



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월21일
(11) 등록번호 10-0823764
(24) 등록일자 2008년04월14일

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7017506

(22) 출원일자 2002년12월21일

심사청구일자 2006년06월22일

번역문제출일자 2002년12월21일

(65) 공개번호 10-2003-0036240

(43) 공개일자 2003년05월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2001/020153

국제출원일자 2001년06월22일

(87) 국제공개번호 WO 2001/98361

국제공개일자 2001년12월27일

(30) 우선권주장

60/213,141 2000년06월22일 미국(US)

60/238,319 2000년10월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Biological Chemistry, Vol.
273(10), pp. 5829-5840

전체 청구항 수 : 총 63 항

심사관 : 김지윤

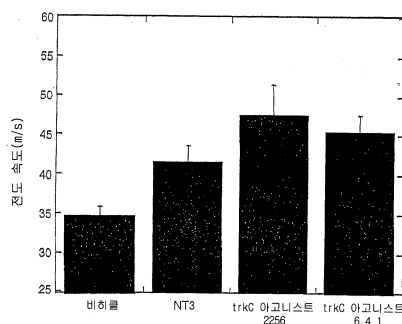
(54) 아고니스트 안티-티알케이-씨 모노클로날 항체

(57) 요약

본 발명은 trkC의 천연 리간드인 NT-3의 특정 생물학적 활성을 모방하는 아고니스트-안티-trkC 모노클로날 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 세포 변성의 예방 및/또는 치료에 그러한 항체를 사용하는 것을 포함하며, 상기 세포 변성은 급성 신경세포 시스템 상해 및 만성 신경변성 질병, 예컨대 말초성 신경장애에 관련된 신경세포 손상을 포함한다.

대표도 - 도13

trkC 아고니스트로의 처리에 의한 시스플라틴-유도 감각/신경장애의 방지



(72) 발명자

프레스타, 레오나르드, 지.

미국캘리포니아94109샌프란시스코, #206, 고우스트리트19

셀튼, 데이빗엘.

미국캘리포니아94618오클랜드, 클로버드라이브5845

(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 안티구와바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 알제리, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키프로스, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨, 폴란드, 미국

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키프로스, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) trkA 또는 trkB와 현저한 교차-반응성을 나타내지 않고;
 (b) trkC의 도메인 5 내의 에피토프와 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 trkC의 도메인 4 내의 에피토프와 특이적으로 더 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간 및 래트의 trkC 둘다에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간의 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체는 쥐의 항체인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항체는 인간화된 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체는 시스플라틴 또는 피리독신-유도 신경장애의 치료에 유용한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체는 당뇨병성 신경장애의 치료에 유용한 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체는 환자에게 투여시 통각과민증을 유발하지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 항체는 NT-3에 비해 증가된 생체이용률을 갖는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체의 trkC 에 대한 활성은 NT-3의 trkC에 대한 활성보다 더 특이적인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 12

서열번호 42, 43, 44, 45, 46, 47 및 48로 구성된 군으로부터 선택된 안티-trkC 항체 헤비 체인.

청구항 13

서열번호 49, 50, 51, 52, 53, 54 및 55로 구성된 군으로부터 선택된 안티-trkC 항체 라이트 체인.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

서열번호 50의 쥐의 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 43의 쥐의 안티-trkC 항체 헤비 체인, 또는 서열번호 51의 쥐의 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 44의 쥐의 안티-trkC 항체 헤비 체인을 포함하는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항체는 인간의 프레임워크 잔기를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 항체는 trkA 또는 trkB와 현저한 교차-반응성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 항체는 다이설파이드-결합으로 결합된 항체 헤비 체인-라이트 체인 두 쌍으로 구성된 호모-테트라머 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 항체는 Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편들로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 21

서열번호 49의 인간 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 42의 인간 안티-trkC 항체 헤비 체인, 서열번호 52의 인간 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 45의 인간 안티-trkC 항체 헤비 체인, 서열번호 53의 인간 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 46의 인간 안티-trkC 항체 헤비 체인, 서열번호 54의 인간 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 47의 인간 안티-trkC 항체 헤비 체인, 또는 서열번호 55의 인간 안티-trkC 항체 라이트 체인과 결합된 서열번호 48의 인간 안티-trkC 항체 헤비 체인을 포함하는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 항체는 trkA 또는 trkB와 현저한 교차-반응성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 항체는 다이설파이드-결합으로 결합된 항체 헤비 체인-라이트 체인 두 쌍으로 구성된 호모-테트라머 구조인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 항체는 Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편들로 구성된 군으로부터 선택된 항체 단편인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 항체는 IgG인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항체는 IgG-2 또는 IgG-4인 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 27

PTA-2147, PTA-2149, PTA-2145 및 PTA-2152로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호 하에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 쥐의 안티-trkC 아고니스트 항체.

청구항 28

PTA-2148, PTA-2150, PTA-2146, PTA-2153, PTA-2151 및 PTA-2144로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호 하에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 쥐의 안티-trkC 아고니스트 항체.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 항체는 PTA-2148, PTA-2150, PTA-2146 및 PTA-2153로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호 하에 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체.

청구항 30

제27항에 따른 쥐의 안티-trkC 아고니스트 항체를 코딩하는 분리된 핵산 분자.

청구항 31

제28항에 따른 인간의 안티-trkC 아고니스트 항체를 코딩하는 분리된 핵산 분자.

청구항 32

PTA-2136, PTA-2137 및 PTA-2138로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호하에서 2000.6.21.자로 ATCC에 기탁된 핵산 분자.

청구항 33

PTA-2133, PTA-2134, PTA-2135, PAT-2139, PTA-2140, PTA-2141, PTA-2142 및 PTA-2143으로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호하에서 2000.6.21.자로 ATCC에 기탁된 핵산 분자.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 35

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자로 형질전환된 숙주세포주.

청구항 36

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 핵산 분자로 형질전환된 하이브리도마 세포주.

청구항 37

제36항에 따른 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체.

청구항 38

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 분리된 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자는 서열 번호: 58, 서열번호: 60, 서열번호: 62, 서열번호: 64, 서열번호: 66, 서열번호: 68 및 서열번호: 70으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 39

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 분리된 핵산 분자로서, 상기 핵산 분자는 서

열번호: 59, 서열번호: 61, 서열번호: 63, 서열번호: 65, 서열번호: 67, 서열번호: 69 및 서열번호: 71로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 따른 핵산분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 41

제38항 또는 제39항에 따른 핵산 분자로 형질전환된 숙주세포.

청구항 42

제38항에 따른 핵산 분자 및 제39항에 따른 핵산 분자 둘다로 형질전환된 숙주세포.

청구항 43

제38항 또는 제39항에 따른 핵산 분자로 형질전환된 하이브리도마 세포주.

청구항 44

제38항에 따른 핵산 분자 및 제39항에 따른 핵산 분자로 형질전환된 하이브리도마 세포주.

청구항 45

삭제

청구항 46

하기 핵산 분자로 형질전환된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 항체:

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 58의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 59의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 60의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 61의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 62의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 63의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 64의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 65의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 66의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 67의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 68의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 69의 핵산 분자, 또는

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 70의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 71의 핵산 분자.

청구항 47

제38항 또는 제39항의 핵산분자에 의해 코딩된 폴리펩티드.

청구항 48

하기 핵산 분자에 의해 코딩된 폴리펩티드 체인을 포함하는 폴리펩티드:

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 58의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 59의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 60의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니

스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 61의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 62의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 63의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 64의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 65의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 66의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 67의 핵산 분자,

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 68의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 69의 핵산 분자, 또는

안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인을 코딩하는 서열번호 70의 핵산 분자 및 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 라이트 체인을 코딩하는 서열번호 71의 핵산 분자.

청구항 49

제1항, 제16항 및 제21항 중 어느 한 항에 따른 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 유효량을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 신경장애 또는 신경변성 질병 치료용 또는 손상된 신경세포 회복용 약제학적 조성물.

청구항 50

제1항의 항체를 유효성분으로 포함하고, 상기 항체를 포유동물에게 투여하여 신경장애 또는 신경변성 질병을 치료하거나 손상된 신경 세포를 회복시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 신경장애는 말초성 신경장애, 당뇨병성 신경장애 및 대-섬유 감각 신경장애로 구성된 군으로부터 선택된 약제학적 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 신경변성 질병은 근위축성측삭경화증(ALS)인 약제학적 조성물.

청구항 53

제50항에 있어서, 상기 신경 세포는 감각 뉴런 또는 운동 뉴런인 약제학적 조성물.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 감각 뉴런은 배근 신경절 유래인 약제학적 조성물.

청구항 55

제53항에 있어서, 상기 운동 뉴런은 척수 유래인 약제학적 조성물.

청구항 56

제50항에 있어서, 상기 투여는 정맥내 또는 피하내인 약제학적 조성물.

청구항 57

제50항에 있어서, 상기 투여는 국소 투여인 약제학적 조성물.

청구항 58

제1항, 제16항 또는 제21항의 항체를 유효성분으로 포함하고, 상기 항체를 말초성 뉴런에 접촉시켜 말초성 뉴런의 증식, 유지 또는 재생을 높이기 위한 약제학적 조성물.

청구항 59

제1항의 안티-trkC 항체를 코딩하는 핵산을 유효성분으로 포함하고, 상기 핵산을 포유동물의 세포에 도입하여 포유동물의 신경장애, 신경변성 질병 또는 신경세포손상으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병 또는 상태를 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

제59항에 있어서, 상기 핵산은 생체외에서 상기 세포 안으로 도입되는 약제학적 조성물.

청구항 63

제59항에 있어서, 상기 핵산은 생체내에서 상기 세포 안으로 도입되는 약제학적 조성물.

청구항 64

제1항의 안티-trkC 항체를 유효성분으로 포함하는 신생혈관생성 유도용 약제학적 조성물.

청구항 65

아고니스트 안티-trkC 항체 생산방법으로서, 상기 trkC의 도메인 5, 또는 도메인 4 및 5 내의 부위에서 trkC에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 것을 포함하는 방법.

청구항 66

삭제

청구항 67

제65항에 있어서, 상기 항체는 trkC의 도메인 5 내의 에피토프와 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 trkC는 천연 인간 trkC 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 에피토프는 상기 천연 인간 trkC의 아미노산 잔기 L284, E287 및 N335를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 급성 신경 세포계의 상해, 및 말초 신경장애를 포함하는 만성 신경변성 질환과 관련된 신경세포 손상을 포함하는 세포성 변성의 예방 및/또는 치료에 상기 아고니스트를 사용하는 것이다.

배경기술

<2> 뉴로트로핀은 작고 기본적인 단백질의 한 패밀리(family)으로서, 신경계의 발생(development) 및 유지에 중요한 역할을 한다. 그 패밀리 중 최초로 인식되고 아마도 가장 잘 이해된 멤버는 신경성장인자(NGF)로서, 이것은 말초 신경계의 감각 및 교감 뉴런의 발생에 주요한 영향을 미친다(Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P.U., Physiol. Rev. 48, 534-569(1968); Thoenen, H. et al., Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 109, 145-

178[1987]). NGF가 마우스 하악골하의 선(gland) 유래의 상동체를 포함하여 오랫동안 알려져 왔지만 또한 그것의 성숙된 활성 형태를 종종 2.5S NGF로 불려왔지만, 유사한 기능을 갖는 연속적으로 관련된 그러나 별개의 폴리펩티드들을 인식한 것은 많은 시간이 흐른 뒤였다.

<3> 그 첫번째 것은 뇌-유래의 뉴로트로핀 인자(BDNF)로 불리었는데, 그것은 Leibrock, J. 등 (Nature 341, 149-152[1989])에 의해 클로닝되고 시퀀싱되었다. 이 인자는 본래 돼지 뇌로부터 정제되었지만, (Barde, Y.A. et al., EMBO J. 1, 549-553[1982]) 그것의 cDNA가 클로닝되고 시퀀싱될 때까지는 그것의 NGF와의 상동성이 명백하지 않았다. NGF 및 BDNF 간의 전체 아미노산 서열의 상동성은 약 50%이다. 이 발견의 관점에서, Leibrock 등은 BDNF 및 NGF가 공통적인 구조 및 기능적 특성을 갖는 한 패밀리의 뉴로트로핀의 멤버들이라고 생각할 이유가 없다고 판단하였다.

<4> 실제 NGF 및 BDNF와 밀접히 관련된 또다른 뉴로트로핀들이 그 이후에 발견되었다. 몇몇 그룹들이 뉴로트로핀으로 인식되었는데, 이들은 원래 신경인자(NF)로 불리었고 현재는 뉴로트로핀-3(NT-3)으로 불려진다(Ernfors et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5454-5458(1990); Hohn et al., Nature 344, 339[1990]; Maisonpierre et al., Science 247, 1446[1990]; Rosenthal et al., Neuron 4, 767[1990]; Jones and Reichardt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8060-8064(1990); Kaisho et al., FEBS Lett. 266, 187[1990]). NT-3은 NGF 및 BDNF(NT-2) 둘다와 약 50%의 아미노산을 공유한다. 뉴로트로핀-4 및 5(NT-4 및 NT-5)가 그 패밀리에 추가되었다 (미국특허번호 제5,364,769, 1994. 11.15. 등록; Hallbook, F. et al., Neuron 6, 845-858[1991]; Berkmeier, L.R. et al., Neuron 7, 857-866[1991]; Ip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3060-3064[1992]). 상기 Berkmeier 등에 의해 처음 기술된 포유동물의 분자, 그것은 이어서 제노퍼스(*Xenopus*) NT-4의 상동체인 것으로 밝혀졌고, 통상 NT-4/5로 불리운다. 또한 NT-6으로 불려지는 포유동물에서 발견되는 산성 상동적 단백질이 있다 (Berkmeier, et al., Somat. Cell Mol. Genet. 18(3):233-245[1992]). 더 최근에는 물고기인 지포포러스속(*Xiphophorus*) 유래의 또다른 상동성 단백질이 발견되어 NT-6으로 명명되었다(Gotz et al., Nature 372:266-269[1994]). 그 문헌에서 NT-7로 기술된 또다른 단백질이 있는데 그것은 잉어인 사이프린스속(*Cyprinus*)(Lai, et al., Mol. Cell. Neurosci. 11(1-2):64-76(1998) 및 제브라피쉬인 다니오속(*Danio*)(Nilsson et al., FEBS Letters 424(3):285-90[1998])으로부터 클로닝된 것이다. 이러한 세가지 물고기의 뉴로트로핀 중 어떤 것도 물고기 이외에서는 기술되지 않았으며, 포유동물의 뉴로트로핀과의 관계는 불명했다. 제브라피쉬의 뉴로트로핀-7(zNT-7)의 아미노산 서열은 다른 뉴로트로핀의 서열보다 물고기의 신경성장인자(NGF) 및 뉴로트로핀-6(NT-6)에 더 많이 관련이 있다. 그러나 zNT-7은 물고기의 NGF 및 NT-6(각각 65% 및 63% 아미노산 서열 상동성)에 똑같이 관련이 있는데, 이는 그것이 별개의 뉴로트로핀 서열을 나타냄을 암시한다. zNT-7은 성숙한 단백질의 중앙에 있는 베타-턴 영역 내의 15개 아미노산 잔기를 포함한다. 재조합 zNT-7은 인간의 p75 뉴로트로핀 수용체에 결합할 수 있고 비록 래트의 NGF보다는 덜 효율적이긴 하나 래트의 trkA 수용체 티로신 키나아제의 티로신 인산화를 유도할 수 있다. zNT-7은 래트의 trkB 또는 trkC와는 상호작용하지 않았다. 이는 NGF와 유사한 수용체 특이성을 암시하는 것이다. 본 발명자들이 제안하건대, zNT-7 및 NT-6과 같은 NGF와 구조적 기능적으로 관련이 있는 수개의 부가적인 멤버들의 등장과 같이, 경골어류들이 진화하는 동안 뉴로트로핀 진화 트리에서 NGF 서브패밀리의 다양화(diversification)가 발생했다는 것이다.

<5> 다른 폴리펩티드 성장 인자들과 유사한 뉴로트로핀들은 세포 표면 수용체들과의 상호작용을 통해 그들의 표적 세포에 영향을 미친다. 본 발명자들의 현재의 지식에 따르면, 두 종류의 트랜스메브레인 글리코단백질이 뉴로트로핀의 수용체로서 기능한다. 평형 결합(Equilibrium binding) 연구에 따르면, 뉴로트로핀-반응성 뉴론은 두 종류의 수용체를 갖는데, 그 첫번째 것은 통상 저분자량(65-80kDa), 낮은 친화도의 수용체(LNGFR)를 갖는데, 이 수용체는 $p75^{NTR}$ 또는 p75로 명명되었고, 그것은 2×10^{-9} M의 K_D 로 NGF, BDNF 및 NT-3와 결합한다. 한편, 다른 종류의 수용체는 고분자량(130-150kDa), 높은 친화도(10^{-11} M의 K_D)를 가지는데, 이들이 수용체 티로신 키나아제인 trk 패밀리의 멤버들이다.

<6> trk A 수용체 패밀리의 첫번째 멤버는 trkA로서 초기에는 축삭적 도메인 상으로의 트로포미오신 서열의 전위(translocation)에 의해 유발된 종양원성(oncogenic) 형질전환의 결과로서 인식되었다(Martin-Zanca et al., Mol. Cell. Biol. 9(1):24-33[1989]). 그 이후의 연구에서는 trkA가 NGF의 신호전달 수용체로서 인식되었다. 이어서, 두개의 다른 관련 수용체, 마우스 및 래트의 trkB(Klein et al., EMBO J. 8, 3701-3709[1989]; Middlemas et al., Mol. Cell. Biol. 11, 143-153[1991]; EP 455,460(1991.11.6. 공개) 및 돼지, 마우스 및 래트의 trkC(Lamballe et al., Cell 66, 967-979[1991]; EP 522,530(1993.1.13. 공개)가 trk 수용체 패밀리의 멤버로서 인식되었다. 그 trk 수용체들의 구조들은 매우 유사하며, 교번 스플리싱(alternate splicing)을 통해

두개의 알려진 trkA의 형태, 세개의 알려진 trkB(두개는 기능적 티로신 키나아제 도메인이 없음) 및 적어도 네개의 trkC의 형태(몇몇은 기능적 티로신 키나아제 도메인이 없고 두개는 티로신 키나아제 도메인 내에 작은 삽입물을 갖음)를 발생시킴으로써 그 패밀리의 복잡성을 증가시킨다.

<7> p75 및 trk 수용체의 역할에 대해서는 논쟁의 여지가 있다. 일반적으로 trk 수용체 티로신 키나아제는 특정 뉴로트로핀에 대한 결합 특이성을 제공하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, trkA를 발현하는 세포주는 NGF 뿐만 아니라 NT-3 및 NT-4/5(그러나 BDNF는 아님)와 결합하며, trkB 발현 세포는 BDNF, NT-3, NT-4 및 NT-4/5(그러나 NGF는 아님)와 결합하며, 이와는 대조적으로 trkC 발현 세포는 NT-3와만(다른 뉴로트로핀은 아님) 결합하는 것으로 보고되어 있다. 또한 모델 시스템에서 교번 스플리싱 과정으로부터 발생된 다양한 형태의 trk 수용체들이 다른 세포간 신호 경로를 활성화시킬 수 있으므로 생체내에서 다른 생리학적 기능을 매개할 것으로 추측된다. p75의 부재시 주어진 trk 수용체를 발현하는 세포가 뉴로트로핀과 낮은 친화도로 결합할 것인지 아니면 높은 친화도로 결합할 것인지는 불명하다(Meakin and Shooter, Trends Neurosci. 15, 323-331[1992]).

<8> 다양한 세포주를 이용한 연구 결과 중 공개된 것들에 따르면 p75가 뉴로트로핀 반응성에 있어 필수적이라는 견해와 또한 필수적이지 않다는 견해가 있어서 혼란스럽다. p75만을 발현하는 세포주는 NGF, BDNF, NT-3 및 NT-4와 평형상태에서 유사한 낮은 친화도로 결합하지만 그 결합속도상수는 현저히 다르다. 결과적으로 p75 결합은 모든 뉴로트로핀의 공통 성질이지만, p75 수용체 또한 리간드 구별에 있어서 한 역할을 할 것이다(Rodriguez-Tebar et al., EMBO J. 11, 917-922[1992]). trk 수용체가 전통적으로 생물학적으로 중요한 뉴로트로핀 수용체라고 생각되어 왔지만, 최근에 trkA 발현이 결여된 골수종 세포에서 NGF가 여전히 아마도 p75를 통해 생물학적 활동에 있어서 큰 변화를 유발할 수 있다는 것이 입증되어 왔다(Hermann et al., Mol. Biol. Cell 4, 1205-1216[1993]). Davies et al.(Neuron 11, 565-574[1993])는 p75 유전자에 영 돌연변이(null mutation)를 갖는 트랜스제닉 마우스 모델에서 뉴로트로핀에 대한 배아 뉴런의 생존 반응을 매개함에 있어서 p75의 역할을 조사하는 연구 결과를 발표하였다. 그들은 p75가 NGF에 대한 NGF-의존성 피부 감각 뉴런의 민감도를 향상시킨다는 것을 발견하였다. p75가 뉴로트로핀들의 생물학적 효과의 적어도 일부를 매개할 수 있다는 것을 나타내는 많은 연구가 있어 왔다. 그 분야는 여전히 다소 논쟁의 여지가 있지만 p75 시그널링은 세포 죽음 및 신경돌기 성장을 조절하는 것에 관련이 있다(Barker, PA, Cell Death Diff. 5:346-356[1998]; Bredesen et al., Cell Death Diff. 5:357-364[1998]; Casaccia-Bonnet et al., Cell Death Diff. 5:357-364[1998]; Raoul et al., Curr. Op. Neurobiol. 10:111-117[2000]; Davies, AM, Curr. Biol. 10:R198-R200[2000]). 중요한 것은 p75의 자극이 trkC를 자극하는 효과를 변경하는 것으로 나타났다는 것이다(Hapner, et al., Developm. Biol. 201:90-100[1998]).

<9> 전장의 천연 trkA, trkB 및 trkC 수용체들의 세포의 도메인은 다섯개의 기능적 도메인을 갖는데, 다양한 다른 단백질에서 상동적이거나 그렇지 않으면 유사한 구조들로서 정의되어 왔다. 그 도메인은 성숙한 trk 수용체의 아미노산 서열의 N-터미널에서 시작하여 1)인간의 trkA의 아미노산 위치 1 내지 약 32, 인간의 trkB의 아미노산 위치 1 내지 약 36, 인간의 trkC의 아미노산 위치 1 내지 약 48의 제1시스테인-풍부 도메인; 2)trkA의 아미노산 위치 33 내지 약 104, trkB의 아미노산 위치 37 내지 약 108, trkC의 아미노산 위치 49 내지 약 120의 루신-풍부 도메인; 3)trkA의 아미노산 위치 105 내지 약 157, trkB의 아미노산 위치 약 109 내지 164, trkC의 아미노산 위치 121 내지 약 177의 제2시스테인-풍부 도메인; 4) trkA의 아미노산 위치 176 내지 약 234, trkB의 아미노산 위치 183 내지 약 239, trkC의 아미노산 위치 196 내지 약 257의 제1면역글로불린-유사 도메인; 5) trkA의 아미노산 위치 264 내지 약 330, trkB의 아미노산 위치 270 내지 334, trkC의 아미노산 위치 약 288 내지 약 351의 제2면역글로불린-유사 도메인을 갖는다.

<10> 뉴로트로핀은 별개의 그러나 오버랩되는 말초 및 중추 뉴런의 세트에 작용을 한다. 이러한 작용은 뉴런 발생의 생존을 보장하는 중요한 역할에서부터(감각 및 교감 뉴런의 NGF), 뉴런들의 형태학에 미치는 상대적으로 덜 중요한 역할(푸르키네 세포 상의 NT-3)에 이른다. 이러한 활성들은 특정 신경변성 질병의 치료로서 뉴로트로핀을 사용하는 관점에 있어 흥미를 유발한다. NT-3는 말초 백혈구의 증식을 촉진하는 것으로 밝혀졌고 따라서 NT-3가 호중구감소증, 감염성 질병 및 종양의 치료에 사용될 수 있다고 제시되어 왔다(미국특허번호 제6,015,552, 2000.6.18.등록).

<11> 심혈관의 발생을 조절하고 상해에 대한 맥관 반응을 조절함에 있어서의 뉴로트로핀의 역할이 조사되었다(Donovan et al, Nature Genetics 14:210-213[1996]; Donovan et al., A.J. Path. 147:309-324[1995]; Kraemer et al., Arteriol. Thromb. and Vasc. Biol. 19:1041-1050[1999]). 뉴로트로핀은 신생혈관형성을 조절

하고 맥관의 완전성을 위한 잠재적인 치료법으로 기술되고 있다(PCT 공개 WO 00/24415, 2000.5.4. 공개).

- <12> 신경변성 질병 및 급성 뉴런의 상해로 인해 발생하는 것과 같은 세포 변성의 치료를 보장할 수 있다고 해도 뉴로트로핀은 몇몇 단점들을 갖고 있다. 한 중요한 단점은 특이성의 결여이다. 대부분의 뉴로트로핀은 하나 이상의 수용체와 교차 반응한다. 예컨대, trkC 수용체 티로신 키나아제의 바람직한 리간드인 NT-3는 또한 trkA 및 trkB에도 결합하여 그것들을 활성화시킨다(Barbacid, J. Neurobiol. 25:1386-1403[1994]; Barbacid, Ann. New York Acad. Sci. 766:442-458[1995]; Ryden and Ibanez, J. Biol. Chem. 271:5623-5627[1996]; Belliveau et al., J. Cell. Biol. 136:375-388[1997]; Farinas et al., Neuron 21:325-334[1998]). 결과적으로 특정 뉴런 군집을 타겟으로 하는 치료법을 고안하기는 어려웠다. 뉴로트로핀 치료법의 또다른 한계는 NT-3를 포함하는 뉴로트로핀이 통각과민을 유발하는 것으로 알려져 있다는 것이다(Chaudhry, et al., Muscle and Nerve 23:189-192[2000]). 또한 NT-3와 같은 뉴로트로핀들은 설치류에서 낮은 약학동력성 및 생체이용률을 갖고 있으며 이는 그들을 인간에 임상적으로 적용하는 것에 대한 심각한 의문을 발생시킨다(Haase et al., J. Neurol. Sci. 160:S97-S105[1998], Helgren et al., J. Neurosci. 17(1):372-82[1997]에서 사용된 투여량, 데이타는 하기에 나옴).
- <13> 따라서 뉴로트로핀의 공지의 단점들이 없는 신경변성 질환 및 급성 신경 세포 상해 치료제의 개발이 시급하다.

발명의 상세한 설명

- <14> 발명의 개요
- <15> 본 발명은 trkC 수용체의 세포의 도메인 내의 에피토프에 대한 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 개발 및 특징화에 관한 것으로서 그 항체는 trkC 수용체의 천연 리간드인 NT-3의 생물학적 활성과 유사한 활성을 가지지만 NT-3의 공지된 문제점 중 일부가 없다. 본 발명은 또한 실험 동물 모델에서의 신경장해의 치료시 상기 아고니스트 항체들의 유용성을 입증한다. 안티-trkC 아고니스트 항체는 신경세포 손상, 특히 말초성 신경장해와 같은 신경변성 질병과 관련되거나 충격, 독성 약제, 외과수술 등과 같은 외부 인자들에 의해 유발된 신경 세포의 상해와 같은 세포 변성의 예방 또는 치료에 있어서 NT-3보다 훨씬 많은 장점들을 제공한다.
- <16> 본 발명은 또한 (a) trkA 또는 trkB와의 현저한 교차-반응성이 없고; (b) trkC의 도메인 5의 에피토프를 인지하는 안티-trkC 모노클로날 항체에 관한 것이다.
- <17> 본 발명의 특정 아고니스트 항체들은 부가적으로 trkC의 도메인 4의 에피토프를 인지할 수 있다. 바람직한 구체예에서 항체는 인간 및 설치류(예컨대, 래트 또는 마우스)의 trkC 둘다에 결합하고 쥐, 키메라(인간화된 것을 포함하는) 또는 인간의 항체가 될 수 있다. 그 항체들은 천연 trkC 리간드인 NT-3의 하나 이상의 활성을 모방할 수 있으며 따라서 세포 변성과 관련된 다양한 질병들, 예컨대, 시스플라틴 또는 피리독신-유도 신경장해 또는 당뇨병성 신경장해와 같은 신경장해 및 (세포 변성이 골수 세포 변성과 관련되는 경우) 호산구감소증 및/또는 호염기백혈구감소증, 림프구감소증, 단핵구감소증, 및 호중구감소증과 같은 불충분한 혈액 세포 질환들을 포함하는 질병들의 예방 및/또는 치료에 효과적일 수 있다. 특히 바람직한 한 구체예에서 본 발명의 아고니스트 항체는 NT-3보다 우수한 성질들을 나타내는데, 그 예로는 환자에게 투여시 통각과민을 유발하지 않으며 NT-3에 비해 증가된 생체이용률 및/또는 더 높은 특이적 활성을 갖는다.
- <18> 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 4 및 5로 구성된 군으로부터 선택된 CDR 1; 서열번호 6, 7, 8, 9, 10 및 11로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2; 및 서열번호 12, 13, 14, 15, 16 및 17로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3를 포함하는 안티-trkC 항체 헤비 체인에 관한 것이다.
- <19> 또한 본 발명은 서열번호 18, 19, 20, 21, 22, 23 및 24로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1; 서열번호 25, 26, 27, 28, 29 및 30으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2; 및 서열번호 31, 32, 33, 34, 35 및 36으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3를 포함하는 안티-trkC 항체 라이트 체인에 관한 것이다.
- <20> 본 발명은 또한 하기 CDR을 포함하는 쥐의 안티-trkC 항체 헤비 체인에 관한 것이다:
- <21> (a) XaaWXaaXaaWVK식(서열번호: 37)의 CDR1 (여기서 위치1의 Xaa는 F 또는 Y이고 위치3의 Xaa는 I 또는 M이며, 위치4의 Xaa는 E 또는 H이다);
- <22> (b) EIXaaPXaaXaaXaaXaaTNYNEKFKXaa식(서열번호: 38)의 CDR2 (여기서 위치3의 Xaa는 L 또는 Y이고; 위치5의 Xaa는 G 또는 S이며, 위치6의 Xaa는 S 또는 N이며, 위치7의 Xaa는 D 또는 G이며; 위치8의 Xaa는 N 또는 R이며; 위치17의 Xaa는 G 또는 S이다); 및

- <23> (c) KNRNYYGNYVV식(서열번호: 12) 또는 KYYYGNSYRSWYFDV(서열번호:13)식의 CDR3.
- <24> 본 발명은 또한 하기 CDR을 포함하는 인간의 안티-trkC 항체 헤비 체인에 관한 것이다:
- <25> (a) XaaXaaXaaYYWXaa식(서열번호: 39)의 CDR1 (여기서 위치1의 Xaa는 S 또는 I이고; 위치2의 Xaa는 G 또는 S이며; 위치3의 Xaa는 G, T 또는 Y이며, 위치7의 Xaa는 S 또는 N임);
- <26> (b) XaaIXaaXaaSGSXaaTXaaNPSLKS식(서열번호: 40)의 CDR2 (여기서 위치1의 Xaa는 Y 또는 R이고; 위치3의 Xaa는 Y 또는 F이며; 위치4의 Xaa는 Y 또는 T이며; 위치8의 Xaa는 S 또는 R이며; 위치10의 Xaa는 N 또는 Y임);
- <27> (c) DRDYDSTGDYYSYGYMDV(서열번호: 14); DGGYSNPF(서열번호: 15); ERIAAAGXaaDYYYNGLXaaV(서열번호: 41)로 이루어진 군으로부터 선택된 식의 CDR3 (여기서 위치8의 Xaa는 A 또는 T이며 위치16의 Xaa는 D 또는 A임).
- <28> 본 발명은 또한 라이트 체인과 결합된 상기 쥐의 안티-trkC 항체 헤비 체인의 CDR을 포함하는, 라이트 체인과 결합된 헤비 체인을 포함하는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체에 관한 것이다. 그 항체는 바람직하게는 인간의 것이며, 인간의 프레임워크 잔기들을 포함하며 바람직하게는 trkA 또는 trkB와의 현저한 교차-반응성을 나타내지 않는다. 본 출원 전체에 걸쳐 항체는 가장 넓은 의미로 정의되며, 특히 Fv 단편, Fab 단편, Fab' 또는 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 단편을 포함한다. 모든 클래스 및 이소타입의 항체들이 포함되며, 그 중에서도 IgG, 특히 IgG-2 또는 IgG-4가 바람직하다.
- <29> 또한 본 발명은 쥐 또는 인간의 안티-trkC 아고니스트 항체 헤비 또는 라이트 체인 또는 그 단편을 코딩하는 분리된 핵산에 관한 것이다. 한 구체예에서 핵산은 PTA-2133, PTA-2134, PTA-2135, PTA-2136, PTA-2137, PTA-2138, PTA-2139, PTA-2140, PTA-2141, PTA-2142 및 PTA-2143으로 구성된 군으로부터 선택된 수탁번호 하에 2000.6.21.에 ATCC에 기탁된 핵산분자이다.
- <30> 또한 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 항체 헤비 및/또는 라이트 체인을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그러한 핵산으로 형질전환된 세포에 관한 것이다. 또한 본 발명은 그러한 핵산으로 형질전환된 하이브리도마 세포주 및 그러한 하이브리도마 세포에 의해 생산된 항체에 관한 것이다.
- <31> 또한 본 발명은 상기 정의된 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 유효량을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- <32> 또한 본 발명은 세포 변성 관련 질병을 치료하는 방법에 관한 것으로서 포유동물에게 여기서 기재된 유효량의 아고니스트 안티-trkC 항체를 투여하는 것을 포함한다.
- <33> 또한 본 발명은 신경장애 또는 신경변성 질병을 치료하는 방법 또는 손상된 신경 세포를 회복시키는 방법으로서, 여기서 기재된 유효량의 아고니스트 안티-trkC 항체를 포유동물에게 투여하는 것을 포함한다. 예컨대 신경장애는 말초성 신경장애, 당뇨병성 신경장애 및 대 섬유(large-fiber) 신경장애를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 신경변성 질병은 예컨대 근위축성측삭경화증(ALS), 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 헌팅톤 무도병일 수 있다. 손상된 뉴런은 감각 뉴런, 예를 들어 배근신경절 뉴런, 및 운동 뉴런, 예를 들어 척수 유래 뉴런과 같은 말초성일 수도 있고, 중추 뉴런일 수도 있다. 그 손상은 다양한 외부 및 내부 인자들, 예컨대 충격, 뉴로톡신의 노출, 대사 질병, 감염성 약제 등을 포함한다.
- <34> 본 발명은 또한 말초성 뉴런의 발생, 증식, 유지 또는 재생을 촉진하는 방법으로서, 그러한 뉴런에 유효량의 본 발명에 의한 항체를 접촉시키는 것을 포함한다.
- <35> 또한 본 발명은 포유 동물인 대상의 세포 변성과 관련된 질병 또는 상태의 치료(예방을 포함)를 위한 방법에 관한 것으로서 여기서 말한 안티-trkC 항체를 코딩하는 핵산을 그 대상 세포에 도입하는 것을 특징으로 한다. 본 발명(유전자 치료법)은 바람직하게는 신경장애 또는 신경변성 질병의 치료 또는 손상된 신경세포의 회복에 관한 것이다. 따라서 수용자 세포는 바람직하게는 신경세포이다.
- <36> 또한 본 발명은 유전자 치료 용도에 적합한 안티-trkC 항체를 코딩하는 유전물질(핵산)을 포함하는 운반 비히클에 관한 것이다.
- <37> 또한 본 발명은 본 발명의 안티-trkC 항체의 유효량을 운반함으로써 신생혈관형성을 유도하는 방법에 관한 것이다. 그 운반은 특별히 항체의 투여 및 그 항체를 코딩하는 핵산의 운반(예컨대 유전자 치료법에서)을 포함한다.
- <38> 또한 본 발명은 서열번호: 58, 서열번호: 59, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63, 서열번호: 64, 서열번호: 65, 서열번호: 66, 서열번호: 67, 서열번호 68, 서열번호: 69, 서열번호: 70 및 서열번호:

71로 이루어진 군으로부터 선택된 쥐 또는 인간의 안티-trkC 아고니스트 항체의 헤비 또는 라이트 체인을 코딩하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다. 본 발명은 또한 하나 이상의 분리된 핵산 분자들에 의해 코딩된 폴리펩티드에 관한 것이다.

<39> 또한 본 발명은 쥐 또는 인간의 안티-trkC 아고니스트 항체의 헤비 체인, 라이트 체인 또는 그 둘다를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 전체 세포에 관한 것이다.

실시예

<68> 바람직한 구체예의 상세한 설명

<69> A. 정의

<70> 용어 "뉴로트로핀" 및 그것의 문법적 변형들이 호환적으로 사용된다. 그것은 신경성장인자(NGF) 및 연속적으로 관련된 유사체들을 포함하는 한 패미리의 폴리펩티드를 가리킨다. NGF, 뇌-유래 성장 인자(BDNF, NT-2로도 알려진), 뉴로트로핀-3(NT-3), 뉴로트로핀-4 및 -5(NT-4/5), 뉴로트로핀-6(NT-6) 및 뉴로트로핀-7(NT-7)이 지금까지 이 패미리의 멤버들로서 인식되어 왔다.

<71> 용어 "뉴로트로핀"은 어떤(인간의 또는 인간이 아닌) 동물 종들의 천연 뉴로트로핀을 및 그 기능적 유도체를 포함한다. 그것은 천연 공급원으로부터 정제되었든, 재조합 DNA 기술 방법에 의해 제조되었든지 아니면 화학적 합성 또는 이러한 또는 다른 방법들의 조합에 의해 제조되었든지에 관계없다. "천연" 또는 "천연 서열" 뉴로트로핀은 인간 또는 비인간인 동물 종들에서 자연적으로 발생하는 뉴로트로핀(자연적으로 발생하는 절단된 또는 변이 형태 및 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체들을 포함)의 아미노산 서열을 갖는다.

<72> 용어 "trk", "trk 폴리펩티드", "trk 수용체" 및 그 문법적 변형들이 호환적으로 사용된다. 그것들은 수용체 티로신 키나제 슈퍼패밀리의 폴리펩티드들을 가리키는데, 그것들은 하나 이상의 천연 뉴로트로핀과 결합할 수 있다. 이 패밀리 중 현재 인식된 멤버들은 trkA(p140^{trkA}), trkB 및 trkC이다.

<73> 여기서 사용되는 표현 "세포의 도메인" 또는 "ECD"은 자연 발생 수용체의 세포의 도메인의 리간드 결합 기능을 공유하는 어떤 폴리펩티드 서열을 가리킨다. 그 세포의 도메인의 리간드 결합 기능이란 리간드와 결합하는 폴리펩티드의 능력을 말한다. 더 작은 절편(segment)들도 리간드 결합에 적합한 것으로 발견되어 왔으므로 전체 세포의 도메인을 반드시 포함할 필요는 없다. 그 절단된 세포의 도메인은 통상 가용성이다. 용어 "ECD"는 성숙한 수용체의 소수성 트랜스메브레인 서열(및, 선택적으로 그 트랜스메브레인 도메인의 1-20 아미노산의 C-터미널 및/또는 N-터미널)이 결실된 폴리펩티드 서열을 포함한다.

<74> 용어 "아고니스트 안티-trkC 항체"는 항체를 가리키는데, 천연 서열 trkC 수용체에 결합하고 활성화시킬 수 있으며/있거나 trkC 신호전달 기능에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 활성화시켜 그 수용체의 천연 리간드, 특히 NT-3의 생물학적 활성을 흉내낼 수 있다. 예컨대 아고니스트 항체는 trkC 수용체의 ECD 도메인에 결합함으로써 그 수용체의 다이머화(dimerization)를 유도하고 그 결과로서 세포내 촉매적 키나아제 도메인을 활성화시킬 수 있다. 결과적으로 이것은 생체내 및/또는 생체외에서 수용체를 발현하는 세포의 성장 및/또는 분화를 자극하는 결과를 낳는다. 본 발명의 아고니스트 항체는 바람직하게는 인간의 trkC 수용체 또는 비인간에서 그것에 대응되는 도메인, 예컨대 쥐의 trkC 수용체의 도메인 5의 적어도 일부(약 266 내지 약 381의 아미노산 위치) 및/또는 도메인 4(약 178 내지 약 265의 아미노산 위치)를 포함하는 에피토프를 인지한다.

<75> 본 발명의 아고니스트 안티-trkC 항체와 관련하여 사용되는 경우 "생물학적 활성"은 통상 trkC의 천연 리간드인 NT-3와 같은 이펙터(effector) 기능을 갖는 것을 말한다. 그 이펙터 기능은 바람직하게는 trkC 수용체 티로신 키나아제에 결합하여 활성화시키고/거나 trkC 시그널링 기능에 의해 매개되는 다운스트림 경로를 활성화시키는 능력이다. 제한없이 바람직한 생물학적 활성은 손상된 세포, 특히 생체외 또는 생체내의 뉴런의 발생, 증식, 유지 및/또는 재생을 촉진하는 능력을 포함한다. 상기 뉴런은 말초성(교감, 부교감, 감각 및 소장의) 뉴런, 운동 뉴런 및 중추(뇌 및 척수) 뉴런, 및 비뉴런성 세포, 예컨대 말초성 백혈구를 포함한다. 특히 바람직한 생물학적 활성은 신경장해, 예컨대, 말초성 신경장해 또는 다른 신경변성 질환들을 치료(예방을 포함)하거나 손상된 신경 세포를 회복시키는 능력이다. 손상된 뉴런은 감각, 교감, 부교감 또는 소장, 예컨대 배근신경절 뉴런, 운동뉴런 및 중추 뉴런, 예컨대 척수 유래의 뉴런일 수 있으며, 그 손상은 충격(trauma), 독성 약제, 외과수술, 졸중, 국소빈혈, 감염, 대사 질환, 영양 결핍 및 다양한 악성종양을 포함하는 원인에 의한 것일 수 있다. 또 다른 특이

적 생물학적 활성은 신생혈관생성을 유도하는 능력이다.

- <76> 여기서 사용된 "치료"란 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과는 감지가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이, 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다. "치료"는 치료가 수용되지 않는 경우에 예측되는 생존과 비교해서 연장된 생존을 또한 의미한다. "치료"는 한 질환의 병변이 발전되거나 변경되는 것을 예방하는 의도로 수행되는 중재이다. 따라서, "치료"는 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리킨다. 치료할 필요가 있는 것들은 이미 질환을 가지고 있는 상태 뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 특히 치료는 신경 세포의 병변(pathology)과 같은 손상의 세포 변성의 병변을 직접 예방 또는 지연시키거나 감소시키는 것일 수 있고 또는 세포, 예컨대 뉴런을 다른 치료약제에 의한 치료에 더 민감하게 만드는 것일 수 있다. 더 바람직한 구체예에서 치료는 쇠퇴를 감소시키거나 지연시키고/거나 표적 뉴런의 기능의 회복을 촉진하는 것이다.
- <77> (만성)신경변성 질환 또는 급성 신경계 상해의 "병변"은 제한없이 신경의 기능장애, 퇴화, 상해 및/또는 죽음을 포함하는 환자의 존재에 영향을 미치는 모든 현상을 포함한다.
- <78> 여기서 가장 넓은 의미로 사용된 용어 "신경변성 질환" 및 "신경변성 질환"은 제한없이 신경 변성 및/또는 기능장애에 관련된 모든 병변의 질환들을 포함한다. 그 질환의 예는 말초 신경장애; 운동뉴런 질환, 근위축성측삭경화증(ALS, Lou Gehrig병), 안면신경마비, 및 척수성근위축 또는 마비와 관련된 다양한 질환과 같은 운동뉴런 질환; 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 간질, 다발성 경화증, 헌팅톤 무도병, 다운 증후군, 신경성 귀머거리 및 미니에르병과 같은 다른 인간의 신경변성 질환들을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- <79> "말초성 신경장애"는 운동, 감각, 감각운동, 또는 자율 기능 장애 중 하나 또는 그들의 조합들로서 가장 자주 나타나는 것들로서 말초 신경에 영향을 미치는 신경변성 질환이다. 통상 발생하는 말초성 신경장애는 예컨대, 시스템성 질환으로부터 초래되거나 신경독성 드러그 예컨대, 항신생물(antineoplastic) 약제 또는 산업 또는 환경 오염원들에 의해 유도될 수 있다. "말초 감각 신경장애"는 말초 감각 뉴런의 변성에 특징이 있는데, 그것은 특발성일 수 있고 예컨대 당뇨병(당뇨성 신경장애), 암의 세포증식억제제 치료법(예컨대, 빈크리스틴, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 3'-아지도-3'-데옥시티미딘 또는 탁산, 예컨대 팍리탁셀[TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ] 및 독세탁셀[TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France])과 같은 화학치료약제를 이용하는 치료), 알코올 중독, 후천성 면역결핍 증후군(AIDS), 또는 유전적 소인의 결과로서 발생할 수 있다. 통상 후천적 말초성 신경장애는 예컨대, Refsum병, Krabbe병, 이염백질이영양증, Fabry병, Dejerine-Sottas 증후군, 무베타지단백혈증 및 Charcot-Marie-Tooth(CMT)병(프로니얼(Proneal) 근위축증 또는 유전성 운동 감각 신경장애(HMSN)로도 알려져있다)을 포함한다. 말초성 신경장애 대부분의 유형은 수개월 또는 수년의 기간에 걸쳐 천천히 발전한다. 임상적인 관례상 그러한 신경장애는 만성이라 불리운다. 때때로 말초성 신경 장애는 수일에 걸쳐 빠르게 발전하는데 이는 급성이라 불리운다. 통상 말초성 신경장애는 감각 및 운동 신경에 함께 영향을 미쳐서 혼합된 감각 및 운동 신경장애를 유발하나, 순수한 감각 신경장애 및 순수한 운동 신경장애 또한 알려져 있다.
- <80> 본 발명에서 사용되는 용어 "독성 약제"는 그것의 화학적 작용을 통해 신경계의 한 구성성분의 활성을 손상시키거나 저해시키는 물질을 말한다. 많은 독성 약제(또한 "신경독성 약제"로도 불리움)에는 상기 나열한 것과 같은 화학치료약제, 알코올, 금속, 산업적 독성물질, 음식 및 의약 등의 오염물 등이 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- <81> 치료 목적의 "포유동물"은 인간, 가축, 동물원 동물, 스포츠 또는 애완용 동물, 예컨대, 개, 말, 양, 고양이, 소, 등을 포함하는 포유동물로서 분류된 어떤 동물을 가리킨다. 바람직하게 포유동물은 인간이다.
- <82> 여기서 사용된 용어 "trkC 이뮤노어드헤신(immunoadhesin)"은 "trkC-면역글로불린 키메라"와 호환되어 사용될 수 있으며 면역글로불린 서열과 trkC의 일부분(통상 그것의 세포외 도메인)과 조합한 키메라 분자를 가리킨다. 면역글로불린 서열은 바람직하게는 필수적인 것은 아니지만 면역글로불린 불변(constant) 도메인이다. 적절한 면역글로불린 불변 도메인 서열과 결합된 수용체 서열로부터 제조된 키메라(이뮤노어드헤신)는 당업계에 공지되어 있다. 문헌들에 보고된 이뮤노어드헤신은 T세포 수용체*(Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2936-2940[1987]; CD4*(Capon et al., Nature 337: 525-531[1989]; Traunecker et al., Nature, 339:68-70[1989]; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol., 9:347-353[1990]; Byrn et al., Nature, 344:667-670[1990]);

L-셀렉틴(호우밍 수용체)(Watson et al., J. Cell. Biol., 110:2221-2229[1990]; Watson et al., Nature, 349:164-167[1991]; CD44*(Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313[1990]); CD28* 및 B7*(Linsley et al., J. Exp. Med., 173:721-730[1991]; CTLA-4*(Linsley et al., J. Exp. Med. 174:561-569[1991]; CD22*(Stamenkovic et al., Cell, 66:1133-11144[1991]; TNF 수용체(Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539[1991]; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol., 27:2883-2886[1991]; Peppel et al., J. Exp. Med., 174:1483-1489[1991]); NP 수용체(Bennett et al., J. Biol. Chem. 266:23060-23067[1991]; 및 IgE 수용체 α*(Ridgway et al., J. Cell. Biol., 115:abstr. 1448[1991]의 융합들을 포함한다. 여기서 별표(*)는 그 수용체가 면역글로불린 슈퍼패밀리의 멤버라는 것을 의미한다.

- <83> 본 발명에서 "분리된" 핵산 또는 폴리펩티드는 그 핵산 또는 폴리펩티드의 동물 또는 인간의 공급원에 존재하는 오염물질 핵산 또는 폴리펩티드로부터 인식되고 분리된 핵산 또는 폴리펩티드를 가리킨다. 핵산 또는 폴리펩티드는 표지를 이용하여 진단 또는 프로브 목적으로 표지될 수 있으며 이는 하기 진단 분석 논의에서 더 상세히 설명될 것이다.
- <84> 통상 용어 "아미노산 서열 변이체"는 참조(예컨대 천연 서열) 폴리펩티드와 비교하여 그들의 아미노산 서열에서 어떤 차이를 갖는 분자를 가리킨다. 아미노산 변형은 천연 아미노산 서열에서의 치환, 삽입, 결실 또는 그러한 변경들의 바람직한 조합이 될 수 있다.
- <85> 용어 "DNA 서열 코딩", "DNA 코딩" 및 "핵산 코딩"은 데옥시리보핵산 가닥에 따라 있는 데옥시리보뉴클레오티드의 순서 또는 서열을 가리킨다. 이러한 데옥시리보뉴클레오티드의 순서는 폴리펩티드 체인을 따라 있는 아미노산의 순서를 결정한다. DNA 서열은 따라서 아미노산 서열을 코딩한다.
- <86> 용어 "복제가능한 발현 벡터" 및 "발현 벡터"는 DNA의 조각을 가리키는데, 통상 이중가닥이며, 그것은 외부 DNA 조각이 그 벡터 안으로 삽입될 수 있다. 외부 DNA는 이중 DNA로서 정의되며, 이는 숙주세포에서는 자연적으로 발견되지 않는 DNA이다. 그 벡터는 외부 또는 이중 DNA를 적당한 숙주세포로 운송하는 데에 이용된다. 숙주 세포에서 그 벡터는 숙주의 염색체 DNA와는 독립적으로 복제할 수 있으며, 그 벡터 및 그것의 삽입된 (외부)DNA의 수개의 복사본들이 생성될 수 있다. 또한 그 벡터는 외부 DNA를 폴리펩티드로 번역하도록 하는 필수 요소들을 함유한다. 외부 DNA에 의해 코딩된 많은 폴리펩티드 분자들은 따라서 빠르게 합성될 수 있다.
- <87> 용어 "콘트롤 서열"은 특정 숙주 개체 내에서 작동적으로 결합된 코딩 서열의 발현을 위해 필요한 DNA 서열을 말한다. 원핵생물에 적합한 콘트롤 서열은 예컨대 프로모터, 선택적으로 작동자 서열, 리보솜 결합 부위 및 기타 (약간이긴 하지만) 이해된 서열들을 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 (enhancer)를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- <88> 핵산은 그것이 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 위치될 때 "작동적으로 결합"되어 있다고 한다. 예컨대, 한 DNA가 그것의 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전단백질(preprotein)로서 발현된다면 전서열(presequence) 또는 분비 리더(secretory leader)의 DNA가 그 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동적으로 결합되고; 코딩 서열의 전사에 영향을 미친다면 프로모터 또는 인핸서가 작동적으로 그 서열에 결합되며; 번역을 촉진하기 위함이라면 리보솜 결합 부위가 코딩서열에 작동적으로 결합된다. 통상 "작동적으로 결합"된 이란 결합된 DNA 서열들이 근접한 것을 의미하며, 분비 리더의 경우에는 해독 상(reading phase)에 근접한 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 근접할 필요가 없다. 결합은 간편한 제한부위에서 라이게이션에 의해 수행된다. 그러한 부위들이 존재하지 않으면 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 종래 관례에 따라 사용된다.
- <89> 본 발명에서 사용되는 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"이라는 용어는 호환되며, 그러한 모든 정의는 자손을 포함한다. 따라서 "형질전환체" 및 "형질전환된 (숙주)세포"라는 말은 일차 대상 세포 및 그것으로부터 유래된 배양물(전달의 횟수에 상관없이)을 포함한다. 의도한 또는 의도하지 않은 돌연변이로 인해서 모든 자손이 DNA 함량에 있어 정확히 동일하지는 않는다는 것 또한 이해되고 있다. 본래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 같은 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 포함된다. 별개의 지정이 의도되는 경우에는 그 문맥으로부터 명백할 것이다.
- <90> 여기서 "외래" 요소는 세포에는 외부의 것이거나, 그 세포와 동종인 핵산 서열이지만 그 요소가 통상적으로는 발견되지 않는 숙주세포 핵산 내의 위치에 존재하는 것을 의미한다.
- <91> "항체(Ab)" 및 면역글로불린(Ig)"은 같은 구조적 특징을 갖는 당단백질이다. 항체가 특이적 항원에 대한 특이성을 나타내는 반면에, 면역글로불린은 항체, 및 항원 특이성이 결여된 항체 유사 물질 모두를 포함한다. 후자의 폴리펩티드는 예컨대 림프계에서는 낮은 수준으로 생산되며 골수종에 의해서 증가된 수준으로 생산된다.

- <92> "천연 항체" 및 "천연 면역글로불린"은 통상 약 150,000 달톤의 헤테로테트라머(heterotetrameric) 당단백질이며 두개의 동일한 라이트(L) 체인 및 두개의 동일한 헤비(H) 체인으로 구성된다. 각 라이트 체인은 하나의 공유 다이설파이드 결합에 의해 헤비 체인과 결합되어 있는데, 그 다이설파이드 결합의 수는 다른 면역글로불린 이소타입의 헤비 체인에 따라 다양하다. 각 헤비 및 라이트 체인은 또한 규칙적으로 공간이 떨어진 체인내 다이설파이드 결합을 갖는다. 각 헤비 체인은 한 말단에 하나의 가변 도메인(V_H)을 갖고 그 옆에는 많은 불변 도메인이 있다. 각 라이트 체인은 한 말단에 한 가변 도메인을 갖고 다른쪽 말단에 한 불변 도메인을 갖고; 그 라이트 체인의 불변 도메인은 헤비 체인의 제1불변 도메인과 함께 배열되며 그 라이트 체인의 가변 도메인은 헤비 체인의 가변 도메인과 함께 배열된다. 특정 아미노산 잔기들이 라이트 및 헤비 체인의 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성하는 것으로 보인다.
- <93> 용어 "가변"은 항체들 사이에서 가변 도메인의 특정 부분의 서열이 서로 극도로 다르다는 사실을 가리키는 것이고 이는 그것의 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에 이용된다. 그러나 그 가변성이 항체들의 가변 도메인 전체에 걸쳐 고르게 분포되는 것은 아니다. 라이트 체인 및 헤비 체인의 가변 도메인 모두 과가변(hypervariable) 영역으로 불리우는 세 절편이 있다. 가변 도메인 중 더 잘 보존된 부분들은 프레임워크 영역(FR)이라 부른다. 천연 헤비 및 라이트 체인 각각의 가변 도메인은 네개의 FR(각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함하며, 주로 세개의 과가변 영역에 의해 연결된 α -시트 구조를 형성하며, 그것은 루프 구조를 형성하고 일부 경우에는 β -시트 구조의 일부를 형성한다. 각각의 체인 내의 과가변 영역은 FR에 가까운 위치에서 다른 체인 유래의 과가변 영역과 결합하여 항체의 항원결합부위의 형성을 가능케 한다(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991), 페이지 647-669). 불변 도메인들은 항체의 항원과의 결합에 직접적으로 관련은 없지만 항체-의존적 세포 독성에서 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.
- <94> 여기서 사용된 용어 "과가변 영역"은 항원-결합을 유발하는 항체의 아미노산 잔기들을 가리킨다. 과가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"(즉, 라이트 체인 가변 도메인의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3), 헤비 체인의 가변 도메인의 31-35(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)) 유래의 아미노산 잔기들 및/또는 "과가변 루프"(즉, 라이트 체인 가변 도메인의 잔기들 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 헤비 체인 가변 도메인의 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)) 유래의 잔기들을 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR"잔기들은 여기서 정의하는 바로는 과가변 영역 이외의 가변 도메인 잔기들을 말한다.
- <95> 항체의 파파인 분해로 인해 두개의 동일한 항체-결합 단편이 생산되는데, 이를 "Fab" 단편이라 부른다. 각각은 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 잔기 "Fc" 단편은 그의 이름에서 유추할 수 있는 바와 같이 쉽게 결정화하는 능력을 갖는다. 펩신 처리에 의해서는 $F(ab')_2$ 단편이 생산되는데 그것은 두개의 항원-결합 부위를 가지며 항원과 교차결합할 수 있다.
- <96> "Fv"는 완전한 항원-인지 및 결합 부위를 포함하는 최소한의 항체 단편이다. 이 영역은 단단한 비공유결합으로 하나의 헤비 체인과 하나의 라이트 체인의 가변 도메인의 다이머로 구성된다. 이 구조에서는 각 가변 도메인의 세개의 과가변 영역들이 상호작용하여 V_H - V_L 다이머의 표면 상에 항원-결합 부위를 정의한다. 통합 여섯개의 과가변 영역이 항체에게 항원-결합 특이성을 제공한다. 그러나 단일의 가변 도메인이라도(단지 항원에 특이적인 세개의 과가변 영역만을 포함하는 Fv의 반일지라도) 비록 전체 결합 부위의 경우보다는 더 낮은 친화도이겠지만 항원을 인식하고 결합할 수 있다.
- <97> Fab 단편은 또한 라이트 체인의 불변 도메인 및 헤비 체인의 제1불변(CH1) 도메인을 포함한다. Fab' 단편은 Fab 단편과 다른데, 그 차이는 항체의 힌지 영역 유래의 하나 이상의 시스테인들을 포함하는 헤비 체인 CH1의 카르복실 터미널에 수개의 잔기들을 첨가한 것에 있다. Fab'-SH는 여기서는 Fab'를 가리키는 것인데 그것 내에 불변 도메인의 시스테인 잔기가 자유 티올(thiol)기를 생성한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 한쌍의 Fab' 단편들로서 생산되었는데, 그것들 사이에 힌지 시스테인을 가졌다. 다른 항체 단편들의 화학적 커플링 또한 알려져 있다.
- <98> 어떤 척추동물 중 유래의 항체(면역글로불린)의 "라이트 체인"은 그들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파, 람다로 불리우는 명확히 별개인 두개의 유형 중 하나이다.
- <99> 헤비 체인의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 면역글로불린은 다른 클래스로 분류된다. 다섯가지 주요한 면역글로불린 클래스는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이다. 이들중 몇몇은 서브클래스(이소타입)로 더 분류될 수

있다. 예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 분류될 수 있다. 다른 클래스의 면역글로불린들에 대응되는 헤비 체인 불변 도메인은 각각 ,로 불리운다. 다른 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 삼차원 구조들은 잘 알려져 있다.

- <100> 여기서 사용된 용어 "항체"는 가장 넓은 의미이며 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 특히 인간, 비인간(예컨대 쥐)을 포함하며 인간에 적응된 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체를 포함한), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예컨대, 이중특이적 항체) 및 항체 단편들을 포함한다.
- <101> "항체 단편"은 전장 항체, 통상 그것의 항원 결합 또는 가변 도메인의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편들, 다이어바디(diabody), 선형 항체, 단일-체인 항체 분자 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체들을 포함한다.
- <102> 여기서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종의 항체들의 군집으로부터 얻어진 항체, 즉 소수로 존재하는 가능한 자연발생 돌연변이를 제외하고는 그 군집을 포함하는 개별 항체들이 동일한 항체들을 의미한다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이며 단일 항원 부위에 대해 유도된다. 또한 전형적으로 다른 결정인자(에피토프)에 대해 유도된 다른 항체들을 포함하는 종래의 (폴리클로날) 항체 제조와 비교하여 각 모노클로날 항체는 그 항원에 대해 단일의 결정인자에 대해 유도된다. 그 변경자 "모노클로날"은 실질적으로 동질의 항체 군집으로부터 얻어진 항체의 특징들을 가리키며 그것을 구성함에 있어 어떤 특별한 방법에 의해 제조되는 것이 요구되지 않는다. 예컨대 본 발명에 따라 사용된 모노클로날 항체들은 Kohler et al., Nature 256:495(1975)에 의해 최초 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조되거나 재조합 DNA 방법(예컨대 미국특허번호 제4,816,567)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 예컨대 Clackson et al., Nature 352:624-628(1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)에 기재된 기술을 사용하여 파아지의 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있다.
- <103> 여기에서 특별히 모노클로날 항체는 헤비 체인 및/또는 라이트 체인의 일부분이 특정 종 유래의 항체들 또는 특정 항체 클래스 또는 서브 클래스에 속하는 항체들의 대응 서열과 동일하거나 상동적인 반면 그 체인의 나머지는 또 다른 종 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체들의 대응 서열과 동일하거나 상동적인 "키메라" 항체(면역글로불린), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 그 항체의 단편을 포함한다(미국특허번호 제4,816,567; Morrison et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984)).
- <104> 비인간(예컨대 쥐) 항체의 "인간화된" 형태는 비인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소한의 서열을 포함하는 키메라 항체들이다. 대부분의 부분들에서 인간화된 항체들은 수용자(recipient)의 과가변 영역 잔기들이 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간(공여자 항체) 유래의 과가변 영역 잔기들로 치환된 인간의 면역글로불린(수용자 항체)이다. 예컨대 인간의 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기들이 대응되는 비인간 잔기들에 의해 치환된다. 또한 인간화된 항체들은 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 이러한 변형들은 항체 성능을 더욱 다듬기 위해 행해질 수 있다. 통상 인간화된 항체는 하나 이상의 실질적으로 모든, 전형적으로는 두개의 가변 영역을 포함할 것인데, 그것 안에는 모든 또는 실질적으로 모든 과가변 영역이 비인간 면역글로불린의 그것에 대응되며 모든 또는 실질적으로 모든 FR이 인간의 그것에 대응된다. 인간화된 항체는 또한 선택적으로 적어도 일부분의 면역글로불린의 불변 영역(Fc), 전형적으로는 인간의 면역글로불린의 그것들을 포함할 수 있다. 더 상세한 내용은 Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329(1988) 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)을 참조하라.
- <105> "단일-체인 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편들은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 여기서 이러한 도메인들은 단일 폴리펩티드 체인 내에 존재한다. 통상 Fv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함하는데, 이는 sFv가 항원 결합을 위해 요구되는 구조를 형성하도록 한다. sFv에 대해서는 Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)를 참조하라.
- <106> 용어 "다이어바디"란 두개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 가리키는데, 그 단편들은 같은 폴리펩티드 체인(V_H-V_L) 내에서 라이트 체인의 가변 도메인(V_L)에 결합된 헤비 체인 가변 도메인(V_H)을 포함한다. 너무 짧아서 같은 체인 상의 두 도메인 사이를 페어링할 수 없는 링커를 사용하여 그 도메인들을 또다른 체인의 상보적 도메인과 페어링하도록 하여 두개의 항체-결합 부위를 생성한다. 다이어바디는 예컨대 EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)에 상세히 기재되어 있다.

- <107> 본 출원 전체에 걸쳐 사용된 "선형 항체"라는 표현은 Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)에 기재된 항체를 말한다. 간단히 이러한 항체들은 한쌍의 직렬 Fd 절편들($V_H-C_H1-V_H-C_H1$)을 포함하는데, 이들은 한쌍의 항원 결합 영역을 형성한다. 선형 항체들은 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.
- <108> 용어 "에피토프"란 단백질 항원 상에서의 (모노클로날 또는 폴리클로날) 항체를 위한 결합 부위를 말한다.
- <109> 인간의 천연 서열 trkC의 아미노산 서열 내의 도메인 5 및/4에 결합하거나 또는 비인간 trkC 수용체 내의 등가의 에피토프와 결합하는 항체는 "에피토프 맵핑"에 의해 인식된다. 단백질 상의 에피토프의 위치를 맵핑하고 특징을 찾기 위한 많은 방법이 당업계에 공지되어 있다. 그것은 Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999의 11장에 기재된 바와 같이 항체-항원 복합체의 결정 구조를 용해시키는 것, 경쟁 분석, 유전자 단편 발현 분석 및 합성 펩티드-의존적 분석을 포함한다. 경쟁 ELISA 분석은 실시예1에 특별히 기재되어 있다. 유전자 단편 발현 분석에 따르면 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임은 무작위적으로 또는 특이적 유전적 구성에 의해 단편화될 수 있고, 그 발현된 단백질 단편의 테스트될 항체와의 반응성이 결정된다. 유전자 단편은 예컨대 방사성 아미노산의 존재하에서 PCR에 의해 생산된 후 생체외에서 전사 및 번역되어 단백질이 될 수 있다. 방사성 표지된 단백질 단편에의 항체의 결합은 그 다음에 면역침전법 및 젤 전기영동에 의해 결정된다. 특정 에피토프는 또한 과아지파티클의 표면 상에 디스플레이된 무작위의 펩티드 서열들의 대규모 라이브러리(과아지 라이브러리)를 사용하여 인식될 수 있다. 대안으로는 오버랩핑 펩티드 단편들의 특정 라이브러리가 간단한 결합 분석에서 항체의 결합에 대해 테스트될 수 있다. 후자의 방법은 약 5 내지 15개의 아미노산의 선형 에피토프를 정의하는 데에 적합하다.
- <110> 두개의 항체가 같은 동일하거나 입체배치적으로 오버랩핑되는 에피토프를 인지했을 때 항체는 참조 항체로서의 "실질적으로 동일한 에피토프"에 결합한다. 두 에피토프가 동일하거나 입체배치적으로 오버랩핑되는 에피토프에 결합하는지 아닌지를 결정하기 위해 사용되는 가장 일반적이고 빠른 방법은 경쟁 분석으로서, 그것은 표지된 항원 또는 표지된 항체를 이용하여 모든 수의 다른 포맷들에 적용될 수 있다. 통상 항원은 96-웰 플레이트 상에 고정되며 표지된 항체들의 결합을 방해하는 비표지된 항체들의 능력은 방사성 또는 효소 표지를 이용하여 측정될 수 있다. 경쟁 ELISA 분석은 실시예1에 기재되어 있다.
- <111> 아미노산 또는 아미노산 잔기라는 용어는 여기에서 자연 발생적인 L 아미노산을 가리키거나 또는 하기 변이체에 관해서 더 설명되는 바와 같이 D-아미노산을 가리킨다. 통상 사용되는 아미노산을 위한 하나 및 세개의 약자가 여기에서 사용된다(Bruce Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York(3d ed. 1994)).
- <112> 혼성화는 바람직하게는 "스트린전트 조건"하에서 수행된다. 그 조건은 (1)세척을 위한 낮은 이온력 및 높은 온도, 예컨대 50℃에서 0.015M의 염화나트륨/0.0015M의 시트르산 나트륨/0.1% 소듐 도데실 설페이트를 이용하거나, (2)포름아마이드(예컨대, 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% Ficol1/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750mM의 염화나트륨 및 75mM 시트르산 나트륨을 갖는 pH 6.5의 50mM 인산 나트륨 버퍼를 포함하는 50%(v/v) 포름아마이드)와 같은 변성제를 42℃에서 혼성화하는 동안을 의미한다. 또 다른 예는 42℃에서 0.2 x SSC 및 0.1% SDS 내에서 세척하면서 50% 포름아마이드, 5 x SSC(0.75M NaCl, 0.075M 시트르산 나트륨), 50mM 인산 나트륨(pH 6/8), 0.1% 피로인산 나트륨, 5 x Denhardt의 용액, 소니케이션된 연어 정자 DNA(50g/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 설페이트를 42℃에서 이용하는 것이다.
- <113> B. 본 발명을 수행하기 위한 방법
- <114> 본 발명은 아고니스트 인간 및 비인간 모노클로날 항체(후자의 인간화된 형태를 포함)에 관한 것으로서, 그것은 trkC 수용체의 천연 리간드인 NT-3의 특정 생물학적 활성을 모방한다. 쥐 및 인간의 안티-trkC 항체의 생산을 위한 일반적인 기술은 당업계에 널리 공지되어 있고 하기에서도 기술된다. 아고니스트 항체의 선별을 포함하여 더 상세한 것은 하기 실시예1에서 제공된다.
- <115> 1. 항체 제조
- <116> (i) 폴리클로날 항체
- <117> 폴리클로날 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 폴리클로날 항체는 포유동물에서 발생될 수 있는데, 예컨대 면역화제 및 원한다면 보조제를 하나 이상 주입함에 의해 발생될 수 있다. 전형적으로, 그 면역화제 및/또는 보조제는 다중의 피하내 또는 정맥내 주입에 의해 포유동물에 주입될 것이다. 그 면역화제를 면역화된

포유동물 내에서 면역원성인 것으로 알려진 단백질, 예컨대 혈청 알부민 또는 콩 트립신 저해제에 컨저게이션시키는 것이 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 보조제의 예는 프로인트 완전 보조제 및 MPL-TDM을 포함한다.

- <118> (iii) 모노클로날 항체
- <119> 모노클로날 항체를 Kohler et al., Nature, 256:495(1975)에 의해 처음 기술된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있고, 또는 재조합 DNA 방법(미국특허번호 제4,816,567)에 의해 제조될 수 있다.
- <120> 하이브리도마 방법에서 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 짧은꼬리원숭이를 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜 면역화에 사용되는 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 대안으로는 림프구가 생체외에서 면역화될 수 있다. 그 다음에 림프구는 적당한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103[Academic Press, 1986]).
- <121> 상기와 같이 하여 제조된 하이브리도마 세포를 적당한 배양 배지(바람직하게는 융합되지 않은 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 포함하는)에 시딩하고 성장시켰다. 예컨대 부모 골수종 세포가 효소인 하이폭산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 없다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 HGPRT 결핍 세포의 성장을 방해하는 하이폭산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이다(HAT 배지).
- <122> 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감하며, 선별된 항체-생산 세포에 의해 높은 수준의 항체를 안정되게 생산할 수 있도록 지지하는 세포이다. 이들 중 바람직한 골수종 세포주는 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양 유래의 것(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA로부터 얻을 수 있는)과, SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA)와 같은 세포주이다. 인간의 골수종 및 마우스-인간의 이중골수종 세포주 또한 인간의 모노클로날 항체 생산을 위해 사용되는 것으로 기재되어 있다(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York[1987]).
- <123> 하이브리도마 세포가 자라는 배양 배지는 항원에 대한 모노클로날 항체를 위해 분석된다. 바람직하게는 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성이 방사선면역분석법(RIA) 또는 효소-링크 면역흡착 분석법(ELISA)과 같은 생체의 결합 분석에 의해 또는 면역침전법에 의해 결정된다.
- <124> 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예컨대 Munson et al, Anal. Biochem., 107:220(1980)의 Scatchard 분석에 의해 결정된다.
- <125> 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포가 인식된 후에 그 세포는 제한 회석 절차에 의해 서브클로닝될 수 있고 표준 방법에 의해 성장될 수 있다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103[Academic Press, 1986]). 이 목적을 위한 적당한 배양 배지는 예컨대 DMEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한 하이브리도마 세포는 생체내에서 동물 내의 복수 종양과 같이 자랄 수 있다.
- <126> 상기 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체는 배양 배지, 복수 유체 또는 혈청으로부터 종래의 면역글로불린 정제 절차, 예컨대 Protein A-세파로즈, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피에 의해 적당히 분리된다.
- <127> 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 종래의 절차들(예컨대, 모노클로날 항체의 헤비 및 라이트 체인을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여)을 이용하여 용이하게 분리될 수 있다. 하이브리도마 세포는 그러한 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 분리되면 그 DNA는 발현 벡터에 놓여질 수 있고 그 벡터는 이콜라이(E. coli)세포, 시미안 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO)세포, 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포들(트랜스펙션되지 않으면 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는)에 트랜스펙션시켜 재조합 숙주세포에서 모노클로날 항체를 합성할 수 있다. 그 DNA는 또한 변형될 수 있는데, 예컨대 상동적인 쥐의 서열 위치에서 코딩서열을 인간의 헤비 및 라이트 체인의 불변 도메인으로 치환하거나(Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6851(1984), 그 면역글로불린 코딩서열에 모든 또는 일부의 비-면역글로불린 폴리펩티드의 코딩서열을 공유결합시킴으로써 변형될 수 있다. 그런 방식으로 여기의 안티-trkC 모노클로날 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 생성된다.

- <128> 전형적으로 그러한 비-면역글로불린 폴리펩티드가 본 발명 항체의 불변 도메인 대신 치환되거나 본 발명 항체의 항원-결합 부위의 가변 도메인 대신 치환됨으로써 trk 수용체에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 다른 항원에 대한 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체가 생산된다.
- <129> 키메라 또는 하이브리드 항체는 또한 교차결합제에 관련된 것들을 포함하는 합성 단백질 화학에서의 공지의 방법을 이용하여 생체외에서 제조될 수 있다. 예컨대 이뮤노톡신이 다이설파이드 교환 반응을 이용하거나 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 구성될 수 있다. 이 목적을 위한 바람직한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트를 포함한다.
- <130> 항체의 제조법 생산은 하기에 더욱 상세히 설명될 것이다.
- <131> (iii) 인간화된 항체
- <132> 통상 인간화된 항체는 비인간 공급원으로부터 그것에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기들을 갖는다. 이러한 비인간 아미노산 잔기들은 종종 "수입" 잔기라 불리우는데, 그것은 전형적으로 "수입" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 인간화는 실질적으로 Winter 및 그 동료들의 방법에 따라[Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988)], 인간 항체의 대응 서열을 설치류의 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 수행될 수 있다.
- <133> 따라서 그러한 "인간화된" 항체는 본래의 완전한 인간의 가변 도메인이 비인간 종 유래의 대응 서열에 의해 치환된 키메라 항체(Cabilly, 상기 언급함)이다. 실용적으로 인간화된 항체는 전형적으로 일부의 CDR 잔기들 가능하게는 FR 잔기들이 설치류의 항체 내의 상동 부위들의 잔기들에 의해 치환된 인간 항체이다.
- <134> 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 성질들을 보유한 채 인간화되는 것이 중요하다. 이 목적을 달성하기 위해서는 바람직한 방법에 따라, 인간화된 항체가 부모 및 인간화된 서열의 삼차원 모델을 이용하여 부모 서열 및 다양한 개념상의 인간화된 산물들을 분석하는 과정에 의해 제조된다. 삼차원 면역글로불린 모델은 공통적으로 당업자들이 이용가능하며 친숙하다. 선별된 후보자 면역글로불린 서열의 가능한 삼차원 구조가 컴퓨터 프로그램을 이용하여 도시되고 디스플레이될 수 있다. 이러한 디스플레이 검사를 통해 후보 면역글로불린 서열이 기능함에 있어서 그 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있다. 예컨대 후보 면역글로불린이 그것의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기들을 분석할 수 있다. 이러한 방식으로 FR 잔기들이 공통 서열 및 수입 서열로부터 선별되고 조합되어, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원에 대한 증가된 친화도가 달성될 수 있다. 일반적으로 CDR 잔기들이 항원 결합에 직접 그리고 가장 실질적으로 영향을 미친다. 더 상세한 내용은 미국출원번호 제07/934,373호(1992.8.21 출원)를 참조하라. 이것은 1991.6.14.에 출원된 미국출원번호 제07/715,272호의 일부계속출원이다.
- <135> (iv) 인간 항체
- <136> 인간의 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간의 골수종 및 마우스-인간의 이종골수종 세포주가 인간의 모노클로날 항체의 생산을 위해 기재되었다. 예컨대 Kozbor, J. Immunol. 133, 3001(1984) 및 Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)를 참조하라.
- <137> 현재에는 내재성 면역글로불린 생산이 없는 경우 면역화시 인간 항체의 한 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물(예컨대 마우스)을 생산할 수가 있다. 예컨대 키메라 및 생식계열 돌연변이체 마우스에서의 항체 헤비체인의 결합 영역(J_H) 유전자의 동질접합성 결실로 인해 내재성 항체 생산이 완전히 저해된다는 것이 기술되어 있다. 그러한 생식계열 돌연변이체내에서 인간의 생식계열 면역글로불린 유전자 어레이를 트랜스퍼하면 항원 켈린지시에 인간 항체가 생산될 수 있다. 예컨대 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555(1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258(1993)을 참조하라.
- <138> Mendez et al. (Nature Genetics 15: 146-156(1997))는 그 기술을 더욱 개선시켜 "Xenomouse(제노마우스) II"로 지정된 트랜스제닉 마우스 계열을 제조하였는데, 이는 항원을 가지고 켈린징했을 때 인간 항체에 높은 친화도를 나타냈다. 이는 상기 기재된 바와 같이 메가베이스의 인간의 헤비 체인 및 라이트 체인 로커스를 결실 부분이 있는 마우스의 내재성 J_H 절편안으로 생식계열 통합시킴으로써 수행되었다. 그 제노마우스 II는 약 66 V_H 유전자, 완전한 D_H 및 J_H 영역 및 세개의 다른 불변 영역(μ , δ 및 χ)을 함유한 1,020kb의 인간 헤비 체인 로

커스를 포함하며 또한 32V_K 유전자, J_K 절편 및 C_K 유전자를 함유한 800kb의 인간 κ 로커스를 포함한다. 이러한 마우스에서 생산된 항체들은 모든 면에서 인간에서 보여지는 것들과 유사하다. 예컨대 유전자 재배열, 조립 및 레퍼토리 등이다. 쥐의 로커스에서는 유전자 재배열을 방해하는 내재성 J_H 절편의 결실로 인해 인간 항체들이 내재성 항체들에 비해 우선적으로 발현된다.

<139> 대안으로는 파아지 디스플레이 기술(McCafferty et al., Nature 348, 552-553[1990])이 사용되어 비면역화된 공여자들 유래의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 생체외에서 인간의 항체 및 항체 단편들이 생산될 수 있다. 이 기술에 따르면 항체 V 도메인 유전자가 M13 또는 fd와 같은 사상 박테리오파지의 다수의 또는 소수의 코우트 단백질 안으로 프레임에 맞춰서 클론되어 그 파아지 파티클의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이된다. 그 사상 파티클은 파아지 게놈의 단일가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에 그 항체의 기능적 성질에 기초한 선별을 통해 그러한 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자를 선별할 수 있다. 따라서 파아지는 B-세포의 일부 특징들을 모방한다. 파아지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 예컨대 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571(1993)을 참고하라. V-유전자 절편의 몇몇 공급원이 파아지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. Clackson et al., Nature 352, 624-628(1991)은 면역화된 마우스의 지라로부터 유래된 V 유전자들의 작고 랜덤한 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 분리하였다. 비면역화된 인간 공여자들로부터 얻은 V-유전자들의 레퍼토리가 구성될 수 있고 다양한 배열의 항체들이 Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597(1991) 또는 Griffith et al., EMBO J. 12, 725-734(1993)에 의해 기재된 기술에 따라 실질적으로 분리될 수 있다. 천연 면역 반응에서 항체 유전자는 높은 비율로 돌연변이를 축적한다(체세포성 과돌연변이). 도입된 일부 변화들은 높은 친화도를 제공할 수 있고 높은 친화도의 표면 면역글로불린을 디스플레이하는 B세포가 뒤따르는 항체 선택지동안 우선적으로 복제되고 분화된다. 이러한 자연적인 과정들이 "체인 셔플링(shuffling)"으로 알려진 기술을 사용함으로써 모방될 수 있다(Marks et al., Bio/Technol. 10, 779-783[1992]). 이 방법에서는 파아지 디스플레이에 의해 얻어진 "일차" 인간 항체의 친화도가, 비면역화된 공여자들로부터 얻어진 V 도메인 유전자들의 자연발생적 변이체들(레퍼토리들)의 레퍼토리를 가지고 헤비 및 라이트 체인 V 영역 유전자를 연속적으로 치환함으로써 향상될 수 있다. 이 기술을 통해 nM 범위내의 친화도를 갖는 항체 및 항체 단편들을 생산할 수 있다. 매우 큰 파아지 항체 레퍼토리(일명 "모든 라이브러리의 어미")를 제조하기 위한 전략이 Waterhouse et al, Nucl. Acids Res. 21, 2265-2266(1993)에 의해 기재되어 있고, 그러한 큰 파아지 라이브러리로부터 직접적으로 높은 친화도의 인간 항체를 분리하는 것이 Griffith et al., EMBO J.(1994)에 보고되어 있다. 유전자 셔플링이 또한 설치류 항체로부터 인간 항체들을 유도하는 것에 사용될 수 있다. 여기에서 인간 항체는 그 출발 물질인 설치류의 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. 이 방법(여기서는 또한 "에피토프 임프린팅(imprinting)"으로 불리우는)에 따르면, 파아지 디스플레이 기술에 의해 얻어진 설치류 항체들의 헤비 또는 라이트 체인 V 도메인 유전자가 한 레퍼토리의 인간 V 유전자로 치환되어 설치류-인간 키메라를 생성시킨다. 항원을 선별하여 기능적 항원-결합 부위를 회복할 수 있는 인간의 가변 부위를 분리할 수 있다. 즉, 에피토프가 파트너 선택을 결정한다. 잔존하는 설치류의 V 도메인을 교체하기 위해 그 과정이 반복될 때 인간 항체들이 얻어진다(PCT 특허출원 WO 93/06213 참조, 1993.4.1. 공개). CDR 이식에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와는 달리 이 기술은 완벽히 인간 항체를 제공하며, 이는 설치류 기원의 프레임워크 또는 CDR이 없다.

<140> (v) 이중특이성 항체

<141> 이중특이성 항체들은 모노클로날, 바람직하게는 인간의 또는 인간화된 항체들로서, 그것들은 적어도 두개의 다른 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다. 이 경우에 있어서는 그 결합 특이성 중 하나가 아고니스트 항체를 제공하기 위한 trkC 수용체에 대한 것이며, 다른 하나가 어떤 다른 항원, 바람직하게는 다른 수용체 또는 수용체 서브유닛을 위한 것이다. 예컨대 trkC 수용체에 특이적으로 결합하는 이중 항체 및 뉴로트로핀, 또는 trkC 수용체 및 또 다른 trk 수용체들이 본 발명의 범위 내에 있다.

<142> 이중특이성 항체들을 만드는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로 이중특이성 항체들의 재조합 생산은 두개의 면역글로불린의 헤비 체인-라이트 체인 쌍의 공동발현에 기초한다. 여기서 두개의 헤비 체인은 두개의 다른 특이성을 갖는다(Millstein and Cuello, Nature 305, 537-539(1983)). 면역글로불린 헤비 및 라이트 체인의 무작위적인 분류로 인해, 이러한 하이브리도마(quadromas)는 10개의 다른 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산하고 그것 중 단지 하나만이 올바른 이중특이성 구조를 갖는다. 그 올바른 분자의 정제는 통상 친화성 크로마토그래피 스텝에 의해 행해지지만, 다소 번거롭고 수율이 낮다. 유사한 절차들이 PCT 출원 공개 NO. WO 93/08829(1993.5.13. 공개) 및 Traunecker et al., EMBO 10, 3665-3659(1991)에 기재되어 있다.

- <143> 다른 더 바람직한 접근법에 따르면, 바람직한 결합 특이성을 갖는 항체의 가변 도메인(항체-항원 결합 부위)이 면역글로불린 불변 도메인 서열과 융합된다. 그 융합은 아마도 면역글로불린 헤비 체인 불변 도메인을 가지며 그것은 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 적어도 한 융합에 존재하는 라이트 체인 결합을 위해 요구되는 부위를 함유하는 제1 헤비 체인 불변 영역(CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 헤비 체인 융합 및 원한다면 면역글로불린 라이트 체인을 코딩하는 DNA가 별개의 발현 벡터로 삽입된 후 적당한 한 숙주 유기체에 공동트랜스펙션시킨다. 그 구성에 사용된 세개의 폴리펩티드 체인의 비율이 동등하지 않을 때 최적의 수율을 제공한다면 구체예들에서 세 폴리펩티드 단편들의 상호 비율을 조정함으로써 우수한 용통성을 제공할 수 있다. 그러나 두개 이상의 폴리펩티드가 동등한 경우에도 발현이 높은 수율로 이루어지거나 그 비율이 어떠한 특정 효과도 발생시키지 않는 경우에는 한 발현 벡터 내에 폴리펩티드 체인 두개 또는 세개 모두를 삽입시키는 것도 가능하다. 한 접근법에 관한 바람직한 구체예에서 이중특이적 항체들은 한쪽 팔에 제1결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 헤비 체인 및 다른쪽 팔에는 제2결합 특이성을 제공하는 하이브리드 면역글로불린 헤비 체인-라이트 체인 쌍으로 구성된다. 이 입체 구조는 원치않는 면역글로불린 체인 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다. 그 이유는 이중특이성 분자의 단지 한 쪽에만 면역글로불린 라이트 체인이 존재함으로써 분리가 쉬어지기 때문이다. 이 접근법은 PCT 공개번호 WO 94/04690(1994.3.3.공개)에 개시되어 있다.
- <144> 이중특이성 항체를 제조하는 더 상세한 설명은 예컨대 Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210(1986)을 참조한다.
- <145> (vi) 헤테로컨저게이트 항체
- <146> 헤테로컨저게이트 항체는 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 헤테로컨저게이트 항체는 두개의 공유결합된 항체로 구성되어 있다. 그러한 항체들은 예컨대 면역 시스템 세포를 원치않는 세포로 표적화시키거나(미국특허 제 4,676,980), HIV 감염 치료를 위해 제안되어져 왔다(PCT 출원공개 WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP 03089). 헤테로컨저게이트 항체는 어떤 간편한 교차결합방법에 의해 제조될 수 있다. 적당한 교차결합제는 당업계에 잘 알려져 있고 미국특허 제4,676,980에 많은 교차결합 테크닉과 함께 기재되어 있다.
- <147> (vii) 항체 단편
- <148> 특정 구체예에서 안티-trkC 항체(쥐, 인간 및 인간화된 항체 및 항체 변이체를 포함하여)는 항체 단편이다. 다양한 테크닉이 항체 단편 생산을 위해 개발되어 왔다. 전통적으로 이러한 단편들은 본래의 완전한 항체의 단백질 가수분해에 의해 유도되었다(예컨대 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117(1992) and Brennan et al., Science 229:81(1985) 참조). 그러나 이러한 단편들은 현재 재조합 숙주세포에 의해 직접 제조될 수 있다. 예컨대 Fab'-SH 단편들은 직접 이콜라이(*E.coli*)로부터 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 회수할 수 있다(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167(1992)). 또다른 구체예에서 F(ab')₂가 그 F(ab')₂ 분자의 조립을 촉진하기 위한 루신 지퍼 GCN4를 사용하여 형성된다. 또다른 접근법에 따르면 Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편들이 재조합 숙주 세포 배양으로부터 직접 분리될 수 있다. 항체 단편들을 생산하기 위한 다른 테크닉들도 당업자에게 명백할 것이다.
- <149> (viii) 항체의 아미노산 서열 변이체
- <150> 안티-trkC 항체 DNA 안으로 적절한 뉴클레오티드 변경을 도입함으로써 안티-trkC 항체의 아미노산 서열 변이체가 생산된다. 그러한 변이체들은 예컨대 여기의 실시예들의 안티-trkC 항체의 아미노산 서열 내의 잔기들의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환이 조합되어 최종 구조체에 이를 수 있다(그 최종 구조체가 원하는 특성을 가지는 한). 그 아미노산 변화는 또한 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변경과 같은 인간화된 또는 변이체 안티-trkC 항체의 번역후 과정에 의한 것일 수 있다.
- <151> 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치인 안티-trkC 항체의 특정 잔기들 또는 영역을 인식하는 데에 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이다(이는 Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085(1989)에 기술되어 있음). 여기서 한 잔기 또는 한 그룹의 표적 잔기들이 인식되고(예컨대, arg, asp, his, lys, 및 glu), 그것이 중성 또는 음성적으로 전하가 부여된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 trkC

항체와 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 그 치환에 대한 기능성 민감성이 입증된 이러한 아미노산 위치들은 그 치환 부위에서의 그 이상의 또는 다른 변이들을 도입함으로써 더욱 세밀하게 가공될 수 있다. 따라서 아미노산 서열 변이가 도입되는 그 부위는 미리 정해지지만 돌연변이 그 자체의 성질은 미리정해질 필요가 없다. 예컨대 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해서 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발이 그 표적 코돈 또는 영역에서 수행되고 그 발현된 안티-trkC 항체 변이체는 원하는 활성에 대해 스크리닝된다.

<152> 아미노산 서열 삽입은 또한 한 잔기로부터 백개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드에 이르는 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-터미널 융합을 포함한다. 또한 단일 또는 다수개의 아미노산 잔기들의 서열내 삽입을 포함한다. 터미널 삽입의 예는 N-터미널 메티오닐 잔기를 갖는 안티-trkC 항체 또는 에피토프 태그에 융합된 항체를 포함한다. 안티-trkC 항체 분자의 다른 삽입 변이는 그 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드를 안티-trkC 항체의 N- 또는 C-터미널에 융합시키는 것을 포함한다(하기 참조).

<153> 또 다른 유형의 변이는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이들은 안티-trkC 항체 분자에 있는 적어도 하나의 아미노산 잔기가 제거되고 다른 잔기가 그 위치에 삽입된다. 치환 돌연변이유발을 위해 가장 좋은 부위는 과가변 영역을 포함하지만 FR 변형 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 제목하에 하기 표1에 나타나 있다. 그러한 치환들이 생물학적 활성에 변형을 초래한다면 표 1의 "치환 예"에서 후보로 기재된 더 많은 실질적 변경들 또는 하기 기재된 바와 같이 아미노산 클래스를 참고로 하여 도입되고 그 산물이 스크리닝될 수 있다.

표 1

본래 잔기	치환예	바람직한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

<154> 치환 영역의 폴리펩티드 백본 구조, 예를 들어, 시트 또는 나선 구조로 (b)표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성 및 (c) 사이드 체인의 벌크(bulk)를 유지함에 있어서의 그들의 영향에 현저히 차이를 유발하는 치환을 선별

함으로써 항체의 생물학적 성질을 실질적으로 변경할 수 있다. 자연 발생 잔기들은 공통적인 사이드 체인 성질에 기초하여 여러 그룹들로 분류된다:

- <156> (1) 소수성: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- <157> (2) 뉴트럴 친수성: cys, ser, thr;
- <158> (3) 산성: asp, glu;
- <159> (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- <160> (5) 체인의 방위(orientation)에 영향을 미치는 잔기들: gly, pro; 및
- <161> (6) 방향성: trp, tyr, phe.

<162> 비보전적 치환들은 이러한 클래스 중 하나의 한 멤버들을 또다른 클래스와 교환하는 것이 될 것이다.

<163> 인간화된 또는 변이체 안티-trkC 항체의 적절한 구조를 유지함에 관련되지 않은 어떤 시스테인 잔기는 통상 세린으로 치환되어 그 분자의 산화 안정성을 향상시키고 잘못된 교차결합을 막을 수 있다. 반대로 시스테인 결합이 항체에 추가되어 그것의 안정성을 향상시킬 수 있다(특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우에).

<164> 특히 바람직한 타입의 치환 변이는 하나 이상의 부모 항체(예컨대 인간화된 또는 인간 항체)의 과가변 영역 잔기들을 치환하는 것과 관련된다. 더 이상의 개발을 위해 선별된 변이체들은 그들을 발생시킨 부모 항체들에 비해 향상된 생물학적 특성을 가질 것이다. 그러한 치환 변이체를 제조하기 위한 편리한 방법은 파아지 디스플레이를 이용한 친화도 성숙이다. 간단히 몇개의 과가변 영역 부위(예컨대 6-7개의 부위)를 돌연변이시켜 각 부위에서 가능한 모든 아미노 치환을 형성한다. 이렇게 하여 형성된 항체 변이체들은 각 파티클 내에 패키징된 M13의 유전자 III 산물로의 융합과 같이 사상 파아지 파티클로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 그 파아지-디스플레이된 변이체들은 여기서 기재한 바와 같이 그들의 생물학적 활성(예컨대 결합 친화도)에 대해 스크리닝된다. 변형을 위한 후보자 과가변 영역 부위를 식별하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발이 수행되어 항원 결합에 현저히 공헌하는 과가변 영역 잔기를 인식할 수 있다. 대안으로, 또는 부가적인 방법으로는 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 항체와 인간의 trkC 간의 접촉점을 인식하는 것이 유익할 수 있다. 그러한 접촉 잔기들 및 그 이웃하는 잔기들은 여기서 기술하는 테크닉에 따라 치환을 위한 후보가 될 수 있다. 그러한 변이체들이 제조되면 변이체들의 패널이 여기서 기재된 바와 같이 스크리닝하여 하나 이상의 관련 분석에서 우수한 특성을 갖는 항체들을 개발을 위해 선별할 수 있다.

<165> (ix) 항체의 글리코실화 변이체

<166> 항체는 그들의 불변 영역의 보존 위치에서 글리코실화된다(Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128[1997]; Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32[1997]). 면역글로불린들의 올리고당 사이드 체인은 단백질의 기능(Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318[1996]; Wittwe and Howard, Biochem. 29:4175-4180[1990]), 및 글리코단백질 부분들간의 분자내 상호작용(이것은 글리코단백질의 구조 및 그 글리코단백질의 표현된 삼차원 표면에 영향을 미침)(Hefferis and Lund, 상기와 같음; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416[1996])에 영향을 미친다. 올리고당은 또한 특이적 인지 구조에 기초하여 주어진 글리코당을 특정 분자들로 표적화시킬 수 있다. 예컨대 아갈락토실화된 IgG에서 그 inter-CH2 공간 및 터미널 N-아세틸글루코사민 잔기 바깥의 올리고당 부분 'flips'는 만노스 결합 단백질에 결합 가능하게 될 수 있다(Malhotra et al., Nature Med. 1:237-243[1995]). CAMPATH-1H(인간 림프구의 CDw52 항원을 인지하는 재조합 인간화된 쥐의 모노클로날 IgG1 항체)로부터 올리고당을 글리코캡티다제로 제거하면 차이니즈 햄스터 난소(CHO)세포에서 상보적 매개 용균(CMCL)이 완전히 감소되었다(Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318[1996]). 반면에 뉴라미니다제를 사용하여 시알산 잔기를 선별적으로 제거하면 CMCL의 어떤 손실도 없었다. 항체의 글리코실화는 또한 항체-의존적 세포독성(ADCC)에 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔다. 특히 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사민트랜스퍼라제 III(GnT III)의 테트라사이클린-조절 발현을 갖는 CHO 세포는, 이분된 GlcNAc의 글리코실트랜스퍼라제 촉매형성으로 ADCC 활성이 개선된다는 것이 보고되었다(Umana et al., Mature Biotech. 17:176-180[1999]).

<167> 항체의 글리코실화 변이체는 그 안에 항체의 글리코실화 패턴이 변경된 변이체이다. 변경이란 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부분들을 삭제하거나 그 항체에 하나 이상의 탄수화물을 부가하거나 글리코실화의 조성(글리코실화 패턴), 글리코실화의 정도 등을 변경하는 것을 의미한다. 글리코실화 변이체는 예컨대 그 항체를 코딩하는 핵산 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위를 제거, 변경 및/또는 부가함으로써 제조된다.

- <168> 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-링크 또는 O-링크이다. N-링크는 그 탄수화물 부분이 아스파라진 잔기의 사이드 체인에 부착된 것이다. 트리펩티드 서열 아스파라진-X-세린 및 아스파라진-X-트레오닌(여기서 X는 프롤린 이외의 아미노산임)이 아스파라진 사이드 체인에 그 탄수화물 부분이 효소적으로 부착하기 위한 인지 서열이다. 따라서 폴리펩티드에서 이러한 트리펩티드 서열의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 만든다. O-링크 글리코실화는 슈가 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌(5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신 또한 사용되긴 하지만) 중 하나가 부착된 것이다.
- <169> 글리코실화 부위를 항체에 부가하는 것은 아미노산 서열이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 변경함으로써 수행된다(N-링크 글리코실화 부위를 위해). 그 변경은 또한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 본래의 항체 서열에 부가하거나 치환함으로써 수행될 수 있다(O-링크 글리코실화 부위를 위해).
- <170> 안티-trkC 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산은 당업계에 공지된 다양한 방법들에 의해 제조된다. 이러한 방법들은 천연 공급원으로부터의 분리(자연발생적인 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 안티-trkC 항체의 더 이전에 제조된 변이체 또는 비-변이 버전의 올리고뉴클레오티드-매개(또는 부위-특이적) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이 유발을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- <171> 항체의 글리코실화(글리코실화 패턴을 포함)는 또한 그것의 기초인 뉴클레오티드 서열을 변경함이 없이 변경될 수 있다. 글리코실화는 크게 그 항체를 발현하는 데에 사용될 숙주 세포에 의존한다. 제조할 글리코단백질, 예컨대 잠재적인 치료법인 항체와 같은 제조할 글리코단백질의 발현에 사용되는 세포 유형은 거의 자기 본연의 세포가 아니기 때문에 항체의 글리코실화 패턴에 상당한 변이를 기대할 수 있다(Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070[1997]). 숙주 세포 선택에 더하여 항체의 제조할 생산 동안 글리코실화에 영향을 미치는 인자들은 성장 모드, 배지 조제, 배양 농도, 산소 주입, pH, 정제 방법 등을 포함한다. 다양한 방법들이 특정 숙주 유기체에서 글리코실화 패턴을 변경하기 위해 제안되어 왔는데, 그 예로는 올리고당 생산에 관련된 특정 효소의 도입 또는 과발현을 포함한다(미국특허번호 제5,047,335; 5,510,261 및 5,278,299). 글리코실화 또는 특정 타입의 글리코실화는 예컨대 엔도글리코시다제 H(Endo H)와 같은 효소로 그 글리코단백질로부터 제거될 수 있다. 또한 그 제조할 숙주세포는 예컨대 특정 타입의 다당류를 가공함에 있어 결합을 만드는 것과 같은 유전적으로 엔지니어링될 수 있다.
- <172> 항체의 글리코실화 구조는 탄수화물 분석의 종래 테크닉에 의해 쉽게 분석될 수 있다. 그것은 렉틴 크로마토그래피, NMR, Mass 분광광도계, HPLC, GPC, 단당류 조성 분석, 연속적인 효소 분해 및 HPAEC-PAD(이것은 높은 pH 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 전하에 기초하여 올리고당을 분리함)를 포함한다. 분석 목적으로 올리고당을 방출하는 방법 또한 공지되어 있다. 이는 효소 처리(통상 펩티드-N-글리코시다제 F/엔도-β-갈락토시다제를 사용하여 수행됨), 가혹한 알칼리 환경을 이용한 제거(주로 O-링크 구조를 방출하기 위해), 및 무수 히드라진을 사용하는 화학적 방법(N- 및 O-링크 올리고당 둘다를 방출하기 위해)을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- <173> (x) 항체의 다른 변경들
- <174> 여기서 기재된 안티-trkC 항체들은 또한 면역리포솜으로서 조제될 수 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다(예컨대 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 및 미국특허번호 제4,485,045 및 4,544,545 참조). 증가된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국특허번호 제5,013,556에 개시되어 있다.
- <175> 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화된 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)를 가지고 역상 증발 방법에 의해 제조될 수 있다. 리포솜은 정해진 포어 크기의 필터를 통해 들어가서 원하는 직경을 갖는 리포솜을 얻을 수 있다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편은 Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)에 기재된 바와 같이 리포솜과 다이설파이드 상호교환 반응을 통해 리포솜과 컨저게이션될 수 있다. 화학요법제(독소루비신과 같은)는 선택적으로 리포솜 내에 함유된다. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484를 참조하라.
- <176> 본 발명의 항체는 또한 그 항체를 프로드러그(예컨대 펩티드 화학요법제, WO 81/01145 참조)를 활성 항암제로 변환시키는 프로드러그 활성 효소와 컨저게이션시킴으로써 ADEPT에 사용된다. WO 88/07378 및 미국특허번호 제4,975,278을 참조하라.

- <177> ADEPT에 유용한 면역컨저게이트의 효소 구성성분은 프로드러그를 그것의 더 활성이고 세포독성인 형태로 변환시키기 위한 방식으로 프로드러그 상에 작용할 수 있는 효소를 포함한다.
- <178> 본 발명의 방법에 유용한 효소들은 알칼라인 포스파타제(포스페이트-함유 프로드러그를 프리(free) 드러그로 변환시키는 데에 유용함), 아릴설파타제(설페이트-함유 프로드러그를 프리 드러그로 변환시키는 데에 유용함), 시토신 디아미나아제(비-독성인 5-플루오로시토신을 항암 드러그인 5-플루오로우라실로 변환시키는 데에 유용함), 세라티아(serratia) 프로테아제, 썬몰리신, 서브틸리신, 카복시펩티다제 및 카텝신(카텝신 B 및 L과 같은)와 같은 프로테아제(펩티드-함유 프로드러그를 프리 드러그로 변환시키는 데에 유용함), D-알라닐카복시펩티다제(D-아미노산 치환체를 함유한 프로드러그를 변환시키는 데에 유용함), -갈락토시다제 및 뉴라미니다제와 같은 탄수화물 절단 효소(글리코실화된 프로드러그를 프리 드러그로 변환시키는 데에 유용함), -락타마제(-락탐을 갖는 드러그 유도체를 프리 드러그로 변환시키는 데에 유용함), 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제와 같은 페니실린 아미다제(각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기를 갖는 그들의 아민 질소에서 유도체화된 드러그를 프리 드러그로 변환시키는 데에 유용함)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 대안으로는 효소 활성을 갖는 항체, 당업계에서 소위 "앱자임(abzyme)으로 알려진 항체가 본 발명의 프로드러그를 프리 활성 드러그로 변환시키는 데에 사용될 수 있다(예컨대 Massey, Nature 328:457-458(1987)를 참조한다). 항체-앱자임 컨저게이트가 여기에 기재된 바와 같이 앱자임을 종양 세포 군집에 운반하기 위해 제조될 수 있다.
- <179> 본 발명의 효소는 상기 논의된 바와 같은 이중이중기능성 교차결합제의 사용과 같은 당업계에 잘 알려진 테크닉에 의해 안티-trkC 항체에 공유결합될 수 있다. 대안으로는 본 발명 효소의 적어도 하나의 기능적 활성 부분에 결합된 본 발명의 항체의 적어도 하나의 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질을 당업계에 잘 알려진 재조합 DNA 테크닉을 사용하여 구성할 수 있다(Neuberger et al., Nature 312:604-608[1984]).
- <180> 본 발명의 특정 구체예에서 본래의 완전한 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 더 바람직할 수 있다. 이 경우에 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 예컨대 구출(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 단편안에 통합시킴으로써(예컨대 항체 단편 내의 적절한 영역의 돌연변이에 의해 또는 그 항체 단편의 말단 또는 중간에 융합될 펩티드 태그 안으로, 예컨대 DNA 또는 펩티드 합성에 의해, 에피토프를 통합시킴으로써 수행될 수 있다. WO 96/32478(1996.10.17 공개)를 참조한다.
- <181> 그 구출 수용체 결합 에피토프는 통상 Fc 도메인의 하나 이상의 루프 유래의 하나 이상의 아미노산 잔기들이 그 항체 단편의 상동 위치로 전달되는 영역을 구성한다. 더 바람직하게는 하나 이상의 Fc 도메인 루프 유래의 세계 이상의 잔기들이 전달되는 것이다. 더욱 더 바람직하게는 에피토프가 Fc 영역의 CH2 도메인(예컨대 IgG의)으로부터 얻어져서, CH1, CH3 또는 V_H 영역 또는 그 항체의 하나 이상의 그러한 영역들로 전달된다. 대안으로는 에피토프는 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 얻어져서 항체 단편의 C_L 영역 또는 V_L 영역 또는 둘다로 전달된다.
- <182> 인간화된 또는 변이체 안티-trkC 항체(글리코실화 변이체 포함)의 공유적 변형은 또한 본 발명의 범위 내에 속한다. 그것들은 적용가능하다면 항체의 효소 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 그 항체의 다른 타입의 공유적 변형이 그 항체의 표적된 아미노산 잔기를 유기 유도체화제(선별된 사이드 체인 또는 N- 또는 C-터미널 잔기들과 반응할 수 있는)로 반응시킴으로써 도입된다. 폴리펩티드의 공유적 변형의 예는 미국특허번호 제 5,534,615에 기재되어 있는데, 이 문헌은 특히 참고문헌으로 통합되어 있다. 항체의 바람직한 유형의 공유적 변형은 그 항체를 다양한 비단백질성 폴리머들, 예컨대 미국특허번호 제 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방법으로 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에 연결할 수 있다.
- <183> 2. 박터, 숙주세포 및 재조합 방법
- <184> 본 발명은 또한 본 발명에 의한 비인간, 예컨대 쥐 및 인간의 안티-trkC 항체(비인간 항체의 인간화된 버전을 포함)를 코딩하는 분리된 핵산 분자, 그 핵산 분자를 포함하는 박터 및 숙주세포 및 그 항체 생산을 위한 재조합 테크닉을 제공한다.
- <185> 항체의 재조합 생산을 위해서는 그것을 코딩하는 핵산이 분리되어 그 이후의 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 박터에 삽입될 수 있다. 또다른 구체예에서 항체는 상동적 재조합, 예컨대 미국특허번호 제 5,204,244호(특히 여기에 참고로 통합되어 있음)에 개시되어 있는 재조합에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 종래의 방법들(예컨대 그 항체의 헤비 체인 및 라이트 체인을 코딩하는 유전자에 특이적

으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써)을 이용하여 쉽게 분리되고 시퀀싱될 수 있다. 많은 벡터들이 사용가능하다. 그 벡터 구성요소들은 미국특허번호 제5,534,615호(1996.7.9. 등록됨, 특히 참고로 여기에 통합되어 있음)에 기재되어 있는 바와 같이 일반적으로 신호서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

<186> 여기에서 DNA를 클로닝하거나 발현하기 위해 적합한 숙주세포는 상기 기재한 바와 같은 원핵, 효모 및 고등 진핵 세포이다. 이 목적에 적합한 원핵생물은 진정세균, 예컨대 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예컨대 이 콜라이와 같은 에스체리치아(*Escherichia*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*)[예컨대 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)], 세라티아(*Serratia*)[예컨대, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 쉬겔라(*Shigella*)] 뿐만 아니라 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*)[예컨대, 바실러스 리체니포르미스 41P, 1989.4.12.에 공개된 DD 266,710에 기재되어 있음]와 같은 바실리(*Bacilli*), 수도모나스 애루기노사(*P. aeruginosa*)와 같은 수도모나스(*Pseudomonas*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 와 같은 엔테로박테리아세(*Enterobacteriaceae*)를 포함한다. 그러나 이 콜라이 B, 이콜라이 X1776(ATCC 31,537) 및 이콜라이 W3110(ATCC 27,325)와 같은 다른 균주들이 적합하다고 해도 바람직한 이콜라이 클로닝 숙주는 이콜라이 294(ATCC 31,446)이다. 이러한 예들은 제한이 아닌 예시에 불과한 것이다.

<187> 원핵생물에 더하여, 사상 균류 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 안티-trkC 항체-코딩 벡터의 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상의 빵만드는 효모가 하등 진핵 숙주 유기체들 중에 가장 일반적으로 사용된다. 그러나 다른 속, 종 및 균주들이 모두 사용가능하며 유용하다. 예컨대 스킴조사카로마이세스 폼브(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이버로마이세스(*Kluyvermyces*) 숙주, 예컨대 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라질리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgris*)(ATCC 16,045), 케이. 위커라미(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티(*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906), 케이. 써모톨러란스(*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 리시아(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*) 예컨대 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상성 균류, 예컨대 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 나이저(*A. niger*)를 포함한다.

<188> 글리코실화된 안티-trkC 항체의 발현을 위해 적당한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유도된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 많은 바콜로바이러스 균주 및 변이체 및 다양한 대응하는 허용가능한 곤충 숙주, 예컨대 스포도테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*)(췌기벌레), 애데스 애집티(*Aedes aegypti*)(모기), 애데스 알보픽투스(*Ades albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터의 곤충 숙주 세포가 인식되었다. 트랜스펙션을 위한 다양한 바이러스 균주들이 공공적으로 얻을 수 있다. 예컨대 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*) NPV의 Bm-5 균주가 있으며, 그러한 바이러스들은 여기서 본 발명에 따라 바이러스로 사용될 수 있다. 특히 스포도테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 트랜스펙션을 위해 사용될 수 있다. 면, 옥수수, 감자, 콩, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 배양물 또한 유용한 숙주가 될 수 있다.

<189> 그러나 가장 큰 관심은 척추동물 세포에 있어 왔고 배양(조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 루틴한 절차가 되어 왔다. 유용한 포유동물 숙주세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아의 신장주(현탁 배지에서 성장을 위해 서브클론된 293 또는 293 세포들)(Graham et al., J. Gen Virol. 36:59[1997]); 야기 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216[1980]); 마우스의 세르틀리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251[1980]); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간의 경부 암종 세포(HeLa, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W 138, ATCC CCL 75); 인간의 간세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y.Acad. Sci. 383:44-68[1982]); MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다.

<190> 상기 숙주 세포들은 상기 기재된 안티-trkC 항체 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하기에 적합한 형태로 변형된

종래의 영양 배지에서 배양된다.

<191> 본 발명의 안티-trkC 항체의 생산에 사용되는 숙주세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 구입가능한 배지, 예컨대 Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium(MEM)(Sigma), RPMI-1640(Sigma) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Sigma)가 숙주세포를 배양하는 데에 적합하다. 또한 Ham et al., Meth. Enz. 58:44(1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255(1980), 미국특허번호 제4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 U.S. Patent Re. 30,985에 기재된 배지 중 어떤 것이 숙주세포의 배양 배지로서 이용될 수 있다. 이러한 배지들은 호르몬 및/또는 다른 성장인자들(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피성장인자), 염(예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 버퍼(예컨대 HEPES), 뉴클레오티드(예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대, GENTAMYCIN™드러그), 미량 원소(마이크로몰 범위내에서 최종 농축액에 보통 존재하는 유기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 어떤 다른 보충물들이 당업자에게 알려진 적절한 농도를 첨가될 수 있다. 온도, pH, 등과 같은 배양 조건은 이전에 이미 발현을 위해 선별된 그 숙주세포에 사용되었던 조건들을 그대로 사용하면 되며 이는 당업자에게 명백할 것이다.

<192> 제조합 테크닉을 사용하면 항체가 세포내, 주변세포질 공간, 또는 배지내로 직접 분비될 수 있다. 만약 항체가 세포내에서 생산된다면 제1단계로서 특정 잔해들, 숙주세포 또는 용균된 단편들이 예컨대 원심분리 또는 초여과에 의해 제거된다. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167(1992)에 이 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 분리하기 위한 절차가 기재되어 있다. 요약하면 세포 페이스트가 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오리드(PMSF)의 존재하에서 약 30분간 해동된다. 세포 잔해들은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우 그러한 발현 시스템으로부터의 상청액이 보통 먼저 상업적으로 구입가능한 단백질 농축 필터, 예컨대, Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 유닛을 사용하여 농축된다. PMSF와 같은 프로테아제 저해제가 그 다음 단계에 포함되어, 우발적 오염원의 성장을 막기 위해 포함될 수 있는 단백질가수분해 및 항생제를 억제한다.

<193> 세포로부터 제조된 항체 조성물은 예컨대 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 젤 전기영동, 투석 및 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. 바람직한 정제 테크닉은 친화도 크로마토그래피이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 그 항체에 존재하는 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 달려있다. 단백질 A는 인간의 1, 2, 또는 4 헤비 체인에 기초한 항체를 정제하는 데에 사용될 수 있다(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 3에 대해 제안된다(Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575(1986)). 친화성 리간드가 부착하는 매트릭스는 가장 종종 아가로스이나 다른 매트릭스들도 사용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스는 조절된 포어 글래스 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠이며, 이들은 아가로스보다 더 빠른 유속과 더 짧은 공정시간을 가능케 한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함하는 경우에는 Bakerbond ABX™수지(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)가 정제에 유용하다. 다른 단백질 정제 테크닉, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분류, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환수지(폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 헤파린 SEPHAROSE™ 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 회수된 항체에 따라 사용될 수 있다.

<194> 예비적 정제 단계 다음에 원하는 항체 및 오염물질을 포함하는 혼합물을 용출 버퍼를 사용하여 2.5 내지 4.5의 pH에서, 바람직하게는 낮은 염농도(예컨대 약 0-0.25M 염)에서 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용시켰다.

<195> 3. 아고니스트 안티-trkC 항체의 식별

<196> 아고니스트 항체는 예컨대 키나아제 수용체 활성화(KIRA) 분석(미국특허번호 제5,766,863호 및 5,891,650호에 기재되어 있음)을 이용하여 식별될 수 있다. 이 ELISA-유형의 분석은 수용체 단백질 티로신 키나아제(rPTK, 예컨대 trk 수용체)의 키나아제 도메인의 자동인산화를 측정함으로써 키나아제 활성의 정성적 및 정량적 측정에 적합하다. 또한 이것은 선별된 rPTK의 잠재적 아고니스트 또는 안타고니스트의 식별 및 특징화를 위해서도 적합하다. 그 분석의 제1단계는 키나아제 수용체, 이것은 진핵세포의 세포막에 존재하는 수용체로서 이 경우에는 trkC 수용체의 키나아제 도메인의 인산화에 관한 것이다. 그 수용체는 내재성 수용체 또는 그 수용체의 핵산이거나 세포 안으로 형질전환될 수 있는 수용체 구조체일 수 있다. 전형적으로 제1고상(예컨대 제1 분석 플레이트의 웰)은 그러한 세포(통상 포유동물 세포주)의 실질적으로 상동인 군집으로 코팅되어 그 세포가 그 고상에 부착되도록 한다. 종종 그 세포는 부착성이어서 제1고상에 자연적으로 부착할 수 있다. 만약 "수용체 구조체"가

사용된다면 그것은 통상 키나아제 수용체 및 플래그(flag) 폴리펩티드의 융합을 포함한다. 그 플래그 폴리펩티드는 ELISA 부분에서 포획제, 종종 포획 항체에 의해 인지된다. 후보 아고니스트와 같은 분석물이 그 부착세포를 갖는 웰에 첨가되고 그 티로신 키나아제 수용체(예컨대 trkC 수용체)가 그 분석물에 노출(또는 접촉)된다. 이 분석은 원하는 티로신 키나아제 수용체(예컨대 trkC)를 위한 아고니스트 리간드를 식별할 수 있게 한다. 이 분석은 또한 티로신 키나아제 수용체의 안타고니스트를 검출하는 데에도 이용할 수 있다. 아고니스트가 그 수용체에 결합하는 것을 방해하는 안타고니스트 리간드의 존재를 검출하기 위해서는 그 부착세포가 먼저 후보로 지목된 안타고니스트 리간드에 노출된 다음 아고니스트 리간드에 노출됨으로써 수용체 결합 및 활성화의 경쟁적 저해가 측정될 수 있다. 또한 분석은 아고니스트 리간드에 결합하여 그것이 rPTK에 결합하고 활성화시키는 능력을 감소 또는 제거시킨다. 그러한 안타고니스트를 검출하기 위해서는 후보로 지목된 rPTK에 대한 안타고니스트 및 아고니스트를 함께 인큐베이션시키고 그 부착된 세포를 이 리간드 혼합물에 노출시킨다. 그 분석물의 노출 후에 그 부착 세포는 용균 버퍼(이것은 용해제를 함유함) 및 약한 교반을 이용하여 용해된다. 이로써 세포 용균물의 농축 또는 정제의 필요 없이 방출된 세포 용균물을 직접 그 분석의 ELISA에 적용시킬 수가 있다.

<197> 이렇게 제조된 세포 용균물은 그 분석의 ELISA 단계에 적용될 준비가 된 것이다. ELISA 단계의 제1단계는 제2고상(통상 ELISA 미세적정 플레이트의 웰)을 티로신 키나아제 수용체 또는 수용체 구조체의 경우에는 플래그 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 포획제(종종 포획 항체)로 코팅된다. 제2고상의 코팅은 그 포획제가 제2고상에 부착되도록 수행된다. 그 포획제는 통상 모노클로날 항체이지만 본 명세서의 실시예에서 기술된 바와 같이 폴리클로날 항체 또한 사용될 수 있다. 얻어진 세포 용균물은 그 부착한 포획제에 노출되거나 포획제와 접촉함으로써 그 수용체 또는 수용체 구조체가 제2고상에 부착(또는 포획)된다. 그 다음에 세척 단계를 수행하여 결합되지 않은 세포 용균물을 제거하고 포획된 수용체 또는 수용체 구조체를 남긴다. 그 부착 또는 포획된 수용체 또는 수용체 구조체는 그 다음에 안티-포스포티로신 항체(티로신 키나아제 수용체에서 인산화된 티로신 잔기들을 인식하는)에 노출되거나 그것과 접촉된다. 바람직한 구체예에서는 안티-포스포티로신 항체는 비방사성 칼라 시약의 칼라 변화를 촉매하는 효소에 (직접 또는 간접적으로) 컨저게이션시킨다. 따라서 그 수용체의 인산화는 뒤따르는 시약의 색상 변화에 의해 측정될 수 있다. 그 효소는 안티-포스포티로신 항체에 직접 결합되거나, 컨저게이트 분자(예컨대, 비오틴)가 안티-포스포티로신 항체에 컨저게이션되고 이어서 그 효소가 그 컨저게이션 분자를 경유하여 안티-포스포티로신에 결합할 수 있다. 결국 안티-포스포티로신 항체가 포획된 수용체 또는 수용체 구조체에 결합하는 것이 칼라 시약에서의 칼라 변화에 의해 측정된다.

<198> 초기 식별 이후에 그 아고니스트 활성이 표적화된 생물학적 활성을 테스트하는 것으로 알려진 생분석(bioassay)에 의해 더 확인되고 더 연구될 수 있다. 예컨대, NT-3의 활성을 모방한 안티-trkC 모노클로날 항체의 능력이 PC12 신경돌기 성장 분석에서 실시예1에 기재된 바와 같이 테스트될 수 있고, 실시예2에 기재된 바와 같이 시스플라틴 및 피리독신-유도 신경장해의 실험 동물 모델과 같은 공지의 신경변성 질병의 동물 모델에서 확인될 수 있다.

<199> 3. 아고니스트 안티-trkC 항체의 치료법 및 진단법적 사용

<200> 본 발명의 안티-trkC 아고니스트 항체는 세포 변성 또는 기능장애에 관련된 질병의 치료(예방 포함)에 유용한 것으로 믿어져 왔다. 특히 안티-trkC 아고니스트 항체는 다양한 (만성) 신경변성 질병 및 급성 신경세포 상해의 치료를 위한 유망한 후보이다. 그러한 신경변성 질환은 말초성 신경장해; 운동뉴런 질환, 예컨대 근위축성측삭경화증(ALS, Lou Gehrig병), 안면신경마비 및 척수성근위축 또는 마비와 관련된 다양한 질환과 같은 운동뉴런 질환; 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 간질, 다발성 경화증, 헌팅톤 무도병, 다운 증후군, 신경성 귀머거리 및 미니에르병과 같은 다른 인간의 신경변성 질병들을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

<201> 본 발명의 안티-trkC 항체는 말초성 신경장해의 치료에 특히 적합한 것으로 믿어진다. 말초성 신경장해는 운동, 감각, 감각운동, 또는 자율 기능 장애 중 하나 또는 그들의 조합들로서 가장 자주 나타나는 것들로서 말초 신경에 영향을 미치는 신경변성 질환이다. 통상 발생하는 말초성 신경장해는 예컨대, 전신 질병으로부터 초래되거나 신경독성 드러그 예컨대, 항신생물(antineoplastic) 약제 또는 산업 또는 환경 오염원들과 같은 독성 약제에 의해 유도될 수 있다. 따라서 말초 감각 신경장해는 감각 뉴런의 변성, 말초 감각 뉴런 기능의 감소 또는 상실에 특징이 있는데, 그것은 특발성일 수 있고 예컨대 당뇨병(당뇨성 신경장해), 암의 세포증식억제제 치료법(예컨대, 빈크리스틴, 시스플라틴, 메토타렉세이트, 또는 3'-아지도-3'-데옥시티미딘 과 같은 화학치료약제를 이용하는 치료), 알코올 중독, 후천성 면역결핍 증후군(AIDS), 또는 유전적 소인의 결과로서 발생할 수 있다. 통상 후천적 말초성 신경장해는 예컨대, Refsum병, Krabbe병, 이염백질이영양증, Fabry병, Dejerine-

Sottas 증후군, 무베타지단백혈증 및 Charcot-Marie-Tooth(CMT)병(또한 프로니얼(Proneal) 근위축증 또는 유전성 운동 감각 신경장해(HMSN)로도 알려져있다)을 포함한다.

- <202> trkC 수용체의 천연 리간드인 NT-3의 입증된 능력(말초성 백혈구의 증식 촉진)에 기초하여, 본 발명의 안티-trkC 아고니스트 항체 또한 호중구감소증, 다양한 감염 또는 종양의 치료를 위한 치료약제로 사용될 수 있다. trkC의 발현은 뉴런에 한정되지 않기 때문에 안티-trkC 아고니스트 항체는 신경세포에 제한되지 않고 일반적인 세포성 변성에 의해 특징지어지는 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.
- <203> 본 발명의 안티-trkC 항체는 또한 신생혈관형성을 유도하거나 신생혈관생성이 요구되는 병리적 상태/ 질병을 치료하기 위해 사용된다. 그러한 병리적 상태는 예컨대 불충분한 대뇌의 순환에 기인한 대뇌혈관 질환을 포함하는 심장의 국소빈혈(그 원인이 되는 병에 상관없이)을 포함한다. 신생혈관생성은 또한 궤양, 당뇨병성 합병증인 궤상 세포 질병, 및 외과수술 후의 상처의 치료에 바람직하다.
- <204> 본 발명의 안티-trkC 항체는 또한 세포 변성 관련 질병, 특히 상기 나열한 신경변성 질병들의 진단에 유용할 수 있다.
- <205> 진단 용도로는 항체가 전형적으로 검출가능한 부분으로 표지될 것이다. 통상 하기 카테고리로 그룹화될 수 있는 많은 표지들이 사용가능하다.
- <206> (a) ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H 및 ^{131}I 와 같은 방사선동위원소. 그 항체는 Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs.(1991)에 기재된 테크닉을 사용하여 방사선동위원소로 표지될 수 있고, 신틸레이션 계수를 이용하여 방사성이 측정될 수 있다.
- <207> (b) 희토류 킬레이트(유로퓸 킬레이트) 또는 형광물질 및 그것의 유도체, 로다민 및 그것의 유도체, 단실(dansyl), 리사민(Lissamine), 파이코에리쓰린(phycoerythrin) 및 Texas Red와 같은 형광물질 표지가 사용가능하다. 형광물질 표지는 Current Protocols in Immunology(상기)에 기재된 테크닉을 이용하여 항체에 컨저게이션될 수 있다. 형광물질은 플루오리미터(fluorimeter)를 이용하여 정량될 수 있다.
- <208> (c) 다양한 효소-기질 표지가 가능하고 미국특허번호 제4,275,149호가 이들 중 일부에 관한 것이다. 그 효소는 통상 다양한 테크닉으로 측정될 수 있는 색소생산성 물질의 화학적 변형을 촉매한다. 예컨대, 효소는 기질 내에서의 색상 변화를 촉매하고 이것이 분광광도계로 측정될 수 있다. 대안으로는 그 효소가 그 기질의 형광성 또는 화학발광성을 변경시킬 수 있다. 형광성의 변화를 정량화하는 테크닉은 상기 기재한 바와 같다. 그 화학발광 기질은 화학적 반응에 의해 전자적으로 흥분될 수 있고 그 다음에 측정될 수 있는(예컨대 화학발광측정기를 이용하여) 빛을 내뿜거나 형광 수용자에게 에너지를 줄 수 있다. 효소 표지의 예는 루시페라제(예컨대 반딧불의 루시페라제 및 박테리아의 루시페라제; 미국특허번호 제4,737,456), 루시페린, 2,3-디히드로프탈라진디온, 말레이트 디하이드로게나제, 유레아제, 퍼옥시다제(예컨대 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRPO), 알칼라인 포스파타제, -갈락토시다제, 글루코아밀라제, 라이소자임, 당 옥시다제(예컨대 글루코스 옥시다제, 갈락토스 옥시다제 및 글루코스-6-포스페이트 디히드로게나제), 헤테로시클릭 옥시다제(예컨대 유리카제 및 크산틴 옥시다제), 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제 등을 포함한다. 효소를 항체에 컨저게이션시키는 테크닉은 O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym.(ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166(1981)에 기재되어 있다.
- <209> 효소-기질 조합의 예는 예컨대:
- <210> (i) 기질로서 수소 퍼옥시드를 갖는 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRPO)(여기서 수소 퍼옥시드는 다이(dye) 전구체(예컨대, 오르토펜렌 디아민(OPD) 또는 3, 3', 5, 5'-테트라메틸 벤지딘 하이드로클로라이드(TMB))를 산화시킴);
- <211> (ii) 색소생산성 기질로서 파라-니트로페닐 포스페이트를 갖는 알칼라인 포스파타제(AP); 및
- <212> (iii) 색소생산성 기질(예컨대, p-니트로페닐-D-갈락토시드) 또는 플루오르제닉 기질인 4-메틸럼벨리페틸-D-갈락토시드를 갖는 -D-갈락토시다제(-D-Gal).
- <213> 당업자는 많은 다른 효소-기질 조합을 사용할 수 있다. 이에 대한 일반적인 기술은 미국특허번호 제4,275,149 및 4,318,980에 있다.
- <214> 때때로 표지는 간접적으로 항체에 컨저게이트된다. 당업자는 이를 달성하기 위한 다양한 테크닉을 잘 알고 있을 것이다. 예컨대 항체는 아비딘과 컨저게이션할 수 있는 비오틴 및 상기 기재된 세개의 넓은 카테고리 중 어느 하나로 컨저게이션될 수 있고 그 반대로 가능하다. 비오틴은 선택적으로 아비딘에 결합하기 때문에 이러한 간접

적인 방법으로 그 표지가 항체에 컨저게이션될 수 있다. 대안으로는 항체에 표지를 간접적으로 컨저게이션시키기 위해 작은 햅텐(예컨대, 디곡신) 및 안티-햅텐 항체(예컨대 안티-디곡신 항체)와 컨저게이션할 수 있는 상기 기재된 다른 유형의 표지들 중 하나로 항체를 컨저게이션할 수 있다. 따라서 항체를 이용한 표지의 간접 컨저게이션이 달성될 수 있다.

- <215> 본 발명의 또다른 구체예에서 안티-trkC 항체는 표지될 필요가 없고 그 존재는 안티-trkC 항체에 결합하는 표지된 항체를 이용하여 검출될 수 있다.
- <216> 본 발명의 항체는 예컨대 경쟁적 결합 분석, 직접 또는 간접 샌드위치 분석법 및 면역침전 분석과 같은 어떤 공지의 분석방법에 의할 수 있다. Zola, Monoclonal Antibodies; A Manual of Techniques, pp. 147-158(CRC Press Inc. 1987)를 참고하라.
- <217> 경쟁적 결합 분석은 제한된 양의 항체를 가지고 결합을 위해 테스트 샘플 분석물과 경쟁하는 표지된 표준의 능력에 기초한 것이다. 테스트 샘플 내의 trkC 단백질의 양은 항체에 결합하게 되는 표준의 양과 반비례한다. 결합하는 표준의 양 결정을 용이하게 하기 위해 그 항체들은 통상 그 경쟁 전 또는 후에 불용성이므로 그 항체에 결합된 그 표준 및 분석물은 결합안된 표준 및 분석물로부터 간편하게 분리될 수 있다.
- <218> 샌드위치 분석은 두개의 항체를 사용하는데, 각각은 검출될 단백질의 다른 면역원성 부분, 또는 에피토프에 결합할 수 있다. 샌드위치 분석법에서는 테스트 샘플 분석물이 고상 재제체에 고정된 제1항체에 의해 결합된 다음에 제2항체가 그 분석물에 결합하여 불용성의 3개 파트의 복합체를 형성한다. 미국특허번호 제4,376,110을 참조하라. 제2항체는 그 자체가 검출 가능한 부분으로 표지되거나(직접 샌드위치 분석) 검출가능한 부분으로 표지된 안티-면역글로불린 항체를 사용하여 측정될 수 있다. 예컨대 샌드위치 분석의 한 유형은 ELISA 분석이며 이 경우 검출가능한 부분은 효소이다.
- <219> 그 항체들은 또한 생체내에서 진단적 분석법을 위해 사용될 수 있다. 통상 항체는 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 또는 ^{35}S 와 같은 방사성핵종으로 표지되어서 원하는 세포 또는 조직이 면역신티오그래피(immunosciintigraphy)를 사용하여 국소화될 수 있다.
- <220> 항체는 또한 병리학에서 염색 시약으로 사용될 수 있다. 하기 테크닉들은 당업계에 잘 알려져 있다.
- <221> 본 발명의 안티-trkC 아고니스트 항체가 향상된 효율성, 향상된 약학동력학적 성질(pK) 및 생체이용성을 갖고 투여에 따른 통각과민의 염려가 없는 치료약제로서 NT-3를 능가하는 많은 잇점을 갖고 있는 것으로 믿어진다.
- <222> 4. 약제학적 조제
- <223> 본 발명의 항체의 치료법적 조제는 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 선택적인 생리학적으로 허용가능한 담체, 첨가제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980))와 혼합함으로써 동결건조된 조제물 또는 수용액의 형태로 저장을 위해 조제된다. 허용가능한 담체, 첨가제 또는 안정화제는 적용되는 투여량 및 농도에서는 수용자에게 비독성인 것이며, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 버퍼; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개의 잔기 이내)의 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질, 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 수크로즈, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 슈가; 나트륨과 같은 염-형성 카운터 이온; 금속 복합물(예컨대 Zn-단백질 복합체); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.
- <224> 여기에서의 조제는 또한 치료될 특징에 필요하다면 하나 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있다. 바람직하게는 서로에게 반대의 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 것들이어야 한다.
- <225> 활성 성분들은 또한 예컨대 코아세르베이션 테크닉 또는 계면 중합반응에 의해 제조된 미세캡슐, 예컨대 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미세캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 미세캡슐 각각에 콜로이드 드러그 전달 시스템(예컨대, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)으로 담겨지거나, 또는

마크로에멀전에 담겨질 수 있다. 그러한 테크닉은 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)에 기재되어 있다.

- <226> 생체내 투여를 위해 조제화는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통해 여과함으로써 쉽게 수행될 수 있다.
- <227> 서방형 제제 또한 제조될 수 있다. 적당한 예의 서방형제제는 항체를 함유하는 소수성 폴리머의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 그 매트릭스는 필름 또는 미세캡슐과 같은 정형화된 형태이다. 서방형 매트릭스는 폴리에스테르, 히드로젤(예컨대, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드(미국특허번호 제3,773,919), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 코폴리머, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, Lupron Depot™(젯산-글리콜산 코폴리머 및 루프롤리드 아세테이트로 구성된 주입가능한 마이크로스피어)과 같은 분해성 젯산-글리콜산 코폴리머, 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 젯산-글리콜산과 같은 폴리머는 100일 이상동안 분자를 방출시킬 수 있는 데 반하여, 특정 하이드로젤은 더 짧은 기간동안 단백질을 방출시킨다. 캡슐화된 항체가 생체내에서 긴 시간동안 유지될 때 그것들은 37℃의 습기에 노출된 결과 변성 또는 응집되고, 면역원성에 있어서 생물학적 활성을 잃어버리고 변화가 일어난다. 합리적인 방법들이 관련된 메커니즘에 의존한 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예컨대 응집 메커니즘이 씨오-다이설파이드 인터체인지를 통해 분자간 S-S 결합 형성인 것이 밝혀지면, 설프하이드릴(sulfhydryl) 잔기들을 변형시키고 산성 용액으로부터 동결건조시키고 습기량을 조절하고 적절한 첨가제를 사용하고 특정 폴리머 매트릭스 조성물을 개발함으로써 안정화를 이룰 수 있다.
- <228> 치료에 이용될 본 발명의 항체의 유효량은 예컨대 치료 목적, 투여 루트, 및 환자의 상태에 따라 정해될 것이다. 따라서 최적 치료 효과를 얻기 위해 필요하다면 의사 또는 약사가 그 투여량을 조절하고 투여 루트를 변형시킬 필요가 있다. 전형적인 일일 투여량은 상기 기재한 인자들에 기초하여 약 1g/kg 내지 100mg/kg 또는 그 이상이 될 것이다. 전형적으로 의사 또는 약사는 본 발명의 분자를 투여량이 생물학적 효과에 요구되는 양에 도달할 때까지 투여할 것이다. 이 치료법의 진행은 종래의 분석법에 의해 쉽게 모니터링된다.
- <229> 투여는 당업계에 알려진 종래의 루트가 될 수 있으며, 정맥내, 피하, 국소, 근육내, 기관내, 대뇌내, 비강내, 폐내 및 실질조직내 투여를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- <230> 4. 유전자 치료법
- <231> 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산은 또한 다양한 (만성) 신경변성 질병 및 급성 신경세포 손상, 특히 유전적으로 얻은 말초성 신경장애의 유전자 치료에 사용될 수 있다. 유전자 치료를 위한 두가지 기본 접근법은 생체의 유전자 치료와 생체내 유전자 치료이다. 기능적 치환 유전자가 생체외에서 세포에 도입되고 그 변형된 세포가 배양액에 담겨지고 이것이 다시 대상에 재이식된다. 생체내 유전자 치료법에서는 표적 세포가 대상으로부터 제거되지 않고 트랜스퍼된 유전자가 수용자 내에서 인시츄로 수용자의 세포 안으로 도입된다.
- <232> 인간에서의 몇몇 생체의 유전자 치료 연구가 보고되고 검토되어 왔다. 예컨대 Anderson, Science 256:808-813(1992) 및 Miller, Nature 357:455-460(1992)에 나타나 있다.
- <233> 생체내 유전자 치료법의 생존 능력은 몇몇 동물 모델에서 입증되어 왔고 Felgner et al., Nature 349:351-352(1991)에서 검토되었다. 직접적인 유전자 트랜스퍼가 보고되었는데 예컨대 근육조직(Ferry et al., Proc Natl. Acad. Sci. 88:8377-8781[1991]; Quantin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584[1992]); 동맥 벽(Nabel et al., Science 244:1342-1344[1989]); 및 신경계(Price et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:156-160[1987])로 트랜스퍼된다.
- <234> 따라서 본 발명은 또한 아고니스트 안티-trkC 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 세포 안으로 전달하기에 적합한 전달 비히클을 제공할 수 있다(생체내이든 생체외이든 관계없이). 통상 항체(예컨대 선형 항체 또는 항체 체인)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터 및 이중 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결될 수 있다. 도입을 위한 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주세포 안으로 도입하기에 적합한 전달 비히클은 비-바이러스 비히클 및 바이러스 벡터를 포함한다. Verma and Somia, Nature 389:239-242(1997)를 참조하라.
- <235> 본 발명의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 비-바이러스 비히클의 많은 변형들(당업계에 공지된)은 본 발명의 범위에 속한다. 안티-trkC 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 네이키드(naked) DNA로서 세포에 전달될 수 있다(미국특허번호 제5,692,622; WO 97/40163). 대안으로는 다양한 물질들(전달 형태의), 예컨대 양이온성 지질; 생체적용가능한 폴리머(천연 폴리머 및 합성 폴리머); 리포단백질; 폴리펩티드; 다당류; 리포다

당류; 인공 바이러스 엔벨롭; 금속 입자; 및 박테리아를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 전달 비히클은 미세입자일 수 있다. 이러한 다양한 물질들의 혼합물 또는 컨저게이트가 전달 비히클로서 사용될 수 있다. 여기서 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 이러한 다양한 전달 형태와 비공유적으로 또는 공유적으로 결합될 수 있다. 리포솜이 예컨대 사구체 상피세포와 같은 특정 세포 유형에 표적화될 수 있다.

<236> 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스를 포함하여 아데노바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 폭스바이러스 (백신 바이러스와 같은), 및 파르보바이러스에 기초한 것들과 같은 DNA 바이러스 벡터; 및 레트로바이러스 벡터와 같은 RNA 바이러스를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 레트로바이러스 벡터는 쥐의 백혈병 바이러스 및 렌티바이러스(인간의 에이즈 바이러스와 같은)를 포함한다. Naldini et al., Science 272:263-267(1996)를 참조하라.

<237> 안티-trkC 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 비-바이러스 전달 비히클은 숙주세포 또는 표적 세포 내로 당업계에 공지된 방법(예컨대 인산칼슘 공동침전 테크닉; 일렉트로포레이션(electroporation); 전기투과화(electropermeabilization); 리포솜-매개 트랜스펙션; 탄도(ballistic) 트랜스펙션; 생물포격(biolistic) 공정(미세입자 포격); 제트 주입 및 바늘 및 주사 주입 또는 마이크로인젝션)에 의해 도입될 수 있다. 많은 트랜스펙션 방법들이 당업계에 공지되어 있다.

<238> 바이러스 전달 비히클은 감염에 의해 세포에 도입될 수 있다. 대안으로는 바이러스 비히클은 세포 안으로의 전달을 위해 상기 기재된 바와 같은 비-바이러스 전달 비히클 중 어느 하나로 통합될 수 있다. 예컨대 바이러스 벡터는 양이온성 리피드(Hodgson and Solaiman, Nature Biotechnol. 14:339-342[1996]); 또는 라멜라 리포솜(Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3471[1997]; 및 Faller et al., J. Virol. 49:269[1984])과 혼합될 수 있다.

<239> 한 바람직한 구체예에서는 본 발명의 안티-trkC 항체의 헤비 및 라이트 체인(단편을 포함하여) 둘다를 코딩하는 핵산이 동일한 폴리시스트로닉(polycistronic) 발현 벡터(예컨대 미국특허번호 4,965,196 및 4,713,339에 기재된 바와 같은)에 놓여질 것이다. 폴리시스트로닉 발현 벡터는 2차 단백질 및 원하는 단백질을 위한 코딩 서열을 포함하고 원하는 서열 및 이차 서열 모두 같은 프로모터에 의해 조정된다. 그 코딩 서열들은 번역 중지 및 개시 신호 코돈에 의해 분리되어 있다. 그 이차 서열의 발현은 원하는 단백질 서열의 발현 상에 조절 효과를 미칠 수 있고 그 이차 단백질은 트랜스펙션된 세포 선택의 마커로서 기능한다.

<240> 생체내 유전자 치료법에서 벡터는 예컨대, 정맥내(i.v.) 주입에 의해 수용자에게 투여될 수 있다. 적당한 농도는 선택된 특정 벡터, 숙주, 사용된 프로모터의 힘 및 치료대상인 질병의 심각도 등의 다양한 인자에 따라 결정된다.

<241> 본 발명은 하기 실시예들에 의해 더 상세히 설명되지만 그 실시예들에 한정되는 것은 아니다.

<242> 실시예

<243> <실시예1: 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 제조 및 특징분석>

<244> 항체의 생산 및 동형결정(isotyping)

<245> 야생형 Balb/C 마우스 및 인간의 IgG2 또는 IgG4를 생산하는 트랜스제닉 마우스(제노마우스(Xenomice), Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156[1997])에 복막내, 리어 풋패드(rear footpad)를 통해, 또는 피하내로 20 μ g의 인간의 trkC-IgG(Shelton et al., J. Neurosci. 15: 477-491[1995])를 프로인트 또는 리비(Ribi) 보조제와 함께 상기 Mendez et al.에서 기재한 바와 같이 투여하여 과면역화시켰다. 면역 마우스 유래의 지라 세포를 골수종 세포(X63.Ag8.653, ATCC Rockville, MD)와 융합하였다. 253개의 제노마우스 및 35개의 야생형 Balb/C 마우스를 사용하여 총 33개의 융합을 수행하였다. 플레이트(총 21,734개 웰)를 먼저 trkC-IgG를 이용하여 직접적인 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 그 ELISA 스크린은 684개의 trkC 양성 하이브리도마를 인식하였고 그것들 모두는 trkC KIRA(키나아제 활성화된 수용체 분석)으로 아고니스트 활성화에 대해 평가하였다. 그 KIRA 인식된 14개의 제노마우스 및 22개의 야생형 Balb/C 마우스가 안티-trkC 아고니스트 항체를 분비하는 하이브리도마를 유도하였다. 이러한 하이브리도마를 제한 희석을 통해 서브클로닝하고 아고니스트 활성을 확인하기 위해 재분석하고 그것을 Pristane-프라임 Balb/C 또는 누드 마우스(Hongo et al., Hybridoma 14: 253-260[1995]) 안으로 주입함으로써 복수증을 유발하였다. 복수에 존재하는 모노클로날 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피(상기 Hongo et al.)에 의해 정제하였다. 특이적 융합 효율(양성의 수/스크린된 웰의 수)은 제노마우스 및 야생형

Balb/C 마우스 융합 둘다에 대해 3%였다. 아고니스트 모노클로날 항체의 발생율(아고니스트/trkC ELISA 양성 수)은 제노마우스 및 야생형 Balb/C 마우스 융합 각각 3% 및 8%였다. 쥐의 모노클로날 항체의 이소타입을 GIBCO BRL 딥스틱 또는 Zymed 마우스-타입 동형결정 키트를 사용하여 결정하였다. 제노마우스는 항체의 대응 이소타입들을 생산하는 IgG₂ 또는 IgG₄ 균주였다. 하기 표는 다양한 인간 및 쥐의 anti-trkC 모노클로날 항체의 이소타입들을 나타낸다. 총 8개의 인간 IgG₂, 6개의 인간 IgG₄, 7개의 쥐 IgG₁, 10개의 쥐 IgG_{2a} 및 5개의 쥐 IgG_{2b} 모노클로날 항체가 인식되었다. KIRA 분석법에 의해 결정하듯이 가장 잠재적인 아고니스트 활성을 갖는 모노클로날 항체들(표 2에서 별표로 표시됨)을 심층 특징분석을 위해 선별하였다.

표 2

인간의 Mabs (14총)			
IgG ₂ 이소타입 (8Mabs)		IgG ₄ isotype 이소타입 (6Mabs)	
2.5.1*		4.8	
6.1.2*		2337	
6.4.1*		2338	
2342		2339	
2343		2348	
2344 *		2349*	
2345 *			
2346			
쥐의 Mabs (22총)			
IgG ₁ (7)	IgG _{2a} (10)	IgG _{2b} (5)	IgG ₃
2249	2248*	2252	
2250*	2272	2273	
2253*	2251	2277	
2254	2255	2278	
2256*	2274	2280	
2257	2275		
2260	2276		
	2278		
	2281		
	2282		

아고니스트 활성의 결정

a. KIRA 분석

두가지 생분석을 사용하여 anti-trkC 모노클로날 항체의 NT-3 아고니스트 활성을 결정하였다. 그 키나아제 활성화 수용체 분석법(KIRA)(상기 더욱 상세히 설명하였음)은 NT-3 또는 아고니스트 모노클로날 항체와 같은 리간드의 자극에 대한 반응으로 트랜스펙션 세포에서 trkC의 티로신 인산화를 측정하였다(Sadick et al., Exp. Cell Res. 234:354-361[1997]). 그 모노클로날 항체를 KIRA 자극 버퍼(2% 소혈청알부민(BSA; Intergen Co., Purchase, NY) 및 25mM Hepes를 함유한 F12/DMEM 50:50, 0.2µm 여과된)에서, 27µg/ml로 희석하였다. 그 모노클로날 항체를 자극 배지에서 연속적으로 1:3(총 8개 희석액; 농도 범위 0.01 내지 180nM) 더 희석하였다. HSV 글리코단백질 D(gD) 유래의 26개 아미노산 폴리펩티드 플래그 에피토프로 융합된 trkC로 안정하게 트랜스펙션된 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 시딩(5 X 10⁴ 세포/웰)하고 성장시켰다. 그 다음에 그 세포를 NT-3(양성 대조군으로서) 또는 다양한 anti-trkC 모노클로날 항체들로 자극하였다(연속적인 희석액, 0.1; 1.56; 3.13; 6.25; 12.5; 25; 50 및 100ng/ml을 사용하여). 모든 희석액을 6시간동안 두번 분석하였다. 그 분석은 실질적으로 상기 Sadick et al.(상기)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 요약하면 세포를 Triton X-100을 사용하여 용균시키고, gD 에피토프 및 인산화된 trkC 에 대한 항체를 이용하여 ELISA에 포획된 용균물에 존재하는 trkC를 효소에 적합하게 컨저게이션된 anti-포스포티로신 항체들을 이용하여 검출하고 정량하였다. trkC에 대한 것이 아닌 모노클로날 항체(anti-IL8 IgG₂, 제노마우스-유래 인간 항체 또는 anti-gp 120 IgG¹ 쥐 모노클로날 항체)를 음성 대조군으로 사용하였다. 도 1(A 및 B)에 나타난 바와 같이, 모든 선별된 anti-trkC 모노클로날 항체가 trkC 수용체의 티로신 인산화를 자극할 수 있기 때문에 NT-3의 활성을 모방할 수 있다. 인간의 anti-trkC 모노클로날 항체(도1a)는 쥐의 anti-trkC 모노클로날 항체(도1b)보다 더 강력한 아고니스트 활성을 나타내었다. 예컨대 가장 우수한 인간의 anti-trkC 모노클로날 항체는 가장 우수한 쥐의 anti-trkC 모노클로날 항체보다 10배 더 강력했다. 또한 인간의 모노클로날들은 특히 더 낮은 온도범위에서 NT-3와 거의 같은 효율성을 보였다.

b. PC12 신경돌기 성장 분석

안티-trkC 모노클로날 항체의 NT-3 모방 활성을 결정하기 위해 사용되는 또 다른 분석법은 PC12 신경돌기 성장 분석법이었다. 이 분석은 적절한 리간드에 의한 자극에 대한 반응에서 래트의 페오사이토크로마 (pheocytochroma) 세포(PC12)에 의한 신경돌기 성장 과정을 측정하는 것이다. 이러한 세포들은 내재성 trkA를 발현하며 따라서 NGF에 반응성이 있다. 그러나 그들은 내재성 trkC를 발현하지 못하기 때문에 NT-3 및 그 아고니스트들에 대한 반응을 유도하기 위해서는 trkC 발현으로 트랜스펙션된다. PC12 세포를 전장 인간 trkC로 트랜스펙션시키고(Urfer et al., Biochem. 36:4775-4781[1997]; Tsoulfas et al., Neuron 10:975-990[1993]), 96-웰 세포 배양 플레이트에 플레이팅(1000 세포/웰)하였다. 트랜스펙션하고 3일이 지난 후 안티-trkC 모노클로날 항체를 삼중으로 첨가하고(농도 범위 0.0002 내지 2.7nM) 37°C에서 부가적으로 3일간 인큐베이션하였다. 그 세포를 상 대조 현미경검사로 분석하고 셀의 직경이 2배를 초과하는 신경돌기를 갖는 세포를 계수하였다. 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체 뿐만 아니라 쥐의 것도 도1c 및 도1d에 나타낸 바와 같이 PC12 세포에서 신경돌기 성장을 자극할 수 있었다. 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체(도1c)는 쥐의 안티-trkC 모노클로날 항체(도1d)보다 더욱 더 강력한 활성을 나타내었다. 따라서 KIRA 분석에서 얻어진 결과들이 입증되었다. 또한 KIRA 분석과 일치하여 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체가 NT-3로 얻어진 자극과 매우 유사하게 나타났다. 상기 두개의 생 분석으로 얻어진 결과들은 trkC 수용체의 천연 리간드인 NT-3의 활성을 안티-trkC 모노클로날 항체가 모방하는 능력이 있음을 입증하는 것이다.

모노클로날 항체들의 아고니스트 활성은 티로신 인산화의 최대 유도에 따라 순위매겨졌고 KIRA 분석 및 PC12 신경돌기 성장 분석에서의 인산화 곡선의 EC50을 계산하였다. 하기 표3은 다양한 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 특징들을 요약한 것이다.

표 3

MAb ID	이소타입	아고니스트 활성 KIRA/PC12	래트의 trkC결합	면역플랫 NR/Red.	친화도 Kd (nM)
인간의 MAbs				NR Red.	
2.5.1	G2	(+++ / +++)	NO	++ ++	12
6.1.2	G2	(++++ / +++)	NO	+ +	12.5
6.4.1	G2	(+++ / +++)	YES	+ +	12
2344	G2	(+++ / +++)	NO	++ +	19
2345	G2	(+++ / +++)	NO	++ ++	12.1
2349	G4	(+++ / +++)	NO	++ +	23
쥐의 MAbs					
2248	G2a	(+ / +)	NO	+++ .	5.9
2250	G1	(+ / +)	NO	++ ++	8.7
2253	G1	(+ / +)	NO	++ ++	42
2256	G1	(+ / +)	YES	++ +	82

안티-trkC 항체의 특이성 테스트

안티-trkC 모노클로날 항체의 특이성을 직접적인 ELISA를 이용하여 테스트하였다. 50nM 카보네이트 버퍼에 희석된 100 μ l의 1 μ g/ml 용액, pH 9.5를 이용하여, 미세적정 플레이트를 밤새 포획 항원으로서 수용체 trkA-IgG, trkB-IgG 또는 trkC-IgG의 이뮤노어드레신 구조체로 코팅하였다(Shelton et al., J. Neurosci. 15: 477-491[1995]). CD4-IgG(Capon et al., Nature 337:525-531[1989])를 음성 대조군으로서 포획 항원 위치에서 사용하였다. 그 코팅된 플레이트를 0.5% BSA 및 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 희석된 다양한 농도의 안티 trkC 모노클로날 항체(0.01 내지 1 μ g/ml의 100 μ l)를 가지고 실온에서 1시간동안 인큐베이션시켰다. 여분의 결합되지 않은 항체들을 제거하기 위해 세척한 후 적절한 HRP 컨저게이트(인간의 모노클로날 항체:염소의 안티-인간 κ -HRP, 1:5000희석; 쥐의 모노클로날 항체:염소의 안티-마우스 IgG(Fc)-HRP, 1:5000 희석)를 첨가하고 실온에서 1시간 인큐베이션시켰다. 그 플레이트를 세척한 후에 이미 기재된 바와 같이 현상하고 판독하였다(Hongo et al., Hybridoma 14:253-260[1995]). 도 2는 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체 6.1.2를 사용한 대표 실시예를 나타낸다. 그 결합은 trkC에 대해 매우 특이적이었으며 trkA 및 trkB 모두에 대해서 어떤 심각한 교차반응도 발견되지 않았다. 유사하게 다른 인간 및 마우스 안티-trkC 모노클로날 항체들도 trkC의 특이적 인지를 나타내었다.

인간 trkC를 위해 사용되는 포획 항원이 trkC-IgG 대신 trkC-gD인 것을 제외하고는 실질적으로 상기 기재한 바와 같이 직접적인 ELISA를 사용하여 다양한 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체들의 인간 trkC 및 래트 trkC

에의 결합을 비교하였다. 그 결과는 도 3에 나타나 있다. 도 3에 따르면 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체들 중 단지 6.4.1만이 현저하게 래트의 trkC를 인지하였으며, 나머지는 인간의 trkC에 특이적이었다. 유사하게 쥐의 모노클로날 항체들 중에서 단지 2256만이 래트의 trkC를 현저한 정도로 인지하는 반면 다른 것들은 인간의 trkC에만 특이적 인지를 나타내었다.

<257> 친화도 연구

<258> 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체들의 친화도를 BIAcore-2000™ 표면 플라스몬 공명(SPR) 시스템(BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.)을 사용하여 측정하였다. CM5 바이오센서 칩을 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC) 및 N-하이드록시수신이미드(NHS)로 공급자의 지시에 따라 활성화시켰다. 결합 실험의 제1시리즈에서 항원, gD-태그된 trkC를 10mM 아세트산 나트륨 버퍼(pH 4.8)로 희석하였고 그 활성화된 칩 상에 0.09mg/ml의 농도로 주입하였다. 다양한 노출시간을 사용하여 항원 밀도의 네 범위가 얻어졌다: 14,000-17,000 반응 유닛(RU), 7000-9000RU, 2000-3000RU 및 400-600RU. 그 칩은 에탄올아민으로 블록시켰다.

<259> 동력학적 측정의 제1시리즈에서 안티-trkC 항체(IgG)를 러닝 버퍼(0.05% Tween-20 및 0.01%의 아지트화나트륨 함유 PBS)로 희석하였고, 0.03ml(667nM)을 0.01ml/분의 유속으로 25℃에서 바이오센서 칩 상에 주입하였다. 10mM HCl의 30초 펄스 후 100mM Tris-HCl, pH 8.0의 1분 펄스 및 두 세척 단계로 재생을 수행하였다.

<260> 실험의 제2시리즈에서 IgG(10mM 아세트산나트륨 중의 0.1mg/mL, pH 4.8)를 항체 밀도가 1000-2000RU로 제한되는 것을 제외하고는 상기 기재한 바와 같이 고정하였다. 3.7M 내지 29nM 범위의 gD-trkC의 2배 연속 희석액들을 상기 기재한 바와 같이 동력학 측정을 위해 바이오센서 칩 상에 주입시켰다.

<261> 각 동력학 곡선의 분리 상은 단일 지수 분리 속도(k_{off})에 딱 맞았고 이러한 비율은 간단한 1:1 Langmuir 결합 모델(Lofas & Johnsson, 1990)을 이용하여 그 주입 상으로부터 결합 속도(k_{on})를 계산하는 데에 이용하였다.

<262> SPR 측정으로부터 평형 분리 상수, K_d 를 k_{off}/k_{on} 의 비율로서 계산하였다.

<263> gD-trkC에 대한 안티-trkC의 친화도를 SPR 동력학 실험에서 고정화된 항체 또는 항원을 이용하여 측정하였다. 저밀도의 고정화된 항원(0.4 내지 0.6ng/mm²)을 이용하여 실험에서 결정된 외견상의 친화도들이 고정된 IgG를 이용한 실험들에서 결정된 것들과 통상 일치하였다(표2 참조). 그러나 높은 밀도의 고정화된 gD-trkC에서는 각 항체의 외견상의 결합 친화도가 10배 만큼 많은 비율로 현저히 더 단단한 것을 알 수 있었다. 그 이유는 아마도 이가 IgG에 의한 단단한 결합성 효과 때문일 것이다. 몇몇 경우에는 trkC가 고정된 IgG 상에 주입되었을 때 결합이 검출되지 않았다. 이는 IgG의 고정화로 인해 항원-결합 부위가 입체적으로 블록킹되었기 때문일 것이다. 테스트된 모든 조건 하에서 항체 2248은 테스트된 모든 항체 중 가장 높은 외견상 친화도($K_d=5.6$ 내지 8.5nM)를 가졌다.

표 4

SPR에 의해 결정된 결합 친화도. 결과는 고정된 gD-trkC(400-600 RU)에의 IgG결합 및 고정된 IgG(1000-3000 RU)에의 gD-trkC의 결합에 대해 나타난 것임. NDB=검출 불가능한 결합.

항체 (IgG)	K_d (nM)	
	고정된 gD-trkC	고정된 IgG
2248	5.9	8.5
2250	8.7	28
2253	42	51
2256	62	300
2344	19	NDB
2345	12	NDB
2349	23	NDB
6.4.1	12	28
6.1.2	13	16
2.5.1	12	NDB

<264>

- <265> 경쟁 ELISA
- <266> 항체가 그들이 인지하는 trkC 상의 에피토프에 따라 분류된 다양한 그룹들에 대한 예비적 정보를 얻기 위해 경쟁 ELISA를 사용하였다. 이 분석에서 trkC-gD(1 μ g/ml)를 미세적정 플레이트를 코팅하기 위한 포획 항원으로 사용하였다. 특이적 비오틴화된 안티-trkC 모노클로날 항체(1 μ g/ml)를 그 코팅된 플레이트에 단독 또는 또다른 안티-trkC 모노클로날 항체(비표지되고, 표지된 항체와 비교하여 과잉(50 μ g/ml)으로)의 존재하에 첨가하였다. 만일 비오틴화된 항체 및 비표지된 항체 둘다가 같거나 오버랩되는 에피토프를 인지한다면 그것들은 고정화된 trkC에의 결합에 대해 경쟁할 것이고 결과적으로 표지된 항체의 결합을 감소시킬 것이다. 만일 그들이 다르고 비-오버랩되는 에피토프를 인지한다면 이들 사이의 경쟁은 없을 것이고 표지된 항체의 고정화된 trkC에의 결합은 영향을 받지 않을 것이다. 비표지된 인간의 IgG2 및 마우스의 IgG를 음성 대조군으로 사용하였다. 도 4의 대표 데이터는 모든 안티-trkC 모노클로날 항체가 쥐의 trkC-2248 모노클로날 항체를 제외하고는 표지된 인간의 안티-trkC 6.1.2 모노클로날 항체와 고정화된 trkC에의 결합에 대해 경쟁하는 것을 나타낸다. 이는 쥐의 2248 항체는 다른 모든 안티-trkC 항체에 의해 인지되는 에피토프와는 다른 trkC 상의 에피토프를 인지한다는 것을 암시하는 것이다.
- <267> 비표지된 쥐의 모노클로날 항체 2248이 먼저 고정화된 trkC에 결합되면 다른 어떤 (비오틴화된) 항체들은 그들의 결합 부위에 접근할 수 없다는 것은 매우 흥미로운 사실이다. 이는 비록 에피토프는 별개이지만, 입체구조적인 방해로 인해 발생하는 현상으로 보인다. 그러한 쌍마다의 비교를 가지고 유용한 정보를 얻을 수 있으며 동일한 항원에 대한 항체들을 에피토프 인지에 기초하여 다른 그룹들로 분류할 수 있다. 그러한 비교의 요약은 도 5에 나타나 있다. 이 결과는 항체들이 두개의 별개 그룹(:그룹 1은 2248을 제외한 모든 모노클로날 항체를 포함함, 반면 그룹 2는 2248로 구성됨.)으로 나뉠 수 있다.
- <268> 도메인 교환 돌연변이체를 이용한 에피토프 맵핑
- <269> 다양한 도메인이 trkA 또는 trkB 유래의 대응 도메인으로 치환된 키메라 trkC를 이용하여 더이상의 에피토프 맵핑을 수행하였다. 이 접근법은 안티-trkC 항체가 trkA 또는 trkB와 현저히 교차결합하지 않는다는 사실에 의해 가능한 것이다. 도메인의 결실은 단백질의 이차 구조를 무너뜨리는 반면 도메인-교환 돌연변이체에서 관련 단백질 유래의 대응 도메인(유사한 크기 및 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는)으로의 치환은 이차 구조를 보존할 것이다. trk 수용체의 세포외 도메인은 도6a에 나타난 바와 같이 5개의 도메인으로 구성된다. D1 및 D3는 시스테인-풍부 도메인이고, D2는 루신-풍부 도메인이며, D4 및 D5는 면역글로불린 유사 도메인이다. D1, D4 및 D5를 trkB 또는 trkA 유래의 대응 도메인으로 치환하는 것을 포함하는 도메인-교환 돌연변이체를 제조하였다(Urfer et al., EMBO J. 14:2795-2805[1995]). 야생형 trkC 및 야생형 trkA를 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용하였다. trkC의 도메인-교환 돌연변이체는 치환된 도메인의 공급원에 따라 명명된다. 예컨대 s1B는 trkB 유래의 D1 도메인을, s4B는 trkB 유래의 D4 도메인을, s5B는 trkB 유래의 D5 도메인을, s5A는 trkA 유래의 D5 도메인을 갖는 것이다. 모든 돌연변이체는 이뮤노어드레신, 예컨대 IgG에 융합되고 정제된 형태로 발현되었다.
- <270> 각각의 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 다양한 도메인-교환 돌연변이체와의 결합을 ELISA에 의해 평가하였다. 염소 안티-인간 IgG 유래의 F(ab')₂ 단편을 이뮤노어드레신(이뮤노어드레신으로서 trkC의 도메인-교환 돌연변이체 및 trkC-IgG, trkA-IgG)의 연속적인 희석액(100 μ g/ml 내지 2.4ng/ml, 100 μ l/웰, 실온에서 한시간)을 포획하기 위해 미세적정 플레이트를 코팅하기 위해 사용하였다. 비표지된 인간 또는 비오틴화된 쥐의 안티-trkC 모노클로날 항체를 고정된 이뮤노어드레신을 함유한 플레이트에 첨가하고(웰당 100 μ l; 1 μ g/ml, 실온에서 1시간), 결합안된 여분의 시약을 제거하기 위해 세척하고 염소 안티-인간 κ 또는 HRP에 컨쥬게이트된 스트렙타아비딘과 함께 인큐베이션시켰다. 도6b에 나타난 바와 같이 모든 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체들은 도메인 D1 또는 D4의 치환을 갖는 trkC 도메인-교환 돌연변이체를 인지할 수 있었다. 그러나 trkB 또는 trkA 유래의 대응 도메인을 갖는 도메인 5의 치환에 의해서는 안티-trkC 항체에 의한 인지를 할 수 없었다. 결합 정도는 음성 대조군, trkA로 관찰된 것과 같은 낮은 수준으로 감소되었다. 이 결과로 테스트된 모든 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체가 도메인 D5 내의 어느 위치에 있는 에피토프를 인지한다는 것을 유추할 수 있다.
- <271> 사용된 이차 항체가 HRP에 커플링된 염소의 안티-마우스 IgG Fc라는 것을 제외하고는, 유사한 분석을 쥐의 안티-trkC 모노클로날 항체를 가지고 실질적으로 유사한 방법으로 수행하였다. 인간의 안티-trkC 항체를 가지고 했을 때에는 도메인 D5의 치환으로 인해 테스트된 모든 쥐의 안티-trkC 모노클로날 항체의 결합을 파괴시켰다(도

6b). 부가적으로 도메인 D4의 치환 또한 2248 위의 안티-trkC 항체의 결합을 파괴시켰다. 인간의 안티-trkC 모노클로날 항체 및 위의 그것 모두 2248 위의 항체(이것은 도메인 4 내의 결정인자를 부가적으로 인지하는 것으로 보임)를 제외하고는 도메인 5 내의 에피토프를 인지하는 것으로 보인다. 2248 에피토프는 도메인 4 및 5의 경계를 오버랩핑하는 선형 에피토프일 수 있다. 대안으로 2248 항체는 도메인 4 및 도메인 5 둘다로부터 유래된 결정인자를 가진 불연속적인 에피토프에 의해 형성된 이차 구조를 인지할 수 있다. 흥미롭게도 Urfer et al.(J. Biol. Chem. 273: 5829-5840[1998])이 더 이전에 NT-3와의 상호작용을 매개하기 위해 trkC 수용체에서 도메인 5의 중요한 역할을 한다는 것을 확립하였다. 놀랍게도 여기서 기술된 항체들 역시 NT-3에 의해 인지된 것과 크게 오버랩핑되는 trkC의 에피토프에 결합한다. 이는 놀랍게도 NT-3 및 면역글로불린 분자의 상대적인 크기 및 형상 때문이다. 이러한 액티베이터의 가능한 작용 모드는 그들의 세포내 티로신 키나아제 도메인을 함께 가져와서 교차 인산화시켜 활성화시키는 방식으로 두개의 trkC 분자들의 세포외 도메인을 교차결합시키는 것이다.

<272>

호모다имер인 NT-3에 있어서 trkC와 상호작용하는 분자의 두 영역이 그 분자의 반대편에서 정 반대이다. 즉 서로로부터 180도 떨어져 있다. 이러한 영역들 사이의 거리는 16Å이다. 한편, 여기서 기재된 면역글로불린 분자 내의 두개의 trkC 상호작용 부위는 서로 반대가 아니다. trkC 결합 도메인을 NT-3과는 다른 각으로 디스플레이 할 뿐만 아니라, 면역글로불린으로 인해 NT-3에 있을 때 보다 더 넓은 거리로 trkC 결합 도메인들이 서로로부터 떨어져 있을 것이다. 이는 두개의 Fab 도메인의 정확한 각에 따라 다양할 것이지만 50Å 내지 150Å의 범위내이다. NT-3과 그 아고니스트 Mab와 같은 두개의 매우 다른 교차결합제가 trkC 상의 동일한 부위에 결합될 때 아고니스트로서 작용한다는 것을 미리 예측하는 것은 매우 어렵다.

<273>

부위-특이적 돌연변이 유발

<274>

부위-특이적 돌연변이유발을 이용하여 안티-trkC 항체의 인지에 있어 선별된 개개의 도메인 5의 아미노산 잔기의 공헌도를 결정하였다. 도 7은 인간의 trkC 도메인 4 및 5의 아미노산 서열을 나타낸다. 점찍은 모든 잔기들을 L284, L286 및 E287 잔기들을 제외(이들은 각각 E, H 및 K로 변경)하고는 알라닌으로 돌연변이시켰다(Urfer et al., J. Biol. Chem. 273:5829-5840[1998]). 총 26개의 단일 아미노산 돌연변이가 일어났고 그들이 안티-trkC 모노클로날 항체에의 결합에 미치는 효과를 측정하였다. 하기 표 5에 나타난 값들은 돌연변이체의 안티-trkC 항체 대 야생형 trkC에의 결합 비율을 나타낸다. 변이를 최소화하고 효과적인 비교를 제공하기 위해, 각 항체에 대한 각 돌연변이체에 대해 결정하였고, 야생형 trkC로 얻어진 EC50 값으로 나누었다.

표 5

trkC 돌연변이체	NT-3*	2.5.1	6.1.2	6.4.1	2344	2345	2349	2248	2250	2253	2256	1436
trkC	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
R275A	1.1											
E280A	0.7											
E283A	1.7											
L284E	1.1	NB	NB	NB	NB	NB	NB	0.7	0.8	0.7	1.1	0.8
R285A	1.5	1.1	1.2	0.8	0.9	1.0	0.9	0.8	2.6	0.9	NB	0.4
L286H	1.2	0.6	1.37	NB	0.9	0.5	0.6	0.6	0.4	0.4	0.6	0.6
E287K	27.3	NB	NB	NB	NB	NB	NB	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8
E291A	1.0											
R295A	11.6											
Q309A	1.0											
R312A	0.8											
K315A	0.9											
H318A	1.0	0.8	1.1	0.7	0.8	1.0	0.7	1.0	1.0	0.8	0.8	1
E320A	1.0											
E324A	1.2											
E329A	1.0											
N335A	37.8	NB	NB	0.3	NB	NB	1.5	0.6	0.6	0.5	0.5	0.8
K336A	0.9											
T338A	30.3											
H339A	1.7											
K350A	1.0											
Q358A	1.2											
K366A	0.9											
E367A	1.2											
D372A	1.2											
E373A	1.1											

<275>

- <276> 상기 회색 부분은 지정된 돌연변이체가 모노클로날 항체 결합에 대해 초기 효과를 보이지 않았다는 것이고 따라서 재분석하지 않았다. 모노클로날 항체 결합을 완전히 제거한 돌연변이는 NB("No Binding observed")로써 나타내었다. 상기 분석을 통해 trkC의 아미노산 잔기 L284, E287, 및 N335이 테스트된 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체에 의한 인지에서 주요한 공헌을 하는 것을 알 수 있었다. trkC 도메인 5와 NT-3의 복합체 모델은 이 잔기들의 위치가 항체의 항체의 CDR과 가깝게 접촉하고 있음을 보여준다(도 8). 이 모델은 trkA 도메인 5와 NGF와의 복합체의 결정 구조에 기초한 것이다. 더 상세한 설명은 상기 제시한 Urfer et al., J. Biol. Chem. (1998) 또는 Ultsch et al., J. Mol. Biol. 290:149-159(1999).
- <277> 항체의 가변 영역의 클로닝 및 시퀀싱
- <278> trkC 및 안티-trkC 모노클로날 항체 간의 상호작용의 분자적 기초를 더 잘 이해하기 위해 아고니스트 항체들의 헤비 및 라이트 체인 가변 서열들을 클로닝하고 DNA 서열을 결정하였다. 총 RNA는 인간 및 쥐의 안티-trkC 항체를 생산하는 하이브리도마 세포로부터 RNA 분리 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 분리하였다. RNA를 SuperScript II 시스템(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 및 각각의 헤비 체인 또는 라이트 체인의 서브그룹 유래의 프레임워크 4 서열에 기초한 특이적 3' 프라이머(Kabat and Wu, J. Immunol. 147: 1709-1719[1991])를 이용하여 cDNA로 역전사하였다. 이어서 PCT 증폭을 수행하였는데, 헤비 및 라이트 체인의 N-터미널 아미노산 서열에 기초한 특이적 전방 프라이머 및 cDNA 합성을 위해 사용되는 동일한 3' 프라이머를 갖는 2.5M의 DMSO의 존재하에서, AmpliTaq DNA 폴리머라제(Perkin Elmer, Foster City, CA)를 이용하여 수행하였다. PCR 산물은 인간의 헤비 및 라이트 체인 불변 영역 둘다를 포함한 F(ab')₂ 벡터 안으로 서브클로닝하였다(Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167[1992]). V_H 및 V_L 도메인 각각 다섯개의 클론이 시퀀싱되었고 하나의 공통 서열을 얻었다.
- <279> 도 9는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인의 추론된 아미노산 서열을 나타낸다(2250, 서열번호: 42; 2253, 서열번호: 43; 2256, 서열번호: 44; 6.1.2, 서열번호: 45; 6.4.1, 서열번호: 46; 2345, 서열번호: 47 및 2349, 서열번호: 48). 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체들의 라이트 체인의 추론된 아미노산 서열은 도10에 나타나 있다(2250, 서열번호: 49; 2253, 서열번호: 50; 2256, 서열번호: 51; 6.1.2, 서열번호: 53; 6.4.1, 서열번호: 53; 2345, 서열번호: 54 및 2349, 서열번호: 55). 도 9 및 도 10 둘다 상보성 결정 영역(Complementarity Determining Regions, CDRs)이 CDR1, CDR2 및 CDR3로 표시되었고 그 대응 아미노산 서열은 진하게 나타내었다. 도 11은 다양한 안티-trkC 모노클로날 항체의 헤비 체인 뿐만 아니라 라이트 체인의 CDR 서열까지 요약하였는데, 각각이 속하는 헤비 체인 및 라이트 체인 패밀리를 지정하였다.
- <280> 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 체인 및 라이트 체인의 CDR의 결정된 아미노산 서열에 기초하여 몇몇 이러한 영역들의 일반 공식을 제공할 수 있다. 쥐의 항체에 대해 헤비 체인 CDR1은 공식 XaaW₁XaaXaaW₂VK(서열번호: 37)로 표현될 수 있는데, 여기서 위치1의 Xaa는 F 또는 Y이고, 위치3의 Xaa는 I 또는 M이며 위치 4의 Xaa는 E 또는 H이다. 쥐의 헤비 체인 CDR2는 공식 EIXaaPXaaXaaXaaXaaTNYNEKFKXaa(서열번호: 38)로 표시되며, 여기서 위치 3의 Xaa는 L 또는 Y이고, 위치5의 Xaa는 G 또는 S이고, 위치6의 Xaa는 S 또는 N이며 위치 7의 Xaa는 D 또는 G이며, 위치 8의 Xaa는 N 또는 R이며, 위치 17의 Xaa는 G 또는 S이다. 쥐의 헤비 체인 CDR3은 공식 KNRNYYGNVYV(서열번호: 12) 또는 KYYYGNSYRSWYFDV(서열번호: 13)으로 표현될 수 있다. 인간 항체에 대해서는 헤비 체인 CDR1이 공식 XaaXaaXaaY₁W₂Xaa(서열번호: 39)로 표현될 수 있는데, 여기서 위치1의 Xaa는 S 또는 I이고, 위치 2의 Xaa는 G 또는 S이며 위치 3의 Xaa는 G, T 또는 Y이며, 위치 7의 Xaa는 S 또는 N이다. 인간의 헤비 체인 CDR2는 공식 XaaIXaaXaaSGSXaaTXaaNPSLKS(서열번호: 40)로 표시되며, 여기서 위치 1의 Xaa는 Y 또는 R이고, 위치3의 Xaa는 Y 또는 F이고, 위치4의 Xaa는 Y 또는 T이며 위치 8의 Xaa는 S 또는 R이며, 위치 10의 Xaa는 N 또는 Y이다. 인간의 헤비 체인 CDR3은 공식 DRDYDSTGDYYSYGMV(서열번호: 14), DGGYSNPF(서열번호: 15) 또는 ERIAAAGXaaDY₁Y₂Y₃NGLXaaV(서열번호: 41)으로 표현될 수 있고 여기서 위치 8의 Xaa는 A 또는 T이고 위치 16의 Xaa는 D 또는 A이다.
- <281> 헤비 및 라이트 체인의 가변 영역의 추론된 아미노산 서열은 이러한 항체의 N-터미널 펩티드 서열의 결정에 의해 확인하였다. Millipore Immobilon-PSQ 멤브레인 상의 전기블랏팅(electroblotting)을 BioRad Trans-Blot 트랜스퍼 세포에서 250mA의 일정 전류에서 1시간동안 수행하였다(Matsudaira, J. Biol. Chem. 262:10035-10038[1987]). PVDF 멤브레인을 50% 메탄올에서 0.5분간 0.1% Coomassie Blue R-250를 가지고 염색한 후 50% 메탄올에서 10% 아세트산을 가지고 2-3분간 탈염하였다. 그 멤브레인을 물로 전체를 세척하고 저장하기 전에 20 °C에서 건조하였다. 자동화된 단백질 시퀀싱을 온라인 PTH 분석기가 구비된 모델 494A Perkin-Elmer 서열분석기(Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA) 상에서 수행하였다. PVDF 멤브레인 상에 전기블랏팅된 단백질을

6mm 마이크로 글래스 카트리지에 시퀀싱하였다. 피크를 Justice Innovation 소프트웨어로 Nelson Analytic 760 인터페이스를 사용하여 통합하였다. 서열 번역은 DEC 알파 상에서 수행하였다(Henzel et al., J. Chromatography 404: 41-52[1987]). 표 6에 인간 및 쥐의 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체를 그들의 N-터미널 서열에 기초하여 분류한 것을 요약하였다.

표 6

인간의 안티 trkC 아고니스트 mAbs	헤비 체인	라이트 체인
6.1.2	Subgroup II	Kappa I
6.4.1	Subgroup II	Kappa I
2345	Subgroup II	Kappa III
2349	Subgroup II	Kappa III
2.5.1	Subgroup II	Kappa I
2344	Subgroup II	Kappa I
쥐의 안티 trkC 아고니스트 mAbs		
2248	Subgroup IIA	Kappa I
2250	Subgroup IIA	Kappa I
2253	Subgroup IIA	Kappa IV
2256	Subgroup IIA	Kappa III

<실시예 2: 신경장해에 대한 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 영향>

실험 동물 모델

NT-3 아고니스트의 주요한 용도는 말초성 신경장해의 치료 및/또는 예방이다. 대 섬유 미엘린화된(large fiber myelinated) 감각 뉴런(이는 고유수용(proprioception) 및 진동 감각을 매개하는 데에 관련된)이 NT-3에 대해 높은 친화도를 나타내는 수용체로서 작용하는 trkC를 발현하는 것으로 알려져 있다. 이러한 대 섬유에 관련된 신경 장애는 통상 당뇨병이며 또한 시스플라틴 및 피리독신과 같은 특정 화학치료제에 대한 반응에서 유도된다. NT-3는 실험적 당뇨병 신경장해 및 시스플라틴 유도 신경장해의 동물 모델에서 효과를 나타내었다. 그러나 NT-3는 설치류 모델에서 나타낸 바와 같이 그것의 생체이용률이 나쁘기 때문에 심각한 제한이 있다. NT-3의 아고니스트로서 안티-trkC 모노클로날 항체를 사용하면 많은 장점을 얻을 수 있고, NT-3의 사용에 관련된 잠재적인 많은 문제점을 극복할 수 있다.

아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체의 생체내 반감기를 실험 동물에 정맥내 또는 피하내에 주사하여 결정하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이 래트에 1mg/kg의 정맥내(IV) 주입 또는 5mg/kg의 피하내(subQ) 주입 후 다양한 시간대에 모노클로날 항체 2256의 혈청 수준을 측정하였다. 그 혈청 수준은 trkC의 티로신 오토인산화를 증가시키는 그것의 능력에 의해 기능적으로 완전한 항체 2256의 양을 KIRA 분석법을 통해 측정함으로써 결정하였다. 이러한 데이터는 래트에서 모노클로날 항체 2256이 9일의 반감기와 피하내 투여 후 69%의 생체이용률을 가짐을 암시한다. 이러한 값들은 다른 항체들로 얻은 것과 일치하며, NT-3를 가지고 얻은 것들과는 전혀 다른 것이다. 도 12에 나타낸 데이터는 Mab 2256과 동일한 투여량 및 투여루트(1mg/kg 정맥내; 5mg/kg 피하내)로 NT-3를 투여한 후 얻은 데이터이다. 이러한 데이터는 NT-3에 대한 혈청 반감기가 4-5분이며 피하내 생체이용률이 7%임을 나타낸다. 이 데이터는 그 항체들이 NT-3에 비해 생체이용률 및 생체내 혈청 반감기라는 매우 중요한 특성의 견지에서 현저히 개선된 것임을 나타낸다.

대 섬유 감각 신경장해의 두 동물 모델에서 NT-3가 화학적 손상의 영향을 보호하고 회복할 수 있다는 것이 보여졌다. 매우 높은 투여량의 NT-3가 높은 투여량의 피리독신의 독성 효과로부터 대 섬유 감각 뉴런을 보호하는 것으로 나타났고, 그것보다는 더 보통인 투여량의 NT-3가 시스플라틴 투여의 효과를 역전시키는 것으로 나타났다. NT-3 및 여기서 기재된 아고니스트 Mab의 조직 분포에 많은 차이가 있기 때문에 Mab의 생체의 활성이 동물 모델에 유효하게 적용될 지 아닌지를 결정하는 것이 중요하다.

시스플라틴 유도 신경장해의 동물 모델을 만들기 위해, 성체 래트를 1mg/kg의 양으로 복막내 투여 루트를 통해 일주일에 2회씩 16주동안 시스플라틴을 투여하였다. 그 후 래트를 4그룹으로 나누었다. 모든 네개의 그룹을 계속하여 일주일에 2회씩 시스플라틴을 투여하였다. 그 계속된 시스플라틴에 더하여 한 그룹은 NT-3를 1mg/kg의 투여량으로 일주일에 3회 투여하였고, 다른 한 그룹은 Mab 2256을 1mg/kg의 투여량으로 일주일에 1회 투여하였고, 또 다른 한 그룹은 일주일에 한번 Mab 6.4.1을 1mg/kg의 양으로 투여하였고, 나머지 그룹은 살린을 일주일에 3회 투여하였다. NT-3 투여는 피하내인 반면 Mab 및 살린은 정맥내 투여하였다. 이 처리 절차는 4주간

더 계속되었기 때문에 시스플라티늄 투여로부터 총 20주가 소요되었다.

<289> 대 섬유 감각 뉴런의 기능을 이 동물들에서 전기생리학적으로 H-wave recoding을 사용하여 평가하였다(Gao et al., Ann. Neurol. 38(1):30-7[1995]). 도 13의 데이터로부터 알 수 있듯이, 감각 전도 속도가 시스플라티늄과 살린만을 처리한 동물에서 매우 낮았다. Mab 2256 또는 Mab 6.4.1로 일주일에 1회 처리한 것과 같이, 일주일에 3회의 NT-3 처리로 낮춰진 전도 속도가 향상되었다. 일주일에 1회 사용된 모노클로날 항체로 나타난 향상의 정도는 적어도 NT-3로 일주일에 3번 처리하여 나타난 정도만큼은 우수하였다.

<290> 피리독신 또한 감각 뉴런의 큰 미엘린화 서브군집을 중요하게 손상시키는 감각 신경장해를 유도하는 것으로 알려져 있다(Helgren et al., J. Neurosci. 17(1):372-82[1997]). 높은 투여량의 NT-3는 이 신경장해의 발달을 블록하는 것으로 알려져 왔다(Helgren et al., J. Neurosci. 17(1): 372-82[1997]). 두 다른 투여량의 피리독신(400mg/kg 또는 600mg/kg 매일, IP)으로 동물을 2주동안 처리하면 DRG의 큰 뉴런이 손상된다. 이러한 손상을 DRG의 큰 뉴런에 의해 배타적으로 또는 더 선호적으로 발현되는 것으로 알려진 공지의 몇몇 단백질의 감소에 의해 검출하였다. 이러한 마커들의 발현 수준을 TAQMAN RT-PCR 테크닉을 사용하여 mRNA 수준을 측정하여 평가하였다.

<291> trkC 아고니스트를 위한 Taqman RT-PCR은 다음과 같다.

<292> A. 프로브 및 프라이머

A. Probes and Primers

NFL

F-CAGCAGAACAAGGTCCTGGAA 21MER (SEQ ID NO: 72)
R-AGCGGGAAGGCTCTGAGTG 19MER (SEQ ID NO: 73)
P-AGCTGTTGGTGCTGCGCCAGAA 22MER (SEQ ID NO: 74)

NSE

F-TCCATTGAAGACCCATTGAC 21MER (SEQ ID NO: 75)
R-GCCGACATTGGCTGTGAAC 19MER (SEQ ID NO: 76)
P-AGGATGACTGGGCAAGTTGTTCA 24MER (SEQ ID NO: 77)

TRKC

F-CAGCCCACTGCACCATATCA 20MER (SEQ ID NO: 78)
R-CTGTATCCGGCCAGCAT 18MER (SEQ ID NO: 79)
P-CCATGGCATCACTACACCTTCATCGCT 27MER (SEQ ID NO: 80)

CALRET

F-TGGGAAAATTGAGATGGAGA 21MER (SEQ ID NO: 81)
R-GCTGCCTGAAGCACAAGG 20MER (SEQ ID NO: 82)
P-CGCAGATCCTGCCAACCGAAGAGA 24MER (SEQ ID NO: 83)

PARVALB.

F-GACACCACTCTTCTGGAATGC 23MER (SEQ ID NO: 84)
R-TTGCCAAACCAACCTACCA 21MER (SEQ ID NO: 85)
P-ATCGGACACACCTGTAGGGAGGACC 26MER (SEQ ID NO: 86)

GAPDH

F-CAGTGGCAAAGTGGAGATTGT 21MER (SEQ ID NO: 87)
R-AATTTGCCGTGAGTGGAGTC 20MER (SEQ ID NO: 88)
P-CCATCAACGACCCCTTCATTGACCTC 26MER (SEQ ID NO: 89)

<293>

<294> 프로브 및 프라이머는 Primer Express, (ABI-Perkin-Elmer)를 사용하여 설계되었다. 프라이머 프로브 선택에 관한 가이드라인은 Williams and Tucker(1999) PCR application, pp. 365-75(Academic Press)에 있다.

<295> B. 총 RNA 제조 및 정량

<296> 포스페이트 버퍼 살린이 관류된 래트로부터 L4 및 L5를 절개하였다. 왼쪽 및 오른쪽 사이드를 별개의 튜브로 분리하였다. 표준 곡선에 사용된 총 RNA를 위해 모든 DRG를 대조군 래트로부터 잘라내었다. 총 RNA를 Qiagen Rneasy 미니 칼럼을 이용하여 분리하였다. 조직은 제조업자들의 지시에 따라 균질화하였다. 총 RNA를 Ribogreen Quantitation Kit(Molecular Probes)를 이용하고 제조업자의 지시에 따라 정량화하였다.

<297> C. RT-PCR

<298> 총 RNA의 25 나노그램을 50ul 반응 당 사용하였다. 예외적으로 표준 곡선 반응은 반응당 500, 250, 25 또는 2.5 나노그램을 사용하였다. 각 반응은 25pmol의 각 올리고뉴클레오타이드 프라이머, 0.2mM의 각 dNTP, 100nM 형광 표

지된 올리고뉴클레오타이드 프로브, 1X RT-PCR 버퍼(PE 바이오시스템), 2.0mM MgCl₂, 20U RNase 저해제, 12.5MuLV 역전사효소(RT, PE 바이오시스템) 및 2.5U Amplitaq Gold 폴리머라제(PE 바이오시스템)을 포함하였다. 역전사는 48℃에서 30분간 그리고 이어서 95℃에서 10분간 Amplitaq Gold 활성화 및 RT 불활성화에 대해 수행한 후, PCR(15초간 95℃의 및 1.5분간 60℃의 40사이클)을 수행하였다.

<299> D. 유전자 발현 정량

<300> 콘트롤 RNA를 사용하여 하우스킥핑 유전자 및 각 Taqman 런을 갖는 관심의 유전자를 제조하였다. 표준 곡선은 Taqman 런으로부터 얻은 역치 싸이클(Ct) 값 대 첨가된 콘트롤 총 RNA의 양의 로그값을 플롯팅함으로써 얻었다. 그 결과로 얻어진 선형 방정식을 log RNA 값으로 풀었다. 그 실험적 Ct 값에서 플러깅(plugging)하여 실험적 유전자 발현값의 로그값을 얻었다. 10에 이 값의 제곱을 자승하여 나노그램의 실험적 유전자 발현값을 얻었다.

<301> 도 14에 나타난 바와 같이, 두 주 동안 피리독신 처리를 한 결과 뉴로필라민트 라이트 체인(NFL), 뉴런 특이적 에놀라제(enolase)(NSE), trkC 및 칼레티닌 발현이 투여량 의존적으로 감소되었다. 이러한 감소의 투여량 의존도 및 정도는 마커마다 다양했는데, 이는 뉴런 손상의 마커로서의 이러한 단백질이 다른 감수성을 갖는다는 암시한다.

<302> 도 15는 두가지 투여량의 Mab 2256를 낮은 투여량(400mg/kg 매일)의 피리독신과 함께 동물을 처리한 결과를 나타낸다. NFL 및 NSE는 이런 수준의 피리독신 처리로 발현이 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 동물을 5mg/kg의 Mab 2256(subQ 매주)로 공동처리하면 이러한 발현에서의 감소가 완전히 블록된다. 1mg/kg 투여량의 Mab 2256은 이러한 단백질의 발현에 뚜렷한 영향을 미치지 않았다. trkC나 칼레티닌 발현 모두 이러한 낮은 투여량의 피리독신 처리에 의해서 현저한 영향을 받지 않았으나 5mg/kg의 Mab 2256으로 처리하면 콘트롤 수준에 비해 trkC 발현이 실제적으로 증가하였다.

<303> 동물을 더 높은 투여량(매일 600mg/kg의 투여량)의 피리독신으로 처리하면 NFL, NSE 및 칼레티닌은 매우 낮은 수준으로 떨어지는 반면, trkC 발현은 콘트롤 값의 약 50%로 떨어진다(도 16). 1mg/kg 또는 5mg/kg의 Mab 2256으로 공동처리하면 완전하게는 아니지만 현저하게 trkC 및 칼레티닌에서 보여지는 발현 감소를 블록시킨다. Mab 2256으로 처리된 동물은 NFL 및 NSE 발현에 있어 보호가 되는 경향이 약간 있지만, 이는 통계적인 의미는 없었다. 따라서 대 감각 뉴런에 대해 손상의 다중 생화학 마커를 사용하여 Mab 2256이 피리독신 처리의 독성을 개선시킬 수 있는 것을 보았다.

<304> 피리독신 신경장해의 전기생리학적, 행동학적 영향을 검사하기 위해 래트를 8일간 400mg/kg으로 피리독신을 하루 두번 주입하였다. 그들의 큰 직경의 감각 구심성신경의 기능을 송아지 넓적다리의 좌골신경을 자극한 후 발의 근육의 M-웨이브(직접적인 운동) 및 H-웨이브(반사 감각) 반응을 기록하여 전기생리학적으로 테스트하였다(Gao et al., Ann. Neurol. 38(1):30-7 [1995]). 8일간 피리독신을 처리한 결과 도 18에 나타나 있는 바와 같이 운동 반응에 비해 감각 반응의 정도가 크게 감소하였다. Mab 2256을 동시에 처리하였을 때에는 감각 정도에서 발생하는 피리독신-유도 감소가 블록되었다. 이는 매우 높은 투여량(20mg/kg 매일)의 NT-3를 사용하여 얻은 효과(공지됨)와 유사하였다(Helgren et al., 상기).

<305> 피리독신으로 처리된 동물을 또한 그들의 고유수용 기능에 대해 테스트하였다. 그것들을 수평 사다리를 가로질러 밝은 빛과 소리 자극을 피해 어두운 상자 안으로 걸어들어 가도록 훈련시켰다. 그 동물들을 아래로부터 비디오로 촬영하였고, 그 사다리 단 위에서의 그들의 뒷발의 위치의 성질에 대해 그들을 처리한 것을 모르는 관찰자에게 판단하도록 하였다. 각 발 위치를 좋은 위치(발이 척골의 앞쪽부분, 발가락의 바로 뒤에서 디디어지고 발가락은 사다리 단을 제대로 감음), 견고한 디딤(발이 발가락 바로 뒤 이외의 부분에 디디어나 사다리 단에 견고하게 디디어지고, 발가락은 종종 사다리단을 감지 않음), 거의 결함(발이 가까스로 발가락의 극히 앞부분 또는 뒷꿈치의 뒷부분 상에 접촉하지만 몸무게를 지탱하기는 함), 결함(발이 사다리단에 아예 디디이지 않거나 거의 디디이지 않아서 발이 무게를 지탱하지 못하고 무게가 실렸을 때 사다리 아래로 떨어짐)로서 점수를 매겼다. 정상 래트는 그들의 뒷발을 정확하게 놓는 방법을 매우 빠르게 배우고, 이것이 뒷발이 공간에 있는 위치에 대한 우수한 고유수용 감각에 요구된다. 피리독신(400mg/kg을 8일간 하루 2회씩 투여)으로 처리한 후 상기와 같은 실험을 한 결과 좋은 위치가 거의 30% 감소하였고 결함 및 거의 결함 둘다가 증가하였다(도 18). Mab 2256을 동시에 투여한 경우에는 동물이 좋은 위치의 감소가 줄었고 결함 및 거의 결함의 증가가 작아서 훨씬 좋은 성능을 나타내었다.

<306> 요약하면 Mab 2256을 함께 처리하면 생화학적으로, 전기생리학적으로 그리고 행동 수행 상의 성능에 의해 측정 한 바와 같이 피리독신의 독성 효과를 개선시킨다.

<307> trkC Mab이 치료학적으로 NT-3와 적어도 같은 효과를 나타낸다는 확인한 후에, 그 관찰된 통각과민 역작용을 검사하였다. NT-3 투여의 부작용이 설치류(도 19) 및 인간(Chaudhary et al., Muscle and Nerve 23: 189-192[2000])에서 보여졌다. 래트를 Hargreave 장치를 이용하여 뒷발의 열 감수성에 대해 훈련시키고 테스트한 다음 Mab 2256 IV, 1mg/kg 또는 NT-3 subQ 1mg/kg을 목덜미에서 투여하였다. 투여 후 2, 4, 및 6시간 후 래트를 그들의 열 중지 시간에 대해 다시 테스트하였다. 도 19에서 볼 수 있는 바와 같이, NT-3 투여에 의해 투여 이후 4 및 6시간되는 시점에서는 현저한 열 통각과민이 유발된 반면에, trkC Mab 2256은 열 고통 감각에 있어 어떠한 영향도 미치지 않았다. 따라서 신경장해를 반전시키거나 방해하기에 유효한 투여량일 때, NT-3는 고통의 감수성을 증가시키지만, Mab 2256은 그렇지 않다.

<308> 널리 사용되는 화학요법제인 시스플라틴은 진동 감각 및 고유수용 감각의 선별적 손실과 함께 감각 신경장해를 유발한다. 여기에서 본 발명자들은 뉴로트로핀 인자 중 신경성장인자의 한 멤버인 뉴로트로핀-3(NT-3)이 래트에서 시스플라틴에 의해 H-반사-관련 감각 신경 전도 속도가 감소된 것을 정상 수준으로 회복시킨다는 것을 입증하였다. NT-3를 처리하면 시스플라틴에 의해 유발된 배근 신경절 내의 대 감각 뉴런의 뉴로필라민트 단백질의 비정상적인 세포질 분포를 다시 올바르게 할 수 있고 장판지 신경 내에서 미엘린화된 섬유들의 수 감소를 제대로 되돌릴 수 있다. 따라서 시스플라틴 신경독성의 NT-3 의존적 복귀로 인해, NT-를 말초 감각 신경장해의 치료에 사용될 가능성이 제안될 수 있다.

<309> 성체 래트를 2-3주간 높은 투여량의 피리독신(비타민 B6)을 장기간 투여하면 고유수용감각의 손실이 매우 크며, 이것은 이 비타민을 인간에 과복용시키거나 시스플라틴과 같은 화학요법제로 처리한 인간에게서 발견되는 것과 유사하다. 빔-워킹 임무(beam-walking task)에서 양적으로 그리고 말초성 신경 자극에 의해 유발된 H-웨이브의 EMG 기록에 의해 평가된 바와 같이, 장기적인 피리독신 처리 동안 뉴로트로핀 인자인 NT-3(5-20mg/kg/day, s.c.)를 공통투여하면 피리독신 독성과 관련된 행동 및 전기생리학적 후유증을 크게 감소시켰다. 또한 NT-3를 투여하면 척수의 배(dorsal)쪽 기둥의 감각 섬유들의 변성을 막는다. 이러한 데이터들은 NT-3가 근육 감각 구심성 신경을 위한 표적-유도된 뉴로트로핀 인자라는 증거와 일치하며, NT-3의 약리학적 투여량이 대-섬유 감각 신경장해의 치료에 유익할 수 있다.

<310> 생물학적 물질의 기탁

<311> 하기 하이브리도마 세포주 및 플라스미드를 American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA(ATCC)에 2000.6.21.자로 기탁하였다:

하이브리도마/플라스미드 지정	ATCC No.
2.5.1	PTA-2151
6.1.2	PTA-2148
6.4.1	PTA-2150
2344	PTA-2144
2345	PTA-2146
2349	PTA-2153
2248	PTA-2147
2250	PTA-2149
2253	PTA-2145
2256	PTA-2152
DNA pXCA-2250HL	PTA-2136
DNA pXCA-2253HL	PTA-2137
DNA pXCA-2256HL	PTA-2138
DNA pXCA-6.1.2H	PTA-2141
DNA pXCA-6.4.1H	PTA-2143
DNA pXCA-2345H	PTA-2142
DNA pXCA-2349H	PTA-2133
DNA vegf4chim-6.1.2L	PTA-2134
DNA vegf4chim-6.4.1L	PTA-2135
DNA vegf4chim-2345L	PTA-2139
DNA vegf4chim-2349L	PTA-2140

<312>

<313> 이 기탁은 특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약(부다페스트 조약)의 규정에 따라 행

해졌다. 이는 기탁일로부터 30년간 생존가능한 배양액의 보존을 보증한다. 그 유기체들은 부다페스트 조약 및 제네펜크 인크와 ATCC와의 계약서에 근거하여 ATCC에 의해 분양될 수 있다. 이는 해당 미국 특허의 등록시 또는 미국 또는 해외 출원의 공개시, 어느것이든 빠른 때에 공중에 그 배양물의 자손이 영구적으로 그리고 제한없이 제공될 수 있다. 35 USC § 122 및 그에 부속된 특허청장의 규칙(37 CFR § 1.12, 886 OG 638 특허 참조)에 따라 미국특허청의 특허청장에 의해 결정된 사람에게 그 자손을 제공하는 것을 보장한다.

- <314> 유럽 특허에 있어서는 기탁된 미생물의 샘플이 그 유럽 특허의 허여가 공보에 게재된 날까지 또는 그 출원이 거절 또는 취하되거나 취하된 것으로 간주될 때 까지는 그 샘플을 요청한 사람에 의해 추천된 전문가에게 행해지는 그 샘플의 발급에 의해서만 이용가능하게 될 것이다.
- <315> 본 출원의 양수인은 기탁된 그 배양물이 적당한 조건 하에서 배양될 때 사멸, 분실 또는 파괴되면, 그들은 통지시 그 같은 배양물의 생존가능한 개체로 신속하게 대체할 것이다. 그 기탁된 균주의 사용가능성은 그 특허법에 따라 어떤 정부의 공권력 하에 주어진 권리를 위반하여 본 발명을 실시할 권한이 있는 것으로 해석되지 않는다.
- <316> 상기 기재된 명세서는 당업자가 본 발명을 실시하기에 충분한 것으로 간주된다. 본 발명은 기탁된 구조체들에 의해 그 범위가 한정되지 않는다. 그 이유는 기탁된 구체예들은 단지 본 발명의 특정 관점을 예시하기 위한 것이기 때문이다. 또한 기능적으로 등가인 모든 구조체들은 본 발명의 범위에 속한다. 여기서 물질의 기탁은 여기에 기재된 상세한 설명이 최상의 모드를 포함하여 본 발명의 어떤 관점을 실시하기에는 부적합하다거나 그들이 표현하는 특정 예시에 본 권리범위가 제한되는 것으로 해석되는 것을 허용하는 것이 아니다. 실제 여기서 기재되고 나타난 것들 뿐만 아니라 본 발명의 다양한 변형들이 앞선 기재로부터 당업자들에게 명백할 것이며 따라서 첨부된 청구범위의 범위에 속하는 것이다.
- <317> 특정 문제점또는 상황에 대한 본 발명의 교시들의 적용은 여기에 포함된 교시의 관점에서 당업자의 능력 범위 내에 있을 것이다. 본 발명의 산물, 그것의 분리를 위한 대표적인 공정, 용도 및 제조의 예들은 상기 나타나 있지만 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- <318> 본 명세서를 걸쳐 인용된 모든 인용문헌 및 거기서 인용된 문헌들은 여기에 참고로 통합되어 있다.

도면의 간단한 설명

- <40> 도 1a 내지 1d는 KIRA(A 및 B) 및 PC12 신경돌기 성장 분석(C 및 D)를 사용하여 입증된 trkC 수용체에 대한 다양한 인간(A 및 C) 및 쥐(B 및 D) 모노클로날 항체들의 아고니스트 활성을 나타낸다. Protein A, 정제된 모노클로날 항체는 KIRA 자극 버퍼(2% 소 혈청 알부민[BSA, Intergen Co., Purchase, NY] 및 25mM Hepes 함유 F12/DMEM 50:50, 0.2 μ m 여과된)에서 27 μ g/ml로 희석하였다. 그 다음에 모노클로날 항체를 자극 매체에서 1:3 (총 8개 희석액; 0.01 내지 180nM Mab 범위의 농도)으로 희석하였다. GD-트랜스펙션된 CHO 세포(5×10^4 세포/웰)를 NT-3 또는 Mab(이중으로 분석된 희석물들)로 6시간동안 자극한 후 그 분석을 실시예들에 기재한 바와 같이 완료하였다(도 1a, 인간의 Mab; 도 1b, 쥐의 Mab). 정제된 Mab를 실시예들에서 기술한 바와 같이 PC12 신경돌기 성장 분석에서 아고니스트 활성에 대해 분석하였다. 래트의 PC12 세포를 전장의 인간 trkC로 트랜스펙션시키고 그 세포를 1000세포/웰의 밀도로 플레이트팅시켰다. 트랜스펙션으로부터 3일 후 Mab을 삼중으로 trkC 트랜스펙턴트 함유 웰에 첨가하였고(0.0002 내지 2.7nM의 농도), 37°C에서 3일간 더 인큐베이션시켰다. 그 세포를 상 대조 현미경으로 분석한 후 그 세포의 직경을 2배 초과하는 신경돌기를 갖는 세포를 계수하였다.
- <41> 도 2는 대표 실시예로서 6.1.2 항체를 사용하여 trkC에 특이적으로 결합하는 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체를 나타낸다.
- <42> 도 3은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체가 래트 trkC 보다 인간의 trkC를 더 효율적으로 인식하는 것을 입증하고 있다. 래트의 trkC에 결합하는 모노클로날 항체의 능력을 수용체의 이뮤노어드헤신 구조체를 사용하여 측정하였다. trkC(인간의 trkC-gD 또는 래트의 trkC-IgG)를 미세적정 플레이트(50mM 카보네이트 버퍼, pH 9.5에 희석된 10 μ L의 1 μ g/ml 용액) 상에 밤새 고정시켰다. 그 플레이트를 세척하고 블로킹시켰다. 그 Mab을 0.5% BSA 및 0.05% Tween 20을 함유한 PBS 중에 1 μ g/ml로 희석시키고, 적정 세포에 첨가한 후(100 μ L/웰) 실온에서 한시간 동안 인큐베이션하였다. 그 플레이트를 세척하고 적절한 HRP 컨제이트를 첨가하고(인간의 Mab : 염소의 안티-인간 κ -HRP, 1:5K; 쥐의 Mab; 염소의 안티-moIgG(Fc)-HRP, 1:5 K), 실온에서 한시간동안 인큐베이션시켰다. 그 다음에 그 플레이트를 세척하고 현상하고 판독하였다.
- <43> 도 4는 경쟁 ELISA를 이용한 에피토프 맵핑의 대표적인 예를 나타낸다. 비오티닐화된 인간의 안티-trkC 6.1.2 모노클로날 항체를 여분의 다양한 비표지된 안티-trkC 모노클로날 항체의 존재 또는 부존재하에서 고정된 trkC와

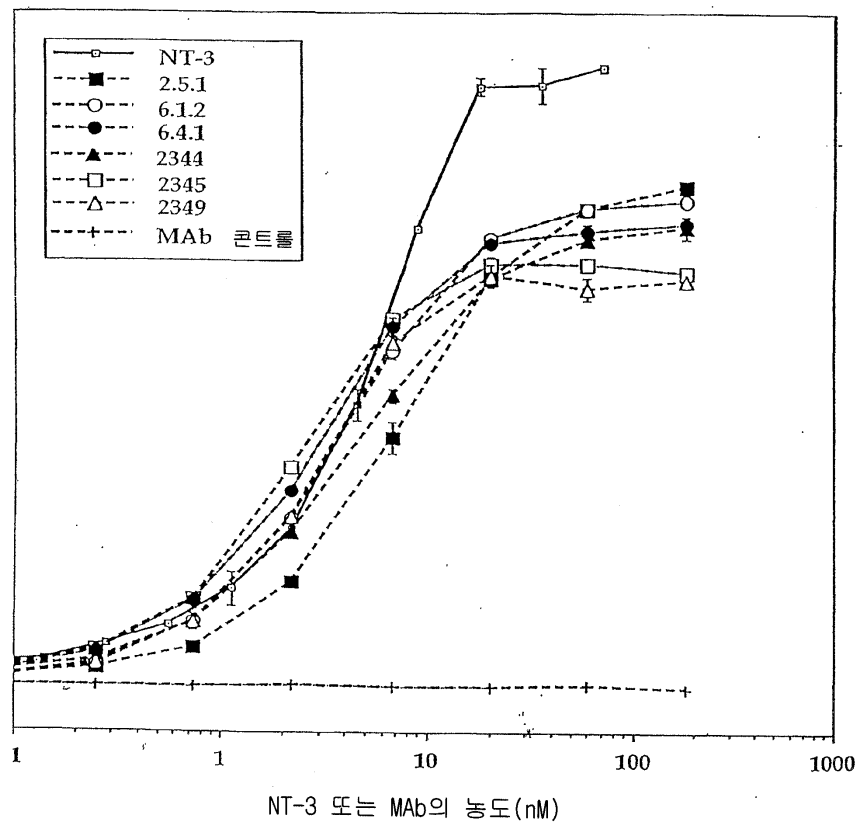
함께 인큐베이션시켰다.

- <44> 도 5는 경쟁 ELISA를 사용한 에피토프 맵핑 결과를 요약한 것이다.
- <45> 도 6a 내지 6c는 다양한 아고니스트 인간(B) 및 쥐(C)의 안티-trkC 모노클로날 항체에 의해 인지된 trkC 상의 에피토프들의 맵핑에 있어서 다양한 trkC 키메라(A) 및 그들의 이용을 나타낸 개략도이다.
- <46> 도 7은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 의한 인지에 대한 그들의 역할을 해독하기 위해 돌연변이유발을 위해 타게팅된 잔기들을 나타내는 인간의 trkC 도메인 4 및 5의 아미노산 서열이다.
- <47> 도 8은 안티-trkC 모노클로날 항체와 결합한 trkC의 3차원 리본 다이어그램을 나타낸다. 특히 도시된 것은 안티-trkC 항체의 CDR에 의한 인지에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 trkC의 아미노산 잔기들이다.
- <48> 도 9는 쥐 및 인간의 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 유래의 헤비 체인 가변(V_H) 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. 또한 세개의 CDR 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 진하게 표시되어 있다. 헤비 체인 2250 및 2253의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 1이다. 2256 헤비 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 2이다. 6.1.2 및 2345 헤비 체인의 CDR1은 서열번호: 3이다. 6.4.1 헤비 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 4이다. 2349 헤비 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 5이다. 2250 및 2253 헤비 체인의 아미노산 서열은 서열번호: 6이다. 2256 헤비 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 7이다. 6.1.2 헤비체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 8이다. 6.4.1 헤비 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 9이다. 2345 헤비 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 10이다. 2349 헤비 체인 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 11이다. 2250 및 2253 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 12이다. 2256 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 13이다. 6.1.2 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 14이다. 6.4.1 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 15이다. 2345 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 16이다. 2349 헤비 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 17이다.
- <49> 도 10은 쥐 및 인간의 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 유래의 라이트 체인 가변(V_L) 영역의 아미노산 서열을 나타낸다. 또한 세개의 CDR 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)은 진하게 강조되어 있다. 2250 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 18이다. 2253 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 19이다. 2256 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 20이다. 6.1.2 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 21이다. 6.4.1 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 22이다. 2345 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 23이다. 2349 라이트 체인의 CDR1의 아미노산 서열은 서열번호: 24이다. 2250 라이트 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 25이다. 2253 라이트 체인 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 26이다. 2256 라이트 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 27이다. 6.1.2 라이트 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 28이다. 6.4.1 라이트 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 29이다. 2345 및 2349 라이트 체인의 CDR2의 아미노산 서열은 서열번호: 30이다. 2250 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 31이다. 2253 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 32이다. 2256 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 33이다. 6.1.2 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 34이다. 6.4.1 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 35이다. 2345 및 2349 라이트 체인의 CDR3의 아미노산 서열은 서열번호: 36이다.
- <50> 도 11은 쥐 및 인간의 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체의 헤비 및 라이트 체인의 CDR의 아미노산을 나타낸다. 또한 데이터베이스에서 얻어진 CDR 서열과의 상동성에 근거하여 이러한 서열들이 속하는 패밀리를 나타내었다.
- <51> 도 12는 생체내에서 향상된 반감기(수명) 및 생체이용률을 갖는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체를 나타낸다.
- <52> 도 13은 시스플라틴-유도 신경장애에 대한 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체를 나타낸다.
- <53> 도 14는 피리독신 신경장애에 의해 유도된 마커 발현에서의 감소를 나타낸다.
- <54> 도 15는 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 의한 낮은 투여량의 피리독신의 효과의 개선을 보여준다.
- <55> 도 16은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 의한 높은 투여량의 피리독신의 효과의 개선을 보여준다.
- <56> 도 17은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 의한 피리독신 신경장애의 개선을 보여준다.

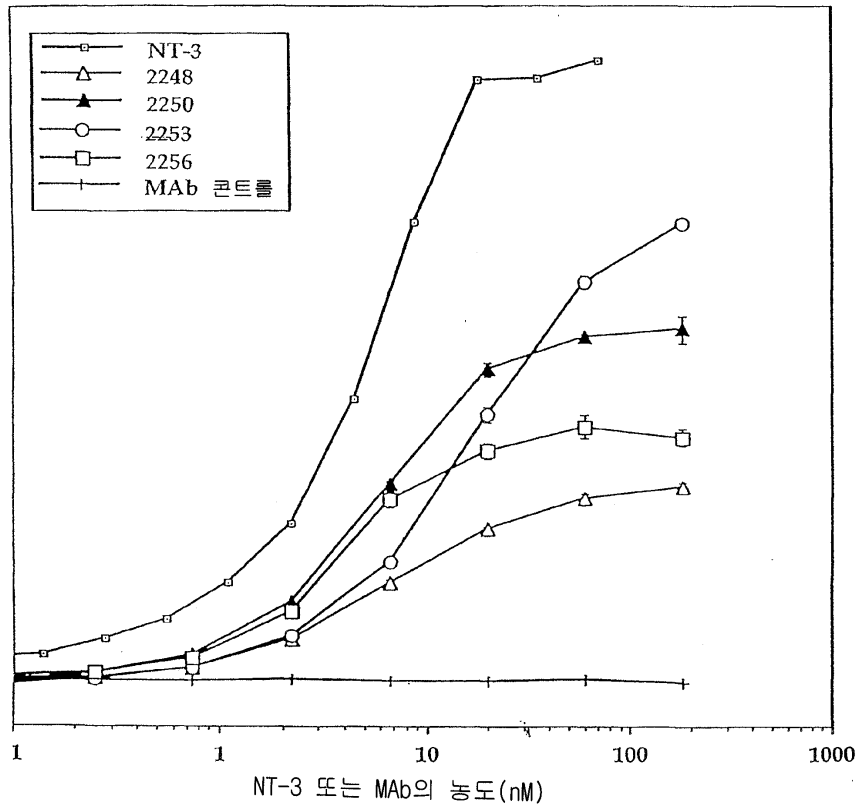
- <57> 도 18은 아고니스트 안티-trkC 모노클로날 항체에 의한 사다리의 피리독신-유도 결합의 중지를 나타낸다.
- <58> 도 19는 NT-3가 치료법적 투여량에서 통각과민을 유발하는 반면 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체는 그렇지 않은 것을 나타낸다.
- <59> 도 20은 도메인 4 및 5의 경계가 지시되는 경우 인간의 trkC의 아미노산 서열을 나타낸다(서열번호: 56).
- <60> 도 21a 및 도 21b는 인간의 trkC 수용체의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다(서열번호: 57).
- <61> 도 22는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 2250의 헤비 체인(A; 서열번호: 58) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 59)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <62> 도 23은 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 2253의 헤비 체인(A; 서열번호: 60) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 61)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <63> 도 24는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 2256의 헤비 체인(A; 서열번호: 62) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 63)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <64> 도 25는 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 2345의 헤비 체인(A; 서열번호: 64) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 65)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <65> 도 26은 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 2349의 헤비 체인(A; 서열번호: 66) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 67)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <66> 도 27은 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 6.1.2의 헤비 체인(A; 서열번호: 68) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 69)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.
- <67> 도 28은 안티-trkC 아고니스트 모노클로날 항체 6.4.1의 헤비 체인(A; 서열번호: 70) 및 라이트 체인(B; 서열번호: 71)의 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

도면

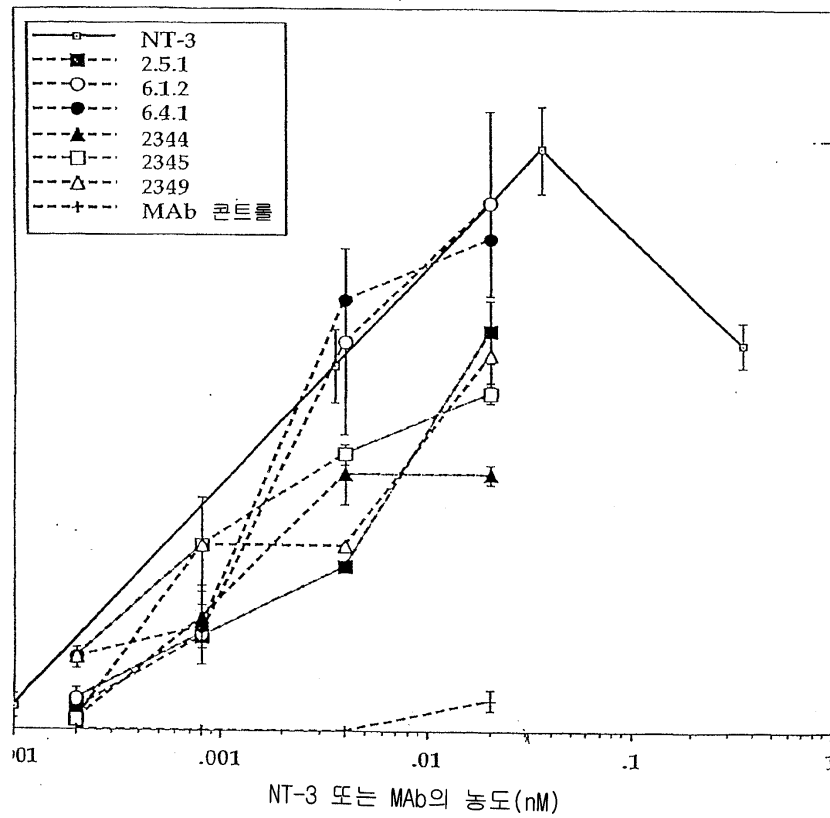
도면1a



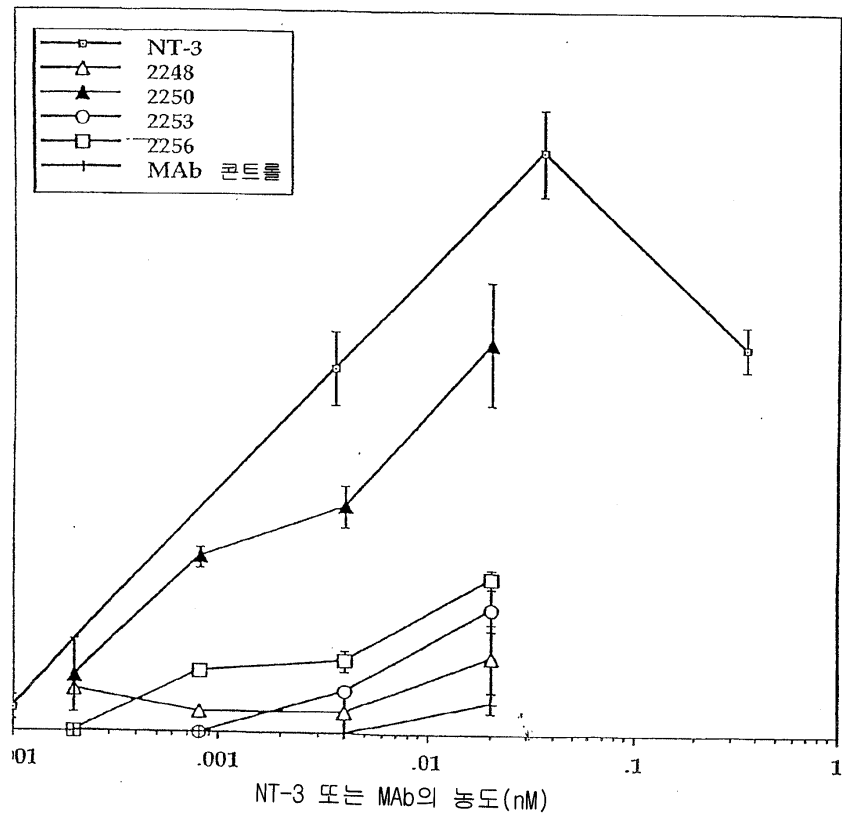
도면1b



도면1c

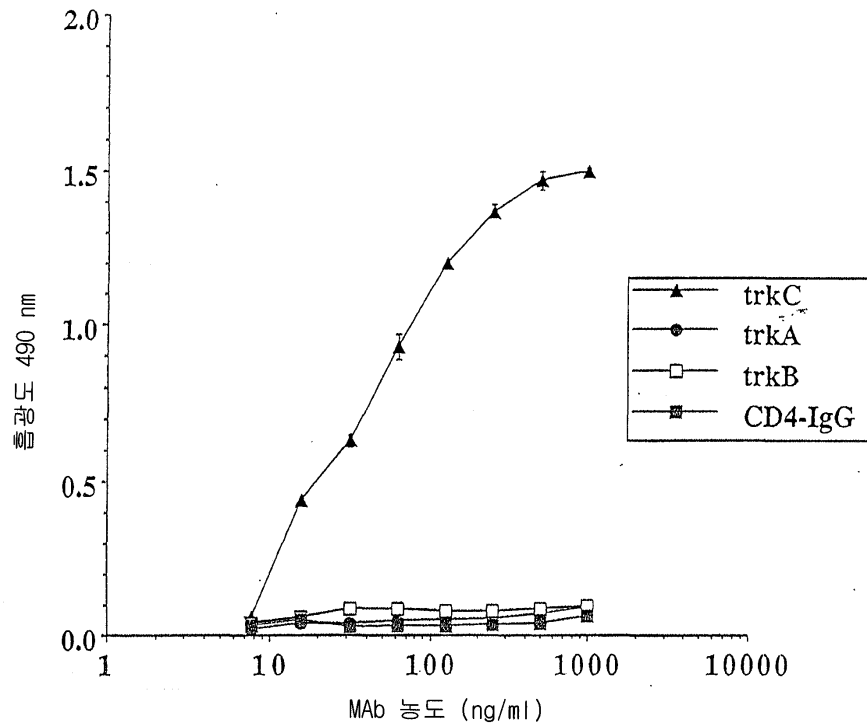


도면1d



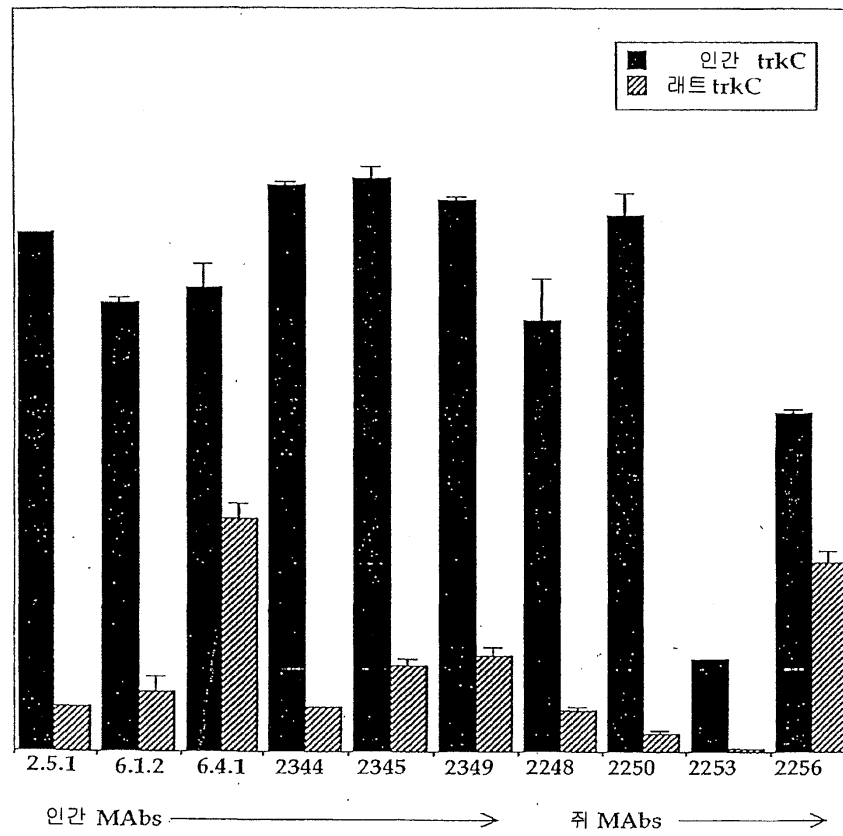
도면2

아고니스트 MAb의 trkC에의 특이적 결합
(대표적인 MAb로서의 6.1.2)



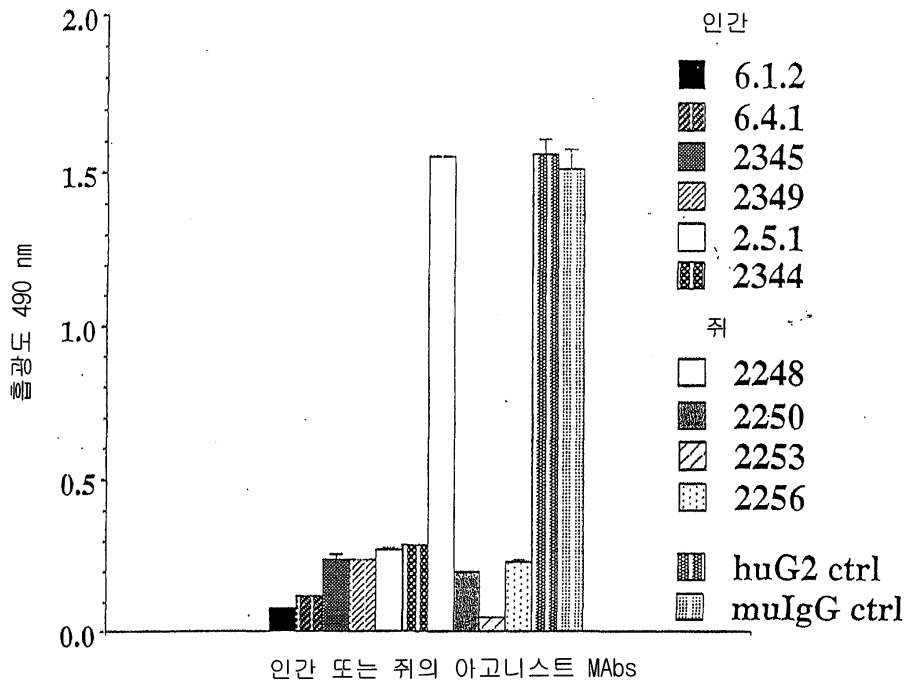
분석 포맷: trk-IgG 또는 CD4-IgG + MAb+적절한 HRP 컨저게이트

도면3



도면4

크로스블로킹 분석을 통해 밝혀진 trkC에 대한
2개의 면역우성 아고니스트 에피토프



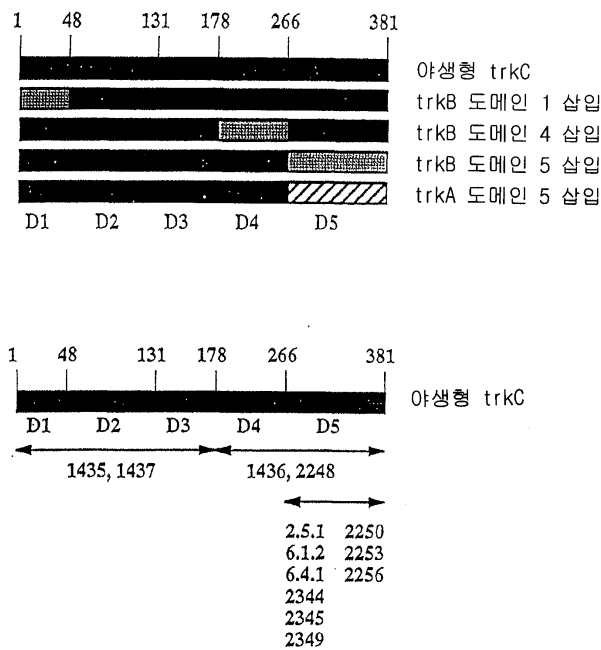
분석포맷:trkC ECD + 비표지된 MAbs + 비오틴화된 6.1.2 + SA-HRP

에피토포 맵핑 요약
6/9/99

		비표시된 MAb									
		2344	2345	2349	2.5.1	6.1.2	6.4.1	2248	2250	2253	2256
비오틴-MAb											
2344	0.02	0	0	0	0.01	0	0	1.52	0	0	0
2345	0.26	0.04	0.02	0.02	0.17	0.11	0.08	1.48	0.04	0.07	0.05
2349	0.09	0.01	0	0	0.06	0.04	0.03	1.55	0.02	0.03	0.02
2.5.1	0.06	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	1.54	0.01	0.02	0.01
6.1.2	0.3	0.24	0.24	0.27	0.08	0.12	0.12	1.55	0.2	0.05	0.23
6.4.1	0.2	0.12	0.1	0.15	0.06	0.07	0.07	1.56	0.1	0.03	0.1
2248	1.52	1.53	1.54	1.5	0.74	1.12	0.01	1.4	0.04	1.48	
2250	0.27	0.1	0.05	0.21	0.08	0.07	1.57	0.01	0.07	0.21	
2253	1.35	1.4	1.45	1.4	0.66	0.9	1.55	1.24	0	1.34	
2256	0.52	0.15	0.07	0.38	0.13	0.12	1.63	0.01	0.02	0.02	
Group 1a	Group 1b	Group 2	Group 3								
2344	2250	2248	2253								
2345	22537										
2349	2258										
2.5.1											
6.1.2											
6.4.1											
2250											
2256											
도메인 맵핑 결과로부터 Group1과 Group2를 분할한(2248은 도메인 4/5에 결합하는 유일한 MAb이고 다른 것들은 05에 특이적이다. 점 돌연변이는 R285G 2250, 2253 및 2256의 일부하는 것을 암시한다.											

분석 포맷 : 90-1-KC + 비표시된 MAb + 비오틴화된 MAb + SA-HRP
(1 µg/ml) (50 µg/ml) (1 µg/ml) (1:1K)

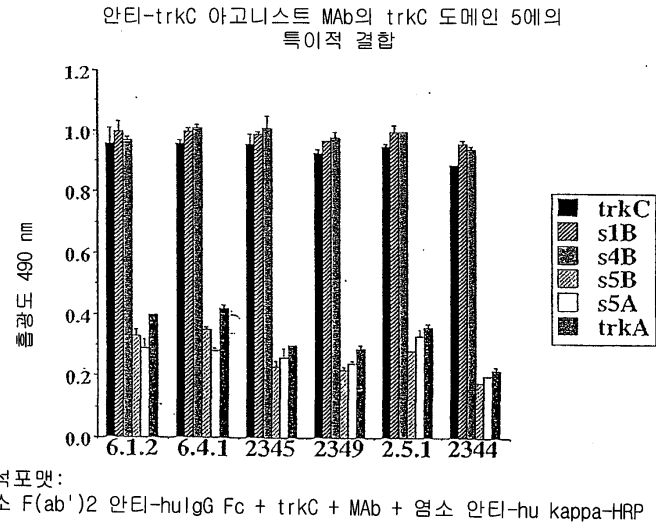
도면6a



trkA 및 trkB 도메인-교환 돌연변이체를 이용한 그로스 에피토프 맵핑

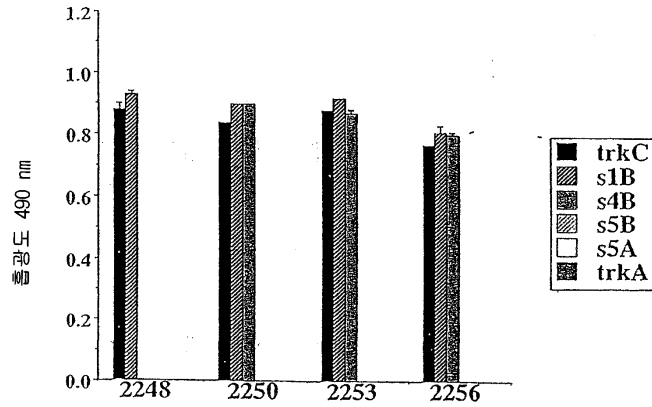
MAb의 도메인 결합 특이성이 전체 도메인 치환 돌연변이체들을 사용하여 측정되었다. 하기와 같은 trkC로의 단일 도메인 치환들이 행해졌다: trkB 도메인 1, trkB 도메인 4, trkB 도메인 5 및 trkA 도메인 5. 야생형 trkB는 음성 대조군으로서 포함되며 이전에 에피토프 맵핑된 비-아고니스트인 쥐의 MAb(1435, 1436 및 1437)가 MAb 대조군으로 포함된다. 이 맵핑의 결과로서 모든 아고니스트 MAb의 도메인 5 결합 특이성이 밝혀졌다. 예외적으로 MAb 2248은 도메인 4 및 5에 의해 형성된 에피토프에 결합한다.

도면6b



도면6c

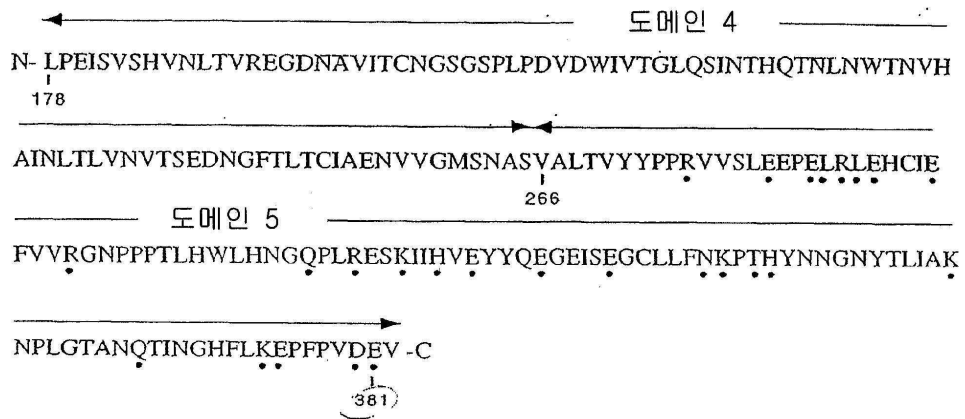
쥐 anti-trkC 아고니스트 MAb의 trkC 도메인
4 또는 5에의 특이적 결합



분석포맷:

염소 F(ab')₂ anti-huIgG Fc + trkC-IgG + MAb + 염소 anti-마우스 IgG Fc-I

도면7



hutrkc 도메인 4 및 5의 서열. 점으로 표시된 모든 잔기들은
알라닌으로 돌연변이 되었음. 그러나 잔기 L284, L286 및 E287은 예외적으로
각각 E, H, 및 K로 변경되었다(7)

도면8



아티-trkC 아고니스트 MAb의 헤비 체인 서열

CDR1 CDR2

2250 : N-QVQLQQSGAELMOPGASVKISCKSTGYTFNFWIEWVKQRPG--HGLEWIGEILPGSDNTNINEKFKG
 2253 : N-QVQLQQSGAELMOPGASVKISCKSTGYTFNFWIEWVKQRPG--HGLEWIGEILPGSDNTNINEKFKG
 2256 : N-QVQLQQPGAELVAPGASVKLSCKASGYTFTSYMMHWVKQRPG--QGLEWIGEIYPSNGRTNINEKFKS
 6.1.2 : N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGIYIYSG-STNYPNPKLKS
 6.4.1 : N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGG--SISTYYWNIWIRQHPAGKLEWIGRIYTSG-STNYPNPKLKS
 2345 : N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGIYIYSG-RTYYPNPKLKS
 2349 : N-QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKLEWIGIYIYSG-STYYPNPKLKS

CDR3

2250 : KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYICARKN---RN----YIGNTVVWGQGLTVTVSA-C
 2253 : KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYICARKN---RN----YIGNTVVWGAGTTLTVSS-C
 2256 : KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYICARKY---YIGNSYRSWTFDWMGAGTTLTVSS-C
 6.1.2 : RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYICTRDRDYDSTGDYYSYIGMDVWGQGTITVTVSS-C
 6.4.1 : RVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYICARDGGYSNFPD-----WGQGLTVTVSS-C
 2345 : RVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYICARER-IAAAGADYYINGLDVWGQGTITVTVSS-C
 2349 : RLTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYICARER-IAAAGTDYYINGLAWWGQGTITVTVSS-C

안티-trkC 아코니스트 MAb의 라이트 체인 서열

	<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>
2250	: N-DIVMTQSPASVSLGQRATISYRAASKSVSTSG--YSYHWNQOKPGOPPRLLIYLVSNLESQVPA	RF
2253	: N-QIVLTQSPAIMASPGKVTITCSASSVSF-----MYWFQOKPGTSPKLIYSTSNLASQVPA	RF
2256	: N-DIVLTQSPASVSLGQRATISCRASEVDNYG--ISFMNWFQOKPGOPPKLLIYAASNQSGVPA	RF
6.1.2	: N-DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIEN-----DLGWYQOKPGKAPKRLIYAASSLSQSVPS	RF
6.4.1	: N-DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSYSSNNKNTLAWYQOKPGOPPKLLIYWASTRESQV	PDRI
2345	: N-EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS-----NYLTWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATG	IPDRF
2349	: N-GIVLTQSPGTLSPGERATFSCRASQSGSS-----TYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATG	IPDRF

CDR3

2250	: SGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATVYCQHIRE-LTRSARGQSWKKR---C
2253	: SGSGGTSYSLTISRMEAEADAATVYCQQRSS-YPLTFGAGTKLELKR-C
2256	: SGSGSGTDFSLNTHPMEEDDTAMYFCQQSKE-VPRTFGGGTKLEMKR-C
6.1.2	: SGSGSGTEFTLTISLSLQPEDFAFYCLQHNS-LPLTFGGGTKVEIKR-C
6.4.1	: SGSGSGTDFTLTISLSLQAEADVAVYCQQHYN-TPLTFGGGTKVEIKR-C
2345	: SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCQQYGRSPPTTFGQGRLEIKR-C
2349	: SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYCQQYGRSPPTTFGQGRLEIKR-C

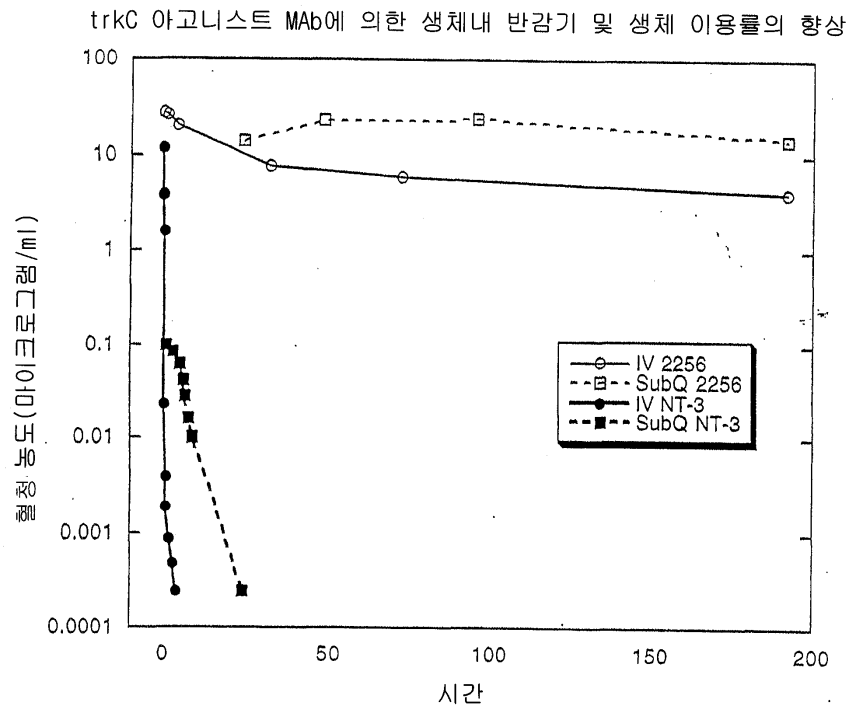
라이트 체인

헤비 체인

항체

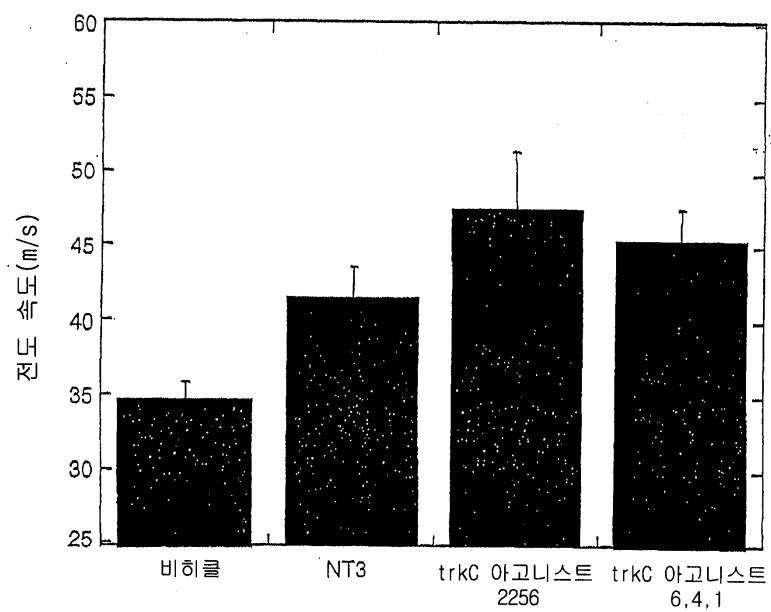
구	패밀리	CDR1	CDR2	CDR3	패밀리	CDR1	CDR2	CDR3
2250	VH1A	FWIEWVK	EILFGSDNTNNEKFKG	KNRN----YIGNYVV	V Kappa I	RASKSVSTSGSYMH	LVSNLES	QHIRELTRS
2253	VH1A	FWIEWVK	EILFGSDNTNNEKFKG	KNRN----YIGNYVV	V Kappa IV	SASSSVS-----XNY	STSNLAS	QORSSYPLT
2256	VH1A	YTMHWVK	EIVFSNGRTNNEKEKS	KYIYGNSIRSWIFDV	V Kappa III	RASESYDNYGIFPN	AASNQCS	QOSKEVPRT
인간								
6.1.2	VH1I	SGGYWMS	YIYSGSTNINPSLKS	DRDYDSTGDYISYGMGV	V Kappa I	RASQGIRN-----DLG	AASSLQS	LQHNS-LPLT
6.4.1	VH1I	ISTYYVN	RIYTSGSTNINPSLKS	DGGYSNPF-----	V Kappa I	KSSQSVSYSSNNKNYLA	WASTRES	QOHYN-TPLT
2345	VH1I	SGGYWMS	XIPYSGRTYINPSLKS	ER-IAAAGADYYNGLDV	V Kappa III	RASQSVSS-----NYLT	GASSRAT	QOYGRSPPT
2349	VH1I	SGGYWMS	YIYSGSTYINPSLKS	ER-IAAAGTDYYNGLDV	V Kappa III	RASQSGSS-----TYLA	GASSRAT	QOYGRSPPT

도면12



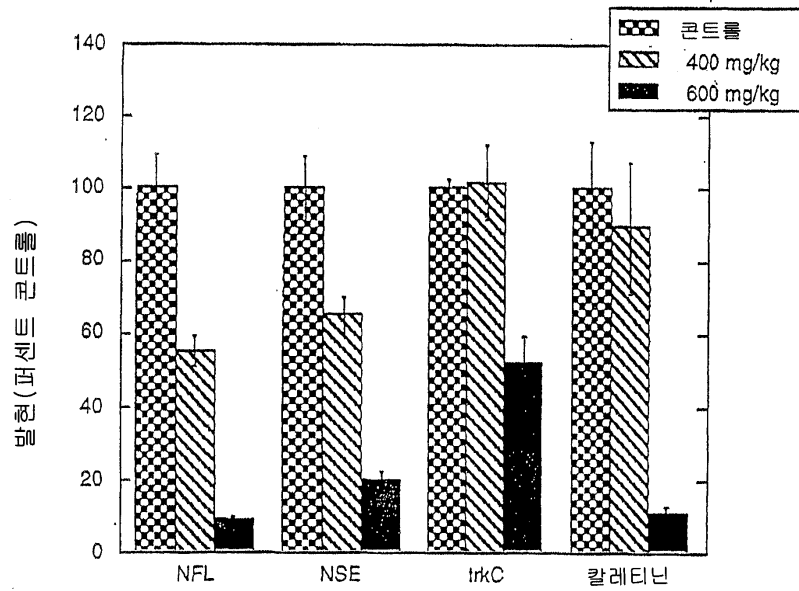
도면13

trkC 아고니스트로의 처리에 의한 시스플라틴-유도 감각 신경장애의 반전



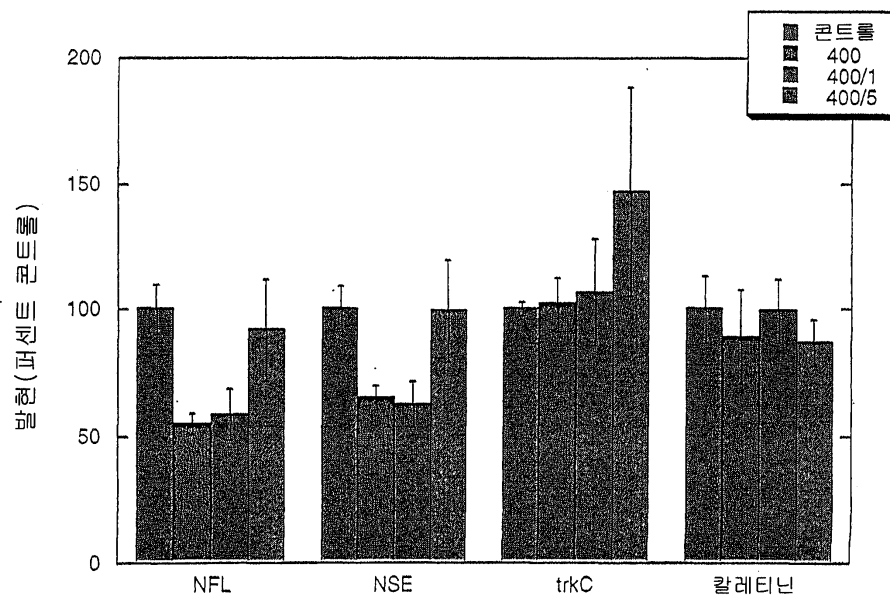
도면14

피리독신 신경장애에 의한 마커 발현의 감소

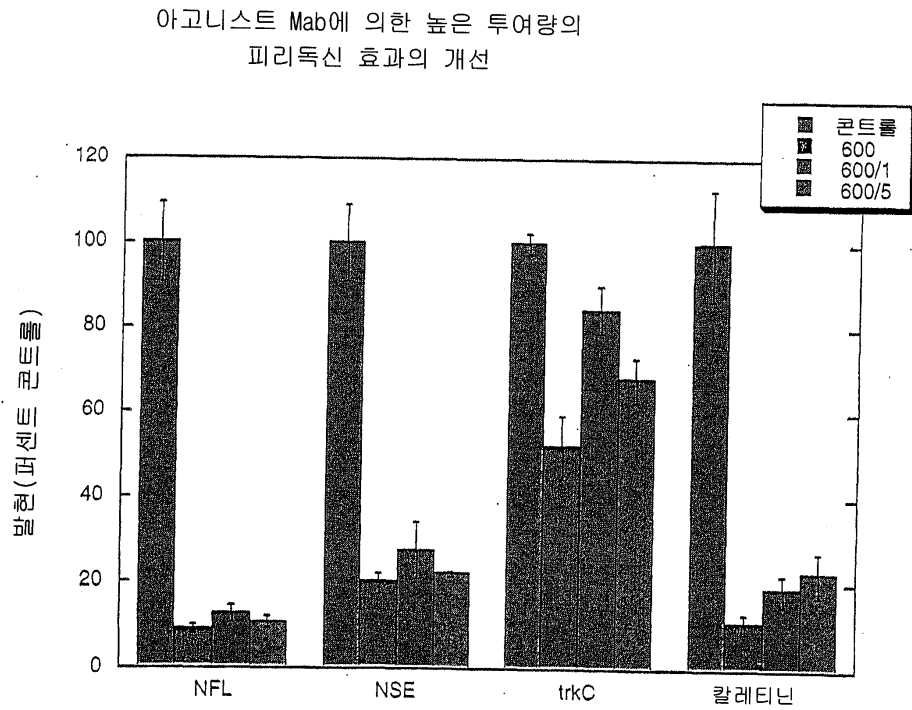


도면15

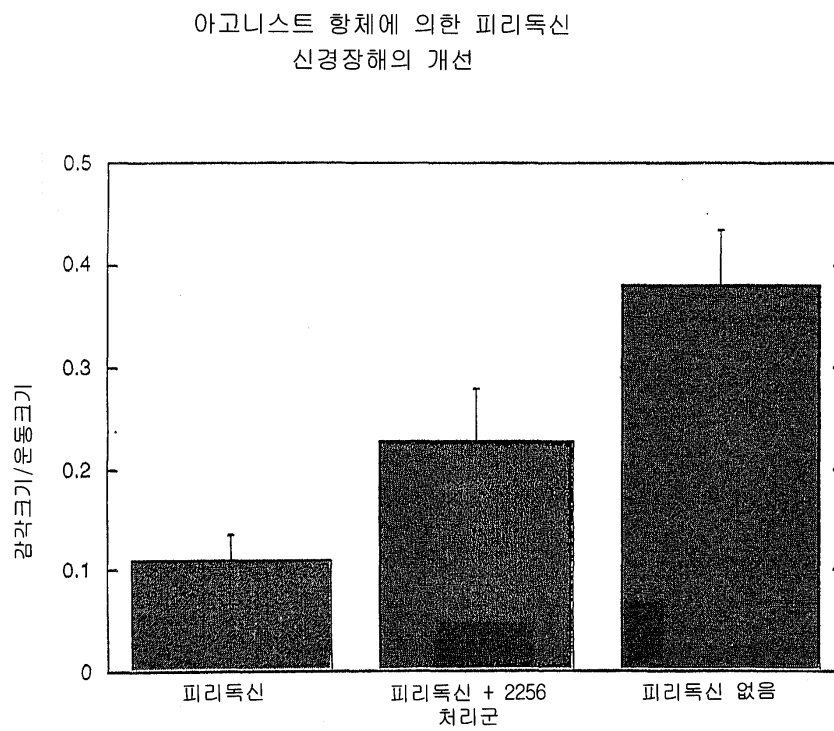
아고니스트 Mab에 의한 낮은 투여량의
피리독신 효과의 개선



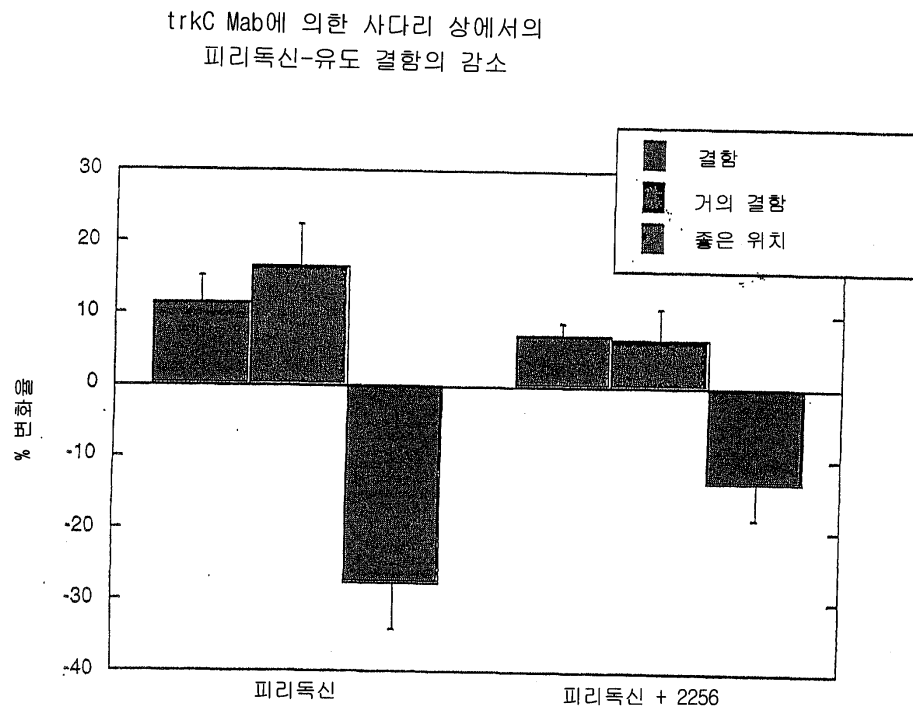
도면16



도면17

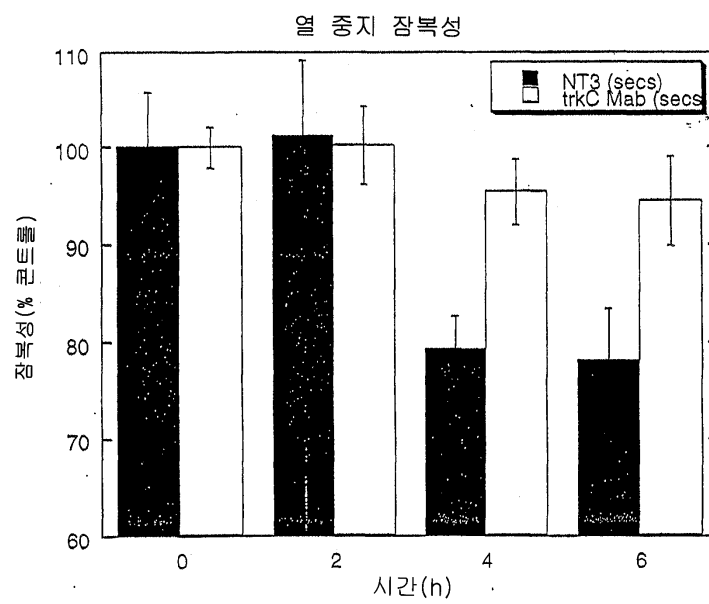


도면18



도면19

NT3는 치료법 투여량에서 통각 과민증을 유발하지만 Mab는 그렇지 않음



```

> Tue Jun 20 2000 15:48:17
> /devaux Unix Files/crikemab/pl.hutrkc
> , 808 Amino Acids, 0 Stops, MM: 90996.08

1 CPANVCYCKT EINCRRPDG NLFPLEGGD SGNSNGNANI NITDISRMT SHIENWRL HTLANVDMEL YTLGLQKLTIK NSGLRSIQPR AFAPKNPHLRY
101 INLSSNRLTT LSMQLFQTL LRELQLEQNF PNCSCDIRMM QLMQEQGEAK LNSQNLXCIN ADGSQLPLFR MNISQCDLPE ISVSHVNLTV REGDNVITC
      ↗Start Domain 4

201 NGSGSPLEDV DWIVTGLOSI NTHOTNLNMT NVHAINLTLV NVTSEDNGFT LTICIAENVVG MSNASVALTV YVPPRVVSL EPELRLEHCI EFVVRGNPPP
      ↗Start Domain 5

301 TLHMLHNOQP LRESKIIVE YVQGEISEG CLLEFKPETHY NNCNVTLIAK NPLGTANQTI NGHFLKEPPP ESTDNFILFD EVSFTPTTV THKFEEDTFG
      ↗End Domain 5

401 VSIANGLAAP ACVLVLVLV MINKYGRSK FGKKGPVAVI SGEEDSASPL HHINHGITT SSLDAGPDTV VIGWTRIPVI ENQYFRQGH NCHKPDYVQ

501 HIKRRDIVLK RELGEGAFGK VELAEYNLS PTKDRMLVAV KALKDPTLAA KQDFOREAEL LTNLQHEHIV KFYGVCGDGD PLIMVFEYMK HGDINKFLRA

601 HGPDMILVD QPQRQAKGEL GLSQMLHIAS QIASOMVYLA SOHFVHRLA TRNCLVGANL LVKIGDFGMS RDVSTDYVR LPNPSGNDFC IWCEVGGHTM

701 LPIRNPPES IYVKETTES DWNSFGVILM EIFTYKQPM FQLSNTEVIE CITQGRVLER PRVCPKEYVD VMLSCQREP QRELNIKEIV KILHALGKAT

801 PIYLDILG

```

도면21a

```

> Tue Jun 20 2000 16:16:53
> /devaux Unix Files/krkmb/ss.hutrkc
> 0 Sites {}
> length: 2607 bp (circular)

1  TGCCCTGCA ATTTGTCGTG GAGCAAGCT GGCCTGSEC GGCATGTCG AACCTCTCC GCTCTCTGGA AGGCGAGAT TCAGGGAACA
   ACCGGACGTT TACACAGAC GTGCTCTGGA CTCTAGTTAA CGGCCCCCG CTGTCTACCG TTGAGGAGG TCCCGTCTTA AGTCCCTTGT
101 CGTTACGCTT CGGTTATAG TTGTAGTGC TTGTAGTTC CTATAGTGA AGTATGTTT ATCTCTGAC GCGTCAAGA GTGTGAGAT TCGGCGACT
201 CATGAGAGCT TACACCGGAC TTCAAAAGCT GACCATGAG AACTCAGGC TTGAGAGCAT TACGCCAGA GCGTTTGCCA AGAACCCCA TTGCGTTAT
   GTACCTCAG ATGTGCGCTG AGTTTITGGA CTGTAGTTC TTGAGTCTG AAGCTTGTA AGTGGGCTT CGGAACGCT TCTTGGGCT AAACGCAATA
301 ATTAACCTGT GAGTAAAGG GCTCACCACA CTCTGTCG AGCTCTCA GAGCTGAT CTTCGGAAT TGCAGTTGGA GCGAACTTT TTCAACTGCA
   TATTTGACA GTTCAATTGCG CGAGTGTGT GAGAGCCCG TCGAGAGGT TCGCAACTA GAAGCCCTTA AGTCAACT GGTCTTGAA AGTTGACCT
401 GGTGTGACT CGCTGTGAG GAGCTGTGCG AGGAGCAGG GAGGCGGAG CTGACAGCG AGACTCTA GTGATGANT GGTATGAGT CCGAGCTTC
   CGACATGTA GCGAACCTAC GTGAGACCG TCTCTGTC GAGTGTGCT GGTGAGAT GACTGAGTT GACTCTCCG TGTACGACA ATGTTGAAAG
501 TCTCTTCG ATGAACATCA GTGAGTGA CTTTCTGAG ATGAGCTGA GCGACCTGA CTTGACCTGA CGAGAGGTT AGATGCTGT TATCACTTC
   AGAGAGGCG TACTTGTAGT CAGTCAACT *Start Domain 4
601 ATGCGCTG GATCACCCCT TCTGATGTG GACTGATAG TCACTGGCT GAGTCCATC AACACTCAC AGACTGATCT GAACTGATC AATGTTGATG
   TTACCGGAC CTAGTGGGGA AGGCTACAC CTGACCTATC AGTACCCGA CGTCAAGTAG TTGTGAGTGA TCTGTTAGA CTTGACCTG TTACAAGTAC
701 CGATCACTT GAGCTGTG ATCTGAGCA GTGAGGACA TGGCTTACC CTGACCTGA TTGACAGAA CGTGTGCGG ATGAGCAAG CAGTGTGTC
   GGTAGTTGA CTGACCAAC TTACACTGCT CACTCTGTT ACCGAGTGG GACTGACCT AGCTCTCTT GACCAACCG TACTGTTAC GGTCAACAAG
   *Start Domain 5
801 CTTCACTTC TACTATCCC GAGCTGTGCT GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG GAGCTGTGAG
   GAGTGTGAG ATGATAGGG GTGACACCA CTGACCTC CTGACCTC ACCTGAGT CTGACCTC ACCTGAGT CTGACCTC ACCTGAGT GAGGTTGCT
901 AGCTGTGCT GGTGTGCA TGGGAGCT CTGCGGAGT CGAAGTCAAT CATATGGA TACTACCAAG AGGAGAGAT TTCCGAGGCG TCGTGTCTT
   TCGACCTGA CCGAGCTTT ACCGCTGGA GACCCCTCA GGTCTGATG GTTACACTT ATGAGTTC TCCCTCTTA AAGGCTCGG AGGACGAGA
1001 TCAACAGCC CAGCACTAC ACTATACCT CATTCGCAA AACCACTGG GACACCCA CCGAGAGCT AATGCGCAT TCTTCAAGA
   AGTTGTGCG GTGCTGATG TTGTTACCT TGATATGGA GTTACGTTT TTGCTGAC CGTGTGCTT GTTCTGTAG TTACCGTGA AGAGTTCTT
1101 GCGCTTCC GAGACAGG ATACTTTAT CTTGTTGAC GAGTGTGCT CCACTCTCC ATACTGTG TCCGAGTGA TGGTGTGTT GTCTCTCTT GTTAAACCC
   CGGAGAGGT CTCTCTGCG TATTAATA GAACAACTG CTCTACTAG GGTGTGAGG ATAGTACAC TGGTGTGTT TTATACGAG TCCGAGTTT AAGCTTACT
   *End Domain 5
1201 GTATCTGAG CAGTTGACT TCTGCTTTT GCTGTGTC TGTCTGCT TGTCTGCT ATATGCTCA ATATGCTG AGCTGCAA TTGAGATGA
   CATAGATATC GTCAACCTGA ACACGAAA CGGACAGG ACACACCA AGAGAGAG TACTGTGT TTATACGAG TCCGAGTTT AAGCTTACT

```

vi.60 gseedit, ss.hutrkc, page 1

도면21b

1301 AGGTTCCCTT GGTGTGATC AGTGTGAGG AGACTCAGC CAGCTCAGT CACACATC ACCACGGAT CACACGGCC TCCTCCTG AGTGTGAGG
TCCACGGCA CCGACATAG TACCACTCC TCCTGAGTC GTGGGTGAGT TGTGTGCTA GTGTGCTGAGT TGTGTGCTGAGT TGTGTGCTGAGT TGTGTGCTGAGT
1401 CGACATCTGT GTATGTGCA TACTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT GAGTGTGAT
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
1501 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
1601 ACAGATCTGT GTGTGTGAT GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
1701 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
1801 CATGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
1901 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2001 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2101 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2201 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2301 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2401 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2501 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT
2601 GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG GATATATG
GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT GTGTGTGAT

> length: 2607
not found:
v1.60 GSeqedit, sa.hurkrc, page 2

도면22

A. Mab 2250 해비 체인

CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGATGCAGCCTGGGGCCCTCAGTGAAGATA
TCCTGCAAGTCTACTGGCTACACATTAGTAACCTCTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG
CCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGCAGTGAATACTAATCTAC
AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTAC
ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAAAGAAAT
CGTAACCTACTATGGTAACCTACGTTGTATGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

B. Mab 2250 라이트 체인

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACC
ATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTGATCATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAAC
CAACAGAAACAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACTCAATCT
GGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCAT
CCTGTGGAGGAGGAGTGTGCAACCTATTACTGTGACACATTAGGGAGCTTACACGT
TCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAAAACCG

도면23

- A. Mab 2253 헤비 체인
- CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGCAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATA
 FCCTGCAAGTCTACTGGCTACACATTCAAGTAACCTTCTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGG
 CTTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAAGATTTTACCTGGCAGTGATAATACTAATACTACA
 ATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCCTGTCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACA
 TCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAAAGAATC
 TTAATACTATGGTAACATACGTTGTCTGGGGCGCAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
- B. Mab 2253 라이트 체인
- CAAATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC
 ATAACCTGCAGTGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTT
 CCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCAAACTCTGGATTATAGTACATCCAACCTGGCTTC
 TGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAG
 CCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTACCCGCT
 CACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAACATAAACGG

도면24

- A. Mab 2256 헤비 체인
- CAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
 CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATCCTAGCAACGGTCGTACTAATACTAC
 AATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACG
 ACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC
 TCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAAATATTACTACGGTAATAGCTATCGTTCTCTGGTAC
 TTCGATGTCTGGGGCGCAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
- B. Mab 2256 라이트 체인
- GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
 ATCTCTGCAAGCCAGCGAAAGTGTGATAATTATGGCATTAGTTTATGAACCTGGTTTC
 CAACGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
 CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTCTGTGCAGCAAAGTAAGGAGGTTCTCTCG
 ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAGATGAAACGG

도면25

- A. Mab 2345 헤비 체인
- CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCTGTCTCCCTC
 ACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
 CAGCACCCAGAAAAGGGCCTGGAGTGGTTGGGTACATCTTTTACAGTGGGAGGACCTACT
 ACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACATATCAGTAGACACGCTTAAGAACCAGTTCTC
 CCTGAAGCTGAACCTGTGTGACAGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCG
 GATAGCAGCAGCTGGTGGGACTACTACTACAACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC
 CACGGTCACCGTCTCCTCA
- B. Mab 2345 라이트 체인
- GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCTGCAAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTACTTAACCTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTCAGCAGTATGGTCGCTCACCTCCGATCACCTTC
 GGCCAAGGACACGACTGGAGATTAAACGA

도면26

A. Mab 2349 헤비 체인

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTTATTATTATGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTAC
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTTACTATCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGCG
GATAGCAGCAGCTGGAACGGACTACTACTACAACGGTTTGGCCGTCTGGGGCCAAGGGAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

B. Mab 2349 라이트 체인

GGAAATTGTGTTGACGCACTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACT
TTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAGAGTGGTAGCAGCACCTACTTAGCTGGTACCAGCAGAAAC
CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG
ACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
CTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTATGGTAGGTACCTCCGATCACCTTCG
GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA

도면27

A. Mab 6.1.2 헤비 체인

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGC
CAGCACCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCAAC
TACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTGGACACGTCTAAGAACCAGTTCT
TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTACGAGAGAT
CGGGACTATGATAGTACCGGGGATTACTACTCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

B. Mab 6.1.2 라이트 체인

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGAAATGATTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATTTTGCAACTTTTACTGTCTACAGCATAATAGTCTTCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGACCAAGGTGGAGATCAAACGA

도면28

4. Mab 6.4.1 헤비 체인

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAGGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTC
ACCTGCACGTGCTCTGGTGGCTCCATCAGTACTTACTACTGGAACTGGATCCGGCAGCCC
GCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTATCTATAACAGTGGGAGCACCAACTACAA
CCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGGC
TACAGTAACCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

5. Mab 6.4.1 라이트 체인

GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTCATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCT
TGGTACCAGCAGAAACCTGGACAGCCTCCTAAGCTG
CTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGAATCAGTGGCAGCGGG
TCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTAT
TACTGTCAACAACATTATAATACTCCACTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATC
AAACGA

서열목록

<110> Genentech, Inc.
<120> AGONIST ANTI-TRK-C MONOCLONAL ANTIBODIES
<130> IF02P058/US
<150> US 60/238,319
<151> 2000-10-05
<160> 89
<170> Kopatent In 1.71
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Murine
<400> 1
Phe Trp Ile Glu Trp Val Lys
1 5
<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Murine
<400> 2
Tyr Trp Met His Trp Val Lys
1 5
<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Ile Ser Thr Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Ser Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 6
 Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10
 15 Gly
 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 7
 Glu Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 12

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 12
 Lys Asn Arg Asn Tyr Tyr Gly Asn Tyr Val Val
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 13
 Lys Tyr Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Arg Ser Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Asp Arg Asp Tyr Asp Ser Thr Gly Asp Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Asp Gly Gly Tyr Ser Asn Pro Phe Asp
 1 5
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Glu Arg Ile Ala Ala Ala Gly Ala Asp Tyr Tyr Tyr Asn Gly Leu Asp
 1 5 10 15
 Val
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Glu Arg Ile Ala Ala Ala Gly Thr Asp Tyr Tyr Tyr Asn Gly Leu Ala
 1 5 10 15
 Val
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 18
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15
 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 19
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 20
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

 Ala
 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Arg Ala Ser Gln Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 25
 Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 26

 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 26
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 27
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Murine
 <400> 27
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5
 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 31
 Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser
 1 5
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 32
 Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400>
 > 33
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Leu Gln His Asn Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 35
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Pro Ile
 Thr
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murine
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa = F or Y
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa = I or M
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (4)
 <223> Xaa = E or H
 <400> 37
 Xaa Trp Xaa Xaa Trp Val Lys
 1 5
 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Murine
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa = L or Y
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> Xaa = G or S
 <220>

 <221> UNSURE
 <222> (6)
 <223> Xaa = S or N
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (7)
 <223> Xaa = D or G
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (8)
 <223> Xaa = N or R
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (17)
 <223> Xaa = G or S
 <400> 38
 Glu Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Xaa
 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa = S or I
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (2)
 <223> Xaa = G or S
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa = G, T or Y
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (7)
 <223> Xaa = S or N
 <400> 39
 Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Trp Xaa
 1 5
 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa = Y or R
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa = Y or F
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (4)
 <223> Xaa = Y or T
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (8)
 <223> Xaa = S or R
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (10)
 <223> Xaa = N or Y
 <400> 40

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Ser Xaa Thr Xaa Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (8)
 <223> Xaa = A or T
 <220>

<221> UNSURE
 <222> (16)
 <223> Xaa = D or A
 <400> 41

Glu Arg Ile Ala Ala Ala Gly Xaa Asp Tyr Tyr Tyr Asn Gly Leu Xaa
 1 5 10 15

Val
 <210> 42
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 42

Asn Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn
 20 25 30

Phe Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys

50 55 60
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Lys Asn Arg Asn Tyr Tyr Gly Asn Tyr Val Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Cys
 115 120
 <210> 43
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 43
 Asn Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn
 20 25 30
 Phe Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Lys Asn Arg Asn Tyr Tyr Gly Asn Tyr Val Val Trp Gly
 100 105 110
 Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys
 115 120
 <210> 44
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 44
 Asn Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
 20 25 30
 Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys
 50 55 60

Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Lys Tyr Tyr Tyr Gly Asn Ser Tyr Arg Ser Trp Tyr Phe
100 105 110

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys
115 120 125

<210> 45
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 45

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
20 25 30

Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Asp Tyr Asp Ser Thr Gly Asp Tyr Tyr Ser
100 105 110

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

Ser Cys
130
<210> 46
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 46

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

Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr
20 25 30

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

Ile Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Asn Pro Phe Asp Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Cys
 115
 <210> 47
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 20 25 30
 Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Glu Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ile Ala Ala Ala Gly Ala Asp Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Asn Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Cys
 <210> 48
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Asn Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro

50 55 60
 Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Ile Ala Ala Ala Gly Thr Asp Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Asn Gly Leu Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Cys
 <210> 49
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 49
 Asn Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr
 20 25 30
 Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile
 85 90 95
 Arg Glu Leu Thr Arg Ser Ala Arg Gly Gln Ser Trp Lys Lys Arg Cys
 100 105 110
 <210> 50
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Murine
 <400> 50
 Asn Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 20 25 30
 Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Cys
100 105

<210> 51

<211> 114

<212> PRT

<213> Murine

<400> 51

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

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

Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Lys Glu Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
100 105 110

Arg Cys

<210> 52

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys
 100 105 110
 <210> 53
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Asn Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 35 40 45
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
 50 55 60
 Val Pro Asp Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 85 90 95
 Gln His Tyr Asn Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 100 105 110
 Ile Lys Arg Cys
 115
 <210> 54
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser
 85 90 95
 Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Cys
 100 105 110
 <210> 55
 <211> 112

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 Asn Gly Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Gly Ser Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser
 85 90 95
 Pro Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Cys
 100 105 110
 <210> 56
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Cys Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro Asp Asp Gly Asn Leu Phe Pro Leu Leu Glu Gly Gln Asp Ser Gly
 20 25 30
 Asn Ser Asn Gly Asn Ala Asn Ile Asn Ile Thr Asp Ile Ser Arg Asn
 35 40 45
 Ile Thr Ser Ile His Ile Glu Asn Trp Arg Ser Leu His Thr Leu Asn
 50 55 60
 Ala Val Asp Met Glu Leu Tyr Thr Gly Leu Gln Lys Leu Thr Ile Lys
 65 70 75 80
 Asn Ser Gly Leu Arg Ser Ile Gln Pro Arg Ala Phe Ala Lys Asn Pro
 85 90 95
 His Leu Arg Tyr Ile Asn Leu Ser Ser Asn Arg Leu Thr Thr Leu Ser
 100 105 110
 Trp Gln Leu Phe Gln Thr Leu Ser Leu Arg Glu Leu Gln Leu Glu Gln
 115 120 125
 Asn Phe Phe Asn Cys Ser Cys Asp Ile Arg Trp Met Gln Leu Trp Gln
 130 135 140
 Glu Gln Gly Glu Ala Lys Leu Asn Ser Gln Asn Leu Tyr Cys Ile Asn

145	150	155	160
Ala Asp Gly Ser Gln Leu Pro Leu Phe Arg Met Asn Ile Ser Gln Cys	165	170	175
Asp Leu Pro Glu Ile Ser Val Ser His Val Asn Leu Thr Val Arg Glu	180	185	190
Gly Asp Asn Ala Val Ile Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Pro Leu Pro	195	200	205
Asp Val Asp Trp Ile Val Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asn Thr His Gln	210	215	220
Thr Asn Leu Asn Trp Thr Asn Val His Ala Ile Asn Leu Thr Leu Val	225	230	235
Asn Val Thr Ser Glu Asp Asn Gly Phe Thr Leu Thr Cys Ile Ala Glu	245	250	255
Asn Val Val Gly Met Ser Asn Ala Ser Val Ala Leu Thr Val Tyr Tyr	260	265	270
Pro Pro Arg Val Val Ser Leu Glu Glu Pro Glu Leu Arg Leu Glu His	275	280	285
Cys Ile Glu Phe Val Val Arg Gly Asn Pro Pro Pro Thr Leu His Trp	290	295	300
Leu His Asn Gly Gln Pro Leu Arg Glu Ser Lys Ile Ile His Val Glu	305	310	315
Tyr Tyr Gln Glu Gly Glu Ile Ser Glu Gly Cys Leu Leu Phe Asn Lys	325	330	335
Pro Thr His Tyr Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Pro	340	345	350
Leu Gly Thr Ala Asn Gln Thr Ile Asn Gly His Phe Leu Lys Glu Pro	355	360	365
Phe Pro Glu Ser Thr Asp Asn Phe Ile Leu Phe Asp Glu Val Ser Pro	370	375	380
Thr Pro Pro Ile Thr Val Thr His Lys Pro Glu Glu Asp Thr Phe Gly	385	390	395
Val Ser Ile Ala Val Gly Leu Ala Ala Phe Ala Cys Val Leu Leu Val	405	410	415
Val Leu Phe Val Met Ile Asn Lys Tyr Gly Arg Arg Ser Lys Phe Gly	420	425	430
Met Lys Gly Pro Val Ala Val Ile Ser Gly Glu Glu Asp Ser Ala Ser	435	440	445
Pro Leu His His Ile Asn His Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ser Leu Asp	450	455	460

Ala Gly Pro Asp Thr Val Val Ile Gly Met Thr Arg Ile Pro Val Ile
465 470 475 480

Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Arg Gln Gly His Asn Cys His Lys Pro Asp
485 490 495

Thr Tyr Val Gln His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu Lys Arg Glu
500 505 510

Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn
515 520 525

Leu Ser Pro Thr Lys Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys Ala Leu Lys
530 535 540

Asp Pro Thr Leu Ala Ala Arg Lys Asp Phe Gln Arg Glu Ala Glu Leu
545 550 555 560

Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys
565 570 575

Gly Asp Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly
580 585 590

Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Met Ile Leu
595 600 605

Val Asp Gly Gln Pro Arg Gln Ala Lys Gly Glu Leu Gly Leu Ser Gln
610 615 620

Met Leu His Ile Ala Ser Gln Ile Ala Ser Gly Met Val Tyr Leu Ala
625 630 635 640

Ser Gln His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val
645 650 655

Gly Ala Asn Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp
660 665 670

Val Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Leu Phe Asn Pro Ser Gly Asn Asp
675 680 685

Phe Cys Ile Trp Cys Glu Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg
690 695 700

Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser
705 710 715 720

Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Ile Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly
725 730 735

Lys Gln Pro Trp Phe Gln Leu Ser Asn Thr Glu Val Ile Glu Cys Ile
740 745 750

Thr Gln Gly Arg Val Leu Glu Arg Pro Arg Val Cys Pro Lys Glu Val
755 760 765

Tyr Asp Val Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro Gln Gln Arg Leu

770	775	780
Asn Ile Lys Glu Ile Tyr Lys Ile Leu His Ala Leu Gly Lys Ala Thr		
785	790	795 800
Pro Ile Tyr Leu Asp Ile Leu Gly		
805		
<210> 57		
<211> 2607		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 57		
tgccctgcaa attgtgtctg cagcaagact gagatcaatt gccggcggcc ggacgatggg	60	
aacctcttcc cctccttgga agggcaggat tcagggaaca gcaatgggaa cgccaatc	120	
aacatcacgg acatctcaag gaatatcact tccatacaca tagagaactg gcgcagctctt	180	
cacacgtca acgccgtgga catggagctc tacaccggac ttcaaaagct gacctcaag	240	
aactcaggac ttccggagcat tcagcccaga gcctttgcca agaaccacca		
tttgcgttat 300		
ataaacctgt caagtaaccg gctcaccaca ctctcgtggc agctcttcca gacgctgagt	360	
cttcgggaat tgcagttgga gcagaacttt ttcaactgca gctgtgacat ccgctggatg	420	
cagctctggc aggagcaggg ggaggccaag ctcaacagcc agaacctcta ctgcatcaat	480	
gctgatggct ccagcttcc tctcttccgc atgaacatca gtcagtgtga ccttctgag	540	
atcagctga gccacgtcaa cctgaccgta cgagagggtg acaatgctgt tatcacttgc	600	
aatggctctg gatcaccctt tctgatgtg gactggatag tcaactgggt gcagtcac	660	
aacactcacc agaccaatct		
gaactggacc aatgttcatg ccatcaactt gacgctggtg 720		
aatgtgacga gtgaggacaa tggcttcacc ctgacgtgca ttgcagagaa cgtggtgggc	780	
atgagcaatg ccagtgtgc cctcactgtc tactatcccc cacgtgtggt gaggctggag	840	
gagcctgagc tgcgcctgga gcaactgcat gagtttgggg tgcgtggcaa cccccacca	900	
acgtgcaact ggctgcacaa tgggcagcct ctgcgggagt ccaagatcat ccatgtgaa	960	
tactaccaag agggagagat ttccgagggc tgcctgctct tcaacaagcc caccactac	1020	
aacaatggca actataacct cattgceaaa aaccactgg gcacagccaa ccagaccatc		
1080		
aatggccact tctcaagga gccctttcca gagagcacgg ataactttat cttgtttgac	1140	
gaagtgagtc ccacacctcc taccactgtg acccacaac cagaagaaga cacttttggg	1200	
gtatccatag cagtgtgact tgcctgtttt gcctgtgtcc tgttgggtgt tctcttcgtc	1260	
atgatcaaca aatattgtcg acggtccaaa ttgggaatga agggccccgt ggctgtcatc	1320	
agtgtgagg aggactcagc cagccactg caccacatca accacggcat caccagccc	1380	
tcgtcactgg atgccgggcc cgacactgtg gtcatgtgca tgactcgcac cctgtcatt	1440	
gagaaccccc agtacttccg tcaggacac		
aactgccaca agccggacac gtatgtgcag 1500		
cacattaaga ggagagacat cgtgtgaag cgagaactgg gtgagggagc ctttgaaag	1560	
gtcttctctg ccgagtgtca caacctcagc ccgaccaagg acaagatgct tgtggctgtg	1620	
aaggccctga aggatccacc cctggctgcc cggaggatt tccagaggga ggccgagctg	1680	
ctaccaacc tgcagcatga gcacattgtc aagtctctat gagtgtgcgg cgatggggac	1740	
cccctcatca tggctcttga atacatgaag catggagacc tgaataagtt cctcagggcc	1800	
catgggccag atgcaatgat ccttgtggat ggacagccac gccaggccaa gggtgagctg	1860	
gggctctccc aaatgtcca cattgccagt cagatgcct cgggtatggt gtacctggcc	1920	
tcccagcact ttgtgcaccg agacctggcc accaggaact gcctggttgg agcgaatctg	1980	
ctagtgaaga ttggggactt cgcatgtcc agagatgtct acagcacgga ttattacagg	2040	
ctctttaate catctggaaa tgatttttgt atatggtgtg aggtgggagg acacaccatg	2100	
ctccccattc gctggatgcc tctgaaagc atcatgtacc ggaagtccac tacagagagt	2160	
gatgtatgga gcttcggggg gatcctctgg gagatcttca cctatggaaa gcagccatgg	2220	
ttccaactct caaacacgga ggtcattgag tgcattaccc		
aaggtcgtgt tttggagcgg 2280		
ccccgagtct gcccacaaaga ggtgtacgat gtcagtctgg ggtgctggca gagggaaacca	2340	

cagcagcggg tgaacatcaa ggagatctac aaaatcctcc atgctttggg gaaggccacc 2400
ccaatctacc tggacattct tggctagtgg tggctggtgg tcatgaattc atactctgtt 2460
gcctctcttc tccctgcctc acatctccct tccacctcac aactccttcc atccttgact 2520
gaagcgaaca tcttcatata aactcaagtg cctgctacac atacaacact gaaaaaagga 2580
aaaaaaaaga aaaaaaaaaa aaaccgc 2607

<210
> 58
<211> 360
<212> DNA
<213> Murine
<400> 58
caggtccaac tgcagcagtc tggggctgag ctgatgcagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcctgcaagt ctactggcta cacattcagt aacttctgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gcagtgataa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagaaagaat 300
cgtaactact atggtaacta cgttgtatgg ggccaaggga ctctggtcac
tgtctctgca 360
360
<210> 59
<211> 330
<212> DNA
<213> Murine
<400> 59
gacattgtga tgaccagtc tcttgccttc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
atctcataca ggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcaactggaac 120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatecaa cctagaatct 180
gggggtccctg ccaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcacct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc
tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacacgt 300
tcggctcggg gacaaagttg gaaaaaacgg 330
<210> 60
<211> 360
<212> DNA
<213> Murine
<400> 60
caggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgcagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcctgcaagt ctactggcta cacattcagt aacttctgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gcagtgataa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac
240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagaaagaat 300
cgtaactact atggtaacta cgttgtctgg ggcgcaggca ccactctcac agtctcctca 360
360
<210> 61
<211> 321
<212> DNA
<213> Murine
<400> 61
caaattgtgc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
ataacctgca gtgccagtc aagtgtagt tacatgtact gggtccagca gaagccaggc 120
acttctccca aactctggat ttatagtaca
tccaacctgg ctcttgaggt cctgtctgc 180
ttcagtgga gtggatctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggtgaa 240
gatgtgcca ctattactg ccagcaaagg agtagttacc cgctcacgtt cgggtgctggg 300
accaagctgg aactaaaacg g 321
<210> 62

<211> 372
 <212> DNA
 <213> Murine
 <400> 62
 caggtccagc tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg ctcttggtta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120

 cctggacaag gccttgagtg gattggagag atttatccta gcaacggctc tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaaaatat 300
 tactacggta atagctatcg ttcttggtac ttcatgtctt ggggcgcagg caccactctc 360
 acagtctcct ca 372
 <210> 63
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Murine
 <400> 63
 gacattgtgc tgacccagtc tccagcttct ttggtgtgt
 ctctaggga gaggccacc 60
 atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactggttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
 cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctcgg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatg aaacgg 336
 <210> 64
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 caggtgcagc
 tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag aaaagggcct ggagtggatt gggtacatct ttacagtgg gaggacctac 180
 tacaaccctg cctcaagag tgcagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactctgt gactgccgcg gacacggcgg tgtattactg tgcgagagag 300
 cggatagcag cagctggtgc ggactactac tacaacggtt tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtea ccgtctctc a 381

 <210> 65
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtcga gagtgttagc agcaactact taacctggtt ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgagtgta ttactgtcag cagtatggtc gctcacctcc gatcaccttc 300
 ggccaagga cagactgga gattaaacga 330

 <210> 66
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggttatt attatggag ctggatccgc 120

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcacctac 180
tacaaccgt cctcaagag tcgacttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagag 300
cggatagcag cagctggaac ggactactac tacaacggtt
tggccgtctg gggccaaggg 360
accacgtca ccgtctctc a 381
<210> 67
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 67
ggaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttctg ctccagggga aagagccact 60
ttctctctga gggccagtc gagtggttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt
ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta ggtcacctcc gatcaccttc 300
ggccaagggg cagcactgga gattaaacga 330
<210> 68
<211> 384
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 68
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcaccaac 180
tacaaccgt cctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa
gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tacgagagat 300
cgggactatg atagtaccgg ggattactac tcctactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384
<210> 69
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 69
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgctt
gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttttta ctgtctacag cataatagtc ttccgctcac tttcgcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324
<210> 70
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 70
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgagge cttcgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt acttactact ggaactggat ccggcagccc
120
gccgggaagg gactggagtg gattgggcgt atctatacca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagttagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gtctctcctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgggggc 300
tacagtaacc cttttgacta ctggggccag ggaaccttgg tcaccgtctc ctca 354
<210> 71
<211> 342

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 gatatccaga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtcagcca gagtgtttca
 tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tgggtaccagc agaaacctgg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tcctgaccg aatcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaacaaca ttataatact 300
 ccactcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaac ga 342
 <210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 72
 cagcagaaca aggtcctgga a 21
 <210> 73
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 73
 agcgggaagg ctctgagtg 19
 <210> 74
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 74
 agctgttggt gctgcgccag aa 22
 <210> 75
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 75
 tcattgaag acccattga c 21
 <210> 76
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 76
 gccgacattg gctgtgaac 19
 <210> 77
 <211> 24

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	77	
	aggatgactg ggcagcttgg tcca	24
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	78	
	cagcccactg caccatatca	20
<210>	79	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	79	
	ctgtatccgg cccagcat	18
<210>	80	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	80	
	ccatggcatc actacacctt catcgct	27
<210>	81	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	81	
	tgggaaaatt gagatggcag a	21
<210>	82	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	82	
	gctgcctgaa gcacaaaagg	20
<210>	83	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	83	
	cgcgatcct gccaacgaa gaga	24
<210>	84	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	84	
	gacaccactc ttctggaaaa tgc	23
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	85	
	ttgccaaacc aacacctacc a	21
<210>	86	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	86	
	atcggacacc acctgtaggg aggacc	26
<210>	87	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	87	
	cagtggcaaa gtggagattg t	21
<210>	88	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	
<400>	88	
	aatttgccgt gattggagtc	20
<210>	89	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Synthetic oligonucleotide	

<400> 89
ccatcaacga ccccttcatt gacctc

26