

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07K 16/30

(11) 공개번호 10-2005-0037478
(43) 공개일자 2005년04월22일

(21) 출원번호	10-2004-7005716		
(22) 출원일자	2004년04월17일		
번역문 제출일자	2004년04월17일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2002/033470	(87) 국제공개번호	WO 2003/033674
국제출원출원일자	2002년10월18일	국제공개일자	2003년04월24일

(30) 우선권주장 60/343,657 2001년10월18일 미국(US)
60/377,716 2002년05월02일 미국(US)

(71) 출원인 바이엘 파마슈티칼스 코포레이션
미국 06516 코넥티커트주 웨스트 헤이븐 모건 레인 400
(72) 발명자
다케우찌, 도시히코
미국94611캘리포니아주오클랜드아스코트드라이브6529
두보이스-스트링펠로우, 나탈리
미국94707캘리포니아주버클리더알라메다1008
머피, 존, 이.
미국94618캘리포니아주오클랜드하보드코트49
링켄버거, 줄리
미국94556캘리포니아주모라가리임보울바드299

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) MN 결합 및 세포 부착-증화 활성을 갖는 인간 항체

명세서

본 출원은 2001년 10월 18일에 출원된 동시계속 중인 가출원 일련 번호 제 60/343657 호 및 2002년 5월 3일에 출원된 동시계속 중인 가출원 일련 번호 제 60/377716 호를 우선권으로 주장하며 참조문헌으로 삽입한다.

본 출원은 출원의 일부로 컴팩트 디스크에 저장된 서열 목록을 참조로 삽입한다. 본 서열 목록은 "MN 결합 및 세포 부착-증화 활성을 갖는 인간 항체"라는 제목의 1.44 MB의 ASCII 파일이며, 2002년 10월 3일에 생성되었다.

기술분야

본 발명은 MN 결합 인간 항체에 관한 것이다.

배경기술

MN은 다수의 임상 암종 표본에서 발견되나 상응하는 기관의 정상 조직에는 없는 세포 표면 단백질이다. MN cDNA는 클로닝되었으며 (Pastorek, J. et al, Oncogene (1994), 9, 2877-2888), 예상되는 단백질은 신호 펩티드, 프로테오글리칸-관련 서열, 탄산 탈수 효소 도메인, 막투과 부분, 및 짧은 세포내 꼬리로 이루어진다. MN은 위 및 담관 점막에서 (Liao, S.Y., et al, Am J Pathol (1994), 145, 598-609), 소장에 위치한 고도로 증식하는 정상 세포에서 (Saarnio, J. et al, J Histochem Cytochem (1998) 46, 497-504) 정상적으로 발현된다. 그러나, MN은 100 %의 신장 세포 암종 (Liao, S.Y., Cancer Res (1997) 57, 2827-2831), 100 %의 식도 암종 (Turner, J.R. Hum Pathol, (1997) 28, 740-744), 90 % 이상의 자궁경부 암종 (Liao, S.Y., et al, Am J Pathol (1994), 145, 598-609), 76 %의 악성 결장 암종 (Saarnio, J. et al, Am J Pathol (1998) 153, 279-285), 80 %의 비-소세포 폐 암종 (Vermylen, P. et al, Eur Respir J (1999), 14, 806-811), 및 48 %의 유방암 (Chia, S.K. et al, J. Clin. Oncol. (2001) 19, 3660-3668)에서 정규 장소 밖에서 발현된다.

MN에 대한 항체는 설명되었다. 마우스 모노클로날 항체 G250은 마우스 모델에서 신장 세포 암종 종양 크기를 감소시키는데 효과적이다 (van Dijk, J. et al, Int J. Cancer (1994) 56, 262-268). 이 항체는 이어서 인간 Fc 영역 및 마우스 가변

성 영역을 함유하는 키메릭 항체로 제조되었다. 이 키메릭 G250 항체는 단지 66 %만이 인간 유래이므로 유사한 완전 인간 항체에 비해서 인간에서 면역원성의 기회가 더 크게 된다. 그러므로, 33 % 마우스 항체로 치료하면 인간의 항-마우스 면역원성 반응을 일으킬 수 있고 항암 치료 효과가 없게 된다. 키메릭 항체의 이러한 문제는 MN에 대한 완전 인간 항체의 필요성을 확실히 제기한다.

발명의 간단한 요약

본 발명은 프로테오글리칸 도메인 중에 GEEDLP 반복부분을 표적으로 하는 모노클로날 인간 MN 항체 또는 MN 항체 단편으로 구성된다. MN 세포 표면 단백질의 프로테오글리칸 도메인은, 이러한 동일한 GEEDLP 반복부분을 4 개 함유한다. 목적 에피토프에 대한 결합은 경쟁 ELISA로 입증되며, ELISA 신호는 이 반복부분을 함유하는 웨티드 (PGEEDLPGEEDLP)와 함께 인큐베이션함으로써 약해질 수 있다. 이러한 결합의 억제는 또한 비아코어 검정법 (Biacore assays)을 사용하여 입증될 수 있으며, 여기서 고정된 MN 또는 프로테오글리칸 웨티드에 대한 목적 항체의 결합은 웨티드 반복부분에 의해서 억제될 수 있다. 웨티드 반복부분에 결합하는 것 이외에, 인간 항-MN 항체는 CGL-1 세포의 MN 코팅된 플라스틱 플레이트에 대한 세포 부착을 억제할 수 있다. 인간 항-MN 항체는 팩스 (FACS) 및 면역조직화학적 방법으로 암 세포 및 종양의 MN 발현을 진단하고 정량하는데 사용되어 왔다. 또한 예를 들어, 인간 항-MN IgG1은 항체-의존 성 세포-매개 세포독성을 통해 종양 세포 용해를 매개한다. 그러므로, 이러한 항체는 MN이 상향조절되어 있는 암의 치료에 유용할 것이며 MN이 상향조절되어 있는 암의 진단에 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1 FACS로 측정한 PC3mm2 인간 전립선 암 세포의 MN 발현

도 2 서열 번호 1번에서 서열 번호 83번까지의 서열 동정

도 3 Fab 디스플레이 벡터인 pMORPH18 Fab 1

도 4 pMORPHx9_Fab1_FS의 벡터 지도

도 5 항-MN 항체 MN-3으로의 세포 부착 차단의 영상

도 6 MN 항체 1에서 39까지의 항체 결합 쌍. 비아코어 결합 친화력이 표시되었다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 MN에 결합하는 인간 항체를 제공한다. 이러한 항체는 다양한 치료 및 진단의 목적으로 유용하다. 이러한 목적은 예를 들어 이를 포함한다.

인간 MN 항체의 특징

본원에서 사용된 "항체"는 원상태의 면역글로불린 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA), 및 그들의 단편, 예를 들어 인간 MN 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab, F(ab')₂, scFv 및 Fv를 포함한다. 면역화학적 측정법에 사용될 경우, MN에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 단백질에서 제공되는 검출 신호보다 5-, 10- 또는 20-배 이상 높은 검출 신호를 제공한다. 바람직하게는, 인간 MN에 특이적으로 결합하는 항체는 면역화학적 측정법에서 다른 단백질을 검출하지 않으며 용액으로부터 MN을 면역침전시킬 수 있다.

본 명세서에서 VL2 및(또는) VL3에 대한 언급은 경쇄 (light chain)의 람다 (λ)군을 표시하려는 의도이다.

MN에 결합하는 인간 항체의 K_d 는, 실-시간 이분자 상호작용 분석법 (Bimolecular Interaction Analysis(BIA))과 같은 기술을 포함하는 당업계에서 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다 (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991 및 Szabo et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995). BIA는 임의의 상호작용자 (예를 들어, BIACoreTM)를 표지하지 않고, 실시간으로 생물특이적 상호작용을 연구하는 기술이다. 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance (SPR))에서 광학 현상의 변화가 생물학적 분자 간의 실-시간 반응의 표지로 사용될 수 있다.

BIACoreTM 검정법에서, 본 발명의 인간 항체는 약 0.6 nM (6×10^{-10} M) 내지 약 1800 nM (1.8×10^{-6} M) 범위의 K_d 로 인간 MN에 특이적으로 결합한다 (도 6 참조). 본 발명의 보다 바람직한 인간 항체는 대략 0.6 nM 내지 약 90 nM의 K_d 로 인간 MN에 특이적으로 결합하며, 본 발명의 가장 바람직한 항체는 대략 4 nM의 K_d 로 인간 MN 단백질에 결합한다.

바람직하게는, 계획된 본 발명의 항체는 4개의 동일 반복부분을 함유하는 프로테오글리칸 도메인 내의 GEEDLP 반복부분에 결합할 것이다. 목적 에피토프에 대한 결합은 경쟁 ELISA (Zavada et al, Br. J. of Cancer 82, 1808-1813, 2000)와 같은 기술을 포함하여 당업계에서 알려진 임의의 방법으로 입증될 수 있는데, 여기서 ELISA 신호는 본 반복 부분 (PGEEDLPGEEDLP)을 함유하는 웨티드와 함께 인큐베이션하면 약해질 수 있지만, 역시 프로테오글리칸 도메인 내에 존재하는 유사한 웨티드 (PSEEDSPREEDP)에 의해서는 억제되지 않는다. 이러한 결합 억제 패턴은 또한, BIACoreTM 기술을 사용하여 입증될 수 있는데, 여기서 고정된 MN 또는 프로테오글리칸 웨티드에 대한 목적 항체의 결합은 웨티드 반복구간과의 배양에 의해서 억제될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 항체는 또한, MN 코팅된 플라스틱 플레이트 ELISA에 대한 MN 발현 세포의 세포 부착을 억제할 수 있다 (Zavada et al, Br. J. of Cancer 82, 1808-1813, 2000).

본 발명은 MN 단백질에 대한 완전 인간 항체를 생성하기 위해 모르포시스 파지-항체 기술 (Morphosys phage-antibody technology)을 사용한다. 모르포시스 라이브러리는 인간 백본 (backbone)에 기초하여, 면역원성의 가능성을 현저히 감소 시킨다.

상기한 MN 결합 및 세포 부착 중화 특성을 갖는 다수의 인간 항체는 모르포시스 HuCAL Fab 라이브러리 (MorphoSys HuCAL Fab library)의 스크리닝에 의해서 동정되었다. HuCAL 라이브러리에서 조합된 CDR 카세트는, 위치 95 내지 102에 미치는, 5 내지 28의 아미노산 잔기 범위의 길이 분포를 얻도록 설계되었다 (Knappik et al., J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000). 본 발명의 일부 실시태양에서, 인간 항체의 VH3-CDR3 구역은 도 2의 서열 번호 61-80에서 나타나는 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 다른 실시태양에서, 인간 MN 항체의 VLA1-CDR3, VLA2-CDR3 및 VLA2-CDR1 구역은, 도 2의 서열 번호 48-60에서 나타나는 최적화된 VH3-CDR1과 함께 도 2의 서열 번호 81-89에서 나타낸 아미노산 서열을 가진다. MN 결합 및 세포 부착-중화 활성을 갖는 인간 항체는 표 1 및 2에 도시되었다; 이러한 항체의 가변 구역 (CDR3 뿐)은 표 1 및 2에 도시되었다.

인간 항체 수득

상기한 MN 결합 및 세포 부착-중화 활성을 갖는 인간 항체는 다음과 같이 모르포시스 HuCAL 라이브러리로부터 동정될 수 있다. 인간 MN을 마이크로타이터 플레이트에 코팅하고, 모르포시스 HuCAL-Fab 파지 라이브러리와 인큐베이션하였다 (실시예 1). 이러한 MN과 결합하지 않은 파지-연결된 Fab는 판으로부터 씻겨 나갈 수 있고, MN에 단단하게 결합한 파지만이 남는다. 결합한 파지는 pH의 변화에 의해서 용출될 수 있고, 대장균 (*E. coli*) 숙주에 감염시켜서 증폭시킬 수 있다. 이 패닝 과정 (panning process)은 MN에 단단하게 결합하는 파지-연결된 항체의 집단을 풍부하게 하기 위해서 한번 또는 두번 반복될 수 있다. 풍부한 풀에서 나온 Fab는 그 다음 발현되고, 정제되고, ELISA 측정법으로 스크리닝된다. 동정된 히트 (hits)는 그 후 BIAcoreTM 검정법을 사용하여 결합을 측정하고, 이러한 히트는 상기한대로 세포 부착 측정법에서 더 옥 스크리닝될 수 있다.

HuCAL-Fab 라이브러리에서의 초기 패닝은 또한 1 라운드에서는 항원으로서 MN으로, 2 라운드에서는 BSA 또는 트랜스페린과 같은 담체 단백질과 융합된 MN 웨티드로, 3 라운드에서는 다시 MN 항원으로 수행할 수 있다. 패닝에 사용될 수 있는 인간 MN 웨티드는 인간 MN 서열 번호 45-47을 포함한다. 이러한 웨티드 서열은 세포 부착에 관계된다고 생각되는 MN 프로테오글리칸 서열로부터 유래된다.

별법으로, 패닝은 항원으로서 MN 발현 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들면, MN 항원이 트랜스펙션된 세포는 비오틴으로 표지할 수 있다. 다음으로 이러한 트랜스펙션된 세포를 표지되지 않고 MN이 트랜스펙션되지 않은 세포와, 표지된 것: 표지되지 않은 것의 비율이 1:10이 되도록 혼합한다. 파지 라이브러리는 세포에 첨가되고, 비오틴화된 MN-포함 세포는 자석에 결합하는 스트렙타비딘-결합된 자성 비드에 의해서 포획된다. 비특이적 파지는 씻겨 나가고, MN-포함 세포는 자기장을 제거함으로써 특이적으로 용출된다. 이러한 특이적으로 결합된 파지는 세포 패닝의 추가의 라운드에서 증폭될 수 있으며, 또는 웨티드 및(또는) 단백질 패닝으로 대체될 수 있다.

상세한 스크리닝 과정은 아래의 구체적인 예에서 설명한다. 고도 활성의 특이적인 항체 또는 항체 단편의 다른 선택 방법은, 당업자에게 예상될 수 있으며 인간 MN 항체를 동정하는데 사용될 수 있다.

상기한 특성을 가진 인간 항체는 또한 항체-코드하는 발현 구조체가 트랜스펙션된 숙주 세포를 포함하는, 항체를 발현하는 임의의 세포로부터 정제할 수 있다. 숙주 세포는 인간 항체가 발현되는 조건에서 배양한다. 정제된 인간 항체를, 세포 속에서 항체와 정상적으로 관련되어 있는 다른 물질, 예를 들면 특정 단백질, 탄수화물, 또는 지질로부터 당업계에서 잘 알려진 방법으로 분리한다. 상기 방법은, 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography), 황산 암모늄 분류법 (ammonium sulfate fractionation), 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 및 제조용 젤 전기영동 (preparative gel electrophoresis)을 포함하지만, 이들에만 한정되지 않는다. 정제된 인간 항체의 제조는 80 % 이상; 바람직하게는 90 %, 95 %, 또는 99 % 순도이다. 제조의 순도는 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동과 같이 당업계에서 공지된 임의의 방법으로 측정할 수 있다. 본 발명의 정제된 인간 항체의 제조는, 상기한 MN 결합 및 중화 특성을 갖는 인간 항체의 한 유형 이상을 함유할 수 있다.

별법으로, 인간 항체는 아미노산을 합성하는 화학적 방법, 예를 들면 고체-상 기술을 사용한 직접적 웨티드 합성법을 사용하여 제조할 수 있다 (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Roberge et al., Science 269, 202-204, 1995). 단백질 합성은 수동 기술 또는 자동조작을 사용해서 수행할 수 있다. 자동화된 합성법은 예를 들어, 어플라이드 바이오시스템즈 431A 웨티드 합성기 (Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer))로 이를 수 있다. 임의로는, 인간 항체의 단편은 개별적으로 합성될 수 있고, 화학적 방법을 결합하여 전체-길이의 분자를 제조할 수 있다.

새로이 합성한 분자는 실질적으로 분취용 고성능 액체 크로마토그래피로 정제할 수 있다 (예를 들면, Creighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). 합성 폴리웨티드의 조성은, 아미노산 분석 또는 시퀀싱으로 확인할 수 있다 (예를 들면, 애드만 분해를 사용).

인간 항체의 치료적 유용성의 평가

특정 항체가 예로써 암의 치료에 치료적으로 유용할 수 있는지 평가하기 위해서, 항체를 마우스 이종이식 중앙 모델에서 생체내 시험할 수 있다. 필요하다면, 치료적 평가 전에 인간 Fab MN 항체를 IgG₁ 항체로 전환할 수 있다. 이러한 전환은 실시예 5에서 기술되고, 치료적 모델의 예는 실시예 9에서 상세화되었다. 유용성은 또한 실시예 13에서 기술한 바와 같이, 항체 의존적 세포-매개 세포독성 검정법을 사용하여 시험할 수 있다.

인간 MN 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드

본 발명은 또한, 인간 MN 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 치료적 또는 진단 용도로 다양한 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

VH-CDR3 구역을 코드하는데 사용될 수 있는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 14-33에서 나타난다. VL-CDR3 구역을 코드하는데 사용될 수 있는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 34-44에서 나타난다. 모르포시스 HuCAL 라이브러리로부터 단리된, 본 발명의 인간 항체의 중쇄 및 경쇄를 코드하는 폴리뉴클레오티드는 도 2에 나타난다. 추가적인 최적화된 VH3-CDR1 서열은 서열 번호 1-13에서 나타난다.

숙주 세포 내에 존재하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 막 성분, 단백질 및 지질과 같은 다른 세포 성분 없이 단리할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 세포로부터 제조되고 표준 혼산 정제 기술을 사용해 분리할 수 있으며, 또는 종합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 증폭 기술을 이용하거나 자동화된 합성기를 이용해서 합성할 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 단리 방법은 일반적이며 당업계에 공지되었다. 폴리뉴클레오티드를 얻는 임의의 상기 기술은, 본 발명의 항체를 코드하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 얻는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 제한 효소 및 탐침은 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 단리하는데 사용될 수 있다. 단리된 폴리뉴클레오티드는 다른 분자가 없거나 적어도 70, 80 또는 90 %가 없도록 제조된다.

본 발명의 인간 항체-코드 cDNA는, mRNA를 주형으로 사용하여 표준 문자 생물학 기술로 제조될 수 있다. 그 후, cDNA 문자를 당업계에 공지되어 있고 삼브루크 등(Sambrook et al. (1989))과 같은 매뉴얼에 기재된 문자 생물학 기술을 사용하여 복제할 수 있다. PCR과 같은 증폭 기술을 폴리뉴클레오티드의 추가 카피를 얻기 위해서 사용할 수 있다.

별법으로, 합성 화학 기술을 본 발명의 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 합성하는데 사용할 수 있다. 유전 코드의 퇴보성(degeneracy)은 예를 들어 서열 번호 48-89에서 각각 나타나는 VH-CDR3, VH-CDR1 또는 VL-CDR3, 경쇄 또는 중쇄 아미노산 서열 중 하나를 갖는 항체를 코드할 다른 뉴클레오티드 서열이 합성되도록 한다.

폴리뉴클레오티드의 발현

본 발명의 인간 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기 위해서, 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역을 위해 필요한 인자를 함유하는 발현 벡터에 폴리뉴클레오티드를 삽입할 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 방법을, 인간 항체를 코드하는 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 인자를 함유하는 발현 벡터를 구성하는데 사용할 수 있다. 이러한 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체 내 유전자 재조합을 포함한다. 상기 기술은 예를 들면 삼브루크 등(1989) 및 아우수벨 등(Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1995)에 개시되어 있다. (아래의 실시예 1 내지 3 참조)

다양한 발현 벡터/숙주 시스템은, 본 발명의 인간 항체를 코드하는 서열을 함유하고 발현하는데 사용될 수 있다. 이는 미생물, 예를 들어 재조합 박테리오파지, 플라스미드, 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환한 박테리아; 효모 발현 벡터로 형질전환한 효모, 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 바콜로바이러스(baculovirus))를 감염시킨 곤충 세포 시스템, 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV); 담배 모자이크 바이러스(TMV) 또는 박테리아 발현 벡터(예를 들면, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환한 식물 세포 시스템, 또는 동물 세포 시스템을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

조절 요소 또는 조절 서열은 전사 및 번역을 수행하기 위해서 숙주 세포의 단백질과 상호작용하는, 벡터의 번역되지 않는 구역(인해서, 프로모터, 5' 및 3' 비전사 구역)이다. 상기 요소들은 그 강도와 특이성에서 다양할 수 있다. 사용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 항시발현성 및 유도성 프로모터를 포함하는 임의의 수의 적절한 전사 및 번역 요소를 사용할 수 있다. 예를 들면, 박테리아 시스템에 클로닝할 때, 블루스크립트(BLUESCRIPT) 파지미드(스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라졸라 소재) 또는 pSPORT1 플라스미드(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 기타 등등의 하이브리드 lacZ 프로모터와 같은 유도성 프로모터가 사용될 수 있다. 바콜로바이러스 폴리헤드린 프로모터는 곤충 세포에서 사용될 수 있다. 식물 세포의 계놈(예를 들면 열 충격, 루비스코 및 저장 단백질 유전자) 또는 식물 바이러스(예를 들면, 바이러스 프로모터 또는 리더 서열)에서 유래된 프로모터 또는 인핸서는, 벡터 안으로 클로닝될 수 있다. 포유동물 세포 시스템에서는, 포유동물의 유전자로부터 또는 포유동물의 바이러스로부터 유래된 프로모터가 바람직하다. 인간 항체를 코드하는 다수 카피의 뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포주를 생성하는 것이 필요하다면, SV40 또는 EBV에 기초한 벡터를 적절한 선택성 표지와 사용할 수 있다.

제약 조성물

상기한 임의의 인간 MN 항체는, 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 제공될 수 있다. 제약학상 허용되는 담체는 바람직하게는 발열인자가 없다. 상기 조성물은 단독으로 투여하거나 또는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스 및 물을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 임의의 멀균, 친생물학적 제약학상 담체내에서 투여될 수 있는 안정화 화합물과 같은 1 종 이상의 다른 약제와 함께 투여될 수 있다. 다양한 수성 담체는 예를 들어, 0.4 % 식염수, 0.3 % 글리신 등등을 쓸 수 있다. 이러한 용액은 멀균이고 일반적으로 입자상 물질이 없다. 이러한 용액은 통상의 잘 알려진 멀균 기술(예를 들면, 여과)에 의해서 멀균될 수 있다. 본 조성물은 pH 조절과 같이 생리학적 조건에 근접하기 위해 요구되는 제약학상 허용되는 보조 물질 및 완충제 등을 함유할 수 있다. 상기 제약 제제에서의 본 발명의 항체의 농도는 다양하게 변화할 수 있으며, 즉 약 0.5 중량% 미만, 통상적으로 1 중량% 이상 내지 15 또는 20 중량% 일 수 있으며, 선택된 특정 투여 방법에 따라 주로 액체 부피, 점도 등에 기초하여 선택될 것이다. 미국 특허 제 5,851,525호 참조. 필요하다면, 예를 들어 MN 결합에 대해 각기 다른 K_d 를 가진 한 형태 이상의 인간 항체가 제약 조성물에 포함될 수 있다.

조성물은 환자에게 단독으로 또는 다른 약제, 약품 또는 호르몬과 함께 투여될 수 있다. 유효 성분 이외에, 이러한 제약 조성물은, 활성 화합물의 제제 안으로의 가공을 용이하게 하는 제약학상 사용될 수 있는 부형제 및 보조물질을 포함하는 적

합한 제약학상 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥-내, 골수내, 경막내, 심실내, 경피, 피하, 복강내, 비내, 비경구, 국소, 설하 또는 직장 수단을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다.

제약 조성물이 조제된 후에는, 그것들은 적절한 용기에 넣을 수 있고 지시한 조건에서의 치료를 위해 라벨을 붙일 수 있다. 상기 라벨은 양, 빈도 및 투여 방법을 포함할 것이다.

진단 방법

본 발명은 또한 혈청, 폐, 간, 심장, 유방, 신장, 결장, 세포 배양 시스템의 표본, 또는 무세포 시스템(예를 들면, 조직 균질 혼탁액)을 포함하는(이에 한정되지는 않음) 시험 제조에서 인간 MN을 검출할 수 있는 진단 방법을 제공한다. 상기 진단 방법은 예를 들어, MN이 상승된 장애를 진단하기 위해 사용될 수 있다. 상기 장애는 신장, 식도, 유방, 자궁경부, 결장 및 폐의 암종을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 진단을 위해 사용될 때, 환자로부터의 시험 표본에서의 항체-MN 복합체의 양이 정상 표본에서의 복합체의 양보다 많게 검출되면, 그 환자가 장애를 가질 가능성이 확인된다. 암 조직에서 MN 검출의 면역조직화학적 방법은 실시예 12에서 기재한다.

시험 제조는 본 발명의 인간 항체와 접촉되고, 시험 제조는 그후 항체-MN 복합체의 존재에 대해 측정된다. 필요하다면, 인간 항체는 검출가능한 표지, 예를 들면 형광, 방사성 동위원소, 화학발광, 또는 효소 표지, 예를 들어, 호스라디쉬 페옥시다아제, 알칼리성 포스파타아제, 또는 루시퍼라아제를 포함할 수 있다. MN 발현 종양 세포의 형광-기초의 검정법은 실시예 11에 나타난다.

임의로, 항체를 고체 지지체에 결합시킬 수 있는데, 이는 측정법의 자동화에 적용될 수 있다. 적당한 고체 지지체는 유리 또는 플라스틱 슬라이드, 조직 배양 플레이트, 마이크로타이터 웰, 튜브, 실리콘 칩, 또는 비드와 같은 입자(라텍스, 폴리스티렌, 또는 유리 비드를 포함하지만 이에 한정되지는 않음)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 공유 및 비공유 결합, 수동 흡수, 또는 항체 및 고체 지지체에 결합된 결합 잔기의 쌍의 사용을 포함하여, 당업계에서 공지된 임의의 방법이 항체를 고체 지지체에 부착시키는데 사용될 수 있다. MN 및 항체의 결합은 반응물을 함유하는데 적당한 임의의 용기에서 이루 어질 수 있다. 상기 용기의 예는 마이크로타이터 플레이트, 시험관, 미세원심분리 튜브를 포함한다.

치료 방법

본 발명은 또한, MN이 상승된 장애의 증상을 개선하는 방법을 제공한다. 이러한 장애는 신장, 식도, 유방, 자궁경부, 결장 및 폐의 암종을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 문헌[(Liao, S.Y., Cancer Res (1997) 57, 2827-2831), (Turner, J.R. Hum Pathol, (1997) 28, 740-744), (Liao, S.Y., et al, Am J Pathol (1994), 145, 598-609), (Saarnio, J. et al, Am J Pathol (1998) 153, 279-285) 및 (Vermylen, P. et al, Eur Respir J (1999), 14, 806-811)] 참조.

본 발명의 한 실시태양에서, 본 발명의 치료적 유효 용량의 인간 항체가 상기한 암들과 같이 MN이 상승되는 장애를 가진 환자에게 투여된다.

치료적 유효 용량의 결정

치료 유효 용량의 결정은 당업자의 능력 안에 있다. 치료적 유효 용량은 치료적 유효 용량이 없을 때에 명백한 효과에 비해, 암을 효과적으로 치료하는데 사용되는 인간 항체의 양을 지칭한다.

치료적 유효 용량은 초기에는 동물 모델, 통상적으로 래트, 마우스, 토끼, 개 또는 돼지에서 평가할 수 있다. 동물 모델은 또한 적절한 농도 범위 및 투여 경로를 결정하는데 사용될 수 있다. 상기 정보를 그후 인간에서의 유용한 용량 및 투여경로를 결정하는데 사용할 수 있다. 피하 마우스 이종이식 모델은 실시예 9에서 기재한다.

치료 효능 및 독성, 예를 들어 인간 항체의 ED₅₀ (집단의 50 %에서 치료 효과가 있는 용량) 및 LD₅₀ (집단의 50 %가 치사하는 용량)은, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 제약학적 방법으로 결정될 수 있다. 치료 효과에 대한 독성의 용량 비는 치료 지수이며, 비율, LD₅₀/ED₅₀로 표현할 수 있다.

큰 치료 지수를 나타내는 제약 조성물이 바람직하다. 동물 연구에서 얻은 자료는 인간에게 사용하기 위한 용량의 범위를 공식화하는데 사용된다. 상기 조성물에 함유되는 용량은 바람직하게는, 독성이 거의 없거나 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도(circulating concentrations) 범위 내이다. 용량은 사용된 제형, 환자의 민감도 및 투여 경로에 따라 좌우되는 이 범위 내에서 변화한다.

정확한 용량은 치료를 필요로 하는 환자에 관련된 인자에 따라서 의사가 결정할 것이다. 용량 및 투여는 인간 항체의 충분한 농도를 제공하거나 목적 효과를 유지하도록 조절된다. 고려될 수 있는 인자는 질병 상태의 심도, 대상의 일반적 건강, 대상의 나이, 체중 및 성별, 영양상태, 투여의 시간 및 빈도, 약물 병용, 반응 민감도 및 치료에 대한 내성/반응을 포함한다. 지속형 제약 조성물은 특정 제제의 반감기와 제거율에 따라 매 3 내지 4 일마다, 매주, 또는 2주마다 한번씩 투여할 수 있다.

본 발명의 인간 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드는 구성될 수 있고 트랜스페린-다양이온-매개된 DNA 전달, 네이키드 또는 캡슐화된 핵산의 트랜스펙션, 리포솜-매개된 세포 융합, DNA-코팅된 라텍스 비드의 세포내 수송, 원형질체 융합, 바이러스 감염, 전기충격법(electroporation), "유전자 총(gene gun)", 및 DEAE- 또는 인산 칼슘-매개된 트랜스펙션을 포함하지만 한정되지는 않는 잘-학립된 기술을 사용하여 생체외 또는 생체내에서 세포로 도입될 수 있다.

항체의 생체내의 유효 용량은 약 5 μg 내지 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 약 50 μg 내지 약 5 mg/kg , 약 100 μg 내지 약 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 환자 체중, 및 약 200 내지 약 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 환자 체중의 범위이다. 항체를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 투여하기 위해서, 생체내 유효 용량은 DNA 약 100 ng 내지 약 200 ng, 500 ng 내지 약 50 mg, 약 1 μg 내지 약 2 mg, 약 5 μg 내지 약 500 μg 및 약 20 μg 내지 약 100 μg 이다.

본 발명의 인간 항체-함유 제약 조성물의 투여 방식은 항체를 숙주에 전달하는 적당한 임의의 경로일 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 비경구 투여, 예를 들면 피하, 근육내, 정맥내, 또는 비내 투여에서 특히 유용하다.

본 개시내용에서 인용된 모든 특히 및 특히 출원은 본원에 참조문헌으로 명백히 삽입되었다. 상기 개시내용은 통상적으로 본 발명을 설명한다. 보다 완전한 이해는 하기의 특정 실시예와 관련하여 얻을 수 있으며, 이는 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니라 예시의 목적으로 제공되었다.

실시예

실시예 1

인간 조합 항체 라이브러리 (*HuCAL-Fab 1*)의 제조

*HuCAL-Fab 1*의 클로닝. *HuCAL-Fab 1*은 Fab 항체 단편 형태에서 완전한 합성, 모듈식 인간 항체 라이브러리이다. *HuCAL-Fab 1*을 단일사슬 형태인 항체 라이브러리로부터 시작해 조립하였다 (*HuCAL-scFv*; Knappik et al. J. Mol. Biol. 296 (2000) 55). *HuCAL-Fab 1*을 파지미드 발현 벡터 pMORPH18 Fab 1으로 클로닝하였다 (도 3). 이 벡터는 C-말단에서 필라멘트형 파지의 절단된 유전자 III 단백질에 융합된 *phoA* 신호 서열을 갖는 *Fd* 단편을 포함하고, 추가로 *ompA* 신호 서열을 갖는 경쇄 VL-CL을 포함한다. 두 사슬 모두 *lac* 오페론의 조절하에 있다. 불변 도메인 *C λ* , *C κ* 및 *CH*는 *HuCAL*의 모듈식 시스템과 완전히 양립하는 합성 유전자이다 (Knappik et al., 2000).

먼저, $V\lambda$ 및 $V\kappa$ 라이브러리를 EcoRV/DraIII 및 EcoRV/BsiWI을 사용한 제한 효소 분해에 의해, 각각 *HuCAL-scFv*로부터 단리했다. 이들 $V\lambda$ 및 $V\kappa$ 라이브러리를 EcoRV/DraIII 및 EcoRV/BsiWI으로 절단한 pMORPH18 Fab 1에 각각 클로닝하였다. 라이게이션 및 대장균 (*E. coli*) TG-1으로의 형질전환 후, 양쪽 경우 모두 *HuCAL-scFv*의 VL 다양성을 초과하는 4.14×10^8 및 1.6×10^8 크기의 라이브러리를 각각 얻었다.

유사하게, VH 라이브러리를 StyI/MunI을 사용한 제한 효소 분해에 의해, *HuCAL-scFv*로부터 단리하였다. 이 VH 라이브러리를 StyI/MunI으로 절단한 pMORPH18-V λ 및 $V\kappa$ 라이브러리에 클로닝하였다. 라이게이션 및 대장균 (*E. coli*) TG-1으로의 형질전환 후, 67%의 올바른 클론을 갖는 총 2.09×10^{10} 크기의 라이브러리를 얻었다 (207 클론의 시퀀싱으로 동정).

파지미드 분리, 파지 증폭 및 정제. *HuCAL-Fab*를 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜 및 1% 글루코스를 함유하는 2 \times TY 매질 (2 \times TY-CG)에서 증폭하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$, 약 0.5의 OD600에서의 헬퍼 파지의 감염 (VSCM 13), 원심분리 및 2 \times TY / 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜 / 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카나마이신에서의 재현탁 후에, 세포를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양하였다. 파지를 상청액으로부터 PEG-침전하고 (Ausubel et al., 1998), PBS/20% 글리세롤에서 재현탁하여, -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 2 회의 패닝 라운드 사이의 파지 증폭을 다음과 같이 수행하였다. 중간 로그 상의 TG1-세포를 용출된 파지로 감염시키고, 1% 글루코스 및 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜을 보충한 LB-한천 상에서 평판 배양하였다. 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 배양한 후, 콜로니를 긁어내고 0.5의 OD600으로 조절하였다. 헬퍼 파지를 상기처럼 첨가하였다.

실시예 2

고체상 패닝

맥시소프TM (MaxiSorpTM) 마이크로타이터 플레이트 (눈크 (Nunc))의 웰을, PBS 중의 인간 MN 단백질로 코팅하였다 (2 $\mu\text{g}/\text{웰}$). PBS 중의 5% 탈지 분유로 차단한 후, 상기처럼 정제된 1-5 $\times 10^{12}$ *HuCAL-Fab* 파지를 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 첨가하였다. 몇 차례의 세척 단계 후, 결합된 파지를 100 mM의 트리에틸아민을 이용한 PH-용출 및 1M TRIS-Cl pH 7.0을 이용한 후속적인 중화에 의해 용출하였다. 상기와 같이 매 라운드 사이에 수행되는 파지 증폭과 함께, 3회의 패닝 라운드를 행하였다.

실시예 3

발현을 위한 선택된 *Fab* 단편의 서브클로닝

선택된 *HuCAL* *Fab* 단편의 *Fab*-코딩 삽입체를, 가용성 *Fab*가 빠르게 발현이 촉진되도록 발현 벡터 pMORPHx7_FS 내에 서브클로닝하였다. 선택된 *HuCAL* *Fab* 클론의 DNA 제조물을 *Xba*I/*Eco*RI로 분해하였고, 그 결과 *Fab* 코딩 삽입체 (*ompA*-*VL* 및 *phoA*-*Fd*)를 절단해냈다. 이전에 *scFv*를 지니고 있던 *Xba*I/*Eco*RI 절단된 벡터 pMORPHx7에 정제된 삽입체를 서브클로닝하여, pMORPHx9_Fab1_FS(도 4)로 명명된 *Fab* 발현 벡터를 얻었다. 이 벡터에서 발현되는 *Fab*는 검출 및 정제를 위해 두개의 C-말단 태그 (FLAG 및 Strep)를 지닌다.

실시예 4

ELISA에 의한 MN-결합 *Fab* 단편의 동정

맥시소프 ELISA 플레이트의 웰을 코팅 완충용액으로 희석한 5 μ g/ml 농도의 인간 MN 용액 100 μ l/웰로 코팅하였다. 개별적인 Fab의 발현은, 30 °C에서 12 시간 동안 0.5 mM의 IPTG로 유도하였다. 가용성 Fab를 삼투 쇼크에 의해 주변세포질로부터 추출하고 (Ausubel et al., 1998) ELISA에서 사용하였다. Fab 단편을 항-Fab 항체 (디아노바 (Dianova))로 검출하였다. 호스라디쉬 페옥시다아제-결합 항-마우스 IgG 항체 및 POD 가용성 기질 (로슈 디아그노틱스 (Roche Diagnostics))의 첨가 후에, 370 nm에서의 값을 판독하였다.

실시예 5

HuCAL 면역글로불린 발현 벡터의 제조

중쇄 클로닝. pcDNA3.1+ (인비트로젠 (Invitrogen))의 다중 클로닝 자리를 제거하고 (NheI/ApaI), HuCAL 설계에 이용하는 제한 부위와 양립할 수 있는 스타터페를 선도 서열 (NheI/EcoRI), VH-도메인 (EcoRI/BlpI) 및 면역글로불린 불변 구역 (BlpI/ApaI)의 라이제이션을 위해 삽입하였다. 선도 서열 (EMBL M83133)은 코자크 서열 (Kozak, 1987)을 갖추고 있었다. 인간 IgG1 (PIR J00228), IgG4 (EMBL K01316) 및 혈청 IgA1 (EMBL J00220)의 불변 구역을, 약 70 염기 길이를 갖는 중첩 올리고뉴클레오티드로 절단했다. 침묵 돌연변이를 도입하여 HuCAL 설계와 양립할 수 없는 제한 부위를 제거하였다. 중첩 신장-PCR에 의해 올리고뉴클레오티드를 스플라이싱하였다.

경쇄 클로닝. pcDNA3.1/Zeo+ (인비트로젠)의 다중 클로닝 자리를 두개의 각기 다른 스타터페로 치환하였다. κ -스터페는 κ -선도자 (NheI/EcoRV), HuCAL-scFv Vk-도메인 (EcoRV/BsiWI) 및 κ -사슬 불변 구역 (BsiWI/ApaI)의 삽입을 위한 제한 부위들을 제공하였다. λ -스터페에서의 상응하는 제한 부위는 NheI/EcoRV (I-선도자), EcoRV/HpaI (VI-도메인) 및 HpaI/ApaI (λ -사슬 불변 구역)이었다. λ -선도자 (EMBL L27692) 뿐만 아니라 κ -선도자 (EMBL Z00022) 모두 코자크 서열을 갖고 있었다. 인간 κ - (EMBL J00241) 및 λ -사슬 (EMBL M18645)의 불변 구역을, 상기한 바와 같이 중첩 신장-PCR에 의해 조립하였다.

IgG-발현 CHO-세포의 생성. CHO-K1 세포를, IgG 중쇄 및 경쇄 발현 벡터들의 동일 몰수의 혼합물로 함께 트랜스펙션 (co-transfect) 시켰다. 2중-내성인 트랜스펙션체를 600 μ g/ml의 G418 및 300 μ g/ml의 제오신 (Zeocin) (인비트로젠)으로 선택한 후 한계 희석하였다. 단일 클론의 상청액을 포획-ELISA에 의해 IgG 발현에 대해 평가하였다 (아래 참조). 양성 클론 (positive clones)을, 10% 초저 (ultra-low) IgG-FCS (라이프 테크놀러지스 (Life Technologies))를 보충한 RPMI-1640 배지에서 증식시켰다. 상청액의 pH를 8.0으로 조절하고 무균 여과를 한 후에, 용액으로 표준 단백질 A 컬럼 크로마토그래피 (포로스 20 A, PE 바이오시스템스 (Poros 20 A, PE Biosystems))를 실시하였다.

실시예 6

CDR3 라이브러리의 설계

V λ 위치 1 및 2. 본래의 HuCAL 마스터 유전자들을 그들의 진성 N-말단들인 VLA1: QS (CAGAGC), VLA2: QS (CAGAGC) 및 VLA3: SY (AGCTAT)로 제조하였다. 이를 아미노산을 포함하는 서열이 WO 97/08320에 나타나 있다. HuCAL 라이브러리 제조 동안, 라이브러리 클로닝이 용이하도록 처음 두개의 아미노산을 DI로 교체하였다 (EcoRI 부위). 모든 HuCAL 라이브러리는 5'-말단에 EcoRV 부위 GATATC (DI)를 갖는 VL λ 유전자를 함유한다. 모든 HuCAL 카파 유전자 (라이브러리의 마스터 유전자 및 모든 유전자)는 5'말단에 DI를 함유한다.

VH 위치 1. 본래의 HuCAL 마스터 유전자들을 그들의 진성 N-말단들인, 처음 아미노산으로 Q (=CAG)를 갖는 VH1A, VH1B, VH2, VH4 및 VH6, 및 처음 아미노산으로 E (=GAA)를 갖는 VH3 및 VH5로 제조하였다. 이를 아미노산을 포함하는 서열이 WO 97/08320에 나타나 있다. HuCAL Fab 1 라이브러리에서, 모든 VH 사슬은 처음 위치에 Q (=CAG)를 함유한다.

V κ 1/V κ 3 위치 85. CDR3 라이브러리를 도입하는데 이용되는 카세트 돌연변이 발생 과정 때문에 (Knappik et al., J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000), V κ 1 및 V κ 3의 위치 85는 T이거나 또는 V일 수 있다. 따라서, HuCAL scFv 1 라이브러리 제조 동안, V κ 1 및 V κ 3의 위치 85를 다음과 같이 변경하였다. 원래의 V κ 1, 85T (코돈 ACC); V κ 1 라이브러리, 85T 또는 85V (TRIM 코돈 ACT 또는 GTT); 원래의 V κ 3, 85V (코돈 GTG); V κ 3 라이브러리, 85T 또는 85V (TRIM 코돈 ACT 또는 GTT); HuCAL Fab 1에도 동일하게 적용했다.

CDR3 설계. 일정하게 유지되는 모든 CDR3 잔기는 표 1 및 2에 나타나 있다.

CDR3 길이. 설계된 CDR3 길이 분포는 다음과 같다. 변경된 잔기는 도 2에서 보이는 서열 목록에 나타나 있다. V 카파 CDR3, 8 아미노산 잔기 (위치 89 내지 96) (종종 7 잔기), Q90이 고정되어 있음; V 람다 CDR3, 8 내지 10 아미노산 잔기 (위치 89 내지 96) (종종 7-10 잔기), Q89, S90 및 D92가 고정되어 있음; 및 VH CDR3, 5 내지 28 아미노산 잔기 (위치 95 내지 102) (종종 4-28), D101이 고정되어 있음.

실시예 7

에피토프 지도 제작을 위한 경쟁 ELISA

눈크 맥시소브 마이크로타이터 플레이트를 5 μ g/ml 농도의 PBS 중의 MN 또는 MN-펩티드-연결된 BSA 100 μ l로, 4 °C에서 밤새 코팅하였다. 마이크로타이터 플레이트 진탕기 상에서, 각 웰을 실온에서 2 시간동안 PBS 중의 5% 털지 우유로 차단하였다. 플레이트를 0.05% 트윈-20 (Tween-20)을 포함한 PBS로 세척하였다. 웰 당 200 μ l의 항체 또는 항체 + 프로테오글리칸 웹티드 A, B 또는 C (서열 번호 20-22)를 웰에 첨가하였다. 50% 총말점 결정을 최대한 용이하게 하기 위해,

항체 및 플로테오글리칸 웨티드 농도를 최적화하였다. 이들 항체/웨티드 혼합물을 마이크로타이터 플레이트 진탕기 상에서 실온으로 1.5 시간 동안 인큐베이션하였다. ELISA 플레이트를 0.05% 트윈-20을 함유한 TBS로 5배 빨리 세척하였다. 결합한 항체를 퍼옥시다제 결합 염소 항-Fab IgG (시그마(Sigma))를 이용해 시험하였다. TBS-트윈으로 추가 세척한 후에, 100 μl 의 BM 블루 POD 기질 (로슈)을 첨가하였다. 30 분 인큐베이션 후에, 370 nm에서 흡광도를 읽었다.

실시예 8

세포 부착 검정법

50 mM 중탄산 완충용액 pH 9.2 중의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 정제된 MN을 1.5 시간 동안 5 cm 세균 페트리 접시의 바닥에 30 μl 양 만큼 흡착하였다. 이 적재를 제거하고 PBS로 3회 세정하였다. 뒤이어 이 적재를 DMEM 중의 5% 소태아혈청으로 차단하였다. 적재를 20-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-MN IgG 30 mL 또는 PBS 및 대조군으로서의 관련성 없는 항체로 추가로 처리하였다. 적재를 PBS로 세척한 후, 스포트(spot)을 30 μl 의 CGL-1 세포 혼탁액 (10^5 세포/mL)으로 인큐베이션하고 밤새 인큐베이션하였다. 적재를 PBS로 세척한 후, CGL-1 세포가 MN으로 코팅된 플레이트에 부착하는 것을 차단하는 항-MN 항체의 능력을 평가하였다. 이 실험의 예로 제시한 도 5에서, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-MN 항체 MN-3 (도 5A)가 대조군 감마 글로불린 (도 5B) 및 항체 처리가 없는 경우 (도 5C)와 비교해 세포 부착을 억제했다.

실시예 9

피하 이종이식 암 모델

항-MN 항체의 항종양 효과를, 면역 결핍 마우스에서 피하 이종이식 모델을 이용해 평가하였다. HT-29 세포를, 10% FBS를 보충한 DMEM에서 부착 배양체로서 유지하였다. 6-7 주 나이의 SCID 마우스의 우측 옆구리에, 배지 0.1 mL 중의 1×10^7 세포를 피하 접종하였다. 매일 500 μg 용량으로 모노클로날 항체를 투여하였다. 대조군 마우스를 PBS 또는 관련성 없는 모노클로날 항체로 처리하였다. 종양을 활주 캘리퍼스로 주 2회 측정하였다. 항-종양 효능을 항-MN 항체 치료 대 대조 치료에서의 종양 크기를 비교해서 평가하였다.

실시예 10

면역 콘쥬게이트를 갖는 피하 이종이식 암 모델

항-MN 항체를 당업계에 공지된 프로토콜을 이용해, 세포독성 소분자에 콘쥬게이션시켰다 (예를 들어 C. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996), 93, 8618-8623.). HT-29 세포를, 10% FBS를 보충한 DMEM에서 부착 배양체로서 유지하였다. 6-7 주 나이의 암컷 CB-17 SCID 마우스의 우측 옆구리에, 배지 0.1 mL 중의 1×10^7 종양 세포를 피하 접종하였다. 종양 크기가 65 mm^3 에 도달한 이후에, 5일간 연속해서 0.5 mg 항체 콘쥬게이트를 매일 주사하였다. 대조군 마우스를 PBS, 관련성 없는 모노클로날 항체 또는 콘쥬게이션되지 않은 유리 약물로 처리하였다. 종양을 활주 캘리퍼스로 주 2회 측정하였다. 항-종양 효능을 항-MN 항체 치료 대 대조 치료에서의 종양 크기를 비교해서 평가하였다.

실시예 11

형광-활성화 세포 분류 검정법 (FACS 검정법)

진단 수단으로 세포를 MN 발현에 대해 검정할 수 있다. 부착 세포주에 대해, 먼저 배양 배지를 제거하고, 차가운 PBS로 1회 세척하고 세포주에 따라 그것들을 5 내지 10분 동안 PBS 중의 1 mM EDTA로 처리하여 (주기적으로 플라스크를 가볍게 두드려서 촉진한다), 세포를 플라스크로부터 떼어내었다. 세포들을 회전시켜 가라앉히고 (1500 rpm, 5 분), 차가운 염색 완충용액 (Staining Buffer) (10% FBS, 0.1% 아지드화 나트륨, PBS)으로 세척하였다. 세포를 차가운 염색 완충용액에서 200 μl 중의 백만개 세포로 재현탁하였다. 1차 항체를 3.2E-11 내지 3.2E-8 M로 첨가하고 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비결합된 항체를 차가운 염색 완충용액으로 세척하였다. 세포 펠렛을 200 μl 의 차가운 염색 완충용액에서 재현탁하고 200 μl 의 세포 당 20 μl 의 FITC-결합 항-인간 2차 항체 (파민젠 (Pharmingen))를 첨가하였다. 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비결합된 항체를 세척하고, 염색 완충 용액 중의 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 요오드화 프로피디움 (PI) (시그마) 200 μl 에 세포를 재현탁하였다 (죽은 세포를 게이팅하기 위해). PI를 흡수하는 세포를 게이팅하는 FACS 분석을 계속하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, FACS 검정에서, PC3mm2 인간 전립선 암 세포는 MN을 발현하였다. 검은 선이 대조군, 이소타입-대응 인간 항체를 나타내는데 비해, 붉은 선은 인간 항-MN 항체로 염색된 것을 나타낸다.

실시예 12

종양 표본의 면역조직화학 분석

MN 발현에 대해 종양 부분을 시험할 수 있다. MN은 암에서는 높게 발현되고 정상 조직에서는 낮은 발현 수준을 나타내기 때문에, MN 발현을 분석하는 것은 환자 표본에 있어서 암의 진단 및 검출에 유용하다. 조직 부분의 분석을 위해서, 표준 면역조직화학 기법을 사용할 수 있다. PC-3 전립선 암종을 함유하는 조직 부분을 SCID 마우스에 이식하였다. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-MN 항체를 왁스가 제거된 파라핀 부분과 인큐베이션하고, 슬라이드를 퍼옥시다제가 결합된 2차 항체를 이용해 현상하였고 DAB 크로모겐 (chromogen)을 이용해 현상하였다. 강한 막-결합 신호를 즉시 관찰하였는데, 이것은 전립선 암 세포에서의 높은 MN 발현의 특징이다.

실시예 13

항체-의존성 세포 매개 세포독성 검정법 (ADCC 검정법)

항-MN IgG의 항-종양 활성을 ADCC 활성에 의해 매개될 수 있다. MN-발현 PC-3mm2 세포 및 비-MN 발현 HCT-116 세포를 250 ng/mL, 1000 ng/mL 또는 2000 ng/mL의 인간 항-MN IgG1 또는 대조군 인간 IgG1 항-디옥신 항체와 인큐베이션하였다. 인간 PBMC를 50:1, 25:1 및 5:1의 효과기:효과 비율로 이들 세포에 첨가하였다. 표적 세포 용해의 수치를 측정하기 위해, 크롬-51 방출 분석을 수행하였다. HCT-116 또는 PC-3mm2 세포 존재하에 대조군 항체 또는 무항체의 배양에서 소량의 용해를 관찰하였다. 이러한 자발적인 용해 수치는 50:1, 25:1 및 5:1 표적 효과기 비율에 대해 각각 10-15%, 5-10%, 또는 2-3% 이었다. 유사하게, 비-MN 발현 HCT-116 세포의 용해는 항-MN 항체와 인큐베이션한 경우 0-10% 범위였다. 그러나 인간 항-MN IgG와 인큐베이션했을 때 PC-3mm2 세포의 용해는 대조군보다 훨씬 높았다. 50:1의 표적:효과기 비율에서 250 ng/mL, 1000 ng/mL 및 2000 ng/mL를 이용할 때 40, 50 및 60%의 용해를 관찰하였다. 유사하게, 25:1의 비율에서 30, 33 및 38% 용해를 관찰했고, 마지막으로 5:1의 표적:효과기 비율에서 8, 10 및 15% 용해를 관찰하였다. 이들 실험은 인간 항-MN 항체가 항-종양 ADCC 활성을 매개하고, 암의 치료에 이용될 수 있음을 보여주었다.

표 1 및 2의 언급

HuCAL 서열 개요 (HuCAL 라이브러리 scFv1, scFv2, scFv3 및 Fab 1)에 관한 언급

1. 번호매기기	V λ 위치 9에서 캡을 제외하고 번호매기기는 VBASE에 따른다. VBASE에서 캡은 위치 10으로 정해진다. (또한, 문헌 [Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol., 227, 776-798, Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14, 4628-4638 and Williams et al. (1996) J. Mol. Biol., 264, 220-232] 참조)
2. 제한부위	이 부위들의 위치는 단백질 서열 개요에서 단지 대략적으로만 주어진다. 자세한 위치에 대해서는, DNA 서열 개요 또는 벡터NTI 마스터 유전자 서열 파일 (공유 데이터베이스에서 찾을 수 있다.)을 이용하라.
3. V 람다 위치 1&2	본래의 HuCAL 마스터 유전자들을 하기의 그들의 진성 N-말단들로 제조하였다: VL λ 1: QS (CAGAGC) VL λ 2: QS (CAGAGC) VL λ 3: SY (AGCTAT) 이 아미노산들을 함유하는 서열들은, 즉 특허 출원 및 PDB 구조 모델 파일에서 찾을 수 있다. HuCAL 라이브러리 제조동안, 처음 두 아미노산들을 라이브러리 클로닝이 용이하도록 DI로 교체하였다 (EcoRV 부위). 모든 HuCAL 라이브러리는 5'-말단에 EcoRV 부위 GATATC (DI)를 갖는 VL λ 유전자를 함유한다. 모든 HuCAL 카파 유전자 (라이브러리 내의 모든 유전자 및 마스터 유전자)는 5'-말단에 DI를 함유한다.
4. VH 위치 1	본래의 HuCAL 마스터 유전자를 하기의 그들의 진성 N-말단들로 제조하였다: 처음 아미노산으로 Q (=CAG)를 갖는 VH1A, VH1B, VH2, VH4 및 VH6 처음 아미노산으로 E (=GAA)를 갖는 VH3 및 VH5 짧은 FLAG 서열 (DYKD)에 융합된 모든 HuCAL VH 사슬은 첫번째 위치에 E (=GAA)를 함유한다 (HuCAL 라이브러리 scFv1, 2 및 3). HuCAL Fab 1 라이브러리에서, 모든 VH 사슬은 첫번째 위치에 Q (=CAG)를 함유한다.
5. V κ 1/ V κ 3 위치 85	HuCAL scFv1 라이브러리 제조 동안 V κ 1 및 V κ 3의 위치 85를 변경하였다. 원래의 V κ 1: 85T (코돈 ACC) V κ 1 라이브러리: 85T 또는 85V (TRIM 코돈 ACT 또는 GTT) 원래의 V κ 3: 85V (코돈 GTG) V κ 3 라이브러리: 85T 또는 85V (TRIM 코돈 ACT 또는 GTT) HuCAL scFv1 뿐만 아니라 HuCAL scFv2 및 3도 이 위치에 대해선 HuCAL scFv1과 같다.
6. CDR 3 설계	서열 개요에 일정하게 유지되는 모든 CDR3 잔기들이 나타난다.
7. CDR 3 길이	여기에 설계된 CDR 3 길이 분포가 있다. 서열 개요에 변경된 잔기들이 괄호 (x)안에 주어진다. V 카파 CDR3: 8 아미노산 잔기 (위치 89 및 96) (종종 7 잔기); 고정된 Q90 V 람다 CDR3: 8 내지 10 아미노산 잔기 (위치 89 내지 96) (종종 7-10 잔기); 고정된 Q89, S90, D92 VH CDR 3: 5 내지 28 아미노산 잔기 (위치 95 내지 102) (종종 4-28); 고정된 D101

표 1a.

HuCAL 라이브러리 scFv1, scFv2, scFv3 및 Fab1의 서열 요약

豆 1b.

Framework 2					Framework 3					Framework 4										Framework 5																
4					5					6					7					8					9											
9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0					
BstXI					XbaI																															
Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	L	A				
Q	P	P	G	Q	P	G	K	A	L	E	W	V	S	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	
Q	M	P	G	Q	M	P	G	K	G	L	E	W	M	G	Q	S	P	G	R	G	L	E	W	L	G	Q	S	P	G	R	G	L	E	W	L	G
					</td																															

豆 1c.

표 2a.

HuCAL 라이브러리 scFv1, scFv2, scFv3 및 Fab1의 서열 요약

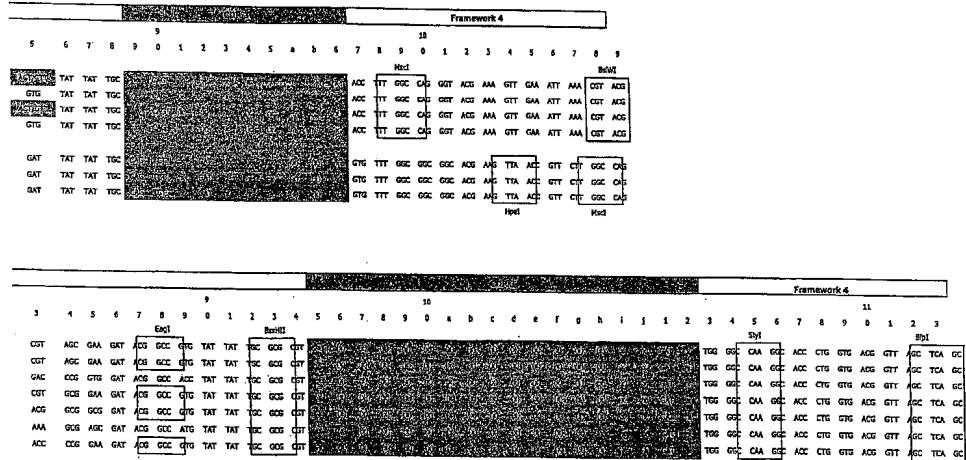
VH

표 2b.

work

Framework 3																									
3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	b	c	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	b	c		
												HIV													
CAG	GGT	CTC	GAG	TGG	ATG	GCC						CCT	GTC	ACC	ATT	AGC	GCG	TAT	ATG	GAA	CTC	ATC	AGT	GTC	
CAG	GGT	CTC	GAG	TGG	ATG	GCC						CCT	GTC	ACC	ATT	AGC	GCG	TAT	ATG	GAA	CTC	ATC	AGT	GTC	
AAA	GGC	CTC	GAG	TGG	CTG	GCT						CCT	GTC	ACC	ATT	AGC	GCG	TAT	ATG	GAA	CTC	ATC	AGT	GTC	
AAA	GGT	CTC	GAG	TGG	GTC	ADC						CCT	TTC	ATT	ATC	AAA	GAT	ACT	TGA	AAA	ATC	ATG	ATC	ACC	AAT
AAA	GAT	CTC	GAG	TGG	ATT	GSC						CCT	TTC	ATT	ATC	TTA	GCT	ATG	TGA	AAA	ATC	ATG	ATC	ACC	AAT
AAA	GAT	CTC	GAG	TGG	ATG	GCC						CCT	TTC	ACC	ATT	AGC	GCT	TAT	CTG	CCT	ATC	ATG	ATC	ACC	AAT
AAA	GAT	CTC	GAG	TGG	ATG	GCC						CCT	TTC	ACC	ATT	AGC	GCT	TAT	CTG	CCT	ATC	ATG	ATC	ACC	AAT
CCT	GAC	CTC	GAG	TGG	TGC	GTC						CCT	TTC	ACC	ATT	AGC	GCT	TAT	CTG	CCT	ATC	ATG	ATC	ACC	AAT

且 2c.



(57) 청구의 범위

청구항 1.

MN 단백질에 결합하는 인간 항체의 정제된 제제.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 항체가 MN 단백질의 프로테오글리칸 도메인에 결합하는 정제된 제제.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 항체가 MN 단백질의 프로테오글리칸 도메인 내의 GEEDLP 반복 구역에 결합하는 정제된 제제.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 항체가 약 0.6 nM 내지 약 1800 nM의 K_d 로 인간 MN 단백질에 결합하는 제제.

청구항 5.

제3항에 있어서, 상기 항체가 약 0.6 nM 내지 약 90 nM의 K_d 로 인간 MN 단백질에 결합하는 제제.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 61-80으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH3-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 48-60으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH3-CDR1 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 64의 아미노산을 포함하는 VH3-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는 VL λ 1-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 10.

제1항에 있어서, 서열번호 82-83으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL λ 2-CDR1 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 84-89로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL λ 2-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 12.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 61 및 84, 서열번호 62 및 87, 서열번호 63 및 89, 서열번호 64 및 84, 서열번호 65 및 84, 서열번호 66 및 85, 및 서열번호 67 및 88로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 및 VL2-CDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 정제된 제제.

청구항 13.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 61 및 86, 서열번호 61 및 85, 서열번호 61 및 87, 서열번호 61 및 88, 서열번호 61 및 89, 서열번호 63 및 86, 서열번호 63 및 85, 서열번호 63 및 87, 서열번호 63 및 88, 및 서열번호 63 및 84로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 및 VL2-CDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 정제된 제제.

청구항 14.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 71 및 87, 서열번호 61 및 87, 서열번호 72 및 87, 서열번호 73 및 87, 서열번호 74 및 87, 서열번호 75 및 87, 서열번호 76 및 87, 서열번호 77 및 87, 서열번호 78 및 87, 서열번호 79 및 87, 및 서열번호 80 및 87로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 및 VL2-CDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 정제된 제제.

청구항 15.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 61 및 81, 서열번호 69 및 81, 및 서열번호 70 및 81로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 및 VL1-CDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 정제된 제제.

청구항 16.

제1항에 있어서, 상기 인간 항체가 서열번호 61 및 86 및 48, 서열번호 61 및 86 및 49, 서열번호 61 및 86 및 50, 서열번호 61 및 86 및 51, 서열번호 61 및 86 및 52, 서열번호 61 및 86 및 53, 서열번호 61 및 86 및 54, 서열번호 61 및 86 및 55, 서열번호 61 및 86 및 56, 및 서열번호 61 및 86 및 57로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR3 및 VH3-CDR1 아미노산 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 17.

MN 단백질에 결합하는 인간 항체의 정제된 제제를 코드하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 18.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 1-13으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR1 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 19.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14-33으로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 VH3-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 20.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 34-36으로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 VL1-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 21.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 37-38로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 VL2-CDR1 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 22.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 39-44로 구성되는 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 VL2-CDR3 구역을 포함하는 정제된 제제.

청구항 23.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 및 14 및 41, 서열번호 2 및 14 및 41, 서열번호 3 및 14 및 41, 및 서열번호 4 및 14 및 41로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR1, VH3-CDR3 및 VL2-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 24.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14 및 37 및 41 및 서열번호 14 및 38 및 41로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR1 및 VL2-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 25.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14 및 41 및 1, 서열번호 14 및 41 및 2, 서열번호 14 및 41 및 3, 서열번호 14 및 41 및 4, 서열번호 14 및 41 및 5, 서열번호 14 및 41 및 6, 서열번호 14 및 41 및 7, 서열번호 14 및 41 및 8, 서열번호 14 및 41 및 9, 및 서열번호 14 및 41 및 10으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR3 및 VH3-CDR1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 26.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14 및 39, 서열번호 15 및 42, 서열번호 16 및 44, 서열번호 17 및 39, 서열번호 18 및 39, 서열번호 19 및 40, 및 서열번호 20 및 43으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 27.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14 및 34, 서열번호 22 및 34, 서열번호 22 및 35, 서열번호 22 및 36, 및 서열번호 23 및 34로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL1-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 28.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 14 및 41, 서열번호 14 및 40, 서열번호 14 및 42, 서열번호 14 및 43, 서열번호 14 및 44, 서열번호 16 및 41, 서열번호 16 및 40, 서열번호 16 및 42, 서열번호 16 및 43, 및 서열번호 16 및 39로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 29.

제17항에 있어서, 상기 뉴클레오티드 서열이 서열번호 24 및 42, 서열번호 14 및 42, 서열번호 25 및 42, 서열번호 26 및 42, 서열번호 27 및 42, 서열번호 28 및 42, 서열번호 29 및 42, 서열번호 30 및 42, 서열번호 31 및 42, 서열번호 32 및 42, 및 서열번호 33 및 42로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3, VL2-CDR3 뉴클레오티드 서열을 포함하는 정제된 제제.

청구항 30.

MN 결합 항체를 코드하는, 제17항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 31.

MN 결합 항체를 코드하는, 제18항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 32.

MN 결합 항체를 코드하는, 제19항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 33.

MN 결합 항체를 코드하는, 제20항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 34.

MN 결합 항체를 코드하는, 제21항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 35.

MN 결합 항체를 코드하는, 제22항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 36.

MN 결합 항체를 코드하는, 제23항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 37.

MN 결합 항체를 코드하는, 제24항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 38.

MN 결합 항체를 코드하는, 제25항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 39.

MN 결합 항체를 코드하는, 제26항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 40.

MN 결합 항체를 코드하는, 제27항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 41.

MN 결합 항체를 코드하는, 제28항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 42.

MN 결합 항체를 코드하는, 제29항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 43.

MN 결합 항체를 발현하는, 제30항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 44.

MN 결합 항체를 발현하는, 제31항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 45.

MN 결합 항체를 발현하는, 제32항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 46.

MN 결합 항체를 발현하는, 제33항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 47.

MN 결합 항체를 발현하는, 제34항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 48.

MN 결합 항체를 발현하는, 제35항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 49.

MN 결합 항체를 발현하는, 제36항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 50.

MN 결합 항체를 발현하는, 제37항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 51.

MN 결합 항체를 발현하는, 제38항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 52.

MN 결합 항체를 발현하는, 제39항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 53.

MN 결합 항체를 발현하는, 제40항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 54.

MN 결합 항체를 발현하는, 제41항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 55.

MN 결합 항체를 발현하는 조건 하에서 제31항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계

를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 57.

항체가 발현되는 조건 하에서 제32항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계

를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 58.

항체가 발현되는 조건 하에서 제33항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계

를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 59.

항체가 발현되는 조건 하에서 제34항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 60.

항체가 발현되는 조건 하에서 제35항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 61.

항체가 발현되는 조건 하에서 제36항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 62.

항체가 발현되는 조건 하에서 제37항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 63.

항체가 발현되는 조건 하에서 제38항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 64.

항체가 발현되는 조건 하에서 제39항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 65.

항체가 발현되는 조건 하에서 제40항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 66.

항체가 발현되는 조건 하에서 제41항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 67.

항체가 발현되는 조건 하에서 제42항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 68.

항체가 발현되는 조건 하에서 제43항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
숙주 세포 배양으로부터 인간 항체를 정제하는 단계
를 포함하는, 인간 항체의 제조 방법.

청구항 69.

a) 특정 세포에서 MN 단백질이 발현되는 조건을 갖는 인간을 준비하는 단계, 및
b) MN 항체, 및 MN 발현 세포의 세포사를 유도할 수 있는 세포독성제를 함유하는 인간 MN 항체 화합물의 유효량을 상기
인간에게 투여하는 단계
를 포함하는, 특정 세포에서 MN 단백질이 발현되는 인간 질환의 치료 방법.

청구항 70.

제69항에 있어서, 상기 질환이 신장 세포 암종, 식도 암종, 자궁경부 암종, 악성 결장 암종 및 비소세포 폐 암종으로 구성되
는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 71.

제69항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 61-80으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 72.

제69항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 48-60으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR1 구역을 포함하는 방법.

청구항 73.

제69항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 81로 구성되는 VL1-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 74.

제69항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 82-83으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VL2-CDR1 구역을 포함하는 방법.

청구항 75.

제69항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 84-89로 구성되는 군으로부터 선택되는 VL2-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 76.

a) 시험 제제를 MN 항원에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계, 및

b) 시험 제제를 항체-MN 항원 복합체의 존재에 대해 검정하는 단계

를 포함하는, 시험 제제 내의 MN 항원의 검출 방법.

청구항 77.

제76항에 있어서, 상기 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 방법.

청구항 78.

제76항에 있어서, 상기 항체가 고체 지지체에 결합된 방법.

청구항 79.

a) MN 단백질 수치가 상승하는 질환을 갖는 것으로 의심되는 환자로부터의 표본을 MN에 결합하는 인간 항체와 접촉시키는 단계, 및

b) 항체-MN 복합체의 존재에 대해 검정하고, 이로써 정상 표본 내의 복합체 양보다 많은 양의 복합체 검출이 상기 환자가 상기 질환을 지닐 가능성이 있음을 확인하는 단계

를 포함하는, MN 단백질 수치가 상승하는 질환의 진단을 보조하는 방법.

청구항 80.

제79항에 있어서, 상기 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 방법.

청구항 81.

제79항에 있어서, 상기 항체가 고체 지지체에 결합되는 방법.

청구항 82.

제79항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 61-80로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 83.

제79항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 48-60으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VH3-CDR1 구역을 포함하는 방법.

청구항 84.

제79항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 81로 구성되는 VL1-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 85.

제79항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 82-83으로 구성되는 군으로부터 선택되는 VL2-CDR1 구역을 포함하는 방법.

청구항 86.

제79항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 84-89로 구성되는 군으로부터 선택되는 VL2-CDR3 구역을 포함하는 방법.

청구항 87.

MN 단백질에 결합하는 인간 항체 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

요약

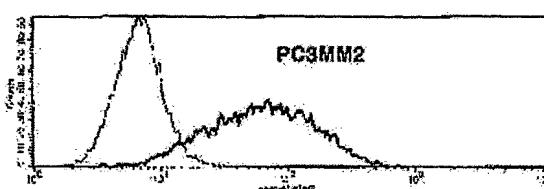
본 발명은 프로테오글리칸 도메인 내의 GEEDLP 반복구간을 표적으로 하는 모노클로날 인간 MN 항체 또는 MN 항체 단편으로 구성된다. MN 세포 표면 단백질의 프로테오글리칸 도메인은, 이러한 동일 GEEDLP 반복구간을 4 개 함유한다. 목적 에피토프에 대한 결합은 경쟁 ELISA로 입증할 수 있고, ELISA 신호는 이러한 반복구간을 함유하는 펩티드 (PGEEDLPGEEDLP)와 함께 인큐베이션함으로써 억제될 수 있다. 이러한 결합 억제는 또한 비아코어 검정법으로 입증할 수 있고, 여기서 목적 항체의 고정된 MN 또는 프로테오글리칸 펩티드에의 결합은 펩티드 반복구간에 의해서 억제될 수 있다. 펩티드 반복구간에의 결합 이외에, 인간 항-MN 항체는 CGL-1 세포의 MN 코팅된 플라스틱 플레이트에 대한 부착을 억제할 수 있다. 인간 항-MN 항체는 FACS 및 면역조직화학적 방법을 사용하여 암 세포 및 종양에서 MN 발현을 진단하고 정량하는데 사용되어 왔다. 인간 항-MN IgG1이 항체-의존적 세포-매개 세포독성을 통해 종양 세포 용해를 매개하는 것이 또한 예로서 제공된다. 그러므로, 이러한 항체는 MN이 상향조절되어 있는 암의 치료에 유용할 것이며, MN이 상향조절되어 있는 암의 진단에 유용할 수 있다.

대표도

도 1

색인어

항-MN 항체, 펩티드 반복구간, MN 발현

도면**도면1**

도면2a

시열 정보

시열 번호	시열 정보	DNA 서열
	VH3-CDR1	
1		GAATTACCTTAAGCAGAGGGCCATGACC
2		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGAGG
3		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGCC
4		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGAGG
5		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
6		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
7		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
8		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
9		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
10		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
11		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
12		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
13		GAATTACCTTAAGCAGGGCCATGATGGG
	VH3-CDR3	
14		TCTCTACTCTGTTGATT
15		AATGGTACTCTATGGGATTT
16		GTTATGTTCTGGTATGGATCAT
17		GCTGGTCTCGTATGATGTT
18		AATATTACTAAGCTGATGTT
19		GTTGGTACTCTGTTGATT
20		AATGGTACTCTGTTGATT
21		ACGCTACTCTGTTGATT
22		AAGCTTACTCTGTTGATT
23		AAACCTTACTCTGTTGATT
24		AATGGCTCTGTTGATT
25		AATCTGCTCTGTTGATT
26		AATGGCTCTGTTGATT
27		AATGGATGCTATGGATGTT
28		AATGCCCTCCCTATGGATGTT
29		AATGCTCTGCTATGGATGTT
30		GGGGGGACGCTATGGATGTT
31		CAGGGGACCCGTTGATGTT
32		AATGGCGTGGTATGGATGTT
33		AATGGCATCCGATGGATGTT

도면2b

시열 정보	
34	VL1-CDR3
35	1 CAGGCGGTGACTATGAGAGCTATGATT
36	2 CAGAGCCGAGACTATGAGAGCTATGATT
36	3 CAGAGCCGAGACTATGAGAGCTATGATT
37	VL2-CDR1
38	1 ACGGGGTACTGGAGCGATAGGGGGCGGGGGGGAGAGTACGCC
38	2 ACGGGGTACTGGAGCGATAGGGGGCGGGGGAGAGTACGCC
39	VL2-CDR3
40	1 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
41	2 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
41	3 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
42	4 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
43	5 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
44	6 CAGAGCTATGACCGGTGCTTTAAGCTGTT
45	프로테오글리칸 A GEEDLPSEEDSPREEDPGEEDLP
46	프로테오글리칸 B PGEEDLPGEEDLP
47	프로테오글리칸 C PSEEDSPREEDP
48	VH3-CDR1
49	1 GFTFSERANT
49	2 GFTFSAMMT
50	3 GFTFSGMMMA
51	4 GFTFSWVANT
52	5 GFTFSVSNMVT
53	6 GFTFSRNLMT
54	7 GFTFERWNGA
55	8 GFTFSRRMMV
56	9 GFTFSRWMMV
57	10 GFTFSSESMMT
58	11 GFTFSWMMMT
59	12 GFTFSVMMMT
60	13 GFTFSGSMMT

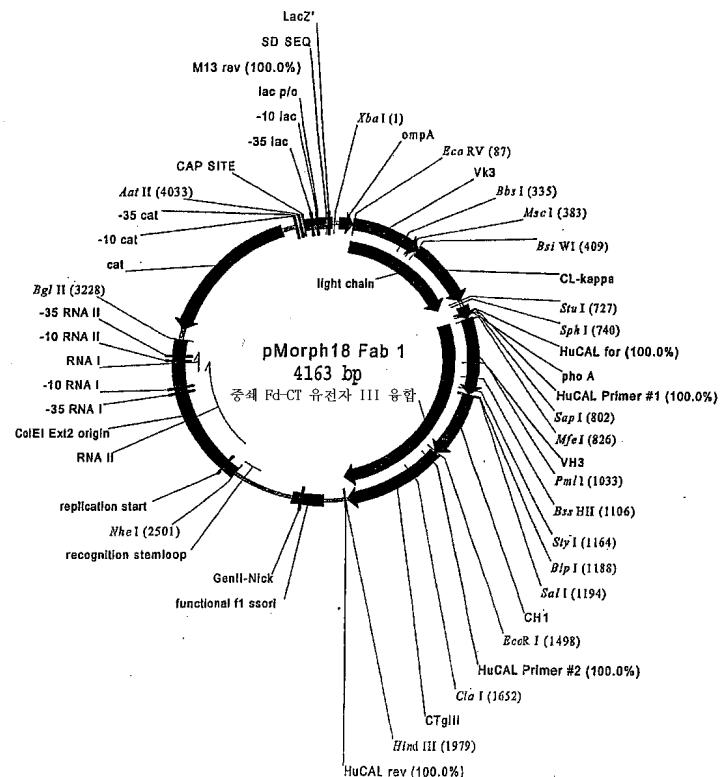
도면2c

서열 정보

	VH3-CDR3	이미노-서열
61	1	SATFIDY
62	2	NGTRMDV
63	3	GIVRGMDH
64	4	CGSRVDV
65	5	NTKSDV
66	6	GGTREDY
67	7	NGRNLDY
68	8	TATRFDY
69	9	KPFTGKYGHTGFDI
70	10	KPFTGKYGHTGFDI
71	11	NGLFRMDV
72	12	NLRMDV
73	13	NAVRMDV
74	14	NAMRMDV
75	15	NARMDV
76	16	NVRMDV
77	17	GGTRMDV
78	18	GGTRMDV
79	19	NGVRMDV
80	20	NGRMDV
	VL1-CDR3	
81	1	QSDTYERPMI
	VL2-CDR1	
82	1	TGTSSDRTRPDKYA
83	2	TGTSSDVSGLNIVS
	VL2-CDR3	
84	1	GSYDRAFKSV
85	2	GSYGIKKTE
86	3	GSYDMEARNI
87	4	GSYDRLYKLL
88	5	GSYDRAYRLL
89	6	GSYDERSRYA

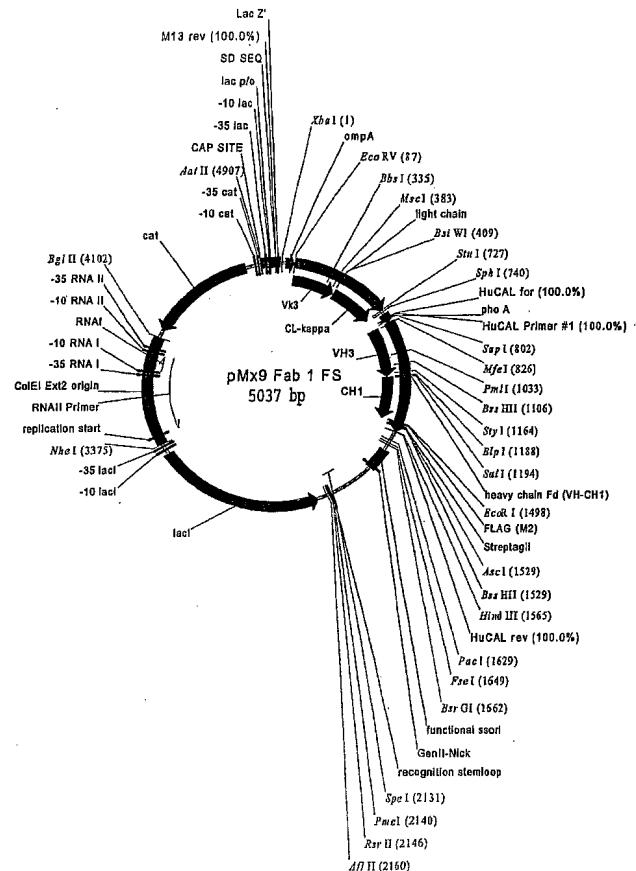
도면3

Fab 디스플레이 벡터 pMORPH18 Fab 1



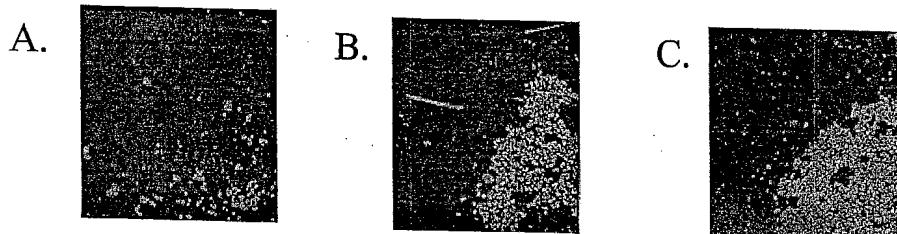
도면4

pMORPHx9_Fab1_FS 의 백터 지도



도면5

항-MN 항체 MN-3로의 세포부착 차단



A. 20 ug/mL Ab MN-3

B. 20 ug/mL 인간 감마 글로불린

C. 항체 처리 안함

도면6a

증쇄/경쇄 쌍

항체	증쇄/경쇄	BSA 표지된 인간 MN 프로테오글리칸 펩티드에 대한 BIACore에서의 대략의 친화도	프로테오글리칸 펩티드 B (1mg/ml)로의 ELISA 신호 억제	MN 세포 결합 검정법에서의 억제 (100 ug/ml Fab)
1	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-1	1.82E-06	75.00%	>95%
2	VH3-CDR3-2/VL2-CDR3-4	3.96E-08	93.00%	>95%
3	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-6	4.65E-09	74.00%	>95%
4	VH3-CDR3-4/VL2-CDR3-1	6.40E-06	75.00%	ND
5	VH3-CDR3-5/VL2-CDR3-1	8.56E-07	32.00%	ND
6	VH3-CDR3-6/VL2-CDR3-2	ND	40.00%	ND
7	VH3-CDR3-7/VL2-CDR3-5	ND	51.00%	ND
8	VH3-CDR3-1/VL1-CDR3-1	ND	73.00%	ND
9	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
10	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-2	ND	ND	ND
11	VH3-CDR3-9/VL1-CDR3-3	ND	ND	ND
12	VH3-CDR3-10/VL1-CDR3-1	ND	ND	ND
13	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	6.03E-08	ND	ND
14	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
15	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-4	9.00E-08	ND	ND
16	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-5	9.90E-08	ND	ND
17	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-6	ND	ND	ND
18	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-3	ND	ND	ND
19	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-2	ND	ND	ND
20	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-4	ND	ND	ND
21	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-5	ND	ND	ND
22	VH3-CDR3-3/VL2-CDR3-1	ND	ND	ND
ND = 측정되지 않음				

도면6b

증쇄/경쇄 쌍

항체	증쇄/경쇄 쌍	BSA 표지된 인간 MN 프로테오글리칸 펩티드에 대한 BIACore에서의 대략의 친화도	프로테오글리칸 펩티드 B (1mg/ml)로의 ELISA 신호 억제	MN 세포 결합 검정법에서의 억제 (100 ug/ml Fab)
23	VH3-CDR1-1/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	5.84E-09	ND	ND
24	VH3-CDR1-2/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.31E-09	ND	ND
25	VH3-CDR1-3/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	4.89E-09	ND	ND
26	VH3-CDR1-4/VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3	3.57E-09	ND	ND
27	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-1/VL2-CDR3-3	9.47E-09	ND	ND
28	VH3-CDR3-1/VL2-CDR1-2/VL2-CDR3-3	3.95E-09	ND	ND
29	VH3-CDR3-11/VL2-CDR3-4	8.19E-09	ND	ND
30	VH3-CDR3-12/VL2-CDR3-4	3.91E-09	ND	ND
31	VH3-CDR3-12/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
32	VH3-CDR3-13/VL2-CDR3-4	1.34E-09	ND	ND
33	VH3-CDR3-14/VL2-CDR3-4	1.23E-09	ND	ND
34	VH3-CDR3-15/VL2-CDR3-4	1.61E-09	ND	ND
35	VH3-CDR3-16/VL2-CDR3-4	1.31E-09	ND	ND
36	VH3-CDR3-17/VL2-CDR3-4	2.87E-09	ND	ND
37	VH3-CDR3-18/VL2-CDR3-4	2.82E-09	ND	ND
38	VH3-CDR3-19/VL2-CDR3-4	1.43E-09	ND	ND
39	VH3-CDR3-20/VL2-CDR3-4	1.55E-09	ND	ND
40	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-1	1.82E-08	ND	ND
41	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-2	5.70E-09	ND	ND
42	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-3	6.00E-10	ND	ND
43	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-4	N.D.	ND	ND
44	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-5	2.00E-09	ND	ND
45	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-6	6.00E-10	ND	ND
46	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-7	8.00E-10	ND	ND
47	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-8	4.10E-09	ND	ND
48	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-9	1.20E-09	ND	ND
49	VH3-CDR3-1/VL2-CDR3-3/VH3-CDR1-10	1.00E-09	ND	ND

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Corporation
Takeuchi, Toshi

<120> Human Antibodies That Have MN Binding and Cell Adhesion-Neutralizing Activity

<130> MSB-7289

<160> 83

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggatttacctt tagcgagag ggccatgacc

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggatttacctt tagcgccgc catgatgacg

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggatttacctt tagcgggag catgatggcc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggatttacctt tagcgactg ggcgatgacg

30

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tctgctactc gtttgatta t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

aatggtaactc gtatggatgt t

21

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 ggtattgttc gtggatggaa tcat

24

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ggtggttctc gttatgtatgt t

21

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

<400> 9
 aatattacta agtctgtatgt t

21

<210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ggtggtaactc gttttgatta t

21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 aatggtcgta atcttgatta t

21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 actgctactc gttttgatta t

21

<210> 13
 <211> 45
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aaggctttta ctggtaagta ttggggcat actggtttg atatt

45

<210> 14

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

aaacctttta ctggtaagta ttggggcat actggtttg atatt

45

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aatggcctgc gtatggatgt t

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

aatctgctgc gtatggatgt t

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aatgcgggtgc gtatggatgt t

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

aatgcgatgc gtatggatgt t

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aatgccctcc gtatggatgt t

21

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 aatgtgctgc gtatggatgt t

21

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 ggggggacgc gtatggatgt t

21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 cagggcaccc gtatggatgt t

21

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 aatggcgtgc gtatggatgt t

21

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 aatggcatcc gtatggatgt t

21

<210> 25
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 acgggtacta gcagcgatag gacgcgccccg ccgaagtacg cc

42

<210> 26
 <211> 42
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

acgggtacta gcagcgatgt gtccggcctc aacatcgtgt cc

42

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cagagccgtg actatgagaa gcctatgatt

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

cagagccgag actatgagaa gcctatgatt

30

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

cagagccgag actatgagaa gcctatgatt

30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

cagagctatg accgtgcttt taagtctgtt

30

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

cagagctatg accataagaa gactgag

27

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cagagctatg acatgtttgc tcgtgttatt

30

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 cagagctatg accgtcttta taagaagctt

30

<210> 34
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 cagagctatg accgggctta tcgacttctt

30

<210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 cagagctatg accgttctcg ttatgct

27

<210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 20 25 30

<210> 37
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 1 5 10

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro
1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Asn Gly Thr Arg Met Asp Val
1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Ile Val Arg Gly Met Asp His
1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Gly Ser Arg Tyr Asp Val
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Asn Ile Thr Lys Ser Asp Val
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Gly Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Asn Gly Arg Asn Leu Asp Tyr
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Thr Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Lys Pro Phe Thr Gly Lys Tyr Trp Gly His Thr Gly Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Gly Leu Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Asn Leu Leu Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Asn Ala Val Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Asn Ala Met Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 54

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

<400> 54

Asn Ala Leu Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Asn Val Leu Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Gly Thr Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Gly Thr Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Asn Gly Val Arg Met Asp Val
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Asn Gly Ile Arg Met Asp Val
1 5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Glu Arg Ala Met Thr
1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Ala Met Met Thr
1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Met Met Ala
1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Trp Ala Met Thr
1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ser Ala Thr Arg Phe Asp Tyr
1 5

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

Gln Ser Arg Asp Tyr Glu Lys Pro Met Ile
 1 5 10

<210> 66
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Arg Thr Arg Pro Pro Lys Tyr Ala
 1 5 10

<210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Ser Gly Leu Asn Ile Val Ser
 1 5 10

<210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Phe Lys Ser Val
 1 5 10

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Gln Ser Tyr Gly His Lys Lys Thr Glu
 1 5

<210> 70

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

<400> 70

Gln Ser Tyr Asp Met Phe Ala Arg Val Ile
 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Gln Ser Tyr Asp Arg Leu Tyr Lys Lys Leu
 1 5 10

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Ser Tyr Asp Arg Ala Tyr Arg Leu Leu
 1 5 10

<210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gln Ser Tyr Asp Arg Ser Arg Tyr Ala
 1 5

<210> 74
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 ggatttacct ttagcagcta tgcgatgagc

30

<210> 75
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 ggatttacct ttgtgaagag catggtggtg

30

<210> 76
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 76
ggatttacct ttagcaggaa cctgatgacc 30

<210> 77
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
ggatttacct ttgagcggtg gatggggcg 30

<210> 78
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 78
ggatttacct ttagcaggag gatgatggc 30

<210> 79
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 79
ggatttacct ttagcaggtg gatgatggc 30

<210> 80
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 80
ggatttacct ttagcgagag catgatgacg 30

<210> 81
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 81
ggatttacct ttagctggca catgatgacg 30

<210> 82
<211> 30
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

ggatttacct ttagctccgt gatgatgacg

30

<210> 83

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

ggatttacct ttagcgggag catgatgacg

30