의해 수행될 수 있다. 미스매치 수복의 억제제의 불활성화는 과다돌연변이된 (hypermutated) 하이브리도마의 계통을 안정화시킨다.

[0082]

본 발명의 하이브리도마 세포를 생성하는 방법의 일부 실시태양에서, 하이브리도마 세포는 미스매치 수복의 화학 억제제에 노출된다. 본 발명의 방법의 특정 실시태양에 사용되는 미스매치 수복의 화학 억제제는 적어도 하나의 안트라센, ATPase 억제제, 뉴클레아제 억제제, RNA 간섭 분자, 폴리머라제 억제제, 및 미스매치 수복 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드에 특이적으로 혼성화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (WO2004/046330)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바람직한 실시태양에서, 화학 억제제는 하기 화학식의 안트라센 화합물이다.



[0083]

[0084]

상기 식에서, R₁-R₁₀은 독립적으로 수소, 히드록실, 아미노, 알킬, 치환 알킬, 알케닐, 치환 알케닐, 알킬닐, 치환 알킬닐, 0-알킬, S-알킬, N-알킬, 0-알케닐, S-알케닐, N-알케닐, 0-알킬닐, S-알킬닐, N-알킬닐, 아릴, 치환 아릴, 아릴옥시, 치환 아릴옥시, 헤테로아릴, 치환 헤테로아릴, 아르알킬옥시, 아릴알킬, 알킬아릴, 알킬아릴옥시, 아릴술포닐, 알킬술포닐, 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 구아니디노, 카르복시, 알콜, 아미노산, 술포네이트, 알킬 술포네이트, CN, NO₂, 알데하이드기, 에스테르, 에테르, 크라운 에테르, 케톤, 유기황 화합물, 유기금속기, 카르복실산, 유기규소, 또는 임의로 하나 이상의 알킬화 히드록실기를 포함하는 탄수화물이고; 상기 헤테로알킬, 헤테로아릴, 및 치환 헤테로아릴은 산소, 황, 금속 원자, 인, 규소 또는 질소인 적어도 하나의 헤테로원자를 포함하고; 상기 치환 알킬, 치환 알케닐, 치환 알킬닐, 치환 아릴, 및 치환 헤테로아릴의 상기 치환체는 할로젠, CN, NO₂, 저급 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 아르알킬, 아르알콕시, 구아니디노, 알콕시카르보닐, 알콕시, 히드록시, 카르복시 및 아미노이고; 상기 아미노기는 아실기, 또는 1 내지 3개의 아릴 또는 저급 알킬기로 임의로 치환된다. 특정 실시태양에서, R₅ 및 R₆은 수소이다. 다른 실시태양에서, R₁-R₁₀은 독립적으로 수소, 히드록실, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 페닐, 톨릴, 히드록시메틸, 히드록시프로필, 또는 히드록시부틸이다. 안트라센의 비제한적인 예는 1,2-디메틸안트라센, 9,10-디메틸안트라센, 7,8-디메틸안트라센, 9,10-디페닐안트라센, 9,10-디히드록시메틸안트라센, 9-히드록시메틸-10-메틸안트라센, 디메틸안트라센-1,2-디올, 9-히드록시메틸-10-메틸안트라센-1,2-디올, 9-히드록시메틸-10-메틸안트라센-3,4-디올, 및 9,10-디-m-톨릴안트라센을 포함한다.

[0085]

화학 억제제는 세포의 성장 배지 내에 도입될 수 있다. 일부 실시태양에서, 화학 억제제는 세포의 계통을 재안정화시키기 위해서 과다돌연변이된 하이브리도마 세포로부터 회수될 수 있다. 별법으로, 방법은 미스매치 수복의 화학 억제제의 불활성화, 이에 의한 과다돌연변이된 하이브리도마의 계통의 안정화를 포함할 수 있다.

[0086]

일부 실시태양에서, 방법은 항체-생산 세포로부터 면역글로불린-생산 유전자를 클로닝하고, 면역글로불린 유전자를 포유동물 발현 세포 내로 형질감염시키는 것을 추가로 포함하고, 여기서 면역글로불린 유전자는 발현 제어 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0087]

본 발명은 또한 (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 표적 항원과 생체 외에서 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 공여 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체에 의한 항원의 결합을 결정하고; (d) 미스매치 수복의 억제에 의해 하이브리도마의 항체 생산을 최적화하거나; 또는 하이브리도마로부터 면역글로불린 유전자를 포유동물 발현 세포 내로 클로닝하고, 여기서 포유동물 발현 세포의 미스매치 수복이 억제되고; (e) 표적 항원에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선택하여 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 생성하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 표적 항원에 대해 고친화도 항체를 생산하는 포유동물 발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 단계 (a) 및 (b)에 대한 대안으로서, 질병에 걸린 환자 또는 항원-노출된 공여자로부터 유래된 면역글로불린-생산 B-세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 공여 세포와 생체 외에서 융합

시켜 하이브리도마 세포를 형성하는 것을 사용할 수 있다.

[0088] 본 발명은 또한 (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 표적 항원과 생체 외에서 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 상기 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체의 표적 항원에 대한 결합을 스크리닝하고; (d) 미스매치 수복의 억제에 의해 하이브리도마의 생산을 최적화하거나; 또는 하이브리도마로부터 면역글로불린 유전자를 포유동물 발현 세포 내로 클로닝하고, 여기서 포유동물 발현 세포의 미스매치 수복이 억제되고; (e) 하이브리도마 또는 재조합 세포로부터 생산된 항체에 비해 표적 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 항체를 분비하는 포유동물 발현 세포를 스크리닝하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 표적 항원에 대한 고친화도 항체를 생산하는 포유동물 발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0089] 본 발명은 또한 (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 표적 항원과 생체 외에서 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 공여 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체에 의한 항원의 결합을 결정하고; (d) 하이브리도마로부터 면역글로불린 유전자를 모 포유동물 발현 세포 내로 클로닝하고, 여기서 포유동물 발현 세포의 미스매치 수복이 억제되고; (e) 모 포유동물 세포 또는 하이브리도마 발현 세포를 인큐베이팅하여 돌연변이를 유발시켜, 과다돌연변이된 포유동물 발현 세포를 형성하고; (f) 모 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체에 비해 표적 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 항체를 분비하는 과다돌연변이 가능 포유동물 발현 세포를 선택하거나 또는 모 포유동물 발현 세포보다 더 고역가의 항체를 분비하는 과다돌연변이 가능 포유동물 발현 세포를 선택하여, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 포유동물 발현세포를 생산하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 고역가의 고-친화도 항체를 생산하는 포유동물 발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 단계 (a) 및 (b)에 대한 대안으로서, 질병에 걸린 환자 또는 항원-노출된 공여자로부터 유래된 면역글로불린-생산 B-세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 공여 세포와 생체 외에서 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하는 것을 사용할 수 있다.

[0090] 본 발명은 또한 (a) 면역글로불린-생산 세포를 포함하는 말초혈 단핵 세포를 표적 항원과 생체 외에서 조합하고; (b) 면역글로불린-생산 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성하고; (c) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체의 항원에 대한 결합을 스크리닝하고; (d) 하이브리도마로부터 면역글로불린 유전자를 모 포유동물 발현 세포 내로 클로닝하고, 여기서 포유동물 발현 세포의 미스매치 수복이 억제되거나 또는 미스매치 수복의 억제에 의해 하이브리도마의 생산을 최적화하고; (e) 모 포유동물 세포 또는 하이브리도마 발현 세포를 인큐베이팅하여 돌연변이를 유발시켜, 과다돌연변이된 포유동물 발현 세포를 형성하고; (f) 하이브리도마 세포로부터 생산된 항체에 비해 표적 항원에 대해 더 높은 친화도를 갖는 항체를 분비하는 과다돌연변이 가능 포유동물 발현 세포를 스크리닝하고; (g) 모 포유동물 발현 세포보다 더 고역가의 항체를 분비하는 과다돌연변이 가능 포유동물 발현 세포를 스크리닝하여, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 고역가의 고친화도 항체를 생산하는 포유동물 발현 세포를 생산하는 것을 포함하는, 생체 외에서 면역화된 면역글로불린-생산 세포로부터 고역가의 고친화도 항체를 생산하는 포유동물 발현 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0091] 본 발명의 방법의 일부 실시태양에서, 항체는 ELISA-기반 분석 또는 당업계에 공지된 항체-항원 결합을 측정할 수 있는 다른 분석을 사용하여 스크리닝된다 [Crowther, J. R. (2001) The ELISA guidebook, 1st ed. Humana Press, Totowa, NJ].

[0092] 일부 실시태양에서, 스크리닝 분석은 모 하이브리도마에 의해 생산되는 것보다 더 높은 친화도의 항체를 생산하는 과다돌연변이된 하이브리도마를 스크리닝한다.

[0093] 일부 실시태양에서, 본 발명의 방법은 본래 선택된 세포에 의해 생산되는 것보다 더 고역가의 항체를 갖는 과다돌연변이된 항체-생산 세포를 선택하는 것을 추가로 포함한다.

[0094] 면역글로불린-생산 세포를 골수종 세포에 융합하는 방법 및 상기 방법에 유용한 골수종 세포도 당업계에 공지되어 있다 [Kohler & Milstein, Eur. J. Immunol. 1976, 6:511-9; Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion].

[0095] 인간에게 투여하기 위해 설계된 MAb의 생성을 위해 사용되는 인간 B-세포는 바이러스 전염의 가능한 비히클을 제시할 수 있다. 융합 파트너 세포 및 공여자로부터의 말초혈 단핵 세포 (PBMC)는 면역결핍-1 및 2, B형 및 C형 간염, 사이토메갈로-, 헤르페스-6, 및 엡스타인-바 바이러스를 포함하여 바이러스 DNA의 부채를, 예를 들어 PCR에 의해 확인하기 위해 예비스크리닝할 수 있다.

- [0096] 본 발명의 방법에 따라 생산된 하이브리도마 세포는 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0097] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 생성된 하이브리도마 세포에 의해 생산된 표적 항원에 대한 항체를 포함한다. 본 발명의 항체는 또한 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 사용하여 재조합 방식으로 생산된 항체를 포함한다. 본 발명의 바람직한 항체는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 항체는 바람직하게는 완전 인간, 보다 바람직하게는 완전 인간 모노클로날 항체이다.
- [0098] 본 발명의 바람직한 항체는 표적 항원의 에피토프, 예를 들어 입체형태적 에피토프에 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항체는 바람직하게는 질병-연관 항원, 예를 들어 GM-CSF (이로 제한되지 않음), 바람직하게는 인간 GM-CSF (서열 1), 보다 바람직하게는 성숙 인간 GM-CSF (서열 2)에 대해 작용한다. 일부 실시태양에서, 항체가 결합하는 에피토프는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 5개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 항체가 결합하는 에피토프는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 10개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 항체가 결합하는 에피토프는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 15개의 연속 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 항체가 결합하는 에피토프는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 20개의 연속 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 항체가 결합하는 에피토프는 서열 1 또는 서열 2에 도식된 아미노산 서열의 적어도 25개의 연속 아미노산을 포함한다. 본 발명의 특정 바람직한 실시태양에서, 항체가 결합하는 GM-CSF의 에피토프는 서열 33-36 중의 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 항체-생산 세포는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (Amer. Type Cult. Coll.) (미국 20110-2209 버지니아주 매나사스 유니버시티 블러바드 10801)에 각각 2007년 1월 18일에 (10G9), 및 2007년 1월 31일에 (E10) 기탁되었고, 기탁 번호 PTA-8173 및 PTA-8193이 부여되었다. 본 발명의 항-GM-CSF 항체의 예는 상기 세포에 의해 생산된 항체이다.
- [0099] 당업자는 항체 특이성이 주로 6개의 CDR 구역, 특히 H 사슬 CDR3에 의해 결정됨을 알 것이다 ([Kala M et al., (2002) J. Biochem. 132:535-41]; [Morea V et al., (1998) J. Mol. Biol. 275:269-94]; 및 [Chothia C et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-17]). 그러나, 항체 프레임워크 구역은 항원-항체 상호작용에서 (Panka DJ et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3080-4), 특히 CDR 루프의 입체형태에서 (Foote J et al., (1992) J. Mol. Biol. 224:487-99) 중요한 역할을 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 GM-CSF에 대한 항체 특이성을 부여하는 H 또는 L쇄 CDR 또는 FWR 구역의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 당업계에서 일상적으로 수행되는 도메인 셔플링 (shuffling) 실험 ([Jirholt P et al., (1998) Gene 215:471-6]; [Soederlind E et al., (2000) Nature Biotechnology 18:852-6])은 본원에 기재되고 예시된 내용에 따라 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 상기 도메인 셔플링 실험에 의해 생성된 항체는 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0100] 따라서, 일부 실시태양에서, 항체는 서열 40 또는 46에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 41 또는 47에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함한다. 특히 바람직한 일부 실시태양에서, 항체는 서열 42 또는 48에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 43 또는 49에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 CDR1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 44 또는 50에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 CDR2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 45 또는 51에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 CDR3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 52 또는 58에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 53 또는 59에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 54 또는 60에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 중쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 55 또는 61에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 FWR1 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 56 또는 62에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 FWR2 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 57 또는 63에 실질적으로 동일하거나 또는 동일한 경쇄 FWR3 아미노산 서열을 포함한다.
- [0101] 일부 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 서열 8, 9, 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 중쇄는 서열 10, 11, 또는 17의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 서열 12, 13, 또는 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 경쇄는 서열 14, 15, 또는 19의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.
- [0102] 중쇄 및 경쇄 및 이를 코딩하는 유전자 사이에 존재할 가능성이 있는 천연 서열 변이 때문에, 당업자가 본 발명

의 항체의 독특한 결합 특성 (예를 들어, 특이성 및 친화도)를 계속 유지하면서 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 유전자 내의 일정 수준의 변이를 발견할 것으로 예상함을 이해하여야 한다. 상기 예상은 부분적으로는 유전자 코드의 다의성, 및 코딩되는 단백질의 특성을 평가할 수 있을 정도로 변경시키지 않는 보존적 아미노산 서열 변이의 공지의 진화적 성공에 기인한 것이다. 따라서, 상기 변이체 및 상동체는 서로 실질적으로 동일한 것으로 간주되고, 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0103]

따라서, 본 발명의 항체는 본 발명의 항체의 생물학적 특성 (예를 들어, 결합 친화도 또는 면역 효과기 활성화)을 보유하는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 부가, 또는 교체를 갖는 변이체를 포함한다. 숙련인은 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 교체를 갖는 변이체를 생산할 수 있다. 상기 변이체는 특히 (a) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비보존적 아미노산으로 치환된 변이체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드에 부가되거나 또는 폴리펩티드로부터 결실된 변이체, (c) 하나 이상의 아미노산이 치환기를 포함하는 변이체, 및 (d) 폴리펩티드가 폴리펩티드에 유용한 특성을 부여할 수 있는 다른 펩티드 또는 폴리펩티드, 예를 들어 융합 파트너, 단백질 태그 또는 다른 화학적 모이어티 (moiety), 예를 들어 항체에 대한 에피토프, 폴리히스티딘 서열, 비오틴 모이어티 등과 융합된 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체는 하나의 종으로부터의 아미노산 잔기가 다른 종의 대응하는 잔기를 보존된 또는 비보존된 위치에서 치환하는 변이체를 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 비보존된 위치의 아미노산 잔기는 보존적 또는 비보존적 잔기로 치환된다. 유전적 (억제, 결실, 돌연변이 등), 화학적, 및 효소적 기술을 포함하여 상기 변이체를 얻는 기술은 당업자에게 공지되어 있다.

[0104]

일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 12의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 바람직한 실시태양에서, 항체는 서열 16의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 13의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 그러나, 당업자는 일부 경우에, 주어진 중쇄와 다양한 경쇄의 페어링, 또는 주어진 경쇄와 다양한 중쇄의 페어링이 천연 조합에 비해 동일하거나 더 우수한 특이성 및/또는 친화도를 갖는 항체를 생성시킨다는 것을 알 것이다. 따라서, 본 발명은 H 및 L쇄 쌍의 바람직한 조합으로 제한되지 않고, 따라서 본 발명의 항체는 본원에 기재된 H 및 L쇄, 또는 GM-CSF에 대해 특이적이고 높은 친화도 결합의 달성을 위해 본원에 기재된 H 및 L쇄와 대등한 것으로 당업자에게 공지되어 있거나 실험에 의해 결정된 다른 H 또는 L쇄를 포함 (이로 제한되지 않음)하여 H 및 L쇄 쌍의 상이한 조합을 포함한다.

[0105]

본 발명의 바람직한 항체는 2개의 중쇄를 포함한다. 본 발명의 바람직한 항체는 2개의 경쇄를 포함한다. 본 발명의 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항체가 보다 바람직하다.

[0106]

본 발명의 항체는 본 발명의 항체의 생물학적 특성 (예를 들어, 결합 친화도 또는 면역 효과기 활성화)을 보유하는 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 부가, 또는 교체를 갖는 변이체를 포함한다. 숙련인은 단일 또는 다수의 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 교체를 갖는 변이체를 생산할 수 있다. 상기 변이체는 특히 (a) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존적 또는 비보존적 아미노산으로 치환된 변이체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드에 부가되거나 또는 폴리펩티드로부터 결실된 변이체, (c) 하나 이상의 아미노산이 치환기를 포함하는 변이체, 및 (d) 폴리펩티드가 폴리펩티드에 유용한 특성을 부여할 수 있는 다른 펩티드 또는 폴리펩티드, 예를 들어 융합 파트너, 단백질 태그 또는 다른 화학적 모이어티, 예를 들어 항체에 대한 에피토프, 폴리히스티딘 서열, 비오틴 모이어티 등과 융합된 변이체를 포함할 수 있다. 본 발명의 항체는 하나의 종으로부터의 아미노산 잔기가 다른 종의 대응하는 잔기를 보존된 또는 비보존된 위치에서 치환하는 변이체를 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 비보존된 위치의 아미노산 잔기는 보존적 또는 비보존적 잔기로 치환된다. 유전적 (억제, 결실, 돌연변이 등), 화학적, 및 효소적 기술을 포함하여 상기 변이체를 얻는 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 또한, 본 발명의 항체는 항체 단편을 포함한다. "단편"은 바람직하게는 적어도 약 40, 보다 바람직하게는 적어도 약 50, 보다 바람직하게는 적어도 약 60, 보다 바람직하게는 적어도 약 70, 보다 바람직하게는 적어도 약 80, 보다 바람직하게는 적어도 약 90, 보다 바람직하게는 적어도 약 100개의 아미노산 길이이고, 전장 서열의 일부 생물학적 활성 또는 면역학적 활성, 예를 들어, 결합 친화도 또는 결합력 (avidity) 및 면역 효과기 활성을 보유하는 폴리펩티드 서열을 의미한다.

[0107]

본 발명의 항체는 1×10^{-2} 미만의 해리 상수 (K_D)를 포함하는, 표적 항원에 대한 결합 친화도를 갖는다. 일부 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-3} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-4} 미만이다. 일부 실시태양에서, K_D 는

1×10^{-5} 미만이다. 또 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-6} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-7} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-8} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-9} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-10} 미만이다. 또 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-11} 미만이다. 일부 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-12} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-13} 미만이다. 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-14} 미만이다. 또 다른 실시태양에서, K_D 는 1×10^{-15} 미만이다.

- [0108] 본 발명의 항체는 예를 들어 항체가 그의 에피토프에 결합하는 것을 공유 부착이 방지하지 않도록 항체에 대한 임의의 종류의 분자의 공유 부착에 의해 변형된 유도체를 포함한다. 적합한 유도체의 예는 글리코실화된 항체 및 단편, 아세틸화된 항체 및 단편, 페길화된 (pegylated) 항체 및 단편, 인산화된 항체 및 단편, 및 아마이드화된 항체 및 단편을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 항체 자체가 공지의 보호/차단기, 단백질 분해 절단, 세포성 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 유도체화될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 상기 설명된 바와 같은 하나 이상의 비-전통적인 아미노산을 함유할 수 있다. 본 발명의 일부 실시태양에서, GM-CSF 또는 그의 에피토프는 면역원성 단백질에 컨주게이팅되어 항원의 면역원성을 향상시킨다. 면역원성 단백질은 세포의 면역 반응을 향상시키는 임의의 단백질, 예를 들어 과산화물 독소이드 C (TT), 키폴 림펫 헤모시아닌 (KLH), 알부민, 난알부민, 병아리 알부민 (CAB), 소 혈청 알부민, 갑상선 글로불린, 디프테리아 독소이드, BCG, 콜레라 독소 동일 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시태양에서, 항원은 성숙 단백질의 변성에 의해 생성된다.
- [0109] 본 발명의 항체는 항체 활성 또는 안정성을 개선시키는 변형 후 모이어티를 가질 수 있다. 상기 모이어티는 황, 메틸, 탄수화물, 인, 및 면역글로불린 분자에서 통상적으로 발견되는 다른 화합물기를 포함한다.
- [0110] 본 발명의 항체는 임의의 이소형의 항체일 수 있다. 항체의 이소형은 생체 내 클래스 스위칭을 이용하여 또는 유전공학에 의해 변경시킬 수 있다.
- [0111] 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 제공된다. 본 발명의 핵산은 게놈 DNA, DNA, cDNA, RNA, 이중 가닥 및 단일 가닥 핵산, 및 그의 상보성 서열을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0112] 본 발명의 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 서열 8 및/또는 서열 12의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체의 중쇄는 서열 10을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 일부 실시태양에서, 항체의 경쇄는 서열 14를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 또한, 서열 8의 아미노산 서열 및 서열 12의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드도 제공된다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열 10 및/또는 서열 14의 핵산 서열을 포함한다.
- [0113] 본 발명의 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 서열 16 및/또는 서열 18의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 항체의 중쇄는 서열 17을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 일부 실시태양에서, 항체의 경쇄는 서열 19를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 또한, 서열 16의 아미노산 서열 및 서열 18의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드도 제공된다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열 17 및/또는 서열 19의 핵산 서열을 포함한다.
- [0114] 일부 실시태양에서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 (및 이들이 코딩하는 펩티드)는 리더 (leader) 서열을 포함한다. 당업계에 공지된 임의의 리더 서열이 사용될 수 있다. 리더 서열은 제한 부위 및/또는 번역 개시 부위를 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명은 서열 9 및/또는 서열 13의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일부 실시태양에서, 항체의 중쇄는 서열 11을 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 일부 실시태양에서, 항체의 경쇄는 서열 15를 포함하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다. 또한, 서열 9의 아미노산 서열 및 서열 13의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드도 제공된다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오타이드는 서열 11 및/또는 서열 15의 핵산 서열을 포함한다.
- [0115] 또한, 본 발명에 의해 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 숙주 세포, 예를 들어 재조합 숙주 세포 (이로 제한되지 않음)도 고려된다.
- [0116] 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 함유하는 재조합 발현 벡터가 제공된다. 발현 벡터는 하나 이상의 추가의 서열, 예를 들어 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서), 선택 마커, 및 폴리아데닐화 신호 (이로 제한되지 않음)를 함유할 수 있다.

- [0117] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 적합한 조절 요소에 작동가능하게 연결될 수 있는 적어도 하나의 재조합 단백질을 코딩하는 합성, 게놈, 또는 cDNA-유래 핵산 단편을 포함한다. 상기 조절 요소는 전사 프로모터, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종료를 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 발현 벡터, 특히 포유동물 발현 벡터는 하나 이상의 비전사되는 요소, 예를 들어 복제 기원, 발현되는 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 다른 5' 또는 3' 인접 비전사 서열, 5' 또는 3' 비번역 서열 (예를 들어 필수 리보솜 결합 부위), 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 공여 및 수용 부위, 또는 전사 종료 서열을 포함할 수 있다. 또한, 숙주 내에서 복제되는 능력을 부여하는 복제 기원도 포함될 수 있다.
- [0118] 척추동물 세포 형질전환에 사용되는 발현 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열은 바이러스 공급원에 의해 제공될 수 있다. 예시적인 벡터는 문헌 [Okayama and Berg (1983) Mol. Cell. Biol. 3:280]에 설명된 바와 같이 제조할 수 있다.
- [0119] 시스템에 사용될 수 있는 선택 마커는 양성 및 음성 선택 마커, 예를 들어 항생제 내성 유전자 (예를 들어, 네오마이신 내성 유전자, 히드로마이신 내성 유전자, 카나마이신 내성 유전자, 테트라사이클린 내성 유전자, 페니실린 내성 유전자), 간시클로버 선택을 위한 HSV-TK, HSV-TK 유도체, 또는 6-메틸퓨린 선택을 위한 세균 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 유전자와 같은 당업계에 공지된 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다 (Gadi et al., (2000) Gene Ther. 7:1738-1743). 선택 마커를 코딩하는 핵산 서열 또는 그의 클로닝 부위는 관심있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열 또는 그의 클로닝 부위의 상류 또는 하류에 위치할 수 있다.
- [0120] 일부 실시태양에서, 벡터는 예를 들어 구성적 (constitutive), 유도가능, 숙주-특이적, 및/또는 조직-특이적 프로모터를 포함하고 이로 제한되지 않는 하나 이상의 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터 및 인핸서는 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV), 아데노바이러스 2, 시미안 바이러스 40 (SV40), 및 폴리오마로부터 유도된다. 상용성 숙주 세포에 의존하는 바이러스 게놈 프로모터, 제어 및/또는 신호 서열을 이용하여 발현을 유도할 수 있다. 또한, 하우스-키퍼 (house-keeping) 유전자로부터 유도된 프로모터 (예를 들어, β -글로빈, 티미딘 키나제, 및 EF-1 α 프로모터)도 그 내부에서 벡터가 발현되는 세포 종류에 따라 사용될 수 있다. 일부 실시태양에서, 프로모터는 관심있는 하나 이상의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 상류에 존재한다.
- [0121] 본 발명의 벡터는 하나 이상의 세포내 리보솜 결합 부위(들) (IRES)을 함유할 수 있다. IRES 서열을 융합 벡터 내로 포함시키면 일부 단백질의 발현을 향상시키는 데 유리할 수 있다.
- [0122] 일부 실시태양에서, 벡터 시스템은 임의의 상기 핵산 서열의 상류 또는 하류에 위치할 수 있는 하나 이상의 폴리아데닐화 부위 (예를 들어, SV40)를 포함할 것이다.
- [0123] 벡터 성분은 연속적으로 연결되거나, 또는 유전자 산물의 발현을 위한 최적 공간을 제공하는 방식으로 (즉, ORF 사이에 "스페이스" 뉴클레오티드의 도입에 의해) 배열되거나, 또는 다른 방식으로 위치할 수 있다. 또한, 발현을 위한 최적 공간을 제공하기 위해 조절 요소, 예를 들어 IRES 모티프가 배열될 수 있다.
- [0124] 본 발명의 발현 벡터로 형질감염된 세포는 양성 선택 조건 하에 선택되고/되거나 재조합 단백질 발현에 대해 스크리닝될 수 있다. 재조합-양성 세포는 팽창되고, 목적하는 표현형을 보이는 서브클론에 대해 스크리닝된다.
- [0125] 진핵생물 및 원핵생물 세포를 포함하는 세포는 본 발명의 발현 벡터로 형질전환될 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 실시태양은 본 발명의 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 세포는 바람직하게는 진핵생물 세포, 보다 바람직하게는 식물, 설치류, 또는 인간 기원의 세포, 예를 들어 NSO, CHO, perC.6, Tk-ts13, BHK, HEK293 세포, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L 세포, C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0 골수종 세포, 및 BHK 세포주 (이로 제한되지 않음)이다.
- [0126] 일반적으로, 형질감염은 세포, 또는 단일 세포의 현탁액을 사용하여 수행될 것이지만, 처리된 세포 또는 조직의 충분한 분획이 폴리뉴클레오티드를 포함하여 형질감염된 세포가 성장하고 이를 이용할 수 있을 정도로 다른 방법도 적용될 수 있다. 형질감염을 위한 기술은 잘 공지되어 있다. 몇몇 형질전환 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, Kaufman (1988) Meth. Enzymology 185:537 참조). 당업자가 쉽게 이해하는 바와 같이, 적절한 형질전환 프로토콜은 숙주 세포 종류 및 관심있는 유전자의 성질에 의해 결정된다. 임의의 상기 프로토콜의 기본적인 성분은 관심있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 적합한 숙주 세포 내로 도입한 후, 벡터 DNA를 안정한, 발현가능한 방식으로 포함하는 숙주 세포를 확인하고 분리하는 것을 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 기술은 전기천공, 형질도입, 세포 융합, 염화칼슘의 사용, 및 관심있는 세포와의 융합을 위한 지질과 함께 폴리뉴클레오티드를 패키징 (packaging)하는 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 선택가능 마커 유

전자가 다수의 세포 세대에 대해 일정한 수준으로 발현될 정도로 형질감염이 안정한 경우, 세포주를 얻을 수 있다.

[0127] 특히 포유동물 세포 내로 형질감염시키기 위한 통상적인 한 방법은 인산칼슘 침전이다. 다른 방법은 세균 원형질체와 포유동물 세포의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-유도 융합이다 (Schaffner et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163). 또다른 방법은 전기천공이고, 이는 또한 예를 들어 문헌 [Potter et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161]에 설명된 바와 같이 DNA를 숙주 세포의 세포질 내로 직접 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0128] 또한, DNA의 형질감염은 지질-핵산 복합체 (또는 리포솜)를 형성하는, 배양된 세포에 적용될 때 핵산의 세포 내로의 흡수를 용이하게 하는 폴리리포솜 시약, 예를 들어 리포펙틴 및 리포펙타민 (집코 비알엘 (Gibco BRL, 미국 매릴랜드주 게터스버그))을 사용하여 수행할 수 있다.

[0129] 목적하는 단백질을 발현하는 세포를 확인한 후에, 이 세포를 팽창시키고 선택할 수 있다. 형질감염된 세포는 많은 방식으로 선택할 수 있다. 예를 들어, 세포는 관심있는 폴리펩티드의 발현에 대해 선택될 수 있다. 또한, 그 내부의 벡터가 항생제 내성 유전자를 함유하는 세포에 대해, 세포는 항생제 내성에 대해 선택될 수 있고, 벡터를 함유하는 세포를 양성으로 선택하게 된다. 다른 실시태양에서, 세포는 선택 조건 하에 성장하도록 허용될 수 있다.

[0130] 단백질을 생산하는 클론이 확인되면, 이 세포주는 하나 이상의 목적하는 표현형을 갖는 서브클론, 예를 들어 고-역가 발현, 향상된 성장 특성, 및/또는 예를 들어 단백질 변형 및/또는 변경된 번역후 변형에 의해 요구되는 생화학적 특성을 갖는 단백질을 생성시키는 능력을 보이는 세포 (이로 제한되지 않음)를 확인하기 위해 추가로 스크리닝될 수 있다. 상기 표현형은 주어진 서브클론의 고유한 특성 또는 돌연변이 유발에 의한 것일 수 있다. 돌연변이 유발은 화합물, UV-파장 광, 방사선 조사, 바이러스, 삽입 돌연변이원, 결합 DNA 수복, 또는 상기 방법의 조합을 사용하여 달성될 수 있다.

[0131] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 항체의 제약 조성물을 특징으로 한다. 제약 조성물은 환자에서 질병, 예를 들어 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0132] 본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 제형화된, 미제한적으로 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병과 같은 질병의 치료를 위한 하나 이상의 MAb를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0133] 예방 용도에서, 제약 조성물은 질병 또는 병태 (예를 들어 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병)에 걸리기 쉽거나 달리 걸릴 위험이 있는 환자에게 예방 유효량으로 투여된다. 위험이 있는 개인은 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 가족력이 있는 개인, 이전에 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병에 대해 치료를 받은 개인, 및 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병을 발병할 가능성이 증가된 것을 제시하는 임의의 다른 임상 징후를 나타내는 개인을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 달리 설명하면, 위험이 있는 개인은 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병을 발병할 위험이 일반 집단보다 더 큰 것으로 생각되는 임의의 개인이다. 용어 "예방 유효량"은 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 발생 또는 재발의 예방으로서 관찰된 효과를 생성하는 제형의 양을 나타내는 의미이다. 제형의 예방 유효량은 대개 활성제가 없는 제2 제형이 유사한 상황의 개인에게 투여될 때 관찰되는 효과에 비해 그들이 갖는 효과에 의해 결정된다.

[0134] 치료 용도에서, 조성물은 상기 질병이 의심되거나 이미 질병에 걸린 환자에게 그의 합병증 및 질병의 발생에서 중간에 일어나는 병리학적 표현형을 포함하여 질병의 증상 (생화학적 및/또는 조직학적)을 치유하거나 적어도 부분적으로 중지시키는 치료 유효량으로 투여된다.

[0135] 예방 및 치료 요법 모두에서, 약제는 보통 충분한 반응이 얻어질 때까지 수회 투여량으로 투여된다. 전형적으로, 반응을 모니터링하고, 반응이 감퇴하기 시작하면 반복 투여량을 제공한다.

[0136] 본원에 설명된 질병, 예를 들어, 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 치료를 위한 모노클로날 항체의 유효 용량은 많은 상이한 인자, 예를 들어 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 동물인지, 투여되는 다른 의약, 및 처치가 예방적인지 치료적인지에 따라 변한다. 보통, 환자는 인간이지만 비인간 포유동물이 또한 치료받을 수 있다.

[0137] 용량은 치료될 질병 상태의 심도 및 반응성에 좌우되고, 치료 과정은 수 일 내지 수 개월, 또는 치유가 달성되거나 질병 상태의 감소가 달성될 때까지 지속된다. 최적 투여 스케줄은 환자 또는 대상의 신체 내에 약물 축적의 측정으로부터 계산할 수 있다. 당업자는 최적 투여량, 투여 방법 및 반복 비율을 쉽게 결정할 수 있다. 최

적 투여량은 개별 항체의 상대 효능 및 동시 투여의 경우에, 질병의 치료에 사용된 공지의 약물의 상대 효능에 따라 변할 수 있다. 최적 투여량은 일반적으로 시험관 내 및 생체 내 동물 모델에서 효과적인 것으로 밝혀진 EC50에 기초하여 추정될 수 있다.

[0138] 일반적으로, 투여량은 0.01 μg 내지 100 g/kg 체중이고, 매일, 매주, 매달 또는 매년 1회 이상 또는 심지어 2 내지 20년마다 1회 제시될 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 치치가 예방적인지 치료적인지에 따라 변할 수 있다. 예방 용도에서, 비교적 낮은 투여량이 장기간 동안 비교적 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 일부 환자는 나머지 생애 동안 치료를 계속 받는다. 치료 용도에서, 질병 진행이 감소되거나 종결될 때까지 및 바람직하게는 환자가 질병 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지, 비교적 짧은 간격으로 비교적 높은 투여량이 종종 요구된다. 이후에, 환자는 예방 요법으로 투여받을 수 있다.

[0139] 개인의 필요는 다를 수 있지만, 제형의 유효량에 대한 최적 범위를 결정하는 것은 당업계의 기술 범위 내에 있다. 인간 용량은 동물 연구로부터 추정될 수 있다 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20TH ED., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2000). 일반적으로, 당업자가 조정할 수 있는 제형의 유효량을 제공하기 위해 요구되는 용량은 수여체의 연령, 건강, 신체 상태, 체중, 질병 또는 질환의 종류와 정도, 치료 빈도, 동시 치료법 (있는 경우)의 성질 및 목적하는 효과(들)의 성질과 범위에 따라 변할 것이다.

[0140] 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체와 함께 제형화될 수 있다. 적합한 제약상 허용되는 담체는 물, PBS, 염 용액 (예를 들어 링거액), 알콜, 오일, 젤라틴 및 탄수화물, 예를 들어 락토스, 아킬로스 또는 전분, 지방산 에스테르, 히드록시메틸셀룰로스 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 상기 제제는 멸균될 수 있고, 필요한 경우 보조제, 예를 들어 윤활제, 방부제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 버퍼 및 착색제와 혼합될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 적합한 제약상 담체는 당업계에 공지되어 있다 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 20TH ED., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2000).

[0141] 편리하게 단위 투여형으로 제공될 수 있는 제약 제형은 제약업에 잘 공지된 통상적인 기술에 따라 제조할 수 있다. 상기 기술은 활성 성분을 제약상 담체(들)와 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미분 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하고 밀접하게 회합시킴으로써 제조된다. 제형은 단위-용량 또는 다수-용량 용기, 예를 들어 밀봉 앰플 및 바이알 내에 제공될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 담체의 첨가만을 요구하는 동결 또는 동결-건조 (동결건조된) 상태로 보관될 수 있다.

[0142] 제약 조성물은 일반적으로 멸균의 실질적인 등장성이고 미국 식품의약국 (U.S. Food and Drug Administration)의 모든 우수 제조 실무 (GMP) 규정에 완전히 적합하게 제형화된다.

[0143] 제형, 용량 및 투여 요법에 관한 추가의 지침은 당업계에서 이용가능하다 ([Berkow et al., 1997, THE MERCK MANUAL OF MEDICAL INFORMATION, Home, ed., Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, NJ.]; [Goodman et al., 1996, GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9th ed. McGraw-Hill Health Professions Division, New York]; [Ebadi, 1998, CRC DESK REFERENCE OF CLINICAL PHARMACOLOGY, CRC Press, Boca Raton, Fla.]; [Katzung, 2001, BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY, 8TH ED. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York]; [Speight et al., 1997, AVERV'S DRUG TREATMENT: A GUIDE TO THE PROPERTIES, CHOICE, THERAPEUTIC USE AND ECONOMIC VALUE OF DRUGS IN DISEASE MANAGEMENT, 4TH ED. Adis International, Auckland/Philadelphia, PA]).

[0144] 제약 치료제로서 사용될 때, 본 발명의 조성물은 단독으로 투여될 수 있거나 질병, 예를 들어 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 치료에 사용되는 다른 화합물 또는 조성물과 동시-투여될 수 있다. 본원에서 "보충 화합물" 또는 "보충 조성물"로 칭하는 상기 화합물의 예는 항생제, 항-시토킨, 항-천식약, 항포스포리파제 (예를 들어, 포스포리파제의 억제제), 혈관이완제 (예를 들어, 아데노신, 베타-아드레날린성 작용제 또는 길항제, β -아드레날린성 차단제, α -아드레날린성 차단제, 이뇨제, 평활근 혈관이완제, 질산염 및 안지오텐신-전환 효소 억제제), 생체분자, 세포증식 억제제 및 화학치료제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 제약 조성물은 예를 들어 하나 이상의 보충 화합물을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 항체는 보충 화합물에 컨주게이팅된다.

[0145] 본 발명의 또다른 측면에 따라, 예를 들어 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 치료를 위한 키트가 제공된다.

[0146] 본 발명의 키트는 본 발명의 항체 또는 항체 조성물, 및 환자에서 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병을 치료하기 위한 또는 표적 항원 (예를 들어, GM-CSF)의 생물학적 활성을 억제하기 위한 방법에서 키트를 사용하기 위한 사용설명서를 포함한다. 키트는 적어도 하나의 보충 화합물을 포함할 수 있다. 키트는 사용설명서 및/또는 예

를 들어 주사에 의한 항체 또는 항체 조성물을 투여하기 위한 수단을 포함할 수 있다.

- [0147] 본 발명의 항체는 비제한적으로 혈청과 같은 생물학적 샘플 내에서 항원을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적으로 유동 세포계와 같은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 본 발명의 항체와 함께 인큐베이팅한 후, 세척하고 표지된 2차 항체와 함께 인큐베이팅할 수 있다. 예를 들어, 2차 항체는 경쇄에 대해 지정되고, 검출을 위해 FITC 또는 피코에리트린에 컨쥬게이팅될 수 있다.
- [0148] 본 발명의 항체의 항원 중화 활성은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의한 항원 중화 분석으로 시험할 수 있다. 예를 들어, 항체의 중화 활성은 항원-의존 세포주를 사용하여 평가할 수 있다. GM-CSF-의존 세포주의 예는 TF-1 및 AML-193을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- [0149] 제1 항원 중화 분석에서, 항원-의존 세포를 분석 배지, 항원, 및 시험 또는 이소형 대조군 항체와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이팅한 항원에 현탁한다. 인큐베이션 기간 후, 성장 억제제는 당업계에 공지된 임의의 방법으로 평가한다. 예를 들어, Cell Titer 시약 (프로메가)을 첨가할 수 있고, 이어서, 추가로 인큐베이팅하고 분광광도계에서 490 nm에서 광학 밀도 (O.D.)를 측정하고 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. 항원 중화의 백분율을 다음과 같이 계산한다: $100 - [(Ig \text{ 존재시의 O.D.} / Ig \text{ 비존재시의 O.D.}) \times 100]$.
- [0150] 다른 중화 분석에서, 항원은 본 발명의 항-항원 항체와 혼합된다. 항원-의존 세포는 혼합물에 첨가된 후 인큐베이팅된다. 상기 인큐베이션 기간 후, 성장 억제제를 측정한다. 예를 들어, DNA 증식 마커 MTS를 첨가한 후, 염료 혼입을 측정할 수 있다. 항-항원 항체의 부재 하에 비해 항체의 존재 하에 감소된 염료 혼입은 항원의 중화를 나타낸다.
- [0151] 별법으로, 항원-의존 세포를 항원의 존재 하에 성장시킨 후, 증가량의 항체를 배양 배지에 첨가하고 상기 설명된 바와 같은 중화 활성을 평가한다.
- [0152] 본 발명의 치료 방법은 본 발명의 항체의 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 환자 또는 대상에게 투여함으로써 표적 항원, 예를 들어, GM-CSF의 생물학적 활성을 억제하는 방법, 및 비제한적으로 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병과 같은 질병을 치료하는 방법을 포함한다. GM-CSF의 생물학적 활성은 GM-CSF 수용체에 대한 결합을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 방법은 예를 들어 비제한적으로 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병과 같은 질병의 예방적 또는 치료적 처치를 수행하기 위해 사용될 수 있다.
- [0153] 본 발명의 치료 방법은 인간 및 비-인간 동물에서 사용하기에 적합하다. 본 발명으로부터 이익을 얻는 비-인간 동물은 애완동물, 외래종 동물 (예를 들어, 동물원 동물) 및 가축을 포함한다. 바람직하게는, 비-인간 동물은 포유동물이다.
- [0154] 본 발명에 사용하기 위한 항체는 임의의 허용되는 투여형, 예를 들어 캡슐, 정제, 수성 현탁액, 용액 등으로 경구 투여될 수 있다. 항체는 또한 비경구로 투여될 수 있다. 이는 다음 투여 경로에 의한다: 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 윤활막내, 흉골내, 비강내, 국소적, 수막강내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술. 일반적으로, 항체는 근육내 또는 정맥내 주사로서 제공될 것이다.
- [0155] 본 발명의 항체는 단독으로 또는 제약상 허용되는 담체, 예를 들어 허용되는 항원보강제, 비히클 및 부형제와 함께 투여될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 항체는 다른 치료제의 전후에 또는 동시에 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 단독으로 투여되거나 보충 화합물과 동시투여될 수 있다.
- [0157] 본 발명의 항체는 비컨쥬게이팅된 항체 또는 컨쥬게이팅된 항체의 균질 혼합물로서, 또는 비컨쥬게이팅된 항체와 컨쥬게이팅된 항체의 불균질 혼합물로서 투여될 수 있다.
- [0158] 효과적인 치료는 다양한 방식으로 평가할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 암, 감염성 질병 또는 염증성 질병의 효과적인 치료는 느려진 질병 진행에 의해 결정된다. 또 다른 실시태양에서, 효과적인 치료법은 환자의 평안 (well-being) 증가, 예를 들어 체중 증가, 힘 회복, 통증 감소, 번영, 및 보다 건강하다는 환자의 주관적인 표시와 같은 징후에 의해 측정된다.
- [0159] [실시예]
- [0160] 하기 실시예는 본 발명을 보다 상세히 설명하기 위해 제공된다. 실시예는 본 발명을 예시하고자 한 것으로서 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

- [0161] 실시예 1
- [0162] GM-CSF에 대한 항원-특이적 인간 MAb의 생성
- [0163] 물질 및 방법
- [0164] 인간 B-세포, 생체의 면역화 및 세포 배양. 하기 모든 과정에서, 세포를 5% CO₂ 내에서 37°C에서 성장시켰다. 류코팩 (leukopak)은 과상풍 독소이드 (TT)-접종한 건강한 개인으로부터 입수하였다. PBMC를 Ficoll-Plaque (아머샴 바이오사이언시즈 (Amersham BioSciences))에 의해 정제하고, CD19 양성 B-세포 및 CD4 양성 T-세포를 각각 EasySep(등록상표) 인간 CD4 및 CD19 선택 키트 (스텝셀 테크놀로지스 (StemCell Technologies))에 의해 PBMC로부터 분리하고, 혼합하여 B-세포/T-세포 풀 (pool) (BT4 세포)를 제조하였다. BT4 세포를 10% 열-불활성화된 인간 혈청 AB (나비 (Nabi, 미국 플로리다주)), 2 mM L-글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 1 mM 피루브산나트륨, 55 μ M 2-머캅토에탄올 (인비트로젠 (Invitrogen, 미국 캘리포니아주))을 함유하는 완전 RPMI1640 (인비트로젠) 내에서 배양하였다.
- [0165] 생체의 면역화를 위해, BT4 세포를 T-세포 및 B-세포 에피토프의 존재 하에 동시-배양하였다. 간단히 설명하면, BT4 세포를 1:1 비의 방사선을 조사한 자가 PBMC의 존재 하에 1 Lf/mL의 과상풍 독소이드 (TT) (사이렉스 (Cylex, 미국 매릴랜드주))를 함유하는 완전 RPMI 내에 10⁶/mL의 밀도로 접종하여, 활성화된 T 세포 (T-풀 (pool))를 생산하였다. 항원-활성화된 B-세포 (B-풀)을 생성하기 위해, BT4 세포를 10% 인간 혈청 AB, 활성화된 T-세포로부터의 5% 조건화된 배지, 20 U/mL IL-2, 0.5 ng/mL IL-6, 100 U/mL IL-10 (페프로테크) 및 250 ng/mL의 표적화된 항원(이전에 설명된 바와 같이 (Zafiroopoulos et al., (1997) J. Immunol. Methods 200:181-90) T- 및 B-세포 에피토프를 모두 함유하도록 합성된)의 다양한 구역을 나타내는 펩티드의 콕테일 (바이오-월드 (bio-World, 미국 오하이오주))를 함유하는 완전 RPMI 내에 3 x 10⁶ 세포/mL의 밀도로 접종하였다.
- [0166] GM-CSF에 대한 선택된 B-세포 에피토프는 EHVNAIQEARLLNL (서열 3), STQPWEHVNAIQEAR (서열 4), MASHYKQHCPPTPET (서열 5)이었다.
- [0167] T-풀 및 B-풀을 7일 동안 따로 배양한 후, 단층의 방사선을 조사한 CHO 지지 (feeder) 세포 상에서 10% 열-불활성화된 인간 AB 혈청 및 400 U/ml IL-4 (페프로테크)를 함유하는 완전 RPMI 내에서 각각 1:10 비로 동시-배양하였다 (10⁶ 세포/mL). 5일 후, 동시-배양된 T-풀 및 B-풀을 융합시켜 상기한 바와 같이 하이브리도마를 생성하였다.
- [0168] 폐포 단백증 (PAP) 환자의 B-세포의 불멸화 (immortalization)를 위해, PBMC를 정제하기 위해 100 mL의 전혈을 처리하였다. 림프구를 10% 열 불활성화된 태소 혈청 (FBS) (제이알에이치 바이오사이언시즈 (JRH Biosciences, 미국 캔사스주)), 2 ng/mL IL-4 (페프로테크), 2 mM L-글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 1 mM 피루브산나트륨, 55 μ M 2-머캅토에탄올 (인비트로젠), 50 μ g/mL 트랜스페린, 5 ng/mL 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA), 및 0.5 μ g/mL 시클로스포린 A (시그마 (Sigma, 미국 미저리주))를 함유하는 완전 RPMI 내에서 방사선을 조사한 CHO 지지 세포의 존재 하에 7-10일 동안 배양하였다. 이어서, 림프구를 아래 설명된 바와 같이 전기-융합시켰다.
- [0169] 항원-반응 하이브리도마의 세포 융합 및 효소결합 면역흡수 분석 (ELISA) 스크리닝. 인간 투여용으로 설계된 MAb의 생성을 위해 사용되는 인간 B-세포는 바이러스 전염의 잠재적인 위험을 나타낼 수 있다. 융합 파트너 세포 및 건강한 공여자로부터의 PBMC를 면역결핍-1 및 2, B형 및 C형 간염, 사이토메갈로바이러스, 헤르페스-6, 및 엡스타인-바 바이러스를 포함한 바이러스 DNA의 부재를 확인하기 위해 PCR에 의해 예비-스크리닝하였다. 림프구를 CYTOPULSE CEEF-50 장치 (사이토 펄스 사이언시즈, 인크. (Cyto Pulse Sciences, Inc., 미국 매릴랜드주))를 사용하여 K6H6/B5 세포 (ATCC)와 1:1의 림프구 대 K6H6/B5 비로 융합시켰다.
- [0170] 융합 후, 세포를 평저 96-웰 마이크로플레이트 내에 ~5,000 세포/웰로 10% 열 불활성화된 FBS, 2 mM L-글루타민, 0.1 mM 비-필수 아미노산, 1 mM 피루브산나트륨, 55 μ M 2-머캅토에탄올 (인비트로젠), 100 μ M 히포잔틴, 0.4 μ M 아미노프테린 및 16 μ M 티미딘 (HAT, 시그마)을 함유하는 완전 RPMI 내에서 접종하였다. 배지를 매주 교체하고, 항원 반응성 스크리닝의 완료까지 (3-5주) HAT 선택을 유지하였다.
- [0171] 항원-반응 MAb의 확인을 위해, ELISA-기반 스크리닝을 플레이트 세척기 및 분광광도계와 통합된 BIOMEK FX 액체 취급 시스템을 사용하여 로봇식으로 수행하였다. 간단히 설명하면, 미량액가관을 코팅 버퍼 (50 mM 탄산염-중탄산염, pH 9.4) 내에 희석된 50 μ L/웰의 실험실내 생산된 재조합 항원 (1 μ g/mL GM-CSF)으로 실온에서 6시간

동안 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 결합 버퍼 (1% BSA (시그마) 및 0.05% Tween 20 (바이오라드 (BioRad, 미국 캘리포니아주))를 함유하는 PBS)로 2시간 동안 실온에서 차단시켰다. 플레이트를 세척 버퍼 (0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 1회 세척하고, 50 μ L/웰의 하이브리도마 상등액을 ELISA 플레이트에 옮겼다. 결합 반응을 실온에서 2시간 동안 수행하였다. 후속적으로, 플레이트를 4회 세척하고, 결합 버퍼 내에 1:10,000으로 희석시킨 100 μ L의 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP)-컨쥬게이팅된 염소 항-인간 IgG+M (잭슨 이뮤노리서치 래보라토리스 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 미국 펜실베이니아주))를 첨가하고, 반응을 실온에서 1.5시간 동안 수행하였다. 마지막으로, 플레이트를 4회 세척하고, 100 μ L/웰의 SureBlue 기질 (케이피엘 (KPL, 미국 매릴랜드주))을 10분 동안 첨가하였다. 50 μ L/웰의 1 N 황산을 첨가함으로써 반응을 중지시키고, 450 nm에서 흡광도를 결정하였다.

[0172]

형광-활성화된 세포 분류 (FACS) 분석. Ig 결합 및 세포 세척 단계를 병행 결합 버퍼 (DPBS) (칼슘 또는 마그네슘, 0.5% BSA가 존재하지 않는)를 사용하여 수행하고, 반응을 V자형 바닥 마이크로플레이트 내에 설치하고, 샘플을 FACSaria 장치 (비디 바이오사이언시스 (BD Biosciences, 미국 뉴저지주))를 사용하여 분석하였다. 도 3A에 도시된 FACS 실험을 위해, 10^6 개의 무린 항-GM-CSF 하이브리도마 세포 (Mul19/2)에 100 ng/반응물의 GM-CSF를 로딩한 후, 항-GM-CSF 인간 Mab E5와 함께 인큐베이팅하였다. GM-CSF 특이적 Mab의 결합을 10 μ g/mL FITC-표지된 염소 항-인간 Ig (서던바이오테크 (SouthernBiotech), 미국 알라바마주))로 검출하였다. 도 3B에 도시된 FACS 실험을 위해, E10 하이브리도마 세포를 세척하고, 90 μ L의 부피에서 500,000 세포/웰로 접종하였다. 이어서, 10 μ L의 피코에리트린 (PE)-표지된 GM-CSF (알앤디 시스템 (R&D System, 미국 미네소타주))을 각 웰에 첨가하고, 세포를 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 비표지된 GM-CSF 경쟁을 위해, 하이브리도마 세포를 5 μ g/mL 제조함 인간 GM-CSF (페프로테크)와 함께 실온에서 1시간 동안 예비-인큐베이팅하고, 3회 세척한 후, 상기한 분석과 같이 PE-GM-CSF와 함께 인큐베이팅하였다. 도 4에 도시된 FACS 실험을 위해, A431 및 A431-K5 세포 (트라 파스탄 박사 (Dr. Tra Pastan; 미국 국립 암 연구소 (National Cancer Institute))의 기증물)를 결합 버퍼 내에 희석시킨 10 μ g/mL의 C12 Mab 또는 정상 인간 IgM (잭슨 이뮤노리서치 래보라토리스)로 염색하고, 반응을 상기한 바와 같이 수행하였다.

[0173]

GM-CSF 중화 생물 검정. GM-CSF-의존 인간 적백혈병 세포주 TF-1 (ATCC)을 10 ng/mL 제조함 인간 GM-CSF (페프로테크)를 함유하는 완전 RPMI 1640 (상기 참조) 내에서 성장시켰다. 실험 전일에, TF-1 세포를 0.1% FBS 내에서 GM-CSF의 부재 하에 성장시켰다. 영양을 공급하지 않은 세포를 2회 세척하고, 분석 배지 내에 현탁하고, 96-웰 마이크로플레이트 내에 10,000 세포/웰의 농도로 접종하였다. 웰은 분석 배지, 100 pg/mL GM-CSF, 또는 도면 범례에 표시된 농도에서 시험 또는 이소형 대조군 Ig와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이팅한 GM-CSF를 함유하였다. 3일 후, 40 μ L의 Cell Titer 시약 (프로메가)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이팅하였다. 광학 밀도 (O.D.)를 분광광도계에서 490 nm에서 측정하고, 모든 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. GM-CSF 중화의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: $100 - (\text{Ig 존재시의 O.D.} / \text{Ig 비존재시의 O.D.} \times 100)$.

[0174]

항체 클래스-스위치. 하이브리도마 세포를 10 mL PBS로 1회 세척하고, 완전 RPMI에 재현탁시키고, 평저 96-웰 마이크로플레이트 내로 접종하고, 37°C에서 5% CO₂ 내에서 인큐베이팅하였다. 4일 후, 세포를 피펫팅에 의해 재현탁시키고, 100 μ L을 2.3 μ g/mL 염소 항-인간 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치)로 코팅된 20 ELISPOT 플레이트 (밀리포어 (Millipore, 미국 매사추세츠주))에 옮겼다. 조직 플레이트 내의 나머지 세포에 추가로 100 μ L의 완전 RPMI를 공급하였다. 철야 인큐베이션한 후, ELISPOT 플레이트를 0.05% Tween을 함유하는 PBS (PBST)로 3회 세척한 후, 100 μ L의 2 μ g/mL 염소 항-인간 IgG (H+L)-HRP를 첨가하고, 플레이트를 진탕하면서 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST로 3회 세척한 후, 100 μ L의 AEC 기질 용액 (시그마)을 웰에 첨가하고, 진탕하면서 90분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 기질을 흡인하고, 플레이트를 dH₂O로 세척하고, 공기 건조시켰다. 양성 스폿 (IgG 생산을 표시함)을 나타내는 웰의 클론을 팽창시켰다. IgG를 분비하는 단일-세포 콜로니가 확인될 때까지 양성 웰을 트래킹하면서 양성 클론을 1000, 100, 10 및 0.25 세포/웰로 재접종함으로써, 상기 단계를 순차적으로 반복하였다.

[0175]

중공 섬유 및 교반 생물반응기를 사용하는 발효. 세포를 글루코스 및 글루타민을 각각 6 g/L 및 4 mM에서 유지하는 1 L HyQCDM4N50 무혈청 배지 (하이클론 (HyClone, 미국 유타주))를 함유하는 2 L 생물반응기 (B Braun Stat B-DU) 내에 2.5×10^5 /mL로 접종하였다. 제어 설정값은 다음과 같았다: pH 7.1, 공기를 사용한 dO₂ 40% 포화, 온도 37°C, 및 교반 속도 80 rpm. 2 mL의 샘플을 매일 수확하여, 1 mL을 Cedex 장치를 사용하여 세포 계

수를 위해, 1 mL을 ELISA에 의해 Ig 농도를 측정하기 위해 사용하였다. 중공 섬유 실행을 위해, 10^8 개의 생존 세포를 15 mL의 완전 RPMI를 함유하는 FiberCell 시스템 (벨코 (Bellco), 미국 뉴저지주) 내에 접종하고, 50%의 글루코스가 소비될 때 1 리터의 신선한 배지를 함유하는 인라인 (inline) 저장기를 사용하여 재공급하였다.

[0176]

하이브리도마 세포주의 유전적 다양성을 증가시키기 위한 미스매치 수복 억제. 하이브리도마 세포를 완전 RPMI (음성 대조군), 또는 250 μ M 또는 500 μ M의 MMR-억제 안트라센 화합물을 함유하는 완전 RPMI 내에서 성장시켰다. 세포를 3 내지 4일마다 모세포에 존재하거나 또는 존재하지 않는 신선한 배지 내에 1:5의 희석 비율로 통과시키고, 3주 후 세포를 수확하고, FACS 버퍼 (1% BSA가 존재하는 PBS) 내에 2×10^6 세포/mL로 재현탁시켰다. 세포를 10 μ g/mL FITC-컨쥬게이팅된 염소 항-인간 Ig (잭슨 이뮤노리서치)로 얼음 상에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 10 mL 빙냉 FACS 버퍼로 세척하고, 3 mL FACS 버퍼 내에 재현탁시켰다. 10 μ L Viaprobe (벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)를 5분 동안 얼음 상에서 첨가하고, 생존 세포를 FACS Aria 세포 분류기 (벡톤 디킨슨) 상에서 높은 Ig 표면 염색에 대해 분류하였다. 게이트는 최고 Ig 표면 염색을 갖는 5% 하위집단을 나타내는 세포를 분류하기 위해 설정되었다. 역가가 향상된 클론의 선택을 위해, FACS 분류된 세포를 U자형 바닥 96 웰 플레이트에 접종하고, 1주 동안 37°C에서 5% CO₂ 내에서 인큐베이팅하였다. 50 μ L의 상등액을 웰로부터 수확하고, 염소 항-인간 IgM+G 코팅된 플레이트를 사용하는 ELISA를 통해 IgM 생산에 대해 분석하였다. 내부 대조물로서, 각각의 ELISA 플레이트의 3개의 웰을 50 μ L의 10 ng/mL 인간 IgM (잭슨 이뮤노리서치)으로 접종하였다. 450 nm에서 얻은 O.D. 값을 내부 대조 웰의 평균값에 대해 표준화하였다. 높은 IgM 신호를 나타내는 웰을 추가의 분석을 위해 팽창시켰다. 현미부수체 (microsatellite) 불안정성 (MSI) 분석을 위해, Qiagen DNeasy 조직 키트 (키아젠 (Qiagen))를 사용하여 모세포 또는 모세포-처리된 세포로부터 DNA를 추출하였다. BAT 폴리 A 리퍼트 마커 (7)를 D4 형광-표지된 BAT-26-F (5'-tcaccatccattgcacagt-3') (서열 20) 및 BAT-26-R (5'-ctgcgagaaggtactcaccc-3') (서열 21) 프라이머, pfuUltra™ 고충실도 폴리머라제 (스트라타젠 (Stratagene), 미국 캘리포니아주)를 사용하여 증폭시키고, 반응물을 다음과 같이 인큐베이팅하였다: 95°C에서 5분; 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 및 72°C에서 2분의 9 사이클, 어닐링 온도를 각 사이클마다 1°C 감소시킴; 94°C에서 1분, 52°C에서 1분 및 72°C에서 2분의 30 사이클; 72°C에서 10분의 최종 연장. 단일 카피의 마커 대립유전자는 단지 50%의 PCR 반응에서 앰플리콘을 생성시키는 DNA의 희석을 사용함으로써 얻었다. PCR 산물을 CEQ 샘플 로드 용액으로 1:10으로 희석한 후, 단편 분석을 위해 Beckman CEQ 8000 유전자 분석 시스템 내로 로딩하였다.

[0177]

항원-특이적 인간 MAb의 생성. 생체의 면역화는 상기 설명된 바와 같이 자발적인 대상 (건강한 공여자)으로부터 얻은 냉동-보관된 B-세포를 사용하여 수행하였다. 별법으로, B-세포를 혈청 내에 관심있는 항원에 특이적인 고역가의 MAb를 함유하는 인간 대상으로부터 얻었다. 후자 방법의 원리는 일부 항원-특이적 MAb가 비정상 면역 반응으로부터 생성되거나 (자가면역 환자의 경우와 같이), 종양, 미생물 또는 백신 항원에 대한 생체 내 면역 반응으로부터 유래할 수 있다는 가능성에서 유래한다.

[0178]

몇몇 항원-반응성 인간 MAb가 생체 외에서 면역화된 세포의 융합 후에 PAP 환자 B-세포로부터 생성된 하이브리도마 라이브러리로부터 확인되었다. 4개의 하이브리도마주, 즉 E5 (IgM), G7 (IgM), E10 (IgG) 및 G9 (IgG)를 추가의 연구를 위해 선택하고, 이들이 생산하는 인간 MAb를 ELISA에 의해 특이성에 대해 시험하였다. 도 1은 E5, G7 및 E10 인간 MAb만이 인간 GM-CSF와 반응하고, 인간 상동체와 53% 동일성을 갖는 뮤린 GM-CSF를 포함하여 시험된 다른 10개의 비관련 항원과는 반응하지 않았음을 보여준다. G9 하이브리도마에 대해 유사한 결과가 얻어졌다. 상기 인간 MAb의 특이성을 확인하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 인간 GM-CSF를 상이한 에피토프에서 인간 GM-CSF에 특이적인 막 결합된-MAB를 발현하는 마우스 하이브리도마 세포의 표면에 결합하도록 하였다. 형광 강도 이동으로 나타나는 바와 같이 (도 2A, 저변 패널), E5 MAb는 상기 조건 하에 상기 세포의 표면에 결합하였다. 상기 결과는 천연 인간 GM-CSF에 결합하는 E5 MAb의 능력을 입증하였다. 세포-결합된 GM-CSF의 부재 하에, E5 MAb는 상기 하이브리도마 세포에 의해 발현된 임의의 막 결합된 단백질과 교차-반응하지 않았다 (도 2A, 중간 패널). 이와 유사하게, E10 MAb는 FACS 분석을 통해 높은 특이성을 보였다. 또한, E10 MAb는 하이브리도마 세포 막에 회합되는 것으로 밝혀졌으므로, 가용형의 피코에리트린 (PE)-표지된 GM-CSF에 결합하는 그의 능력이 FACS에 의해 나타났다 (도 2B, 중간 패널). 결합 특이성은 과량의 비표지된 GM-CSF와 함께 E10 하이브리도마 세포를 예비-인큐베이팅함으로써 입증되었다 (도 2B, 하부 패널).

[0179]

인간 MAb의 드 노보 (de novo) 클래스-스위치. 상기 설명된 2가지 전략을 사용하여, 다양한 인간 및 비인간 항원에 대한 IgG 및 IgM 인간 MAb를 생성하였다. 시판되는 대부분의 치료 항체는 IgG 이소형의 것이지만, 잠재적인 치료적 IgM MAb를 시험하는 암 임상시험에서는 생체 내에서 종양의 퇴행을 보였다 (16, 17). 상기 임상 반

응은 보체 경로를 강하게 고정 및 활성화시키고 종양 세포를 효과적으로 사멸시키는 IgM의 능력에 의한 것일 수 있다. IgG는 대식세포 및 NK 세포 상의 Fc 수용체에 결합하고, 따라서 종양 세포에 대한 ADCC 활성을 매개할 수 있다. 동일한 특이성 (동일한 항원 및 에피토프)을 갖는 IgG 및 IgM 모두를 생체 내 최상의 약물학적 활성에 대해 시험할 수 있다. IgG 이소형이 바람직한 경우에, IgM의 드 노보 클래스-스위칭을 위한 신속한 확고한 과정 (물질 및 방법 참조)이 이어졌다. 예로서 E5주를 사용하여, 사용된 성장 조건 하에 IgG 이소형으로 클래스-스위칭된 세포의 하위세트를 확인하였다. E5 IgG는 그의 가변 구역에서 동일한 뉴클레오티드 서열을 나타내고, 모 E5 IgM과 유사한 GM-CSF에 대한 반응성 (도 3)을 나타냈다.

[0180]

인간 MAb의 생물학적 활성. 질병의 가용형 매개체를 표적화하는 치료 MAb에 대해 요구되는 약물학적 특성은 성장 인자를 중화시키는 능력을 포함한다. 상기 언급된 바와 같이, 그러한 하나의 예는 RA의 매개체로서 GM-CSF이다 (9-11). 인간 적혈구아형 세포 (TF1)의 성장이 그들의 배양 배지 내의 상기 시토킨의 존재에 의존적인 세포-기반 분석을 사용하는 GM-CSF 기능을 차단하는 인간 MAb의 능력을 평가하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, E10 및 G9는 모두 GM-CSF-의존 세포 성장을 유의하게 억제한 반면, 인간 IgG 이소형 대조군은 어떠한 영향도 보이지 않았다. E10과 G9 사이에 관찰된 효능의 차이는 각각 870 및 14 피코몰의 그들의 겔보기 친화도로 잘 상호관련된다. E5 MAb는 그의 보다 낮은 친화도 (5 nM)와 일치하여 최소 중화 활성만을 보였다.

[0181]

인간 MAb를 분비하는 하이브리도마의 역가 및 안정성의 평가. MAb 제조 세포주의 중요한 특성은 전체 배지 제조 사이클 동안 Ig 분비의 안정성이다. 사이클 지속시간이 약 2개월인 하나의 시나리오에서, 24시간마다 배가 되는 세포주는 해동부터 수확까지 약 60 세대에 이를 것이다. 본 발명의 방법을 이용하여 생성된 하이브리도마의 MAb 역가 및 생산 안정성을 시험하기 위한 모델로서 E5 세포주를 사용하였다. 상기 세포주로부터 유래된 클론인 3D2는 24시간의 배가 시간을 보였고, 2개월 초과 연속 배양 후 제한 희석에 의해 재-클로닝하였다. 클론을 생산하는 빈도는 세포 밀도에 대해 표준화된 그들의 조건화된 배지 내의 Ig 농도를 측정하여 ELISA를 통해 결정하였다. 도 5a는 시험한 모든 E5-3D2 서브클론이 고수준의 Ig를 분비하는 것을 보여주고, 이는 60 세대 후 상기 세포 집단에서 Ig 생산의 균질한 보유를 입증한다. 이어서, 소규모 (15 mL) 중공 섬유 시스템을 이용하여 Ig 생산을 평가하였다. 세포를 중공 섬유 카트리지에서 내에 접종하고, 1 리터의 신선한 배지를 함유하는 인라인 저장기를 사용하여 연속적으로 공급하였다. 5일에 시작하여, 카트리지에서부터 모든 조건화된 배지 (15 mL)를 매일 수확하고, 신선한 배지로 교체하였다. 발효를 추가로 4일 동안 수행하면서, 매일의 Ig 역가를 공지 농도의 Ig 표준물질을 사용하는 ELISA에 의해 결정하였다. 4일 실행 동안 1.2 g/L의 누적 역가를 기록하였다. 8일 내지 9일에, 글루코스 소비가 피크였고 (2 g/L/일), 이는 세포가 극히 높은 세포 밀도를 잘 견딘다는 것을 나타낸다. 생산 성능을 또한 교반 생물반응기 시스템을 사용하는 1-리터 규모 유가식 실행으로 평가하였다. 동결 애플로부터 세포를 먼저 해동하고, 진탕 플라스크 내에 접종하고, 나중에 1 리터의 무혈청 배지를 함유하는 교반 생물반응기 (바우어 (Bauer)) 내에 접종하였다. 세포 생존력이 60% 미만으로 떨어질 때까지 (6일) 발효를 수행하였다. Ig 생산 및 세포 밀도를 1일 내지 5일에 기록하였고, 도 5b에 도시한다. 대수 증식기 (1-4일) 동안, 배가 시간이 평균 23.4시간인 24 pg/세포/일의 특이적 생산성이 측정되었고, 이는 보다 고역가를 유지하면서 플라스크로부터 생물반응기까지 상기 세포의 우수한 확장성을 제안한다.

[0182]

미스매치 수복 조절을 통한 인간 MAb를 분비하는 하이브리도마의 유전적 최적화. MMR의 일시적 조절을 수반하는 형태 발생 (morphogeny)으로 명명한 과정을 이용하여 MAb-생산 세포주의 품질을 개선하는 유용성이 이전에 입증되었다 ([Nicolaidis et al., (1995) Genomics 30:195-206]; 및 [Nicolaidis et al., (1998) Mol. Cell Biol. 18:1635-41]). 상기 방법을 사용하여 세포 풀의 유전적 다양성을 증가시킨 후, 보다 고역가의 친화도 ([Grasso et al. (2004) Bioprocess Int. 2:58-64]; 및 [Nicolaidis et al., (2005) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1059:1-11]), 또는 향상된 성장률 (Grasso, L. 개인적인 관찰)을 보이는 서브클론을 확인하기 위해서 초고속 스크리닝을 수행하였다. 하이브리도마 전략을 이용하여 생성시킨 MAb-분비 세포주에서 표현형 다양성을 증가시키는 능력을 입증하기 위해, E5 세포를 형태 발생시켰다. BAT 폴리-A 리피트 마커에서 현미부수체 불안정성 (MSI)을 검출함으로써 MMR 억제를 모니터링하였다. 형태 발생 과정에 노출시킨 세포에서 분석된 24개의 BAT 대립유전자 중에서, 3개의 대립유전자는 도 6A에 나타난 단일 뉴클레오티드 결실, 및 삽입을 포함하는 변형을 보였다. 모 세포 내의 임의의 24개의 BAT 대립유전자에서 MSI는 검출되지 않았다. 후속적으로, 모세포 또는 형태 발생-처리된 세포를 마이크로플레이트에서 제한 희석에 의해 접종하였다. 세포 클론을 1주 동안 MAb를 분비하도록 하고, 그들의 조건화된 배지를 Ig 농도에 대해 ELISA에 의해 분석하였다. O.D.가 1을 초과하는 (높은 Ig 분비) 클론의 빈도를 스크리닝된 클론의 총 수로부터 결정하였고 (모세포에 대해 3,763 및 모세포에 대해 2,437), 형태 발생-처리된 집단에서 260% ($p = 0.0014$) 증가한 것으로 밝혀졌다 (도 6B).

[0183]

요약

- [0184] 상기 연구는 미스매치 수복의 억제와 조합된, 최적화된 생체의 면역화 및 인간 B-세포 불멸화 과정을 이용하여 면역요법을 위해 인간 MAb를 개발하기 위한 실행가능한 전략을 나타낸다. 상기 방안으로, 안정한 하이브리도마 세포주에 의해 분비된 고도로 특이적인 생물학적 활성 MAb를 생성할 수 있다.
- [0185] 본 발명의 방법에 따라, 4-일 중공 섬유 발효 실행 동안 60 초과의 배가 및 1 g 초과의 MAb/l의 생산이라는 안정한 MAb 생산이 달성되었고, 이는 본 발명의 방법에 의해 생성된 하이브리도마 세포가 관류 시스템 및 잠재적으로 대규모 제조에 적합함을 제안한다. 또한, 상기 공정으로 생성된 하이브리도마는 유가식 생물반응기 실행으로 잘 수행하였고, 이는 상업적인 용도를 위한 상기 세포주의 잠재적인 용도를 제안한다. 요약하면, 본원에 제시된 플랫폼 공정은 면역치료 용도를 위한 우수한 품질의 완전 인간 항체의 신속하고 비용-효과적인 개발을 위한 대체적인 방안을 제공한다.
- [0186] **실시예 2**
- [0187] **완전 인간 항-GM-CSF 항체의 생성; PAP 세포의 단리**
- [0188] 성인 인간 폐포 단백증 (PAP)의 환자는 폐포 내에 인지질 및 계면활성 단백질을 축적한다. PAP는 과도한 계면활성제를 청소하는 폐포 대식세포 및 타입 II 상피 세포의 능력 결여로 인한 것으로 가정되었다. 상기 설명된 바와 같이, 폐 계면활성제 항상성의 제어에서 GM-CSF에 대한 역할은 무린 모델에서 확립되었고, 이를 확장하면 인간 병태의 원인이다. 또한, PAP 환자는 GM-CSF에 대한 순환성 중화 항체를 갖는 것으로 나타났고, 그에 의해 상기 시토킨을 질병의 원인으로 시사한다. 상기 자가면역 반응이 GM-CSF에 특이적인지 여부는 불분명하다. 그러나, PAP 환자의 하위집단이 GM-CSF 요법으로 개선되는 것으로 나타났고, 이는 유전자 파괴 또는 항체-매개 중화에 의한 GM-CSF의 부재가 PAP를 발병시킨다는 가설을 지지한다.
- [0189] **GM-CSF-특이적 항체의 단리.** 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 PAP 환자로부터 단리하였다. 간단히 설명하면, PAP 환자의 B 세포를 전혈로부터 수거하였다. 전혈을 동일 부피 PBS-/로 희석하고, 용기를 뒤집어 내용물을 부드럽게 혼합하였다. 25 ml의 희석 혈액을 25 ml Ficoll-Paque (아머삼 바이오사이언시즈 에이비 (Amersham Biosciences AB, 스웨덴 읍살라))를 함유하는 50 ml 튜브 상에 깔았다. 튜브를 2,000 rpm에서 30분 동안 실온에서 원심분리하였다. 10-ml 피펫을 사용하여 계면층으로부터 PBMC를 수집하고, 새로운 50-ml 튜브로 옮기고, PBS-/로 2회 세척하였다. PBMC 펠렛을 10 ml ACK 용해 버퍼 (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2) 버퍼 내에 재현탁시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하여, 적혈구를 용해시키고, PBS-/로 2회 세척하였다.
- [0190] **PAP B-세포와 골수종 세포주의 융합에 의한 하이브리도마의 생성.** PAP 환자로부터의 농축된 B 세포를 다음 방법에 의해 다양한 골수종 세포 (인간-마우스 이종하이브리도마 (ATCC, 미국 버지니아주)); CBF-7 세포 (인간-마우스 이종하이브리도마); HEK293; 인간 골수종 세포)에 융합시켰다. B 세포 및 융합 파트너 세포는 우수한 생존력을 가져야 한다 (대수 증식기에 $\geq 90\%$ 생존). 원래의 배지 내의 두 세포 종류를 계수하고, 15 ml 튜브 내에서 1:1 비로 혼합한 후, 1,000 RPM에서 6분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 세포를 10-15 ml의 냉 CPFM (CYTOPULSE 융합 배지, 사이토 펄스 사이언시즈)을 사용하여 3회 세척하였다. 최종 펠렛을 10×10^6 세포/ml CPFM 내에 재현탁시켰다. CYTOPULSE CEEF-50 (사이토 펄스 사이언시즈)을 사용하여 전기-융합을 수행하였다. 융합 파라미터는 제조사 및 실험 지침에 따라 최적화하고, 융합 효율은 펄싱된 5,000개 세포에서 하나의 하이브리드로 평균하였다. 융합 후, 세포를 평저 96-웰 마이크로플레이트 내에서 10% 열 불활성화된 FBS, 100 μ M 히포잔틴, 0.4 μ M 아미노프테린 및 16 μ M 티미딘 (HAT, 시그마)를 함유하는 완전 RPMI 내에 ~5,000 세포/웰로 접종하였다. 배지를 매주 교체하고, 항원 반응성의 완료까지 HAT 선택을 유지하였다.
- [0191] **ELISA 스크리닝 분석.** 항원-반응 MAb의 확인을 위해, ELISA-기반 스크리닝을 플레이트 세척기 및 분광광도계와 통합된 BIOMEK FX 액체 취급 시스템을 사용하여 로봇식으로 수행하였다. 간단히 설명하면, 미량역가관을 코팅 버퍼 (50 mM 탄산염-중탄산염, pH 9.4) 내에 희석된 50 μ l/웰의 실험실내 생산된 재조합 항원 (1 μ g/mL GM-CSF)으로 실온에서 6시간 동안 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 결합 버퍼 (3% BSA (시그마) 및 0.05% Tween 20 (바이오라드)을 함유하는 PBS)로 2시간 동안 실온에서 차단시켰다. 플레이트를 세척 버퍼 (0.05% Tween 20 함유 PBS)으로 1회 세척하고, 50 μ l/웰의 하이브리도마 상등액을 ELISA 플레이트 내로 옮겼다. 결합 반응은 실온에서 2시간 동안 수행되었다. 후속적으로, 플레이트를 4회 세척하고, 결합 버퍼 내에 1:10,000으로 희석시킨 100 μ l의 HRP-컨쥬게이션된 염소 항-인간 IgG+m (잭슨 면역로리서치 레보라토리스)을 첨가하고, 반응을 실온에서 1.5시간 동안 수행하였다. 마지막으로, 플레이트를 4회 세척하고, 100 μ l/웰의 SUREBLUE 기질 (케이피엘)을 10분 동안 첨가하였다. 50 μ l/웰의 1 N 황산을 사용하여 반응을 중지시키고, 450 nm에서 흡광도를 결정하였다.

[0192] **FACS 분석 및 분류.** 모든 연구에서, Ig 결합 및 세포 세척 단계를 빙냉 결합 버퍼 (칼슘 또는 마그네슘, 0.5% BSA를 함유하지 않는 DPBS)를 사용하여 수행하였다. PBMC 또는 하이브리도마 세포를 세척하고 500,000 세포/웰로 접종하였다. FITC 및 피코에리트린(PE)-표지된 항-인간 CD3, CD19, CD20 (서던바이오테크) 및 PE-표지된 GM-CSF (알앤디 시스템)를 첨가하고 (10-100 희석), 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 결합 버퍼로 3회 세척하고, FACSARIA 장치 (비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 분석 또는 분류하였다. Mab E10의 이소형 분석의 결과를 도 9에 도시한다. E10의 이소형을 결정하기 위해, 이소형을 유도하기 위해 항-인간 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, Lκ 및 Lλ Fc 특이적 항체를 사용하여 표준 분석을 수행하였다.

[0193] **GM-CSF 중화 생물 검정.** 인간 GM-CSF-의존 인간 적백혈병 세포주 TF-1 (ATCC)을 10 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (페프로테크)를 함유하는 완전 RPMI 1640 (상기 참조) 내에서 성장시켰다. 실험 전일에, TF-1 세포를 0.5% FBS 내에서 GM-CSF의 부재 하에 성장시켰다. 영양을 공급하지 않은 TF-1 세포를 수확하고, 분석 배지 (0.5% BSA가 존재하는 보통 RPMI)로 2회 세척하였다. 세포를 분석 배지 내에 재현탁시키고, 96-웰 마이크로플레이트 내에 10,000 세포/웰의 농도로 접종하였다. 웰은 분석 배지, 100 pg/mL GM-CSF, 또는 도면에 표시된 농도에서 시험 또는 이소형 대조군 Ig와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이팅한 GM-CSF를 함유하였다. 3일 후, 40 μL의 Cell Titer 시약 (프로메가)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이팅하였다. 광학 밀도 (O.D.)를 분광광도계에서 490 nm에서 측정하고, 모든 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. GM-CSF 중화의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: $100 - [(Ig \text{ 존재시의 } O.D. / Ig \text{ 비존재시의 } O.D.) \times 100]$. 도 4는 완전 인간 Mab를 사용한 TF-1 세포주의 GM-CSF-의존 성장 억제율 입증한다.

[0194] **하이브리도마 세포주의 유전적 다양성을 증가시키기 위한 미스매치 수복 억제.** 미스매치 수복의 억제는 생산, 세포 성장 또는 항체 활성이 향상된 유전적으로 다양한 자손 세포를 만들 수 있다. Mab 활성 및 세포 성장을 개선하기 위해, 하이브리도마 세포를 완전 RPMI (음성 대조군), 또는 250 μM 또는 500 μM의 미스매치 수복 억제제 모르포센 (9,10-디메틸 안트라센, 엠피 바이오메디칼스 (MP Biomedicals, 미국 캘리포니아주))를 함유하는 완전 RPMI 내에서 성장시켰다. 세포를 3 내지 4일마다 모르포센이 존재하거나 또는 존재하지 않는 신선한 배지 내에 1:5의 희석 비율로 통과시키고, 3주 후 세포를 수확하고, FACS 버퍼 (1% BSA가 존재하는 PBS) 내에 2×10^6 세포/mL로 재현탁시켰다. 세포를 10 μg/mL FITC-컨쥬게이팅된 염소 항-인간 Ig (잭슨 이뮤노리서치)로 얼음 상에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 10 mL 빙냉 FACS 버퍼로 세척하고, 3 mL FACS 버퍼 내에 재현탁시켰다. 10 μL VIAPROBE (백톤 디킨슨)를 5분 동안 얼음 상에서 첨가하고, 생존 세포를 FACSARIA 세포 분류기 (백톤 디킨슨) 상에서 높은 Ig 표면 염색에 대해 분류하였다. 게이트는 최고 Ig 표면 염색을 갖는 5% 하위집단을 나타내는 세포를 분류하기 위해 설정되었다. 상기 집단을 미스매치 수복 (MMR)의 화학 억제제의 존재 또는 부재 하에 1주 동안 팽창시키고, 과정을 2회 더 반복하였다. 역가가 향상된 클론의 선택을 위해, FACS 분류된 세포를 U자형 바닥 96 웰 플레이트에 200 μL 완전 RPMI 내에 0.8 세포/웰로 접종하였다. 플레이트를 1주 동안 37°C에서 5% CO₂ 내에서 인큐베이팅하였다. 50 μL의 상등액을 웰로부터 수확하고, 염소 항-인간 IgM+G 코팅된 플레이트를 사용하는 ELISA를 통해 IgM 생산에 대해 분석하였다. 내부 대조물로서, 각각의 ELISA 플레이트의 3개의 웰을 50 μL의 10 ng/mL 인간 IgM (잭슨 이뮤노리서치)으로 접종하였다. 450 nm에서 얻은 O.D. 값을 내부 대조 웰의 평균값에 대해 표준화하였다. 높은 IgM 신호를 나타내는 웰을 추가의 분석을 위해 팽창시켰다. MSI 분석을 위해, Qiagen DNeasy 조직 키트 (쿼이겐)를 사용하여 모세포 또는 MMR 억제제-처리된 세포로부터 DNA를 추출하였다. BAT 폴리 A 리피트 마커를 D4 형광-표지된 mBAT-26-F (5'-tcaccatccattgcacagtt-3') (서열 20) 및 mBAT-26-R (5'-ctgcgagaaggtactcacc-3') (서열 21) 프라이머, pfuUltra™ 고충실도 폴리머라제 (스트라타젠)를 사용하여 증폭시키고, 반응물을 다음과 같이 인큐베이팅하였다: 95°C에서 5분; 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 및 72°C에서 2분의 9 사이클, 어닐링 온도를 각 사이클마다 1°C 감소시킴; 94°C에서 1분, 52°C에서 1분 및 72°C에서 2분의 30 사이클; 72°C에서 10분의 최종 연장. 단일 카피의 마커 대립유전자는 단지 50%의 PCR 반응에서 앰플리콘을 생성시키는 DNA의 희석을 사용함으로써 얻었다. PCR 산물을 CEQ 샘플 로드 용액으로 1:10으로 희석한 후, 단편 분석을 위해 Beckman CEQ 8000 유전자 분석 시스템 내로 로딩하였다 (Blake et al., Stepwise deletions of polyA sequences in mismatch repair-deficient colorectal cancers. (2001) Am. J. Pathol. 158:1867-70).

[0195] **실시예 3**

[0196] **GM-CSF에 대한 높은 특이성을 갖는 모노클로날 항체 E10의 생성**

[0197] 몇몇 항체는 PAP 환자의 B 세포로부터 유도되었다. 상기 항체는 IgM, IgG 이소형의 것이었다. 각각의 상기 항체는 본원에 설명된 특이성에 대한 분석을 이용하여 GM-CSF에 특이적으로 결합하는 것으로 밝혀졌다. 하나의

항-GM-CSF 인간 IgG1 모노클로날 항체 E10은 골수종 세포와 융합한 후 상기 설명된 바와 같이 ELISA에 의해 항-인간 GM-CSF 모노클로날 항체에 대해 스크리닝한 페로 단백질증 (PAP) 환자의 B 세포로부터 생성되었다.

[0198]

PAP 환자로부터의 혈액 (91 ml 전혈)을 사용하여 총 4,950만 개의 PBMC를 분리하였다. 상기 세포의 생존력은 99.0%이었다. FACS 분석의 결과를 표 2에 나타낸다. 약 2,500만 개의 PBMC를 지지 세포와 함께 IL-4 2 ng/ml (페프로테크), 트랜스페린 50 µg/ml (시그마), PMA 5 ng/ml (시그마) 및 시클로스포린 A 0.5 µg/ml (시그마)가 존재하는 cRPMI1640 (10 ml) 내에서 배양함으로써 B 세포를 팽창시켰다. 배양 11일 후, 1,200만 개의 세포가 유지되었고, 후속적으로 전기-융합 (CytoPulse CEEF-50)에 의해 골수종 세포와 융합시켰다. FACS 분석 결과를 표 2에 나타낸다.

표 2

[0199]

E10 모노클로날 항체의 생성 및 FACS에 의한 분석

	FITC-CD3(%)	FITC-CD20(%)	PE-GMCSF(%)	CD20/GMCSF
PBMC	62.6	14.4	5.9	6.3
11일 배양	77.2	17.0	0.7	0.1

[0200]

융합된 세포를 열 불활성화된 10% FBS (제이알에이치 바이오사이언시즈); L-글루타민 200 mM (인비트로젠); 비-필수 아미노산 10 mM (인비트로젠); 피루브산나트륨 용액 100 mM (인비트로젠); Pen-Strep (인비트로젠); 2-머캅토에탄올 55 mM (인비트로젠); 및 1x HAT (시그마)가 존재하는 RPMI 1640 (인비트로젠) 내에서 배양하였다.

[0201]

12일 배양한 후, 하이브리도마 배양액의 약 48%가 성장을 보였다. 이어서, 하이브리도마를 재조합 GM-CSF (페프로테크)를 사용하는 GM-CSF 특이적 ELISA를 이용하여 스크리닝하였다. GM-CSF에 대해 양성인 것을 포함하여 몇몇 클론이 분리되었다. 상기 클론을 재조합 GM-CSF에 특이적이고 과상포 독소 (TT)에 특이적이지 않은 것을 확인하기 위해 ELISA에 의해 다시 시험하였다. 클론 4E10은 GM-CSF와 특이적으로 반응하지만, TT와 특이적으로 반응하지 않은 것으로 나타났다. 클론 4E10을 후속적으로 서브클로닝하였다. 3주 후, 배양된 서브클론을 GM-CSF에 대한 특이성이 유지되는지 확인하기 위해 ELISA에 의해 스크리닝한 후, 하기 설명한 바와 같이 추가로 특성화하였다.

[0202]

E10의 특성화. 항-GM-CSF 항체 E10의 특이성을 결정하기 위해, 일정 범위의 항원을 사용하여 항원-특이적 ELISA를 수행하였다 (도 8). 도 8은 항원, 즉 hIL-1a, hIL-2, hIL-3, hIL-4, hIL-5, IL-6, hIL-13, hGM-CSF, mGM-CSF, BSA 및 TT에 대한 결합을 비교한다. 후속 연구에서, 항-GM-CSF 항체의 결합을 인간 GM-CSF, 인간 메조텔린, SEB, BGG, CAB, HEL, TT, BSA, 염소 IgG, 인간 뮤신 및 마우스 IgG (테이타 비제시)에 비교하였다. 두 연구에서, 4E10은 인간 GM-CSF와만 반응하였다.

[0203]

E10의 이소형을 결정하기 위해, 이소형을 유도하기 위해 항-인간 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, Lκ 및 Lλ를 사용하여 표준 분석을 수행하였다. 상기 분석은 4E10이 IgG1 및 카파 항체임을 증명하였다 (도 9 참조).

[0204]

GM-CSF의 생물학적 활성을 시험관 내에서 중화시키는 E10의 능력을 생존 및 성장을 위해 상기 시토킨에 의존성인 세포주 TF-1을 사용함으로써 시험하였다 (도 8 참조). 인간 GM-CSF-의존 인간 적백혈병 세포주 TF-1 (ATC C)을 10 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (페프로테크)를 함유하는 완전 RPMI 1640 내에서 성장시켰다. 실험 전일에, TF-1 세포를 0.1% FBS 내에서 GM-CSF의 부재 하에 성장시켰다. 영양을 공급하지 않은 TF-1 세포를 수확하고, 분석 배지 (0.5% BSA가 존재하는 보통 RPMI)로 2회 세척하였다. 세포를 분석 배지 내에 현탁시키고, 96-웰 마이크로플레이트 내에 10,000 세포/웰의 농도로 접종하였다. 웰은 분석 배지, 100 pg/mL GM-CSF, 또는 20 µg/mL 내지 0.315 µg/mL의 농도에서 시험 또는 이소형 대조군 Ig와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이팅한 GM-CSF를 함유하였다. 3일 후, 40 µL의 CELL TITER 시약 (프로메가)를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이팅하였다. 광학 밀도 (O.D.)를 분광광도계에서 490 nm에서 측정하고, 모든 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. GM-CSF 중화의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: $100 - [(Ig \text{ 존재시의 } O.D. / Ig \text{ 비존재시의 } O.D.) \times 100]$. 항체 4E10은 100 pg/mL의 농도에서 GM-CSF의 활성을 시험관 내에서 중화할 수 있다.

[0205]

항체가 인간 재조합 GM-CSF와 교차-반응할지 결정하기 위해 E10을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, E10은 환원 조건 하에 인간 GM-CSF와 교차-반응한다.

[0206]

E10의 결합 친화도를 결정하기 위해, BIACORE 분석을 다음과 같이 수행하였다. E10에 대한 결합 상수는 약 870 pM이다 (도 11).

- [0207] 실시예 4
- [0208] GM-CSF에 대한 높은 특이성을 갖는 모노클로날 항체 G9의 생성
- [0209] 항-GM-CSF 인간 IgG1 모노클로날 항체 G9를 K6 또는 CBF-7과 융합한 후, 상기 설명된 바와 같이 ELISA에 의해 항-인간 GM-CSF 모노클로날 항체에 대해 후속적으로 스크리닝한 폐포 단백증 (PAP) 환자의 B 세포로부터 생성하였다.
- [0210] PAP 환자로부터의 혈액 (91 ml 전혈)을 사용하여 총 4,950만 개의 PBMC를 분리하였다. 상기 세포의 생존력은 99.0% (데이타 비제시)이었다. 약 2,500만 개의 PBMC를 지지 세포와 함께 IL-4 2 ng/ml (페프로테크); 트랜스페린 50 µg/ml (시그마); PMA 5 ng/ml (시그마); 및 시클로스포린 A 0.5 µg/ml (시그마)가 존재하는 cRPMI1640 (10 ml) 내에서 배양함으로써 B 세포를 팽창시켰다. 배양 11일 후에, 1,200만 개의 세포가 유지되었고, 후속적으로 전기-융합 (CytoPulse CEEF-50)에 의해 골수종 세포에 융합시켰다.
- [0211] 융합된 세포를 열 불활성화된 10% FBS (제이알에이치 바이오사이언시즈); L-글루타민 200 mM (인비트로젠); 비필수 아미노산 10 mM (인비트로젠); 피루브산나트륨 용액 100 mM (인비트로젠); Pen-Strep (인비트로젠); 2-머캅토에탄올 55 mM (인비트로젠); 및 1x HAT (시그마)가 존재하는 RPMI 1640 (인비트로젠) 내에서 배양하였다.
- [0212] 배양 12일 후, 하이브리도마 배양액의 약 48%가 성장을 보였다. 이어서, 하이브리도마를 재조합 GM-CSF (페프로테크)를 사용하는 GM-CSF-특이적 ELISA를 사용하여 스크리닝하였다. GM-CSF에 대해 양성인 것을 포함하여 몇몇 클론이 분리되었다. 상기 클론을 재조합 GM-CSF에 대해 특이적이고 과상포 독소 (TT)에 대해 특이적이 아님을 확인하기 위해 ELISA에 의해 다시 시험하였다. G9 집단은 GM-CSF와 높은 특이적 반응성을 보였지만, TT에 대해서는 보이지 않았다. 이어서, G9 집단을 서브클로닝하여 순수 배양액을 얻었다. 3주 후, 배양된 서브클론을 GM-CSF에 대한 특이성이 유지되는지 확인하기 위해 ELISA에 의해 스크리닝한 후, 하기 설명한 바와 같이 추가로 특성화하였다.
- [0213] **G9의 특성화.** 항-GM-CSF 항체 G9의 특이성을 결정하기 위해, 일정 범위의 항원을 사용하여 항원 특이적 ELISA를 수행하였다 (도 8). 도 8은 항원, 즉 hIL-1a, hIL-2, hIL-3, hIL-4, hIL-5, IL-6, hIL-13, hGM-CSF, mGM-CSF, BSA 및 TT에 대한 결합을 비교한다. 후속 연구에서, 항-GM-CSF 항체의 결합을 인간 GM-CSF, 인간 메조텔린, SEB, BGG, CAB, HEL, TT, BSA, 염소 IgG, 인간 뮤신 및 마우스 IgG (데이타 비제시)에 비교하였다. 두 연구에서, G9는 인간 GM-CSF와만 반응하였다.
- [0214] G9의 이소형을 결정하기 위해, 이소형을 유도하기 위해 항-인간 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, Lκ 및 Lλ를 사용하여 표준 분석을 수행하였다. 상기 분석은 G9가 IgG1 및 카파 항체임을 입증하였다 (도 12).
- [0215] **G9 중화 생물 검정.** GM-CSF의 생물학적 활성을 시험관 내에서 중화시키는 G9의 능력을 생존 및 성장을 위해 상기 시토킨에 의존성인 세포주 TF-1을 사용함으로써 시험하였다 (도 4). 인간 GM-CSF-의존 인간 적백혈병 세포주 TF-1 (ATCC)을 10 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (페프로테크)를 함유하는 완전 RPMI 1640 내에서 성장시켰다. 실험 전일에, TF-1 세포를 0.1% FBS 내에서 GM-CSF의 부재 하에 성장시켰다. 영양을 공급하지 않은 TF-1 세포를 수확하고, 분석 배지 (0.5% BSA가 존재하는 보통 RPMI)로 2회 세척하였다. 세포를 분석 배지 내에 현탁시키고, 96-웰 마이크로플레이트 내에 10,000 세포/웰의 농도로 접종하였다. 웰은 분석 배지, 100 pg/mL GM-CSF, 또는 20 µg/mL 내지 0.315 µg/mL의 농도에서 시험 또는 이소형 대조군 Ig와 함께 1시간 동안 예비-인큐베이팅한 GM-CSF를 함유하였다. 3일 후, 40 µL의 CELL TITER 시약 (프로메가)를 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 추가로 인큐베이팅하였다. 광학 밀도 (O.D.)를 분광광도계에서 490 nm에서 측정하고, 모든 샘플로부터 배지 배경을 감하였다. GM-CSF 중화의 백분율을 다음과 같이 계산하였다: $100 - [(Ig \text{ 존재시의 } O.D. / Ig \text{ 비존재시의 } O.D.) \times 100]$. 항체 G9는 100 pg/mL의 농도에서 GM-CSF의 활성을 시험관 내에서 중화할 수 있다.
- [0216] 항체가 인간 재조합 GM-CSF와 교차-반응할지 결정하기 위해, G9를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, G9는 환원 조건 하에 인간 GM-CSF와 교차-반응한다.
- [0217] G9의 결합 친화도를 결정하기 위해, 상기한 바와 같이 BIACORE 분석을 수행하였다. G9에 대한 결합 상수는 약 11 - 17 pM이다 (도 13).
- [0218] 실시예 5
- [0219] 완전 인간 항-GM-CSF 항체 G9 및 E10을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

[0220]

항체 G9. 완전 인간 항-GM-CSF 항체 G9에 대한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 표준 방법에 의해 얻었다. 간단히 설명하면, 제조사의 지시에 따라 Trizol 시약 (인비트로젠)을 사용하여 하이브리도마 G9로부터 총 RNA를 단리하였다. 메세지를 제조사의 지시에 따라 Superscript II 역전사효소 (인비트로젠)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 경쇄 및 중쇄 가변 구역을 증폭시키기 위해, 경쇄에 대해 프라이머 서열 22와 서열 23 및 중쇄에 대해 서열 24와 서열 25를 사용하여 Herculanase DNA 폴리머라제 (스트라타젠)를 사용하는 PCR 반응을 수행하였다. PCR 산물을 pCR4-TOPO 벡터 (인비트로젠) 내로 클로닝하고, 이. 콜라이 Mach1 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 LB 카나마이신 플레이트 상에서 선택하였다. 콜로니를 위에서와 동일한 프라이머 쌍을 사용하여 삽입을 위해 스크리닝하고, 각각 4개의 양성 콜로니를 사용하여 TempliPhi 시약 (지이 헬스케어 (GE Healthcare))를 사용하여 DNA 서열 결정을 위한 주형 DNA를 생성하였다. DNA 삽입체를 프라이머 서열 26과 서열 27을 사용하여 Beckman Coulter DTCs 서열결정 시약을 사용하여 서열결정한 후, Beckman Coulter CEQ2000 상에서 데이터 획득 및 분석하였다. 리더 펩티드 서열을 경쇄에 첨가하기 위해, 양성 클론을 Herculanase DNA 폴리머라제를 사용하여 프라이머 서열 28과 서열 23을 사용하여 재증폭시켰다. 리더 펩티드 서열을 포함하는 전장 중쇄 (서열 11)를 생성하기 위해, 주형으로서 원래의 cDNA를 사용하여 프라이머 서열 29와 서열 30을 사용하여 PCR을 수행하였다. 생성되는 PCR 산물을 TA 클로닝하고, Mach1 세포 내로 형질전환시키고, 양성 클론을 상기 설명된 바와 같이 확인하였다. TempliPhi 시약을 사용하여 생성한 주형 DNA를 사용하여 프라이머 서열 25, 서열 26, 서열 31, 서열 32, 서열 33, 서열 34, 서열 27 및 서열 30을 사용하여 전장 G9 중쇄 cDNA의 서열을 결정하였다. G9에 대한 전장 중쇄 (서열 11)와 G9에 대한 전장 경쇄 (서열 15)에 대한 생성되는 DNA 서열을 아래에 나타낸다. 서열 11과 서열 15로부터 유도된 예측된 번역 산물을 각각 서열 9와 서열 13에 나타낸다. 서열 10과 서열 14로부터 유도된 예측된 번역 산물을 각각 서열 8과 서열 12에 나타낸다. 서열 11과 15의 밑줄친 서열은 PCR에 의해 첨가된 리더 서열을 나타낸다. 서열 10과 14의 폴리뉴클레오타이드 서열은 첨가된 리더 서열 없이 각각 G9 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩한다. 서열 9와 13의 소문자 서열은 PCR 반응에 의해 첨가된 인간 리더 펩티드를 나타낸다. 서열 8, 9, 12 및 13의 밑줄친 서열은 CDR 구역을 나타낸다. 서열 8, 9, 12 및 13의 나머지 서열은 가변 구역 및 불변 구역의 프레임워크이다. 중쇄의 불변 구역은 아미노산 서열 WGQG (서열 8의 아미노산 111 또는 서열 9의 아미노산 130)로 시작하고, 경쇄의 불변 구역은 아미노산 서열 FGQG (서열 12의 아미노산 98 또는 서열 13의 아미노산 117)로 시작한다.

[0221]

항체 E10. 완전 인간 항-GM-CSF 항체 E10에 대한 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 표준 방법에 의해 얻었다. 간단히 설명하면, 제조사의 지시에 따라 Trizol 시약 (인비트로젠)을 사용하여 하이브리도마 E10으로부터 총 RNA를 단리하였다. 메세지를 제조사의 지시에 따라 Superscript II 역전사효소 (인비트로젠)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 경쇄 및 중쇄 가변 구역을 증폭시키기 위해, 경쇄에 대해 프라이머 서열 22와 서열 23 및 중쇄에 대해 서열 24와 서열 25를 사용하여 Herculanase DNA 폴리머라제 (스트라타젠)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 산물을 pCR4-TOPO 벡터 (인비트로젠) 내로 클로닝하고, 이. 콜라이 Mach1 세포 내로 형질전환시키고, 형질전환체를 LB 카나마이신 플레이트 상에서 선택하였다. 콜로니를 위에서와 동일한 프라이머 쌍을 사용하여 삽입을 위해 스크리닝하고, 각각 4개의 양성 콜로니를 사용하여 TempliPhi 시약 (지이 헬스케어)를 사용하여 DNA 서열 결정을 위한 주형 DNA를 생성하였다. DNA 삽입체를 프라이머 서열 26과 서열 27을 사용하여 Beckman Coulter DTCs 서열결정 시약을 사용하여 서열결정한 후, Beckman Coulter CEQ2000 상에서 데이터 획득 및 분석하였다. E10에 대한 중쇄 가변 구역 (서열 17) 및 E10에 대한 전장 경쇄 (서열 19)를 코딩하는 생성되는 DNA 서열을 아래에 나타낸다. 서열 17과 서열 19로부터 유도된 예측된 번역 산물을 각각 서열 16과 서열 18에 나타낸다. 서열 16과 18의 밑줄친 서열은 CDR 구역을 나타낸다. 서열 16과 18의 나머지 서열은 가변 구역 및 불변 구역의 프레임워크이다. 중쇄의 불변 구역은 아미노산 서열 WGQG (서열 16의 아미노산 115)로 시작하고, 경쇄의 불변 구역은 아미노산 서열 FGQG (서열 18의 아미노산 98)로 시작한다.

[0222]

실시예 6

[0223]

항-GM-CSF 항체의 에피토프 매핑

[0224]

G9가 결합하는 GM-CSF의 에피토프를 매핑하기 위해, 인간 GM-CSF의 길이에 걸치는 일련의 겹치는 펩티드를 생성하였다 (도 14). 간단히 설명하면, 25개의 인간 GM-CSF 서열을 포함하는 겹치는 12량체 펩티드 (GenBank 기탁 #AAA52578, 잔기 14 내지 144)를 7개의 아미노산 오버랩을 함유하도록 설계하였다. 펩티드는 각각의 펩티드의 C-말단을 유도체화된 셀룰로스 막의 표면에 부착하는 것을 통해 고체상 합성에 의해 3.7 mm X 3.7 mm의 개별 스폿으로서 생성되었다 (SPOT 기술, 시그마 제노시스 (Sigma Genosys)). 어떠한 펩티드가 G9와 교차-반응하는지 결정하기 위해 표준 웨스턴 블롯 분석을 사용하였다 (도 15). 셀룰로스 막을 메탄올에 적시고, 차단 용액 (5% BSA, 1X TBS, 0.1% Tween-20, 0.1% NaN₃) 내에서 밤새 4℃에서 차단시켰다. 1 mg/ml 정제된 10G9 항체를 함유

하는 신선한 차단 용액을 첨가하고, 블롯을 4℃에서 밤새 인큐베이팅하였다. 블롯을 TBS-T (1X TBS, 0.1% Tween-20) 내에 각각 5분 동안 3회 세척하고, 희석제 (5% BSA, 1X TBS, 0.1% Tween-20) 내에서 HRP-컨쥬게이팅 된 염소 항-인간 IgG (H+L) (잭슨 이뮤노리서치 cat. 109-035-088)의 1:10,000 희석액과 함께 1시간 동안 인큐 베이팅하였다. 블롯을 SuperSignal West Femto ECL 기질 키트 (피어스 카탈로그 34095)를 사용하여 현상한 후, BioMAX 필름 (코닥 (Kodak))에 1초 노출시켰다. 상기 방법에 의해, 각각 서열 18, 서열 19, 서열 20, 서열 21 및 서열 47에 대응하는 펩티드 # 6, 13, 14, 15 및 가능하게는 펩티드 # 23이 G9 항체에 의해 특이적으로 인지되었다.

[0225]

본 발명은 상기 설명되고 예시된 실시태양으로 제한되지 않고, 첨부된 청구의 범위 내에서 변동 및 변형이 가능하다.

[0226]

<서열 목록>

서열1:

MWLQSLLLGLTVACSIAPARSPSPSTQFWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMF
DLQEPTCLQTRLELYKQGLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLK
DFLLVIPFDCWEPVQE

서열2:

APARSPSPSTQFWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQ
GLRGLSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

서열3: EHVNAIQEARLLNL

서열4: STQFWEHVNAIQEAR

서열5: MASHYKQHCPPTPET

서열6: LSTAVKELVENS LDAGATNIDLKLDYGVDLIEVSDNGCGVEEENFE

서열7: LRQVLNLLDNAIKYTPEGGEITVSLERDGDHLEITVEDNGPGIPEEDLE

서열8: G9 예측된 중쇄 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHWMHWRQVPGKGPVWVSRINGAGTSITYADSV
RGRFTISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCARANSVWFRGLFDYWGQGTIPVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK*

[0227]

서열 9: G9 예측된 중쇄 아미노산 서열(리더 포함)

mgwsciilflvatatgvhsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHHWMHWRQVPGKGP
VWVSRINGAGTSITYADSVRGRTIISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCARANSVWFRGLEFD
YWGQGTPTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

서열 10: G9 중쇄 핵산 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAGACACTGGATGCACTGGCTTCGCCAGGTTCCAGGTAA
GGGGCCGGTCTGGGTCTCAGTATCAATGGTGCTGGGACTTCCATAACCTACGCGGACTCCGTG
AGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAACACACTGTTTCTGCAATGAACAGTC
TGAGAGCCGACGACACGGCTCTTTATTTCTGTGCAAGAGCGAACAGCGTCTGGTTCGGGGCCT
CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
GTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGCTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA
AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC
ACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATG
ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCA
GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCTGCAACGAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCCGGGAATGA

[0228]

서열 11: G9중쇄 핵산 서열 (리더 포함)

aagcttgccgccaccATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTG
TACACAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCGGGGGGGTCCCTGAG
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGACACTGGATGCACTGGCTTCGCCAGGTT
 CCAGGTAAGGGGCGGTCTGGGTCTCACGTATCAATGGTGTGGGACTTCCATAACCTACGCGG
 ACTCCGTGAGGGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAACAACACACTGTTTCTGCAAAT
 GAACAGTCTGAGAGCCGACGACACGGCTCTTTATTTCTGTGCAAGAGCGAACAGCGTCTGGTTC
 CGGGGCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGG
 GCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG
 CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
 TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAACTCACACATGCCACCCG
 TGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
 TGAGGTCAAGTTCAACTGTGACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAC
 CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGA
 CTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCCGGAAATGAGaattc

서열 12: G9에측된 경쇄 아미노산 서열

EIVLTQSPVTLSPGERVTLSCRASQSVSTNLAWYQQKLGQGPRLLIYGASTRATDIPARFSG
 SGSETEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYDKWPDTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0229]

서열 13: G9 예측된 전체 아미노산 서열 (리더 포함)

mgwscilflvatatgghsEIVLTQSPVTLSPGERVTLSCRASQSVSTNLAWYQQKLGQGPRL
LLIYGASTRADIPARFSGSGSETEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYDKWPDITFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

서열 14: G9 전체 핵산 서열

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGTCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCACTCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCACCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAACTTGGCCAGGG
TCCCAGGCTCCTCATTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGTCAGTGGC
AGTGGGTCTGAGACAGAGTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTGCAGTTT
ATTACTGTGAGCAATATGATAAGTGGCCGGACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTGTGTGCTGTGTAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTAA

서열 15: G9 전체 핵산 서열 (리더 포함)

aagcttgccgccaccATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTG
TACACAGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGTCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGT
CACTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCACCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAACTT
GGCCAGGGTCCCAGGCTCCTCATTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGT
TCAGTGGCAGTGGGTCTGAGACAGAGTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTT
TGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATGATAAGTGGCCGGACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG
GAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGTGTAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA
AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG
GGGAGAGTGTAAgaattc

[0230]

서열 16: 예측된 E10 중쇄 아미노산 서열

QVQLEESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTNYGMHWVRQAPGKLEWLALISYDGNRQYYADSV
KGRFTVSRDNPNNLHLEMKSLRAEDSAIYYCARGAGVLLWFGDLSWFDPWGQGTILVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALISGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

서열 17: E10 중쇄 핵산 서열

CAGGTACAGCTGGAGGAGTACAGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTCAGACTCTCCT
GTGCAGCGTCTGGATTACCTTCACTAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGACTCGAGTGGCTGGCACTCATATCCTATGATGAAATAGGCAATACTATGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAATCCCAACAACACACTGCATCTGGAGATGAAGAGCC
TGCGAGCCGAAGACTCGGCTATATATTACTGTGCGAGAGGGGCTGGGGTATTACTGTGGTTCGG
CGACTTATCCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACC
AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCT
GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGAC

서열 18: 예측된 E10 경쇄 아미노산 서열

DIQMTQSPSNLSASVGRDVTITCRASQNIINTWLAWYQHKPGKPKLRITYQASTLESQVPSRFSG
SGSGTIFTLTISSLPDDFGTYICQNNNSYPYTFGQGTKLEINRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSMDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 19: E10 경쇄 핵산 서열

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAACCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACAATCA
CTTGTCGGGCCAGTCAAAATATTAATACCTGGCTGGCCTGGTATCAGCACAAACCAGGGAAACC
CCCTAAGCTCCGGATATATCAGGCGTCTACGTTAGAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTAGCGGC
AGTGGATCTGGGACGATATTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGGAACCT
ATTACTGCCAACAGAATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA
CCGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG
TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCATGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTAA

[0231]

서열 20: TCACCATCCATTGCACAGTT

서열 21: CTGCGAGAAGGTACTCACCC

서열 22: GAHRTYSWGHTGACBCAGTCTCC

서열 23:

GATCGAATTCTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCC

서열 24: AGGTRCAGCTGBWGSAGTCDG

서열 25: GTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTT

서열 26: AGCGGATAACAATTTCACACAGG

서열 27: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

서열 28:

GATCGGATCCGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACA
GGTGTACACAGCGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC

서열 29: GATCGAATTCTCATTTCGCCGGAGACAGGGAGAGG

서열 30:

GATCGGATCCAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTACACAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

서열 31: GGACAAGAAAGTTGAGCCCA

서열 32: TGCAAGGTCTCCAACAAGC

[0232]

서열 33: CCTGGTCTCTGGTCAGCTCA
서열 34: GGCACGGTGGGCATGTGTGA
서열 35: ARRLNLSRDTA
서열 36: TRLELYKQGLRG
서열 37: YKQGLRGSSTKL
서열 38: RGSSTKLKGPLT
서열 39: KENLKDFLLVIP
서열 40 (G9 H CDR1) GFTFSRHWMH
서열 41 (G9 H CDR2) LISYDGNRQYYADSVKG
서열 42 (G9 H CDR3) ANSVWFRGLFDY
서열 43 (G9 L CDR1) RASQSVSTNLA
서열 44 (G9 L CDR2) GASTRAT
서열 45 (G9 L CDR3) QQYDKWPDY
서열 46 (E10 H CDR1) GFTFTNYGMH
서열 47 (E10 H CDR2) LISYDGNRQYYADSVKG
서열 48 (E10 H CDR3) GAGVLLWFGDLSWFDY
서열 49 (E10 L CDR1) RASQNINTWLA
서열 50 (E10 L CDR2) QASTLES
서열 51 (E10 L CDR3) QQNNSYPYT
서열 52 (G9 H FWR1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
서열 53 (G9 H FWR2) WLRQVPGKGPVWVS
서열 54 (G9 H FWR3) RFTISRDNANNTLFLQMNSLRADDTALYFCAR
서열 55 (G9 L FWR1) EIVLTQSPVTLSPGGERVLTSC
서열 56 (G9 L FWR2) WYQQKLGQGPRLLIY
서열 57 (G9 L FWR3) DIPARFSGSGSETEFTLTISSLQSEDFAVYYC
서열 58 (E10 H FWR1) QVQLEESGGGVVQPGSLRLSCAAS
서열 59 (E10 H FWR2) WVRQAPGKGLEWLA
서열 60 (E10 H FWR3) RFTVSRDNPNTLHLEMKSLRAEDSAIYYCAR
서열 61 (E10 L FWR1) DIQMTQSPSNLSASVGDRTITC
서열 62 (E10 L FWR2) WYQHKPGKPKLRILY
서열 63 (E10 L FWR3) GVPSRFSGSGGTFTLTISSLQPDYFGTYIC

[0233]

수탁번호

[0234]

기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션

수탁번호 : PTA-8173

수탁일자 : 20070118

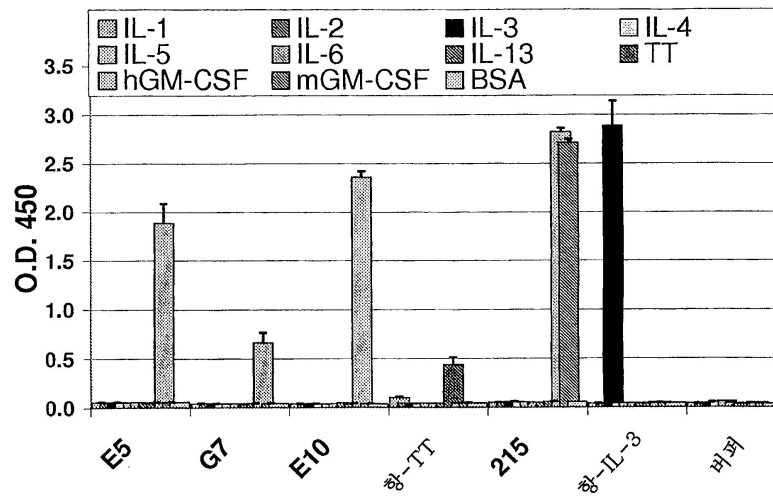
기탁기관명 : 아메리칸 타입 컬처 컬렉션

수탁번호 : PTA-8193

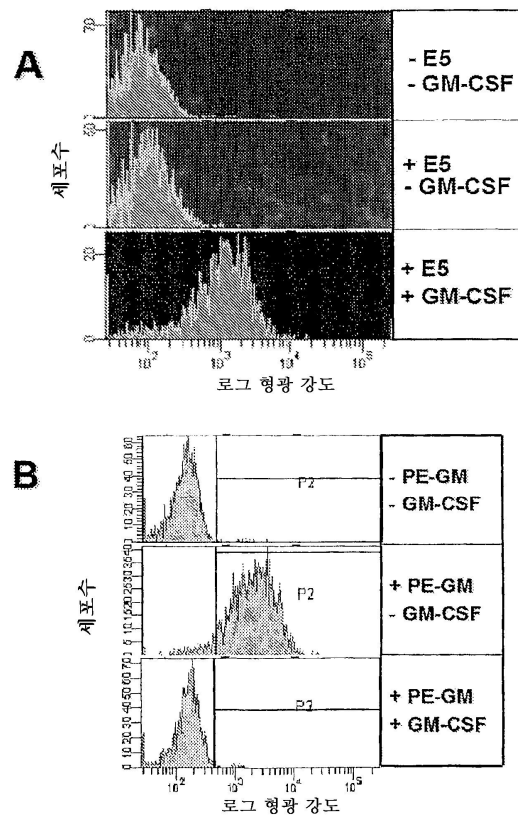
수탁일자 : 20070131

도면

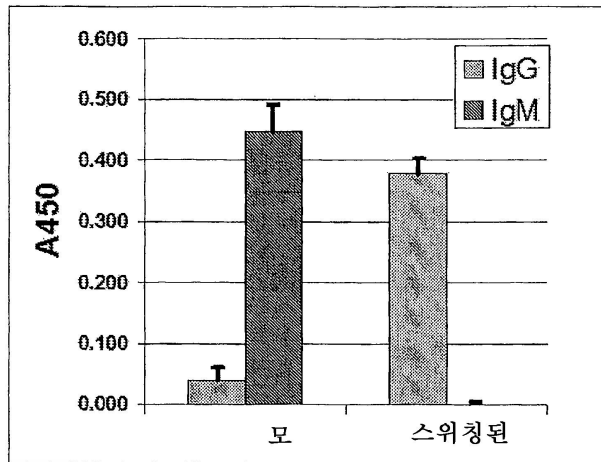
도면1



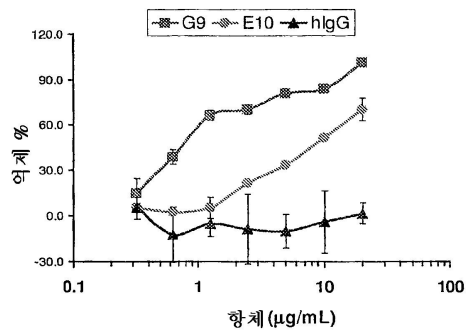
도면2



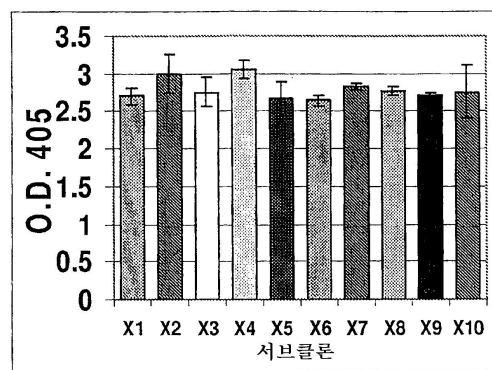
도면3



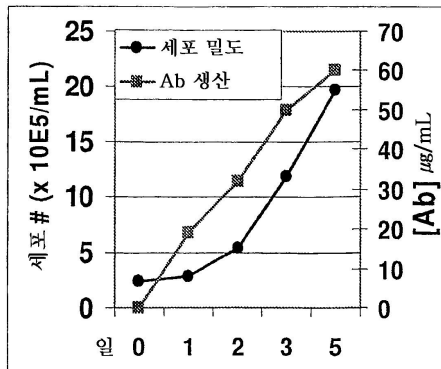
도면4



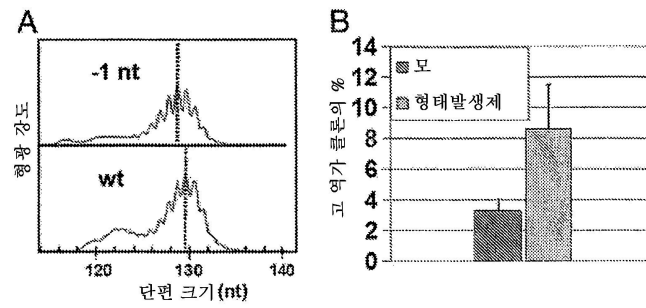
도면5a



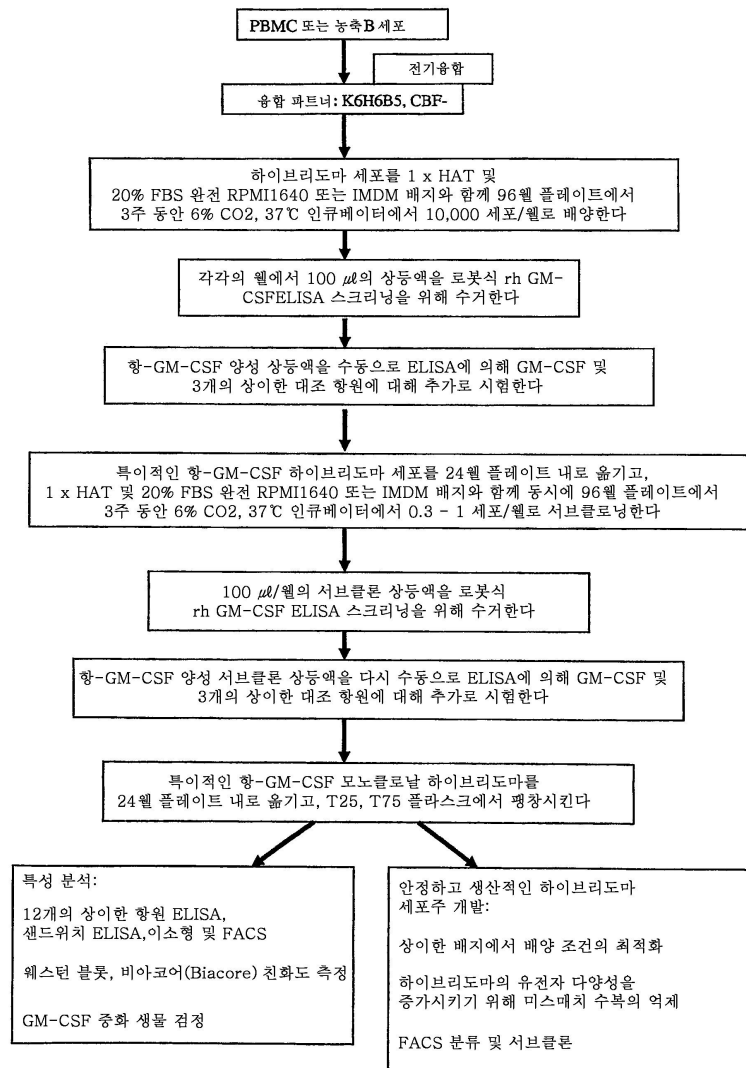
도면5b



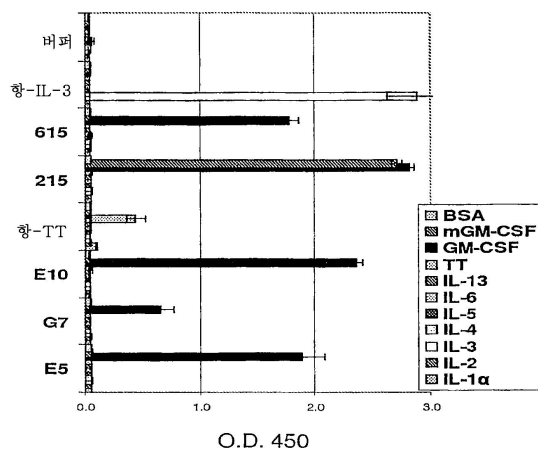
도면6



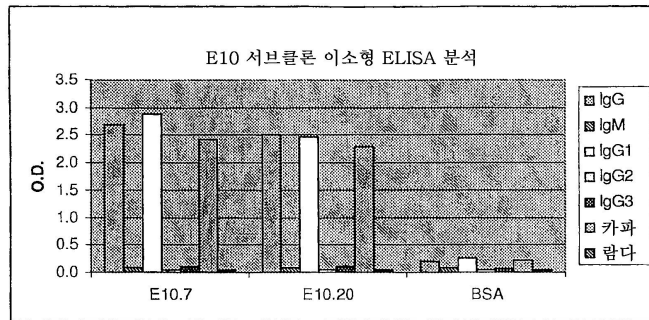
도면7



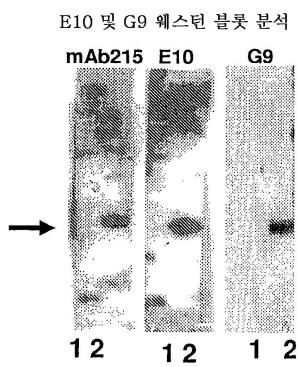
도면8



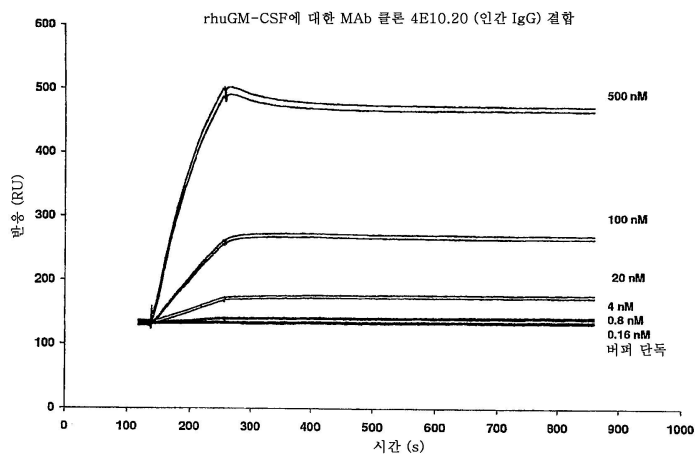
도면9



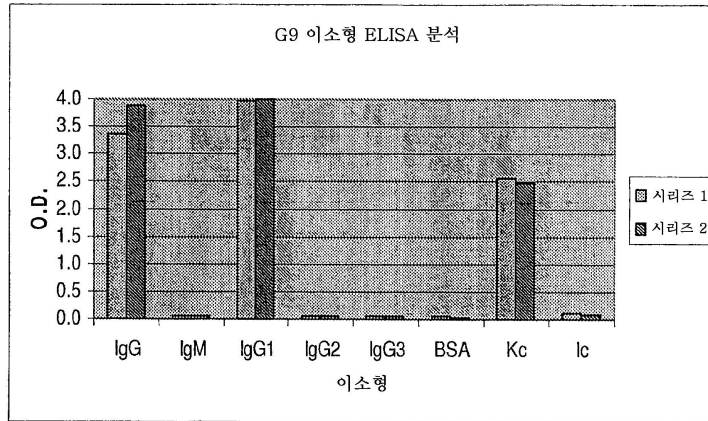
도면10



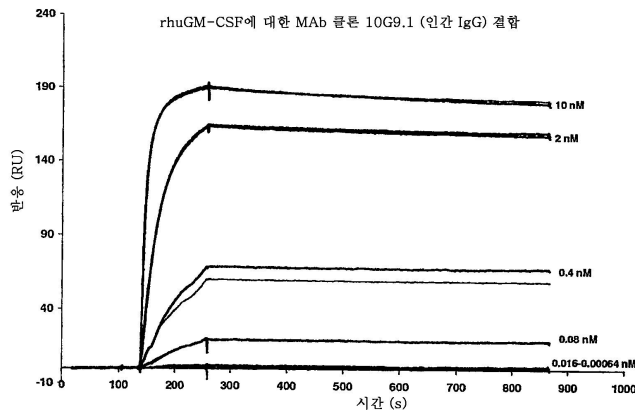
도면11



도면12



도면13



도면14

G9 에피토프 매핑



도면15

G9 에피토프 매핑

	펩티드 번호	서열
	1	CSISAPARSPSP
	2	PARSPSPSTQFW
21	1	SPSTQFWHVNNA
22	2	PWEHVNNAIQEAR
23	3	NAIQEARLLNL
24	4	ARRLLNLSRDTA
25	5	NLSRDTAENHNE
26	6	TAEHNETVEVI
	7	NETVEVISEMFD
	8	VISEMFDLQEP
	9	FDLQEPCLQTR
	10	PTCLQPTRLQYK
	11	TRLELYRGGLRG
	12	RGSLTKLKGPLY
	13	KLKGPLYHMAH
	14	LTHMAHYRQHC
	15	SHYKQKCPTE
	16	HCPPTPETSCAT
	17	PETSCATQIITF
	18	ATQIITFESPE
	19	TFESPEENLEDF
	20	KENLEDFLLVIP
	21	DFLLVIPFDCWE
	22	IPFDCWEFVDE
	23	GEQKLISEEDLG

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Morphotek, Inc.

Sass, Phillip M.

Nicolaides, Nicholas C.

Grasso, Luigi

Li, Jian

Chao, Qimin

Routhier, Eric

Ebel, Wolfgang

<120> ANTIGENIC GM-CSF PEPTIDES AND ANTIBODIES TO GM-CSF

<130> MOR-0690

<140> PCT/US2007/061874

<141> 2007-02-08

<150> US 60/774,500

<151> 2006-02-17

<150> US 60/771,251

<151> 2006-02-08

<160> 86

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211

> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His

20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp

35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe

50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met

85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser

100 105 110

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

115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

130 135 140

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val

1 5 10 15

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr

20 25 30

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

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110
Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 3

Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 4

Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 5

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr

1 5 10 15

<210> 6

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Synthetic construct

<400> 6

Leu Ser Thr Ala Val Lys Glu Leu Val Glu Asn Ser Leu Asp Ala Gly

1 5 10 15

Ala Thr Asn Ile Asp Leu Lys Leu Lys Asp Tyr Gly Val Asp Leu Ile

20 25 30

Glu Val Ser Asp Asn Gly Cys Gly Val Glu Glu Glu Asn Phe Glu

35 40 45

<210> 7

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 7

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

1 5 10 15

Pro Glu Gly Gly Glu Ile Thr Val Ser Leu Glu Arg Asp Gly Asp His

20 25 30

Leu Glu Ile Thr Val Glu Asp Asn Gly Pro Gly Ile Pro Glu Glu Asp

35 40 45

Leu Glu

50

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 8

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 Arg His

20 25 30

Trp Met His Trp Leu Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Pro Val Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 9

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 9

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg His Trp Met His Trp Leu Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Pro

50 55 60

Val Trp Val Ser Arg Ile Asn Gly Ala Gly Thr Ser Ile Thr Tyr Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 10

<211> 1356

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 10

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagttcagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agacactgga tgcactggct tcgccaggtt 120

ccaggtaagg ggccggtctg ggtctcacgt atcaatgggtg ctgggacttc cataacctac 180

gcggactccg tgaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaacaa cacactgttt 240

ctgcaaatga acagtctgag agccgacgac acggctcttt atttctgtgc aagagcgaac 300

agcgtctggt tccggggcct ctttgactac tggggccagg gaaccccggt caccgtctcc 360

tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag acctgaggt caagttcaac 840

tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aagcttcta tcccagcgac 1140

atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgatg aggtcttgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctcct gtctcccggg aatga 1356

<210> 11

<211> 1434

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 11

```
aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca    60
ggtgtacaca gcgaggtgca gctggtggag tctgggggag gcttagttca gccggggggg    120
tccttgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagacactg gatgcaactgg    180
cttcgccagg ttccaggtaa ggggccggtc tgggtctcac gtatcaatgg tgctgggact    240
tccataacct acgcggactc cgtgaggggc cgattcacca tctccagaga caacgccaac    300
aacacactgt ttctgcaaat gaacagtctg agagccgacg acacggctct ttattttctgt    360
```

```
gcaagagcga acagcgtctg gttccggggc ctctttgact actggggcca gggaaacccg    420
gtcaccgtct cctcagctc caccaagggc ccacgggtct tccccctggc accctcctcc    480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa    540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcagggcc ctagaccagcg gcgtgcacac cttcccggt    600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc    660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac    720
aagaaagtgt agcccaaate ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct    780
```

```
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aacccaagga caccctcatg    840
atctcccga cccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag    900
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg    960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac    1020
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc    1080
gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc    1140
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc    1200
```

```
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag    1260
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagca gctcaccgtg    1320
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg    1380
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaaatgaga attc        1434
```

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Asp

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 13

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 13

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Thr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Gly Pro Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

85 90 95

Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Lys

100 105 110

Trp Pro Asp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr

115 120 125

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

130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

195 200 205

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

210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 14

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 14

gaaattgtgc tgactcagtc tccagtcacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagtcact 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc accaacttag cctggtatca gcagaaactt 120
ggccagggtc ccaggctcct ctttatgtgt gcatccacca gggccactga tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtggtgc tgagacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcaa tatgataagt ggccggacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccacca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 15

<211> 723

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 15

aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60

gggttacaca gcgaatttgt gctgactcag tctccagtc ccctgtctgt gtctccaggg 120
gaaagagtca ctctctctcg cagggccagt cagagtgtta gcaccaactt agcctggtat 180
cagcagaaac ttggccaggg tcccaggctc ctcatattatg gtgcatccac cagggccact 240
gatatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgagacag agttcactct caccatcagc 300

agcctgcagt ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc aatatgataa gtggccggac 360
acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgaactg tggtctgcacc atctgtcttc 420
atcttccgcg catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcaccttga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gcctgagttc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaagaa 720
ttc 723

<210> 16

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 16

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

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

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

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

195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

210 215 220

<210> 17

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 17

caggtagcagg tggaggagtc agggggaggc gtgtccagc ctgggaggtc cctcagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcact aattatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactcgagt gctggcactc atacatgatg atggaaatag gcaataactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca atccaacaa cacactgcat 240

ctggagatga agagcctgag agccgaagac tcggctatat attactgtgc gagaggggct 300
 ggggtattac tgtgttcagg cgacttatcc tgggtcgacc cctggggcca gggaaccctg 360
 gtcaccgtct cctcagctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctctctc 420
 aagagcacct ctggggggcag agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 18

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Met Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 19

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 19

gatatccaga tgaccagtc tccttccaac ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcaca 60
atcacttgtc gggccagtc aaatattaat acctggctgg cctggtatca gcacaaacca 120

gggaaacccc ctaagctccg gatatacag gcgtctacgt tagaaagtgg ggtcccttca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacgata ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg gaacttatta ctgccaacag aataatagtt acctgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa ccgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcatggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttaa 645

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 20

tcaccatcca ttgcacagtt 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 21

ctgcgagaag gtactcaccc 20

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 22

Gly Ala His Arg Thr Tyr Ser Trp Gly His Thr Gly Ala Cys Asx Cys

1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys

20

<210> 23

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 23

gatcgaattc ttaacactct cccctgttga agctctttgt gacgggcgag ctcaggcc 58

<210> 24

<211>

21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 24

Ala Gly Gly Thr Arg Cys Ala Gly Cys Thr Gly Asx Trp Gly Ser Ala

1 5 10 15

Gly Thr Cys Asp Gly

20

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 25

gtccaccttg gtgttgctgg gctt 24

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 26

agcggataac aatttcacac agg 23

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 27

cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> 28

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 28

gatcggatcc gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc 60

tacaggtgta cacagcgaaa ttgtgctgac tcagtctcc 99

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 29

gatcgaattc tcatttcccg ggagacaggg agagg 35

<210> 30

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 30

gatcggatcc aagcttgccg ccaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc 60

aacagctaca ggtgtacaca gcgaggtgca gctgggtggag tctgg	105
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 31	
ggacaagaaa gttgagccca	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 32	
tgcaaggtct ccaacaaagc	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 33	
cctggttctt ggtagctca	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oligonucleotide primer	
<400> 34	
ggcacggtgg gcatgtgtga	20
<210> 35	
<211> 12	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic construct

<400> 35

Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 36

Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 37

Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu

1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 38

Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 39

Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Arg His Trp Met His

1 5 10

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 41

Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Arg Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 42

Ala Asn Ser Val Trp Phe Arg Gly Leu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 43
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 44

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 44

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 45

Gln Gln Tyr Asp Lys Trp Pro Asp Thr

1 5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 47

Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Arg Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 48

Gly Ala Gly Val Leu Leu Trp Phe Gly Asp Leu Ser Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 50

Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 51

Gln Gln Asn Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 52

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

20 25

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 53

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

1 5 10

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 54

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

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic construct

<400> 55

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys

20

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 56

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

1 5 10 15

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 57

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 58

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 59

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

1 5 10

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 60

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Pro Asn Asn Thr Leu His Leu Glu

1 5 10 15

Met Lys Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 61

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 61

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic construct

<400> 62

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

1 5 10 15

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 63

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ile Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 64

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 64

Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro

1 5 10 15

Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu

20 25 30

Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser

35 40 45

Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu

50 55 60

Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro

65 70 75 80

Leu Thr

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 65

Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro

1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 66

Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp

1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 67

Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 68

Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg

1 5 10

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 69

Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu

1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 70

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

1 5 10

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 71

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile

1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 72

Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp

1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 73

Val Ile Ser Glu Met Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr

1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 74

Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg

1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 75

Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys

1 5 10

<210> 76

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 76

Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His

1 5 10 15

Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe

20 25 30
 Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe
 35 40 45
 Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 50 55
 <210> 77
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 77

Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser His
 1 5 10
 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 78

Leu Thr Met Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys
 1 5 10
 <210> 79
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic construct
 <400> 79

Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu
 1 5 10
 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 80

His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr

1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 81

Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe

1 5 10

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 82

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu

1 5 10

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 83

Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe

1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 84

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu

1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 85

Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 86

Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly

1 5 10