



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0009174  
(43) 공개일자 2014년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 31/18 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7011891  
(22) 출원일자(국제) 2011년10월27일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2013년05월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/068905  
(87) 국제공개번호 WO 2012/055980  
국제공개일자 2012년05월03일  
(30) 우선권주장  
12/913,300 2010년10월27일 미국(US)

(71) 출원인  
피에르 파브르 메디카먼트  
프랑스, 에프-92100 볼로뉴-빌랑꾸르, 뿔라스 아  
벨-강스, 45  
(72) 발명자  
끌렝귀에르-앙무르, 크리스땅  
프랑스, 에프-74570 꼬로와시, 레 꼬팔레, 루트  
드 세 디오, 73  
(74) 대리인  
한인열

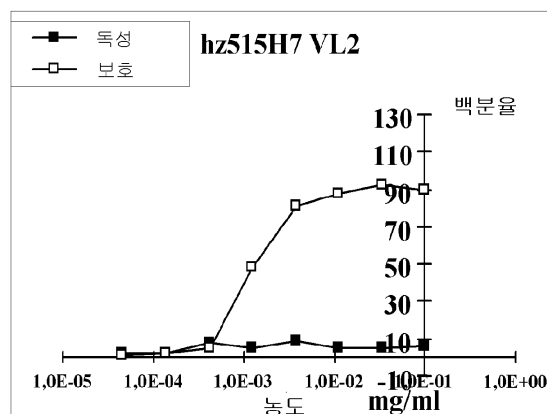
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 HIV의 치료를 위한 항체들

(57) 요약

본 발명은 CXCR4와 결합할 뿐만 아니라 CXCR4 동종이량체들(homodimers)의 입체형태적 변화를 유도할 수 있고 또한 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 복제를 저해할 수 있는 분리된 항체들, 또는 그들의 유도체들 또는 항원 결합 단편들에 관한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 CXCR4 단백질에 특이적인 515H7 및 301aE5 모노클론 항체들, 뿐만 아니라 HIV 감염의 치료를 위한 그들의 용도에 관한 것이다. 이러한 항체들을 포함하는 약제학적 조성물들 및 이러한 항체들의 선별 방법도 역시 포괄된다.

대표도 - 도23



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

IMGT 번호매김 체계 (IMGT numbering system)에 의해 정의된 바와 같은 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 30 내지 33의 아미노산 서열들을 포함하는 상보성 결정 부위들 (CDRs)로부터 선택된 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

서열번호 1, 2 및 3의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄; 또한 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하는, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 3

제 2항에 있어서,

서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 분리된 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 4

제 2항에 있어서,

키메라 항체이고, 서열번호 56, 57 또는 58로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 중쇄, 및 서열번호 59의 서열의 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 5

제 2항에 있어서,

인간화 항체이고, 서열번호 64로 이루어진 서열의 중쇄 가변 부위, 및 서열번호 65, 66, 82 또는 83으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 6

제 2항에 있어서,

인간화 항체이고, 서열번호 67, 68 또는 69로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 중쇄, 및 서열번호 70, 71, 84 또는 85로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 경쇄를 포함하는 인간화 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 7

제 2항에 있어서,

상기 기능적 단편은 단편 Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc, 다이아체들, 또는 화학적 변형에 의해 반감기가 증가되었던 단편이라면 모두로 구성되는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 8

제 7항에 있어서,

서열번호 54의 아미노산 서열을 포함하는 scFv인, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

### 청구항 9

제 1항에 있어서,

서열번호 1, 2 및 30의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄; 및 서열번호 31, 32 및 33의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서,

서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나.

#### 청구항 11

다음의 핵산들로부터 선택되는, 분리된 핵산:

- a) 제 1항 내지 제 10항의 어느 한 항에서 청구된 바와 같은 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나를 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- b) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45로 이루어진 CDRs 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- c) 서열번호 20, 21, 46, 47, 72, 73, 74, 86 및 87로 이루어진 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- d) 서열번호 60 내지 63, 서열번호 75 내지 79, 서열번호 88 및 89로 이루어진 중쇄 및 경쇄 서열의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- e) 서열번호 55로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- f) b), c), d) 또는 e)에 정의된 바와 같은 핵산들에 해당하는 RNA 핵산들;
- g) a), b), c), d) 또는 e)에 정의된 바와 같은 핵산들에 상보적인 핵산들; 또한
- h) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45의 서열의 CDRs의 적어도 하나와 높은 엄격도의 조건들 하에서 혼성화할 수 있는 적어도 18개의 뉴클레오타이드들의 핵산.

#### 청구항 12

제 11항에 청구된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 13

제 12항에 청구된 바와 같은 벡터를 포함하는 숙주세포.

#### 청구항 14

제 12항에 청구된 바와 같은 벡터에 의해 형질전환된 적어도 하나의 세포를 포함하는, 사람을 제외한 형질전환 동물 (transgenic animal).

#### 청구항 15

다음의 단계들을 포함하는, 제 1항 내지 제 10항의 어느 한 항에서 청구된 바와 같은 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나의 생산 방법:

- a) 제 13항에 청구된 바와 같은 세포 배지 및 적절한 배양 조건들에서의 배양; 또한
- b) 배양 배지 또는 상기 배양된 세포들로부터 출발하여 생산된, 상기 항체들 또는 그들의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 회수.

#### 청구항 16

제 15항에서 청구된 바와 같은 방법에 의해 획득가능한 또는 획득된 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도

체들의 하나.

#### 청구항 17

제 1항 내지 제 10항 또는 제 16항의 어느 한 항에 있어서,  
약제 (medicament)로서의 항체.

#### 청구항 18

제 1항 내지 제 10항, 또는 제 16항 내지 제 17항의 어느 한 항에 있어서,  
PBMC에서 HIV-1 KON 일차 분리물 복제를 적어도  $5 \mu\text{g/ml}$ , 바람직하게는 적어도  $10 \mu\text{g/ml}$ 의  $\text{IC}_{90}$  값으로 저해하는, 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나.

#### 청구항 19

제 1항 내지 제 10항 또는 제 16항 내지 제 18항의 어느 한 항에 청구된 바와 같은 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나로 구성되는 화합물을 활성 성분으로서 포함하는 조성물.

#### 청구항 20

제 19항에 있어서,  
약제로서의 조성물.

#### 청구항 21

제 19항 또는 제 20항에 있어서,  
HIV 감염의 예방을 위한 또는 치료를 위한 조성물.

#### 청구항 22

제 21항에 있어서,  
상기 HIV 감염은 X4-친화성 HIV 감염인, 조성물.

#### 청구항 23

제 21항에 있어서,  
상기 HIV 감염은 X4/R5-친화성 HIV 감염인, 조성물.

#### 청구항 24

제 19항 내지 제 23항의 어느 한 항에 있어서,  
HIV 침입 및/또는 복제를 특이적으로 저해할 수 있는 화합물들 중에서 선택되는 적어도 두 번째 항-HIV 화합물을 포함하는, 조성물.

#### 청구항 25

제 24항에 있어서,  
상기 적어도 두 번째 항-HIV 화합물은 HIV 단백질분해효소 저해제들 (PI), 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 HIV 역전사효소 저해제들 (NRTI/NtRTI), 비-뉴클레오사이드 HIV 역전사효소 저해제들 (NNRTI), HIV 침입 저해제들 (HIV entry inhibitors), HIV 삽입효소 저해제들 (HIV integrase inhibitors)와 같은 항-레트로바이러스성 약물들로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 조성물.

#### 청구항 26

제 24항 또는 제 25항에 있어서,

상기 적어도 두 번째 항-HIV 화합물은 항-CCR5 화합물인, 조성물.

#### 청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 항-CCR5 화합물은 마라비록 (Maraviroc)인, 조성물.

#### 청구항 28

다음의 단계들을 포함하는, CXCR4 길항제 항바이러스성 제제들로서 분자들을 검색하고 및/또는 확인하는 방법:

- CXCR4를 발현하는 세포를 선택하고;
- 상기 세포를 제 1항 내지 제 10항 또는 제 16항 내지 제 18항의 어느 한 항의 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나와 함께 배양시키고;
- CXCR4와, 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들의 하나 간의 결합을 잠재적으로 저해하는 테스트 분자들을 평가하고; 또한
- 상기 저해가 가능한 분자들을 선별한다.

#### 청구항 29

제 1항 내지 제 10항 또는 제 16항의 어느 한 항에 따른 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들, 및/또는 제 19항 내지 제 27항의 어느 한 항에 따른 조성물의 HIV 복제를 저해하는 약물의 제조를 위한 용도.

#### 청구항 30

제 1항 내지 제 10항 또는 제 16항의 어느 한 항에 따른 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들, 및/또는 제 19항 내지 제 27항의 어느 한 항에 따른 조성물의 HIV 질환 예방 또는 치료하는 약물의 제조를 위한 용도.

#### 청구항 31

제 1항 내지 제 10항 및 제 16항의 어느 한 항에 따른 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들, 및/또는 제 19항 내지 제 27항의 어느 한 항에 따른 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것으로 구성되는 단계를 포함하는, HIV 예방 또는 치료 방법.

#### 청구항 32

제 31항에 있어서,

상기 환자에게 항-CCR5 화합물을 투여하는 것으로 구성되는 단계도 역시 포함하는, 방법.

## 명세서

### 기술분야

본 발명은 새로운 항체들, 상세하게는 케모카인 수용체들 (chemokine receptors, CXCR)과 특이적으로 결합할 수 있는 마우스의 키메라 (chimeric) 또는 인간화 (humanized) 모노클론 항체들 (monoclonal antibodies)뿐만 아니라 이러한 항체를 코딩하는 아미노산 및 핵산 서열들에 관한 것이다. 한 가지 관점으로부터, 본 발명은 상기 CXCR4와 특이적으로 결합할 수 있고 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염에 대한 강한 활성을 가지는 새로운 항체들, 기능적 단편들 또는 유도체들에 관한 것이다. 또한 본 발명은 HIV 감염의 예방적 및/또는 치료적 처치를 위한 약제 (medicament)로서 이러한 항체들, 기능적 단편들 또는 유도체들의 용도를 포함한다.

### 배경기술

케모카인 (chemokines)은 케모카인 구배 (chemokine gradient)라고 알려져 있는 리간드의 화학적 구배를 따라

특히 면역 반응 시 백혈구의 이동을 조절하는 작은 분비 단백질이다 (Zlotnick A. *et al.*, 2000). 그들은 NH<sub>2</sub>-말단 시스테인 잔기의 위치에 기초하여 두 가지의 주요 서브패밀리, CC 및 CXC로 나누어지고, G 단백질과 연결된 수용체와 결합하며, 이들 두 가지 주요 서브패밀리는 CCR 및 CXCR 이라고 명명된다. 지금까지 50가지 이상의 인간 케모카인 및 18가지 이상의 케모카인 수용체가 발견되었다.

[0003] 케모카인 수용체 패밀리의 여러 구성원들은 세포 내로 다양한 HIV 제 1형 균주의 침입을 허용하도록 일차 수용체 CD4와 함께 보조-수용체 (co-receptors)로서 작용하고, 주요한 보조-수용체로는 CCR5 및 CXCR4를 들 수 있다. T-세포 친화성 X4 HIV-1은 세포 내로 침입을 위해 CD4 및 CXCR4를 사용하는 한편, 대식세포-친화성 R5 HIV-1은 CD4 및 CCR5를 사용한다. 이중-친화성 (dual-tropic) 균주는 보조-수용체로서 CXCR4 및 CCR5를 둘 다 사용할 수 있다. 기타 케모카인 수용체 중에서 CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR4는 HIV 균주의 더 제한된 소집합 (subset)의 에 의해 보조-수용체로서 작용할 수 있다.

[0004] CXCR4 뿐만 아니라 CCL3, CCL4, CCL4-L1의 천연 리간드이기도 한 SDF-1 및 CCR5에 대한 CCR5 리간드는 세포 융합 및 HIV-1의 다양한 균주에 의한 감염을 저해할 수 있다. 이들 연구는 CCR5-친화성 HIV-1에 의해 감염된 환자에서 다른 항-HIV-1 제제와 조합하여 케모카인 수용체를 표적하는 항-HIV 치료제 (therapeutics)의 개발을 독려하여 왔고, CCR5의 소분자 길항제 (small molecule antagonist)인 마라비록 (maraviroc, CELSENTRI<sup>®</sup>)의 승인을 가져왔다. 그럼에도 불구하고, 마라비록은 이중-친화성 HIV-1에 의해 감염된 환자 또는 CXCR4-친화성 HIV-1에 의해 감염된 환자 둘 다에서는 사용되지 않는다 (VIDAL 2009). 따라서 X4-친화성 HIV 복제를 저해할 수 있는 CXCR4 길항제를 확인함으로써 본 유형의 치료법을 X4-친화성 및 이중-친화성 HIV 감염된 환자 둘 다에 확장하는 것은 명확한 의학적 필요성이 있다.

[0005] 케모카인 수용체 4 [퓨진 (fusin), CD184, 레스터 (LESTR) 또는 험스터 (HUMSTR)라고도 알려져 있음]는 352개 또는 360개의 아미노산을 포함하는 두 가지 이소형들 (isoforms)로서 존재한다. Asn 11번 잔기는 당화되어 있고 Tyr 21번 잔기는 설페이트 그룹의 부가에 의해 변형되어 있으며 Cys 109번 및 186번은 수용체의 세포외 (extracellular) 부분 상에 디설파이드 연결 (disulfide bridge)로 결합되어 있다 (Juarez J. *et al.*, 2004).

[0006] 본 수용체는 서로 다른 종류의 정상 조직, 그대로의 (naive) 비-메모리 T-세포, 조절 T-세포, B-세포, 호중성구, 내피세포, 일차 단핵구, 가지 세포 (dendritic cells), 자연 킬러 세포, CD34+ 조혈 줄기세포에 의해, 또한 낮은 수준으로는 심장, 결장, 간, 신장 및 뇌에서 발현된다. CXCR4는 백혈구 포집 (trafficking), B 세포 백혈구 형성 (lymphopoiesis) 및 골수 형성 (myelopoiesis)에서 중요한 역할을 한다.

[0007] 지금까지 기술된 CXCR4 수용체의 독특한 리간드는 간질세포-유래 인자-1 (Stromal-cell-derived factor-1, SDF-1) 또는 CXCL12이다. SDF-1은 림프절, 골수, 간, 폐에서 다량으로 분비되고, 신장, 뇌 및 피부에 의해서는 보다 소량으로 분비된다. 또한 CXCR4는 인간 제 III형 허피스바이러스에 의해 인코딩되는 길항적 케모카인 (antagonistic chemokine)인 바이러스성 대식세포 염증 단백질 II (viral macrophage inflammatory protein II, vMIP-II)에 의해 인식된다.

[0008] 이전에 언급된 바와 같이, CXCR4 수용체는 T-세포-친화성 HIV-1 분리물들 (X4 바이러스들)을 위한 기본적인 보조-수용체이다. 본 수용체로 개입하는 것은 매우 효율적인 방식으로 X4 바이러스 복제를 저해하는 것이 될 것이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 발명적 관점의 하나는 HIV 복제를 저해하는 마우스 모노클론 항체들 (Mabs)을 생성하는 것이다. 본 발명은 CXCR4 동종이량체들 (homodimers)과 결합할 수 있고 HIV 감염에 대항하는 강한 활성을 가진 CXCR5 Mab 515H7 (또는 그의 단편들)를 포괄한다. 본 발명은 CXCR4 동종이량체들과 결합할 수 있고 HIV 감염에 대항하는 강한 활성들을 가진 CXCR5 Mab 301aE5 (또는 그의 단편들)도 역시 포괄한다.

[0010] 놀랍게도, 본 발명자들은 CXCR4와 결합할 수 있을 뿐만 아니라 CXCR4 동종이량체들의 입체형태적 변화 (conformational changes)를 유도할 수 있고 PBMC에서 일차 분리물 (primary isolate) X4-HIV-1 복제를 저해할 수 있는 모노클론 항체들을 생성하고자 하였다. 보다 상세하게, 본 발명의 항체들은 PBMC에서 일차 분리물 X4/R5-HIV-1 복제를 저해할 수 있는 것도 역시 가능하다.

# 과제의 해결 수단

- [0011] 바람직하게, 상기 CXCR4 화합물은:
- [0012] - 진뱅크 (Genebank) 기탁번호 제 NP\_003458호 하에 나타난 바와 같은 서열번호 27의 서열을 가지는 케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 4 이소형 b [호모 사피엔스]:
- MEGISIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGN  
GLVILVMGYQKKLRSM TD KYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFL  
CKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVG VWI  
PALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSC  
YCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIHKQGC EFE  
NTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILSKG  
KRGGHSSVSTESESSSFHSS;
- [0013]
- [0014] - 진뱅크 기탁번호 제 NP\_001008540호 하에 나타난 바와 같은 서열번호 28의 서열을 가지는 케모카인 (C-X-C 모티프) 수용체 4 이소형 a [호모 사피엔스]:
- MSIPLPLLQIYTSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGI  
VGNGLVILVMGYQKKLRSM TD KYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFG  
NFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVG  
VWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVI  
LSCYCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIHKQGC  
EFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSSLKILS  
KGKRGGHSSVSTESESSSFHSS;
- [0015]
- [0016] - 서열번호 27 또는 28을 가지는 이들 b 또는 a 이소형의 하나와 적어도 95% 일치도를 가지는 대안의 전사 스프라이싱 변형체 (transcriptional splice variant) 또는 그의 자연적 변형체; 또한
- [0017] - 그의 자연적 리간드 간질세포-유래 인자-1 (SDF-1)에 의해 특이적으로 인식될 수 있고 바람직하게는 적어도 100, 150 및 200개 아미노산의 길이를 가지는 그의 단편:으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 두 가지 인간 CXCR4 이소형들의 하나이다.
- [0018] CXCR2는:
- [0019] - 진뱅크 기탁번호 제 NP\_001548호 하에 나타난 바와 같은 서열번호 29의 서열을 가지는 인터루킨 8 수용체 베타 [호모 사피엔스]:
- MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLLD AAPCEPESLEINKYFVVIY  
ALVFLLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLP IWAASKV  
NGWIFGTF LCKVVSLLKEVNFYSGILL LACISVD RYLAIVHATR TL TQKRYLVKF
- [0020]
- ICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRILPQSF  
GFIVPLLIMLFCYGFTLRTL FKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLL  
ADTL MRTQVIQETCERNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKI  
LAIHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHTSTTL;
- [0021]
- [0022] - 서열번호 29을 가지는 본 인터루킨 8 수용체와 적어도 95% 일치도를 가지는 대안의 전사 스프라이싱 변형체 또는 그의 자연적 변형체; 또한



- [0023] - IL-8에 의해 특이적으로 인식될 수 있고 바람직하게는 적어도 100, 150 및 200개 아미노산의 길이를 가지는 그의 단편:으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0024] 본 발명은 또한 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 항-HIV 활성을 가지거나 HIV 감염의 치료를 위한 조성물의 제조에 사용될 수 있는 화합물을 선별하는 방법을 포함한다.
- [0025] 첫 번째 관점에서, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 항체를 생성하고 선별하는 방법이다.
- [0026] 보다 상세하게는, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, HIV 복제를 저해할 수 있고, 항-CXCR4 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나를 선별하는 방법에 관한 것이다:
- [0027] i) 생성된 항체들을 검색하여 CXCR4와 특이적으로 결합할 수 있는 항체들을 선별하고;
- [0028] ii) 단계 i)의 상기 선별된 항체들을 테스트하여 말단 혈액 단핵구 세포 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)와 결합할 수 있는 항체들을 선별하고;
- [0029] iii) 단계 ii)의 상기 선별된 항체들을 테스트하여 CXCR4 동종이량체와 결합할 수 있는 항체들을 선별하고; 또한 다음으로
- [0030] iv) 단계 iii)의 상기 선별된 항체들을 테스트하여 PBMC에서 일차 분리물 X4-친화성 HIV-1 복제를 저해할 수 있는 항체들을 선별한다.
- [0031] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, HIV 복제를 저해할 수 있고, 항-CXCR4 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나를 선별하는 방법에 관한 것이다:
- [0032] i) 생성된 항체들을 검색하여 CXCR4와 특이적으로 결합할 수 있는 항체들을 선별하고;
- [0033] ii) 단계 i)의 상기 선별된 항체들을 테스트하여 말단 혈액 단핵구 세포 (PBMC)와 결합할 수 있는 항체들을 선별하고;
- [0034] iii) 단계 ii)의 상기 선별된 항체들을 테스트하여 CXCR4 동종이량체와 결합할 수 있는 항체들을 선별하고; 또한 다음으로
- [0035] iv) 단계 iii)의 상기 선별된 항체를 테스트하여 PBMC에서 일차 분리물 X4-친화성 HIV-1 복제를 저해할 수 있고 및/또는 PBMC에서 일차 분리물 X4/R5-친화성 HIV-1 복제를 저해할 수 있는 항체들을 선별한다.
- [0036] 항체들의 생산은 예를 들어 면역화된 마우스 또는 선별된 마이엘로마 세포와 양립가능한 (compatible) 다른 종 (species)으로부터 나온 비장세포와 마이엘로마 세포의 융합과 같은 당업자가 숙지하고 있는 방법이라면 모두에 의해서 실현될 수 있다 [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497]. 면역화된 동물로는 인간 면역글로불린 좌위 (loci)를 가지고 직접적으로 인간 항체를 생산하는 형질전환 동물을 포함할 수 있다. 또 다른 가능한 구현예는 파지 디스플레이 기법들 (phage display technologies)을 사용하여 라이브러리들을 검색하는 것으로 이루어질 수 있다.
- [0037] 상기 검색하는 단계들 i) 및 ii)는 당업자가 숙지하고 있는 방법 또는 공정이라면 모두에 의해 실현될 수 있다. 비제한적인 예로서, 엘라자 (ELISA), BIAcore, 면역조직화학법 (immunohistochemistry), CXCR4 발현하는 세포막 추출물 또는 정제된 CXCR4를 사용하는 웨스턴 블롯 분석법, FACS 분석법 및 기능적 검색법 (functional screens)이 언급될 수 있다. 바람직한 방법은 생산된 항체가 표적 세포 표면에서 자연 그대로 (native) 수용체 입체형태도 역시 인식할 수 있을 것인지 확인하기 위하여 CXCR4 형질전환체 (단계 1) 및 적어도 PBMC (단계 2)에 관한 FACS 분석에 의한 검색으로 이루어진다. 본 방법은 다음의 실시예들에서 보다 상세하게 기술될 것이다.
- [0038] 상기 검색하는 단계 iii)은 당업자가 숙지하고 있는 방법 또는 공정이라면 모두에 의해 실현될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니지만 바람직한 예로서, CXCR4 형질전환 세포 또는 PBMC로부터 나온 막 추출물 상의 항체들을 사용하는 웨스턴 블롯팅 및/또는 면역-침전 기법들이 언급될 수 있다.
- [0039] 상기 검색하는 단계 vi)은 당업자가 숙지하고 있는 방법 또는 공정이라면 모두에 의해 실현될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니지만 바람직한 예로서, 홀 등 (Holl et al., J. Immunol. 2004, 173: 6274-83)에 의해 기술된 프로토콜을 사용하여 항체를 PBMC에서 X4 일차 HIV-1 및/또는 X4/R5 일차 HIV-1 분리물 복제를 저해하는 그들의 능력에 대해 검색하는 것으로 구성되는 방법이 언급될 수 있다.



- [0040] 본 발명의 선별 방법의 단계 iii)의 바람직한 구현예에서, 상기 단계 iii)은 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP를 발현하는 세포에 관한 BRET 분석법에 의해 항체를 평가하고 BRET 신호의 적어도 40%, 바람직하게 45%, 50%, 55% 또한 더욱 바람직하게는 60%를 저해할 수 있는 항체를 선별하는 것으로 이루어진다.
- [0041] BRET 기술학은 단백질 이중합 (dimerization)의 대표적인 것이라고 알려진 기법이다 [Angers *et al.*, PNAS, 2000, 97: 3684-89].
- [0042] 본 방법의 단계 iii)에 사용된 BRET 기술학은 당업자에게 잘 알려져 있으며 다음의 실시예들에서 상세하게 기술될 것이다. 보다 상세하게는, BERT (생물발광 공명에너지 전이, Bioluminescence Resonance Energy Transfer)은 생물발광 공여자 [레닐라 루시페라제 (Renila Luciferase, RLuc)] 및 형광 수여자인 GFP (녹색 형광 단백질, Green Fluorescent Protein) 또는 YFP (황색 형광 단백질, Yellow Fluorescent Protein)의 돌연변이 사이에 일어나는 비-방사성 에너지 전이이다. 본 경우에는 EYFP (증진된 황색 형광 단백질, Enhanced Yellow Fluorescent Protein)가 사용되었다. 전이의 효능 (efficacy of transfer)은 공여자와 수여자 간의 방향 및 거리에 의존한다. 따라서 에너지 전이는 두 개의 분자가 매우 근접한 거리 (1 내지 10 nm)에 있는 경우에만 일어날 수 있다. 본 특성은 단백질-단백질 상호작용 검정법 (interaction assay)을 개발하는 데 이용된다. 따라서, 두 개 파트너 간의 상호작용을 연구하기 위하여, 첫 번째 파트너는 레닐라 루시페라제와 또한 두 번째 파트너는 GFP의 황색 돌연변이와 유전적으로 융합된다. 융합 단백질들은 강제적인 것은 아니더라도 일반적으로 포유동물 세포에서 발현된다. RLuc는 그의 막투과성 기질 [실렌터라진 (coelenterazine)]의 존재 시 청색광을 방출한다. GFP 돌연변이가 RLuc로부터 10 nm 이내로 근접하는 경우 에너지 전이가 일어날 수 있고, 추가적인 황색 신호가 검출될 수 있다. BRET 신호는 수여자에 의해 방출되는 광 및 공여자에 의해 방출되는 광 간의 비율로서 측정된다. 따라서 BRET 신호는 두 가지 융합 단백질이 근접할수록 또는 입체형태적 변화가 RLuc 및 GFP 돌연변이를 근접하게 하는 경우라면 증가하게 될 것이다.
- [0043] BRET 분석법이 바람직한 구현예가 되는 경우라면, 당업자라면 숙지하고 있는 방법 모두가 CXCR4 이량체들의 입체형태적 변화를 측정하는 데 사용될 수 있다. 다음의 기법들은, 제한되지 않고 언급될 수 있다: FRET (형광 공명에너지 전이, Fluorescence Resonance Energy Transfer), HTRF (균질한 시간에 따른 형광, Homogenous Time resolved Fluorescence), FLIM (형광수명 영상 현미경 분석법, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) 또는 SW-FCCS (단일파장 형광 교차-상관 분광분석법, Single Wavelength Fluorescence Cross-Correlation spectroscopy).
- [0044] 또한 공동-면역침전법 (Co-immunoprecipitation), 알파 검색법 (alpha screen), 화학적 교차-연결법 (chemical cross-linking), 이중-하이드리드법 (Double-Hybrid), 친화 크로마토그래피 (affinity chromatography), 엘라 이자 (ELISA) 또는 파 웨스턴 블롯 (Far western blot)과 같은 다른 고전적인 기법도 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 방법의 상세한 관점에서, 단계 iii)는 CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP 둘 다를 발현하는 세포 상의 BRET 분석법에 의해 항체를 평가하고 BRET 신호의 적어도 40%를 저해할 수 있는 항체를 선별하는 것으로 구성된다.
- [0046] 두 번째 관점에서, 본 발명의 주제는 상기 방법으로 획득된 분리된 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나이다. 상기 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 인간 CXCR4에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 항체는 CXCR4 동종이량체들의 입체형태적 변화를 유도할 수 있다.
- [0047] CXCR4 Mabs와 유사한, 예를 들어 A120 클론은 HIV-1 실험실 균주 (X4 HIV-1<sub>NL4-3</sub>)의 PBMC 내로 침입을 저해할 수 있는 것이 문헌으로부터 알려져 있다 (Tanaka R. *et al.*, J. Virol. 2001, 75: 11534-11543). 더구나, CXCR4 Mabs는 CXCR4를 발현하는 세포주 내로 들어가는 HIV-1 X4 일차 분리물을 저해할 수 있다. 이와 반대로, 이러한 바이러스를 예로 실험실 바이러스 또는 세포주 상에서 뿐만 아니라 자연적 환경에서도 저해할 수 있는 항체는 전혀 기재된 바가 없었다. 그럼에도 불구하고, CXCR4 Mabs가 PBMC 내로 들어가는 HIV-1 X4 일차 분리물들을 저해할 수 있는 것은 본 발명의 새롭고도 자명하지 않은 관점이 된다.
- [0048] 용어 표현들 "기능적 단편들 및 유도체들 (functional fragments and derivatives)" 및 "항원 결합 단편들 및 유도체들 (antigen binding fragments and derivatives)"은 유사하고, 이후 본 명세서에서 상세하게 정의될 것이다.
- [0049] 본 발명은 천연 그대로 형태의 항체에 관한 것이 아니라, 다시 말해 그들은 자연 환경에 존재하지는 않지만 자연적 출처로부터 분리되거나 정제에 의해 획득될 수 있었거나 그 밖에도 유전적 재조합에 의해 또는 화학적 합성에 의해 획득될 수 있었으며, 하기 자세하게 기술될 것인 바와 같이 그들은 비-천연 아미노산들도 다시 포함

할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

- [0050] 보다 상세하게, 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, IMGT 번호매김 체계 (IMGT numbering system)에 의해 정의된 바와 같이 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 30 내지 33의 아미노산 서열을 포함하는 CDRs로부터 선택되는 적어도 하나의 상보성 결정 부위 (complementary determining region) CDR을 포함하는 것을 특징으로 하는, 분리된 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나가 청구된다.
- [0051] 첫 번째 관점에 따르면, 본 발명은 IMGT 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 서열번호 1 내지 6 서열의 CDRs 중에서 선택되는 적어도 하나의 CDR 또는 그의 서열이 서열번호 1 내지 6의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도 (identity)를 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 분리된 항체 또는 그의 기능적 단편 또는 유도체에 관한 것이다.
- [0052] 두 번째 관점에 따르면, 본 발명은 IMGT 번호매김 체계에 따라 정의된 바와 같이 서열번호 1, 2 및 서열번호 30 내지 33 서열의 CDRs 중에서 선택되는 적어도 하나의 CDR 또는 그의 서열이 서열번호 1, 2 및 서열번호 30 내지 33의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 분리된 항체 또는 그의 기능적 단편 또는 유도체에 관한 것이다.
- [0053] 항체의 "기능적 단편 (functional fragment)" 또는 "항원 결합 단편 (antigen binding fragment)"은 상세하게 Fv, scFv (sc = 단일 사슬), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' 또는 scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들 (diabodies), 또는 반감기가 증가될 수 있었던 단편이라면 모두와 같은 항체 단편을 의미한다. 이러한 기능적 단편들은 이후 본 발명의 상세한 설명에서 자세하게 기술될 것이다.
- [0054] 항체의 "유래 화합물 (derived compound)" 또는 "유도체 (derivative)"는 상세하게 펩타이드 스캐폴드 (scaffold) 및 CXCR4를 인식하는 능력을 보존하도록 고유 항체 (original antibody)의 적어도 하나의 CDRs로 구성되는 결합 단백질 (binding protein)을 의미한다. 이러한 유래 화합물들은 당업자에게 잘 알려져 있고 이후 본 발명의 상세한 설명에서 더욱 자세하게 기술될 것이다.
- [0055] 더욱 바람직하게, 본 발명은 유전적 재조합 또는 화학적 합성에 의해 획득되는, 명확하게 키메라 (chimeric) 또는 인간화 (humanized)된 본 발명에 따른 항체들, 그들로부터 유래된 화합물들 또는 그들의 기능적 단편들을 포함한다.
- [0056] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 모노클론 항체로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0057] "모노클론 항체 (monoclonal antibody)"는 거의 균질한 (nearly homogeneous) 항체의 집단으로부터 나온 항체를 의미하는 것으로 이해된다. 보다 상세하게는, 집단의 개별 항체는 최소의 비율로 발견될 수 있는 자연적으로 발생하는 가능한 돌연변이를 제외하고는 일치한다. 달리 말하면, 모노클론 항체는 단 하나의 세포 클론 (예를 들어, 하이브리도마, 균질한 항체를 코딩하는 DNA 분자로 형질전환된 진핵성 숙주세포, 균질한 항체를 코딩하는 DNA 분자로 형질전환된 원핵성 숙주세포 등등)의 성장으로부터 나오는 균질한 항체로 이루어지고, 일반적으로 한 가지 및 동일한 클래스와 서브클래스의 중쇄 그리고 단 한 가지 유형의 경쇄에 의해 특성이 결정된다. 모노클론 항체는 매우 특이적이고 단일 항원에게로 유도된다 (directed against). 또한, 통상적으로 서로 다른 결정기 (determinants) 또는 에피토프 (epitopes)에게로 유도되는 서로 다른 항체들을 포함하는 폴리클론 항체의 조제물과는 대조적으로, 각 모노클론 항체는 항원의 단일 에피토프에게로 유도된다.
- [0058] 보다 상세하게, 본 발명의 첫 번째 바람직한 구현예에 따르면, 항체 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기에서:
- [0059] - CDR-L1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고,
- [0060] - CDR-L2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고,
- [0061] - CDR-L3은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0062] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 서열번호 1, 2 또는 3 서열의 세 가지 CDRs의 적어도 하나, 또는 서열번호 1, 2 또는 3의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0063] 또한 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄를 포함하고, CDR-L1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-L2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-L3은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0064] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 7의 아미노산 서열, 또는 서열번호 7의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 서열의 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0065] 본 발명의 두 번째 바람직한 구현예에 따르면, 항체 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기에서:
- [0066] - CDR-L1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0067] - CDR-L2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0068] - CDR-L3은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0069] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 서열번호 1, 2 또는 30 서열의 세 가지 CDRs의 적어도 하나, 또는 서열번호 1, 2 또는 30의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0070] 또한 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄를 포함하고, CDR-L1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-L2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하며 CDR-L3은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0071] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 34의 아미노산 서열, 또는 서열번호 34의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 서열의 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0072] 보다 상세하게, 본 발명의 항체들 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기에서:
- [0073] - CDR-H1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0074] - CDR-H2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0075] - CDR-H3은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0076] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 서열번호 4, 5 또는 6 서열의 세 가지 CDRs의 적어도 하나, 또는 서열번호 4, 5 또는 6의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0077] 또 다른 특정한 구현예에 따르면, 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하고, CDR-H1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-H2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-H3는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0078] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 8의 아미노산 서열, 또는 서열번호 8의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 서열의 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0079] 보다 상세하게, 본 발명의 항체들 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로부터 선택되는 적어도 하나의 CDR을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하고, 여기에서:
- [0080] - CDR-H1은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0081] - CDR-H2는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하고,
  - [0082] - CDR-H3은 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0083] 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 서열번호 31, 32 또는 33 서열의 세 가지 CDRs의 적어도 하나, 또는 서열번호 31, 32 또는 33의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0084] 또 다른 특정한 구현예에 따르면, 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들의 하나는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하고, CDR-H1은 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-H2는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하고 CDR-H3는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0085] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 35의 아미노산 서열, 또는 서열번호 35의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 적어도 하나의 서열을 포함하는 서열의 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0086] 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 1, 2 및 3의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0087] 마지막으로, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 또한 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0088] 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 서열번호 1, 2 및 30의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 31, 32 및 33의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0089] 마지막으로, 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 또한 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0090] 본 발명의 상세한 설명에서, 용어들 " 폴리펩타이드 (polypeptides)", "폴리펩타이드 서열 (polypeptide sequences)", "펩타이드 (peptides)" 및 "항체 화합물에 또는 그들의 서열에 부착된 단백질"은 상호교환이 가능하다.
- [0091] 본 발명은 천연 그대로 형태의 항체들에 관한 것이 아니고, 예로 그들은 자연 환경으로부터 가져올 수는 없지만 자연적 출처로부터 분리되거나 정제에 의해 획득되거나 또는 유전적 재조합 또는 화학적 합성에 의해 획득되며, 따라서 하기에서 기술될 바와 같이 그들은 비천연 아미노산들도 보유할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0092] 첫 번째 구현예에서, 상보성-결정 부위 (complementarity-determining region), 또는 CDR은 카밧 등에 의해 정의된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 과다가변 부위 (hypervariable regions)를 의미한다 (Kabat *et al.*, 면역학적으로 흥미로운 단백질의 서열 (Sequences of proteins of immunological interest), 제 5판., 미국 보건복지부 (US Department of Health and Human Services), NIH, 1991, 및 이후 개정판). 세 가지의 중쇄 CDRs 및 세 가지의 경쇄 CDRs가 존재한다. 여기에서, 용어들 "CDR" 및 "CDRs"는 경우에 따라서 항체가 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 부여할 수 있는 대다수의 아미노산 잔기들을 포함하는 하나 이상의 부위 또는 심지어 모든 부위를 가리키는 데 사용된다.
- [0093] 두 번째 구현예에서는, CDR 부위 또는 CDR(s)에 의해 IMGT에 의해 정의된 바와 같이 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 과다가변 부위들 (hypervariable regions)를 가리키도록 의도한다.
- [0094] 독특한 IMGT 번호매김 체계 (IMGT unique numbering system)은 어떤 항원 수용체, 사슬 유형 또는 종이라도 가변 도메인을 비교할 수 있도록 정의되어 왔다 (Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M. P., Pommie C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)). 본 번호매김 체계에서, 보존되는 아미노산은 항상 23번 시스테인 (1st-CYS), 41번 트립토판 (보존되는 TRP), 89번 소수성 아미노산, 104번 시스테인 (2nd-CYS), 118번 페닐알라닌 또는 트립토판 (J-PHE 또는 TRP)과 같이 동일한 위치를 보유한다. 독특한 IMGT 번호매김 체계는 구조를 부위 (FR1-IMGT: 1 내지 26번 위치, FR2-IMGT: 39 내지 55번 위치, FR3-IMGT: 66 내지 104번 위치 및 FR4-IMGT: 118 내지 128번 위치) 또한 상보성 결정 부위 (CDR1-IMGT: 27 내지 38번 위치, CDR2-IMGT: 56 내지 65번 위치 및 CDR3-IMGT: 105 내지 117번 위치)의 표준화된 구획 (standardized delimitation)을 제공한다. "공간 (gaps)"은 채워지지 않은 위치를 나타내기 때문에, CDR-IMGT 길이 (괄호들 사이에 나타나고 점으로 분리됨, 예로 [8.8.13])는 결정적인 정보가 된다. 독특한 IMGT



체계은 IMGT 진주목걸이라고도 명명되는 [Ruiz, M. and Lefranc, M. P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. and Lefranc, M. P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] 2차원 그래픽 전시 및 IMGT/3D 구조-DB 에서의 3차원 구조 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M. P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)]에서 사용된다.

- [0095] 세 가지의 중쇄 CDRs 및 세 가지의 경쇄 CDRs가 존재한다. 본 명세서에서, 용어 CDR 및 CDRs는 경우에 따라 항체가 인식하는 항원 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 부여할 수 있는 대다수의 아미노산 잔기를 포함하는 이들 부위의 하나 이상 또는 심지어 이들 부위 전체를 가리키도록 사용된다.
- [0096] 자세하게 설명하자면, 다음의 상세한 설명에서 보다 상세하게 표 2 및 3에서 CDRs는 IMGT 번호매김 체계에 의해 및 카밧 번호매김 체계 (Kabat numbering system)에 의해 정의될 것이라고 이해되어야 한다.
- [0097] IMGT 번호매김 체계는 상기 정의된 바와 같이 IMGT 체계에 따라 CDRs를 정의하는 한편, 카밧 번호매김 체계는 상기 정의된 바와 같이 카밧 체계에 따라 CDRs를 정의한다.
- [0098] 보다 상세하게, 515H7이라고 명명되는 항체에 관하여, CDR-L1은 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 1로, 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 9로 구성된다. CDR-L2에 관하여, IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 2로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 10으로 구성된다. CDR-L3는 두 가지 번호매김 체계의 각 경우에서 서열번호 3으로 구성된다. 중쇄의 경우, CDR-H1은 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 4로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 11로 구성된다. CDR-H2는 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 5로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 12로 구성된다. 마지막으로, CDR-H3는 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 6으로 구성되는 한편 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 13으로 구성된다.
- [0099] 다음으로, 301aE5라고 명명되는 항체에 관하여, CDR-L1은 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 1로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 9로 구성된다. CDR-L2에 관하여, IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 2로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 36으로 구성된다. CDR-L3는 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 30으로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 37로 구성된다. 중쇄의 경우, CDR-H1은 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 31로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 38로 구성된다. CDR-H2는 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 32로 또한 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 39로 구성된다. 마지막으로, CDR-H3는 IMGT 번호매김 체계에서는 서열번호 33으로 구성되는 한편 카밧 번호매김 체계에서는 서열번호 40으로 구성된다.
- [0100] 본 발명의 의미에서, 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간 "일치도 백분율 (percentage identity)"는 최적의 정렬에 따라 획득되어 비교되는 두 개의 서열들 간에 일치하는 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 백분율은 의미하고, 본 백분율은 순수하게 통계적이고 이 두 서열들 간의 차이는 그들 서열을 통하여 무작위적으로 분포한다. 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간 서열 비교는 통상적으로 그들을 최적으로 정렬시킨 이후 서열들을 비교하여 수행되고, 상기 비교는 분절마다 또는 "정렬창 (alignment window)"을 사용하여 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은 수동적인 비교와 더불어 스미스 및 워터만의 로칼 상동성 알고리즘 (local homology algorithm) [Smith and Waterman (1981) Ad. App. Math. 2:482]에 의해, 네들만 및 운쉬의 로칼 상동성 알고리즘 [Neddleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]에 의해, 피어슨 및 립만의 유사도 조사 방법 (similarity search method)[Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]에 의해, 또는 이들 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 소프트웨어에 의해 (위스콘신 유전학 소프트웨어 패키지, 유전학 컴퓨터 그룹, 575 Science Dr., Madison, WI 에서의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 또는 비교 소프트웨어 BLAST N 또는 BLAST P 에 의해) 수행될 수 있다.
- [0101] 두 개의 핵산 또는 아미노산 서열들 간 일치도 백분율은 비교되는 핵산 또는 아미노산 서열이 이들 두 서열들 간 최적의 정렬을 위한 기준 서열 (reference sequence)과 대비하여 부가 (addition) 또는 결실 (deletion)을 포함할 수 있는 두 개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하여 결정된다. 일치도 백분율은 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기가 두 개 서열들 간에 일치하는 동일한 위치의 숫자를 결정하고, 동일한 위치의 숫자를 정렬창에서의 전체 위치 숫자로 나눈 다음 획득된 결과를 두 개 서열들 간 일치도 백분율을 얻기 위하여 100으로 곱하여 계산된다.
- [0102] 예를 들어, 웹 사이트 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> 상에서 입수가능한 BLAST 프로그램, "BLAST 2 서열들" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 서열- 단백질 및 뉴클레오타이드 서열을 비교하기 위한 새로운 도구", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174: 247-250)이 디폴트 매개변수들 (명확하게, 매개변수들 "오픈 갭 페널티 (open gap penalty)"의 경우: 5, 및 "연장 갭 페널티 (extension gap penalty)": 2; 선택된 매트릭스는 예를

들어 프로그램에 의해 제시되는 "BLOSUM 62" 매트릭스일 수 있음)와 함께 사용될 수 있고; 비교되는 두 개 서열들 간 일치도 백분율은 프로그램에 의해 직접 계산될 수도 있다.

[0103] 기준 아미노산 서열과 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도를 가지는 아미노산 서열로는, 기준 서열, 소정의 변형 (modifications), 명확하게 적어도 하나의 아미노산의 결실 (deletion), 부가 (addition) 또는 치환 (substitution), 절단 (truncation) 또는 연장 (extension)을 가지는 것들을 바람직한 예들로 들 수 있다. 하나 이상의 연속적 (consecutive) 또는 비-연속적 (non-consecutive) 아미노산(들)의 치환의 경우에서, 치환된 아미노산이 "동등한 (equivalent)" 아미노산에 의해 대체되는 치환이 바람직하다. 본 명세서에서 용어 표현 "동등한 아미노산들 (equivalent amino acids)"은 해당하는 항체들 및 하기 정의된 특정한 예들의 생물학적 활성을 근본적으로 변형시키지 않지만, 구조적 아미노산들의 하나가 치환될 수 있는 아미노산들이라면 모두를 가리키려고 의도한다.

[0104] 동등한 아미노산들은 치환되어진 아미노산들의 구조적 상동성 (structural homology)을 기초로 하거나 생성될 수 있는 다양한 항체들 간의 생물학적 활성의 비교 테스트 결과들을 기초로 하여 결정될 수 있다.

[0105] 비-제한적인 예로서, 하기 표 1 은 해당되는 변형된 항체의 생물학적 활성의 유의한 변형을 유발하지 않고도 수행될 수 있는 가능한 치환들을 정리하고 있고; 역 치환들 (inverse substitution)이 동일한 조건들 하에서 자연적으로 가능하다.

표 1

원 잔기	치환(들)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

[0106]

[0107] 특정한 구현예에서, 본 발명은 마우스 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들에 관한 것이다.

[0108] 상기 살펴본 바와 같이, 본 발명은 역시 본 발명에서 기술된 바와 같은 항체들로부터 유래한 화합물이라면 모두

에 관한 것이다.

- [0109] 보다 상세하게, 본 발명의 항체, 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 초기 항체의 파라토프 인식 (paratope recognition) 특성의 전부 또는 일부를 보존하는 방식으로 적어도 하나의 CDR가 이식된 펩타이드 스캐폴드 (peptide scaffold)를 포함하는 결합 단백질 (binding protein)로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0110] 본 발명에서 기술된 CDRs의 서열 중에서 하나 이상의 서열들은 면역글로불린의 다양한 단백질 스캐폴드 구조 상에도 역시 존재할 수 있다. 본 경우에, 단백질 서열은 이식된 CDRs의 접힘 (folding)에 유리한 펩타이드 골격을 재생산하는 것을 가능하게 하여, 그들이 파라토프 항원-인식 특성을 보존하게 한다.
- [0111] 일반적으로, 당업자는 고유 항체 (original antibody)로부터 나온 CDRs의 적어도 하나에 이식한 단백질 스캐폴드의 유형을 결정하는 방법을 잘 숙지하고 있을 것이다. 더욱 상세하게, 선택되어진 이러한 스캐폴드는 하기와 같은 판단 기준을 가장 많이 만족시켜야 하는 것으로 알려져 있다 (Skerra A., J. Mol. Recogn. 13, 2000, 167-187):
- [0112] - 좋은 계통유전학적 보존;
- [0113] - 기지의 삼차원 구조 (예를 들어, 결정학 (crystallography), NMR 분광분석 (NMR spectroscopy)) 또는 당업자가 숙지하고 있는 기타 다른 기법과 같음);
- [0114] - 작은 크기;
- [0115] - 전사후 변형 (post-transcriptional modification)이 아주 적거나 없음; 및/또는
- [0116] - 생산, 발현 및 정제의 용이성.
- [0117] 이러한 단백질 스캐폴드들의 기원은, 이에 제한되는 것은 아니지만 피브로넥틴 (fibronectin), 바람직하게는 피브로넥틴 제 III형 도메인, 리포칼린 (lipocalin), 안티칼린 (anticalin) (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4): 257-75), *스테필로코커스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*) 단백질 A의 도메인 B로부터 나온 단백질 Z, 티오레독신 A (thioredoxin A), "안킬린 반복서열 (ankylin repeat)" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), "아마딜로 반복서열 (amadillo repeat)", "루이신-풍부 반복서열 (leucine-rich repeat)", 또는 "테트라트릭코펩타이드 반복서열 (tetratricopeptide repeat)"과 같은 반복된 모티프를 가지는 단백질:로부터 선택되는 구조들일 수 있다.
- [0118] 예를 들어 전갈, 곤충, 식물, 연체동물 등으로부터 나온 하기 독소들 (toxins), 및 신경성 NO 합성효소 (neuronal NO synthase)의 단백질 저해제들 (PIN)와 같은 독소들로부터 유래한 스캐폴드들도 역시 언급되어야 한다.
- [0119] 이러한 하이브리드 구조물들의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 고유 항체와 동일한 결합 특성들을 유지하면서 획득되는 새로운 결합 단백질 (Bes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1): 334-344)인 항-CD4 항체, 즉 13B8.2의 CDR-H1 (중쇄)를 PIN 내의 루프들 하나에 삽입하는 것이 언급될 수 있다. 자세하게 설명하면, 네오카지노스타틴 (neocarzinostatin) (Nicaise *et al.*, Protein Science, 2004, 13(7): 1882-1891)의 루프 하나 상에 항-리소자임 VHH 항체의 CDR-H3 (중쇄)를 이식하는 것도 역시 언급될 수 있다.
- [0120] 마지막으로 상기에서 기술된 바와 같이, 이러한 펩타이드 스캐폴드는 고유 항체로부터 나온 적어도 하나의 CDR(s)를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 반드시 필요한 것은 아니지만 당업자라면 중쇄로부터 나온 적어도 하나의 CDR을 선택할 것이고, 후자는 항체의 특이성을 일차적으로 부여하는 것으로 알려져 있다. 하나 이상의 적절한 CDR(s)의 선택하는 것은 당업자에게 명백할 것이고, 당업자는 적합한 기지의 기법을 선택할 것이다 (Bes *et al.*, FEBS letters 508, 2001, 67-74).
- [0121] 본 발명의 특정한 관점은 본 발명에 따른 항체로부터 유래 화합물을 선별하는 방법에 관한 것으로서, 상기 유래 화합물은 *시험관내* 및/또는 *생체내* HIV 세포 침입을 저해할 수 있고, 상기 유래 화합물은 적어도 하나의 항체 CDR이 이식된 펩타이드 스캐폴드를 포함하며, 상기 방법은,
- [0122] a) 제 1형 HIV 및 PBMC를 포함하는 생물학적 시료를 사용하여 적어도 하나의 항체 CDR이 이식되어 있는 펩타이드 스캐폴드로 구성된 화합물을 *시험관내* 접촉하도록 두고; 또한
- [0123] b) 상기 화합물이 HIV-1 복제를 저해할 수 있는지 여부로 상기 화합물을 선별하는: 단계들을 포함하는 것을 특징으로 하고,



- [0124] 또한 상기 적어도 하나의 이식된 CDR은 다음의 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 30 내지 33의 서열 또는 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 30 내지 33의 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98% 일치도를 가지는 서열의 CDRs 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0125] 바람직한 방식에 따르면, 본 방법은 단계 a)에서 적어도 두 가지 또는 세 가지 항체 CDRs가 이식된 펩타이드 스캐폴드를 포함하는 화합물을 시험관내 접촉하게 두는 것을 포함한다.
- [0126] 본 발명의 보다 더 바람직한 방식에 따르면, 펩타이드 스캐폴드는 그의 구조들이 상기 언급되었던 스캐폴드들 또는 결합 단백질들 중에서 선택된다.
- [0127] 자명하게 이들 예는 제한되지 않고, 당업자가 숙지하고 있거나 당업자에게 자명한 기타 다른 구조는 본 특허 출원에 의해 부여되는 보호범위 내에 포괄되는 것으로 고려되어야 한다.
- [0128] 따라서 본 발명은 상기 펩타이드 스캐폴드가 a) 계통유전학적으로 잘 보존되고, b) 튼튼한 구조물로 이루어지며, c) 잘 알려진 삼차원 분자 조직화 (3-D molecular organization)를 가지고, d) 크기가 작으며 및/또는 e) 안정성 특성에 변화를 주지않고도 결실 및/또는 삽입에 의해 변형될 수 있는 부위를 포함하는 단백질들 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 항체, 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들에 관한 것이다.
- [0129] 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 항체, 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들은 상기 펩타이드 스캐폴드가 i) 바람직하게 제 3형 피브로넥틴의 도메인 10인 피브로넥틴, 리포칼린, 안티칼린, 스테팔로코커스 아우레우스의 단백질 A의 도메인 B로부터 나온 단백질 Z, 티오레독신 A, 또는 "안킬린 반복서열" (Kohl *et al.*, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), "아마딜로 반복서열", "루이신-풍부 반복서열", 및 "테트라트립토펙타이드 반복서열"과 같은 반복된 모티프를 가지는 단백질들로부터 나온 스캐폴드들, 또는 iii) 신경성 NO 합성효소의 단백질 저해제들 (PIN) 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0130] 본 발명의 또 다른 관점은 상기 기술된 항체의 기능적 단편들에 관한 것이다.
- [0131] 보다 상세하게, 본 발명은 상기 기능적 단편이 Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv, scFv-Fc 단편들 및 다이아체들, 또는 PEG화된 (PEGylated) 단편들과 같이 반감기가 증가되었던 단편이라면 모두로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체, 또는 그의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들을 지향한다.
- [0132] 본 발명에 따른 항체의 이러한 기능적 단편들은, 예를 들어 Fv, scFv (sc = 단일 사슬), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들, 또는 폴리에틸렌글리콜 ("PEG화 (PEGylation)")(PEG화된 단편은 Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG, Fab'-PEG라고 약칭된다)과 같은 폴리알킬렌글리콜의 첨가와 같은 화학적 변형에 의해, 또는 리포솜, 미세구 (microspheres) 또는 PLGA 내의 삽입에 의해 반감기가 증가되었던 단편이라면 모두로 구성되고, 상기 단편은 그들이 나온 항체의 활성을 일반적 방식으로, 심지어 부분적으로라도 명확하게 나타낼 수 있는 본 발명의 특징적인 CDRs의 적어도 하나를 가진다.
- [0133] 바람직하게, 상기 기능적 단편들은 그들이 유래한 항체의 다양한 중쇄 또는 경쇄의 부분적 서열로 구성되거나 이를 포함할 것이며, 상기 부분적 서열은 그것이 유래한 항체와 동일한 결합 특이도 (binding specificity)를 보유하면 충분하고, 친화도 (affinity)는 바람직하게는 적어도 100분의 1, 더 바람직하게는 적어도 10분의 1에 해당하는 것이면 충분하다.
- [0134] 이러한 기능적 단편은 그것이 나온 항체의 서열의 적어도 5개의 아미노산들, 바람직하게는 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 또는 100개의 연속적 아미노산들을 포함할 것이다.
- [0135] 바람직하게, 이들 기능적 단편들은 Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 유형 또는 다이아체들일 것이고, 이들은 일반적으로 그들이 획득된 항체와 동일한 결합 특이도를 갖는다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 항체의 단편은 상기 기술된 항체들로부터 시작하여 펩신 (pepsin) 또는 파파인 (papain)을 포함하는 효소적 소화와 같은 방법에 의해 및/또는 화학적 환원에 의한 디설파이드 연결의 절단에 의해 획득될 수 있다. 또한 항체 단편들은 당업자에게도 잘 알려져 있는 재조합 유전학적 기법에 의해 또는 예를 들어 어플라이드 바이오시스템사 (Applied Biosystems) 등이 시판하는 것과 같은 자동 펩타이드 합성기 (automatic peptide synthesizers)에 의한 펩타이드 합성에 의해 획득될 수 있다.
- [0136] 자세하게 설명하면, 하기 표 2는 본 발명의 항체들에 해당하는 다양한 아미노산 서열들을 정리하고 있다. (여기에서 Mu.= 마우스)

표 2

항체	CDR 번호매김	중쇄	경쇄	서열번호
515H7	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	카뱃		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		13
			Mu. 가변 도메인	7
		Mu. 가변 도메인		8
301aE5	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	30
		CDR-H1		31
		CDR-H2		32
		CDR-H3		33
	카뱃		CDR-L1	9
			CDR-L2	36
			CDR-L3	37
		CDR-H1		38
		CDR-H2		39
		CDR-H3		40
			Mu. 가변 도메인	34
		Mu. 가변 도메인		35

[0137]

[0138] 본 발명의 항체들의 상세하고 중요하며 추가적인 관점은 그들이 항체-의존성 세포 독성 (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC, complement dependent cytotoxicity) 와 같은 효과기 기능들 (effector function)을 나타내지 않는 것이다.

[0139] 보다 상세하게, 예로서 본 발명의 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 FcγR (제 I형, 제 II형 또는 제 III형) 또는 C1q, 또는 이들 둘 다에 대해 친화도를 전혀 가지지 않는다.

[0140] 구조적으로 이것은 당업자에게 본 발명의 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나가 Fc 부분이 결여되거나 그들의 Fc 부분이 효과기 기능을 부여할 수 있는 정확한 당화 (glycosylation)를 나타내지 못하는 것을 의미한다.

[0141] 이것의 결론은 본 발명의 항체들이 바람직하게 IgG4 또는 IgG2 이소형들, 더욱 바람직하게는 IgG4 이소형들로부터 선택되는 것이라는 점이다.

[0142] 유사하게, 바람직한 단편들은 Fv, scFv (단일 사슬의 경우 sc), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc 단편들 또는 다이아체들, 또는 폴리에틸렌글리콜 ("PEG화")(Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG, Fab'-PEG라고 불리는 PEG화된 단편들)(폴리(에틸렌)글리콜의 경우 "PEG")과 같은 폴리(알킬렌)글리콜의 첨가와 같은 화학적 변형에 의해, 또는 리포솜 내의 삽입에 의해 반감기가 증가되었던 단편이라면 모두와 같이 ADCC가 결여된 단편들이다.

[0143] 보다 상세하게, 항체 515H7으로부터 유래한 본 발명의 바람직한 기능적 단편은 이하 515H7 scFv-Ck 단편이라고 명명되는 scFv이고 서열번호 54의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0144] 상기 scFv에 해당하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 55의 서열을 포함한다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 상세한 관점은 상기 항체가 마우스, 명확하게 사람과 이종 (heterologous)인 종의 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄 불변 부위들도 역시 포함하는 것을 특징으로 하는, 키메라 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들에 관한 것이다.
- [0146] 본 발명의 보다 또 다른 상세한 관점은 인간 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들이 각각 램다 또는 카파 부위 및 감마-2 또는 바람직하게는 감마-4 부위인 것을 특징으로 하는 인간화 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들에 관한 것이다.
- [0147] 또한 본 발명의 항체는 키메라 또는 인간화 항체들을 포함한다.
- [0148] 키메라 항체는 해당 종의 항체로부터 유래된 자연적 가변 부위 (경쇄 및 중쇄)를 상기 주어진 종과 이종인 종의 항체 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들과 조합하여 포함하는 것이다.
- [0149] 본 항체들, 또는 그들의 키메라 단편들은 재조합 유전학의 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체는 프로모터 및 본 발명의 비인간, 명확하게 마우스의 모노클론 항체의 가변 부위를 코딩하는 서열, 및 인간 항체의 불변 부위를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 DNA를 클로닝하는 것에 의해 생산될 수 있다. 이러한 재조합 유전자에 의해 인코딩되는 본 발명에 따른 키메라 항체는 예를 들어 마우스-인간 키메라일 수 있고, 본 항체의 특이도는 마우스 DNA로부터 유래한 가변 부위에 의해 결정되고 그의 이소형은 인간 DNA로부터 유래한 불변 부위에 의해 결정된다. 키메라 항체들을 제조하는 방법에 관해서는, 버호인 등의 문헌 (Verhoeven *et al.*, BioEssays, 8: 74, 1988)을 참조하라.
- [0150] 하기 본 명세서에서 표 3은 본 발명에 따른 키메라 항체 515H7 (c515H7 또는 C515H7이라고도 명명됨)의 다양한 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열들을 정리하고 있다. (여기에서 c = 키메라)

표 3

항체 c515H7	중쇄	경쇄	서열 번호
완전한 서열 (신호 펩타이드 없음)	cVH (G4wt)	-	56
	cVH (G4PRO)	-	57
	cVH (G2 wt)	-	58
	-	cVL-Ck	59

- [0151]
- [0152] 상기 항체 c515H7의 서열번호 56 내지 58의 중쇄 및 서열번호 59의 경쇄에 해당하는 뉴클레오타이드 서열은 각각 서열번호 60 내지 63 (중쇄) 및 서열번호 64 (경쇄)에 해당한다.
- [0153] 바람직한 구현예에서, 중쇄 서열들은 그들의 C-말단 라이신 잔기로부터 결실된다 (론자사 (Lonza)로부터 나온 pConPlus 벡터 시리즈에서 발견되는 바와 같음: pConPlus  $\gamma$  4 $\Delta$ K, pConPlus  $\gamma$  4PRO $\Delta$ K 및 pConPlus  $\gamma$  2 $\Delta$ K).
- [0154] 더우기, G4PRO 중쇄는 절반-항체 (half-antibodies)의 형성을 피하도록 힌지 부위 (Hinge region)에서 돌연변이를 보유하는 인간 IgG4 이소형에 해당한다. 이돌연변이는 론자사로부터 나온 부모 pConPlus  $\gamma$  4PRO $\Delta$ K 에서 발견된다 [Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D., Roberts G., Pedley B., Adair J. R. 단일 아미노산 치환은 키메라 마우스/인간 (IgG4) 항체의 이질성 (heterogeneity)을 없앤다 Mol. Immunol. (1993) 30(1): 105-108].
- [0155] 보다 상세하게, 본 발명은 서로 다른 포유동물 종들로부터 유래한 항체의 해당 CDRs과 동종의 CDRs를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 4, 5 및 6의 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어지는 키메라 항체 중쇄에 관한 것이다.
- [0156] 보다 상세하게, 본 발명은 서로 다른 포유동물 종으로부터 유래한 항체의 해당 CDRs과 동종의 CDRs를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 1, 2 및 3의 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어지는

키메라 항체 경쇄에 관한 것이다.

- [0157] 보다 상세하게, 본 발명은 서로 다른 포유동물 종으로부터 유래한 항체의 해당 CDRs과 동종의 CDRs를 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 4, 5 및 6의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3를 포함하는 중쇄; 및 서열번호 1, 2 및 3의 아미노산 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄;를 포함하는 것을 특징으로 하는 키메라 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0158] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 8로 이루어진 서열의 중쇄 가변 부위 및 서열번호 7 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는 키메라 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0159] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 56, 57 또는 58로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 중쇄 및 서열번호 59의 경쇄를 포함하는 키메라 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0160] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 서열번호 56 서열의 중쇄 가변 부위 및 서열번호 59 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 본 발명에 따른 키메라 항체 c515H7 VH(G4wt) / VL-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0161] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 서열번호 57 서열의 중쇄 가변 부위 및 서열번호 59 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 본 발명에 따른 키메라 항체 c515H7 VH(G4PRO) / VL-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0162] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 서열번호 58 서열의 중쇄 가변 부위 및 서열번호 59 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 본 발명에 따른 키메라 항체 c515H7 VH(G2wt) / VL-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0163] "인간화 항체 (humanized antibodies)"는 비-인간 기원의 항체로부터 유래한 CDR 부위들, 하나의 (또는 여럿의) 인간 항체들로부터 유래한 항체 분자의 다른 부분들을 포함하는 항체를 의미한다. 또한, 골격의 분절 잔기들의 일부 (FR이라고 불림)는 결합 친화도를 보존하도록 변형될 수 있다 (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327, 1988).
- [0164] 본 발명의 인간화 항체들 또는 그들의 단편들은 당업자가 숙지하고 있는 기법들에 의해 제조될 수 있다 (예를 들어, Singer *et al.*, J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; 및 Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10:169-175, 1992의 문헌들에 기술되어 있는 것과 같음). 이러한 인간화 항체들은 시험관내 진단이 관여하는 방법에서 또는 생체내 예방적 및/또는 치료적 처치에 사용하는 데 바람직하다. 기타 인간화 기법들도 역시, 예를 들어 유럽 특허 제 EP 0 451 216호, 제 EP 0 682 040호, 제 EP 0 939 127호, 제 EP 0 566 647호 또는 미국 특허 제 US 5,530,101호, 제 US 6,180,370호, 제 US 5,585,089호 및 제 US 5,693,761호 특허들로 PDL에 의해 기술된 "CDR 이식 (CDR Grafting)" 기법과 같은 선행기술로 당업자라면 잘 숙지하고 있다. 미국 특허 제 US 5,639,641호, 제 US 6,054,297호, 제 US 5,886,152호 및 제 US 5,877,293호도 역시 인용될 수 있다.
- [0165] 또한, 본 발명은 상기 기술된 마우스 항체로부터 나온 인간화 항체들에 관한 것이기도 하다.
- [0166] 바람직한 방식으로, 인간 항체로부터 유래한 경쇄 및 중쇄의 불변 부위들은 각각 램다 또는 카파, 또한 감마-2 바람직하게 감마-4 부위일 수 있다.
- [0167] 보다 상세하게, 본 발명은 i) 인간 항체 중쇄의 해당 구조를 부위에 동종인 구조를 부위, 및 ii) 서로 다른 포유동물 종으로부터 유래한 항체의 해당 CDRs에 동종인 CDRs를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 4, 5 및 6의 서열을 각각 포함하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어진 것을 특징으로 하는 인간화 항체 중쇄에 관한 것이다.
- [0168] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 64로 이루어진 서열의 가변 부위를 포함하는 인간화 항체 중쇄에 관한 것이다.
- [0169] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 67, 68, 69 및 95로 이루어진 그룹으로부터 선택된 완전한 서열을 포함하는, 인간화 항체 중쇄에 관한 것이다.
- [0170] 보다 상세하게, 본 발명은 i) 인간 항체 경쇄의 해당 구조를 부위에 동종인 구조를 부위, 및 ii) 서로 다른 포유동물 종으로부터 유래한 항체의 해당 CDRs에 동종인 CDRs를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 1,

2 및 3의 서열을 각각 포함하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 것을 특징으로 하는, 인간화 항체 경쇄에 관한 것이다.

- [0171] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 65, 66, 82 또는 83으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 가변 부위를 포함하는, 인간화 항체 경쇄에 관한 것이다.
- [0172] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 70, 71, 84 또는 85로 이루어진 그룹으로부터 선택된 완전한 서열을 포함하는 인간화 항체 경쇄에 관한 것이다.
- [0173] 보다 상세하게, 본 발명은 i) 인간 항체의 해당 구조를 부위에 동종인 구조를 부위들, 및 ii) 서로 다른 포유동물 종으로부터 유래한 항체의 해당 CDRs에 동종인 CDRs를 각각 가지는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 상기 CDRs는 IMGT에 따라 서열번호 4, 5 및 6의 서열을 각각 포함하는 중쇄의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 이루어지고, 또한 서열번호 1, 2 및 3의 서열을 각각 포함하는 경쇄의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 이루어진 것을 특징으로 하는, 인간화 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0174] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 64로 이루어진 서열의 중쇄 가변 부위 및 서열번호 65, 66, 82 또는 83으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 경쇄 가변 부위를 포함하는, 인간화 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0175] 보다 또 다른 구현예에서, 본 발명은 서열번호 67, 68, 69 또는 95로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 중쇄, 및 서열번호 70, 71, 84 또는 85로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열의 경쇄를 포함하는, 인간화 항체, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편에 관한 것이다.
- [0176] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 67 서열의 중쇄, 및 서열번호 70 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0177] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 68 서열의 중쇄, 및 서열번호 70 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0178] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 69 서열의 중쇄, 및 서열번호 70 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0179] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.1-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 67 서열의 중쇄, 및 서열번호 71 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0180] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4PRP) / VL2.1-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 68 서열의 중쇄, 및 서열번호 71 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0181] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.1-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 69 서열의 중쇄, 및 서열번호 71 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0182] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 67 서열의 중쇄, 및 서열번호 84 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0183] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 68 서열의 중쇄, 및 서열번호 84 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0184] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.2-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 69 서열의 중쇄, 및 서열번호 84 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0185] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4wt) / VL2.3-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 67 서열의 중쇄, 및 서열번호 85 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0186] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G4PRO) / VL2.3-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 68 서열의 중쇄, 및 서열번호 85 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0187] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 인간화 항체 H515H7 VH1 D76N (G2wt) / VL2.3-Ck, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편은 서열번호 69 서열의 중쇄, 및 서열번호 85 서열의 경쇄를 포함한다.
- [0188] 본 명세서에서 하기 표 4는 본 발명에 따른 인간화 항체 515H7의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인들 및 전장 (또는 완전한 길이) 각각의 아미노산 서열을 정리하고 있다. (여기에서 H5 = 인간화)



표 4

항체 Hz515H7	중쇄	경쇄	서열번호
가변 도메인	VH1 D76N	-	64
	-	VL2	65
	-	VL2.1	66
	-	VL2.2	82
	-	VL2.3	83
완전한 서열 (신호 펩타이드 없음)	VH1 D76N (G4wt)	-	67
	VH1 D76N (G4PRO)	-	68
	VH1 D76N (G2 wt)	-	69
	-	VL2-Ck	70
	-	VL2.1-Ck	71
	-	VL2.2-Ck	84
	-	VL2.3-Ck	85

[0189]

[0190]

바람직한 구현예에서, 중쇄 서열은 그들의 C-말단 라이신 잔기로부터 결실된다 (론자사로부터 나온 pConPlus 벡터 시리즈에서 발견되는 바와 같음: pConPlus γ 4ΔK, pConPlus γ 4PROΔK 및 pConPlus γ 2ΔK).

[0191]

더우기, G4PRO 중쇄는 절반-항체의 형성을 피하도록 힌지 부위에서 돌연변이를 보유하는 인간 IgG4 이소형에 해당한다. 본 돌연변이는 론자사로부터 나온 부모 pConPlus γ 4PROΔK에서 발견된다 [Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D., Roberts G., Pedley B., Adair J. R. 단일 아미노산 치환은 키메라 마우스/인간 (IgG4) 항체의 이질성을 없앤다. Mol. Immunol. (1993) 30(1): 105-108].

[0192]

상세하게, 본 명세서에서는 인간 IgG4 이소형의 중쇄를 포함하고, 상기 중쇄는 서열번호 95로 표시되는 서열을 가지는, hz515H7 IgG4로 명명되는 인간화 항체가 제공된다.

[0193]

예로서, 혼란을 피하기 위해서, 용어 표현 "VH1"은 용어 표현들 "VH 변형체 1 (VH Variant 1)", "VH 변형체 1 (VH variant 1)", "VH Var 1" 또는 "VH var 1"와 유사하다.

[0194]

상기 예시된 VH/VL 조합은 이에 제한되는 것이 아니라고 이해되어야 한다. 당업자라면 당연히 부당한 부담을 지지 않고도 또한 발명적 기술을 적용하지 않더라도 본 명세서에 기재된 모든 VH 및 VL 을 재배열 (rearrange) 할 수 있다.

[0195]

본 발명의 새로운 관점은 하기 핵산들 (중복성 유전 암호 (degenerative genetic code)라면 모두를 포함함) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산에 관한 것이다:

[0196]

a) 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나를 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;

[0197]

b) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45로 이루어진 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;

[0198]

c) 서열번호 20, 21, 46 및 47로 이루어진 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;

[0199]

d) b) 또는 c)에서 정의된 바와 같은 핵산에 해당하는 RNA 핵산

[0200]

e) a), b) 및 c)에서 정의된 바와 같은 핵산에 상보적인 핵산; 또한

[0201]

f) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45 서열의 CDRs의 적어도 하나와 높은 엄격도의 조건들 하에서 혼성화할 수 있는 적어도 18개 뉴클레오타이드들의 핵산.

[0202]

하기 표 5는 본 발명의 항체들에 관한 다양한 뉴클레오타이드 서열들을 정리하고 있다.

표 5

항체	CDR 번호매김	중쇄	경쇄	서열번호
515H7	IMGT		CDR-L1	14
			CDR-L2	15
			CDR-L3	16
		CDR-H1		17
		CDR-H2		18
		CDR-H3		19
	카뱃		CDR-L1	22
			CDR-L2	23
			CDR-L3	16
		CDR-H1		24
		CDR-H2		25
		CDR-H3		26
301aE5	IMGT		Mu. 가변 도메인	20
		Mu. 가변 도메인		21
	카뱃		CDR-L1	41
			CDR-L2	15
			CDR-L3	42
		CDR-H1		43
	카뱃	CDR-H2		44
		CDR-H3		45
			CDR-L1	48
			CDR-L2	49
			CDR-L3	50
		CDR-H1		51
	카뱃	CDR-H2		52
		CDR-H3		53
			Mu. 가변 도메인	46
		Mu. 가변 도메인		47

[0203]

[0204]

본 발명의 상세한 설명에서 상호교환적으로 사용되는 용어들 "핵산 (nucleic acid)", "핵산 서열 (nucleic sequence)", "핵산 서열 (nucleic acid sequence)", "폴리뉴클레오타이드 (polynucleotide)", "올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)", "폴리뉴클레오타이드 서열 (polynucleotide sequence)" 및 "뉴클레오타이드 서열 (nucleotide sequence)"은 변형 여부에 상관없이 핵산의 단편 또는 부위를 정의하며 비천연 뉴클레오타이드를 포함하기도 하고 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA 또는 상기 DNAs의 전사 산물로 존재하는 뉴클레오타이드들의 명확한 서열을 의미한다.

[0205]

또한 본 명세서에서 본 발명은 그들의 자연적 염색체 환경에서, 예로 자연적 상태에서의 뉴클레오타이드 서열에 관한 것이 아니라는 점이 포함되어야 한다. 본 발명의 서열은 이미 분리되어 및/또는 정제되었고, 다시 말해 예를 들어 복제에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 시료수집되었으며, 그들의 환경은 적어도 부분적으로는 변형되었던 것이다. 본 명세서에서는, 예를 들어 숙주세포를 사용하는 유전적 재조합에 의해 획득되거나 또는 화학적 합성에 의해 획득되는 분리된 핵산들도 역시 언급되어야 한다.

[0206]

"바람직한 서열과 최적의 정렬 이후에 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 90%, 95% 및 98%의 일치도 백분율을 나타내는 핵산 서열들"은 기준 핵산 서열에 대하여 상세하게 결실 (deletion), 절단 (truncation), 연장 (extension), 키메라 융합 (chimeric fusion) 및/또는 치환 명확하게 점 치환 (punctual substitution))과 같은 소정의 변형을 나타내는 핵산 서열을 의미한다. 바람직하게, 그들은 유전적 암호의 중복성 (degeneracy)과 관련이 있는 기준 서열과 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 서열 또는 기준 서열과, 바람직하게는 높은 엄격도 명확하게 하기 본 명세서에서 정의된 조건 하에서 특이적으로 혼성화할 수 있는 상보적인 서열이다.



- [0207] 높은 엄격도의 조건들 하에서의 혼성화는 온도 (temperature) 및 이온 강도 (ionic strength)에 관한 조건이 그들이 두 가지 상보적인 DNA 단편들 간에 혼성화를 유지하도록 하는 방식으로 선별되는 것을 의미한다. 자세하게 설명하면, 상기에서 기술된 폴리뉴클레오타이드 단편들을 정의하려는 목적으로 혼성화 단계의 높은 엄격도 조건들은 유리하게 다음과 같다.
- [0208] DNA-DNA 또는 DNA-RNA 혼성화는 두 단계들로 수행된다: (1) 5 x SSC (1 x SSC는 0.15 M NaCl + 0.015 M 소듐 사이트레이트 용액에 해당한다), 50% 포름아마이드, 7% 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 10 x 덴하르트 용액 (Denhardt's), 5% 텍스트란 설페이트, 1% 연어정자 DNA를 포함하는 포스페이트 완충용액에서 42℃에서 3시간 동안 전혼성화 (prehybridization); (2) 탐침의 길이에 의존적인 온도에서 (예로, > 100개 뉴클레오타이드 길이의 탐침의 경우 42℃) 20시간 동안 일차적으로 혼성화, 이어서 2 x SSC + 2% SDS에서 20분 동안 20℃에서 두 번 세척, 0.1 x SSC + 0.1% SDS에서 20분 동안 20℃에서 한 번 세척. 최종 세척은 > 100개 뉴클레오타이드 길이의 탐침의 경우 0.1 x SSC + 0.1% SDS에서 30분 동안 60℃에서 수행된다. 정해진 길이의 폴리뉴클레오타이드의 경우 상기에 기술된 매우 높은 엄격도 혼성화 조건들은, 샘브룩 등에 기술된 방법에 따라 (Sambrook *et al.*, 1989, 분자 클로닝: 실험실 매뉴얼, 콜드 스프링 하버 연구소, 제 3판, 2001), 더 길거나 더 짧은 길이의 올리고뉴클레오타이드들의 경우 당업자에 의해 응용될 수 있다.
- [0209] 본 발명은 다음의 핵산들 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산 분자도 역시 포괄한다:
- [0210] a) 본 발명에 따른 인간화 항체 중쇄, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편을 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0211] b) 본 발명에 따른 인간화 항체 경쇄, 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편을 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0212] c) 본 발명에 따른 인간화 항체 또는 그의 유래 화합물 또는 기능적 단편을 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0213] d) a), b) 및 c)에서 정의된 바와 같은 핵산에 상보적인 핵산;
- [0214] e) 서열번호 72 또는 서열번호 75 내지 77의 핵산 서열들을 포함하는 적어도 하나의 중쇄와 높은 엄격도 조건들 하에서 혼성화할 수 있는 적어도 18개 뉴클레오타이드들의 핵산;
- [0215] e) 서열번호 73, 74, 86, 87 또는 서열번호 78, 79, 88, 89의 핵산 서열들을 포함하는 적어도 하나의 경쇄와 높은 엄격도 조건들 하에서 혼성화할 수 있는 적어도 18개 뉴클레오타이드들의 핵산.
- [0216] 본 명세서에서 이후 표 6은 본 발명에 따른 인간화 항체 515H7의 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인들 및 전장 (또는 완전한 길이) 각각의 뉴클레오타이드 서열들을 정리하고 있다. (여기에서 Hx = 인간화)

표 6

항체 Hz515H7	중쇄	경쇄	서열번호
가변 도메인	VH1 D76N	-	72
	-	VL2	73
	-	VL2.1	74
	-	VL2.2	86
	-	VL2.3	87
완전한 서열 (신호 펩타이드 없음)	VH1 D76N (G4wt)	-	75
	VH1 D76N (G4PRO)	-	76
	VH1 D76N (G2 wt)	-	77
	-	VL2-Ck	78
	-	VL2.1-Ck	79
	-	VL2.2-Ck	88
	-	VL2.3-Ck	89

[0217]

[0218] 본 명세서에서 하기 표 7은 본 발명에 따른 키메라 항체 515H7의 다양한 중쇄 및 경쇄 가변 도메인들 및 전장 (또는 완전한 길이) 각각의 뉴클레오타이드 서열들을 정리하고 있다. (여기에서 c = 키메라)

표 7

항체 c515H7	중쇄	경쇄	서열번호
완전한 서열 (신호 펩타이드 없음)	cVH (G4wt)	-	60
	cVH (G4PRO)	-	61
	cVH (G2 wt)	-	62
	-	cVL-Ck	63

[0219]

[0220] 달리 말하면, 본 발명은 다음의 핵산으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 분리된 핵산을 다루고 있다:

- [0221] a) 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들을 코딩하는 핵산, DNA 또는 RNA;
- [0222] b) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45 서열로 이루어진 CDRs 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- [0223] c) 서열번호 20, 21, 46, 47, 72, 73, 74, 86 및 87 서열로 이루어진 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- [0224] d) 서열번호 60 내지 63, 서열번호 75 내지 79, 88, 89 및 94 서열로 이루어진 중쇄 및 경쇄 서열들의 그룹으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- [0225] e) 서열번호 55 서열로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 핵산;
- [0226] d) b) 또는 c)에서 정의된 바와 같은 핵산에 해당하는 RNA 핵산
- [0227] e) a), b) 및 c)에서 정의된 바와 같은 핵산에 상보적인 핵산; 또한
- [0228] f) 서열번호 14 내지 19 및 서열번호 41 내지 45 서열의 CDRs의 적어도 하나와 높은 엄격도의 조건들 하에서 혼성화할 수 있는 적어도 18개 뉴클레오타이드들의 핵산.
- [0229] 본 발명은 본 발명에 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이기도 하다.
- [0230] 본 발명은 명확하게 이러한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클로닝 및/또는 발현 벡터들을 지향한다.
- [0231] 본 발명의 벡터들은 바람직하게 주어진 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 발현 및/또는 분비를 허용하는 요소들 (elements)를 포함한다. 따라서 본 벡터는 프로모터, 해독 개시 및 종결 신호뿐만 아니라 적합한 전사 조절 부위를 포함해야 한다. 이것은 숙주세포에서 안정한 방식으로 유지될 수 있어야 하고, 임의적으로 해독된 단백질의 분비를 특징하는 특정한 신호들을 가질 수 있다. 이들 다양한 요소들은 선택되어 사용된 세포 숙주에 따라 당업자에 의해 최적화된다. 이러한 목적으로, 뉴클레오타이드 서열들은 선택된 숙주 내에서 자가-복제하는 (self-replicating) 벡터들 내로 삽입될 수 있거나 선택된 숙주의 융합 벡터들 (integrative vector)이 될 수 있다.
- [0232] 이러한 벡터들은 당업자에 의해 통상적으로 사용되는 방법들에 의해 제조될 수 있고 그 결과 얻은 클론들은 리포펙션 (lipofection), 전기천공법 (electroporation), 열 충격 (heat shock) 또는 화학적 방법과 같은 표준 방법들에 의해 적합한 숙주 내로 도입될 수 있다.
- [0233] 본 벡터들은, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 기원의 벡터들이다. 그들은 본 발명의 뉴클레오타이드 서열들을 클론하거나 발현시키기 위하여 숙주 세포들을 형질전환시키는 데 사용될 수 있다.
- [0234] 또한 본 발명은 본 발명에 기술된 바와 같은 벡터로 형질전환되거나 이를 포함하는 숙주세포들을 포함한다.
- [0235] 세포 숙주는 원핵성 또는 진핵성 시스템들, 예를 들어 박테리아 세포뿐만 아니라 효모 세포들 또는 동물 세포들, 특히 포유동물 세포들로부터 선택될 수 있다. 곤충 또는 식물 세포들도 역시 사용될 수 있다.

- [0236] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환된 세포를 가지는, 사람을 제외한 동물들에 관한 것이다.
- [0237] 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은 다음의 단계들을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 기능적 단편들의 하나를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0238] a) 본 발명에 따른 숙주세포에 적합한 배지 및 배양 조건들에서의 배양; 및
- [0239] b) 상기 배양 배지로부터 또는 상기 배양된 세포로부터 생산된 상기 항체, 또는 그의 기능적 단편들의 하나의 회수.
- [0240] 본 발명에 따른 형질전환된 세포들은 본 발명에 따른 재조합 폴리펩타이드들을 제조하는 방법들에 유용하다. 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 재조합 형태로 제조하는 방법은 벡터 및/또는 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환된 세포를 사용하는 것을 특징으로 하고, 이들도 역시 본 발명에 포함된다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질전환된 세포는 상기 폴리펩타이드의 발현 및 상기 재조합 펩타이드의 회수를 허용하는 조건들 하에서 배양된다.
- [0241] 이미 언급된 바와 같이, 세포 숙주는 원핵성 또는 진핵성 시스템들 중에서 선택될 수 있다. 상세하게는, 이러한 원핵성 또는 진핵성 시스템에서 분비를 용이하게 하는 본 발명에 따른 뉴클레오타이드 서열을 확인하는 것이 가능하다. 따라서 이러한 서열을 보유하는 본 발명에 따른 벡터는 분비될 재조합 단백질들을 생산하는데 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, 관심 있는 이들 재조합 단백질들의 정제는 그들이 숙주 세포의 내부보다는 오히려 세포 배양의 상청액에 존재하는 사실로 인해 용이해질 것이다.
- [0242] 또한 본 발명에 따른 폴리펩타이드들은 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 이러한 제조 방법의 하나도 역시 본 발명의 목적이 된다. 당업자라면 고체상을 사용하는 방법 (명확하게 Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 제 2판, (1984)를 참조하라) 또는 부분적 고체상을 사용하는 기법과 같은 단편의 응축 수단에 의한, 또는 용액에서의 통상적인 합성에 의한 화학적 합성의 방법을 숙지하고 있다. 화학적 합성에 의해 획득되고 해당 비천연 아미노산들을 포함할 수 있는 폴리펩타이드들도 역시 본 발명에 포함된다.
- [0243] 또한 본 발명의 방법에 의해 획득될 수 있는 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들도 본 발명에 포함된다.
- [0244] 본 발명의 보다 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은 인간 케모카인 패밀리 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 및/또는 X4-친화성 HIV 복제를 특이적으로 저해할 수 있는 것을 특징으로 하는 상기 기술된 바와 같은 항체들에 관한 것이기도 하다.
- [0245] 본 발명의 보다 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은 인간 케모카인 패밀리 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 및/또는 X4/R5-친화성 HIV 복제를 특이적으로 저해할 수 있는 것을 특징으로 하는 상기 기술된 바와 같은 항체들에 관한 것이기도 하다.
- [0246] 새로운 구현예에 따르면, 본 발명은 HIV 세포 침입에 관여하는 수용체라면 모두와 상호작용할 수 있는, 예를 들어 CCR5, CD4, CXCR4 (본 발명의 항체가 아닌 또 다른 에피토프를 표적하는 것) 또는 CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR1과 같은 두 번째 모티프를 포함하는 의미에서 이중특이적 항체로 구성되는 항체들, 또는 그들의 유래 화합물들 또는 기능적 단편들에 관한 것이다.
- [0247] 이중특이적, 또는 이중기능적 (bifunctional) 항체들은 두 가지 서로 다른 가변 부위들이 동일한 분자에 결합되어 있는 2세대 노도클론 항체들로 구성된다 (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis rev. 18: 411-419). 그들의 유용성은 세포들의 표면 상에 여러 분자들을 표적하는 능력으로 인해 진단적 및 치료적 영역들 둘 다에서 발휘되었다. 이러한 항체들은 화학적 방법들 (Glennie M J *et al.* 1987 J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. *et al.* 1995 J. Hemat. 377-382) 또는 체세포 방법들 (Staerz U.D. and Bevan M.J. 1986 PNAS 83, 1453-1457; Suresh M. R. *et al.* 1986 Method Enzymol. 121: 210-228)뿐만 아니라, 선호하기로는 이중이중합 (heterodimerization)을 유도하여 찾고 있는 항체의 정제를 용이하게 허용하는 유전적 조작 기법들에 의해 획득될 수 있다 (Merchand *et al.* 1998 Nature Biotech. 16: 677-681).
- [0248] 이들 이중특이적 항체들은 IgG 전부, 이중특이적 Fab'2, Fab'PEG 또는 다이아체들 또는 이중특이적 scFvs로서, 뿐만 아니라 두 가지 결합 부위들이 표적된 항원 또는 그의 단편들 각각에 존재하는 사가 (tetravalent)의 이중특이적 항체로서 (Park *et al.*, 2000 Mol. Immunol. 37(18): 1123-30) 상기 본 명세서에 기술된 바와 같이 제

작될 수 있다.

- [0249] 이중특이적 항체들의 생산과 투여가 두 가지 특이적 항체들의 개별 생산보다 저렴하다는 경제적인 잇점 이외에도, 이러한 이중특이적 항체들의 사용은 치료의 독성을 감소시키는 장점도 가진다. 따라서, 이중 특이적 항체들의 사용은 순환하는 항체들의 전반적인 양 또한 그 결과로 생기는 가능한 독성을 감소시키는 것을 허용한다.
- [0250] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 이중특이적 항체들은 이가 (divalent) 또는 사가 (tetravalent) 항체들이다.
- [0251] 마지막으로, 본 발명은 약제 (medicament)로서의 상기에서 기술된 항체들, 또는 그들의 기능적 단편들 또는 유도체들에 관한 것이다.
- [0252] 또한 본 발명은 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나로 이루어진 화합물을 활성 성분으로서 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 항체는 부형제 및/또는 약제학적으로 허용가능한 담체에 의해 보충될 수 있다.
- [0253] 또한 본 발명은 약제로서의 상기 기술된 바와 같은 조성물에 관한 것이다.
- [0254] 본 발명의 특정한 관점에서, 상기 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나는 PBMC에서 HIV-1 KON 일차 분리물의 복제를 적어도 5  $\mu$ g/ml, 바람직하게는 적어도 10  $\mu$ g/ml의 IC<sub>90</sub> 값으로 저해한다.
- [0255] 본 발명은 HIV 감염의 예방 또는 치료를 위한 약물 (drug) 및/또는 약제 (medicament)의 제조에 사용하는 본 발명에 따른 항체 또는 조성물의 용도도 역시포함한다.
- [0256] 보다 상세하게, 비제한적인 예로서 상기 HIV 감염은 X4-친화성 HIV 감염이다.
- [0257] 또 다른 구현예에서, 비제한적인 예로서 상기 HIV 감염은 X4/R5-친화성 HIV 감염이다.
- [0258] 또한 본 발명은 HIV 복제를 저해하는 약물의 제조에 사용하는, 바람직하게는 인간화된 항체, 또는 그의 기능적 단편 또는 유도체, 및/또는 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다. 일반적으로, 본 발명은 HIV 질환의 예방 또는 치료를 위한 약물의 제조에 사용하는, 바람직하게는 인간화된 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 기능적 단편 또는 유도체, 및/또는 본 발명에 따른 조성물의 용도에 관한 것이다.
- [0259] 본 발명의 상세한 설명에서, "약제학적 담체 (pharmaceutical vehicle)"는 이차적인 반응을 유발하지 않고, 예를 들어 활성이 있는 화합물의 투여를 용이하게 하며, 생물에서 그의 수명 및/또는 효능을 증가시키고, 용액에서 그의 수용성을 증가시키며 또는 그의 저장을 향상시키는 약제학적 조성물에 들어가는 화합물 또는 화합물의 조합을 의미한다. 이러한 약제학적으로 허용가능한 담체는 잘 알려져 있고, 선택된 활성이 있는 화합물의 본성 및 투여 경로에 따라 당업자에 의해 응용될 수 있다.
- [0260] 바람직하게는, 이러한 화합물들은 전신 경로 (systemic route), 명확하게는 정맥내 (intravenous), 근육내 (intramuscular), 피내 (intradermic), 복강내 (intraperitoneal), 피하 (subcutaneous), 또는 구강 (oral) 경로에 의해 투여될 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 항체로 구성되는 조성물은 동일한 시간차를 두고 여러 번의 용량들로 투여될 것이다.
- [0261] 그들의 투여 경로들, 투여 스케줄들 및 최적의 생약 형태들 (galenic form)은, 예를 들어 환자의 나이 또는 체중, 그의 일반 상태의 중증도, 그의 치료에 대한 인내심 및 경험상의 부작용과 같은 환자에 적합한 치료를 확립할 때 일반적으로 고려되는 판단기준들에 따라 결정될 수 있다.
- [0262] 본 발명은 동시적, 개별적 또는 연장된 방식으로 사용을 위한 조합 산물로서 CXCR4에게로 유도되는 항체가 아닌 항-HIV 항체 또는 항-HIV 세포 침입 항체 또는 항-HIV 복제 항체를 추가적으로 포함하는 조성물에 관한 것이기도 하다.
- [0263] 보다 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 또한 항-CCR5, 항-CD4 화합물 및본 발명에서 기술된 것들이 아닌 항-CXCR4 화합물 또는 당업자가 숙지하고 있는 기타 다른 항-HIV 화합물과 같이 HIV 침입 및/또는 복제를 특이적으로 저해할 수 있는 화합물들 중에서 선택된 두 번째 항-HIV 화합물을 포함하는 상기에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0264] 본 발명을 보완하는 또 다른 구현예는 동시적, 개별적 또는 연장된 사용을 위한 조합 또는 결합 산물로서 항-HIV 화합물을 추가로 포함하는 상기에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물로 이루어진다.
- [0265] "동시적 사용 (simutaneous use)"는 단일한 용량 형태에 포함되는 조성물의 화합물 둘 다의 투여를 의미한다.

- [0266] "개별적 사용 (separate use)"은 구별되는 용량 형태에 포함되는 조성물의 화합물 둘 다의 일시적 (at the same time) 투여를 의미한다.
- [0267] "연장된 사용 (extended use)"은 구별되는 용량 형태에 각각 포함되는 조성물의 화합물 둘 다의 연속적인 투여를 의미한다.
- [0268] 일반적으로, 본 발명에 따른 조성물은 HIV 치료의 효능을 유의하게 증가시킨다. 달리 말하면, 본 발명의 항체의 치료적 효과는 항-HIV 제제의 투여에 의해 예측하지 못하는 방식으로 증진된다. 본 발명의 조성물에 의해 생산되는 또 다른 주요 연속적 장점은 더 낮은 유효량의 활성 성분을 사용할 수 있는 가능성에 대한 것이고, 이는 나타날 수 있는 부작용 상세하게 항-HIV 제제의 효과의 위험성을 회피하거나 감소시키는 것을 가능하게 한다. 더욱이, 본 발명에 따른 이러한 조성물은 기대되는 치료적 효과를 더욱 신속하게 달성하는 것을 허용한다.
- [0269] "치료적 항-HIV 제제 (therapeutic anti-HIV agent)"는 환자에게 투여될 때 환자에서 HIV 복제를 치료하거나 예방하는 물질을 의미한다. 이러한 제제의 비-제한적 예로는 "HIV 단백질분해효소 저해제 I (PI)와 같은 항-레트로바이러스성 약물, 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 HIV 역전사효소 저해제 (NRTI/NtRTI), 비-뉴클레오사이드 HIV 역전사효소 저해제 (NNRTI), HIV 침입 저해제 (HIV entry inhibitors), HIV 삽입효소 저해제 (HIV integrase inhibitors)"를 포함한다.
- [0270] 이러한 제제들은 예를 들어 VIDAL에서 "항-HIV 화합물"과 관련된 화합물들에 할애된 페이지 상에 인용되고 있다; 이 문헌에 관한 참고문헌을 통해 인용되는 항-HIV 화합물들은 본 명세서에서 비-제한적인 바람직한 항-HIV 제제로서 인용된다.
- [0271] HIV 단백질분해효소 저해제 (HIV protease inhibitor)는 HIV 단백질분해효소의 활성을 저해할 수 있는 물질이라면 모두를 말한다. 이러한 HIV 단백질분해효소 저해제의 예로는 이에 제한되는 것은 아니지만 사퀴나비르 메실레이트 (Saquinavir mesylate) 또는 SQV (인비라제<sup>®</sup> (Invirase<sup>®</sup>)), 인디나비르 (Indinavir) 또는 IDV (크리지반<sup>®</sup> (Crixivan<sup>®</sup>)), 리토나비르 (Ritonavir) 또는 RTV (노르비르<sup>®</sup> (Norvir<sup>®</sup>)), 넬피나비르 또는 NFV (비라셉트<sup>®</sup> (Viracept<sup>®</sup>)), 암프레나비르 (Amprenavir) (아제네라제<sup>®</sup> (Agenerase<sup>®</sup>)), 프로제이<sup>®</sup> (Prozei<sup>®</sup>)), 로피나비르 (Lopinavir)/리토나비르 (ritonavir) 또는 LPV/r (칼레트라<sup>®</sup> (Kaletra<sup>®</sup>)), 알루비아<sup>®</sup> (Aluvia<sup>®</sup>)), 아타자나비르 (Atazanavir) 또는 ATV (레이아타즈<sup>®</sup> (Reyataz<sup>®</sup>)), 즈리바다<sup>®</sup> (Zrivada<sup>®</sup>)), 포스암프레나비르 (Forsamprenavir) 또는 FPV (렉시아<sup>®</sup> (Lexia<sup>®</sup>)), 텔지르<sup>®</sup> (Telzir<sup>®</sup>)), 티프라나비르 (Tipranavir) 또는 TPV (애티부스<sup>®</sup> (Aptivus<sup>®</sup>)), 다루나비르 (Darunavir) 또는 DRV (프레지스타<sup>®</sup> (Prezista<sup>®</sup>))를 포함한다.
- [0272] HIV 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 역전사효소 저해제 (NRTI)는 HIV RNA의 역전사를 차단하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 유사체인 물질을 말한다. NRTI의 예들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 지도부딘 (Zidovidine) 또는 AZT, ZDV (레트로비르 (Retrovir)/콤비비르 (combivir)/트리지비르 (trixivir)<sup>®</sup>), 디다노신 (Didanosine) 또는 디디아이 (ddi) (비렉스<sup>®</sup> (Videx<sup>®</sup>)), 잘시타빈 (Zalcitabine) (HIVID<sup>®</sup>), 스타부딘 (Stavudine) 또는 d4T (제리트<sup>®</sup> (Zerit<sup>®</sup>)), 라미부딘 (Lamivudine) 또는 3TC (에피비르 (Epivir)/콤비비르 (combivir)/엠피콤 (epzicom)/트리지비르 (trixivir)<sup>®</sup>), 아바카비르 (Abacavir) 또는 ABC (지아젠 (Ziagen)/트리지비르 (trixivir)/엠피콤 (epzicom)<sup>®</sup>), 테노포비르 디소프록실 푸마레이트 (Tenofovir disoproxil fumarate) 또는 TDF (비레아드 (Viread)/아트립플라 (atrapla)/트루바다 (truvada)<sup>®</sup>), 엠트리시타빈 (Emtricitabine) 또는 FTC (엠트리바/아트립플라/트루바다<sup>®</sup>)를 포함한다.
- [0273] 비-뉴클레오사이드 HIV 역전사효소 저해제 (NNRTI)는 HIV RNA의 역전사를 차단하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 유사체가 아닌 물질을 말한다. NNRTI의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 네비라핀 (Nevirapine) 또는 NVP (비라문<sup>®</sup> (Viramune<sup>®</sup>)), 에파비렌즈 (Efavirenz) 또는 EFV (서스티바 (Sustiva)/아트립플라 (atrilpa)<sup>®</sup>, 스토크린<sup>®</sup> (Stocrin<sup>®</sup>)), 텔라비르딘 또는 DLV (레스크립터<sup>®</sup> (Rescriptor<sup>®</sup>) 및 에트라비린



(Etravirine) 또는 ETR (인텔렌스<sup>®</sup> (intelence<sup>®</sup>))를 포함한다.

- [0274] HIV 침입 저해제 (HIV entry inhibitors)는 HIV 세포 침입을 차단하는 물질을 말한다. HIV 침입 저해제로는 이에 제한되는 것은 아니지만 엔푸비르타이드 (Enfuvirtide) 또는 T20 (퓨제온<sup>®</sup> (Fuzeon<sup>®</sup>)), 마라비록 (Maraviroc) 또는 MVC (셀센트리<sup>®</sup> (Celsentri<sup>®</sup>), 셀젠트리<sup>®</sup> (Celzentry<sup>®</sup>))를 포함한다.
- [0275] HIV 삽입효소 저해제 (HIV integrase inhibitors)는 HIV 삽입효소 활성을 저해하는 물질을 말한다. 삽입효소의 예로는 이에 제한되는 것은 아니지만 랄테그라비르 (Raltegravir) 또는 RAL (이센트레스<sup>®</sup> (Isentress<sup>®</sup>))을 포함한다.
- [0276] 이러한 제제들은, 예를 들어 VIDAL에 기술된 약물들과 동일한 부류들에 속하는 화합물들이기도 하고, 이에 제한되는 것은 아니지만 비크리비록 (Vicriviroc), PRO140, TNX-355, AMD070, 락시비르 (Racivir), 아프리시타빈 (Apricitabine), 엘부시타빈 (Elvucitabine), 플로살부딘 (Flosalvudine), 릴피비린 (Rilpivirine), 엘비테그라비르 (Elvitegravir)와 같이 현재 임상시험 중에 있다.
- [0277] 이러한 제제들은 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만 성숙 저해제 (maturation inhibitors) (베비리마트 (Bevirimat)),  $\beta$ -갈락토실-세라마이드 ( $\beta$ -galactosyl ceramide)의 글리코사이드 유사체들, 탄수화물-결합 제제들 (carbohydrate-binding agents), RNaseH 저해제들, HIV 유전자 발현 저해제들 (HIV gene expression inhibitors), 잠복성 T 세포들로부터 HIV 방출의 촉진제들 (발프로산 (valproic acid)...)와 같은 기타 가능성 있는 부류들에 속하는 화합물들이기도 하다.
- [0278] 상세한 바람직한 구현예에서, 조합 산물로서의 본 발명의 상기 조성물은 상기 항-HIV 제제가 동시적 사용을 위해 상기 항체에 화학적으로 결합되는 것을 특징으로 한다.
- [0279] 상기 항-HIV 제제 및 본 발명에 따른 항체 간의 결합을 용이하게 하기 위하여, 결합될 두 가지 화합물들 사이에 폴리(알킬렌)글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 아미노산과 같은 공간 분자 (space molecules)가 도입될 수 있거나; 또 다른 구현예에서, 상기 항체가 반응할 수 있는 기능이 내부에 도입되었던 상기 항-HIV 제제의 활성을 가진 유도체가 사용될 수 있다. 이들 결합 기법들은 당업자에게 잘 알려져 있고 상세한 설명에서 더 자세하게 논의되지는 않을 것이다.
- [0280] 또한 바람직하게, 상기 결합체 (conjugate)를 형성하는 본 발명의 상기 항체는 그의 기능적 단편들 중에서, 명확하게는 scFv 단편들과 같이 그들의 Fc 성분들을 상실하였던 단편들 중에서 선택된다.
- [0281] 본 발명은 또한 약물로서 사용되는 본 발명에 따른 조합 산물로서의 조성물 또는 항-CXCR4 Mab/항-HIV 약물 결합체에 관한 것이다.
- [0282] 바람직하게는, 조합 산물로서의 상기 조성물 또는 상기 결합체는 부형제 및/또는 약제학적 담체에 의해 보충될 수 있다.
- [0283] 따라서, 본 발명은 HIV 복제에 대한 생물학적인 활성을 가진 화합물을 특이적으로 표적하는 약물의 제조에 사용되는 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나에 관한 것이다.
- [0284] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항체, 또는 그의 항원 결합 단편들 또는 유도체들 및/또는 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것으로 구성되는 단계를 포함하는, HIV 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0285] 보다 상세하게, 본 발명에 따른 방법은 마라비록 (Maraviroc)과 같은 항-CCR5 화합물을 상기 환자에게 투여하는 것으로 구성되는 단계도 역시 포함한다.
- [0286] 이전에 기술된 바와 같이, CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5는 PBMC에서 HIV-1 복제에 대항하는 강한 활성을 가지기 때문에, 이러한 항체들은 HIV-1 감염을 치료하는 CXCR4 길항제 (CXCR4 antagonist) 항바이러스성 제제들을 확인하는 검색 검정법 (screening assays)에 사용될 수 있을 것이다. 이들 분석법의 첫 번째 단계에서, CXCR4를 발현하는 세포는 Mabs 515H7 및 301aE5를 넣어 배양되고, 다음으로 Mabs 515H7 및 301aE5 결합을 저해하는 분자들의 잠재력에 대해 평가될 수 있다. 본 유형의 검정법에 사용되는 세포들은 CHO-CXCR4, NIH3T3-CXCR4 또는 U373-MAGI-CXCR4와 같은 CXCR4로 형질전환된 인간 세포주들과 같은 형질전환된 세포주들, NALM6와 같은 CXCR4를 발현하는 인간 세포주들 또는 PBMC와 같은 일차 세포들일 수 있다. CXCR4 발현하는 세포 상에 Mabs 515H7 및 301aE5 결합을 저해하는 CXCR4의 길항제를 검색하는 데 사용되는 방법은 자오 등에 의해 기술된 바와 같은 세포

-기초 경쟁적 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA) (Zhao Q. et al. AIDS Research and Human Reteroviruses, 2003, 19: 947-955) 또는 후아레스 등에 의해 기술된 바와 같은 형광-활성화된 세포 선별법 (FACS)을 사용하는 프로토콜 (Juarez J. et al. Leukemia 2003, 17: 1294-1300)일 수 있다.

- [0287] 따라서 본 발명의 상세한 관점에서, 다음의 단계들을 포함하는 CXCR4 길항제 항바이러스성 제제들로서 분자들을 검색하고 및/또는 확인하는 방법이 고려된다.
- [0288] a) CXCR4를 발현하는 세포를 선택하고;
- [0289] b) 상기 세포를 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나와 배양하고;
- [0290] c) 테스트될 분자들을 CXCR4와 본 발명의 항체, 또는 그의 기능적 단편들 또는 유도체들의 하나 간의 결합에 대한 그들의 가능성 있는 저해를 평가하고; 또한
- [0291] d) 상기 저해를 할 수 있는 분자들을 선별한다.
- [0292] 또 다른 상세한 관점에서, 다음의 단계 e)가 추가될 수 있다:
- [0293] e) 이들 분자들을 HIV-1 복제 검정법에서 테스트한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0294] 본 발명의 기타 특징들 및 장점들은 실시예들 및 하기에 설명이 기술된 도면들과 함께 좀 더 설명될 것이다.
- 도 1A 및 1B는 단핵구 및 림프구 상에서 CXCR4 발현의 게이팅 전략 (gating strategy)을 나타낸 것이다. 도 1A: CD3-PE 항체로 염색한 T 세포. 도 1B: CD3-PE 항체로 염색한 단핵구.
- 도 2A 및 2B는 단핵구 및 림프구 상에서 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5의 결합을 나타낸 것이다.
- 도 3A 및 3B는 HEK293 세포에서 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법을 통하여 SDF-1에 의한 또한 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5에 의한 CXCR4 수용체의 조정 (modulation)을 나타낸 것이다.
- 도 4A 및 4B는 인간 PBMC에서 HIV-1 분리물 KON (X4 바이러스) 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5의 능력을 나타낸 것이다.
- 도 5는 인간 PBMC에서 HIV-1 분리물 KON (X4 바이러스) 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5의 능력을 나타낸 것이다.
- 도 6A, 6B 및 6C는 CHO-CXCR4 세포에서 Mabs 515H7 (도 6A), 301aE5 (도 6B) 및 c515H7 (도 6C)에 의한 SDF-1-유도성 칼슘 방출의 저해를 나타낸 것이다.
- 도 7은 인간 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 MN 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 활성을 나타낸 것이다.
- 도 8은 인간 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 92UG024 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 활성을 나타낸 것이다.
- 도 9는 인간 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 KON, MN 및 92UG024 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 활성을 나타낸 것이다.
- 도 10은 인간 PBMC에서 이중적 HIV-1 X4/R5 바이러스 일차 분리물 89.6 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 활성을 나타낸 것이다.
- 도 11은 인간 PBMC에서 이중적 HIV-1 X4/R5 바이러스 일차 분리물 89.6 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 활성을 나타낸 것이다.
- 도 12는 인간 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 89.6 (이중적 X4/R5 바이러스) 복제를 저해하도록 마라비록 (Maraviroc)과 Mabs c515H7를 결합시키는 것의 유익한 효과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 인간 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 UG93067 (이중적 X4/R5 바이러스) 복제를 저해하도록 마라비록과 Mabs c515H7를 결합시키는 것의 유익한 효과를 나타낸 것이다.
- 도 14는 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 KON 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및



301aE5의 활성을 나타낸 것이다.

도 15는 FACS 분석법에 의해 c515H7 Mab의 결합 특이도를 나타낸 것이다.

도 16은 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법에 의해 CXCR4 동종이량체 상의 c515H7 Mab의 효과를 나타낸 것이다.

도 17은 인간 배아계열 IGHV3-49\*04 및 IGHJ4\*01과 함께 515H7 중쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 정렬을 나타낸 것이다. 515H7 VH 아미노산 서열은 선택된 인간 수용체의 구조를 서열과 함께 정렬된다. VH Var1 (VH1) 서열은 515H7 VH 도메인의 인간화 변형체 (variants)에 해당한다. 76번 위치에서의 단일 회귀 돌연변이 (back mutation)은 굵게 표시된다.

도 18은 인간 배아계열 IGHV4-1\*01 및 IGHJ1\*01과 함께 515H7 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열 정렬을 나타낸 것이다. 515H7 VL 아미노산 서열은 선택된 인간 수용체의 구조를 서열과 함께 정렬된다. VL Var2.1, Var2.2 및 Var2.3 서열은 인간화된 515H7 VL Var2의 조작된 인간화 변형체에 해당하고, 돌연변이가 잔기는 굵게 표시된다. Var2.1 및 Var2.3는 4개 이상의 인간화된 잔기를 보유하는 한편 Var2.3은 5개 이상의 인간 잔기를 포함한다.

도 19는 키메라 515H7 및 인간화 515H7의 서로 다른 변형체들에 의한 바이오틴화된 마우스 항체 515H7의 교차 차단 (cross blocking)을 나타낸 것이다. 부모 마우스 항체를 교차 차단하는 515H7의 인간화된 변형체 (hz515H7)의 활성은 CXCR4 형질전환된 NIH3T3 세포를 사용한 유동 세포측정법 (flow cytometry)에 의해 평가되었다. 인간화 변형체의 활성은 키메라 515H7의 것과 대비되었다. 키메라 VL (cVL)과 조합된 변형체 VH1의 교차 차단 활성은 키메라 (A)의 것과 매우 유사하였다. VH1 변형체 1 (VH1, 회귀 돌연변이가 없는 변형체)의 활성 감소는 VL의 변형체 2 (B)와 조합될 때 전혀 측정되지 않았다.

도 20은 키메라 515H7 및 인간화 515H7의 서로 다른 변형체들에 의한 바이오틴화된 SDF-1 결합의 저해를 나타낸 것이다. SDF-1 결합을 저해하는 515H7 (hz515H7)의 인간화 변형체의 능력은 세포주 RAMOS를 사용한 유동 세포측정법에 의해 평가되었다. 인간화 변형체의 저해 능력은 키메라 515H7의 것과 대비되었다. 인간화 변형체 hz515H7 VH1 D76N VL2는 키메라 항체와 유사한 SDF-1 결합을 저해하는 능력을 가진다. 인간화된 항체 단편 hz515 VH1 VL2는 RAMOS 세포에 대한 SDF-1 결합을 저해하는 데 전적으로 완전한 활성이 있었다.

도 21은 NIH3T3-CXCR4 상의 CXCR4와 특이적으로 결합하는 인간화 515H7 Mabs (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, 및 hz515H7 VH1 D76N VL2.3)을 나타낸 것이다.

도 22는 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법에 의해, CXCR4 동종이량체에 미치는 인간화 515H7 Mabs (hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, 및 hz515H7 VH1 D76N VL2.3)의 효과를 나타낸 것이다.

도 23은 MT-4 세포들에서 X4 HIV-1<sub>MB</sub>-유도성 세포병원성을 저해하는 항-CXCR4 Mab hz515H7의 능력을 나타낸 것이다.

도 24는 인간 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 KON 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mab hz515H7의 능력을 나타낸 것이다.

도 25는 인간 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 89.6 (이중 X4/R5 바이러스) 복제를 저해하도록 Mab hz515H7을 마라비록과 조합하는 것의 유익한 효과를 나타낸 것이다.

도 26은 인간 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 UG93067 (이중 X4/R5 바이러스) 복제를 저해하도록 Mab hz515H7을 마라비록과 조합하는 것의 유익한 효과를 나타낸 것이다.

도 27은 인간 PBMC에서 HIV-1 X4 바이러스 일차 분리물 KON 복제를 저해하는 항-CXCR4 Mab hz515H7 IgG4의 능력을 나타낸 것이다.

도 28은 인간 PBMC에서 HIV-1 일차 분리물 89.6 (이중 X4/R5 바이러스) 복제를 저해하도록 Mab hz515H7 IgG4를 마라비록과 조합하는 것의 유익한 효과를 나타낸 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 실시예들

[0295]

[0296] 실시예 1: 인간 CXCR4에 대한 모노클론 항체 (Mabs)의 생성

[0297] CXCR4에 대한 모노클론 항체들을 생성하기 위하여, Balb/c 마우스가 재조합 NIH3T3-CXCR4 세포 및/또는 CXCR4 세포의 N-말단 및 루프에 해당하는 펩타이드들로 면역화되었다. 6 내지 16주령 된 마우스가 완전 프렌드 아쥬반트 (complete Freund's adjuvant)에 녹인 항원으로 한 번 피하로 (s.c.) 면역화되었고, 이어서 불완전 프렌드 아쥬반트에 녹인 항원으로 2 내지 6번 더 s.c. 면역화되었다. 면역 반응은 안와후방 채혈 (retro-orbital bleeds)에 의해 감시되었다. 혈청은 엘라이자 (ELISA)에 의해 검색되었고 (하기 기술된 바와 같음) 더 높은 항-CXCR4 항체의 역가 (titers)를 가진 마우스가 융합에 사용되었다. 마우스는 희생시켜 비장을 제거하기 이틀 전에 항원으로 정맥내 추가자극 (boost)되었다.

[0298] - 엘라이자 (ELISA)

[0299] 항-CXCR4 항체들을 생산하는 마우스를 선별하기 위하여, 면역화된 마우스로부터 나온 혈청이 엘라이자에 의해 테스트 되었다. 간략하게, 마이크로타이터 플레이트는 BSA와 결합된 정제된 [1-41] N-말단 펩타이드를 사용하여 5 µg의 동등한 펩타이드/mL 농도로 코팅되었고, 100 µL/웰로 4°C에서 하룻밤 동안 배양된 다음 250 µL/웰 농도로 PBS에 녹인 0.5% 젤라틴을 사용하여 블로킹시켰다. CXCR4-면역화된 마우스로부터 나온 혈장의 희석액이 각 웰에 첨가되었고 37°C에서 2시간 동안 배양되었다. 플레이트는 PBS로 세척된 다음 HRP에 접합된 염소 항-마우스 IgG 항체 (잭슨 연구소)로 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 세척한 이후에, 플레이트는 TMB 기질을 사용하여 현상되었고, 반응은 5분 경과시 100 µL/웰의 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가에 의해 정지되었다. 가장 높은 항-CXCR4 항체의 역가를 가진 마우스가 항체 생성을 위해 사용되었다.

[0300] - CXCR4에 대한 Mabs를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0301] 가장 높은 항-CXCR4 항체들의 역가를 나타내었던 Balb/c 마우스로부터 분리된 마우스 비장세포가 PEG를 사용하여 마우스 마이엘로마 세포주 Sp2/0에 융합되었다. 세포는 마이크로타이터 플레이트에 대략 1 x 10<sup>5</sup>/웰 농도로 도말되었고, 이어서 두 주 동안 울트라 배양 배지 + 2 mM L-글루타민 + 1 mM 소듐 피루베이트 + 1 x HAT을 포함하는 선별 배지를 사용하여 배양되었다. 다음으로, 웰은 항-CXCR4 모노클론 IgG 항체에 대해 엘라이자에 의해 검색되었다. 그 다음 하이브리도마를 분비하는 항체가 희석을 제한하여 적어도 두 번 서브클론 되었고 심화 분석을 위한 항체를 생성하기 위하여 시험관내 배양되었다.

[0302] 실시예 2: FACS 분석법에 의한 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5 결합 특이도 (NIH3T3-CXCR4 형질전환체)의 특성 분석

[0303] 본 실험에서는 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5의 인간 CXCR4 (hCXCR4)에 대한 특이적 결합이 FACS 분석법에 의해 조사되었다.

[0304] NIH-3T3, NIH3T3-hCXCR4 형질전환된 세포들이 10 µg/mL의 단일클론 항체들 515H7 및 301aE5와 함께 배양되었다. 그 다음 세포는 1% BSA/PBS/0.01% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>으로 세척되었다. 이후, 알렉사 (Alexa)-표지된 이차 항체가 세포에 첨가되었고 4°C에서 20분 동안 배양되도록 하였다. 그 다음 세포는 다시 두 번 세척되었다. 두 번째 세척에 이어서, FACS 분석법이 수행되었다. 이들 결합 연구의 결과는 하기 표 8에 제공되고, 이는 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5가 인간 CXCR4-NIH3T3 형질전환된 세포주에 특이적으로 결합하는 반면 부모 NIH3T3 세포 상에서는 전혀 인식이 없는 점을 [FACS에 의해 획득된 평균 형광 강도 (MFI)]로 보여준다.

표 8

	NIH3T3 (MFI)	NIH3T3-CXCR4 (MFI)
클론 515H7 (10 µg/ml)	16	2752
클론 301aE5 (10 µg/ml)	21	1367

[0305]

[0306] 실시예 3: FACS 분석법에 의한 말단혈액 단핵세포 (PBMC)와 결합하는 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5의 특성분

석

- [0307] 혈액은 건강한 공여자로부터 연막 (buffy coat)으로서 수집되었다. 100  $\mu$ l의 전혈 (whole blood)이 항-인간 CXCR4 항체들 (클론 515H7 및 301aE5)과 함께 표시된 농도로 4℃에서 20분 동안 배양되었다. 혈액은 PBS-BSA 1%-Na<sub>3</sub> 0.01%에서 세 번 세척되었고 1 : 500으로 희석된 염소 항-인간 알렉사 488 IgG (인비트로젠사)와 4℃에서 20분 동안 배양되었다. 그 다음 세포는 세척되었고 CD14-PE (칼태그사) 또는 CD3-PE (칼태그사)와 4℃에서 10분 동안 배양되었으며 다시 세 번 세척되었다. 적혈구 세포는 고수율 용해 용액 (High-Yield lyse solution, 칼태그사)을 사용하여 상온에서 10분 동안 용해되었다. 세포는 팩스칼리버 (Facsclibur, 벡튼-디킨슨사)를 사용하여 즉시 분석되었다. 단핵구 상의 CXCR4 발현은 CD14 양성 세포 상에서 시행되었고 T 세포 상의 CXCR4 발현은 CD3 양성 세포 상에서 시행되었다 (도 1). 결과는 항원 결합 능력 (ABC)으로 표현되었다.
- [0308] 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, 항-인간 클론 CXCR4 515H7 및 301aE5는 T 림프구 (도 2A)와 단핵구 (도 2B) 둘 다를 염색시켰고, 이는 515H7 및 301aE5 Mabs가 단핵구와 T 림프구의 세포 표면에서 발현되는 CXCR4의 그대로의 형태를 인식할 수 있는 점을 나타내는 것이었다.
- [0309] **실시예 4: 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법에 의한, CXCR4 동종이량체에 미치는 515H7 및 301aE5 Mabs의 효과**
- [0310] 본 기능적 검정법은 CXCR4 동종이량체 수준에서 CXCR4 수용체와 결합하는 SDF-1 및/또는 515H7 Mabs에 유도되는 입체형태적 변화들을 평가하도록 한다.
- [0311] 조사된 상호작용 파트너들을 위한 발현 벡터들은 통상적인 분자생물학 기법을 적용하여 해당되는 염색제 (레닐라 레니포르미스 루시페라제, Rluc 및 황색 형광 단백질, YFP)을 가진 융합 단백질을 제작되었다. BRET 실험을 수행하기 이를 이전에, HEK293 세포가 해당되는 BRET 파트너를 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질전환되었다: CXCR4 동종이중합을 연구하기 위해 [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP]. 그 날 이후에, 세포는 완전 배양 배지 [10% FBS가 보충된 DMEM]를 넣어 폴리-라이신 사전코팅된 흰색 96 MW 플레이트에 분배시켰다. 먼저 세포는 플레이트에 세포 부착이 시행되도록 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양되었다. 그 다음 세포는 200  $\mu$ l DMEM/웰로 처리하여 하룻밤 동안 굼졌다. BRET 실험 직전에, DMEM은 제거되었고 세포는 PBS를 사용하여 신속하게 세척되었다. 그 다음 세포는 항체의 존재 시 또는 부재 시 PBS로 37℃에서 10분 동안 배양되었으며, 이후 300 nM의 SDF-1 존재 시 또는 부재 시 5  $\mu$ M의 실렌타린 H가 최종 부피 50  $\mu$ l로 첨가되었다. 37℃에서 10분 더 배양한 이후에, 미스라스 LB 940 다중표지 리더기 (Mithras LB940 multilabel reader, 베르톨드사)를 사용하여 485 nm 및 530 nm에서 빛-방출의 측정이 개시되었다 (1s/과장/웰이 상온에서 15회 반복되었다).
- [0312] BRET 비율의 계산이 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (Angers *et al.*, 2000): [(방출<sub>530 nm</sub>)-(방출<sub>485 nm</sub>) X Cf] / (방출<sub>485 nm</sub>), 여기에서 동일한 실험 조건 하에서 Rluc 융합 단백질을 단독 발현하는 세포의 경우 Cf =(방출<sub>530 nm</sub>) / (방출<sub>485 nm</sub>). 이 방정식을 단순화하면 BRET 비율이 두 가지 BRET 파트너가 존재할 때 획득되는 530/485 nm 비율에 해당하고, 이는 검정법에 Rluc에 융합된 파트너만이 존재할 때 동일한 실험 조건 하에서 획득되는 530/485 nm 비율에 의해 교정되는 것을 보여준다. 해석 (readability)을 위해, 결과는 밀리BRET 유닛 (mBU)으로 표현된다; mBU은 1000을 곱한 BRET 비율에 해당한다.
- [0313] SDF1 (300 nM)이 CXCR4 수용체에 융합된 연결자 및 수용자 단백질의 공간적 접근으로부터 생겨나는 BRET 신호를 약 20% 증가시켰고, 이는 CXCR4/CXCR4 동종이량체의 형성 또는 미리-존재하던 이량체의 입체형태적 변화를 가리키는 것 같다 (도 3A 및 3B). 515H7 및 301aE5 Mabs는 CXCR4 동종이량체에 대한 SDF-1-유도성 입체형태적 변화를 조정할 수 있었다 (515H7 및 301aE5 Mabs의 경우 SDF-1-유도성 BRET 증가의 69% 저해, 도 3A 및 3B). 515H7 및 301aE5 Mabs도 역시 그들 스스로 CXCR4/CXCR4 공간적 접근을 조정할 수 있었으며, 이는 CXCR4/CXCR4 동종이량체 입체형태 상에 미치는 515H7 및 301aE5 Mabs의 영향을 나타내는 것이었다 (도 3A 및 3B).
- [0314] **실시예 5: 인간 PBMC에서 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5에 의한 HIV-1 일차 분리물 KON (X4 바이러스) 복제의 저해**
- [0315] HIV-1에 대해 혈청음성인 정상 공여자들로부터 얻은 PBMC가 연막 (buffy coats) 또는 피콜-하이파크 (Ficoll-Hypaque) 구배 원심분리에 의한 세포성분채집술 (cytapheresis)로부터 분리되었다. PBMC는 25 mM HEPES, 5 ml

페니실린 (10,000 U/ml) - 스트렙토마이신 (10,000 µg/ml) 2 mM L-글루타민을 포함하고 10% 열-불활성화된 FCS가 보충된 RPMI 1640 세포 배양 배지에서 PHA 존재 시 활성화되었고 단일 주기 중화 검정법 (single cycle neutralization assay)에서 세포성 표적으로서 사용되었다. 일차 인간 PBMC에서 HIV-1 복제는 바이러스 p24 항원의 세포내 염색을 FACS에 의해 분석하여 수행되었다. 간략하게, 웰 당 25 µl의 Mabs 515H7, 301aE5 및 12G5 (R & D 시스템사)의 다양한 희석물 또는 대조군으로서 배양 배지 (RPMI 1640, 10% FCS, 0.1% IL-2)가 웰 당 25 µl의 HIV-1 KON X4 일차 분리물 희석물과 37°C에서 1시간 동안 중복으로 배양되었다. PHA-활성화 인간 PBMC (25 µl/웰)가  $20 \times 10^6$  세포/ml 농도로 96-웰 플레이트 (U자-바닥, 코스타 3599)에 넣은 Mab/바이러스 혼합물에 첨가되었고 RPMI 1640, 10% FCS, 0.1% IL-2에 넣어 24 내지 36시간 동안 배양되었다. Mab가 없는 배지에 넣은 감염되지 않은 PBMC로 이루어진 대조군이 도입되었다. HIV-감염된 PBMC를 검출하기 위하여, 바이러스 p24 항원의 세포내 염색이 수행되었고 유동 세포측정법에 의해 분석되었다. 세포는 고정되었고 사이토폭스/사이토펜 키트 (Cytofix/Cytoperm kit, 벡튼 디킨슨사)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 투과되었으며 (permeabilized) 암소에서 4°C로 10분 동안 배양한 1/160 희석에서 사용된 형광 항-p24 Mab (클론 KC57 - 쿨터 백크만사)를 사용하여 염색되었다. PBS-3% FCS 배지로 세척한 이후, PBMC는 유동 세포측정법의 분석 이전에 PBS로 희석되었다. 서로 다른 시료에서 p24-양성 세포의 백분율은 살아있는 세포 집단 상의 20,000개 게이팅 이벤트에 의해 결정되었다. 살아있는 세포의 소집합은 감염되지 않은 세포의 기저 염색에 대비한 p24 발현으로 분석되었다. p24 항원-양성 수치는 모의-감염된 (mock-infected) 세포의 기저 수치를 차감한 이후에 획득되었다. 중화 백분율은 Mab가 없이 감염된 웰 대조군과 비교되는 p24-양성 세포의 감소로서 정의되었다. 중화 역가는 감염된 세포의 백분율을 90% 감소시키는 Mab의 희석으로서 정의되었다. 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5가 HIV 적용에 대한 기준이 되는 항-CXCR4 Mab라고 알려진 12G5 Mab과 비교되었다. 도 4A 및 4B에서 나타난 바와 같이, 항-CXCR4 Mabs 515H7 및 301aE5는 PBMC에서 HIV-1 KON 일차 분리물 복제를 각각 IC<sub>90</sub> 값 10 µg/ml (66 nM) 및 150 µg/ml (1 µM)로 저해할 수 있다. 반면 12G5 Mab는 PBMC에서 HIV-1 KON 일차 분리물 복제를 저해하는 데 실패하였다 (도 4A).

[0316] **실시예 6: 세포내 칼슘 저장의 CXCR4 수용체-매개성 가동화**

[0317] 본 기능적 검정법은 세포질 세망 (endoplasmic reticulum)으로부터 나온 세포내 저장으로부터 칼슘 방출을 유도하는 포스포리파제 C (phospholipase C) 경로의 자극을 통한 CXCR4 수용체 신호전달을 감시하도록 설계되었다.

[0318] 인간 CXCR4 수용체를 안정하게 전신적으로 발현하는 CHO-K1 세포는 그대로의 (naive) CHO-K1 세포 (ATCC CCL-61)를 인간 CXCR4 수용체의 전체 코딩 서열 (RefSeq 제 NM\_003467호)을 보유하는 포유동물 발현 벡터로 형질전환하여 획득되었다. 세포는 완전 배양 배지 [5% 우태아 혈청 (FCS) 및 500 µg/ml의 젠타마이신이 보충된 DMEM-Ham's F12]에서 증식되었다. 세포는 적절한 배양 배지를 넣은 검은색 96MW 플레이트에 100,000개 세포/웰의 밀도로 도말되었다. 세포는 실험을 실시하기 이전에 하룻밤 동안 굶겼다. 이는 로딩 완충용액 [1x HBSS, 20 mM의 헤페스, 20 mM의 프로베니시드 산 (probenicid acid)]에 녹인 형광 칼슘 염색제 (Fluo-4 세척 없음, 미국 인비트로젠사)과 함께 37°C에서 30분 동안 로딩되었고 25°C에서 30분 동안 이어졌다. SDF-1에 의한 자극은 각 웰 내로 직접 주입되어 수행되었다. 길항기작 실험을 위해, 10 µl의 Mab 용액이 SDF-1 처리 적어도 10분 이전에 로딩 완충용액 내로 직접 첨가되었다. 동적 형광 (Kinetic fluorescence) 측정은 하기 설정을 사용하는 다중-방식 형광 마이크로플레이트 리더기, 미스라스 LB940 (베르톨트사) 상에서 수행되었다: 485 nm에서 여기, 535 nm에서 방출, 10,000 임의적 유닛의 여기 에너지. 각 웰에서의 형광은 SDF-1 주입 (기저 신호) 이전에 0.1 초 동안 매초 마다 또한 20초의 기간 동안 기록된다. 다음으로 20 µl의 SDF-1이 주입되고 데이터 기록은 2분의 기간 동안 이어진다. 각 실험 조건은 중복으로 수행된다. 각 웰에 대한 측정값은 먼저 기저 형광 및 세포가 없는 대조군 웰에 의해 방출되는 형광을 차감하여 교정된다. 비교 데이터는 SDF-1 (100 nM)에 의해 획득되는 최대 자극의 백분율로서 표현된다.

[0319] SDF-1 (100 nM)은 재조합 CHO/CXCR4에서 세포내 칼슘의 신속하고도 강한 방출을 유도하였던 반면, 그대로의 CHO-K1 세포에서는 형광 신호가 전혀 검출되지 않았다. 최대 강도는 기저 형광을 초과하여 > 140%에 도달하였고 SDF-1에 의한 자극이후 약 30초에 관찰되었다 (도 6A, 6B 및 6C). Mabs 515H7 (133 nM)(도 6A) 및 c515H7 (133 nM) (도 6C)는 SDF-1 (100 nM)-유도성 칼슘 신호의 강한 저해를 만들어냈다. Mabs 301aE5 (133 nM)(도 6B)는 SDF-1 (100 nM)-유도성 칼슘 신호의 부분적 저해를 생성하였다.



- [0320] 실시예 7: 인간 PBMC에서 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5에 의한 HIV-1 일차 분리물 KON, MN 및 92UG024 (X4 바이러스) 복제의 저해
- [0321] 단일 주기 중화 검정법
- [0322] 본 검정법은 농축되고 2% 감염된 CD4 T 림프구를 감염 2일 이후에 검출 가능하도록 희석된 일차 분리물 KON, MN 및 92UG024를 사용하여 36시간 이후에 수행되었다.
- [0323] Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 다양한 희석물들의 24 마이크로리터가 25  $\mu$ l의 바이러스와 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 인간 PBMC (25  $\mu$ l)가  $20 \times 10^6$  세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 넣은 Mab/바이러스 혼합물에 첨가되었고 (U자-바닥, 코스타사) RPMI 1640 10% FCS 및 20 U/ml IL-2 (R & D 시스템사, 미네아폴리스 MN)에 넣어 36시간 동안 배양되었다.
- [0324] 배양 2일 이후에, HIV-감염된 림프구는 바이러스 p24 Ag의 세포내 염색에 의해 검출되었다. 세포는 고정되었고 사이토폭스/사이토피 키트 및 펄/워시 (Perm/Wash kit, BD 사이언스사) 키트들 둘 다를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 투과되었으며 4°C로 15분 동안 첨가된 펄/워시 용액을 넣어 1/160 희석으로 사용된 형광 항-p24 Mab (FITC- 또는 PE-항-p24, 클론 KC57; 벡크만 쿨터사/이문테크사, 히알리아, FL)로 염색되었다. 3% FBS를 가진 PBS로 세척한 이후, PBMC는 DIVA 소프트웨어 (BD 바이오사이언스사)를 사용하는 유동 세포측정법 분석 (LSRII; BD 바이오사이언스사) 이전에 300  $\mu$ l의 PBS로 희석되었다. 서로 다른 시료에서 p24-양성 세포의 백분율은 전방- 및 측면-분산 매개변수에 의해 확인되는 살아있는 세포 집단의 20,000개 게이팅 이벤트에 의해 결정되었다. 살아있는 세포의 소집합은 생/사 용액 키트 (live/dead solution kit) (인비트로젠사)를 사용하여 분석되었다. p24 Ag-양성 수치는 모의-감염된 세포의 기저 수치를 차감한 이후에 획득되었다.
- [0325] 중화 백분율은 Mab가 없이 감염된 웰 대조군과 비교되는 p24-양성 세포의 감소로서 정의되었다. 중화 역가는 감염된 세포의 백분율을 90% 감소시키는 항체의 농도로서 정의되었다 (세 번 중복 수행된 연속 희석물들 사이에 간입됨).
- [0326] 도 7, 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5는 PBMC에서 HIV-1 X4 MN, KON 및 92UG024 일차 분리물 복제를 저해할 수 있다. ICs ( $\mu$ g/ml로)의 결과는 표 9에 정리되어 있다.

표 9

	KON			MN			92UG024		
	% inhibition of infected cells			% inhibition of infected cells			% inhibition of infected cells		
	90	80	50	90	80	50	90	80	50
301aE5	>150	>150	150	>150	150	1	>150	150	50
515H7	15	8	1	10	1.5	<1.5	10	3	0.5
c515H7	20	10	1.5	15	1	<1.5	15	3	<1.5

- [0327]
- [0328] 실시예 8: 인간 PBMC에서 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5에 의한 HIV-1 일차 분리물 89.6 (이중 X4/R5 바이러스) 복제의 저해
- [0329] 단일 주기 중화 검정법
- [0330] 본 검정법은 농축되고 감염 2일 이후에 2% 감염된 CD4 T 림프구를 검출 가능하도록 희석된 일차 분리물 89.6을 사용하여 36시간 이후에 수행되었다.
- [0331] Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5의 다양한 희석물들의 24 마이크로리터가 25  $\mu$ l의 바이러스와 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 인간 PBMC (25  $\mu$ l)가  $20 \times 10^6$  세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 넣은 Mab/바이러스 혼합물에 첨가되었고 (U자-바닥, 코스타 3599) RPMI 1640 10% FCS 및 20 U/ml IL-2 (R & D 시스템사, 미네아폴리스 MN)를 넣어 36시간 동안 배양되었다.
- [0332] 배양 2일 이후에, HIV-감염된 림프구는 바이러스 p24 Ag의 세포내 염색에 의해 검출되었다. 세포는 고정되었고 사이토폭스/사이토피 키트 및 펄/워시 (Perm/Wash kit, BD 사이언스사) 키트들 둘 다를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 투과되었으며 4°C로 15분 동안 첨가된 펄/워시 용액을 넣어 1/160 희석이 된 형광 항-p24 Mab (FITC-

또는 PE-항-p24, 클론 KC57; 벡크만 쿨터사/이문테크사, 히알리아, FL)로 염색되었다. 3% FBS를 첨가한 PBS로 세척한 이후, PBMC는 DIVA 소프트웨어 (BD 바이오사이언스사)를 사용하는 유동 세포측정법 분석 (LSRII; BD 바이오사이언스사) 이전에 300  $\mu$ l의 PBS로 희석되었다. 서로 다른 시료에서 p24-양성 세포의 백분율은 전방- 및 측면-분산 매개변수에 의해 확인되는 살아있는 세포 집단의 20,000개 게이팅 이벤트에 의해 결정되었다. 살아있는 세포의 소집합은 생/사 용액 키트 (인비트로젠사)로 분석되었다. p24 Ag-양성 수치는 모의-감염된 세포의 기저 수치들을 차감한 이후에 획득되었다.

[0333] 중화 백분율은 Mab가 없이 감염된 웰 대조군과 비교되는 p24-양성 세포의 감소로서 정의되었다. 중화 역가는 감염된 세포의 백분율을 90% 감소시키는 항체의 농도로서 정의되었다 (세 번 중복 수행된 연속된 희석물들 사이에 간입됨).

[0334] 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, 항-CXCR4 Mabs 515H7, c515H7 및 301aE5는 PBMC에서 HIV-1 89.6 일차 분리물 복제를 저해할 수 있다. ICs ( $\mu$ g/ml로)의 결과는 표 10에 정리되어 있다.

표 10

	89.6		
	% inhibition of infected cells		
	90	80	50
301aE5	>150	150	20
515H7	15	1.5	<1.5
c515H7	10	1.5	<1.5

[0335]

[0336] 실시예 9: 인간 PBMC에서 항-CCR5 분자 마라비록과 조합된 항-CXCR4 Mab c515H7에 의한 HIV-1 일차 분리물 89.6 및 UG93067 (이중 X4/R5 바이러스)의 저해

[0337] 일차 PBMC 상의 HIV 일차 분리물 복제의 다수 회차를 분석하는 중화 검정법

[0338] 본 검정법은 c515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 일련 희석물들 (serial dilutions)을 바이러스의 일련 희석물과 조합시키는 것이고, PBMC (말단 혈액 단핵세포)에 대한 다수 회차 (multiple cycle) 감염을 분석한다. 간략하게, c515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 25- $\mu$ l 분량의 일련 희석물들 (두 배) 네 벌 (quadruplicate)이 각각 미리수화된 (prehydrated) 96-웰 필터 플레이트 (1.25- $\mu$ m 공극 크기, Durapor Dv; 밀리포아사, 프랑스 몰레이)에 넣은 25  $\mu$ l의 연속 희석물과 배양되었다. 바이러스 대조군 (희석된 c515H7 Mab 또는 마라비록을 대체하는 25  $\mu$ l의 RPMI)의 역가측정 (titration)이 c515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 희석물 존재 시의 역가측정과 동일한 플레이트 상에서 수행되었다. 37°C에서 1시간 이후에, 25  $\mu$ l의 PHA-자극성 PBMC가 4 x 10<sup>6</sup> 세포/ml 농도로 (다섯 명의 건강한 공여자로부터 나온 PHA 활성화된 PBMC의 풀) 첨가되어 75- $\mu$ l 최종 배양 부피의 10% 우태아 혈청 (FCS), 및 ml당 20 IU의 인터루킨-2 (IL-2)가 보충된 RPMI가 만들어졌다 (R & D 시스템사). 37°C에서 24시간 이후에, 100  $\mu$ l의 동일한 배양 배지가 첨가되었다. 4일째에 여과에 의해 두 번 세척 (각각 200  $\mu$ l의 RPMI)되어 c515H7 Mab 및 마라비록이 제거되었으며 200  $\mu$ l의 새로운 배양 배지가 첨가되었다. 7일째에 배양 상청액에 있는 p24의 존재가 엘라이자에 의해 측정되었고 음성 대조군 (바이러스의 희석물로 감염되고 10<sup>-6</sup> M 지도부딘 [zidovudine, AZT] 존재 시 유지되는 배양액)과 비교하여 양성 웰을 결정하였다. 네 벌의 웰들이 c515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 각 희석물의 부재 시 ( $I_0$ ) 및 존재 시 ( $I_n$ ) 바이러스 역가 (50% 조직 배양액 감염 용량 [TCID<sub>50</sub>])를 결정하는 데 사용되었다. 중화 역가는 c515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합이 90% 바이러스 역가 감소를 가져오는 희석으로서 정의되었다 ( $I_n/I_0 = 0.1$ ).

[0339] 도 12에 나타난 바와 같이, 이중 친화성 X4R5 바이러스 89.6 복제는 c515H7 Mabs에 의해 2  $\mu$ g/ml의 IC<sub>50</sub> 값으로 저해되었다 (도 12). 마라비록은 50  $\mu$ g/ml 농도에서 IC<sub>50</sub> 저해 활성에 도달하지 못하였다 (도 12). 또한 항체 515H7에 마라비록을 2  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 c515H7 Mabs의 저해 활성을 0.2  $\mu$ g/ml의 IC<sub>50</sub> 값으로 증가

시켰다 (도 12).

[0340] c515H7 Mabs 및 마라비록 조합의 유익한 효과는 두 가지 분자의 다양한 희석물들 및 또 다른 이중 친화성 바이러스 UG93067를 사용하여 평가되었다. 도 13에 나타난 바와 같이, Mabs c515H7 및 마라비록의 저해 활성은 유사하였다. 이들 결과는 CCR5 또는 CXCR4 수용체 둘 중 하나를 사용하는 바이러스 UG93067의 능력이 비교가능한 것이라는 점을 제시해준다. UG93067 바이러스를 사용하여, 이들 X4 (c515H7 Mabs) 및 R5 (마라비록) 저해제의 조합 (각각 10  $\mu$ g/ml)만이 90% 바이러스 역가의 감소를 가능하게 하는 점으로 더 나은 활성이 입증될 수 있었다 (도 13).

[0341] **실시예 10: 항-CXCR4 키메라 Mabs c515H7의 생산**

[0342] 마우스 c515H7 Mabs의 키메라 형식이 설계되었다: 이는 관심 있는 마우스 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에 해당하고, 인간 C $\kappa$  (Ckappa) 및 IgG1 불변 도메인에 유전적으로 융합되었다. 재조합 Mabs는 pCEP4 발현 벡터를 가진 HEK293/EBNA 시스템 (미국, 인비트로젠사)을 사용하는 일시적 형질전환법 (transient transfection)으로 생산되었다.

[0343] 개별적인 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열들이 본 명세서에서 상기에 기술되었다. 더우기, 상기 표 3이 IgG2 및 4 이소형 (바람직한 이소형임)의 서열을 기재하고 있는 바와 같이, IgG1 이소형 중쇄의 예로 서열번호 80의 아미노산 서열 및 서열번호 81의 뉴클레오타이드 서열에 해당하는 c515H7 VH (G1wt)의 서열도 역시 본 명세서에서 언급될 수 있다.

[0344] 515H7 Mab 경쇄 및 중쇄의 가변 도메인에 해당하는 전체 뉴클레오타이드 서열들이 글로벌 유전자 합성 (global gene synthesis) (특셈부르크, 진큐스트사)에 의해 합성되었다. 그들은 인간 IgG1/IgG2/IgG4 면역글로불린의 경쇄 [C $\kappa$ ] 또는 중쇄 [CH1-힌지-CH2-CH3]의 불변 도메인의 전체 코딩 서열을 보유하는 pCEP4 벡터 (미국, 인비트로젠사) 내로 서브클론 되었다. 모든 클로닝 단계는 실험실 매뉴얼 (Sambrook and Russell, 2001)에 기술된 바와 같은 통상적인 분자생물학 기법에 따라 또는 공급자의 지침에 따라 수행되었다. 각 유전적 제작물 (construct)는 빅 염색 종결자 사이클 (Big Dye terminator cycle) 시퀀싱 키트 (미국, 어플라이드 바이오시스템사)를 사용하는 뉴클레오타이드 서열결정에 의해 완전히 검증되었고 3100 유전적 분석기 (3100 Genetic Analyzer)(미국, 어플라이드 바이오시스템사)를 사용하여 분석되었다.

[0345] 현탁배양-적응된 HEK293 EBNA 세포 (미국, 인비트로젠사)는 50 mL의 6 mM 글루타민이 보충된 무혈청 배지 Excell 293 (SAFC 바이오사이언스사)가 들어있는 250 mL 플라스크로 궤도 진탕기 (orbital shaker) 상에서 (110 rpm의 회전 속도) 성장시켰다. 일시적 형질전환은 1 mg/mL의 최종 농도로 물에 녹인 직쇄상 25 kDa 폴리 에틸렌이민 (PEI)(폴리사이언스사) 및 플라스미드 DNA (1 : 1의 중쇄 및 경쇄 플라스미드 비율의 경우 1.25  $\mu$ g/mL의 최종 농도)를 사용하여  $2 \times 10^6$  세포/mL 농도로 수행되었다. 형질전환 4시간 이후에, 배양액은  $10^6$  세포/mL의 최종 농도로 맞추도록 동일한 부피의 새로운 배양 배지를 넣어 희석되었다. 배양 과정은 세포 생존도 및 Mab 생산을 근거로 하여 감시되었다. 일반적으로, 세포 배양은 4 내지 5일 동안 유지되었다. Mab는 통상적인 크로마토그래피 접근법을 사용하여 단백질 A 레진 (미국, GE 헬스케어사) 상에서 정제되었다. Mabs가 기능적 평가에 적합한 수준으로 생산되었다. 생산도 수준들은 전형적으로 정제된 Mabs의 6 및 15 mg/L 사이 범위가 된다.

[0346] **실시예 11: FACS 분석법에 의한 항-CXCR4 키메라 Mabs 515H7의 결합 특이도의 특성분석**

[0347] 본 실험에서는 항-CXCR4 키메라 Mabs 515H7의 인간 CXCR4에 대한 특이적 결합이 FACS 분석법에 의해 조사되었다.

[0348] NIH3T3-hCXCR4 형질전환된 세포들이 0  $\mu$ g/mL으로부터 10  $\mu$ g/mL까지의 용량 범위로 단일클론 항체 515H7와 함께 배양되었다. 다음으로 세포는 1% BSA/PBS/0.01%  $\text{NaN}_3$ 를 사용하여 세척되었다. 이후, 알렉사-표지된 이차 항체가 세포에 첨가되었고 4°C에서 20분 동안 배양되도록 하였다. 그 다음 세포는 다시 두 번 세척되었다. 두 번째 세척에 이어서, FACS 분석법이 수행되었다. 이 결합 연구의 결과는 도 15에 제공되고, 이는 항-CXCR4 키메라 Mab c515H7가 인간 CXCR4-NIH3T3 형질전환된 세포주에 특이적으로 결합하였던 점을 보여준다. 결합이 형질전환되지 않은 NIH3T3 wt 세포에는 검출되지 않았다 (결과 미도시).



- [0349] 실시예 12: 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법에 의한, CXCR4 동종이량체에 미치는 c515H7 Mab의 효과
- [0350] 본 기능적 검정법은 CXCR4 동종이량체 수준에서 CXCR4 수용체와 결합하는 SDF-1 및/또는 c515H7 Mab 상에 유도되는 입체형태적 변화들을 평가하도록 허용한다.
- [0351] 조사된 상호작용 파트너들을 위한 발현 벡터들은 통상적인 분자생물학 기법을 적용하여 해당되는 염색체 (레닐라 레니포르미스 루시페라제, Rluc 및 황색 형광 단백질, YFP)을 가진 융합 단백질들로서 제작되었다. BRET 실험을 수행하기 이틀 전에, HEK293 세포가 해당되는 BRET 파트너를 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질전환되었다: CXCR4 동종이중합을 연구하기 위해 [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP]. 그 날 이후에, 세포는 완전 배양 배지 [10% FBS가 보충된 DMEM]를 넣어 폴리-라이신 사전코팅된 흰색 96 MW 플레이트에 분배시켰다. 먼저 세포는 플레이트에 세포 부착이 시행되도록 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양되었다. 그 다음 세포는 200  $\mu$ l DMEM/웰로 처리하여 하룻밤 동안 굼겼다. BRET 실험 직전에, DMEM은 제거되었고 세포는 PBS로 신속하게 세척되었다. 그 다음 세포는 항체의 존재 시 또는 부재 시 PBS로 37°C에서 10분 동안 배양되었으며, 이후 100 nM의 SDF-1 부재 시 또는 존재 시 5  $\mu$ M의 실렌타진 H가 최종 부피 50  $\mu$ l로 첨가되었다. 37°C에서 10분 동안 더 배양한 이후에, 미스라스 LB 940 다중표지 리더기 (베르톨트사)를 사용하여 485 nm 및 530 nm에서 빛-방출의 측정이 개시되었다 (1s/과장/웰이 상온에서 15회 반복되었다).
- [0352] BRET 비율의 계산이 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (Angers *et al.*, 2000):  $[(\text{방출}_{530 \text{ nm}}) - (\text{방출}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{방출}_{485 \text{ nm}})$ , 여기에서 동일한 실험 조건 하에서 Rluc 융합 단백질을 단독 발현하는 세포의 경우  $\text{Cf} = (\text{방출}_{530 \text{ nm}}) / (\text{방출}_{485 \text{ nm}})$ . 이 방정식을 단순화하면 BRET 비율이 두 가지 BRET 파트너가 존재할 때 획득되는 530/485 nm 비율에 해당하고, 이는 검정법에 Rluc에 융합된 파트너만이 존재할 때 동일한 실험 조건 하에서 획득되는 530/485 nm 비율에 의해 교정되는 것을 보여준다. 해석을 위해, 결과는 밀리BRET 유닛 (mBU)으로 표현된다; mBU는 1000을 곱한 BRET 비율에 해당한다.
- [0353] SDF1 (100 nM)이 CXCR4 수용체에 융합된 공여자 및 수용자 단백질의 공간적 접근으로부터 생겨나는 BRET 신호를 약 10% 증가시켰고, 이는 CXCR4/CXCR4 동종이량체의 형성 또는 미리-존재하던 이량체의 입체형태적 변화를 가리키는 것 같다 (도 16). Mab c515H7는 CXCR4 동종이량체에 대한 SDF-1-유도성 입체형태적 변화를 조정할 수 있었다 (SDF-1-유도성 BRET 증가의 96% 저해, 도 16). Mab c515H7도 역시 스스로 CXCR4/CXCR4 공간적 접근을 조정할 수 있었으며, 이는 CXCR4/CXCR4 동종이량체 입체형태에 미치는 본 Mab의 영향을 나타내는 것이다 (도 16).
- [0354] 실시예 13: CD4 및 CXCR4 또는 CCR5를 발현하는 GFP-형질감염 인간 골육종 (GHOST) 세포를 사용한 Mab 515H7 항-HIV-1 활성의 시험관내 평가
- [0355] CXCR4 515H7 Mab의 특이도를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 CD4 및 CXCR4 또는 CCR5를 발현하는 GHOST 세포들을 사용하여 본 Mab의 항-HIV-1 활성을 평가하였다.
- [0356] 본 검정법은 X4 HIV-1 LAI 바이러스 (CXCR4를 발현하는 고스트 (Ghost) 세포와 함께) 또는 R5 HIV-1 BaL 바이러스 (CCR5를 발현하는 고스트 세포와 함께) 둘 중 하나를 사용하여 48시간 경과 시 수행되었다. 500  $\mu$ l의 고스트 세포가 10% FCS가 보충된 두배코 배양 배지에 24시간 동안 도말되었다 ( $2.5 \times 10^5$  세포/ml). Mab 515H7의 다양한 희석물들이 37°C에서 1시간 동안 배양된 다음 희석된 HIV-1 LAI 바이러스 (1/10) 및 HIV-1 BaL 바이러스 (1/7)가 세포에 48시간 동안 첨가되었다. 세포는 트립신이 처리되었고 PBS 1X로 세척되었다. 세포를 고정하고 바이러스를 불활성화 하도록, 300  $\mu$ l의 1.5% 파라포름알데하이드가 4°C의 암소에서 2시간 동안 세포 펠렛에 첨가되었다. GFP-양성 세포가 유동 세포측정법에 의해 분석되었고 HIV-1 감염의 저해가 계산되었다.
- [0357] 감염된 세포들의 저해 백분율은 Mab가 없는 감염된 웰 대조군과 비교하여 정의되었다. ICs의 결과 ( $\mu$ g/ml)는 표 11에 정리되어 있고, 항-CXCR4 Mab 515H7은 CXCR4 발현하는 고스트 세포에서 HIV-1 X4 Lai 바이러스 감염을 저해할 수 있었던 반면, CCR5 발현하는 고스트 세포에서는 HIV-1 R5 BaL 바이러스의 감염을 저해하는 데 전적으로 활성이 없었다.

표 11

	GHOST CXCR4/ LAI virus			GHOST CCR5/ BaL virus		
	% inhibition of infected cells			% inhibition of infected cells		
	90	80	50	90	80	50
515H7	0.5	0.1	0.08	>75	>75	>75

[0358]

[0359] 실시예 14: 515H7 항-CXCR4 마우스 항체의 인간화 및 상기 h515H7의 단편의 생산

[0360] - 일반적인 절차

[0361] 515H7 항-CXCR4 마우스 항체의 인간화는 CDR-이식 (CDR-grafting)의 보편적 규칙을 적용하여 수행되었다. 면역 유전학적 분석 및 CDR과 구조를 (FR) 부위의 정의는 독특한 IMGT 번호매김 설계뿐만 아니라 IMGT 라이브러리 도구들을 적용하여 수행되었다 (Lefranc, 1997- www.imgt.org).

[0362] 515H7의 인간화 변형체들의 결합은 인간 CXCR4로 안정하게 형질전환된 NIH3T3 세포주 상에서 결정되었다. 결합 활성은 바이오틴화된 마우스 항체와 경쟁 검정법에 의해 평가되었다. 두 번째 시도에서, 인간화 항체들은 RAMOS 세포에 대한 바이오틴화된 SDF-1의 결합을 저해하는 그들의 능력에 대해 평가되었다. RAMOS 세포는 CXCR4의 높은 발현 및 CXCR7과 SDF-1의 낮은 발현 때문에 선택되었다.

[0363] 이들 검정법들은 항-CXCR4 항체의 제조합 인간화 버전을 특성분석하는 데 사용되었다. 가변 도메인들은 IgG1/k 불변 도메인으로 포맷되었고 포유동물 발현 벡터 pCEP 내로 클론되었다. 제조합 IgG1/κ-유래 항체들이 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었다. 발현 배양 상정액들은 여과되었으며 항체들은 프로테인 A 세파로스를 사용하여 정제되었다. 정제된 항체들은 PBS를 넣어 재완충되었으며 항체 농도는 엘라이자에 의해 결정되었다.

[0364] 제조합 항체 단편들이 인간화 항체의 가변 도메인에 특이적인 올리고뉴클레오타이드를 사용한 PCR을 실시하고 이들을 대장균 시스템에 서브클로닝하여 생성되었다. 항체 단편의 정제는 고정된 금속 이온 친화 크로마토그래피 (IMAC)에 의해 시행되었다.

[0365] - 515H7 가변 도메인들의 인간화

[0366] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인들의 서로 다른 서열 정렬들은 도 17 및 도 18에 설명되어 있다.

[0367] 첫 번째 일련의 실험들에서, 세 가지 첫 번째 인간화 변형체들의 항-CXCR4 결합 활성들이 분석되었다. VH 변형체 1 (VH1)은 마우스 VL과 조합되었고 이들 제작물은 바이오틴화된 마우스 515H7 부모 항체의 결합을 저해하는 그들의 능력으로 평가되었다. VH1의 가변 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 90을 포함하는 한편 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 91을 포함한다. 전장의 VH1의 아미노산 서열은 서열번호 92을 포함하는 한편 그의 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 93을 포함한다. 본 제작물은 키메라 항체와 유사한 마우스 항체와 경쟁하는 능력을 보여주었다 (도 19A). 이것은 대부분의 인간 VH 변형체가 키메라와 동일한 결합 능력을 가지는 것을 가르킨다. 따라서, VH1은 VL의 변형체 2와 조합되었다 (도 19B).

[0368] 심화 실험들에서, 항체 515H7의 인간화 변형체들이 CXCR4 발현하는 세포들에 대한 SDF-1의 결합을 저해하는지 여부가 결정되었다 (도 20). hz515H7의 인간화 변형체들의 저해 능력이 유동 세포측정법으로 바이오틴화된 SDF-1을 검출하여 평가되었다. 인간화 항체 hz515H7 VH1 D76N VL2는 키메라 c515H7과 유사한 SDF-1 결합을 저해하는 능력을 가진다.

[0369] 인간화된 변형체 hz515H7 VH1 VL2의 항체 단편도 역시 테스트되었고 상기 항체 단편이 SDF-1의 결합을 완벽하게 저해할 수 있는 점이 결정되었다 (도 20).

[0370] 실시예 15: FACS 분석법에 의한 항-CXCR4 인간화 Mab 515H7의 결합 특이도의 특성분석

[0371] 본 실험에서는 항-CXCR4 인간화 Mabs 515H7의 인간 CXCR4에 대한 특이적 결합이 FACS 분석법에 의해 조사되었다.

[0372] 형질전환된 NIH-3T3, NIH3T3-hCXCR4가 0으로부터 10 μg/mL까지의 인간화 Mabs 515H7 (hz515H7 VH1 D76N VL2,

hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, 및 hz515H7 VH1 D76N VL2.3)와 4℃ 암소에서 20분 동안 100 μl의 FACS 완충용액으로 배양되었다. FACS 완충용액으로 3번 세척한 이후에, 세포는 이차 항체인 염소 항-인간 알렉사 488 (1/500 희석)을 사용하여 4℃ 암소에서 20분 동안 배양되었다. FACS 완충용액으로 3번 세척한 이후에, 프로피디움 요오드가 각 웰에 첨가되었고 살아있는 세포만 FACS에 의해 분석되었다. 적어도 5,000 개의 살아있는 세포가 각 조건에서 형광 강도의 평균 값을 측정하는 데 평가되었다.

[0373] 이들 결합 연구들의 결과는 도 21에 제공되고, 이는 항-CXCR4 인간화 Mabs hz515H7가 인간 CXCR4-NIH3T3 형질 전환된 세포주에 특이적으로 결합하는 점을 [FACS에 의해 획득된 평균 형광 강도 (MFI)]로 보여준다 (NIH3T3 부모 세포의 경우, MFI = 2.2).

[0374] **실시예 16: 생물발광 공명에너지 전이 (BRET) 접근법에 의한, CXCR4 동종이량체에 미치는 hz515H7 Mabs의 효과**

[0375] 본 기능적 검정법은 CXCR4 동종이량체 수준에서 CXCR4 수용체와 결합하는 SDF-1 및/또는 hz515H7 VH1 D76N VL2, hz515H7 VH1 D76N VL2.1, hz515H7 VH1 D76N VL2.2, 및 hz515H7 VH1 D76N VL2.3515H7 상에 유도되는 입체형태적 변화들을 평가하도록 허용한다.

[0376] 조사된 상호작용 파트너들을 위한 발현 벡터들은 통상적인 분자생물학 기법들을 적용하여 해당되는 염색체 (*레니포르미스* 루시페라제, Rluc 및 황색 형광 단백질, YFP)을 가진 융합 단백질로서 제작되었다. BRET 실험을 수행하기 이들 이전에, HEK293 세포가 해당되는 BRET 파트너를 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질전환되었다: CXCR4 동종이중합을 연구하기 위해 [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP]. 그 날 이후에, 세포는 완전 배양 배지 [10% FBS가 보충된 DMEM]를 넣어 폴리-라이신 사전코팅된 흰색 96 MW 플레이트에 분배시켰다. 먼저 세포는 플레이트에 세포 부착을 시행하도록 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양되었다. 그 다음 세포는 200 μl DMEM/웰로 처리하여 하룻밤 동안 굼겼다. BRET 실험 직전에, DMEM은 제거되었고 세포는 PBS를 사용하여 신속하게 세척되었다. 그 다음 세포는 항체의 존재 시 또는 부재 시 PBS로 37℃에서 10분 동안 배양되었으며, 이후 300 nM의 SDF-1 존재 시 또는 부재 시 5 μM의 실렌타린 H가 최종 부피 50 μl로 첨가되었다. 37℃에서 10분 더 배양한 이후에, 미스라스 LB 940 다중표지 리더기 (베르톨트사)를 사용하여 485 nm 및 530 nm에서 빛-방출의 측정이 개시되었다 (1s/과장/웰이 상온에서 15회 반복되었다).

[0377] BRET 비율의 계산이 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다 (Angers *et al.*, 2000):  $[(\text{방출}_{530 \text{ nm}}) - (\text{방출}_{485 \text{ nm}}) \times \text{Cf}] / (\text{방출}_{485 \text{ nm}})$ , 여기에서 동일한 실험 조건 하에서 Rluc 융합 단백질을 단독 발현하는 세포의 경우  $\text{Cf} = (\text{방출}_{530 \text{ nm}}) / (\text{방출}_{485 \text{ nm}})$ . 이 방정식을 단순화하면 BRET 비율이 두 가지 BRET 파트너가 존재할 때 획득되는 530/485 nm 비율에 해당하고, 이는 검정법에 Rluc에 융합된 파트너만이 존재할 때 동일한 실험 조건 하에서 획득되는 530/485 nm 비율에 의해 교정되는 것을 보여준다. 해석 (readability)을 위해, 결과는 밀리BRET 유닛 (mBU)으로 표현된다; mBU는 1000을 곱한 BRET 비율에 해당한다.

[0378] SDF1 (100 nM)이 CXCR4 수용체에 융합된 공여자 및 수용자 단백질의 공간적 접근으로부터 생겨나는 BRET 신호를 약 12% 증가시켰고, 이는 CXCR4/CXCR4 동종이량체들의 형성 또는 미리-존재하던 이량체의 입체형태적 변화들을 가리키는 것 같다 (도 22).

[0379] 515H7 인간화 Mabs는 CXCR4 동종이량체들에 대한 SDF-1-유도성 입체형태적 변화들을 hz515H7 VH1 D76N-VL2 Mab의 경우 약 88%, hz515H7 VH1 D76N-VL2.1의 경우 65%, hz515H7 VH1 D76N-VL2.2의 경우 33%, 또한 hz515H7 VH1 D76N-VL2.3의 경우 21%의 SDF-1-유도성 BRET 증가의 저해 백분율로 조정할 수 있었다 (도 22).

[0380] **실시예 17: MT-4 세포에서 항-CXCR4 Mab hz515H7에 의한 HIV-1<sub>IIIb</sub> (X4 바이러스) 복제의 저해**

[0381] 본 검정법에서, HIV-1<sub>IIIb</sub>에 대한 hz515H7 Mab의 활성은 MT-4 세포들에서 바이러스-유도성 세포병원성의 저해를 기초로 하였다. 세포들은 5일 이내에 생존 세포들의 수를 90%까지 감소시키는 바이러스 용량인 조직 배양 감염 용량 50 (TCID<sub>50</sub>)의 HIV-1<sub>IIIb</sub> 분리물로 5회 감염되었다. 37℃에서 30분 동안 흡착 이후에, 감염된 세포들은 20% 열-불활성화 우태아혈청 (FCS), 100 IU/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신, 2 mM 글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에 넣어  $2 \times 10^5$  개 세포/mL 농도로 맞추었고, 96-웰 편평-바닥 조직 배양 플레이트들 (코스타 3596) (100 μg/웰) 내에 100 μL의 hz515H7 Mab와 함께 다양한 농도들로 접종되었다. 5일째, 세포 생존도가 MTT 비

색 반응으로 측정되었다. hz515H7 Mab으로 처리된 감염된 세포들의 보호작용 백분율은 다음의 공식에 따라 계산되었다:

[0382] 보호작용 % =

[0383]  $\{[\text{hz515H7 Mab으로 처리된 감염 세포의 OD}_{540}] - [\text{감염 세포-대조군의 OD}_{540}]\} /$

[0384]  $\{[\text{미감염 세포-대조군의 OD}_{540}] - [\text{감염 세포-대조군의 OD}_{540}]\}$

[0385] 도 23에 나타난 바와 같이, hz515H7 Mab는 MT-4 세포들에서 HIV-1<sub>MB</sub>-유도성 세포병원성을 저해할 수 있었기 때문에 현저한 항-HIV-1 활성을 보여주고 있다.

[0386] **실시예 18: 인간 PBMC에서 항-CXCR4 Mabs hz515H7에 의한 HIV-1 일차 분리물 KON (X4 바이러스) 복제의 저해**

[0387] 단일 주기 중화 검정법

[0388] 본 검정법은 농축되고 2% 감염된 CD4 T 림프구를 감염 2일 이후에 검출 가능하도록 희석된 일차 분리물 KON을 사용하여 36시간 이후에 수행되었다.

[0389] Mabs hz515H7의 다양한 희석물들의 24 마이크로리터가 25  $\mu$ l의 바이러스와 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. 인간 PBMC (25  $\mu$ l)가  $20 \times 10^6$  세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 넣은 Mab/바이러스 혼합물에 첨가되었고 (U자-바닥, 코스타 3599) RPMI 1640 10% FCS 및 20 U/ml IL-2 (R & D 시스템사, 미네아폴리스 MN)에 넣어 36시간 동안 배양되었다.

[0390] 배양 2일 이후에, HIV-감염된 림프구는 바이러스 p24 Ag의 세포내 염색에 의해 검출되었다. 세포는 고정되었고 사이토펙스/사이토펙 키트 및 펄/워시 (Perm/Wash kit, BD 사이언스사) 키트들 둘 다를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 투과되었으며 4°C로 15분 동안 첨가된 펄/워시 용액을 넣어 1/160 희석으로 사용된 형광 항-p24 Mab (FITC- 또는 PE-항-p24, 클론 KC57; 벡크만 쿨터사/이문테크사, 히알리아, FL)로 염색되었다. 3% FBS를 가진 PBS로 세척한 이후, PBMC는 DIVA 소프트웨어 (BD 바이오사이언스사)를 사용하는 유동 세포측정법 분석 (LSRII; BD 바이오사이언스사) 이전에 300  $\mu$ l의 PBS로 희석되었다. 서로 다른 시료에서 p24-양성 세포의 백분율은 전방- 및 측면-분산 매개변수에 의해 확인되는 살아있는 세포 집단의 20,000개 게이팅 이벤트에 의해 결정되었다. 살아있는 세포의 소집합은 생/사 용액 키트 (인비트로젠사)를 사용하여 분석되었다. p24 Ag-양성 수치는 모의-감염된 세포의 기저 수치들을 차감한 이후에 획득되었다.

[0391] 중화 백분율은 Mab가 없이 감염된 웰 대조군과 비교되는 p24-양성 세포의 감소로서 정의되었다. 중화 역가는 감염된 세포의 백분율을 90% 감소시키는 항체의 농도로서 정의되었다 (세 번 중복 수행된 연속 희석물들 사이에 간입됨).

[0392] 도 24에 나타난 바와 같이, 항-CXCR4 Mabs hz515H7는 PBMC에서 HIV-1 X4 KON 일차 분리물 복제를 저해할 수 있다.

[0393] **실시예 19: 인간 PBMC에서 항-CCR5 분자 마라비록과 조합된 항-CXCR4 Mab hz515H7에 의한 HIV-1 일차 분리물 89.6 및 UG93067 (이중 X4/R5 바이러스)의 저해**

[0394] 일차 PBMC 상의 HIV 일차 분리물 복제의 다수 회차를 분석하는 중화 검정법

[0395] 본 검정법은 hz515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 둘 다의 조합의 일련 희석물들 (serial dilutions)을 바이러스의 일련 희석물들과 조합시키는 것이고, PBMC (말단 혈액 단핵세포)에 대한 다수 회차 (multiple cycle) 감염을 분석한다. 간략하게, hz515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 25- $\mu$ l 분량의 일련 희석물들 (두 배) 네 벌 (quadruplicate)이 각각 미리수화된 (prehydrated) 96-웰 필터 플레이트 (1.25- $\mu$ m 공극 크기, Durapor Dv; 밀리포아사, 프랑스 몰레이)에 넣은 25  $\mu$ l의 연속 희석물과 배양되었다. 바이러스 대조군 (희석된 hz515H7 Mab 또는 마라비록을 대체하는 25  $\mu$ l의 RPMI)의 역가측정 (titration)이 hz515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 희석물 존재 시의 역가측정과 동일한 플레이트 상에서 수행되었다. 37°C에서 1시간 이후에, 25  $\mu$ l의 PHA-자극성 PBMC가  $4 \times 10^6$  세포/ml 농도로 (다섯 명의 건강한 공여자로부터 나온 PHA 활성화된 PBMC의 풀) 첨가되어 75- $\mu$ l 최종 배양 부피의 10% 우태아 혈청 (FCS), 및 ml당 20 IU의 인터루킨-2 (IL-2)가 보충된 RPMI



가 만들어졌다 (R & D 시스템사). 37℃에서 24시간 이후에, 100  $\mu$ l의 동일한 배양 배지가 첨가되었다. 4일째에 여과에 의해 두 번 세척 (각각 200  $\mu$ l의 RPMI)되어 hz515H7 Mab 및 마라비록이 제거되었으며 200  $\mu$ l의 새로운 배양 배지가 첨가되었다. 7일째에 배양 상청액에 있는 p24의 존재가 엘라이자에 의해 측정되었고 음성 대조군 (바이러스의 회석물로 감염되고  $10^{-6}$  M 지도부딘 [zidovudine, AZT] 존재 시 유지되는 배양액)과 비교하여 양성 웰을 결정하였다. 네 벌의 웰들이 515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 각 회석물의 부재 시 ( $V_0$ ) 및 존재 시 ( $V_n$ ) 바이러스 역가 (50% 조직 배양액 감염 용량 [TCID<sub>50</sub>])를 결정하는 데 사용되었다. 중화 역가는 515H7 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합이 90% 바이러스 역가 감소를 가져오는 회석으로서 정의되었다 ( $V_n/V_0 = 0.1$ ).

[0396] hz515H7 Mab 및 마라비록 간의 가능한 상승작용 (synergy)은 이중 친화성 바이러스들 89.6 및 UG93067을 사용하는 두 가지 분자들의 다양한 회석들의 조합을 사용하여 평가되었다. 도 25 및 26에서 나타난 바와 같이, Mab hz515H7 및 마라비록의 저해 활성은 유사하였다. 이들 X4 (hz515H7 Mab) 및 R5 (마라비록) 저해제들의 조합은 PBMC에서 89.6 및 UG93067 이중 X4/R5 바이러스 역가들의 90% 감소를 허용하였다 (각각 도 25 및 도 26).

[0397] 실시예 20: 인간 PBMC에서 항-CXCR4 Mabs hz515H7 IgG4에 의한 HIV-1 일차 분리물 KON (X4 바이러스) 복제의 저해

[0398] 단일 주기 중화 검정법

[0399] 본 검정법은 농축되고 2% 감염된 CD4 T 림프구를 감염 2일 이후에 검출 가능하도록 회석된 일차 분리물 KON을 사용하여 36시간 이후에 수행되었다.

[0400] Mabs hz515H7 IgG4의 다양한 회석물들의 24 마이크로리터가 25  $\mu$ l의 바이러스와 37℃에서 1시간 동안 배양되었다. 인간 PBMC (25  $\mu$ l)가  $20 \times 10^6$  세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 넣은 Mab/바이러스 혼합물에 첨가되었고 (U자-바닥, 코스타 3599) RPMI 1640 10% FCS 및 20 U/ml IL-2 (R & D 시스템사, 미네아폴리스 MN)에 넣어 36시간 동안 배양되었다.

[0401] 배양 2일 이후에, HIV-감염된 림프구는 바이러스 p24 Ag의 세포내 염색에 의해 검출되었다. 세포는 고정되었고 사이토폭스/사이토팜 키트 및 펄/워시 (Perm/Wash kit, BD 사이언스사) 키트들 둘 다를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 투과되었으며 4℃로 15분 동안 첨가된 펄/워시 용액을 넣어 1/160 회석으로 사용된 형광 항-p24 Mab (FITC- 또는 PE-항-p24, 클론 KC57; 벡크만 쿨터사/이문테크사, 히알리아, FL)로 염색되었다. 3% FBS를 가진 PBS로 세척한 이후, PBMC는 DIVA 소프트웨어 (BD 바이오사이언스사)를 사용하는 유동 세포측정법 분석 (LSRII; BD 바이오사이언스사) 이전에 300  $\mu$ l의 PBS로 회석되었다. 서로 다른 시료들에서 p24-양성 세포의 백분율은 전방- 및 측면-분산 매개변수들에 의해 확인되는 살아있는 세포 집단의 20,000개 게이팅 이벤트에 의해 결정되었다. 살아있는 세포의 소집합은 생/사 용액 키트 (인비트로젠사)를 사용하여 분석되었다. p24 Ag-양성 수치는 모의-감염된 세포의 기저 수치들을 차감한 이후에 획득되었다.

[0402] 중화 백분율은 Mab가 없이 감염된 웰 대조군과 비교되는 p24-양성 세포의 감소로서 정의되었다. 중화 역가는 감염된 세포의 백분율을 90% 감소시키는 항체의 농도로서 정의되었다 (세 번 중복 수행된 연속 회석물들 사이에 간입됨).

[0403] 도 27에 나타난 바와 같이, 항-CXCR4 Mabs hz515H7 IgG4는 PBMC에서 HIV-1 X4 KON 일차 분리물 복제를 저해할 수 있다.

[0404] 실시예 21: 인간 PBMC에서 항-CCR5 분자 마라비록과 조합된 항-CXCR4 Mab hz515H7 IgG4에 의한 HIV-1 일차 분리물 89.6 (이중 X4/R5 바이러스)의 저해

[0405] 일차 PBMC 상의 HIV 일차 분리물 복제의 다수 회차를 분석하는 중화 검정법

[0406] 본 검정법은 hz515H7 IgG4 Mabs 또는 마라비록 또는 둘 다의 조합의 일련 회석물들을 바이러스의 일련 회석물들과 조합시키는 것이고, PBMC (말단 혈액 단핵세포)에 대한 다수 회차 감염을 분석한다. 간략하게, hz515H7 IgG4 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 25- $\mu$ l 분량의 일련 회석물들 (두 배) 네 벌이 각각 미리수화된 96-웰 필터 플레이트 (1.25- $\mu$ m 공극 크기, Durapor Dv; 밀리포아사, 프랑스 몰셰이)에 넣은 25  $\mu$ l의 연속 회석

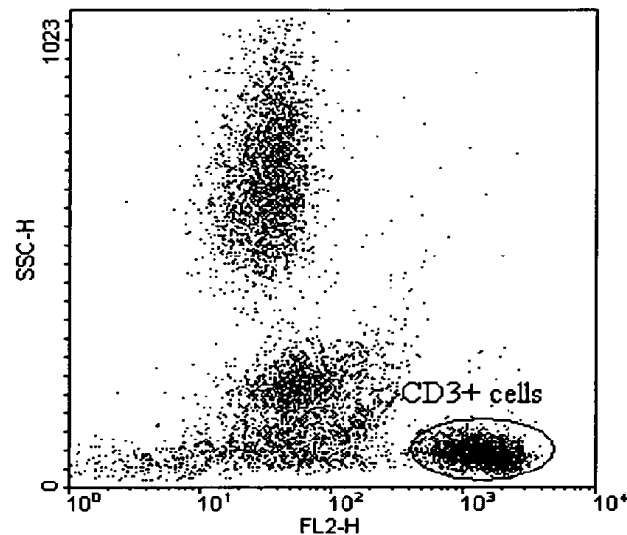


물과 배양되었다. 바이러스 대조군 (희석된 hz515H7 IgG4 Mab 또는 마라비록을 대체하는 25  $\mu$ l의 RPMI)의 역가측정 (titration)이 hz515H7 IgG4 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 희석물 존재 시의 역가측정과 동일한 플레이트 상에서 수행되었다. 37°C에서 1시간 이후에, 25  $\mu$ l의 PHA-자극성 PBMC가  $4 \times 10^6$  세포/ml 농도로 (다섯 명의 건강한 공여자로부터 나온 PHA 활성화된 PBMC의 풀) 첨가되어 75- $\mu$ l 최종 배양 부피의 10% 우태아 혈청 (FCS), 및 ml당 20 IU의 인터루킨-2 (IL-2)가 보충된 RPMI가 만들어졌다 (R & D 시스템사). 37°C에서 24 시간 이후에, 100  $\mu$ l의 동일한 배양 배지가 첨가되었다. 4일째에 여과에 의해 두 번 세척 (각각 200  $\mu$ l의 RPMI)되어 hz515H7 IgG4 Mab 및 마라비록이 제거되었으며 200  $\mu$ l의 새로운 배양 배지가 첨가되었다. 7일째에 배양 상청액들에 있는 p24의 존재가 엘라이자에 의해 측정되었고 음성 대조군들 (바이러스의 희석물들로 감염되고  $10^{-6}$  M 지도부딘 [zidovudine, AZT] 존재 시 유지되는 배양액들)과 비교하여 양성 웰을 결정하였다. 네 벌의 웰들이 hz515H7 IgG4 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합의 각 희석물의 부재 시 ( $V_0$ ) 및 존재 시 ( $V_n$ ) 바이러스 역가 (50% 조직 배양액 감염 용량 [TCID<sub>50</sub>])를 결정하는 데 사용되었다. 중화 역가는 hz515H7 IgG4 Mabs 또는 마라비록 또는 이 둘 조합이 바이러스 역가의 90% 감소를 가져오는 희석으로서 정의되었다 ( $V_n/V_0 = 0.1$ ).

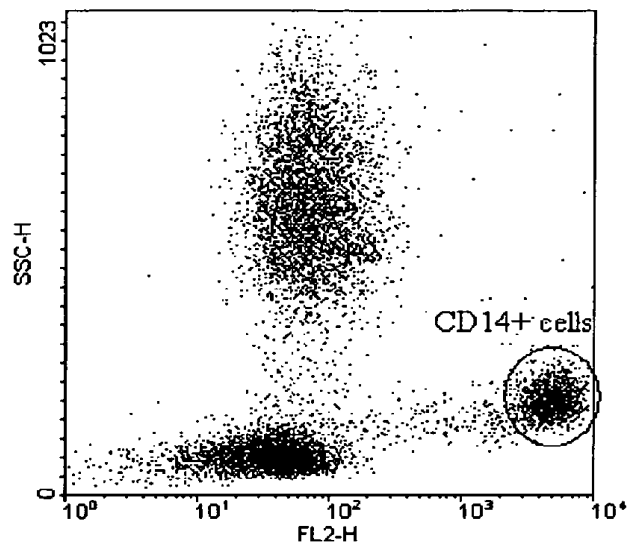
[0407] hz515H7 IgG4 Mab 및 마라비록 간의 가능한 상승작용은 이중 친화성 바이러스 89.6을 사용하는 두 가지 분자들의 다양한 희석들의 조합을 사용하여 평가되었다. 도 28에서 나타난 바와 같이, 이들 X4 (hz515H7 IgG4 Mab) 및 R5 (마라비록) 저해제들의 조합은 PBMC에서 89.6 이중 X4/R5 바이러스 역가의 90% 감소를 허용하였다 (도 28).

## 도면

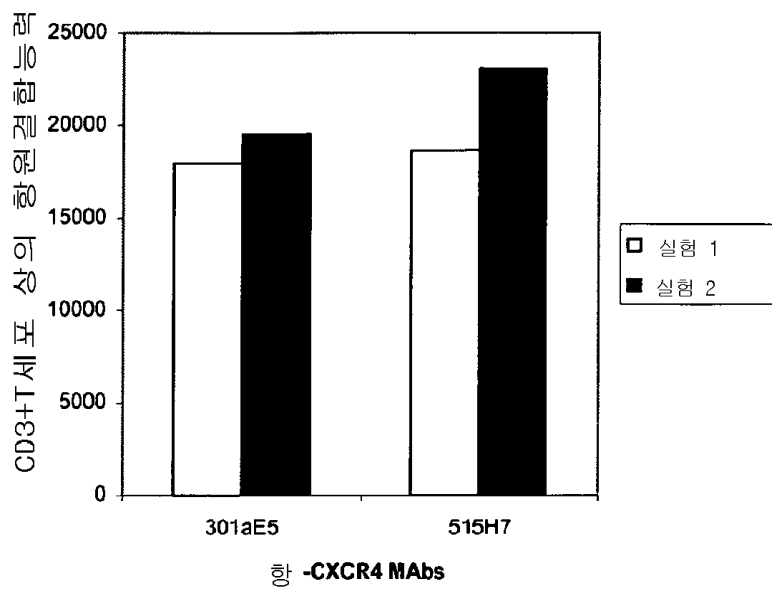
### 도면1a



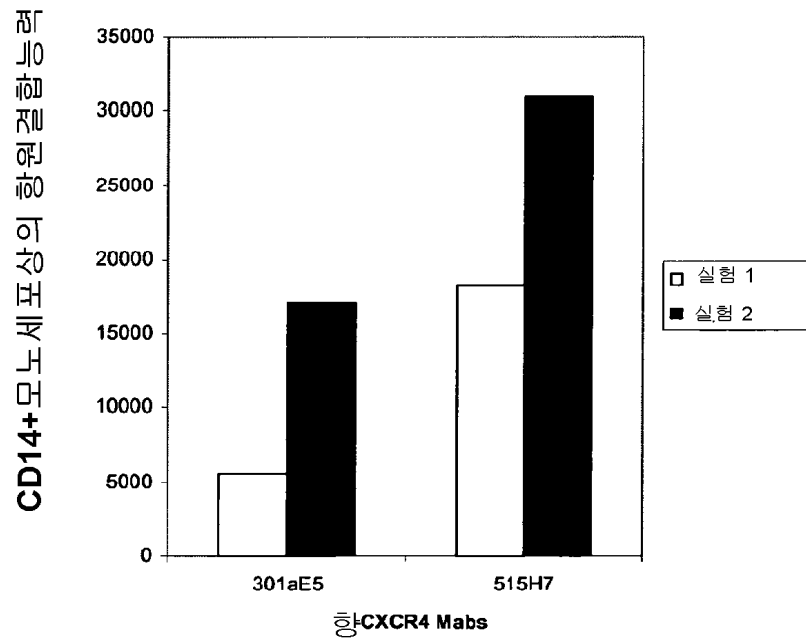
도면1b



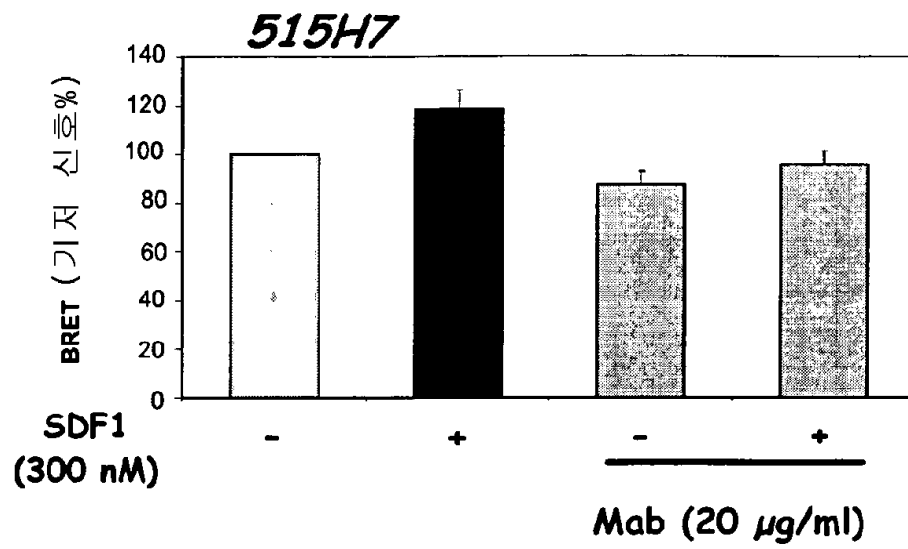
도면2a



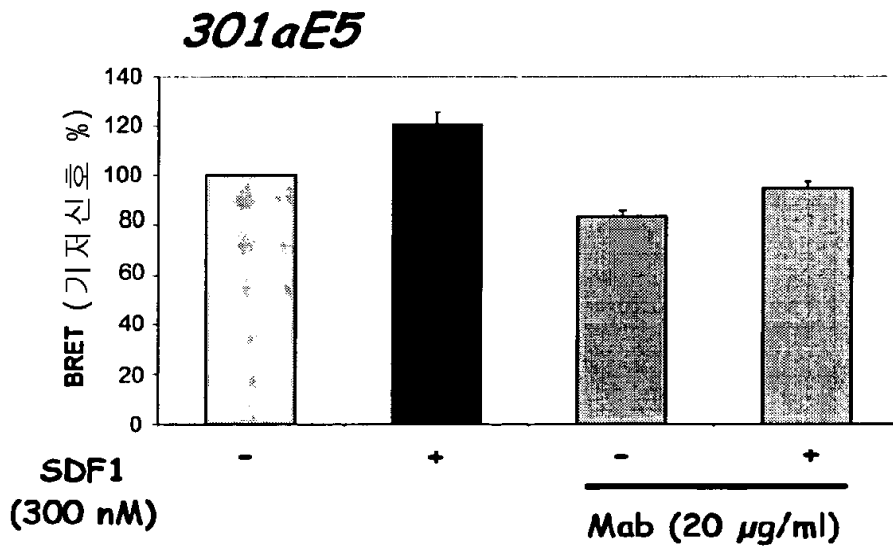
도면2b



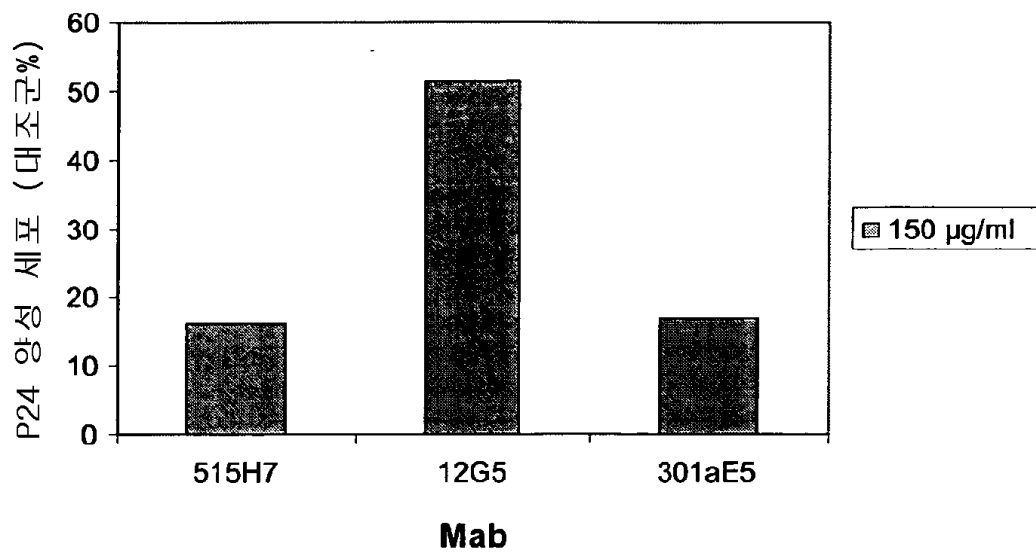
도면3a



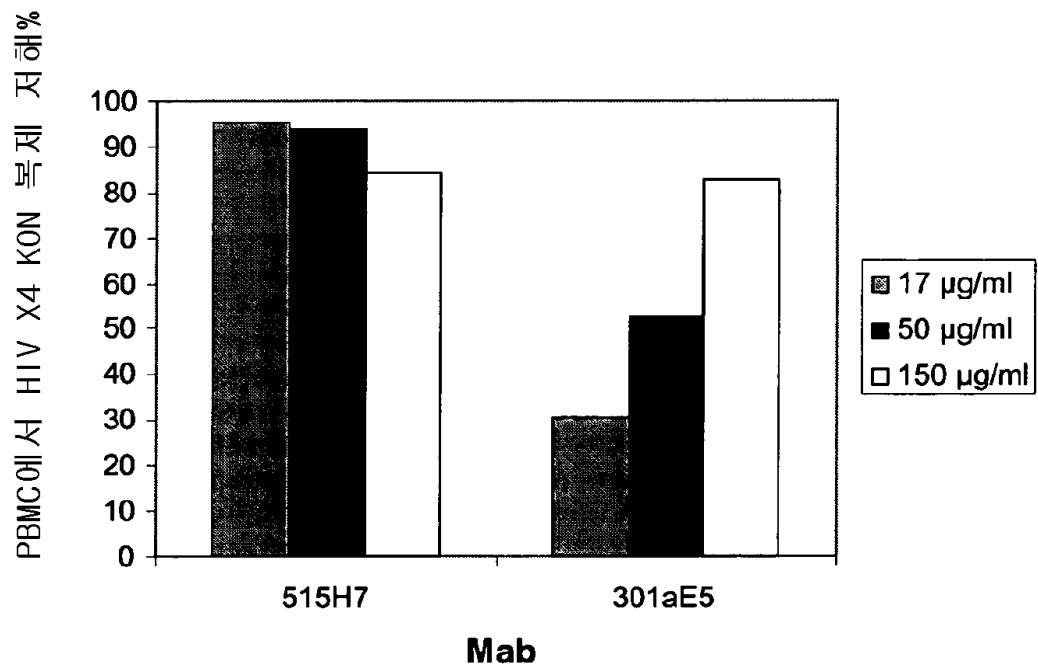
도면3b



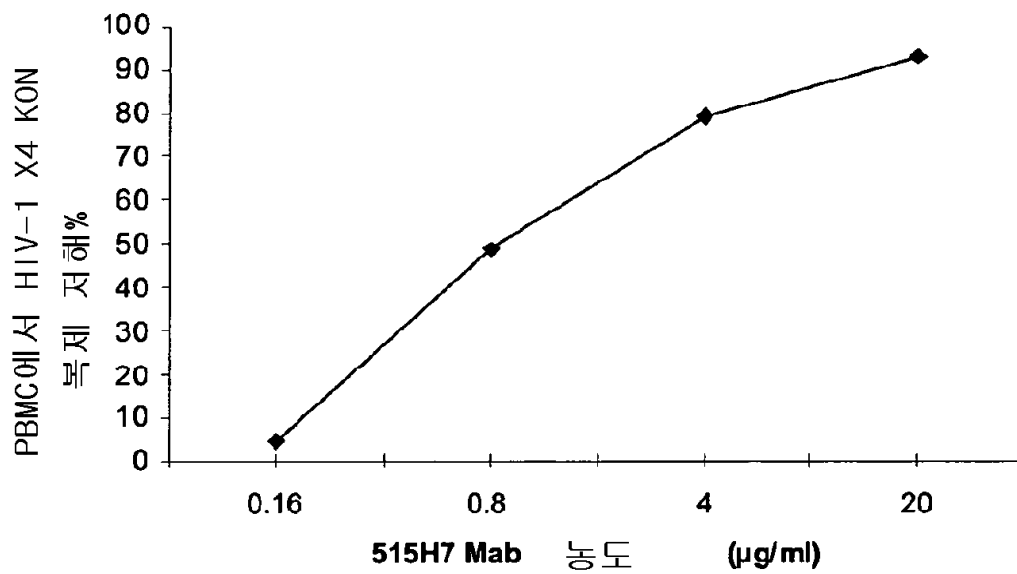
도면4a



도면4b

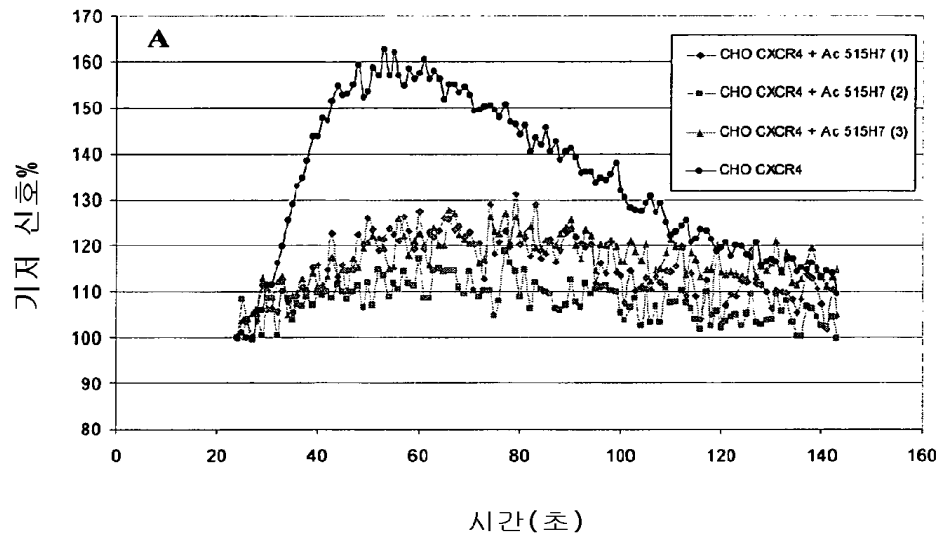


도면5

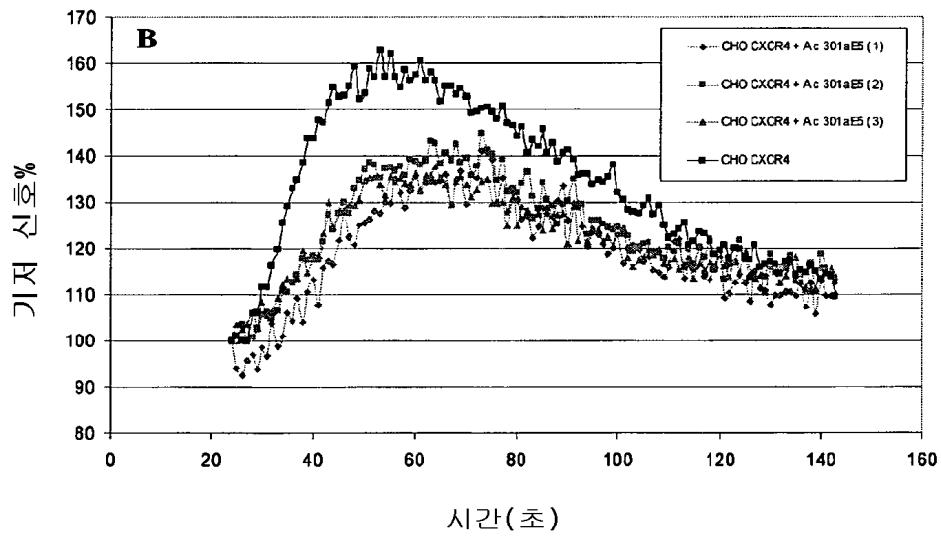




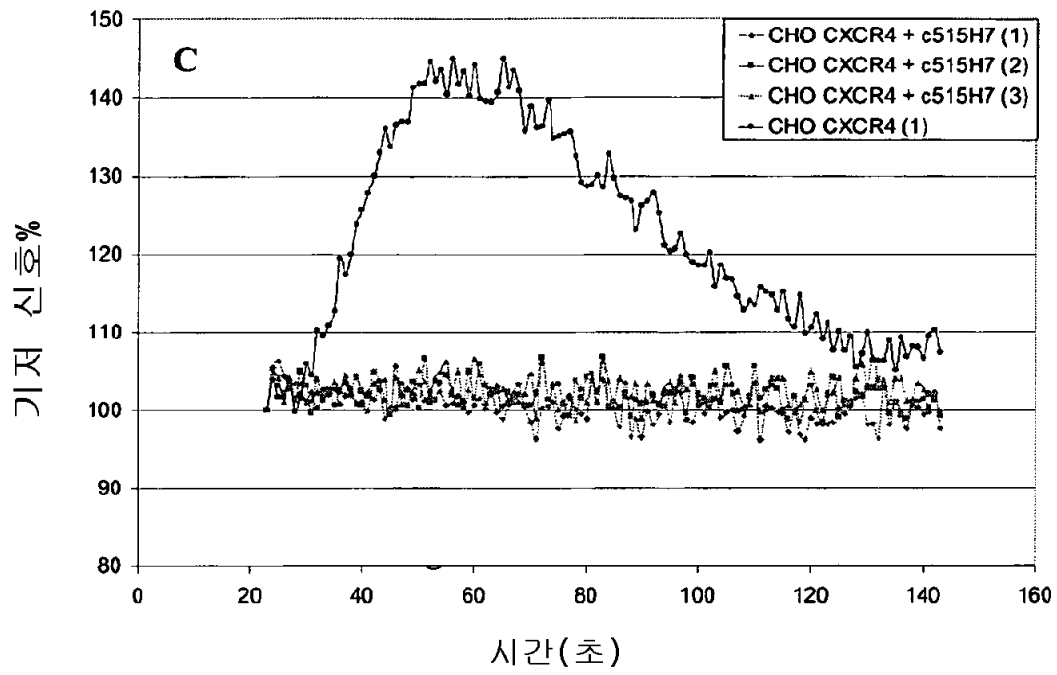
도면6a



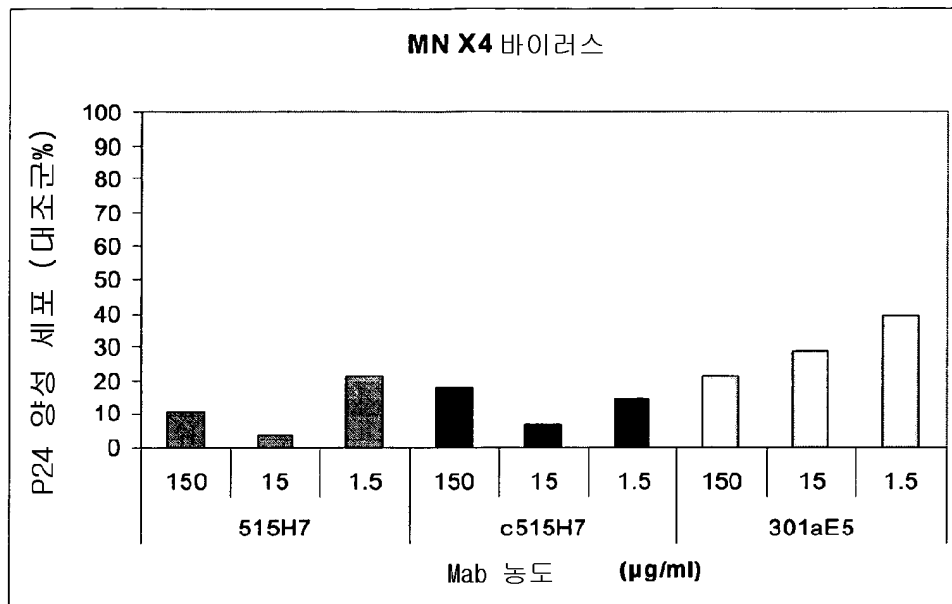
도면6b



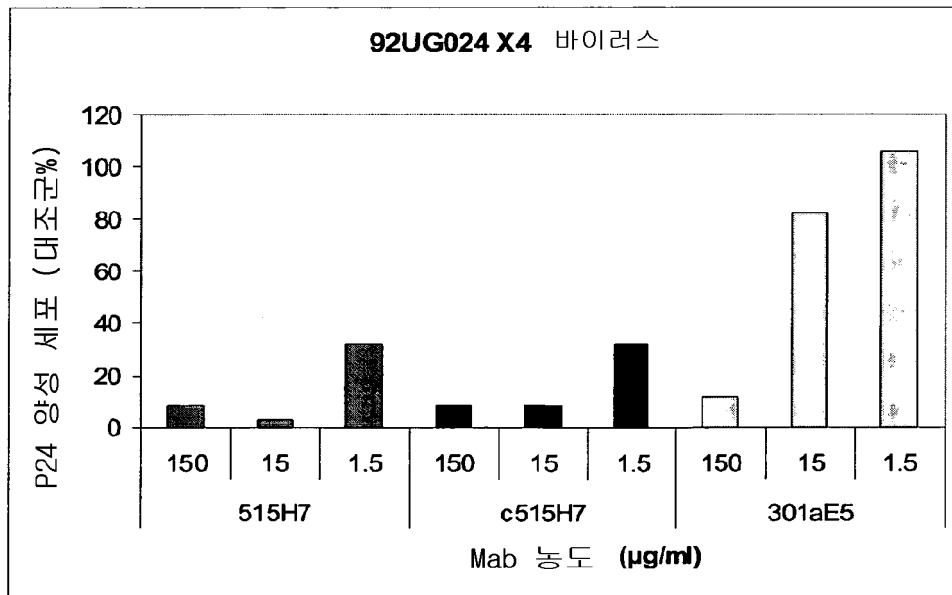
도면6c



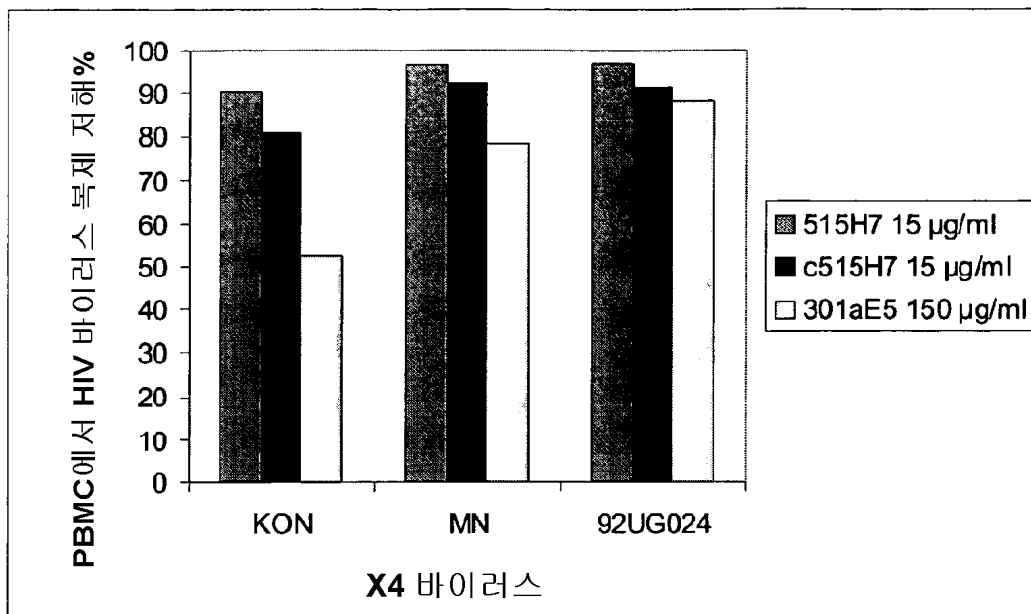
도면7



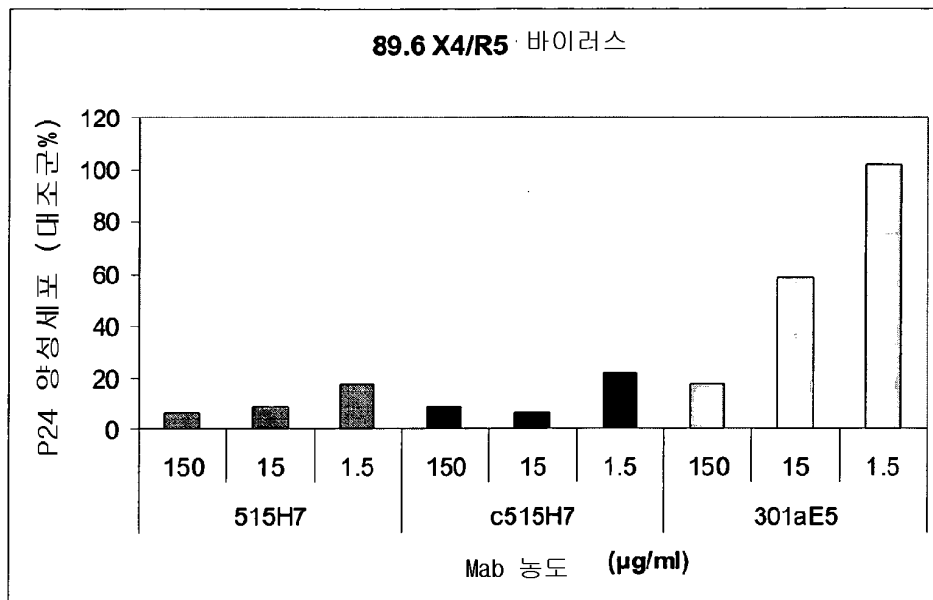
도면8



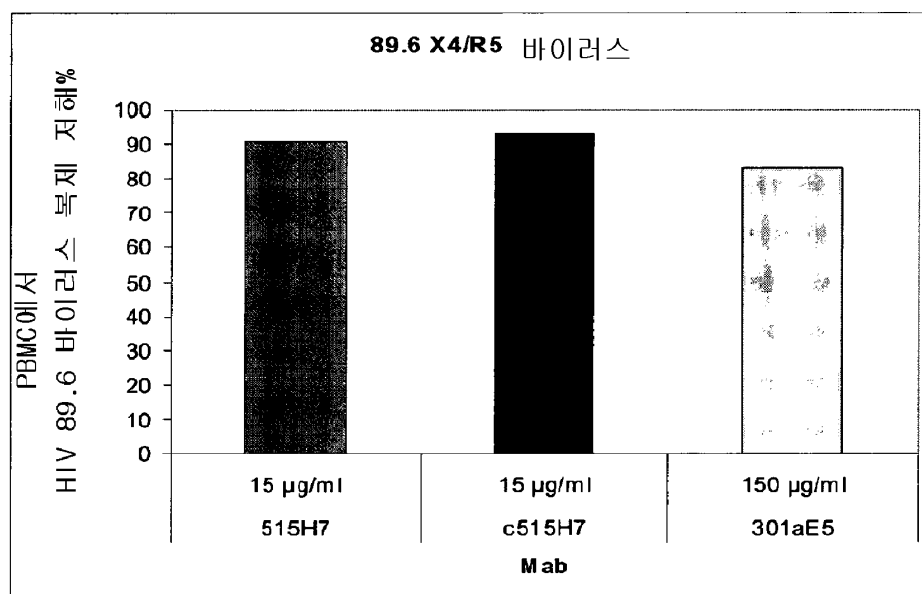
도면9



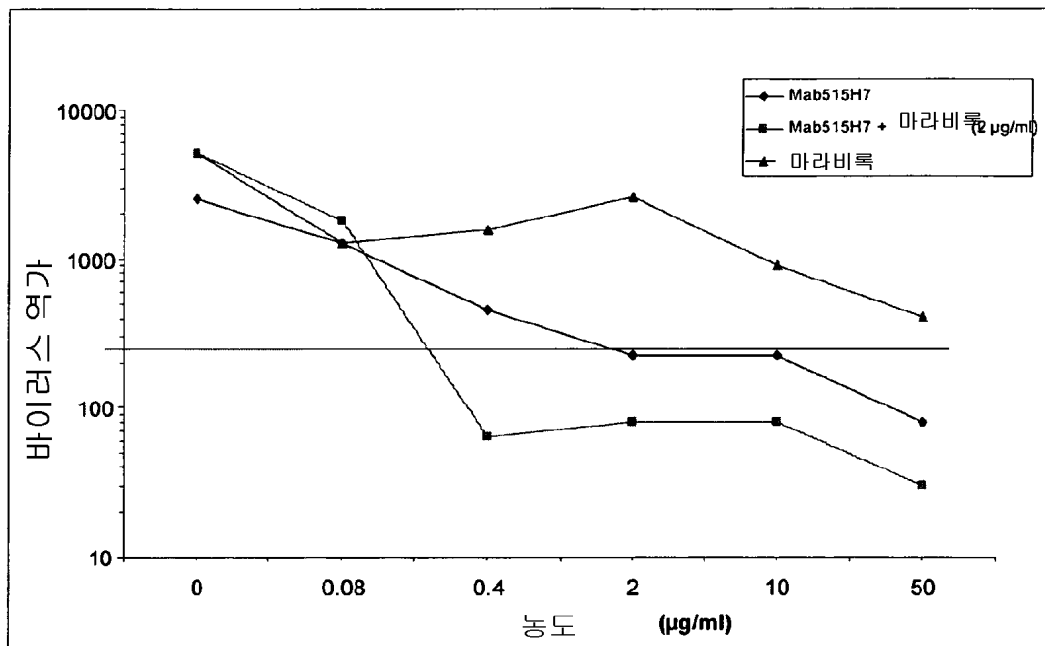
도면10



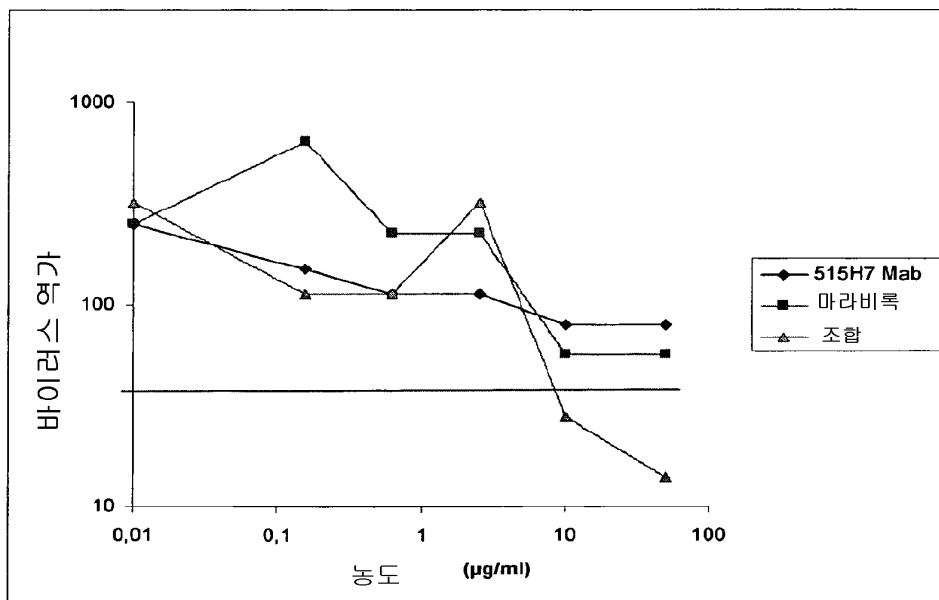
도면11



도면12

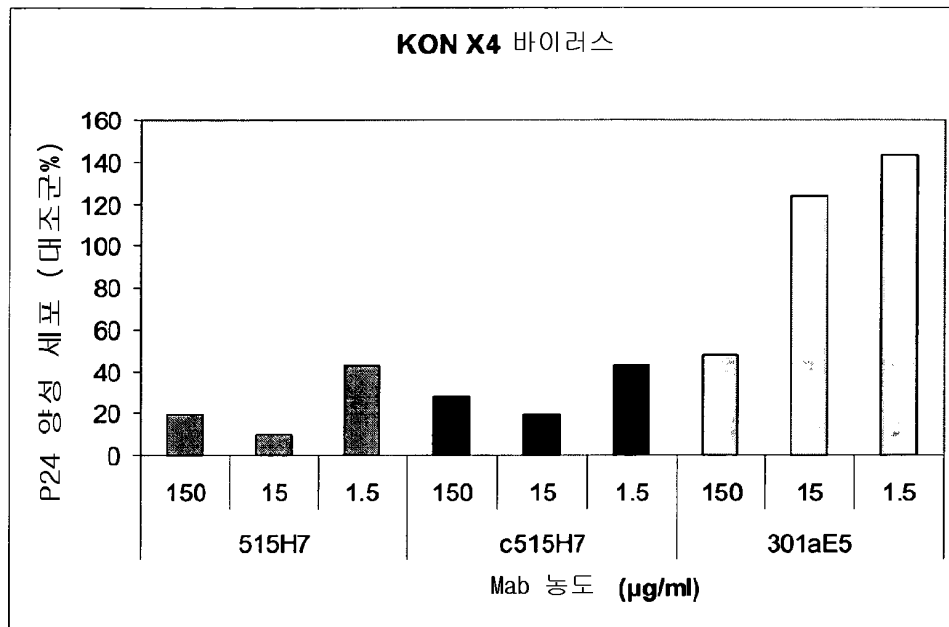


도면13

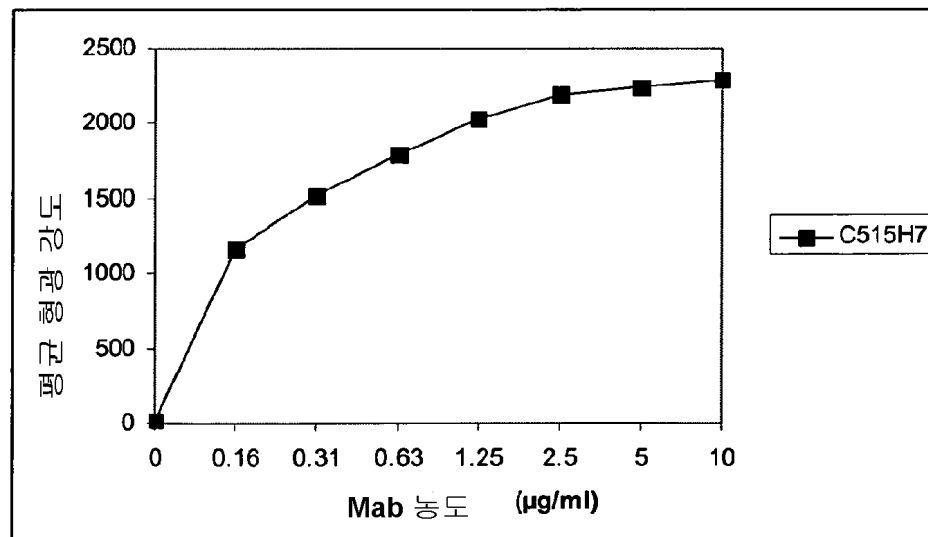




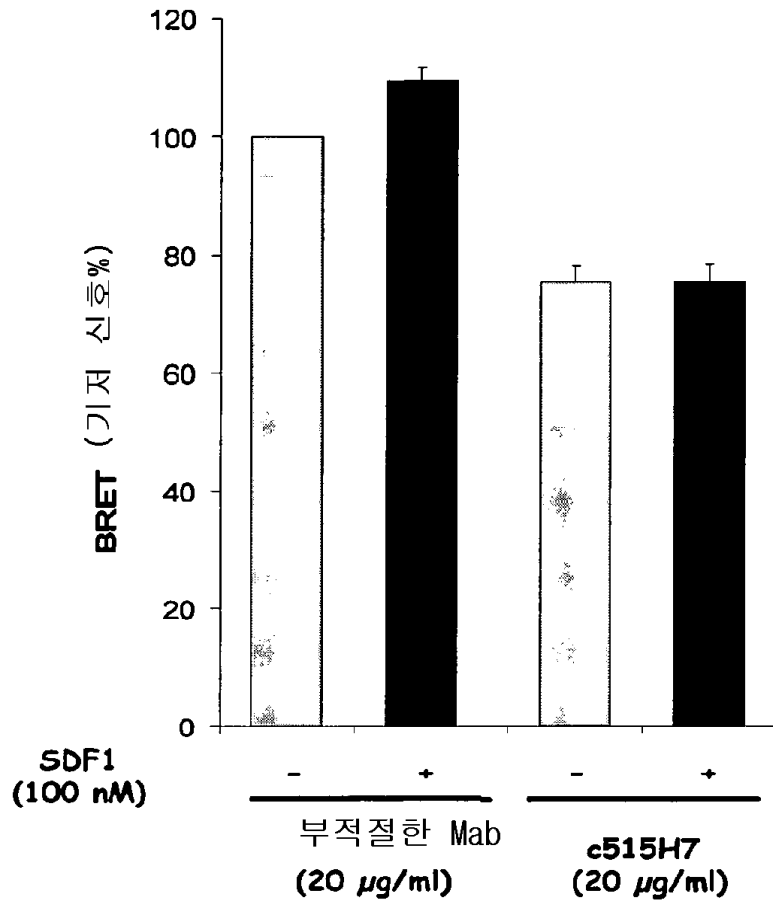
도면14



도면15



도면16



도면17

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60		
515H7 VH	..... ..... .....	EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCATS	GFTF...TDNY	MSWVRQPPGKALEWLGF	IRNKANGYTT				
IGHV3-49*04	..... ..... .....	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...GDYA	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRSKAYGGTT				
VH1	..... ..... .....	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...TDNY	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRNKANGYTT				
VH1 D76N	..... ..... .....	EVQLVESGG.GLVQPGRSLRLSCTAS	GFTF...TDNY	MSWVRQAPGKGLEWVGF	IRNKANGYTT				
	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-125)		
	70	80	90	100					
515H7 VH	..... ..... ..... .....	DYSASVR.GRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS					
IGHV3-49*04	..... ..... ..... .....	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC	TR						
IGHJ4*01	..... ..... ..... .....		YFDYW	GQGTTLTVSS					
VH1	..... ..... ..... .....	EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS					
VH1 D76N	..... ..... ..... .....	EYAASVK.GRFTISRDNQSILYLQMNSLKTEDTAVYYC	ARDVGSNYFDYW	GQGTTLTVSS					

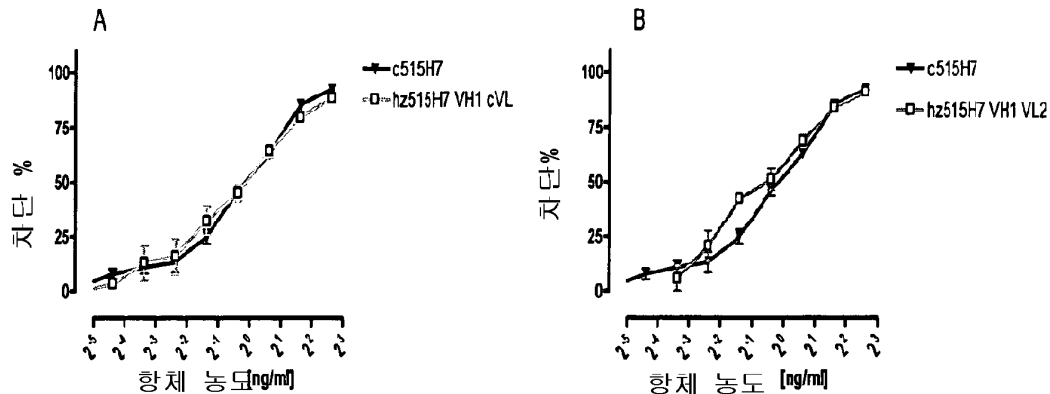
도면18

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....	..... ..... .....
IGKV4-1*01	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQSPKLLIY	WA.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S
VL Var2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	QSVLYSSNNKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S
VL Var2.1	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQSPKLLIY	WA.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S
VL Var2.2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S
VL Var2.3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	WA.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S	.....S

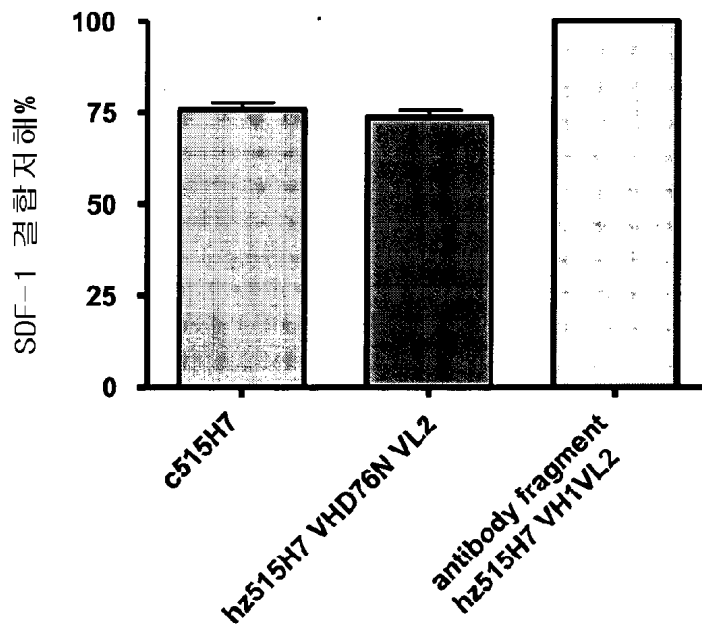
  

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (106-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100				
515H7 VL	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....	..... ..... ..... ..... .....
IGKV4-1*01	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK					
IGKJ1*01	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC							
WT								
VL Var2	ARDSGVP.ARFTGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK					
VL Var2.1	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK					
VL Var2.2	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK					
VL Var2.3	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLRT	FGQGTKVEIK					

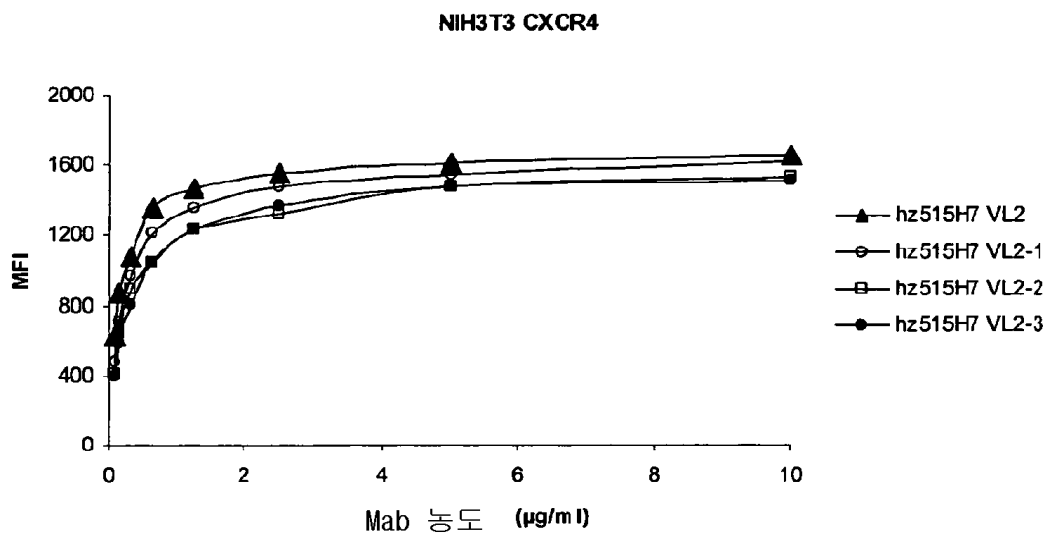
도면19



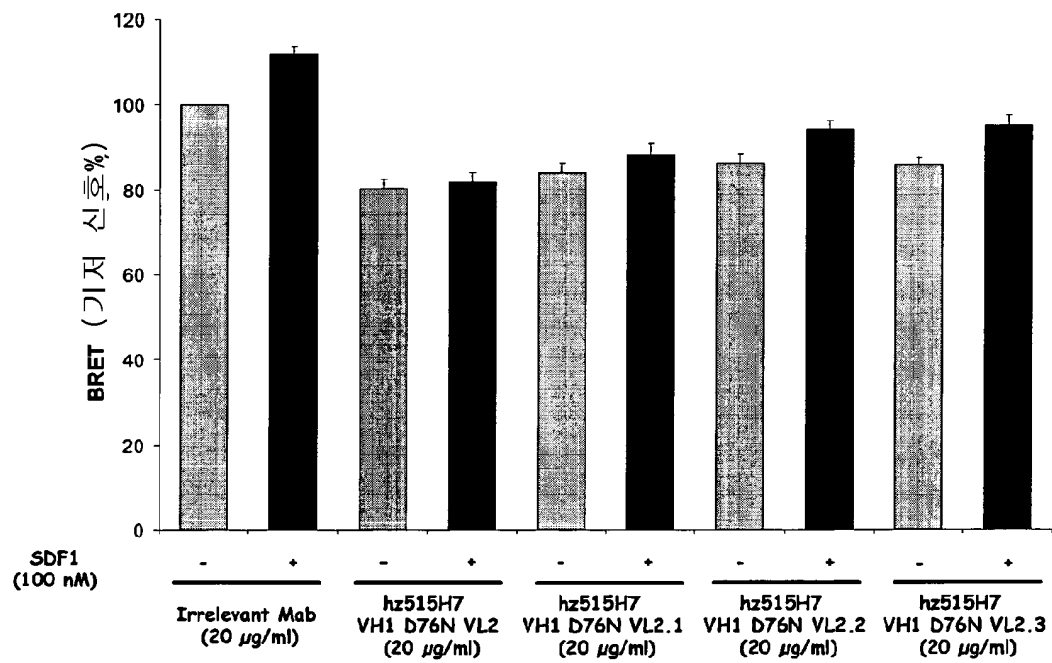
도면20



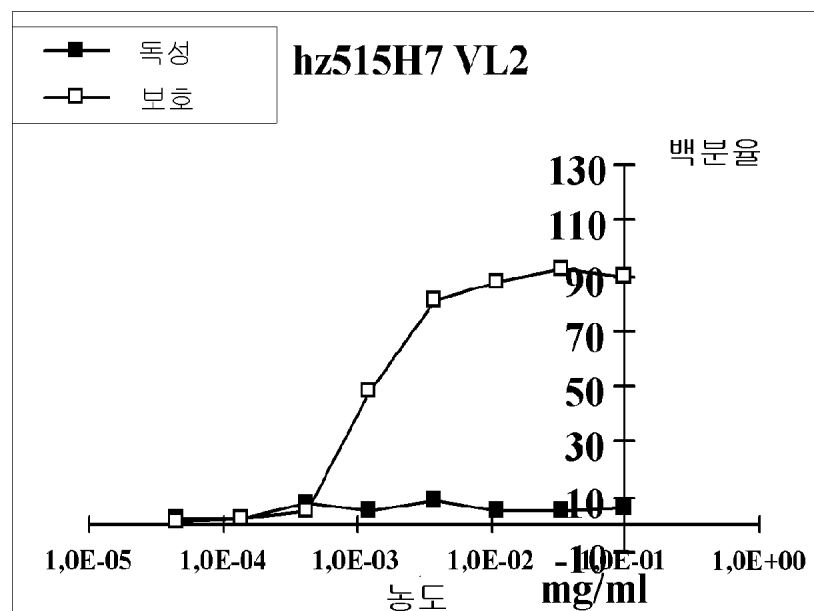
도면21



도면22

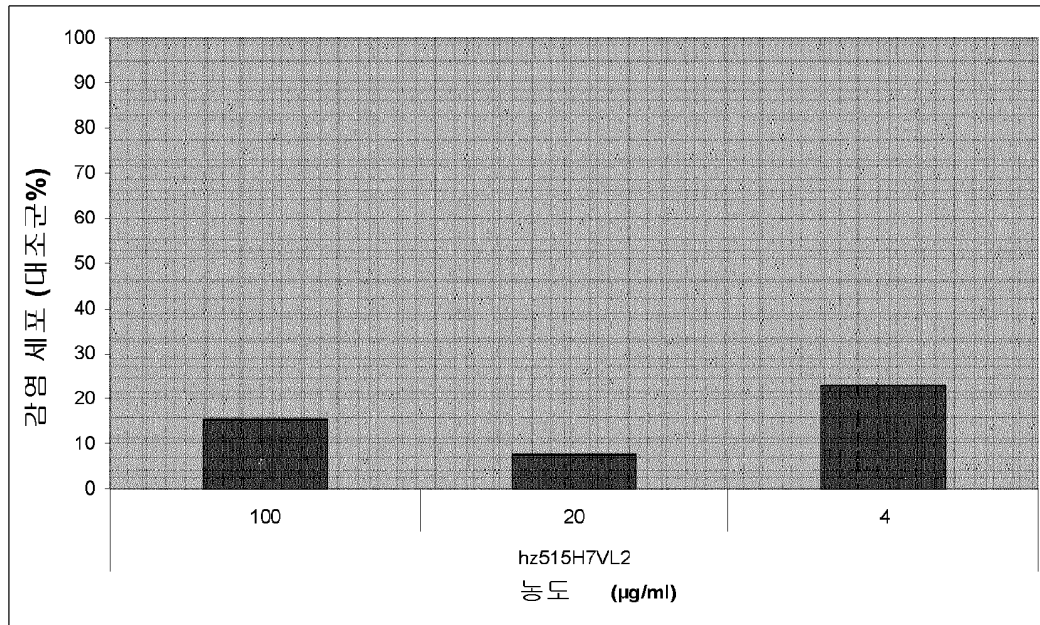


도면23

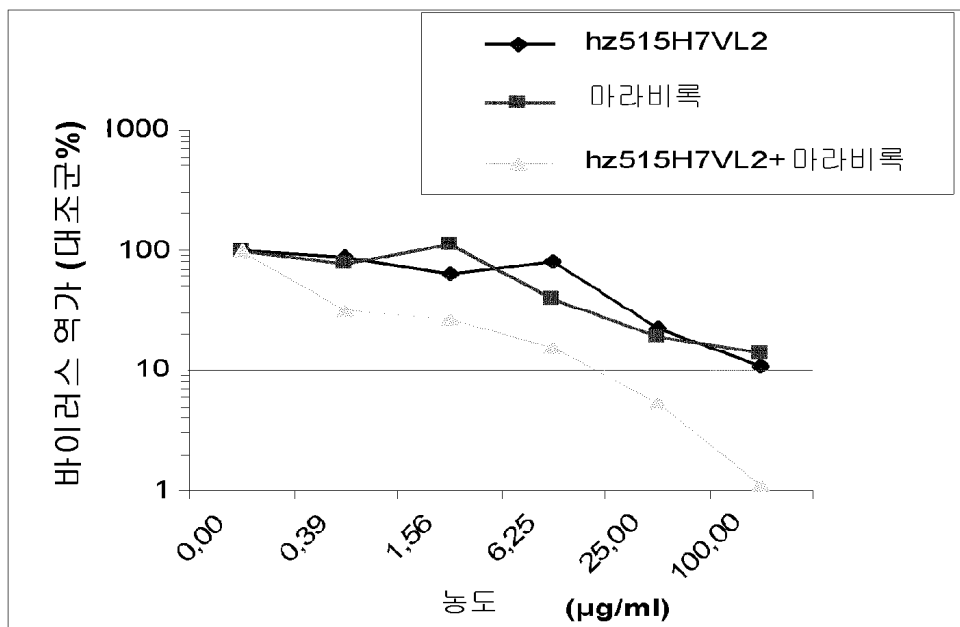




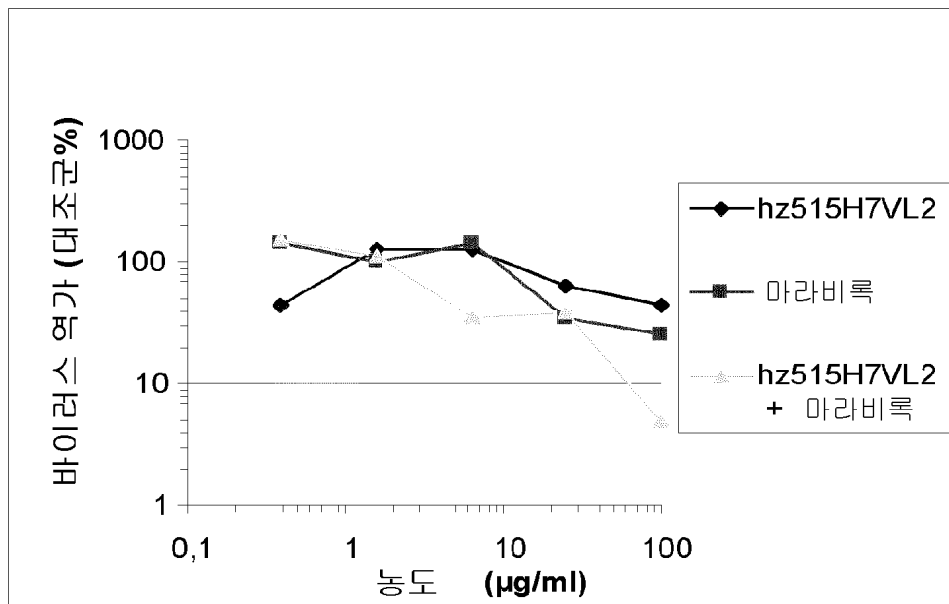
도면24



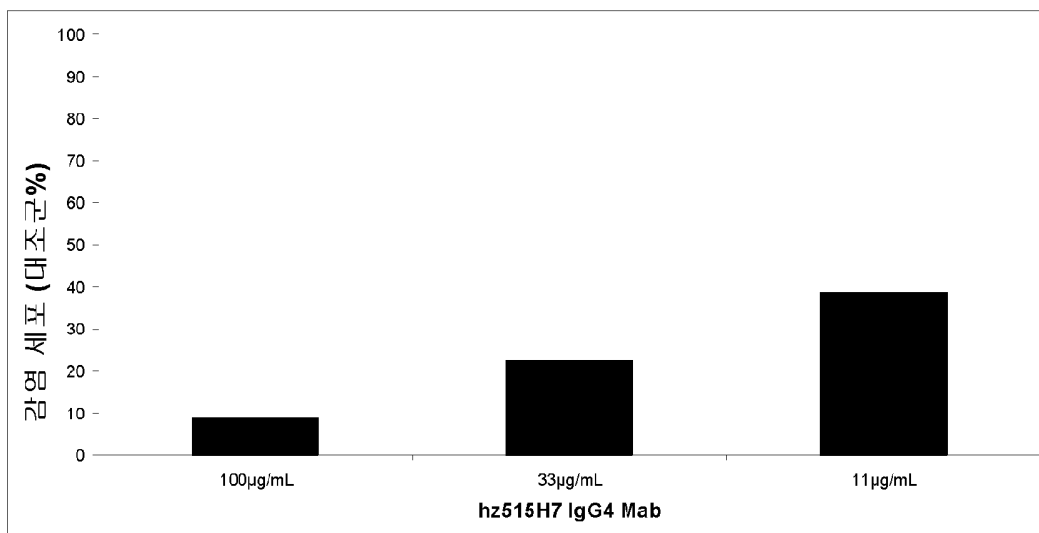
도면25



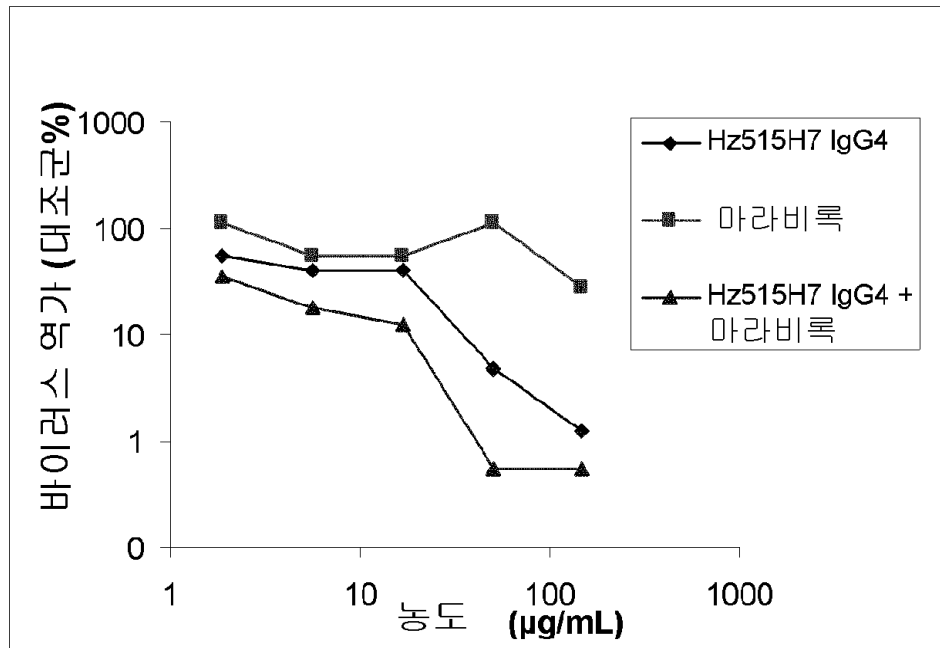
도면26



도면27



도면28



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF HIV

<130> 362690D27470

<140> PCT EP2011/068905

<141> 2011-10-27

<150> US 12/913,300

<151> 2010-10-27

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400>

> 2

Trp Ala Ser

1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr

1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser  
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Asp Asn Tyr Met Ser  
1 5

<210> 12

<211> 19

<212> PRT



<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

<210> 15

<211> 9

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

tgggcatcc 9

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

atgcaatctt ttaatcttcg gacg 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

gggttcacct tcactgataa ctac 24

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 30

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

gcaagagatg tcggttccaa ctactttgac tac 33

<210> 20

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtc gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggt 120

tggtagcagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 180

gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatatct cactctcacc 240

atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc ttttaatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

gaggtgaacc tggtaggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60

tcctgtgcaa ctcttgggtt caccttcaact gataactaca tgagttgggt cgcgcagcct 120  
ccaggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180  
gactacagtg catctgtgag gggtcgggtt accatctcaa gagataattc ccaaagcatc 240

ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300  
gatgtcgggtt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 22  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 22

aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 23

tgggcatccg ctagggattc t 21

<210> 24  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400>

> 24

gataactaca tgagt 15

<210> 25  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 25

tttattagaa acaaagctaa tgggttacaca acagactaca gtgcatctgt gaggggt 57

<210> 26  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 26

gatgtcgggtt ccaactactt tgactac

27

<210> 27

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met

1 5 10 15  
Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu

20 25 30  
Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile

35 40 45  
Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly

50 55 60  
Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu

65 70 75 80  
Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val

85 90 95  
Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val

100 105 110  
His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala

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

130 135 140  
Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val

145 150 155 160  
Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn

165 170 175  
Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn

180 185 190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu

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

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

325 330 335  
 His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser  
 340 345 350

<210> 28

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys  
 20 25 30

Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile  
 50 55 60  
 Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro  
 85 90 95  
  
 Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu  
 100 105 110  
 Cys Lys Ala Val His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val  
 115 120 125  
 Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His  
 130 135 140  
 Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val  
 145 150 155 160  
  
 Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe  
 165 170 175  
 Ile Phe Ala Asn Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg  
 180 185 190  
 Phe Tyr Pro Asn Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile  
 195 200 205  
 Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys  
 210 215 220  
  
 Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp  
 245 250 255  
 Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu  
 260 265 270  
 Ile Ile Lys Gln Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile  
 275 280 285  
  
 Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile



290                      295                      300  
 Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly  
                          325                      330                      335  
 Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser  
                          340                      345                      350  
  
 Phe His Ser Ser  
                          355  
 <210> 29  
 <211> 360  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29  
  
 Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys  
 1                      5                      10                      15  
 Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe  
                          20                      25                      30  
 Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys  
                          35                      40                      45  
 Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu  
  
                          50                      55                      60  
 Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu  
                          85                      90                      95  
 Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp  
                          100                      105                      110  
 Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val  
  
                          115                      120                      125  
 Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg  
                          130                      135                      140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu  
                          165                      170                      175  
 Ala Leu Pro Val Leu Leu Phe Arg Arg Thr Val Tyr Ser Ser Asn Val  
  
                          180                      185                      190  
 Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg  
                          195                      200                      205  
 Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu  
                          210                      215                      220  
 Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val  
  
                          245                      250                      255  
 Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu  
                          260                      265                      270  
 Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg  
                          275                      280                      285  
 Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile  
                          290                      295                      300  
 Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys  
  
 305                      310                      315                      320  
 Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser  
                          325                      330                      335  
 Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser  
                          340                      345                      350  
 Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu  
                          355                      360  
 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 30

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Ala Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln  
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

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

Lys Met Asn Thr Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Asp Tyr Gly Val Tyr

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210>	41	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	41	
cagagtctgt tcaacagtag aaccgaaag aactac		36
<210>	42	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	42	
aagcaatctt ataatcttcg gacg		24
<210>	43	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	43	
gggttctcat taaccgacta tgg		24
<210>	44	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	44	
atatggggtg atggaaccac a		21
<210>	45	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	45	
gccaggggta gacagttcgg gtttgactac		30
<210>	46	
<211>	336	
<212>	DNA	



<213> Mus musculus

<400> 46

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagggtgca aatccagtc gagtctgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 120

tggtagcaac agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tcttctgggc atccattagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 47

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 47

caggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctgggtggcg cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc gactatgggt tatactgggt tcgccagcct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg atggaaccac agactataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatcagt aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240

aaaatgaaca ctctgcaaac tgatgacaca gccaggtatt actgtgccag gggtagacag 300

ttcgggtttg actactgggg ccaaggcacc acgtcacag tctcctca 348

<210> 48

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 48

aaatccagtc agagtctgtt caacagtaga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 49

tgggcatcca ttagggaatc t 21

<210> 50

<211> 24

<212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400>  
 > 50  
 aagcaatctt ataatcttcg gacg 24  
 <210> 51  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 51  
 gactatggtg tatac 15  
 <210> 52  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 52  
 atgatatggg gtgatggaac cacagactat aattcagctc tcaaatcc 48  
 <210> 53  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 53  
 ggtagacagt tcgggtttga ctac 24  
  
 <210> 54  
 <211> 359  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 54  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn  
 20 25 30  
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gln Leu Lys Ser Ser Gly Ser Gly

115 120 125

Ser Glu Ser Lys Ser Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

130 135 140

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser

145 150 155 160

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly

225 230 235 240

Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

245 250 255

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

260 265 270

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

275 280 285

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

290	295	300	
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr			
305	310	315	320
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val			
	325	330	335
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly			
	340	345	350
Glu His His His His His His			
	355		
<210>	55		
<211>	1077		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	55		
gaggtgcagc	tggtggagtc	tggcggagga	ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg	ccagcggctt	caccttcacc	gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg	gcctggaatg	ggtgggcttc	atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg	ccagcgtgaa	gggcccgttc	accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240
gcctacctgc	agatgaacag	cctgaaaacc	gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca	gcaactactt	cgactactgg	ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc 360
caattgaaaa	gcagcggcag	cggtagcgaa	agcaagtcga ccgacatcgt gatgaccag 420
agccccagca	gcctggccgt	gtctctgggc	gagcgggcca ccatgagctg caagagcagc 480
cagagcctgt	tcaacagccg	gacccggaag	aactacctgg cctggtatca gcagaagccc 540
ggccagtccc	caaagctgct	gatctactgg	gccagcgcca gagatagcgg cgtgcccgt 600
cgctttaccg	gcagcggcag	cgagacctac	ttcacctga ccatcagccg ggtgcaggcc 660
gaggacctcg	ccgtgtacta	ctgcatgcag	agcttcaacc tgcggacctt cggccagggc 720
accaagtggt	agatcaagac	gcgtacggtg	gccgtccca gcgtgttcat cttccccca 780
agcgacgagc	agctgaagag	cggcaccgcc	agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 840
cccaggagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 900
gagagcgtca	ccgagcagga	cagcaaggac	tcacctaca gcctgagcag caccctgacc 960
ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 1020

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagc accatcatca ccacat 1077

<210> 56

<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57



<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210                      215                      220  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225                      230                      235                      240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                     245                      250                      255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
                     260                      265                      270  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
  
                     275                      280                      285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
                     290                      295                      300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305                      310                      315                      320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
                     325                      330                      335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
  
                     340                      345                      350  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
                     355                      360                      365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
                     370                      375                      380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
  
                     405                      410                      415  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
                     420                      425                      430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
                     435                      440                      445  
 <210> 58  
 <211> 445  
 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe

225                      230                      235                      240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
                                  245                      250                      255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
                                  260                      265                      270  
  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
                                  275                      280                      285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
                                  290                      295                      300  
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
                                  325                      330                      335  
  
 Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
                                  340                      345                      350  
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
                                  355                      360                      365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
                                  370                      375                      380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
 385                      390                      395                      400  
  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
                                  405                      410                      415  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
                                  420                      425                      430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                                  435                      440                      445  
  
 <210> 59  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 59

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 60

<211> 1341

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 60

gaagtgaacc tgggtggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg	60
agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc	120
cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc	180
gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc	240
ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggggc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg	300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc	360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag	420
agcacagccg ccttgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc	480
tggaaacagc gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc	600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc	660
aagtacggcc caccctgccc cagctgccc gccccgagt tcttgggcgg acccagcgtg	720
ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc	780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggacc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcacctac	900
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag	960
tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag	1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaagagga gatgaccaag	1080
aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc	1200
gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc	1260
aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc	1320
ctgagcctgt ccttgggctg a	1341

<210> 61

<211> 1341

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 61

gaagtgaacc tgggtggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg	60
--	----

agctgcgcca cctccggtt caccctcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120

cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180

gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240

ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggccc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360

gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420

agcacagccg ccttgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600

tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660

aagtacggcc caccctgccc cccctgccc gccccgagt tcttgggcgg acccagcgtg 720

tctctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780

tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960

tgtaaggtct ccaacaagg cctgccaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag 1020

ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaagagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260

aacgtcttta gctgctcgt gatgcagag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320

ctgagcctgt cctgggctg a 1341

<210> 62

<211> 1338

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 62

gaagtgaacc tgggtgagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60

agctgcgcca cctccggtt caccctcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120

cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180

gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240

ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggggc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg 300  
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccactactgac cgtgtccagc 360

gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420  
agcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480  
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgctg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540  
ggcctgtaca gctgagcag cgtggtgacc gtgccaaagca gcaacttcgg caccagacc 600  
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660  
aagtgtctgt tggagtgcc cccctgccca gccccccag tggccggacc cagcgtgttc 720  
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactgta cgtggacggc 840  
gtggagggtg acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag caccttccgg 900  
gtggtgtccg tgctgaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960  
aaggtctcca acaagggcct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa gaccaaggga 1020  
cagccaagag agccacaggt ctacacctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080  
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140  
gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccaccc cccaatgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tctgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260  
gtgttcagct gctccgtgat gcacagggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320  
agcctgtccc caggctga 1338

<210> 63  
<211> 660  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 63

gacatcgtga tgagccagag cccagcagc ctggccgtgt ctgccggcga gaaagtgacc 60  
atgagctgca agagcagcca gacctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120  
tggtatcagc agaagccgg ccagtcctcc aagctgtgta tctactgggc cagcgcagca 180

gacagcggcg tgcccgcag attcaccggc agcggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
atcagccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300  
cggacctttg gcggcggaac aaagctggaa atcaagcgta cggcggccgc tcccagcgtg 360  
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420



ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480  
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540  
 agcagcaccc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600

gtgaccacc aggccctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 66

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 67

<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210                      215                      220  
 Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225                      230                      235                      240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                          245                      250                      255  
  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
                          260                      265                      270  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
                          275                      280                      285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
                          290                      295                      300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305                      310                      315                      320  
  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
                          325                      330                      335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
                          340                      345                      350  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
                          355                      360                      365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
                          370                      375                      380  
  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
                          405                      410                      415  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
                          420                      425                      430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
                          435                      440                      445

<210> 68

<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro

210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val

225                      230                      235                      240  
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

                    245                      250                      255  
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

                    260                      265                      270  
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

                    275                      280                      285  
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

                    290                      295                      300  
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305                      310                      315                      320  
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

                    325                      330                      335  
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

                    340                      345                      350  
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

                    355                      360                      365  
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

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

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

                    405                      410                      415  
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

                    420                      425                      430  
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly

                    435                      440                      445

<210> 69

<211> 445

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys

195 200 205

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

210 215 220

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

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

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

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

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

<210> 70

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

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



1                    5                    10                    15  
 Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
                   20                    25                    30  
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
                   35                    40                    45  
  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
                   50                    55                    60  
 Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
                   85                    90                    95  
 Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110  
  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
                   115                    120                    125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                   130                    135                    140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145                    150                    155                    160  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                   165                    170                    175  
  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
                   180                    185                    190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                   195                    200                    205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                    215  
 <210> 71  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 72

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 72

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60  
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120  
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180  
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240  
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 73

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 73

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60  
atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120  
tggtatcagc agaagcccgg ccagtcctcc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180  
gatagcggcg tgcccgtcgt ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240  
atcagccggg tgcaggccga ggacctcgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 74

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 74

gacatcgtga tgaccagtc cccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60  
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180  
gactctggcg tgcccagacg attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
atctcccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 75

<211> 1341

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 75

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	60
agctgcaccg ccagcggctt caccctcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc	120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca	180
gagtagcccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt	240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg	300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc	360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag	420
agcacagccg ccttgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc	480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc	600
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc	660
aagtacggcc caccctgccc cagctgccc a gccccgagt tcctgggcgg acccagcgtg	720
ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc	780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac ccgaggttcc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcacctac	900
cgggtggtgt ccgtgtgac cgtgtgtcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag	960
tgtaaagtct ccaacaaggg cctgccaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag	1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaagagga gatgaccaag	1080
aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccagc gctggacagc	1200
gacggcagct tcttctgtga cagcaggtg accgtggaca agtcagatg gcaggagggc	1260
aacgtcttta gctgtccgt gatgcacgag gcctgcaca accactacac ccagaagagc	1320
ctgagcctgt ccttgggctg a	1341

<210> 76

<211> 1341

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 76

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg	60
--	----

agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180

gagtagccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240

gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc 360

gccagacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420

agcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtaca gcctgagcag cgtgggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600

tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660

aagtagccg caccctgccc cccctgccc gccccgagt tctggggcg acccagcgtg 720

tctctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780

tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960

tgtaaggctt ccaacaagg cctgccaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag 1020

ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaagagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260

aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320

ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 77

<211> 1338

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 77

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180

gagtagccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240

gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300  
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420  
agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc 480  
tggaacacgc gagccctgac cagcggcgctg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540  
ggcctgtaca gctgagcag cgtggtgacc gtgccaagca gcaacttcgg caccagacc 600  
tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660  
aagtgtctgt tggagtgcc cccctgccca gccccccag tggccggacc cagcgtgttc 720  
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaaccccgga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactgta cgtggacggc 840  
gtggagggtg acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag caccttccgg 900  
gtggtgtccg tgctgaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960  
aaggtctcca acaagggcct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa gaccaaggga 1020  
cagccaagag agccacaggt ctacacctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080  
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140  
gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccaccc cccaatgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tctgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260  
gtgttcagct gtcctgtat gcacaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320  
agcctgtccc caggctga 1338

<210> 78  
<211> 660  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
<400> 78

gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggca gcgggccacc 60  
atgagctgca agagcagca gacctgttc aacagccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
tggtatcagc agaagccgg ccagtcctcc aagctgtga tctactgggc cagcgcaga 180

gatagcggcg tgcccgtcg ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240  
atcagccggg tgcaggcca ggacctgcc gtgtactact gcatgcagag cttcaacctg 300  
cggaccttcg gccagggcac caagtgagg atcaagcgta cggtgccgc tcccagcgtg 360  
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480  
agcggcaaca gccaggagag cgctaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540  
agcagcacc tgacctgag caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600

gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 79

<211> 660

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 79

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gggggccacc 60  
atgtcctgca agtcctccca gtcctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
tggtatcagc agaagcccg ccagccccc aagctgtga tctactgggc ctctgctaga 180  
gactctggcg tgcccgacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
atctcccggtg tgaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cgggtggcgc tcccagcgtg 360

ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480

agcggcaaca gccaggagag cgctaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540

agcagcacc tgacctgag caagccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600

gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 80

<211> 450

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

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

50                                      55                                      60  
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr  
 85                                      90                                      95  
 Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100                                      105                                      110  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115                                      120                                      125  
  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130                                      135                                      140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165                                      170                                      175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180                                      185                                      190  
  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195                                      200                                      205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210                                      215                                      220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245                                      250                                      255  
  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260                                      265                                      270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275                                      280                                      285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290                                      295                                      300



Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys

450

<210> 81

<211> 1353

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 81

gaagtgaacc tgggtggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg	60
agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc	120
cctggcaagg ccttgaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc	180
gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc	240
ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccgg	300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccactgac cgtgtccagc	360

gccagcacca agggccctc cgtgttccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420  
 ggcacagccg cctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccg gaccgtgtcc 480  
 tggacacgag gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540  
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600  
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660  
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc cctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720  
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacccc tgatgatcag cagaaccccc 780

gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900  
 agcacctaca ggggtggtgtc cgtgtgtgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960  
 gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020  
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacaccc tgccaccag cagggaggag 1080  
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140  
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200

ctggacagcg acggcagctt cttctgtac agcaagctga ccgtggaaa gagcagatgg 1260  
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320  
 cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag tga 1353

<210> 82

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 82

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

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

100 105 110

<210> 84

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln  
85 90 95

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 85

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

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

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

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 86

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 86

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggcgtgt ctctgggcga gcgggccacc

60

atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180  
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
 atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 87

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 87

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60  
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180  
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
 atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 88

<211> 657

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 88

gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60  
 atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120  
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180  
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240  
 atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg 300

cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccagcgtg 360  
 ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420  
 ctgaacaact tctacccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgccctgcag 480  
 agcggcaaca gccaggagag cgtaaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540  
 agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600  
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 89

<211> 657

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 89

```

gacatcgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc      60
atgtcctgca agtcctccca gtcctgttgc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc      120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga      180
gactctggcg tgcccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc      240
atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttcaacctg      300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cgggtggccgc tcccagcgtg      360
ttcatcttcc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg      420

```

```

ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgcag      480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg      540
agcagcacc tgacctgag caagcccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag      600
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc      657

```

<210> 90

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 90

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 91

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 91

gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180

gagtagcccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240

gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 92

<211> 450

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80



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

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

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

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

325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	
Gly Lys			
450			
<210> 93			
<211> 1350			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 93			
gaggtgcagc tggtagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg			60
agctgcaccg ccagcggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc			120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca			180
gagtagcccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacgacag caagagcatt			240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg			300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactgggtgac cgtgtctagc			360
gccagcacia agggcccaag cgtgttcccg ctacccccca gcagcaagag caccagcggc			420
ggcacagccg cctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc			480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc			540

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600  
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660  
 aagagctgtg acaagaccca cacctgcccc cctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720  
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag cagaaccccc 780  
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840  
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900

agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960  
 gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020  
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacaccc tgccaccag cagggaggag 1080  
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140  
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccagt 1200  
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcagatgg 1260  
 cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320

cagaagagcc tgagcctgtc cccaggcaag 1350

<210> 94

<211> 1395

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 94

atgaagatgt ggctgaactg ggtgttcttg gtcacactgc tgaacggcat ccagtgcgag 60  
 gtgcagctgg tggaatccgg cggaggcctg gtgcagcctg gcagatccct gagactgtcc 120  
 tgcaccgct cgggtttcac ctacaccgac aactacatgt cctgggtgcg ccaggccct 180  
 ggaaagggcc tggaatgggt gggcttcac cggacaagg ccaacggcta caccacagag 240  
 tacgccgcca gcgtgaaggg ccggttcacc atcagccggg acaacagcaa gagcattgcc 300

tacctgcaga tgaacagcct gaaaaccgag gacaccgccg tgtactactg cgccaggagc 360  
 gtgggcagca actacttcca ctactggggc cagggcacac tggtagcgt gtctagcgcc 420  
 agcacaagg gcccaagcgt gttccccctg gccccctgct ccagaagcac cagcgagagc 480  
 acagccgcc tgggctgct ggtgaaggac tacttccccg agcccgtagc cgtgtcctgg 540  
 aacagcggag cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 600  
 ctgtacagc tgagcagcgt ggtgacctg cccagcagca gcctgggcac caagacctac 660  
 acctgtaacg tggaccacaa gccagcaac accaaggtgg acaagagggt ggagagcaag 720

tacggccac cctgcccc ctgccagcc ccgaggccg cgggcggacc cagcgtgttc 780  
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgacagca gaacccccga ggtgacctgt 840  
gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 900  
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtttaacag cacctaccgg 960  
gtggtgtccg tgctgacct gctgcaccag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgt 1020  
aaggtctcca acaagggcct gccaaagcag atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1080  
cagcctagag agccccaggt ctacacctg ccaccagcc aagaggagat gaccaagaac 1140

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1200  
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1260  
ggcagcttct tctgtacag caggctgacc gtggacaagt ccagatggca ggagggaac 1320  
gtctttagct gctccgtgat gcacaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1380  
agcctgtccc tgggc 1395

<210> 95

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Lys Met Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

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

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

115                      120                      125  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
  
 130                      135                      140  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 165                      170                      175  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 180                      185                      190  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
  
 195                      200                      205  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val  
 210                      215                      220  
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
 225                      230                      235                      240  
 Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly  
 245                      250                      255  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
  
 260                      265                      270  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
 275                      280                      285  
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 290                      295                      300  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
 305                      310                      315                      320  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
  
 325                      330                      335  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
 340                      345                      350  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 355                      360                      365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

405

410

415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp

420

425

430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435

440

445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu

450

455

460

Gly

465