



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0014064
(43) 공개일자 2014년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7008288
(22) 출원일자(국제) 2011년09월02일
 심사청구일자 空
(85) 번역문제출일자 2013년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/050439
(87) 국제공개번호 WO 2012/031273
 국제공개일자 2012년03월08일
(30) 우선권주장
 61/380,181 2010년09월03일 미국(US)

(71) 출원인
 스템 센트알엑스 인코포레이티드
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코
 이스트 자미 코트 450
(72) 발명자
 딜라 스콧 제이.
 미국 94043 캘리포니아주 마운틴 뷰 웨이크 포레
 스트 드라이브 743
 푸드 오리트
 미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 카이맨 레
 인 712
 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
 김진희, 김성기

전체 청구항 수 : 총 108 항

(54) 발명의 명칭 신규한 조절 인자 및 사용 방법

(57) 요 약

항체를 비롯한 신규한 조절 인자 및 이의 유도체, 및 상기 조절 인자를 사용하여 과증식성 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

스틀 로버트 에이.

미국 94501 캘리포니아주 알라메다 5번가 1519

안데르손 웨이드 씨.

미국 94534 캘리포니아주 페어필드 폰드 사이드 웨
이 5177

오시마 사이유

미국 95014 캘리포니아주 쿠페르티노 토리 애비뉴
10100 아파트먼트 214

특허청구의 범위

청구항 1

단리된 CD46 조절 인자.

청구항 2

제1항에 있어서, CD46 조절 인자가 CD46 길항체를 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 3

제1항에 있어서, CD46 조절 인자가 항체 또는 이의 면역반응성 단편을 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 4

제3항에 있어서, 항체 또는 이의 면역반응성 단편이 단일클론 항체를 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 5

제4항에 있어서, 단일클론 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 3개의 상보성 결정 영역을 가진 경쇄 가변 영역 및 3개의 상보성 결정 영역을 가진 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역은 도 11b에 제시된 상보성 결정 영역을 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 인간화된 항체인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 17, 서열 번호: 21, 서열 번호: 25, 서열 번호: 29, 서열 번호: 33, 서열 번호: 37, 서열 번호: 41, 서열 번호: 45, 서열 번호: 49, 서열 번호: 53, 서열 번호: 57, 서열 번호: 61, 서열 번호: 65, 서열 번호: 69, 서열 번호: 73, 서열 번호: 77, 서열 번호: 81 및 서열 번호: 85에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 60% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 15, 서열 번호: 19, 서열 번호: 23, 서열 번호: 27, 서열 번호: 31, 서열 번호: 35, 서열 번호: 39, 서열 번호: 43, 서열 번호: 47, 서열 번호: 51, 서열 번호: 55, 서열 번호: 59, 서열 번호: 63, 서열 번호: 67, 서열 번호: 71, 서열 번호: 75, 서열 번호: 79 및 서열 번호: 83에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 60% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 9

제8항의 아미노산 중쇄 가변 영역 또는 아미노산 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산.

청구항 10

제9항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 11

제8항의 단일클론 항체로부터 유도된 인간화된 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, CD46 변이체 A로부터의 아미노산 서열 또는 이의 단편을 포함하는 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 13

제12항에 있어서, CD46 조절 인자가 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 14

제1항에 있어서, 조절 인자가 피험체에 투여시 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 15

제14항에 있어서, 빈도 감소가 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석, 또는 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 면역조직화학적 검출을 사용하여 측정되는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 16

제14항에 있어서, 빈도 감소가 시험관내 또는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 17

제16항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 면역약화된 마우스 내로의 이식을 포함하는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 18

제17항에 있어서, 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포(Poisson distribution) 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 19

제16항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 시험관내 콜로니 지지 조건으로의 제한 희석 침착을 포함하는 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 20

제19항에 있어서, 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 종양 개시 세포가 종양 영구 세포를 포함하는 것인 단리된 CD46 조절 인자.

청구항 22

CD46 관련 장애 치료를 필요로 하는 피험체에게 치료적 유효량의 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, CD46 관련 장애를 치료하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 CD46 길항제를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 항체 또는 이의 면역반응성 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 항체 또는 이의 면역반응성 단편이 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 단일클론 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 및 인간 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 3개의 상보성 결정 영역을 가진 경쇄 가변 영역 및 3개의 상보성 결정 영역을 가진 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역은 도 11b에 제시된 상보성 결정 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서, 상기 경쇄 가변 영역은 서열 번호: 17, 서열 번호: 21, 서열 번호: 25, 서열 번호: 29, 서열 번호: 33, 서열 번호: 37, 서열 번호: 41, 서열 번호: 45, 서열 번호: 49, 서열 번호: 53, 서열 번호: 57, 서열 번호: 61, 서열 번호: 65, 서열 번호: 69, 서열 번호: 73, 서열 번호: 77, 서열 번호: 81 및 서열 번호: 85에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 60% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역은 서열 번호: 15, 서열 번호: 19, 서열 번호: 23, 서열 번호: 27, 서열 번호: 31, 서열 번호: 35, 서열 번호: 39, 서열 번호: 43, 서열 번호: 47, 서열 번호: 51, 서열 번호: 55, 서열 번호: 59, 서열 번호: 63, 서열 번호: 67, 서열 번호: 71, 서열 번호: 75, 서열 번호: 79 및 서열 번호: 83에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열과 60% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 범(pan) CD46 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 하나 이상의 CD46 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 하나 이상의 CD46 스플라이스 변이체가 CD46D, CD46F 및 CD46J로 이루어진 군으로부터 선택되는 스플라이스 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제22항에 있어서, 상기 과증식성 장애가 신생물성 장애를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 신생물성 장애가 고형 종양을 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 신생물성 장애가 부신암, 방광암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 결장직장암, 췌장암, 전립샘암 또는 유방암을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제22항에 있어서, 상기 피험체에서 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 빈도 감소가 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 빈도 감소가 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 면역조직화학적 검출을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 빈도 감소가 시험관내 또는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 면역약화된 마우스 내로의 이식을 포함하는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 시험관내 콜로니 지지 조건으로의 제한 희석 침착을 포함하는 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제22항에 있어서, 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 44

제22항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 CD46 변이체 A 또는 이의 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 단편을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 융합 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제22항에 있어서, 제2 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 CD46 조절 인자는 상기 CD46 조절 인자와는 별개의 것인 방법.

청구항 48

종양 개시 세포 빈도 감소를 필요로 하는 피험체에게 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 종양 개시 세포 빈도 감소를 필요로 하는 피험체에서 종양 개시 세포 빈도를 감소시키는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 종양 개시 세포가 종양 영구 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 종양 영구 세포가 하나 이상의 마커를 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 CD46 길항제를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제48항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제48항에 있어서, 피험체가 부신암, 방광암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 결장직장암, 췌장암, 전립샘암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 신생물성 장애를 앓는 것인 방법.

청구항 55

제48항에 있어서, 종양 개시 세포 빈도가 10% 이상만큼 감소되는 것인 방법.

청구항 56

제48항에 있어서, 빈도 감소가 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 유세포 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 57

제48항에 있어서, 빈도 감소가 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 대한 면역조직화학적 검출을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 58

제48항에 있어서, 빈도 감소가 시험관내 또는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 면역약화된 마우스 내로의 이식을 포함하는 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 생체내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제58항에 있어서, 빈도 감소가 인간 종양 생세포의 시험관내 콜로니 지지 조건으로의 제한 희석 침착을 포함하는 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 시험관내 제한 희석 분석을 사용하여 측정된 빈도 감소가 푸아송 분포 통계를 사용한 종양 개시 세포 빈도의 정량화를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

피험체에게 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 항암제를 사용하는 치료를 위해 피험체에서 종양을 감작화시키는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 항체인 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 상기 종양이 고형 종양인 방법.

청구항 66

제63항에 있어서, 상기 항암제가 화학요법제를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제63항에 있어서, 상기 항암제가 생물제제를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

과증식성 장애 진단을 필요로 하는 피험체로부터 조직 시료를 수득하는 단계;

조직 시료를 1 이상의 CD46 조절 인자와 접촉시키는 단계; 및

시료와 회합된 CD46 조절 인자를 검출하거나 정량하는 단계

를 포함하는, 과증식성 장애 진단을 필요로 하는 피험체에서 과증식성 장애를 진단하는 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, CD46 조절 인자가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 항체가 리포터에 작동가능하게 회합되어 있는 것인 방법.

청구항 71

CD46 조절 인자, 및 CD46 관련 장애를 치료 또는 진단하는 데 상기 CD46 조절 인자를 사용하는 것에 관한 사용 설명서를 포함하는 용기를 포함하는, CD46 관련 장애를 진단 또는 치료하는 데 유용한 제조물품.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 단일클론 항체인 제조물품.

청구항 73

제72항에 있어서, 용기가 판독가능한 플레이트를 포함하는 것인 제조물품.

청구항 74

하나 이상의 CD46 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 CD46 조절 인자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 고형 종양을 포함하는 신생물성 장애를 앓는 피험체를 치료하는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 하나 이상의 CD46 스플라이스 변이체가 CD46D, CD46F 및 CD46J로 이루어진 군으로부터 선택되는 스플라이스 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제74항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 길항제를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제74항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제74항에 있어서, 신생물성 장애가 부신암, 방광암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 결장직장암, 췌장암, 전립샘암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 80

세포독성제와 회합된 1 이상의 CD46 조절 인자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 신생물성 장애를 앓는 피험체를 치료하는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 상기 세포독성제에 접합되어 있는 것인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제80항에 있어서, 신생물성 장애가 부신암, 방광암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 결장직장암, 췌장암, 전립샘암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 85

종양 개시 세포를 CD46 조절 인자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 개시 세포의 집단을 확인, 단리, 절편화, 또는 강화시키는 방법.

청구항 86

제82항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제83항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 88

제82항에 있어서, 종양 개시 세포에 대해 유세포 분석을 실시하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제85항에 있어서, 상기 유세포 분석이 FACS를 포함하는 것인 방법.

청구항 90

CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 과증식성 장애를 앓는 환자에서 종양 개시 세포를 고갈시키는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 CD46 조절 인자가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 세포독성제에 회합되어 있는 것인 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 범 CD46 항체인 방법.

청구항 94

제92항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 단일 CD46 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 것인 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 단일 CD46 스플라이스 변이체가 CD46D, CD46F 및 CD46J로 이루어진 군으로부터 선택되는 스플라이스 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 96

인간화된 항체를 포함하는 CD46 조절 인자로서, 상기 항체가 실질적으로 서열 번호: 199에 제시된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 실질적으로 서열 번호: 201에 제시된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 CD46 조절 인자.

청구항 97

hSC1.N71 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 98

인간화된 항체를 포함하는 CD46 조절 인자로서, 상기 항체가 실질적으로 서열 번호: 203에 제시된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 실질적으로 서열 번호: 205에 제시된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 CD46 조절 인자.

청구항 99

hSC1.N149 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 100

약학적 유효량의 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 전이 억제 또는 예방을 필요로 하는 피험체에서 전이를 억제 또는 예방하는 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 피험체가 CD46 조절 인자 투여 이전 또는 이후에 용적축소술을 받는 것인 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 용적축소술이 1 이상의 항암제의 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 103

제100항에 있어서, 피험체가 CD46 조절 인자를 투여받은 시점에 병에 차도가 있게 되는 것인 방법.

청구항 104

약학적 유효량의 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 유지 요법 수행을 필요로 하는 피험체에서 유지 요법을 수행하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 피험체가 CD46 조절 인자 투여 이전에 신생물성 장애에 대한 치료를 받은 것인 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 피험체가 CD46 조절 인자를 투여받은 때에 신생물성 장애와 관련하여 무증상인 방법.

청구항 107

제105항에 있어서, 피험체가 신생물성 장애에 대한 치료를 받은 후 6개월을 초과하여 CD46 조절 인자를 투여하는 것인 방법.

청구항 108

제105항에 있어서, CD46 조절 인자가 단일클론 항체를 포함하는 것인 방법.

명세서

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. 119(e)하에 2010년 9월 3일 출원된 미국 가출원 시리얼 번호 제61/380,181호의 이점을 주장하며, 상기 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 출원은 일반적으로 과증식성 장애, 이의 확장, 재발, 도침 또는 전이를 치료 또는 호전시키는 데 사용하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 광범위한 측면에서, 본 발명은 신생물성 장애의 치료 또는 예방을 위한, CD46 길항제 및 융합 구성체를 비롯한 CD46 조절 인자의 용도에 관한 것이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 종양 개시 세포 빈도 감소를 포함하는, 악성 종양의 면역요법적 치료를 위한 항CD46 항체의 용도를 제공한다.

배경기술

[0005]

줄기 및 전구 세포 분화 및 세포 증식은 기관 형성 조직 성장을 지원하고, 모든 살아있는 유기체의 평생 동안 일어나는 조직 대부분의 세포 대체 및 수복을 지원하는 것과 제휴하여 작용하는 정상적인 진행 과정이다. 분화 및 증식 결정은 대개 세포 운명 결정 및 조직 구조를 유지시키기 위해 균형을 이루는 다수의 인자 및 신호에 의해 조정된다. 정상적인 조직 구조는 세포 분열 및 조직 성숙화를 조절하는 미세환경 표식에 반응하는 세포의 결과로서 유지된다. 따라서, 세포 증식 및 분화는 정상적으로는 손상된 또는 죽어가는 세포의 대체를 위해, 또는 성장을 위해 필요한 경우에만 일어난다. 불행하게도, 다양한 신호전달 화학물질의 과잉 또는 부족, 변경된 미세환경 존재, 유전자 돌연변이 또는 이의 일부 조합을 비롯한, 무수한 요인으로 인해 세포 증식 및/또는 분화는 파괴될 수 있다. 정상적인 세포 증식 및/또는 분화가 파괴되거나, 또는 어찌 됐든 파괴되면, 암을 비롯한, 각종 질환 또는 장애가 유발될 수 있다.

[0006]

종래의 암 치료법으로는 화학요법, 방사선 요법, 수술, 면역요법(예컨대, 생물학적 반응 개질제, 백신 또는 표적화된 치료제) 또는 이의 조합을 포함한다. 애석하게도, 매우 많은 암들은 상기의 종래 치료법에 대하여 비반응성이거나, 또는 최소한도로 반응을 보이는 바, 환자에게 남아있는 옵션은 거의 없다. 예를 들어, 일부 환자 서브집단은 특정 요법의 일반적인 유효성에도 불구하고, 환자를 비반응성이 되도록 만드는 유전자 돌연변이(예컨대, KRAS)를 보인다. 또한, 암 유형에 따라, 일부 이용가능한 치료법, 예컨대, 수술은 실현가능한 대체법이 될 수 없다. 현 치료 지침의 치료제에 내재되어 있는 한계는 특히 이전에 치료를 받은 적이 있고, 이후에 다시 도진 환자를 치료하고자 시도할 때에 명백히 드러난다. 이러한 사례에서, 실패한 치료학적 요법 및 그 결과로 초래된 환자 악화는 대개 최종적으로는 치유가 불가능한 것으로 입증된 보다 침습성인 질환인 것으로 그 모습을 드러내는 난치성 종양의 원인이 될 수 있다. 도침, 종양 재발 및 전이를 예방하는 혈관 요법의 실패로 인해 수년간에 걸쳐 암 진단 및 치료가 크게 개선되기는 하였지만, 많은 고령 종양에 대한 전반적인 생존율에는 대개 변함이 없다. 따라서, 보다 표적화되고, 효능이 있는 요법을 개발하고자 하는 도전 과제가 남아있다.

[0007]

유망한 한 연구 분야로는 많은 암의 근간이 되는 것으로 보이는 종양발생 "시드" 세포를 추격하는 표적화된 치료제를 사용하는 것을 포함한다. 상기 목적을 달성하기 위해, 대부분의 고형성 조직들은 상기 조직 대부분을 포함하는 분화된 세포 유형을 생성하는 성체 조직 상주 줄기 세포 집단을 포함하는 것으로 현재 알려져 있다. 이러한 조직에서 발생되는 종양은 유사하게 줄기 세포로부터도 발생되는 이질성 세포 군집으로 구성되지만, 이의 전반적인 증식 및 조직화에 있어서는 현저한 차이를 보인다. 종양 세포 대부분은 제한된 증식 능력을 가지고 있는 것으로 점점 더 인식되어 가고 있지만, 암 세포(보통 암 줄기 세포 또는 CSC(cancer stem cell)로도 공지) 중 소수 집단은 광범위하게 자기 재생하여 자신이 종양 재개시 능력을 가질 수 있도록 하는 배타적인 능력을 가

지고 있다. 더욱 구체적으로, 암 줄기 세포 가설은, 각 종양 내에는(대략 0.1-10%) 이의 종양 전구 세포로, 그리고 이어서 최종적으로 분화된 종양 세포로의 분화 결과로서, 무한 자기 재생이 가능하고, 계속해서 이의 복제 능이 제한된 종양 세포를 생성할 수 있는 별개의 세포 서브세트(즉, CSC)가 존재한다는 것을 제안한다.

[0008] 최근에, 이러한 CSC(이는 또한 종양 영구 세포 또는 TPC(종양 영구 세포)로도 공지)는 전통적인 화학요법제 또는 방사선에 대해 더욱 큰 내성을 가질 수 있고, 따라서, 치료 지침의 임상 요법 후, 지속적으로 추후 재발성 종양, 속발성 종양 및 전이의 성장을 가속화시킬 수 있다는 것이 더욱 명백해졌다. 또한, 정상적인 조직 상주 줄기 세포의 기관 형성 및/또는 자기 재생을 조절하는 경로가 CSC에서 탈조절되거나 변경됨으로써 자기 재생 암 세포 및 종양 형성이 계속적으로 확장된다는 것을 제안하는 증거도 증가하고 있다. 일반적으로, 문헌 ([Al-Hajj et al., 2004, PMID: 15378087]; 및 [Dalerba et al., 2007, PMID: 17548814])(상기 문헌들은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)을 참조할 수 있다. 따라서, 전통적인 것 뿐만 아니라, 보다 최근의 표적화된 치료 방법의 유효성은 심지어 상기와 같은 다양한 치료 방법에 직면에 있는 경우에도 암을 영구화시킬 수 있는 내성을 지닌 암 세포의 존재 및/또는 출현으로 인해 한계가 있다는 것은 자명한 사실이 되었다(문헌 [Huff et al., European Journal of Cancer 42: 1293-1297 (2006)] 및 [Zhou et al., Nature Reviews Drug Discovery 8: 806-823 (2009)])(상기 문헌들은 각각 그 전문이 본원에 참고로 포함된다). 상기 관찰 결과는 고형 종양을 앓고 있을 때 실질적으로 환자의 생존을 증가시킬 수 없는 전통적인 용적축소제의 일관된 무능함을 통해, 및 종양이 어떻게 성장하고, 다시 도지고, 전이되는지에 관한 점점 더 복잡한 이해 개발을 통해 확인할 수 있다. 따라서, 신생물성 장애를 치료하기 위한 최근의 전략법은 종양 재발, 전이 또는 환자 도짐의 가능성을 축소시키기 위해 종양 영구 세포의 분화를 제거, 고갈, 침묵화, 또는 촉진시키는 것의 중요성을 인지해 가고 있다.

[0009] 상기와 같은 전략법을 개발하고자 하는 노력이, 원발성 인간 고형 종양 표본을 이식받고, 오직 배타적으로 면역 약화된 마우스에만 계대접종되는 것인 비전통적인 이종이식편(NTX: non-traditional xenograft) 모델을 포함하는 최근 연구에 도입되었다. 그러한 기법을 통해 이질성 종양을 생성할 수 있고, 그가 무한대로 성장할 수 있도록 가속화시킬 수 있는 독특한 능력을 지닌 세포 서브집단이 존재한다는 것이 확인되었다. 앞서 세운 가설과 같이, NTX 모델에서의 연구를 통해, 확인된 종양 세포 CSC 서브집단은 예전대, 화학요법 및 방사선과 같은 용적축소 요법에 대하여 보다 큰 내성을 가지고 있는 것처럼 나타났다는 것을 확인할 수 있었고, 이는 잠재적으로는 임상적 반응률과 총 생존율 사이의 차이를 설명한다. 추가로, CSC 연구에서 NTX 모델의 사용이 종양 재발 및 전이에 대해 중요한 영향력을 미침으로써 환자 생존율을 개선시키는 CSC 표적화된 요법을 유도할 수 있는 약물 후보물질의 약물 발견과 임상전 평가에서 근본적인 변화를 불러왔다. 진보하였음에도 불구하고, CSC 정체 및 분화 능에 관한 특징을 규명하는 실험 플랫폼의 부족과 함께 원발성 및/또는 이종이식편 종양 조직 취급과 관련된 고유의 기술상의 어려움이 중요한 도전 과제를 제기한다. 따라서, 암 줄기 세포를 선택적으로 표적화하고, 과증식 성 장애를 치료, 예방 및/또는 관리하는 데 사용될 수 있는 진단학적, 예방학적 또는 치료학적 화합물 또는 방법을 개발하는 것이 실질적으로는 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0010] 광범위한 의미에서, CD46 관련 장애(예전대, 과증식성 장애 또는 신생물성 장애)의 치료에서 사용될 수 있는 방법, 화합물, 조성물 및 제조물품에 관한 것인 본 발명에 의해 상기과 같은 목적 및 다른 목적이 제공된다. 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 암 줄기 세포를 효과적으로 표적화하고, 매우 다양한 악성 종양을 앓는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있는 신규한 CD46 조절 인자를 제공한다. 특정 실시양태에서, 개시된 CD46 조절 인자는 하나 이상의 생리학적 경로에서 CD46 폴리펩티드, 이의 리간드 또는 이의 유전자를 인식하거나, 그와 경쟁하거나, 작용시키거나, 길항시키거나, 그와 상호작용하거나, 그와 결합하거나, 또는 회합(association)하여 CD46 단백질의 영향을 조절하거나, 조정하거나, 변경시키거나, 변화시키거나, 변형시키는 임의의 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 선택된 실시양태에서, CD46 조절 인자는 단리된 형태의, 또는 다른 모이어티와 융합되거나 회합된(예전대, Fc-CD46, PEG-CD46 또는 표적 모이어티와 회합된 CD46) CD46 그 자체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 다른 선택된 실시양태에서, CD46 조절 인자는 본 출원의 목적을 위해, CD46을 인식하거나, 그와 경쟁하거나, 그와 상호작용하거나, 그와 결합하여, 종양 개시 세포를 비롯한 신생물성 세포의 성장을 중화시키거나, 제거하거나, 감소시키거나, 감작시키거나, 재프로그래밍하거나, 억제시키거나, 또는 제어하는 임의의 구성체 또는 화합물을 의미하는 것으로 간주되어야 하는 CD46 길항제를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 예상외로, 신생물성 세포의 생존, 재발, 재생 및/또는 전이를 전파시키거나, 유지시키거나, 확장시키거나, 증식시키거나, 또는 다르게는 촉진시킬 수 있는 능력을 침묵화시키거나, 중화시키거나, 감소시키거나, 줄이거나, 고갈시키거나, 완화시키거나, 축소시키거나, 재프로그래밍하거나, 제거하거나

나, 또는 다르게는 억제시키는 것으로 발견된 항CD46 항체, 또는 이의 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0011] 한 실시양태에서, CD46 조절 인자는 항체가 서열 번호: 199에 제시된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 서열 번호: 201에 제시된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화된 항체를 포함할 수 있다. 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 hSC1.N71 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물의 형태일 것이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD46 조절 인자는 항체가 서열 번호: 203에 제시된 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 및 서열 번호: 205에 제시된 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 것인 인간화된 항체를 포함할 수 있다. 추가의 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 hSC1.N149 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물의 형태일 것이다.

[0012] 특정 다른 실시양태에서, 본 발명은 피험체에게로의 투여시 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 CD46 조절 인자를 포함할 것이다. 바람직하게, 빈도 감소는 시험관내 또는 생체내 제한 희석 분석(limiting dilution analysis)을 사용하여 측정될 것이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 분석법은 인간 종양 생세포를 면역화된 마우스에 이식시키는 것을 포함하는 생체내 제한 희석 분석을 사용함으로써 수행될 수 있다. 별법으로, 제한 희석 분석은 인간 종양 생세포를 시험관내 콜로니 지지 조건으로 침착시키는 제한 희석 침착을 포함하는 시험관내 제한 희석 분석을 사용함으로써 수행될 수 있다. 어느 경우에서든, 빈도 감소의 분석, 계산, 또는 정량화는 바람직하게 정확하게 회계할 수 있도록 하기 위해 푸아송 분포(Poisson distribution) 통계를 사용하는 것을 포함할 것이다. 상기와 같은 정량화 방법이 바람직하기는 하지만, 덜 노동 집약적인 방법, 예컨대, 유세포 분석법 또는 면역조직화학법 또한 원하는 값을 제공하는 데 사용될 수 있는 것을 이해할 것이며, 따라서, 이는 명백히 본 발명의 범주내에 포함되는 것으로 간주된다. 그러한 경우, 빈도 감소는 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 알려져 있는 종양 세포 표면 마커에 관한 유세포 분석 또는 면역조직화학적 검출을 사용함으로써 측정될 수 있다.

[0013] 따라서, 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 CD46 관련 장애 치료를 필요로 하는 피험체에게 치료적 유효량의 CD46 조절 인자를 투여함으로써, 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키는 단계를 포함하는, CD46 관련 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 또한, 종양 개시 세포 빈도 감소는 바람직하게는 시험관내 또는 생체내 제한 희석 분석을 사용함으로써 측정될 것이다.

[0014] 이와 관련하여, 본 발명은 적어도 부분적으로는 CD46 폴리펩티드가 각종 신생물의 병인에 관여하는 종양 영구 세포(즉, 암 줄기 세포)와 관련이 있다는 발견에 기초한다는 것을 이해할 것이다. 더욱 구체적으로, 본 출원은 각종의 예시적인 CD46 조절 인자 투여가 종양 개시 세포에 의한 종양발생 신호전달을 감소시키거나, 억제시키거나 또는 제거할 수 있다는 것(즉, 종양 개시 세포의 빈도를 감소시킬 수 있다는 것)을 예상외로 나타낸다. 종양 개시 세포를 감소시키거나, 제거하거나, 재프로그래밍하거나 또는 침묵화시킴으로써든, 또는 종양 세포 형태론적 성질을 변형시킴으로써든(예컨대, 분화 유도, 니치 파괴) 간에 그로 인해 이루어진 상기와 같이 감소된 신호 전달을 통해서 결국에는 종양발생, 종양 유지, 확장 및/또는 전이 및 재발을 억제시킴으로써 CD46 관련 장애를 보다 효과적으로 치료할 수 있다. 다른 실시양태에서, 개시된 조절 인자는 종양 성장을 가속화시킬 수 있는 CD46 매개 주변분비 신호전달을 간섭하거나, 억제시키거나, 또는 다르게는 지연시킬 수 있다. 추가로, 하기에서 더 상세하게 논의되는 바와 같이, CD46 폴리펩티드는 보체 경로에 긴밀하게 관여한다. 본원에 기술된 신규한 CD46 조절 인자를 사용하여 상기 경로에 개입하면 1 초과의 기전에 의해 장애를 추가로 호전시킴으로써(즉, 종양 개시 세포 감소 및 보체 파괴) 부가 또는 상승 효과를 제공할 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태는 CD46 매개 장애 치료를 필요로 하는 피험체에게 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, CD46 매개 장애 치료를 필요로 하는 피험체에서 CD46 매개 장애를 치료하는 방법을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, CD46 조절 인자는 항암제와 회합(예컨대, 접합)될 것이다. 추가로, 상기와 같은 파괴 및 부수적인 이점은 정상적인 인접한 조직과 비교하였을 때 피험체 종양 조직이 상승된 수준의 CD46을 보이던지 또는 감소되거나 저하된 수준의 CD46을 보이던지 간에 달성될 수 있다.

[0016] 본 발명의 CD46 조절 인자는 CD46 분자의 단일 이소폼 또는 염선된 몇몇의 이소폼(즉, 스플라이스 변이체)과 반응하도록 제조되고 선택될 수 있거나, 또는 반대로, CD46 이소폼 중 일부 또는 그 모두와 반응 또는 회합하는 범(pan) CD46 조절 인자를 포함할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 더욱 구체적으로, 본원에 개시되고, 하기 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, 바람직한 조절 인자, 예컨대, 항체는 그가 (예컨대, 특정 엑손 연결부에서의) 단일 스플라이스 변이체에 의해 나타나는 도메인과, 또는 다중 또는 모든 CD46 이소폼 간에 보존되는 도메인(예컨대, 엑손 1-6)과 반응할 수 있도록 생성되고 선택될 수 있다. 이는 본 발명과 관련하여, 하기 실시예 5에 제시되어 있는 바와 같이, 특정 스플라이스 변이체가 바람직하게는 TIC 상에서 발현되는 것으로 밝혀졌다.

고, 이는 종양발생 세포 빈도를 선택적으로 감소시킬 수 있고/거나, 암 줄기 세포 집단을 고갈시킬 수 있는 치료학적 표적으로서의 역할을 할 수 있다는 점에서 중요하다.

[0017] 따라서, 선택된 실시양태에서, 본 발명은 범 CD46 조절 인자를 포함한다. 다른 선택된 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 CD46 조절 인자를 포함한다. 바람직하게, 스플라이스 변이체는 CD46D, CD46F 및 CD46J로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 범 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 피험체를 치료하는 방법을 포함한다. 추가의 다른 실시양태는 하나 이상의 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 CD46 조절 인자의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 피험체를 치료하는 방법을 포함한다.

[0018] 본 발명의 다른 양상은 종양 개시 세포를 침묵화시킴과 동시에, 잠재적으로는 다중 종양원성 생존 경로를 파괴시킬 수 있는 개시된 조절 인자의 능력을 사용한다. 상기와 같은 다중 활성 CD46 조절 인자(예컨대, CD46 길항체)는 치료 지침의 항암제 또는 용적축소제와 함께 병용하여 사용되었을 때에 특히 효과적인 것으로 입증될 수 있다. 추가로, 2종 이상의 CD46 길항체(예컨대, CD46 상의 상이한 두 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체)는 본 발명의 교시에 따라 조합하여 사용될 수 있다. 또한, 하기에서 일부 상세하게 논의되는 바와 같이, 본 발명의 CD46 조절 인자는 접합된(conjugated) 상태로 또는 비접합된 상태로 사용될 수 있고, 임의로는 다양한 화학물질 또는 생물학적 항암제와 함께 감작제로서 사용될 수 있다.

[0019] 따라서, 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태는 피험체에게 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 항암제를 사용하는 치료를 위해 피험체에서 종양을 감작화시키는 방법을 포함한다. 본 발명의 특히 바람직한 측면에서, CD46 조절 인자는 특이적으로는 시험관내 또는 생체내 제한 회석 분석을 사용하여 측정되는, 종양 개시 세포 빈도를 감소시킬 것이다.

[0020] 유사하게, 본 발명의 화합물은 다양한 생리학적 기전을 통해 치료학상의 이점을 발휘할 수 있는 바, 본 발명은 또한 구체적으로 특정 세포 과정을 사용하도록 제조된 선택된 효과기 또는 조절 인자에 관한 것이다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 바람직한 조절 인자는 종양 개시 세포의 표면 상의, 또는 그 부근의 CD46과 회합하여 피험체의 면역 반응을 자극시킬 수 있도록 조작될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조절 인자는 신호전달에 영향을 줄 수 있는 종양 미세환경 중의 CD46 기질의 농도를 증가시키고, CD46 활성을 중화시키는 에피토프에 대한 항체를 포함할 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 개시된 조절 인자는 CD46과 회합된 세포를 고갈 또는 제거함으로써 작용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 임의의 특정 작용 모드로 제한된다기보다는, 원하는 결과를 달성하는 임의의 방법 또는 CD46 조절 인자를 포함한다는 것을 이해하는 것이 중요하다.

[0021] 상기 골격 내의 개시된 실시양태의 바람직한 실시양태는 치료적 유효량의 1 이상의 중화 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, 신생물성 장애를 앓는 피험체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0022] 다른 실시양태는 치료적 유효량의 1 이상의 고갈 CD46 조절 인자를 투여하는 단계를 포함하는, CD46 관련 장애를 앓는 피험체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0023] 추가의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 종양 종괴 중 적어도 일부를 제거하도록 디자인된 초기 시술(예컨대, 화학요법제, 방사선 또는 수술) 이후 일정 기간에 걸쳐 개시된 효과기를 투여하는 것인 유지 요법인 방법을 제공한다. 상기 치료학적 요법은 몇주 간에 걸쳐, 몇개월 간에 걸쳐, 또는 심지어는 몇년 간에 걸쳐 시행될 수 있으며, 여기서, CD46 조절 인자는 예방학적으로 작용하여 전이 및/또는 종양 재발을 억제시킬 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 개시된 조절 인자는 공지된 용적축소 요법과 협력하여 투여됨으로써 전이를 예방하거나 자연시킬 수 있다.

[0024] 상기 논의된 치료제를 사용하는 것 이외에도, 본 발명의 조절 인자는 CD46 관련 장애, 특히, 과증식성 장애를 진단하는 데 사용될 수 있다는 것 또한 이해해야 할 것이다. 따라서, 바람직한 실시양태는

[0025] a. 과증식성 장애 진단을 필요로 하는 피험체로부터 조직 시료를 수득하는 단계;

[0026] b. 조직 시료를 1 이상의 CD46 조절 인자와 접촉시키는 단계; 및

[0027] c. 시료와 회합된 CD46 조절 인자를 검출하거나 정량하는 단계

[0028] 를 포함하는, 과증식성 장애 진단을 필요로 하는 피험체에서 과증식성 장애를 진단하는 방법을 포함한다.

[0029] 상기 방법은 본 출원과 함께 공동으로 쉽게 이해될 수 있으며, 일반적으로 이용가능한 상업적 기술, 예컨대, 자

동 플레이트 판독기, 전용 리포터 시스템 등을 사용함으로써 쉽게 수행될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 검출 또는 정량화 단계는 종양 개시 세포 빈도 감소 및 이의 검출을 포함할 것이다. 또한, 제한 희석 분석법은 앞서 상기에 언급된 바와 같이 수행될 수 있고, 이는 바람직하게는 빈도 감소에 관하여 정확하게 회계할 수 있도록 하기 위해 푸아송 분포 통계를 사용할 것이다.

[0030] 유사한 방식으로, 본 발명은 또한 CD46 관련 장애, 예컨대, 암의 진단 및 모니터링에 유용한 키트를 제공한다. 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 바람직하게 CD46 조절 인자, 및 CD46 관련 장애를 치료 또는 진단하는데 상기 CD46 조절 인자를 사용하는 것에 관한 사용 설명서를 포함하는 용기를 포함하는, CD46 관련 장애를 진단 또는 치료하는 데 유용한 제조물품을 제공한다.

[0031] 본 발명의 다른 바람직한 실시양태는 또한 형광 활성화된 세포 분류법(FACS: fluorescence activated cell sorting) 또는 레이저 매개 절편화와 같은 방법을 통해 종양 개시 세포 집단 또는 서브집단을 확인, 단리, 절편화 또는 강화시키는 데 유용한 수단으로서 개시된 조절 인자의 특성을 사용한다.

[0032] 따라서, 본 발명의 또 다른 바람직한 실시양태는 종양 개시 세포를 CD46 조절 인자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 개시 세포 집단을 확인, 단리, 절편화(sectioning), 또는 강화(enriching)시키는 방법에 관한 것이다.

[0033] 상기 내용은 요약이며, 따라서, 필요에 의해 단순화, 일반화, 및 상세 내용의 생략을 포함한다; 그 결과, 상기 내용은 단지 설명을 위한 것이며, 어느 방식으로든 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에 기술된 방법, 조성물 및/또는 장치 및/또는 다른 주제의 다른 측면, 특징 및 이점은 본원에 기술된 교시에서 자명해질 것이라는 것을 당업자는 이해할 것이다. 하기 상세한 설명에서 추가로 기술되는 단순화된 형태의 개념을 선택적으로 도입하기 위해 요약을 제공한 것이다. 상기 요약은 청구되는 주제의 중요한 특징 또는 본질적인 특징을 확인하고자 하는 것도 아니며, 청구되는 주제의 범주를 결정짓는 데 도움을 주는 기구로서 사용하고자 하는 것도 아니다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1a 및 1b는 각각 결장직장암, 유방암, 또는 비소세포 폐암을 앓는 환자로부터 유래된 고형 종양 표본(도 1a) 및 결장직장암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 비소세포 폐암 세포, 흑색종 세포, 난소암 세포, 및 두부경부암으로부터의, 환자 유래의 비전통적인 이종이식편 종양 표본(도 1b) 상에서의 CD46 발현에 관한 유세포 분석 데이터를 도시한 것이다;

도 2는 세포 표면 마커 CD46, 상피 표면 항원(ESA: epithelial surface antigen), CD66c, 및 CD324를 사용한 종양 개시 세포의 유세포 분석 강화를 보여주는 산포도를 제공한다;

도 3A-C는 비전통적인 이종이식편 모델에서 일련의 계대접종에 의한 CD46^고 세포의 종양 영구 능력에 관하여 입증하는 유세포 분석법 및 형광 활성화된 세포 분류법(FACS) 데이터를 보여주는 것이다;

도 4A-C는 결장직장암에서 이리노테칸이 CD46^고 종양 영구 세포의 빈도에 미치는 효과를 그래프로 도시한 것이다;

도 5A-C는 결장직장암 종양 영구 세포, 종양 전구 세포, 및 비종양발생 세포에서의 CD46 스플라이스 변이체 이소폼 발현을 보여주는 것이다;

도 6은 벌크한 결장직장 종양 세포 집단에서의 CD46 엑손 사용 빈도를 나타내는 실시간 정량적 PCR 데이터를 도시한 것이다;

도 7A-C는 각각 결장직장의 정상적인 인접한 세포 및 결장직장 종양 세포(도 7A), 췌장의 정상적인 인접한 세포 및 췌장 신경내분비 및 비신경내분비 서브타입 종양 세포(도 7B), 및 난소의 정상적인 인접한 세포 및 난소 종양 세포(도 7C)에서의 CD46 단백질의 발현을 보여주는 그래프적 표현이다;

도 8A-C는 각각 결장직장의 정상적인 인접한 세포 및 결장직장 종양 세포(도 8A), 췌장의 정상적인 인접한 세포 및 췌장 신경내분비 및 비신경내분비 서브타입 종양 세포(도 8B), 및 난소의 정상적인 인접한 세포 및 난소 종양 세포(도 8C)에서의, 엑손 10을 포함하는 CD46 스플라이스 변이체의 발현을 보여주는 그래프적 표현이다;

도 9A 및 9B는 K562 세포에서의 CD46 항체의 내재화(도 9A), 및 사포린(Saporin) 독소에 접합된 2차 항마우스 항체를 내재화시킬 수 있는 마우스 단일클론 항CD46 항체에 의한 K562 세포의 사멸(도 9B)을 도시한 그래프적 표현이다;

도 10a-r은 본원 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 단리되고 클로닝된 18개의 별개의 항CD46 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 핵산 및 아미노산 서열을 제공한다;

도 11a 및 11b는 각각 코티아(Chothia) 등에 의해 정의된 바와 같은, 본원 실시예에 기술되어 있는 바와 같이 단리되고 클로닝된 18개의 별개의 CD46 조절 인자의 유전자 배열 및 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 보여주는 표로 나타낸 것이다;

도 12의 A 및 B는 CD46의 다양한 영역에 대한 항CD46 항체 SC1.N122 및 SC1.N29의 결합을 보여주는 ELISA 데이터(도 12의 A) 및 다양한 CD46 엑손에 대한 항CD46 항체 SC1.N29의 결합을 보여주는 ELISA 데이터의 그래프적 표현(도 12의 B)을 그래프로 도시한 것이다;

도 13a 및 13b는 각각 hSC1.N71의 중쇄 가변 영역의 핵산 및 아미노산 서열(서열 번호: 198 및 서열 번호: 199) 및 경쇄 가변 영역의 핵산 및 아미노산 서열(서열 번호: 200 및 서열 번호: 201)(도 13a), 및 hSC1.N149의 중쇄 가변 영역의 핵산 및 아미노산 서열(서열 번호: 202 및 서열 번호: 203) 및 경쇄 가변 영역의 핵산 및 아미노산 서열(서열 번호: 204 및 서열 번호: 205)을 도시한 것으로서, 여기서, 카바트 등에 의해 정의된 바와 같은 CDR은 밑줄로 표시되어 있다;

도 14는 12개의 별개의 CD46 조절 인자의 면역화학적 특징을 표 포맷으로 제공한다;

도 15의 A-C는 4가지 상이한 농도의 항원에 대한 뮤린 항체 SC1.N71(도 15의 A) 및 인간화된 항체 유도체 hSC1.N71(도 15의 B)의 측정된 친화도를 나타내고, 측정값을 포함한 결과를 요약하여 작성된 표를 제공한다(도 15의 C);

도 16의 A 및 B는 각각 개시된 조절 인자를 사용하여 작성된 표준 곡선, 및 건강한 피험체 및 다양한 신생물을 앓는 환자로부터 수득된 시료에서 측정되고, 상기 표준 곡선으로부터 외삽된 가용성 CD46의 혈장 농도를 도시한 것이다;

도 17은 사포린에 접합된 스트렙트아비딘을 사용하는 세포 사멸의 매개를 통해 표적화제로서 작용할 수 있는 개시된 CD46 조절 인자의 능력을 도시한 그래프적 표현이다;

도 18의 A 및 B는 세포 표면 상에서 발현되는 CD46와 회합할 수 있는 개시된 CD46 조절 인자의 능력(도 18의 A), 및 렌티바이러스 유도성 CD46^{-/-}는 상대적으로 면역성이 있지만, CD46^{+/+} 세포에 대해서는 이의 세포 사멸을 매개할 수 있는 능력(도 18의 B)을 도시한 것이다;

도 19의 A 및 B는 상대적으로 낮은 사멸은 조절 인자의 부재하에서 관찰되고(도 19의 A), 개시된 조절 인자는 상이한 종양 유형 간에 사멸을 효과적으로 매개한다(도 19의 B)는 것을 나타내는, 본 발명의 CD46 조절 인자가 스트렙트아비딘-ZAP 접합체의 수용체 의존성 흡수 및 내재화를 매개할 수 있다는 것을 보여주는 것이다; 그리고

도 20A 및 20B는 도 20A가 대조군과 비교하여 개시된 조절 인자의 효과를 나타낸 것이고, 도 20B가 화학요법만을 단독으로 수행하였을 때와 비교하여, CD46 조절 인자가 종양 재발을 지연시킬 수 있고, 무진행 생존율을 증가시킬 수 있다는 것을 입증하는 것인, 암 줄기 세포를 화학적으로 감작화시킬 수 있는 CD46 조절 인자의 능력을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 도입

광범위한 의미에서, 본 발명의 실시양태는 신규한 CD46 조절 인자, 및 암을 비롯한 과증식성 장애의 발병을 치료, 관리, 호전, 또는 예방하는 데 있어서의 이의 용도에 관한 것이다. 어느 특정의 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 개시된 조절 인자는 종양 성장을 감소 또는 지연시키고, 종양발생 세포를 제거 또는 중화시킬 뿐만 아니라, 상기 세포의 항암제에 대한 감작성을 변경시키는 데 있어서 효과적인 것으로 밝혀졌다. 추가로는 놀랍게도, 선택된 종양 영구 세포(TPC)와 CD46으로 알려져 있는 단백질 사이의 표현형상의 연관성에 대해 현재 까지 알려져 있는 바가 없는 것으로 밝혀졌다. 이와 관련하여, 선택된 TPC(즉, 암 줄기 세포 또는 CSC)는 정상적인 조직과 비교하였을 때 뿐만 아니라, 종양 전구 세포(TProg), 및 상당부 고형 종양을 함께 포함하는 비종양 발생(NTG) 세포와 비교하였을 때에도, 특이적인 스플라이스 변이체를 비롯한 CD46을 상승된 수준으로 발현하는 것으로 나타났다. 따라서, 선택된 실시양태에서, 종양 미세환경에서 및 선택된 세포의 표면과 관련된 단백질의 수준이 상승되어 있는 바, CD46은 종양 관련 마커(또는 항원)를 포함하고, TPC 및 관련된 신생물의 검출, 감작

및/또는 억제에 대해 효과적인 제제를 제공하는 것으로 나타났다. 더욱 구체적으로, 및 더욱더 놀랍게도, CD46이 외관상 (적어도 어느 정도까지는) 분비된다는 것을 고려하였을 때, Fc-CD46 구성체 및 면역반응성 길항체(예컨대, 상기 단백질에 대한 항체)를 비롯한 CD46 조절 인자는 종양 영구 세포의 분화를 고갈시키거나, 감작시키거나, 제거하거나, 감소시키거나, 재프로그래밍하거나, 촉진시키거나, 또는 다르게는, 환자에서 종양 성장 또는 재발을 확산시키고/거나, 상기 종양 성장 또는 재발을 계속하여 가속화시킬 수 있는 능력을 방해하거나, 제한하는 데 유용할 수 있다는 것이 추가로 밝혀졌다.

[0037]

바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 웨프티드 또는 폴리펩티드를 포함할 것이다. 앞서 언급하고, 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 본원에 개시된 선택된 실시양태는 접합된 또는 접합되지 않은 형태의, CD46에 대한 항체를 포함할 것이다. CD46 조절 인자의 다른 실시양태는 바람직하게는 CD46, 또는 예를 들어, CD46 융합 구성체(예컨대, CD46-Fc, CD46-표적화 모이어티 등) 또는 CD46-접합체(예컨대, CD46-PEG, CD46-세포독성제 등)를 비롯한, 이의 형태, 변이체, 유도체, 또는 단편을 포함할 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 조절 인자는 유전자 수준에서 작동할 수 있고, 안티센스 구성체, siRNA, miRNA 등과 같은 화합물을 포함할 수 있다. 상기 CD46 조절 인자는 예를 들어, CD46 조절 인자의 형태, 또는 투약 및 전달 방법에 따라 경쟁 기전, 작용시키거나 길항화시키는 선택된 경로, 또는 제거 또는 고갈 특이 세포(비TPC 지지 세포 포함)를 통해 종양 영구 세포 및/또는 관련된 신생물의 성장, 전파 또는 생존을 감소시킬 수 있다.

[0038]

이러한 발견 내용을 고려하며, 당업자는 본 발명의 특히 바람직한 실시양태가 대개는 CD46 조절 인자 및 종양 개시 세포를 감소시키는 데 있어서의 이의 용도에 관한 것이라는 것을 이해할 것이다. 본원에서 광범위하게 논의되는 바와 같이, 본 발명과 화합성인 CD46 조절 인자로는 광범위하게 CD46과 회합하거나, 그와 결합하거나, 복합체를 형성하거나, 또는 다르게는, 그와 반응하거나, 경쟁하고, 임의로는 종양 영구 세포 빈도를 감소시키는 임의의 화합물을 포함한다. 본원에 개시된 예시적인 조절 인자로는 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 웨프티드 또는 폴리펩티드를 포함한다. 특정 바람직한 실시양태에서, 선택된 조절 인자로는 CD46에 대한 항체 또는 이의 면역반응성 단편 또는 유도체를 포함할 것이다. 상기 항체는 실제로는 길항성이거나, 또는 효능성일 수 있다. 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명과 화합성인 효과기는 CD46 그 자체 또는 이의 반응성 단편을 포함하는 CD46 구성체를 포함할 것이다. 상기 CD46 구성체는 융합 단백질을 포함할 수 있고, 다른 폴리펩티드로부터의 반응성 도메인, 예컨대, 면역글로불린, 스테이플드(stapled) 웨프티드 또는 생물학적 반응 개질체를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 추가의 다른 바람직한 측면에서, CD46 효과기 또는 조절 인자는 계놈 수준에서 바람직한 효과를 발휘하는 핵산 조립체를 포함할 것이다. 본 교시와 화합성인 추가의 다른 조절 인자는 하기에서 상세하게 논의할 것이다.

[0039]

관련된 정보에서 보면, 하기 논의는 CD46 조절 인자, CD46 길항체 및 항CD46 항체에 관한 것이다. 각 용어의 더욱 상세한 정의는 하기에서 제공하지만, 상기 용어는 대개는 상기 개시내용의 목적을 위해 상호교환될 수 있고, 문맥을 통해 달리 언급되지 않는 한, 좁게 해석되지 않아야 한다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, CD46 길항체에 관한 것이라고 한 경우, 길항성이 되는 본 발명의 항체 또한 적당할 것이다. 유사하게, CD46 조절 인자라는 용어는 개시된 CD46 길항체 및 항CD46 항체를 명확하게 포함하고, 후자와 관련된 용어 또한 문맥상 제외되지 않는 정도로 조절 인자로서 적용될 수 있다.

[0040]

II. CD46

[0041]

CD46은 또한 막 보조인자 단백질 또는 MCP(membrane cofactor protein)로서도 공지되어 있다. 이는 광범위하게 발현되기는 하지만, 선택적 엑손 스플라이싱 및 당화의 결과로서 다수의 이소폼을 가지는 것인 I형 막횡단 단백질이다. 최근, 상기 분자의 14개의 이소폼이 검출되었다는 것이 문헌 [Karosi et al., *Laryngoscope* 118: 1669-1676 (Sept. 2008)](이는 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다)을 통해 보고되었다. mRNA는 염색체 1q32에 위치하는 단일 유전자로부터 전사되고, 광범위하게 선택적 스플라이싱됨으로써 다양한 단백질 이소폼을 코딩하는 다중의 전사체가 생산된다. 상기 유전자를 포함하는 14개의 엑손 중 엑손 1-6은 모든 CD46 단백질 이소폼에서 보존되는 것인 반면, 엑손 7 내지 9는 가변적으로 사용되는, 세린-트레오닌-프롤린("STP")이 풍부한 영역을 코딩하여 단백질 이소폼에서의 주요 과변이를 일으킨다. 엑손 11 및 12는 CD46의 막횡단 영역을 코딩하는 반면, 엑손 13 및 14는 단백질의 세포질 꼬리를 코딩한다. 가장 장체인 mRNA 전사체인 변이체 A(NM_002389)는 상기 유전자의 14개의 엑손 모두로부터의 서열을 포함한다. 엑손 7, 8, 9, 및 13의 가변적 스플라이싱을 통해 CD46의 14개의 이소폼 다수의 생성된다고 여겨지며, 엑손 8의 선택적인 포함 또는 배제로부터 생성된 66 및 56 kDa의 단백질 이소폼이 우세하게 관찰된다. 엑손 13의 선택적인 포함/배제를 통해서는 상기 분자의 세포질 꼬리의 코딩된 서열에 변이가 일어나는데, 이는 이러한 변이가 단백질의 세포하 수송, 안정성, 및 신호전달 특성에 영향

을 준다는 것을 제안한다.

[0042]

문헌 [Karosi et al.]에 기술되어 있는 바와 같이, CD46 mRNA 이소폼 D는 CD46 유전자의 엑손 1-6, 8-12 및 14를 포함하고(단백질 NP_722548을 코딩하는 서열 NM_153826에 등가), 이소폼 F는 엑손 1-6, 9-12, 및 14를 포함하고(NP_758863을 코딩하는 서열 NM_172353에 등가), 이소폼 J는 엑손 1-6, 8, 10-12, 및 14를 포함한다(NP_758866을 코딩하는 서열 NM_172356에 등가). 더욱 구체적으로, CD46 분자는 4개의 N 말단 짧은 컨센서스 반복부(SCR: short consensus repeat) 모듈("수시(Sushi)" 도메인: 1-3, 2-4 연결부 토플로지에의 4개의 시스테인)을 포함하는데, 여기서, 상기 SCR 도메인은 상기 유전자의 처음 6개의 엑손에 의해 코딩된다. SCR2, 3, 및 4 모듈은 (하기 논의되는) C3b/C4b 결합 및 조절 활성을 가지는 반면, SCR4로부터 원위측에 있는 SCR1 모듈 및 서열은 보체 조절 기능에는 필수적인 것은 아니다. 선택적으로 사용되는 엑손 7-9 뿐만 아니라, 엑손 10에 의해 코딩되는, 막 근위부의 세포외 서열은 주로 O 연결된 탄수화물을 통해 고농도로(heavily) 당화된다.

[0043]

본 개시내용의 목적을 위해, "CD46"이라는 용어는 문맥상 달리 언급되지 않는 한, 임의의 스플라이스 변이체 또는 이의 면역반응성 단편을 비롯한, 바로 앞에서 기술된 바와 같은 임의의 단백질 뿐만 아니라, 상기 단백질, 스플라이스 변이체 또는 단편을 코딩하는 임의의 핵산 서열을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 논의되는 바와 같이, "CD46 마커"는 광범위하게 CD46을 구성하거나, 그를 코딩하는 임의의 검출가능한 단백질, 웨티드 또는 핵산 서열을 포함할 것이다. 바람직한 실시양태에서, CD46 마커는 전장의 당단백질(변이체 A) 또는 스플라이스 변이체 또는 이의 면역반응성 단편을 포함할 것이다. 더욱더 바람직하게, CD46 단백질 마커는 선택된 종양발생 세포 집단의 세포 표면 상에 존재할 것이다. 다른 바람직한 실시양태에서, CD46 마커는 전장의 CD46, 스플라이스 변이체 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산 서열(예컨대, DNA 또는 mRNA)을 포함할 것이다.

[0044]

상기 언급된 변이체와 관련하여, 본 발명의 CD46 조절 인자는 CD46 분자의 단일 이소폼(즉, 스플라이스 변이체) 또는 염선된 몇몇의 이소폼과 반응하도록 제조되고 선택될 수 있거나, 또는 반대로, CD46 이소폼 중 대부분 또는 그 모두와 반응 또는 회합하는 범 CD46 조절 인자를 포함할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 더욱 구체적으로, 본원에 개시되고, 하기 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, 개시된 조절 인자, 예컨대, 항체는 그가(예컨대, 특정 엑손 연결부에서의) 단일 스플라이스 변이체에 의해 나타나는 도메인과, 또는 다중 또는 모든 CD46 이소폼 간에 보존되는 도메인(예컨대, 엑손 1-6)과 반응할 수 있도록 생성되고 선택될 수 있다. 이는 본 발명과 관련하여, 하기 실시예 5에 제시되어 있는 바와 같이, 특정 스플라이스 변이체가 바람직하게는 TIC 상에서 발현되는 것으로 밝혀졌고, 이는 종양발생 세포 빈도를 선택적으로 감소시킬 수 있고/거나, 암 줄기 세포 집단을 고갈시킬 수 있는 치료학적 표적으로서의 역할을 할 수 있다는 점에서 중요하다.

[0045]

다수의 생물학적 기능이 CD46에 기인하는 것인 임의의 이벤트에서, 그 중 다수는 면역계의 조절을 포함한다. CD46의 중요한 면역조절 기능으로는 고등 진핵생물의 선천성 면역 반응의 일부인 보체 단백질에 의한 손상으로부터 숙주 세포를 방어하는 보체 조절을 포함한다. 구체적으로, CD46은 보체 단백질 C3b 및 C4b의 인자 I 매개 단백질분해성 결단을 위한 보조인자이다. 이는 C3b를 불활성 단편으로 결단하는 분자인 C3 컨버타제를 활성화시켜 부적절한 보체 활성화로부터 방어하는 것으로 나타났다. 이의 선천성 면역에서의 역할 이외에도, CD46은 또한 후천성 면역 반응도 조절한다. CD46을 통한 신호전달에 의해 T 세포 증식, 및 항염증성 사이토카인인 IL-10을 다양으로 생산하는 것을 특징으로 하는, Tr1로 명명되는 특정 부류의 조절 T 세포로의 분화가 일어난다. 추가로, 정자가 CD46을 고수준으로 발현하는 바, CD46이 생식에, 아마도, 정자의 난모 세포의 융합에 관여한다고 제안된다. CD46은 또한 태반에서도 고도로 발현되는 것으로 보이며, 모체에 의한 면역 거부로부터 태아를 보호하는 역할도 할 수 있다.

[0046]

CD46은 적혈구 세포를 제외한, 대부분의 인간 정상 세포에 편재하여 발현되는 것으로 추가로 밝혀진 바 있다. 예를 들어, 상피 세포에서는 강하게 발현되고, 림프구 및 내피에서는 중간 정도로 발현되며, 다른 세포, 예컨대, 파골세포, 골세포, 간질 세포 및 근육 세포에는 약하게 발현된다고 보고된 바 있다. CD46이 광범위하게 발현되기 때문에, 다수의 인간 병원체는 감염에 대한 전구체로서 세포에의 결합을 위한 수용체 또는 공동 수용체로서 CD46을 사용하여 전략법을 발달시켰다. 이러한 병원체로는 인간 헤르페스 바이러스 6, 홍역 바이러스, 아데노바이러스의 일부 혈청형, 및 공생균 중 네이세리아(*Neisseria*) 과의 병원성 종을 포함한다. 특정 레트로바이러스는 이의 표면 상에 CD46 모방체를 보유함으로써 보체 매개 면역을 회피한다고 여겨진다(문헌 [Stoiber et al., Molecular Immunology 2005]; [Saifuddin et al., J Gen Virol, 1997]).

[0047]

CD46은 또한 자가면역 장애, 예컨대, 다발성 경화증(MS: multiple sclerosis)을 비롯한, 다수의 질환에 연루되어 있다. MS는 신경 축삭을 절연하는 수초 단백질에 대한 자가면역 반응이 증가하여 탈수초화가 일어난 후, 상기 세포에 의한 전도가 감소하고, 그 결과, 신경계 장애 및 결함이 일어나는 만성 염증성 질환이다. MS는 뇌 및

척수의 백색질을 위협한다(경화증). 이는 면역학적, 유전적, 및 환경적 성분으로 구성된 복잡한 병인을 가진 복합병이며, 비록 수개의 기전에 관하여 연구되기는 하였지만, MS 발병기전에 관한 이해는 완전하지 못하다. T 세포 면역 및 염증을 조절하는 역할을 하기 때문에, CD46은 MS 발병기전에 관여하는 것으로 여겨진다. 더욱 구체적으로, 다발성 경화증에서는 CD46에 결함이 있거나, 저하되어 있으며, 상기 환자에서는 IL-10 생산이 심각하게 손상되어 있다는 것이 최근 데이터를 통해 밝혀졌다. 이러한 IL-10 생산 부족이 아마도 다발성 경화증 환자에서 관찰되는 염증에 참여할 수 있다(문헌 [A.L. Astier, *Immunology*. 2008 June; 124(2):149-154](이는 본원에서 참고로 포함된다)). 일부 경우에, 자가반응성 항CD46 항체가 상기 분자의 정상적인 기능을 손상시킬 수도 있다. 이들 항체가 예컨대, 본원에 기술된 것과 같은 조절 인자로서 작용하는 한, 상기 항체는 본 발명의 범주내 포함되고, 따라서, 사용될 수 있다.

[0048] CD46이 정상 세포상에 존재하는 것 이외에도, CD46 발현 수준은 특정 암에서 증가되어 있을 수 있다. 예를 들어, 유방암(문헌 [Thorsteinsson et al., *APMIS* 106:869-78 (1998)]; [Hofman et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 32:213-9 (1994)]); 결장/결장직장암(문헌 [Andrew et al., *Cancer Res.* 50:5225-30 (1990)]; [Koretz et al., *Br. J. Cancer* 68:926-31 (1993)]; [Juhl et al., *J. Surg. Oncol.* 64:222-30 (1997)]; [Bjorge et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 42:185-92 (1996)]); 폐암(문헌 [Varsano et al., *Clin. Exp. Immunol.* 113:173-82 (1998)]; [Varsano et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19:522-9 (1998)]); 난소암(문헌 [Bjorge et al., *Int. J. Cancer* 70: 14-25 (1997)]); 신장암(문헌 [Blok et al., *Lab. Invest.* 80:335-44 (2000)]; [Gorter et al., *Lab. Invest.* 74: 1039-49 (1996)]); 췌장암(문헌 [Juhl et al., *J. Surg. Oncol.* 64:222-30 (1997)]; 및 전립샘암(문헌 [Jarvis et al., *J. Allergy Clin. Immunol* 99 (NO.1, PART 2): S215 (1997)]; [Liu, *Cancer Res.* 60:3429-3434 (2000)])에서 CD46 발현이 상승되어 있는 것으로 보고된 바 있으며, 또한, PCT WO 02/18948; PCT WO 01/88537도 참조할 수 있다.

[0049] 상기 단백질이 최초로 기술된 이래, CD46에 대한 다수의 항체가 제조되었다. 그러한 항체로는 E4.3(CD46-SCR1)(문헌 [Sparrow et al., *Hum Immunol* 1983 7:1]); M177(CD46-SCR2)(문헌 [Seya et al., *J Immunol* 1990 145:238]); J4/48(CD46-SCR1)(문헌 [Pesando et al., *J Immunol* 1986 137:3689]); GB24(CD46-SCR3/4)(문헌 [Hsi et al., *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988 18:21]); H316(CD46-SCR1)(문헌 [Stern et al., *J Immunol* 1986 137: 1604]); MH61(CD46-SCR3)(문헌 [Okabe et al., *Fertil Steril* 1990 54:1121]); TRA-2-10(CD46-SCR1)(문헌 [Cho et al., *Clin Exp Immunol* 1991 83:257]); MCI20.6(CD46-SCR1)(문헌 [Naniche et al., *J Virol* 1993 67:6025]); 158.2A5(문헌 [Vilella et al.]); 197.2B1(문헌 [Vilella et al.]); 및 MPA7(U.S.P.N. 제7,744,878호)(상기 문헌들은 각각 본원에서 참고로 포함된다)을 포함한다. 일반적으로, 웹: http://prow.ncbi.nih.gov/guide/2027814670_g.htm 상의 [Loveland et al., *Prot Rev*]을 참조할 수 있다. 상기 언급된 목록에서 다수의 항체에 대한 반응성 짧은 컨센서스 반복부 도메인(SCR)을 제공한다.

III. 종양 개시 세포

[0051] 선행 기술의 임의의 교시와는 대조적으로, 본 발명은 종양 개시 세포, 및 특히, 종양 영구 세포를 표적화함으로써 신생물성 장애의 치료, 관리, 또는 예방을 촉진시키는 데 특히 유용한 CD46 조절 인자를 제공한다. 더욱 구체적으로, 앞서 명시된 바와 같이, 놀랍게도, 특히 종양 세포 서브집단은 CD46을 발현하고, 암 줄기 세포 자기 재생 또는 세포 생존에 중요한 모르포겐 신호전달의 국소적인 조화를 변형시킬 가능성이 있다는 것을 발견하게 되었다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, CD46의 조절 인자는 본 교시에 따라 종양 개시 세포 빈도를 감소시킴으로써 과증식성 질환의 치료 또는 관리를 촉진시키는 데 사용될 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 바, 종양 개시 세포(TIC)라는 용어는 종양 영구 세포(TPC; 즉, 암 줄기 세포 또는 CSC) 및 고도로 증식성인 종양 전구 세포(TProg로 명명된다), 둘 모두를 포함하는데, 이들은 모두 일반적으로는 멀크한 종양 또는 종괴의 독특한 서브집단(즉, 0.1-40%)을 포함한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 종양 영구 세포 및 암 줄기 세포라는 용어는 본원에서 등가이며, 상호교환적으로 사용될 수 있다. 대조적으로, TPC는 작은 개수의 단리된 세포를 수회에 걸쳐 이식함으로써(마우스를 통해 2회 이상 계대접종) 입증된 바, 종양 내에 존재하는 종양 세포 조성물의 발생을 완전하게 반복할 수 있고, 무한 자기 재생능을 가질 수 있다는 점에서 TProg와는 차이를 보인다. 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 적절한 세포 표면 마커를 사용하는 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)은 적어도 부분적으로는 단일 세포와 세포 응괴(즉, 이중체)를 구별할 수 있는 이의 능력에 기인하여 고도로 강화된 세포 서브집단(순도 > 99.5%)을 단리시키는 데 있어 신뢰할 만한 방법이다. 상기 기법을 사용함으로써 고도로 정제된 TProg 세포를 작은 세포 개수로 면역약화된 마우스에 이식하였을 때, 1차 이식조직에서 종양 성장을 가속화시킬 수 있다. 그러나, 정제된 TPC 서브집단과는 달리, TProg 생성된 종양은 표현형상 세포 이질성에 있어 모체 종양을 완전하게 반영하지 못하고, 후속 이식조직에서 연속적인 종양발생을 재개시함

에 있어 명백히 비효율적이다. 그에 반해, TPC 서브집단은 모체 종양의 세포 이질성을 완전하게 재구성하고, 연속하여 단리되고, 이식되었을 때, 종양을 효율적으로 개시할 수 있다. 따라서, 비록 TPC 및 TProg, 둘 모두 1차 이식조직에서 종양을 생성할 수 있기는 하지만, 그 둘 사이의 결정적인 차이는 작은 세포 개수로 연속하여 이식되었을 때, 이질성 종양 성장을 영속적으로 가속화시킬 수 있는 TPC의 독특한 능력이라는 것을 당업자는 이해할 것이다. 비록 마커 발현이 배양 조건 및 시험관내 세포주 계대집중에 따라 변할 수는 있지만, TPC의 특징을 규명하는 다른 일반적인 접근법으로는 형태학적 성질과 세포 표면 마커, 전사 프로파일, 및 약물 반응 조사를 포함한다.

[0053]

따라서, 본 발명의 목적을 위해, 정상적인 조직에서 세포 계층을 지지하는 정상적인 줄기 세포와 같이, 종양 영구 세포는 바람직하게, 다계통 분화능은 유지하면서, 무한대로 자기 재생할 수 있는 이의 능력에 의해 정의된다. 따라서, 종양 영구 세포는 종양원성 자손(즉, 종양 개시 세포: TPC 및 TProg) 및 비종양발생(NTG) 자손, 둘 모두를 생성할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 비종양발생 세포(NTG)란 종양 개시 세포로부터 발생되기는 하지만, 그 스스로 자기 재생능을 가지고 있지 않거나, 또는 종양을 포함하는 종양 세포의 이질성 계통을 가지지 않는 종양 세포를 의미한다. 실험상, NTG 세포는 심지어 과량의 세포 개수로 이식된 경우에도 마우스에 재현가능하게 종양을 형성하지 못한다.

[0054]

언급한 바와 같이, TProg는 또한 마우스에서 종양을 생성할 수 있는 이의 제한된 능력에 기인하여 종양 개시 세포(또는 TIC)로 분류된다. TProg는 TPC의 자손이며, 이는 전형적으로 한정된 회수의 비자기 재생 세포 분열을 할 수 있다. 또한, TProg 세포는 추가로 조기 종양 전구 세포(ETP: early tumor progenitor cell) 및 후기 종양 전구 세포(LTP: late tumor progenitor cell)로 나누어질 수 있는데, 이들은 각각 표현형(예컨대, 세포 표면 마커) 및 종양 세포 구조의 발생을 반복할 수 있는 상이한 능력에 의해 구별될 수 있다. 상기와 같은 기술상의 차이에도 불구하고, ETP 및 LTP, 둘 모두 일반적으로는 작은 세포 개수로 이식되었을 때에 종양 세포를 연속하여 재구성할 수 있는 능력은 더 작고, 전형적으로는 모체 종양의 이질성을 반영하지 못한다는 점에서 TPC와 기능적으로 차이가 난다. 상기와 같은 차이에도 불구하고, 다양한 TProg 집단은 드물게는, 보통 줄기 세포에 기인하는 자기 재생능을 획득할 수 있고, 그 스스로 TPC(또는 CSC)가 될 수 있다는 것 또한 밝혀졌다. 어느 경우에든, 두 유형의 종양 개시 세포 모두 단일 환자의 전형적인 종양 종괴에서 나타날 수 있고, 본원에 개시된 바와 같이, 조절 인자를 이용한 치료의 대상이 된다. 즉, 개시된 조성물은 일반적으로 종양에서 나타나는 믹스 또는 특정 실시양태와는 상관없이 상기 CD46 양성 종양 개시 세포의 빈도를 감소시키거나, 이의 화학적감작성을 변경시키는 데 효과적이다.

[0055]

본 발명과 관련하여, TPC는 벌크한 종양을 포함하는 TProg(ETP 및 LTP, 둘 모두), NTG 세포 및 종양 침윤성 비TPC 유래 세포(예컨대, 섬유아세포/기질, 내피 & 조혈 세포)보다 종양발생성이 더 크고, 상대적으로 휴지성이 더 크며, 대개는 화학 내성이 더 크다. 종래 치료법 및 요법이 주로는 종양의 용적을 축소시키기 위해, 및 빠르게 증식하는 세포를 공격하기 위해, 이 두 목적을 위해 디자인된 것임을 고려해 볼 때, TPC는 보다 빠르게 증식하는 TProg 및 다른 벌크한 종양 세포 집단보다도 종래 치료법 및 요법에 대하여 더 큰 내성을 떨 가능성을 가지고 있다. 추가로, TPC는 대개 예컨대, 다중 약물 내성 수송체 발현 증가, DNA 수복 기전 증진, 및 항아포프토시스 단백질과 같은, 종래 치료법에 대해 상대적으로 화학 내성을 띠도록 만드는 다른 특징들을 나타낸다. 이러한 특성들은 각각 TPC에 의한 약물 저항성에 대한 원인이 되는데, 이러한 특성이 진행성 병기의 신생물을 가진 대부분의 환자에 대해 장기간에 걸쳐 확실하게 이익이 될 수 있는 표준 종양학적 치료 요법을 실패로 만드는, 즉, 계속하여 종양 성장 및 재발을 가속화시키는 세포(즉, TPC 또는 CSC)를 적절하게 표적화하지 못하고, 근절시키지 못하는 주요 원인이 되는 것으로 여겨지다.

[0056]

상기 언급한 다수의 종래 기술의 치료법과는 달리, 본 발명의 신규한 조성물은 바람직하게는 선택된 조절 인자의 형태 또는 특이 표적(예컨대, 유전 물질, CD46 또는 CD46 리간드)과는 상관없이, 피험체에 투여시 종양 개시 세포의 빈도를 감소시킨다. 상기 언급한 바와 같이, 종양 개시 세포 빈도는 a) 종양 개시 세포의 제거, 고갈, 감작, 침목화 또는 억제; b) 종양 개시 세포의 성장, 확장 또는 재발의 제어; c) 종양 개시 세포의 개시, 전파, 유지, 또는 증식 방해; 또는 d) 다르게는, 종양발생 세포의 생존, 재생 및/또는 전이 방해의 결과로서 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 개시 세포 빈도는 하나 이상의 생리학적 경로 변화의 결과로서 감소될 수 있다. 종양 개시 세포의 감소 또는 제거에 의해서든, 또는 이의 잠재능(예컨대, 분화 유도, 니치 파괴)의 변형에 의해서든, 또는 다르게는 종양 환경 또는 다른 세포에 대해 영향을 미칠 수 있는 이의 능력 방해에 의해서든 간에, 경로 변화는 결국 종양발생, 종양 유지 및/또는 전이 및 재발을 억제시킴으로써 CD46과 관련된 장애가 보다 효과적으로 치료될 수 있도록 한다.

[0057]

상기와 같은 종양 개시 세포의 빈도 감소를 평가하는 데 사용될 수 있는 방법 중에는 시험관내 또는 생체내 제

한 회석 분석을 진행한 후, 바람직하게는 푸아송 분포 통계를 사용하여 계산하거나, 생체내에서 종양을 생성할 수 있거나, 없는 능력과 같은, 기정의된 결정적 이벤트의 빈도를 평가하는 것이 있다. 상기와 같은 제한 회석 분석이 종양 개시 세포 빈도 감소를 계산하는 데 있어 바람직한 방법이지만, 비록 정확도면에 있어서 약간 떨어지기는 하여도 다른 부담이 덜 한 방법 또한 원하는 값을 효과적으로 측정하는 데 사용될 수 있고, 이는 본원의 교시와 전적으로 화합성이다. 따라서, 당업자가 이해하는 바와 같이, 주지된 유세포 분석 또는 면역조직화학적 수단을 통해 빈도 값의 감소를 측정할 수도 있다. 상기 언급된 모든 방법과 관련하여, 예를 들어, 문헌 ([Dylla et al. 2008, PMCID: PMC2413402] & [Hoey et al. 2009, PMID: 19664991])(이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)을 참조할 수 있다.

[0058] 제한 회석 분석과 관련하여, 종양 개시 세포 빈도의 시험관내 계산은 (예컨대, 각각 처리된 및 비처리된 종양으로부터) 분획된 또는 미분획된 인간 종양 세포를, 콜로니 형성을 조성하는 시험관내 성장 조건으로 침착시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 방식으로, 간단하게 콜로니를 계수하고 이의 특징을 규명함으로써, 또는 예를 들어, 인간 종양 세포를 일련으로 회석하여 플레이트로 침착시키고, 플레이팅 후 10일 이상의 시간이 경과한 후, 콜로니 형성에 대해 양성 또는 음성인 것으로 각 웰을 점수화하는 것으로 이루어진 분석법에 의해 콜로니 형성 세포를 계산할 수 있다. 일반적으로 종양 개시 세포 빈도를 측정할 수 있는 그 능력에 있어서 보다 정확한 것인 생체내 제한 회석 실험 또는 분석은 비처리 대조군 또는 처리된 조건으로부터의 인간 종양 세포를 예를 들어, 일련으로 회석하여 면역약화된 마우스에 이식시킨 후, 이식 후 60일 이상의 시간이 경과한 후, 종양 형성에 대해 양성 또는 음성인 것으로 각 마우스를 점수화하는 것을 포함한다. 시험관내 또는 생체내 제한 회석 분석에 의한 세포 빈도 값은 바람직하게는 푸아송 분포 통계를 양성 및 음성 이벤트의 공지 빈도에 적용시켜 양성 이벤트의 정의를 준수하는 이벤트에 대한 빈도를 제공함으로써 도출할 수 있는데; 양성 이벤트인 경우, 시험관내 또는 생체내에 있어서 이들은 각각 콜로니 또는 종양 형성이다.

[0059] 종양 개시 세포 빈도를 계산하는 데 사용될 수 있는 본 발명과 화합성인 다른 방법과 관련하여, 가장 보편적인 것으로는 정량가능한 유세포 분석 기법 및 면역조직화학적 염색 방법을 포함한다. 바로 앞에서 기술된 제한 회석 분석 기법만큼 정확한 것은 아니지만, 상기 방법은 훨씬 덜 노동 집약적이고, 상대적으로 단기간에 적당한 값을 제공한다. 따라서, 당업자는 종양 개시 세포에 대해 풍부한 것으로 공지된, 당업계에 알려져 있는 세포 표면 단백질(예컨대, 잠재적으로 화합성인 마커는 하기 실시예 1에 기술되어 있다)에 결합하는 하나 이상의 항체 또는 시약을 사용하는 유세포 분석 세포 표면 마커 프로파일 측정을 사용하여, 다양한 시료로부터 TIC 수준을 측정할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 추가의 또 다른 화합성 방법에서, 당업자는 상기 세포들의 경계를 구분하는 것으로 여겨지는 세포 표면 단백질에 결합할 수 있는 하나 이상의 항체 또는 시약을 사용하여 면역조직화학법에 의해 계내(즉, 조직 절편)에서 TIC 빈도를 계산할 수 있다.

[0060] 이어서, 상기 언급된 방법들 중 임의의 것을 사용함으로써, 본원의 교시에 따라 개시된 CD46 조절 인자에 의해 제공되는 TIC(또는 그안의 TPC)의 빈도 감소를 정량화할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 화합물은 (제거, 분화 유도, 니치 파괴, 침목화 등을 비롯한, 상기 언급된 다양한 기전에 의해) TIC의 빈도를 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 만큼 또는 심지어는 35% 만큼 감소시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, TIC의 빈도는 대략 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65% 감소될 수 있다. 특정 실시양태에서, 개시된 화합물은 TIC의 빈도를 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 만큼 또는 심지어는 95% 만큼 감소시킬 수 있다. 물론, 임의의 TIC 빈도 감소가 가능하게는 그에 상응하여 종양발생, 신생물 지속, 재발, 및 침습을 감소시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

IV. CD46 조절 인자

[0062] 어느 경우에서든, 본 발명은 악성 종양과 관련된 다수의 CD46 중 어느 하나의 진단, 치료 및/또는 예방을 위한, CD46 길항체를 비롯한, CD46 조절 인자의 용도에 관한 것이다. 개시된 조절 인자는 단독으로, 또는 매우 다양한 항암 화합물, 예컨대, 화학요법제 또는 면역치료제 또는 생물학적 반응 개질제와 함께 사용될 수 있다. 다른 선택된 실시양태에서, 2가지 이상의 별개의 CD46 조절 인자는 증진된 항신생물성 효과를 제공하기 위해 조합하여 사용될 수 있거나, 다중특이성 구성체를 제작하기 위해 사용될 수 있다.

[0063] 특정 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 웨티드 또는 폴리웨티드를 포함할 것이다. 더욱더 바람직하게, 조절 인자는 가용성 CD46(sCD46) 또는 이의 형태, 변이체, 유도체 또는 단편, 예를 들어, CD46 융합 구성체(예컨대, CD46-Fc, CD46-표적화 모이어티 등) 또는 CD46-접합체(예컨대, CD46-PEG, CD46-세포독성체, CD46-brm 등)를 포함할 것이다. 다른 실시양태에서, CD46 조절 인자는 항체(예컨대, 항CD46 mAb) 또는 이의 면역반응성 단편 또는 유도체를 포함한다는 것 또한 이해할 것이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 중화 항체 또는 이의 유도체 또는 단편을 포함할 것이다. 다

른 실시양태에서, CD46 조절 인자는 내재화 항체를 포함할 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, CD46 조절 인자는 고갈 항체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 언급한 융합 구성체와 마찬가지로, 상기 항체 조절 인자는 선택된 세포독성제, 중합체, 생물학적 반응 개질제(BRM: biological response modifier) 등에 접합되거나, 연결되거나, 또는 다르게는 회합됨으로써 다양한 (및 임의로 다중의) 작용 기전을 가진 지향성 면역요법을 제공할 수 있다. 추가의 다른 실시양태에서, 조절 인자는 유전자 수준에서 작용할 수 있고, 안티센스 구성체, siRNA, 마이크로RNA 등과 같은 화합물을 포함할 수 있다.

[0064] 개시된 CD46 조절 인자는 예를 들어, CD46 조절 인자의 형태, 임의의 관련된 페이로드 또는 전달을 위한 투여 및 전달 방법에 따라, 선택된 경로를 작용시키거나 길항시키는 것, 또는 특정 세포를 제거하는 것을 비롯한 다양한 기전을 통해 종양 세포, 특히, TPC, 및/또는 관련된 신생물을 고갈시키거나, 제거하거나, 억제시킬 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 따라서, 본원에 개시된 바람직한 실시양태는 특이적인 종양 세포 서브집단, 예컨대, 종양 영구 세포의 고갈, 억제 또는 침묵화이지만, 그러한 실시양태는 단지 예시적인 것이고, 어떤 의미로든 제한하는 것이 아니라는 것이 강조되어야 한다. 오히려, 첨부된 특허청구범위에 기술되어 있는 바와 같이, 본 발명은 광범위하게는 어느 특정 기전 또는 표적 종양 세포 집단과는 상관없이 CD46 조절 인자, 및 다양한 CD46 매개 과증식성 장애의 치료, 관리, 또는 예방에서의 이의 용도에 관한 것이다.

[0065] 같은 의미에서, 본 발명의 개시된 실시양태는 하나 이상의 CD46 길항제를 포함한다. 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 CD46 길항제는 CD46 단백질 또는 이의 단편을 인식하거나, 그와 반응하거나, 그와 결합하거나, 그와 경쟁하거나, 그와 회합하거나, 또는 다르게는 그와 상호작용하고, 종양 개시 세포 또는 벌크한 종양 또는 NTG 세포를 비롯한 다른 신생물성 세포의 성장을 제거하거나, 침묵화시키거나, 감소시키거나, 억제시키거나, 방해하거나, 저지하거나 또는 제어하는 임의의 리간드, 폴리펩티드, 웨프티드, 융합 단백질, 항체 또는 이의 면역학적으로 활성인 단편 또는 유도체를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 선택된 실시양태에서, CD46 조절 인자는 CD46 길항제를 포함한다.

[0066] 본원에서 사용되는 바, 길항제란 수용체의 리간드에의 결합, 또는 효소와 기질의 상호작용을 비롯한, 특정의 또는 언급된 단백질의 활성을 중화, 차단, 억제, 파괴, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 의미한다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 길항제는 항체 및 이의 항원 결합 단편 또는 유도체, 단백질, 웨프티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 다당류, 올리고당, 핵산, 안티센스 구성체, siRNA, miRNA, 생체유기 분자, 웨프티드 모방체, 약학 제제 및 이의 대사산물, 전사 및 번역 제어 서열 등을 포함할 수 있다. 길항제는 또한 소분자 억제제, 융합 단백질, 수용체 분자 및 상기 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 기질 표적에의 이의 결합을 격리시키는 유도체, 상기 단백질의 길항제 변이체, 상기 단백질에 대한 안티센스 분자, RNA 압타머, 및 상기 단백질에 대한 리보자임을 포함할 수 있다.

[0067] 본원에서 사용되고, 2가지 이상의 분자 또는 화합물에 적용되는 바, 인식한다 또는 특이적으로 인식한다라는 용어는 한 분자가 다른 한 분자에 대해 효과를 발휘할 수 있는 방식의, 공유 또는 비공유적인 분자의 반응, 결합, 특이적인 결합, 조합, 회합, 상호작용, 연결, 연관, 연합, 융합, 합병 또는 접합을 의미하는 것으로 간주되어야 한다.

[0068] 또한, 본원 실시예에서 입증된 바와 같이, 특정 경우에, 인간 CD46의 일부 조절 인자는 인간 이외의 종(예컨대, 뮤린)으로부터 유래된 CD46과 교차 반응할 수 있다. 다른 경우에, 예시적인 조절 인자는 인간 CD46의 하나 이상의 이소폼에 대해 특이적일 수 있고, 다른 종으로부터 유래된 CD46 오르토로그와의 교차 반응성을 보이지 않을 것이다.

[0069] 어느 경우에는 든, 개시된 조절 인자는 접합된 형태 또는 접합되지 않은 형태로 사용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 즉, 조절 인자는 약학적으로 활성인 화합물, 생물학적 반응 개질제, 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 진단학적 모이어티 또는 생체화합성 개질제와 (예컨대, 공유적으로 또는 비공유적으로) 회합하거나, 또는 이에 접합될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 접합체는 웨프티드, 폴리펩티드, 단백질, 융합 단백질, 핵산 분자, 소분자, 모방체 작용제, 합성 약물, 무기 분자, 유기 분자 및 방사성 동위원소를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 상기 언급한 바와 같이, 선택된 접합체는 적어도 부분적으로는 접합을 일으키는 데 사용되는 방법에 따라 다양한 몰비로 공유적으로 또는 비공유적으로 조절 인자에 연결될 수 있다.

[0070] V. 항체

[0071] a. 개요

[0072] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명의 특히 바람직한 실시양태는 항체 형태의 CD46 조절 인자를 포함한다. 본원에

서 항체라는 용어는 가장 광범위한 의미로 사용되며, 이는 구체적으로 합성 항체, 단일클론 항체, 올리고클론 또는 다중클론 항체, 다클론 항체, 재조합적으로 생산된 항체, 인트라바디, 다중특이성 항체, 이특이성 항체, 1가 항체, 다가 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 영장류화된 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 단일쇄 FvFc(scFvFc: single-chain Fv), 단일 쇄 Fv(scFv: single-chain Fv), 항이디오타입(항Id: anti-idiotypic) 항체, 및 원하는 생물학적 활성(즉, CD46 회합 또는 결합)을 보이는 한, 임의의 다른 면역학적으로 활성인 항체 단편을 포함한다. 보다 더 광범위한 의미에서, 본 발명의 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 단편, 즉, 항원 결합부를 포함하는 분자를 포함하며, 여기서, 상기 단편은 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는 또 다른 면역글로불린 도메인에 융합되거나, 또는 융합되지 않을 수 있다. 추가로, 본원에서 더욱 상세하게 설명되어 있는 바와 같이, 항체 및 항체들이라는 용어는 구체적으로 여기에서 설명되는 바와 같은, 임의로 1 이상의 아미노산 잔기 변형을 포함하고, 면역글로불린의 면역학적으로 활성인 단편에 융합된, 전장의 항체 및 Fc 영역을 포함하는 변이체 Fc 융합물, 또는 이의 단편을 비롯한 Fc 변이체를 포함한다.

[0073] 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 항체 또는 면역글로불린이라는 일반 용어는 생화학적으로 구별될 수 있고, 이의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 적절한 부류로 쉽게 지정될 수 있는 5가지의 별개 부류의 항체를 포함한다. 역사적 이유에서, 주요 부류의 무순상 항체는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM으로 명명된다. 인간에서, IgG 및 IgA 부류는 구조 및 특정의 생화학적 특성에 따라 알려진 서브부류(이소형), 즉, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 인간에서 IgG 이소형은 혈청 중의 이의 존재량의 순서대로 명명되는데, IgG1이 가장 풍부하게 존재한다는 것을 이해할 것이다.

[0074] 항체의 5가지 부류 모두(즉, IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM) 및 이소형 모두(즉, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 뿐만 아니라, 이의 변이체가 본 발명의 범주 내에 포함되며, IgG 부류의 면역글로불린을 포함하는 바람직한 실시양태는 단지 설명 목적으로 좀 더 상세하게 논의될 것이다. 그러나, 그러한 개시내용은 단지 예시적인 조성물 및 본 발명을 실시하는 방법을 증명하는 것이며, 어느 방식으로든 본 발명의 범주 또는 그에 첨부된 특허청구범위를 제한하고자 하는 것은 아니라는 것을 이해할 것이다.

[0075] 이와 관련하여, 인간 IgG 면역글로불린은 분자량이 대략 23,000 달톤인 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드, 및 이소형에 따라 분자량이 53,000-70,000인 2개의 동일한 중쇄를 포함한다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 상응하는 소문자 그리스 문자 α , δ , ϵ , γ , 및 μ 로 표시된다. 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 명명되는, 뚜렷이 다른 2개의 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 당업자는 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배열이 주지되어 있음을 이해할 것이다.

[0076] 4개의 쇄가 Y 배열로 이황화 결합에 의해 연결되어 있는데, 여기서, 경쇄는, Y의 입구(mouth)에서 출발하여 가변 영역을 거쳐 Y의 이중 말단으로까지 계속하여 이어지는 중쇄를 브래킷화하고 있다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 이황화 결합에 의해 중쇄에 연결되어 있는 반면, 헌지 영역의 2개의 이황화 결합은 중쇄를 연결한다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 IgG의 이소형에 기초하여 달라질 수 있는 개수로 일정하게 이격되어 있는 쇄간 이황화 브릿지를 가지고 있다.

[0077] 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인(V_H)에 이어서 다수의 불변 도메인을 가진다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에는 가변 도메인(V_L)을, 그리고, 이의 나머지 다른 한쪽 말단에는 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 이와 관련하여, 경쇄(V_L) 및 중쇄(V_H) 부위, 둘 모두의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것을 이해할 것이다. 대조적으로, 경쇄(C_L) 및 중쇄(C_H1 , C_H2 또는 C_H3)의 불변 도메인은 중요한 생물학적 특성, 예컨대, 분비, 경태반 이동, 순환 반감기, 보체 결합 등을 부여하고, 조절한다. 관례상, 불변 영역 도메인은 항체의 항원 결합부 또는 아미노 말단으로부터 더 원거리에 있을수록 그 번호는 증가한다. 따라서, 항체의 아미노 또는 N 말단은 가변 영역을 포함하고, 카복시 또는 C 말단은 불변 영역을 포함한다. 따라서, C_H3 및 C_L 도메인은 실제로 각각 중쇄 및 경쇄의 카복시 말단을 포함한다.

[0078] 가변이라는 용어는 가변 도메인 중의 특정 부위가 면역글로불린 간에 서열에 있어 광범위하게 차이가 나고, 이들 쟁점 부위가 대개 특정 항체의 결합 및 특이성 특징을 정의한다는 사실을 의미한다. 이들 초가변 부위는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 둘 모두에서 각각 상보성 결정 영역(CDR: complementarity determining region)으로 알려져 있는 3개의 세그먼트로 그 모습을 드러낸다. CDR 측면에 위치하는, 가변 도메인의 더욱 고도로 보존되는

부위는 골격 영역(FR: framework region)으로 명명된다. 더욱 구체적으로, 천연적으로 발생된 단량체 IgG 항체에서, 항체의 각 아암에 존재하는 6개의 CDR은, 수성 환경에서는 항체가 이의 3차원 배열을 취하는 바, 항원 결합부를 형성하기 위해 특이적으로 배치되는 짧은, 비연속 아미노산 서열이다.

[0079] 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 나머지 부분을 포함하는 골격 영역은 아미노산 서열에서 보다 작은 문자간 가변성을 나타낸다. 오히려, 골격 영역은 대개 β 쉬트 입체형태를 취하고, CDR은 β 쉬트 구조의 일부를 연결하거나, 일부 경우에는 그를 형성하는 루프를 형성한다. 따라서, 이러한 골격 영역은 CDR이 쇄간 비공유 상호작용에 의해 올바른 배향으로 배치되도록 하는 스캐폴드를 형성하는 역할을 한다. 배치된 CDR에 의해 형성된 항원 결합부가 면역반응성 항원(즉, CD46) 상의 에피토프에 대해 상보적인 표면을 정의한다. 이러한 상보적인 표면이 항체의 면역반응성 항원 에피토프에의 비공유 결합을 촉진시킨다. CDR의 위치는 당업계의 숙련가에 의해 쉽게 확인될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0080] 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 모두 또는 그 일부는 표준 재조합 및 발현 기법을 사용하여 재조합 또는 조작됨으로써 유효 항체를 제공할 수 있다. 즉, 제1 항체(또는 이의 임의 부위)로부터의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 제2 항체로부터의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역의 임의의 선택된 부위와 혼합하고 매치시킬 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제1 항체의 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 전체 경쇄 가변 영역을 제2 항체의 3개의 중쇄 CDR을 포함하는 전체 중쇄 가변 영역과 쌍을 형성하여 작동 항체를 제공할 수 있다. 또한, 다른 실시양태에서, 다양한 항체로부터 유래된 개별 중쇄 및 경쇄 CDR을 혼합하고 매치시켜 최적화된 특징을 가지는 원하는 항체를 제공할 수 있다. 따라서, 예시적인 항체는 제1 항체로부터의 3개의 경쇄 CDR, 제2 항체로부터 유래된 2개의 중쇄 CDR 및 제3 항체로부터의 세번째 중쇄 CDR을 포함할 수 있다.

[0081] 더욱 구체적으로, 본 발명과 관련하여, 도 11b의 개시된 중쇄 및 경쇄 CDR 중 임의의 것을 상기 방식으로 재조합함으로써 본 발명의 교시에 따른 최적화된 항CD46(예컨대, 항CD46) 항체를 제공할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0082] 어느 경우에서도든, 상보성 결정 영역 잔기 번호는 문헌 [Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)]의 것에 따라 정의될 수 있으며, 구체적으로, 경쇄 가변 도메인에서는 잔기 24-34(CDR1), 50-56(CDR2) 및 89-97(CDR3)이고, 중쇄 가변 도메인에서는 31-35(CDR1), 50-65(CDR2) 및 95-102(CDR3)이다. CDR은 항체마다 상당히 다르다는 것(그리고, 정의상 카바트(Kabat) 컨센서스 서열과 상동성을 보이지 않을 것이다)에 주의한다. 골격 잔기가 최대로 정렬되도록 하기 위해서는 빈번하게는 번호매김 체계에서 스페이서 잔기 삽입을 Fv 영역에 대하여 사용하여야 한다. 추가로, 종간 또는 대립유전자 차이에 기인하여 임의의 주어진 카바트 부위 번호에서 특정의 개별 잔기의 정체는 항체 쇄마다 달라질 수 있다. 또한, 문헌 ([Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)] 및 [MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745(1996)]) (여기서, 서로에 대해 비교하는 경우, 정의는 중복 또는 서브세트 아미노산 잔기를 포함한다)을 참조할 수 있다. 상기 언급된 각각의 참고 문헌은 이의 전문이 본원에 참고로 포함되고, 각각의 상기 인용된 참고 문헌들에 의해 정의되는 바와 같은 CDR을 포함하는 아미노산 잔기는 비교를 위해 기술된다.

CDR 정의

	카바트 ¹	코티아 ²	매캘럼 ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹잔기 번호매김은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌 동일]의 명명법을 따른 것이다.

²잔기 번호매김은 문헌 [Chothia et al., 상기 문헌 동일]의 명명법을 따른 것이다.

³잔기 번호매김은 문헌 [MacCallum et al., 상기 문헌 동일]의 명명법을 따른 것이다.

[0083]

[0084] 비록 본 출원의 컨텐츠가 주어진다면, 당업자는 각각의 중쇄 및 경쇄 서열에 대한 CDR을 문헌 [Kabat et al.] 또는 문헌 [MacCallum et al.]에 의해 정의된 바와 같이 쉽게 확인하고 열거할 수 있지만, 편의상, 도 11b에 제시되어 있는 CDR은 문헌 [Chothia et al.]의 명명법을 사용하여 정의한다. 이와 관련하여, 문헌 [Kabat et

a1.]에 의해 정의된 CDR을 실시에 16에 기술된 인간화 분석을 위해 사용하였고, 인간화된 항체 서열을 도시하는 것이 도 13a 및 13b에서는 밑줄로 표시되어 있다. 따라서, 상기의 모든 명명법에 의해 정의된 CDR을 포함하는 항체는 명백하게 본 발명의 범주 내에 포함된다. 더욱 광범위하게, 가변 영역 CDR 아미노산 잔기라는 용어는 상기 기술된 임의의 서열 또는 구조 기반 방법을 사용하여 확인되는 바와 같은 CDR의 아미노산을 포함한다.

[0085] 본원에서 사용되는 바, 가변 영역 콜격(FR) 아미노산 잔기라는 용어는 Ig 쇄의 콜격 영역의 아미노산을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, 콜격 영역 또는 FR 영역이라는 용어는 가변 영역의 일부이기는 하지만, (예컨대, 카바트의 CDR 정의를 사용하였을 때), CDR의 일부는 아닌 것인 아미노산 잔기를 포함한다. 그러므로, 가변 영역 콜격은 길이가 약 100-120개 사이의 아미노산인 비연속 서열이지만, CDR 바깥쪽의 아미노산만을 포함한다.

[0086] 문헌 [Kabat et al.]에 의해 정의되는 바와 같이 CDR 및 중쇄 가변 영역이 구체적인 예에 대해서, 콜격 영역 1은 아미노산 1-30을 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고; 콜격 영역 2는 아미노산 36-49를 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고; 콜격 영역 3은 아미노산 66-94를 포함하는 가변 영역의 도메인에 상응하고; 콜격 영역 4는 아미노산 103 내지 가변 영역의 말단까지의 가변 영역의 도메인에 상응한다. 경쇄에 대한 콜격 영역은 유사하게 각각의 경쇄 가변 영역 CDR에 의해 분리되어 있다. 유사하게, 문헌 [Chothia et al.] 또는 문헌 [McCallum et al.]에 의한 CDR 정의를 사용하면, 콜격 영역 경계는 상기 기술되어 있는 바와 같이, 각각의 CDR 말단에 의해 분리되어 있다.

[0087] 상기 언급된 구조를 고려해 보았을 때, 본 발명의 항체는 다수의 기능적 실시양태 중 어느 하나를 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 이와 관련하여, 화합성 항체는 피험체에서 원하는 생리학적 반응을 제공하는 임의의 면역반응성 항체(상기 용어는 본원에 정의되어 있는 바와 같다)를 포함할 수 있다. 개시된 항체 중 임의의 것이 본 개시와 함께 사용될 수 있지만, 본 발명의 특정 실시양태는 키메라, 인간화된 또는 인간 단일클론 항체 또는 이의 면역반응성 단편을 포함할 것이다. 추가의 다른 실시양태는 예를 들어, 동종성 또는 이종성 다량체 구성체, Fc 변이체 및 접합된 또는 당화 방식으로 변경된 항체를 포함할 수 있다. 또한, 그러한 배열이 상호 배타적인 것은 아니며, 화합성인 개체 항체는 본원에 개시된 기능적 측면들 중 하나 이상을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 화합성 항체는 인간화된 가변 영역을 포함하는 단일 쇄 디아바디 또는 당화 패턴을 변경시켜 혈청 반감기를 조정하는 Fc 변형을 포함하는 완전 인간 전장의 IgG3 항체를 포함할 수 있다. 다른 예시적인 실시양태는 당업자에게 쉽게 자명해질 것이며, 본 발명의 범주 내에 포함된다는 것을 쉽게 알 수 있을 것이다.

b. 항체 생성

[0089] 주지되어 있는 바와 같이, 토끼, 마우스, 래트 등을 비롯한 다양한 숙주 동물을 접종하고 사용함으로써 본원의 교시에 따른 항체를 제공할 수 있다. 면역 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있는 것인, 당업계에 공지된 아주 번트로는 접종된 종에 따라서, 프로인트(Freund's)(완전 및 불완전), 미네랄 젤, 예컨대, 수산화알루미늄, 계면 활성 물질, 예컨대, 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다음이온, 웨პ티드, 오일 에멀젼, 키홀 림펫 해모시아닌, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 인간 애주번트 예컨대, BCG(바실레 칼메트 구에린: bacille Calmette-Guerin) 및 코리네박테리움 파르븀(*corynebacterium parvum*)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기와 같은 애주번트는 국소 침착물에 항원을 격리시킴으로써 항원이 빠르게 분산되지 못하도록 보호할 수 있거나, 또는 대식세포 및 면역계의 다른 성분들에 대하여 화학주성을 띠는 인자를 분비하도록 숙주를 자극시키는 물질을 함유 할 수 있다. 바람직하게, 폴리웨პ티드를 투여할 경우, 면역화 스케줄은 수주 간의 간격을 두고 진행되는 2회 이상의 폴리웨პ티드 투여를 포함할 것이다.

[0090] 선택된 스플라이스 변이체 및/또는 웨პ티드를 비롯한, CD46 면역원을 이용하여 동물을 면역화시킨 후, 당업계에 알려져 있는 기법을 사용하여 동물로부터 항체 및/또는 항체 생산 세포를 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 동물을 출혈시키거나, 희생시킴으로써 다중클론 항CD46 항체 합유 혈청을 수득한다. 혈청은 동물로부터 수득된 형태로 연구 목적을 위해 사용될 수 있거나, 또는 별법으로, 항CD46 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 정제함으로써 면역글로불린 분획 또는 동종성 항체 제제를 제공할 수 있다.

c. 단일클론 항체

[0092] 다중클론 항체가 본 발명의 특정 측면과 함께 사용될 수 있지만, 바람직한 실시양태는 CD46 반응성 단일클론 항체의 용도를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 단일클론 항체 또는 mAb라는 용어는 실질적으로 동종성인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미하며, 즉, 집단에 포함되어 있는 개별 항체들은 최소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예컨대, 천연적으로 발생된 돌연변이를 제외하면 동일한 것이다. 따라서, 단일클론이라는 수식

어는 상이한 항체로 이루어진 혼합물이 아니라는 항체의 특징을 의미하며, 이는 임의 유형의 항체와 함께 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 단일클론 항체는 CD46과 결합하거나, 회합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서, CD46 결합 폴리펩티드 서열은 복수개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 공정에 의해 수득되었다.

[0093] 바람직한 실시양태에서, 항체 생산 세포주는 면역화된 동물로부터 단리된 세포로부터 제조된다. 면역화 후, 동물을 희생시키고, 림프절 및/또는 비장 B 세포를 당업계에 주지된 수단에 의해 불멸화시킨다. 세포를 불멸화시키는 방법으로는 세포를 온코진으로 형질감염시키는 것, 세포를 종양원성 바이러스로 감염시키고, 불멸화된 세포를 선택할 수 있는 조건하에서 상기 세포를 배양하는 것, 세포를 발암성 또는 돌연변이화 화합물에 가하는 것, 세포를 불멸화된 세포, 예컨대, 골수종 세포와 융합시키는 것, 및 종양 억제 유전자를 불활성화시키는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 골수종 세포와의 융합을 사용할 경우, 골수종 세포는 바람직하게는 면역글로불린 폴리펩티드를 분비하지 않는다(비분비성 세포주). 불멸화된 세포는 CD46, 또는 이의 면역반응성 부위를 사용하여 스크리닝된다. 바람직한 실시양태에서, 초기 스크리닝은 효소 결합 면역검정법(ELISA: enzyme-linked immunoassay) 또는 방사선면역검정법을 사용하여 수행된다.

[0094] 더욱 일반적으로, 본 발명과 일치하는 별개의 단일클론 항체는 하이브리도마, 재조합 기법, 파지 디스플레이 기술, 효모 라이브러리, 트랜스제닉 동물(예컨대, 제노마우스(XenoMouse)[®] 또는 HuMAb 마우스(HuMAb Mouse)[®]) 또는 이의 일부 조합을 비롯한, 당업계에 공지된 매우 다양한 기법을 사용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 단일클론 항체는 예컨대, 상기에 광범위하게 기술되어 있고, 문헌 ([Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)])(이들 각각은 본원에 포함된다)에 더욱 상세하게 교시되어 있는 것과 같은 하이브리도마 기법을 사용함으로써 제조될 수 있다. 개시된 프로토콜을 사용하여, 바람직하게는 관련 항원 및 애주번트를 다회에 걸쳐 피하 또는 복강내 주사함으로써 포유동물에서 항체를 발생시킨다. 앞서 논의된 바와 같이, 이러한 면역화는 일반적으로 비장세포 또는 림프구로부터 (면역화된 동물이 트랜스제닉일 경우에는 완전한 인간 항체일 수 있는) 항원 반응성 항체 생산을 포함하는 면역 반응을 유도한다. 생성된 항체를 동물의 혈청으로부터 수거하여 다중클론 제제를 수득할 수 있는 반면, 일반적으로는 비장, 림프절 또는 말초 혈액으로부터 개별 림프구를 단리시켜 균질한 단일클론 항체 제제를 수득하는 것이 더욱 바람직할 수 있다. 가장 전형적으로는, 비장으로부터 림프구를 수득하고, 불멸화시켜 하이브리도마를 수득한다.

[0095] 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이, 선택 과정은 복수개의 클론, 예컨대, 하이브리도마 클론, 파지 클론, 또는 재조합 DNA 클론 풀로부터 유일의 클론을 선택하는 것일 수 있다. 예를 들어, 표적에 대한 친화성을 개선시키기 위해, 표적 결합 서열을 인간화시키기 위해, 세포 배양물 중에서의 이의 생산을 개선시키기 위해, 생체내에서의 이의 면역원성을 감소시키기 위해, 다중특이성 항체를 생산하기 위해서 등의 목적으로 선택된 CD46 결합 서열을 추가로 변경시킬 수 있고, 변형된 표적 결합 서열을 포함하는 항체 또한 본 발명의 단일클론 항체라는 것을 이해하여야 한다. 전형적으로 상이한 결정기(에피토프)에 대한 별개의 항체를 포함하는 것인 다중클론 항체 제제와는 달리, 단일클론 항체 제제의 각 단일클론 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대한 것이다. 이의 특이성 이외에도, 단일클론 항체 제제는 교차 반응성일 수 있는 다른 면역글로불린에 의해 전형적으로는 오염되지 않는다는 점에서 이롭다.

d. 키메라 항체

[0097] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 2가지 이상의 상이한 종 또는 유형의 항체로부터의 공유적으로 연결된 단백질 세그먼트로부터 유도된 키메라 항체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 키메라 항체라는 용어는, 중쇄 및/또는 경쇄 부위가 특정 종으로부터 유래되거나, 또는 특정 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체 중의 상응하는 서열과 동일하거나, 그와 상동성인 반면, 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나, 또는 또 다른 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체 뿐만 아니라, 원하는 생물학적 활성을 보이는 한은 상기 항체의 단편 중의 상응하는 서열과 동일하거나, 그와 상동성인 구성체에 대한 것이라는 것을 이해할 것이다(미국 특허 번호 제4,816,567호; 문헌 [Morrison et al" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]). 한 예시적인 실시양태에서, 본원의 교시에 따른 키메라 항체는 뮤린 V_H 및 V_L 아미노산 서열 및 인간 공급원으로부터 유래된 불변 영역을 포함할 수 있다. 다른 화합성인 실시양태에서, 본 발명의 키메라 항체는 하기 기술하는 바와 같은 CDR 이식된 또는 인간화된 항체를 포함할 수 있다.

[0098] 일반적으로, 키메라 항체를 제조하는 목적은 의도되는 피험체 종으로부터의 아미노산의 개수가 최대화된 키메라를 생성하고자 하는 것이다. 일례로, 항체가 특정 종으로부터 유래되거나, 또는 특정 항체 부류 또는 서브부류

에 속하는 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 반면, 항체 쇄(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래되거나, 또는 또 다른 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체 중의 상응하는 서열과 동일하거나, 그와 상동성인 것인 CDR 이식된 항체가 있다. 인간에서 사용하기 위해서는, 인간 항체의 천연적으로 발생된 가변 영역 또는 CDR을 대체하면서, 설치류 항체로부터의 가변 영역 또는 선택된 CDR을 인간 항체 내로 이식시킨다. 이러한 구성체는 일반적으로는 피험체에 의한 항체에 대한 원치않는 면역 반응을 감소시키면서, 완전한 강도의 조절 인자 기능(예컨대, CDC, ADCC 등)을 제공할 수 있다는 이점을 가진다.

[0099] e. 인간화된 항체

[0100] 인간화된 항체는 CDR 이식된 항체와 유사하다. 일반적으로, 인간화된 항체는 먼저 비인간 동물에서 유발된 단일 클론 항체로부터 생산된다. 본원에서 사용되는 바, 인간화된 형태의 비인간(예컨대, 뮤린) 항체는 비인간 면역 글로불린으로부터 유래된 서열을 최소로 포함하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화된 항체는 인간 면역글로불린(수령체 항체)의 CDR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성, 및/또는 능력을 가지는 비인간 종(공여체 항체), 예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 또는 비인간 영장류의 CDR로부터의 잔기로 대체된 것인 인간 면역글로불린(수령체 항체)이다.

[0101] 선택된 실시양태에서, 수용체 항체는 컨센서스 서열을 포함할 수 있다. 컨센서스 인간 골격을 생성하기 위해, 수개의 인간 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열로부터의 골격을 정렬하여 컨센서스 아미노산 서열을 확인할 수 있다. 또한, 여러 경우에 있어서, 인간 면역글로불린의 가변 도메인 중의 하나 이상의 골격 잔기는 공여체 항체로부터의 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 이러한 골격 치환은 예컨대, 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위한 CDR과 골격 잔기의 상호작용의 모델링, 및 특정 위치의 비정상적인 골격 잔기를 확인하기 위한 서열 비교에 의한 것과 같은 당업계에 주지된 방법에 의해 확인될 수 있다. 그러한 치환은 이식된 CDR(들)의 적절한 3차원 배열을 유지시키는 데 도움이 되고, 대개는 골격 치환이 없는 유사 구성체에 비하여 무한성을 개선시킨다. 추가로, 인간화된 항체는 수령체 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 추가로 항체 성능을 개선시키기 위해 주지된 기법을 사용하여 상기와 같이 변형시킬 수 있다.

[0102] CDR 이식 및 인간화된 항체는 예를 들어, U.S.P.N. 제6,180,370호, 제5,693,762호, 제5,693,761호, 제5,585,089호, 및 제5,530,101호에 기술되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항체는 1 이상의, 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함하게 되는데, 여기서, CDR 모두 또는 실질적으로 모두는 비인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 골격 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 임의로는 또한 적어도 면역글로불린 불변 영역(Fc) 부위, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명을 위해, 예컨대, 문헌 ([Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)])을 참조할 수 있다. 또한, 예컨대, 문헌 ([Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 U.S.P.N. 제6,982,321호 및 제7,087,409호)을 참조할 수 있다. 추가의 또 다른 방법은 인간공학법으로 지칭되는 것으로, 이는 예를 들어, U.S. 2005/0008625에 기술되어 있다. 본 출원의 목적을 위해, 인간화된 항체라는 용어는 골격 치환이 없거나, 최소한의 골격 치환을 포함하는 CDR 이식된 항체(즉, 하나 이상의 이식된 비인간 CDR을 포함하는 인간 항체)를 분명히 포함하는 것으로 간주될 것이다.

[0103] 추가로, 비인간 항CD46 항체는 또한 WO 98/52976 및 WO 00/34317에 개시된 방법에 의한 탈면역화 또는 인간 T 세포 에피토프의 특이적인 결실에 의해 변형될 수 있다. 간략하면, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 MHC II형에 결합하는 웨პ티드에 대하여 분석할 수 있으며; (WO 98/52976 및 WO 00/34317에 정의되어 있는 바와 같이) 이러한 웨პ티드는 잠재적인 T 세포 에피토프를 나타낸다. 잠재적인 T 세포 에피토프 검출을 위해, 웨პ티드 스레딩 (threading)이라 명명되는 컴퓨터 모델링 접근법이 적용될 수 있고, 추가로, WO 98/52976 및 WO 00/34317에 기술되어 있는 바와 같이, V_H 및 V_L 서열에 존재한 모티프에 대하여 인간 MHC II형 결합 웨პ티드의 데이터베이스를 검색할 수 있다. 이러한 모티프는 18개의 주요 MHC II형 DR 알로타입 중 임의의 것에 결합하고, 따라서, 잠재적인 T 세포 에피토프를 구성한다. 가변 영역 중 소수의 아미노산 잔기를 치환하거나, 또는 단일 아미노산 치환에 의해 검출된 잠재적인 T 세포 에피토프를 제거할 수 있다. 가능한 한, 보존적 치환을 수행한다. 대개는 베타적인 것은 아미지만, 인간 생식계열 항체 서열 중의 위치에 공통된 아미노산이 사용될 수 있다. 탈면역화 변화를 확인한 후, 돌연변이유발법 또는 다른 합성 방법(예컨대, 신생 합성, 카세트 대체 등)에 의해 V_H 및 V_L을 코딩하는 핵산을 구성할 수 있다. 임의로, 돌연변이화된 가변 서열을 인간 불변 영역에 융합시킬 수 있다.

[0104] 선택된 실시양태에서, 인간화된 항체 가변 영역 잔기의 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 80% 이상이 모체 골격 영역

(FR) 및 CDR 서열의 것과 일치할 것이다. 다른 실시양태에서, 인간화된 항체 잔기의 85% 또는 90% 이상이 모체 골격 영역(FR) 및 CDR 서열의 것과 일치할 것이다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 인간화된 항체 잔기의 95% 초과가 모체 골격 영역(FR) 및 CDR 서열의 것과 일치할 것이다.

[0105] 인간화된 항체는 본원에 기술된 바와 같은 일반 분자 생물학 및 생체 분자 공학 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법은 중쇄 또는 경쇄 중 1 이상으로부터의 면역글로불린 Fv 가변 영역 모두 또는 그 일부를 코딩하는 핵산을 단리시키고, 조작하고, 발현시키는 것을 포함한다. 상기 핵산의 공급원은 당업자에게 주지되어 있고, 예를 들어, 하이브리도마, 진핵 세포 또는 항체 생산 파지로부터, 또는 상기 기술된 바와 같이, 소정의 표적에 대한 면역반응성 단편으로부터, 생식계열 면역글로불린 유전자로부터, 또는 합성 구성체로부터 수득될 수 있다. 이어서, 인간화된 항체를 코딩하는 재조합 DNA를 적절한 발현 벡터로 클로닝할 수 있다.

[0106] 인간 생식계열 서열은 예를 들어, 문헌 ([Tomlinson, I. A. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798]; [Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* 16: 237-242]; [Chothia, D. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817]; 및 [Tomlinson et al. (1995) *EMBO J* 14:4628-4638])에 개시되어 있다. V BASE 디렉토리는 인간 면역글로불린 가변 영역 서열에 대한 종합 디렉토리를 제공한다(문헌 [Retter et al., (2005) *Nuc Acid Res* 33: 671-674] 참조). 이러한 서열은 예컨대, 골격 영역 및 CDR에 대한 인간 서열의 공급원으로서 사용될 수 있다. 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 컨센서스 인간 골격 영역은 또한 예컨대, U.S.P.N. 제6,300,064호에 기술되어 있는 바와 같이 사용될 수 있다.

[0107] f. 인간 항체

[0108] 상기 언급된 항체 이외에도, 본 발명의 항체는 완전한 인간 항체를 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 본 출원의 목적을 위해, 인간 항체라는 용어는 인간에 의해 생산된 항체의 것과 일치하는 아미노산 서열을 소유하고/거나, 본원에 개시된 바와 같이 인간 항체를 기법 중 임의의 것을 사용하여 제조된 항체를 포함한다. 인간 항체에 관한 이러한 정의는 구체적으로는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화된 항체는 배제한다.

[0109] 인간 항체는 당업계에 공지된 다양한 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 파지 디스플레이 기법을 사용하여 본 교시에 따른 면역반응성 결합 영역을 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태는 파지 상에서 (바람직하게 인간) 항체 라이브러리를 합성하는 단계, CD46 또는 이의 항체 결합부로 라이브러리를 스크리닝하는 단계, CD46에 결합한 파지를 단리시키는 단계, 및 파지로부터 면역반응성 단편을 수득하는 단계를 포함하는, 항CD46 항체 또는 이의 항원 결합부를 제조하는 방법을 제공한다. 일례로, 파지 디스플레이 기법에서 사용하기 위한 항체 라이브러리를 제조하는 한 방법은 인간 또는 비인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비인간 동물을 CD46 또는 이의 항원성 부위로 면역화시켜 면역 반응을 일으키는 단계, 면역화된 동물로부터 항체 생산 세포를 추출하는 단계; 추출된 세포로부터 본 발명의 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 RNA를 단리시키는 단계, RNA를 역전사시켜 cDNA를 제조하는 단계, 프라이머를 사용하여 cDNA를 증폭시키는 단계, 및 cDNA를 파지 디스플레이 벡터 내로 삽입하여 파지 상에서 항체가 발현될 수 있도록 하는 단계를 포함한다. 더욱 특히, V_H 및 V_L 도메인을 코딩하는 DNA를 PCR에 의해 scFv 렁커와 함께 재조합하고, 파지미드 벡터(예컨대, pCANTAB 6 또는 pComb 3 HSS)로 클로닝한다. 이어서, 벡터를 *E. coli*(*E. coli*)에 전기천공시킨 후, *E. coli*를 헬퍼 파지로 감염시킨다. 이러한 방법에서 사용되는 파지는 전형적으로는 fd 및 M13을 비롯한 섬유상 파지이고, V_H 및 V_L 도메인은 일반적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합적으로 융합된다.

[0110] 본 발명의 재조합 인간 항CD46 항체는 상기와 같이 제조된 재조합형의 조합 항체 라이브러리를 스크리닝함으로써 단리될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 라이브러리는 B 세포로부터 단리된 mRNA로부터 제조된 인간 V_L 및 V_H cDNA를 사용하여 제조된 scFv 파지 디스플레이 라이브러리이다. 상기 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 방법은 당업계에 주지되어 있고, 파지 디스플레이 라이브러리 제조용 키트는 상업적으로 이용가능하다(예컨대, 파마시아 리컴비난트 파지 안티바디 시스템(Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), 카탈로그 번호 27-9400-01; 및 스트라타진(Stratagene) SurfZAP™ 파지 디스플레이 키트, 카탈로그 번호 240612). 항체 디스플레이 라이브러리를 제조하고 스크리닝하는 데 사용될 수 있는 다른 방법 및 시약 또한 존재한다(예컨대, U.S.P.N. 제5,223,409호; PCT 공개 번호 WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; [Fuchs et al., *Bio/Technology* 9: 1370-1372 (1991)]; [Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992)]; [Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)]; [McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)]; [Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)]; [Hawkins et al., *J. Mol.*

Biol. 226:889-896 (1992)]; [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)]; [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580 (1992)]; [Garrad et al., Bio/Technology 9: 1373-1377 (1991)]; [Hoogenboom et al., Nuc. Acid Res. 19:4133-4137 (1991)]; 및 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982 (1991)]) 참조).

[0111] 나이브 라이브러리(천연 또는 합성)에 의해 제조된 항체는 중간 정도의 친화도(K_a = 약 10^6 대지 $10^7 M^{-1}$)를 가질 수 있지만, 당업계에 기술되어 있는 바와 같이, 구성하고, 2차 라이브러리로부터 재선택함으로써 시험관내에서 친화도 성숙 또한 모방할 수 있다. 예를 들어, 돌연변이를 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896(1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법에서 (문헌 [Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)]에 보고된) 오류 빈발(error-prone) 폴리머라제를 사용함으로써 시험관내에서 무작위로 도입시킬 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은, 예컨대, 선택된 개별 Fv 클론에서 관심의 대상이 되는 CDR에 이르는 무작위 서열을 보유한 프라이머를 사용하는 PCR을 이용하여 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이화시키고, 보다 고친화도 클론을 스크리닝함으로써 수행될 수 있다. WO 9607754에는 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성하기 위해 면역글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하는 방법이 기술되어 있다. 또 다른 효과적인 접근법은 비면역화된 공여체로부터 수득된 천연적으로 발생된 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 사용하여 파지 디스플레이에 의해 선택된 V_H 또는 V_L 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 기술되어 있는 바와 같이, 수회의 쇄 재선플링으로 보다 고친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기법을 통해 해리 상수 $K_d(K_{off}/K_{on})$ 가 약 $10^{-9} M$ 이하인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.

[0112] 이의 표면 상에서 결합 쌍을 발현하는 진핵 세포(예컨대, 효모)를 포함하는 라이브러리를 사용하는 유사한 방법이 이용될 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 파지 디스플레이 기술과 마찬가지로, 진핵 라이브러리를 관심의 대상이 되는 항원(즉, CD46)에 대해 스크리닝하고, 후보 결합 쌍을 발현하는 세포를 단리시키고, 클로닝한다. 라이브러리 컨텐츠를 최적화하고, 반응성 결합 쌍의 친화도 성숙을 위해 조치를 취할 수 있다. 예를 들어, U.S.P.N. 제7,700,302호 및 U.S.S.N. 제12/404,059호를 참조할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 항체는 인간 항체를 발현하는 것인 파지 라이브러리로부터 선택된다(문헌 ([Vaughan et al. Nature Biotechnology 14:309-314 (1996)]; [Sheets et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6157-6162 (1998)]; [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)])을 참조할 수 있다). 다른 실시양태에서, 인간 결합 쌍은 진핵 세포, 예컨대, 효모에서 생성된 조합 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 예컨대, U.S.P.N. 제7,700,302호를 참조할 수 있다. 상기 기법을 통해 이롭게는 다수의 후보 조절 인자를 스크리닝할 수 있고, (예컨대, 친화도 성숙 또는 재조합 셔플링에 의해) 상대적으로 용이하게 후보 서열을 조작할 수 있다.

[0113] 또한, 내인성 면역글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전하게 불활성화되어 있는 트랜스제닉 동물, 예컨대, 마우스 내로 인간 면역글로불린 유전자좌를 도입함으로써 인간 항체를 제조할 수 있다. 시험감염시, 인간 항체 생산이 관찰되는데, 이는 유전자 재배열, 조립 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 면에 있어 인간에서 관찰된 것과 매우 유사하다. 이러한 접근법은 예를 들어, in U.S.P.N 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호, 및 제노마우스[®] 기술과 관련하여 U.S.P.N 제6,075,181호 및 제6,150,584호, 및 하기 과학 공보지에 기술되어 있다: 문헌 ([Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859(1994)]; [Morrison, Nature 368:812-13(1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)]). 별법으로, 인간 항체는 표적 항원에 대한 항체를 생산하는 인간 B 림프구의 불멸화를 통하여 제조될 수 있다(이러한 B 림프구는 신생물성 장애를 앓는 개체로부터 회수할 수 있거나, 또는 시험관내에서 면역화된 것일 수 있다). 예컨대, 문헌 ([Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147 (1):86-95 (1991)]; 및 U.S.P.N. 제5,750,373호)를 참조할 수 있다.

VI. 항체 특징

[0114] 항체 조절 인자를 어떻게 수득하든 간에, 또는 그가 상기 언급된 형태 중 어느 형태(예컨대, 인간화된 항체, 인간 항체 등)를 취하든 간에, 개시된 조절 인자의 바람직한 실시양태는 다양한 특징을 나타낼 수 있다. 이와 관련하여, 항CD46 항체 생산 세포(예컨대, 하이브리도마 또는 효모 콜로니)를 선택하고, 클로닝하고, 추가로 예를

들어, 강건한 성장, 고도의 항체 생산을 비롯한 바람직한 특징, 및 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같은 바람직한 항체 특징에 대하여 스크리닝할 수 있다. 하이브리도마를 동종동계 동물에서, 예를 들어, 누드 마우스와 같은 면역계가 없는 동물에서 생체내에서 확장시킬 수 있거나, 또는 세포 배양물에서 시험관내에서 확장시킬 수 있다. 각각이 별개의 항체 종을 생산하는 것인 하이브리도마 및/또는 콜로니를 선택하고, 클로닝하고, 확장시키는 방법은 당업계의 숙련가에게 주지되어 있다.

[0116] a. 중화 항체

특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 중화 항체 또는 이의 유도체 또는 단편을 포함할 것이다. 중화 항체 또는 중화 길항체라는 용어는 CD46 또는 임의의 리간드 또는 효소에 결합하거나, 그와 상호작용하고, 리간드 또는 효소의 이의 결합 파트너(예컨대, CD46) 또는 기질에의 결합을 방해하여, 다르게는 상기 분자의 상호작용으로부터 발생되는 생물학적 반응을 방해하는 항체 또는 길항체를 의미한다. 항체 또는 이의 면역학적으로 기능성인 단편 또는 유도체의 결합 및 특이성을 평가할 때, 항체 또는 단편은 (시험관내 경쟁 결합 검정법, 예컨대, 본원 실시예에 기술되어 있는 것으로 측정된 바) 과량의 항체가 결합 파트너의 표적 분자에의 결합량을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 이상만큼 감소시킬 때, 리간드 또는 효소의 이의 결합 파트너 또는 기질에의 결합을 실질적으로 억제시킬 것이다. CD46에 대한 항체의 경우, 중화 항체 또는 길항체는 바람직하게는 혈청 인자 I에 의한 보체 성분 C3b 및 C4b의 불활성화와 관련된 CD46의 능력을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 이상만큼 감소시킴으로써 유리 글리피칸의 농도를 감소시킬 것이다. 이러한 감소된 활서은 당업계에 알려져 있는 기법을 사용하여 직접 측정될 수 있거나, 그러한 감소가 보체 활성에 미치는 영향에 의해 측정될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0118] b. 내재화 항체

증거를 통해 CD46이 세포에 의해 분비될 수 있다고 제시된 반면, 적어도 일부의 CD46은 여전히 세포 표면과 그대로 회합된 상태로 남아있음으로써, 이를 통해 개시된 조절 인자는 내재화될 수 있다. 따라서, 항CD46 항체는 적어도 어느 정도는 CD46을 발현하는 세포에 의해 내재화될 수 있다. 예를 들어, 종양 개시 세포의 표면 상의 CD46에 결합하는 항CD46 항체는 종양 개시 세포에 의해 내재화될 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, 항CD46 항체는 내재화시 세포를 사멸시키는 세포독성 모이어티와 회합되거나, 이에 접합될 수 있다.

본원에서 사용되는 바, 내재화 항CD46 항체는 포유동물 세포에 회합된 CD46에의 결합시 세포에 의해 흡수되는 것이다. 내재화 항체로는 항체 단편, 인간 또는 인간화된 항체 및 항체 접합체를 포함한다. 내재화는 시험관내 또는 생체내에서 이루어질 수 있다. 치료학적 적용을 위한 경우, 내재화는 생체내에서 이루어질 수 있다. 내재화되는 항체 분자의 개수는 CD46 발현 세포, 특히, CD46 발현 종양 개시 세포를 사멸시키는 데 충분하거나, 적절할 수 있다. 일부 경우에는, 항체 또는 항체 접합체의 효능에 따라, 단일 항체 분자의 세포 내로의 흡수는 항체가 결합하는 표적 세포를 사멸시키는 데 충분하다. 예를 들어, 항체에 접합된 독소 한 분자의 내재화는 종양 세포를 사멸시키는 데 충분할 정도로 특정 독소는 사멸에 있어 고도로 강력한 효능을 가지고 있다. 항CD46 항체의 내재화가 결합시에 이루어지든 아니든 간에, 포유동물 세포 상의 CD46은 하기 실시예에 기술되어 있는 것을 비록한 다양한 검정법에 의해 측정될 수 있다. 항체의 세포 내로의 내재화 여부를 검출하는 방법은 U.S.P.N. 제7,619,068호(이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0121] c. 고갈 항체

다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 고갈 항체 또는 이의 유도체 또는 단편을 포함할 것이다. 고갈 항체라는 용어는 세포 표면 상의 또는 그에 가까이 있는 CD46에 결합하거나, 또는 그와 회합하고, (예컨대, 보체 의존성 세포독성 또는 항체 의존성 세포 세포독성에 의해) 세포의 사멸 또는 제거를 유도하거나, 촉진시키거나, 또는 유발하는 항체 또는 단편을 의미한다. 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 일부 실시양태에서, 선택된 고갈 항체는 세포독성제에 회합하거나, 접합될 것이다. 바람직하게, 고갈 항체는 정의된 세포 집단에서 종양 영구 세포를 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 99% 이상 없애거나, 제거하거나, 또는 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 강화된, 절연화된, 정제된, 또는 단리된 종양 영구 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 세포 집단은 종양 영구 세포를 포함하는 전체 종양 시료 또는 이질성 종양 추출물을 포함할 수 있다. 하기 실시예에 기술된 바와 같은 표준 생화학적 기법을 사용하여 본원의 교시에 따른 종양 영구 세포의 고갈을 모니터링하고 정량화할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0123] d. 에피토프 결합

[0124] 개시된 항CD46 항체는 선택된 표적(들)에 의해 제시되는 별개의 에피토프 또는 결정기와 회합하거나, 그에 결합

할 것이라는 것을 추가로 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 바, 에피토프라는 용어는 특정 항체에 의해 인식되고, 그에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 표적 항원 부위를 의미한다. 항원이 폴리펩티드, 예컨대, CD46일 경우, 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 연속 아미노산 및 비연속 아미노산, 둘 모두로부터 형성될 수 있다. 연속 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로는 단백질 변성시에도 그대로 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로는 단백질 변성시에 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간 입체형태를 띠는 3개 이상, 및 더욱 일반적으로는 5개 또는 8-10개 이상의 아미노산을 포함한다. 더욱 구체적으로, 에피토프라는 용어가 면역글로불린 또는 T 세포 수용체에 특이적인 결합을 할 수 있거나, 또는 다르게는 분자와 상호작용할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 포함한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 에피토프 결정기는 일반적으로 예컨대, 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자로 된 화학적으로 활성인 표면기로 구성되고, 일반적으로, 특이적인 3차원 구조 특징 뿐만 아니라, 특이적인 전하 특징을 가진다. 추가로 에피토프는 선형이거나, 입체형태를 띤 수 있다. 선형 에피토프에서, 단백질과 상호작용 분자(예컨대, 항체) 사이의 상호작용 지점들은 모두 단백질의 1차 아미노산 서열을 따라 선형으로 존재한다. 입체형태를 띠는 에피토프에서, 상호작용 지점들은 서로로부터 선형으로 분리된 단백질 상의 아미노산 잔기 전역에 걸쳐 존재한다.

[0125]

일단 항원 상의 원하는 에피토프가 결정되고 나면, 예컨대, 본 발명에 기술된 기법을 사용하여 상기 에피토프에 대한 항체를 생성할 수 있다. 별법으로, 발견하는 과정 동안 항체의 생성 및 특징 규명을 통해 바람직한 에피토프에 대한 정보를 설명할 수 있다. 이어서, 이러한 정보로부터, 동일 에피토프에의 결합에 대해 항체를 경쟁적으로 스크리닝할 수 있다. 이를 달성할 수 있는 접근법은 서로 경쟁적으로 결합하는 항체, 즉, 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 항체를 발견하는 경쟁 연구를 수행하는 것이다. 그들의 교차 경쟁에 기초한 항체를 비닝하는 고처리량 공정은 WO 03/48731에 기술되어 있다.

[0126]

본원에서 사용되는 바, 비닝(binning)이라는 용어는 이의 항원 결합 특징에 기초하여 항체를 균별로 분류하는 방법을 의미한다. 빈 지정은 테스트된 항체의 관찰된 결합 패턴이 얼마나 상이한지에 따라 다소 임의적일 수 있다. 따라서, 상기 기법이 본 발명의 항체를 분류하는 데 있어 유용한 도구이지만, 빈이 에피토프와 항상 직접적인 상관관계에 있는 것은 아니며, 그러한 초기 결정은 당업계에 알려져 있는 다른 방법에 의해 추가로 확인되어야 한다.

[0127]

이러한 주의 사항에 따라, 선택된 1차 항체(또는 이의 단편)가 동일 에피토프에 결합하는지, 또는 2차 항체와 결합에 대해 교차 경쟁하는지 여부를 당업계에 공지되고, 본원 실시예에 기술된 방법을 사용함으로써 측정할 수 있다. 한 실시양태에서, 포화 조건하에서 본 발명의 1차 항체를 CD46에 결합시킨 후, 2차 항체의 CD46에 결합할 수 있는 능력에 관하여 측정한다. 테스트 항체가 1차 항CD46 항체와 동시에 CD46에 결합할 수 있다면, 이때 2차 항체는 1차 항체와는 다른 에피토프에 결합한다. 그러나, 2차 항체가 동시에 CD46에 결합할 수 없다면, 이때 2차 항체는 동일 에피토프, 중복 에피토프, 또는 1차 항체와 결합되어 있는 에피토프에 아주 근접하게 위치하는 에피토프에 결합한다. 당업계에 공지되어 있고, 하기 실시예에서 상세하게 설명하는 바와 같이, 고체상 직접 또는 간접 방사선면역검정법(RIA: radioimmunoassay), 고체상 직접 또는 간접 효소 면역검정법(EIA: enzyme immunoassay), 샌드위치 경쟁 검정법, 비아코어(Biacore)™ 시스템(즉, 표면 플라즈몬 공명 - GE 헬쓰케어(GE Healthcare)), 포르테바이오(ForteBio)® 분석기(즉, 바이오충 간접계 - 포르테바이오 인코퍼레이티드(ForteBio, Inc.)) 또는 유세포 분석을 사용하여 원하는 데이터를 획득할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 표면 플라즈몬 공명이라는 용어는 바이오센서 매트릭스 내의 단백질 농도의 변화를 검출함으로써 실시간으로 생체특이적인 상호작용을 분석할 수 있도록 하는 광학 현상을 의미한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 상기 분석법은 하기 실시예에서 설명되는 바와 같이, 비아코어 또는 포르테바이오 기기를 사용하여 수행된다.

[0128]

동일 에피토프에 대해 경쟁하는 항체와 관련하여 사용될 때, 경쟁하다라는 용어는 항체 사이의 경쟁이, 테스트 중에 있는 항체 또는 면역학적으로 기능성인 단편이 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적인 결합을 방해하거나 억제시키는 것인 검정법에 의해 측정되는 것을 의미한다. 전형적으로, 상기와 같은 검정법은 비표지된 테스트 면역글로불린 및 표지된 참조 면역글로불린, 이들 중 어느 하나를 보유하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원을 사용하는 것을 포함한다. 경쟁 억제는 테스트 면역글로불린의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 측정함으로써 측정된다. 일반적으로, 테스트 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 경쟁 검정법에 의해 확인되는 항체(경쟁 항체)는 참조 항체와 동일 에피토프에 결합하는 항체, 및 입체 장애 발생으로 인하여 참조 항체가 결합되어 있는 에피토프에 충분히 근접한 거리에 있는 인접한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 경쟁 결합을 측정하는 방법에 관한 추가의 상세한 설명은 본원 실시예에서 제공한다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재할 때, 공통 항원에의 참조 항체의 특이적인 결합은 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상만큼 억제될 것이다. 일부 경우에, 결합은 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 97% 이상만큼

역제된다.

[0129] 에피토프 특이성에 기초하여, 예를 들어, 결합 친화도, 용융 온도(T_m), 및 등전점을 비롯한 다수의 상이한 물리적인 특징들을 이용하여 개시된 항체의 특징을 규명할 수 있다.

[0130] e. 결합 친화도

[0131] 이와 관련하여, 본 발명은 추가로 CD46에 대하여 높은 결합 친화도를 가지는 항체를 사용하는 것을 포함한다. 해리 상수 $K_d(k_{\text{오프}}/k_{\text{온}})$ 가 $\leq 10^{-8}$ M일 때, 본 발명의 항체는 이의 표적 항원에 특이적으로 결합한다고 한다. K_d 가 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M일 때, 항체는 고친화도로 항원에 특이적으로 결합하며, K_d 가 $\leq 5 \times 10^{-10}$ M일 때, 초고도의 친화도를 가진다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 $\leq 10^{-9}$ M인 K_d 및 약 1×10^{-4} /sec인 오프 속도를 가진다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 오프 속도는 $< 1 \times 10^{-5}$ /sec이다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 항체는 약 10^{-8} M 내지 10^{-10} M 사이의 K_d 로 CD46에 결합할 것이며, 추가의 또 다른 실시양태에서, 항체는 $K_d \leq 2 \times 10^{-10}$ M으로 결합할 것이다. 본 발명의 추가의 다른 선택된 실시양태는 해리 상수 또는 $K_d(k_{\text{오프}}/k_{\text{온}})$ 가 10^{-2} M 미만, 5×10^{-2} M 미만, 10^{-3} M 미만, 5×10^{-3} M 미만, 10^{-4} M 미만, 5×10^{-4} M 미만, 10^{-5} M 미만, 5×10^{-5} M 미만, 10^{-6} M 미만, 5×10^{-6} M 미만, 10^{-7} M 미만, 5×10^{-7} M 미만, 10^{-8} M 미만, 5×10^{-8} M 미만, 10^{-9} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 10^{-10} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 미만, 5×10^{-11} M 미만, 10^{-12} M 미만, 5×10^{-12} M 미만, 10^{-13} M 미만, 5×10^{-13} M 미만, 10^{-14} M 미만, 5×10^{-14} M 미만, 10^{-15} M 미만, 5×10^{-15} M 미만인 항체를 포함한다.

[0132] 구체적인 실시양태에서, CD46에 면역특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상, $10^8 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 이상의 회합 속도 상수 또는 $k_{\text{온}}$ 속도($CD46 \text{ (Ab)} + \text{항원 (Ag)} \xrightarrow{k_{\text{온}}} \text{Ab-Ag}$)를 가진다.

[0133] 또 다른 실시양태에서, CD46에 면역특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 10^{-1} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-2} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-3} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-4} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-5} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-6} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-7} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-8} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 미만, 10^{-9} s^{-1} 미만, $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 미만, 또는 10^{-10} s^{-1} 미만인 $k_{\text{오프}}$ 속도($CD46 \text{ (Ab)} + \text{항원 (Ag)} \xrightarrow{k_{\text{오프}}} \text{Ab-Ag}$)를 가진다.

[0134] 본 발명의 다른 선택된 실시양태에서, 항CD46 항체는 10^2 M^{-1} 이상, $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^3 M^{-1} 이상, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^4 M^{-1} 이상, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^5 M^{-1} 이상, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^6 M^{-1} 이상, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^7 M^{-1} 이상, $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^8 M^{-1} 이상, $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^9 M^{-1} 이상, $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{10} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{11} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{12} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{13} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{14} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ 이상, 10^{15} M^{-1} 이상, $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ 이상인 친화 상수 또는 $K_a(k_{\text{온}}/k_{\text{오프}})$ 를 가질 것이다.

[0135] f. 등전점

[0136] 상기 언급한 결합 특성 이외에도, 항CD46 항체 및 이의 단편은 모든 폴리펩티드와 같이, 일반적으로는 폴리펩티드의 순 전하가 0일 때의 pH로서 정의되는 등전점(pi: Isoelectric Point)을 가진다. 용액의 pH와 단백질의 등전점(pi)이 같을 때, 단백질의 용해도는 가장 낮은 것으로 당업계에 알려져 있다. 그러므로, 항체 중 이온화가 가능한 잔기의 개수 및 위치를 변경하여 pi를 조정함으로써 용해도를 최적화시킬 수 있다. 예를 들어, 아미노산을 적절히 치환시킴으로써(예컨대, 비하전된 잔기, 예컨대, 알라닌 대신 하전된 아미노산 예컨대, 리신으로 치환함으로써) 폴리펩티드의 pi를 조작할 수 있다. 어느 특정의 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 상기 항체의 pi를 변화시키는 항체의 아미노산 치환을 통해 항체의 용해도 및/또는 안정성을 개선될 수 있다. 원하는 pi

를 달성하는 데 특정 항체에 대하여 어떤 아미노산 치환이 가장 적절한지 당업자는 이해할 것이다.

[0137] 단백질의 pi는 등전성 포커싱 및 다양한 컴퓨터 알고리즘을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14: 1023] 참조). 한 실시양태에서, 본 발명의 항CD46 항체의 pi는 약 6.5, 약 7.0, 약 7.5, 약 8.0, 약 8.5, 또는 약 9.0보다 높다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항CD46 항체의 pi는 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 또는 9.0보다 높다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체의 pi를 변경시키는 치환은 CD46에 대한 이의 결합 친화도를 유의적으로 감소시키지는 않을 것이다. 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, Fc γ R에의 결합을 변경시키는 Fc 영역의 치환(들)은 또한 pi로 변화시킬 수 있다는 것이 구체적으로 고려된다. 바람직한 실시양태에서, Fc 영역의 치환(들)은 Fc γ R 결합을 원하는 대로 변경하고, pi를 임의로 원하는 대로 변화시키는, 둘 모두를 수행할 수 있도록 구체적으로 선택된다. 본원에서 사용되는 바, pi 값은 우세한 전하 형태의 pi로서 정의된다.

g. 열 안정성

[0139] 항체의 Fab 도메인의 T_m 이 항체의 열 안정성의 우수한 지시계일 수 있고, 추가로 반감기를 지시할 수 있음을 추가로 이해할 것이다. T_m 은 단순히 주어진 도메인 또는 서열의 50%가 언풀딩되는 온도이다. 더 낮은 T_m 은 응집이 더 많이 일어나거나/안정성이 더 낮다는 것을 지시하는 반면, 더 높은 T_m 은 응집이 더 적게 일어나거나/안정성이 더 높다는 것을 지시한다. 따라서, 더 높은 T_m 을 가진 항체 또는 단편 또는 유도체가 바람직할 수 있다. 또한, 당업계에 열려지 있는 기법을 사용하여 항CD46 항체 또는 이의 도메인의 조성을 변경시킴으로써 분자의 안정성을 최적화시킬 수 있다. 예를 들어, U.S.P.N. 제7,960,142호를 참조할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 선택된 항체의 Fab 도메인은 적어도 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C, 110°C, 115°C 또는 120°C보다 높은 T_m 값을 가진다. 또 다른 실시양태에서, 항체의 Fab 도메인은 적어도 약 50°C, 약 55°C, 약 60°C, 약 65°C, 약 70°C, 약 75°C, 약 80°C, 약 85°C, 약 90°C, 약 95°C, 약 100°C, 약 105°C, 약 110°C, 약 115°C 또는 약 120°C보다 높은 T_m 값을 가진다. 단백질 도메인(예컨대, Fab 도메인)의 열적 용융 온도(T_m)는 당업계에 공지된 임의의 표준 방법을 사용하여, 예를 들어, 시차 주사 열량법에 의해 측정될 수 있다(예컨대, 문헌 ([Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78:394-404]; [Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154])(상기 두 문헌 모두 본원에 참고로 포함된다) 참조).

VII. CD46 조절 인자 단편 및 유도체

[0141] 본 발명의 제제가 무손상 융합 구성체, 항체, 단편 또는 유도체를 포함하는지 여부와는 상관없이, 선택된 조절 인자는 CD46과 반응하거나, 결합하거나, 조합되거나, 복합체를 형성하거나, 부착되거나, 연결되거나, 상호작용하거나, 또는 다르게는 회합함으로써 원하는 항신생물성 효과를 제공할 것이다. 항CD46 항체를 포함하는 조절 인자는 항체 상에 발현된 하나 이상의 결합부를 통해 CD46과 상호작용하거나 회합한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 더욱 구체적으로, 본원에서 사용되는 바, 결합부라는 용어는 관심의 대상이 되는 표적 분자(예컨대, 효소, 항원, 리간드, 수용체, 기질 또는 억제제)에 선택적으로 결합하는 것을 담당하는 폴리펩티드의 영역을 포함한다. 결합 도메인은 1 이상의 결합부를 포함한다(예컨대, 무손상 IgG 항체는 2개의 결합 도메인과 2개의 결합부를 가질 것이다). 결합 도메인의 예로는 항체 가변 도메인, 리간드의 수용체 결합 도메인, 수용체의 리간드 결합 도메인 또는 효소적 도메인을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, (예컨대, Fc-CD46 융합 구성체의 일부로서) CD46의 효소적으로 활성인 영역은 기질(예컨대, 글리피칸)에 대한 결합부를 포함할 수 있다.

a. 단편

[0143] 본 발명의 실시를 위해 어떤 형태의 조절 인자(예컨대, 키메라, 인간화된 것 등)가 선택되는지와는 상관없이, 상기 것의 면역반응성 단편이 본원 교시에 따라 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 가장 광범위한 의미에서, 항체 단편이라는 용어는 무손상 항체(예컨대, 천연적으로 발생된 면역글로불린)의 적어도 일부를 포함한다. 더욱 특히, 단편이라는 용어는 무손상 또는 완전한 항체 또는 항체 쇄보다 적은 개수의 아미노산 잔기를 포함하는 항체 또는 항체 쇄(또는 Fc 융합물인 경우, CD46 분자)의 부분 또는 일부를 의미한다. 항원 결합 단편이라는 용어는, 항원과 결합하거나, 항원 결합(즉, 특이 결합)에 대하여 무손상 항체와(즉, 항원 결합 단편이 유래된 무손상 항체와) 경쟁하는 면역글로불린 또는 항체의 폴리펩티드 단편을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, 항체 분자의 단편이라는 용어는 항체의 항원 결합 단편, 예를 들어, 항체 경쇄(V_L), 항체 중쇄(V_H), 단일 쇄 항체(scFv), F(ab')2 단편, Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단일 도메인 항체 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일 쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다. 유사하게, CD46의 효소적으로 활성인 단편은 CD46 기질과 상호작용할 수 있고, (다소 덜 효율적일 수는 있지만) 무손상 CD46의 것과 유사한 방식으로

그를 변형(예컨대, 그를 고정)시킬 수 있는 CD46 분자의 능력을 보유하는 CD46 분자의 부위를 포함한다.

[0144] 단편은 무손상 또는 완전한 조절 인자(예컨대, 항체 또는 항체 쇄)의 화학적 또는 효소 처리를 통해 또는 재조합 수단에 의해 수득될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 이와 관련하여, 다양한 항체 단편은 무손상 항체의 분해에 의해 정의되지만, 그러한 단편은 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법을 이용함으로써 새롭게 합성될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 본원에서 사용되는 바, 항체라는 용어는 전체 항체의 변형에 의해 제조되거나, 또는 재조합 DNA 방법을 이용함으로써 새롭게 합성된 항체 또는 이의 단편 또는 유도체를 명백하게 포함한다.

[0145] 더욱 구체적으로, 항체의 파파인 분해를 통해, 각각 단일 항원 결합부와 남은 Fc 단편을 포함하는, Fab 단편이라 명명되는 2개의 동일한 항원 결합 단편이 생성되는데, 상기 명칭은 쉽게 결정화될 수 있는 이의 능력이 반영된 것이다. 펩신으로 처리하면, 2개의 항원 결합부를 가지며, 여전히 항원과 교차 결합할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 생성된다. Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(C_{H1})을 포함한다. Fab' 단편은 항체 헌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 비롯한 중쇄 C_{H1} 도메인의 카복시 말단에 수개의 잔기가 첨가되어 있다는 점에서 Fab 단편과 다르다. Fab' -SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 1 이상의 유리 티올기를 보유하는 Fab' 에 대해 본원에서 지정한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래는 Fab' 단편 쌍 사이에 헌지 시스테인을 가지는 Fab' 단편 쌍으로서 제조되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다. 다른 항체 단편에 관한 보다 상세한 설명을 위해 예컨대, 문헌 [Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1999)]을 참조할 수 있다.

[0146] Fv 단편이 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 항체 단편이라는 것을 추가로 이해할 것이다. 상기 영역은 예를 들어, scFv의 경우에는 실제로 공유 결합일 수 있는, 밀착 결합으로 회합되어 있는 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 이량체로 구성되어 있다. 이러한 배열로 각 가변 도메인의 3개의 CDR은 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면 상의 항원 결합부를 정의한다. 종합해 보면, 6개의 CDR 또는 이의 서브세트가 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 비록 일반적으로는 전체 결합부보다는 친화도가 낮지만, 심지어 단일 가변 도메인(또는 항원에 대해 특이적인 단 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반부)도 항원을 인식하고, 그에 결합할 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0147] 다른 실시양태에서, 예를 들어, 항체 단편은 Fc 영역을 포함하고, 무손상 항체에 존재할 때 Fc 영역과 정상적으로 회합하는 생물학적 기능, 예컨대, FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합 중 1 이상을 보유하는 것이다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 가지는 1가 항체이다. 예를 들어, 상기와 같은 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.

b. 유도체

[0149] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 1가 또는 다가(예컨대, 2가, 3가 등)일 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 바, 결합가라는 용어는 항체와 회합되는 잠재적인 표적(즉, CD46) 결합부의 개수를 의미한다. 각 표적 결합부는 하나의 표적 분자, 또는 표적 분자 상의 특이적인 위치 또는 자리와 특이적으로 결합한다. 본 발명의 항체가 1 초파의 표적 결합부를 포함하는 경우(다가), 각 표적 결합부는 동일 또는 상이한 분자에 특이적으로 결합할 수 있다(예컨대, 상이한 리간드 또는 상이한 항원에, 또는 동일 항원 상의 상이한 에피토프 또는 위치에 결합할 수 있다). 본 발명의 목적을 위해, 대상 항체는 바람직하게 인간 CD46에 대하여 특이적인 1 이상의 결합부를 가진다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 분자의 각 결합부가 단일의 CD46 위치 또는 에피토프에 특이적으로 결합한다는 점에서 1가일 것이다. 다른 실시양태에서, 항체는 항체가 1 초파의 결합부를 포함하고, 상이한 결합부가 1 초파의 단일 위치 또는 에피토프와 특이적으로 회합한다는 점에서 다가일 것이다. 그러한 경우, 다중 에피토프가 선택된 CD46 폴리펩티드 상에 존재할 수 있거나, 또는 단일 에피토프가 CD46 상에 존재할 수 있고, 동시에 제2의 상이한 에피토프가 또 다른 분자 또는 표면 상에 존재할 수 있다. 예를 들어, U.S.P.N. 제2009/0130105호를 참조할 수 있다.

[0150] 상기 언급된 바와 같이, 다가 항체는 원하는 표적 분자의 상이한 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있거나, 표적 분자 뿐만 아니라, 이종성 에피토프, 예컨대, 이종성 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질, 둘 모두에 면역 특이적으로 결합할 수 있다. 항CD46 항체의 바람직한 실시양태는 오직 두 항원에만 결합하는 반면(즉, 이특이성 항체), 추가의 특이성을 가진 항체, 예컨대, 삼특이성 항체 또한 본 발명에 포함된다. 이특이성 항체의 예로는 제한없이, CD46에 대한 것인 하나의 아암, 및 임의의 다른 항원(예컨대, 조절 인자 세포 마커)에 대한 나머지

다른 한 아암을 가지는 것을 포함한다. 이특이성 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장의 이특이성 항체를 제조하는 전통적인 방법은 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공발현에 기초하는데, 여기서, 상기 두 쇄는 상이한 특이성을 가지는 것이다(문헌 [Millstein et al., 1983, Nature, 305:537-539]). 더 복잡한 화합성을 띠는 다른 다중특이성 구성체 및 이의 제조 방법은 U.S.P.N. 제2009/0155255호에 기술되어 있다.

[0151] 추가의 다른 실시양태에서, 원하는 결합 특이성을 가지는 항체 가변 도메인(항체 항원 조합 부위)을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 헌지, C_H2, 및/또는 C_H3 영역 중 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이 바람직하다. 일례로, 경쇄 결합에 필요한 부위를 포함하는 제1 중쇄 불변 영역(C_H1)은 융합물 중 1 이상에 존재한다. 면역글로불린 중쇄 융합물, 및 원하는 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체에 함께 공형질감염시킨다. 이는 한 실시양태에 있어서, 구성에 사용되는 3개의 폴리펩티드 쇄의 다른 비율이 최적의 수율을 제공할 때, 3개의 폴리펩티드 단편의 상호간의 비율을 조정할 때 더욱 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 2 이상의 폴리펩티드 쇄가 동일한 비율로 발현됨으로써 높은 수율을 얻거나, 그 비율이 특별히 중요하지 않을 경우, 2개 또는 3개의 폴리펩티드 쇄 모두를 코딩하는 코딩 서열을 한 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0152] 상기 접근법의 한 실시양태에서, 이특이성 항체는 한쪽 아암의 제1 합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로불린 중쇄(예컨대, CD46), 및 나머지 다른 한쪽 아암의 (제2 결합 특이성을 제공하는) 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍으로 구성된다. 이특이성 분자의 오직 절반부에만 면역글로불린 경쇄가 존재함으로써 용이한 방식으로 분리될 수 있도록 하는 바, 상기와 같은 비대칭 구조는 원하는 이특이성 화합물이 원치않는 면역글로불린 쇄 조합으로부터 쉽게 분리될 수 있도록 한다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이특이성 항체를 생성하는 것에 관한 추가의 상세한 설명을 위해서는 예를 들어, 문헌 [Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology, 121:210]을 참조할 수 있다. WO 96/27011에 기술된 또 다른 접근법에 따라, 항체 분자 쌍을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 비율(%)을 최대화시킬 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예컨대, 티로신 또는 트리토판)으로 대체할 수 있다. 큰 측쇄(들)와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동은 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것(예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 다른 원치않는 최종 생성물, 예컨대, 동종이량체에 비하여 이종이량체의 수율을 증가시킬 수 있는 기전을 제공한다.

[0153] 이특이성 항체는 또한 교차 결합된 또는 헤데로접합체 항체를 포함한다. 예를 들어, 헤데로접합체에서 항체 중 하나는 아비딘에 커플링될 있고, 다른 나머지 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 상기 항체는 예를 들어, 원치 않는 세포에 대한 면역계 세포를 표적화하는 데(U.S.P.N. 제4,676,980호), 및 HIV 감염 치료를 위해(WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089) 제안되었다. 헤데로접합체 항체는 임의의 용이한 교차 결합 방법을 사용함으로써 제조될 수 있다. 적합한 교차 결합체는 당업계에 주지되어 있고, 다수의 교차 결합 기법과 함께 U.S.P.N. 제4,676,980호에 개시되어 있다.

0154] VIII. CD46 조절 인자 - 불변 영역 변형

a. Fc 영역 및 Fc 수용체

[0156] 상기 기술된 개시된 조절 인자(예컨대, Fc CD46 또는 항CD46 항체)의 가변 또는 결합 영역에의 다양한 변형, 치환, 부가 또는 결실 이외에도, 본 발명의 선택된 실시양태는 또한 불변 영역(즉, Fc 영역)의 치환 또는 변형도 포함할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 더욱 특히, 본 발명의 CD46 조절 인자는 그 중에서도 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기, 치환, 돌연변이 및/또는 변형을 포함함으로써, 약동학적 성질 변경, 혈청 반감기 증가, 결합 친화도 증가, 면역원성 감소, 생산성 증가, Fc 리간드 결합 변경, ADCC 또는 CDC 활성 증진 또는 감소, 당화 및/또는 이황화 결합 변경 및 결합 특이성 변형을 포함하나, 이에 한정되지 않는 바람직한 특징을 가질 수 있게 된다고 사료된다. 이와 관련하여, 유리하게는 이러한 Fc 변이체를 사용함으로써 개시된 조절 인자의 효과적인 항신생물성 특성을 증진시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0157] 본원에서 Fc 영역이라는 용어는 면역글로불린 중쇄의 C 말단 영역을 정의하는 데 사용되며, 이는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 비록 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 달라질 수는 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로는 아미노산 잔기, 위치 Cys226, 또는 Pro230으로부터 이의 카복시 말단까지 뻗어 있는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C 말단의 리신(EU 번호매김 체계에 따라 잔기 447)는 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다.

따라서, 무손상 항체 조성물은 K447 잔기 모두가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 있는 항체 및 없는 항체의 혼합물을 포함하는 항체 집단을 포함할 수 있다. 기능성 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역의 효과기 기능을 소유한다. 예시적인 효과기 기능으로는 C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 포식작용; 세포 표면 수용체(예컨대, B 세포 수용체; BCR)의 하향조절 등을 포함한다. 그러한 효과기 기능은 일반적으로는 Fc 영역이 결합 도메인(예컨대, 항체 가변 도메인)과 조합될 것으로 필요로 하며, 예를 들어, 본원 정의부에서 개시된 것과 같은 다양한 검정법을 사용함으로써 평가될 수 있다.

[0158] Fc 수용체 또는 FcR은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기술한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 일부 실시양태에서, FcR은 IgG 항체와 결합하는 것(감마 수용체)이며, 이는 Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 서브부류 수용체와, 대립형질 변이체 및 별법으로 상기 수용체의 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ II 수용체는 Fc γ RIIA(활성화 수용체) 및 Fc γ RIIB(억제 수용체)를 포함하는데, 이는 이의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는, 유사한 아미노산 서열을 가진다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)를 포함한다(예컨대, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR는 예를 들어, 문헌 ([Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)])에 리뷰되어 있다. 추후에 확인되는 것을 포함하여 다른 FcR도 본원의 FcR 용어에 포함된다. Fc 수용체 또는 FcR이라는 용어는 또한, 특정 경우에, 모체 IgG를 태아에게 전달하는 역할(문헌 ([Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249(1994)]) 및 면역글로불린의 항상성을 조절하는 역할을 담당하는 신생아 수용체, FcRn도 포함한다. FcRn에의 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다(예컨대, 문헌 ([Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997)]; [Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997)]; [Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.)) 참조).

b. Fc 기능

[0159] 본원에서 사용되는 바, 보체 의존성 세포독성 및 CDC라는 것은 보체의 존재 하에서 표적 세포를 용해시키는 것을 의미한다. 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분(C1q)을, 분자, 예를 들어, 이의 동족 항원과 복합체를 형성하고 있는 항체와 결합시킴으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예컨대, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202: 163]에 기술되어 있는 것과 같은 CDC 검정법을 수행할 수 있다.

[0160] 추가로, 항체 의존성 세포 매개 세포독성 또는 ADCC라는 것은 특정의 세포독성 세포(예컨대, 자연 살해(NK: Natural Killer) 세포, 호중구, 및 대식 세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상에 결합된 분비된 IgG로 인해, 이를 세포독성 효과기 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있게 하고, 연속해서 이러한 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성 형태를 의미한다. 표적에 대한 특이적인 고친화성 IgG 항체는 세포독성 세포를 무장시키고, 이는 상기 사멸을 위해 절대적으로 요구된다. 표적 세포의 용해는 세포외에서 이루어지고, 세포 대 세포인 직접적인 접촉을 필요로 하며, 보체를 포함하지 않는다.

[0161] FcR 결합 친화도 또는 ADCC 활성이 변경된 CD46 조절 인자 변이체는 모체 또는 비변형된 항체와 비교하여, 또는 천연 서열 Fc 영역을 포함하는 조절 인자와 비교하여 FcR 결합 활성 및/또는 ADCC 활성이 증진되거나 감소된 것이다. FcR에 대하여 증가된 결합을 보이는 조절 인자 변이체는 모체 또는 비변형된 항체보다, 또는 천연 서열 Fc 영역을 포함하는 조절 인자보다 우수한 친화도로 1 이상의 FcR에 결합한다. FcR에 대하여 감소된 결합을 보이는 변이체는 모체 또는 비변형된 항체보다, 또는 천연 서열 Fc 영역을 포함하는 조절 인자보다 저조한 친화도로 1 이상의 FcR에 결합한다. FcR에 대하여 감소된 결합을 보이는 상기 변이체는 예컨대, 당업계에 주지된 기법으로 측정한 바, FcR에 대하여 거의 또는 전혀 주목할 만한 결합을 소유할 수 있으며, 예컨대, 천연 서열 IgG Fc 영역과 비교하여 FcR에의 0-20% 결합인 결합을 소유할 수 있다.

[0162] FcRn과 관련하여, 본 발명의 항체는 또한 포유동물, 바람직하게, 인간에서 5일 초과, 10일 초과, 15일 초과, 바람직하게, 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과, 또는 5개월 초과의 반감기(예컨대, 혈청 반감기)를 제공하는 불변 영역에 변형을 포함하는 Fc 변이체도 포함하거나, 포함시킨다. 포유동물, 바람직하게, 인간에서 본 발명의 항체(또는 Fc 함유 분자)의 증가된 반감기를 통해 상기 항체 또는 항체 단편은 포유동물에서 보다 더 높은 혈청 역가를 가질 수 있게 되고, 따라서, 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도는 감소하게 되고/거나, 투여되는 상기 항체 또는 항체 단편의 농도도 감

소하게 된다. 생체내 반감기가 증가된 항체는 당업자에게 공지되어 있는 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 생체내 반감기가 증가된 항체는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로서 확인된 아미노산 잔기를 변형시킴으로써(예컨대, 치환, 결실, 또는 부가함으로써) 생성될 수 있다(예컨대, 국제 공개 번호 WO 97/34631; WO 04/029207; U.S.P.N. 제6,737,056호 및 U.S.P.N. 제2003/0190311호 참조). 생체내 인간 FcRn에의 결합 및 인간 FcRn 고친화성 결합 폴리펩티드의 혈청 반감기는 예컨대, 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드를 투여받은 영장류에서 검정될 수 있다. WO 2000/42072에는 FcRn에의 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체가 기술되어 있다. 또한, 예컨대, 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]을 참조할 수 있다.

[0164] c. 당화 변형

[0165] 추가의 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체의 당화 패턴 또는 조성은 변형된다. 더욱 특히, 본 발명의 바람직한 실시양태는 하나 이상의 조작된 당형태, 즉, Fc 영역을 포함하는 분자에 공유적으로 부착된 변경된 당화 패턴 또는 변경된 탄수화물 조성을 포함할 수 있다. 조작된 당형태는 효과기 기능 증진 또는 감소, 표적 항원에 대한 항체의 친화도 증가, 또는 항체 생산 촉진을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 목적에 유용할 수 있다. 감소된 효과기 기능을 원하는 경우, 분자는 비당화된 형태로 발현되도록 조작될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 그러한 탄수화물 변형은 예를 들어, 항체 서열내 하나 이상의 당화 부위를 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 즉, 하나 이상의 아미노산을 치환시킴으로써 하나 이상의 가변 영역 골격 당화 부위를 제거하여 상기 부위의 당화를 제거할 수 있다(예컨대, U.S.P.N. 제5,714,350호 및 제6,350,861호 참조). 대조적으로, 하나 이상의 추가의 당화 부위에서 조작함으로써 Fc 함유 분자에 증진된 효과기 기능 또는 개선된 결합을 부여할 수 있다.

[0166] 추가로 또는 별법으로, 당화 조성이 변경된 Fc 변이체, 예컨대, 푸코실 잔기의 양이 감소된 하이포푸코실화된 항체 또는 이분성 GlcNac 구조가 증가된 항체가 제조될 수 있다. 이러한 및 유사한 변경된 당화 패턴이 항체의 ADCC 능력을 증가시킨다고 입증된 바 있다. 조작된 당형태는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 조작된 또는 변이 발현 균주를 이용함으로써, 하나 이상의 효소(예를 들어, N-아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III(GnTIII))와의 공발현에 의해, 다양한 유기체 또는 다양한 유기체로부터 세포주 내에서 Fc 영역을 포함하는 분자를 발현함으로써, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 후에 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740]; [Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1]; 뿐만 아니라, 유럽 특허 번호: EP 1,176,195; PCT 공보 WO 03/035835; WO 99/54342, [Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17: 176-180]; [Davies et al., 2001 Biotechnol Bioeng 74:288-294]; [Shields et al., 2002, 1 Biol Chem 277:26733-26740]; [Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473], U.S.P.N. 제6,602,684호; U.S.S.N. 제10/277,370호; 제10/113,929호; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140 A1; PCT WO 02/30954 A1; 포틸레전트(Potillegent)™ 기술(바이오와 인코퍼레이티드(Biowa, Inc.)); 글리코MAb(GlycoMAb)™ 당화 조작 기술(글리카트 바이오텍놀로지 아게(GLYCART biotechnology AG)); WO 00061739; EA01229125; U.S.P.N. 제2003/0115614호; [Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49]를 참조할 수 있다.

[0167] IX. 조절 인자 발현

[0168] a. 개요

[0169] 원하는 CD46 조절 인자를 코딩하는 DNA는 종래 방법을 사용함으로써(예컨대, 항체 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열 분석될 수 있다. 조절 인자가 항체일 경우, 단리되고 서브클로닝된 하이브리도마 세포(또는 과지 또는 효모 유래 콜로니)는 상기 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 할 수 있다. 원하는 경우, 핵산은 융합 단백질, 또는 키메라, 인간화된 또는 완전한 인간 항체를 비롯한 제제를 생성하기 위해 본원에 기술된 바와 같이 추가로 조작될 수 있다. 더욱 특히, U.S.P.N. 제7,709,611호에 기술되어 있는 바와 같이, 항체 제조를 위해 변형될 수 있는 단리된 DNA를 사용하여 불변 및 가변 영역 서열을 클로닝할 수 있다.

[0170] 이러한 예시적인 방법은 선택된 세포로부터의 RNA 추출, cDNA로의 전환, 및 항체 특이 프라이머를 사용하는 PCR에 의한 증폭을 수반한다. 적합한 프라이머는 당업계에 주지되어 있으며, 본원에 예시되어 있는 바와 같이, 다수의 상업적으로 공급원으로부터 쉽게 이용할 수 있다. 조합 라이브러리의 스크리닝에 의해 단리된 재조합 인간 또는 비인간 항체를 발현시키기 위해서는 항체를 코딩하는 DNA를 재조합 발현 벡터로 클로닝하고, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모, 및 박테리아를 비롯한 숙주 세포로 도입한다는 것을 이해할 것이다. 추가의 다른 실시양태에서, 조절 인자를 다르게는 원하는 구성체를 생산하지 않는 시미안 COS 세포, NS0 세포, 차이니

즈 햄스터 난소(CHO: Chinese Hamster Ovary) 세포 또는 골수종 세포로 도입하여 그에 의해 발현되도록 한다. 여기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 원하는 조절 인자를 발현하는 형질전환된 세포를 상대적으로 다양으로 성장시켜 융합 구성체 또는 면역글로불린을 임상적 및 상업적으로 공급할 수 있도록 할 수 있다.

[0171] CD46 조절 인자의 원하는 부위를 코딩하는 핵산이 과자 디스플레이 기술, 효모 라이브러리, 하이브리도마 기반 기술, 합성적 방식으로, 또는 상업적 공급원으로부터 수득되든 또는 유래되든 간에, 본 발명은 융합 단백질 및 항CD46 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 유도체를 비롯한 CD46 조절 인자를 코딩하는 핵산 분자 및 서열을 명백히 포함한다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은 추가로 고도한 염격도하에서, 또는 별법으로 중간 정도의 또는 보다 낮은 염격도의 하이브리드화 조건하에서(예컨대, 여기에 정의되는 바와 같은 조건하에서) 본 발명의 조절 인자 또는 이의 단편 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 가지는 핵산에 상보적인 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 핵산 또는 핵산 분자(예컨대, 폴리뉴클레오티드)를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 핵산 분자 또는 단리된 핵산 분자라는 용어는 적어도 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있지만, 바람직하게는 이중 가닥 DNA이다. 또한, 본 발명은 제한없이, 벡터, 플라스미드, 숙주 세포, 코스미드 또는 바이러스 구성체를 비롯한, 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 상기 조절 인자를 도입하는 임의의 비허를 또는 구성체를 포함한다.

[0172] 단리된 핵산이라는 용어는 핵산이 (i) 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)에 의해 시험관내에서 증폭되거나, (ii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생산되거나, (iii) 예를 들어, 절단, 및 젤 전기영동 분획에 의해 정제되거나, (iv) 예를 들어, 화학적 합성에 의해 합성되었다는 것을 의미한다. 단리된 핵산은 재조합 DNA 기법에 의한 조작을 위해 이용가능한 핵산이다.

[0173] 더욱 구체적으로, 본 발명의 항체의 쇄 중 하나 또는 그 둘 모두, 또는 이의 단편, 유도체, 뮤테인 또는 변이체를 비롯한, 조절 인자를 코딩하는 핵산, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 확인, 분석, 돌연변이화 또는 증폭시키기 위한 하이브리드화 프로브, PCR 프라이머 또는 서열 분석 프라이머로서 사용하기에 충분한 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제시키기 위한 앤티센스 핵산, 및 상기에 대해 상보적인 서열 또한 제공한다. 핵산의 길이는 임의 길이일 수 있다. 핵산은 예를 들어, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1,000, 1,500, 3,000, 5,000개 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있고/거나, 하나 이상의 추가 서열, 예를 들어, 조절 서열을 포함할 수 있고/거나, 더 큰 핵산, 예를 들어, 벡터의 부분일 수 있다. 이러한 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, RNA 및/또는 DNA 뉴클레오티드, 및 이의 인공 변이체(예컨대, 웨პ티드 핵산)를 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 면역반응성 단편 또는 유도체를 비롯한, 본 발명의 조절 인자를 코딩하는 핵산은 바람직하게 상기 기술된 바와 같이 단리된다.

b. 하이브리드화 및 정체

[0174] 언급한 바와 같이, 본 발명은 추가로 특정 하이브리드화 조건하에서 다른 핵산과 하이브리드화하는 핵산을 제공한다. 핵산을 하이브리드화시키는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 예컨대, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]을 참조할 수 있다. 본 출원의 목적을 위해, 중간 정도로 염격한 하이브리드화 조건은 5 x 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC), 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA(pH 8.0)를 함유하는 사전 세척액, 하이브리드화 완충제 약 50% 포름아미드, 6xSSC, 및 하이브리드화 온도 55°C(또는 다른 유사 하이브리드화 용액, 예컨대, 약 50% 포름아미드를 함유하는 것, 하이브리드화 온도 42°C), 및 60°C 0.5xSSC, 0.1% SDS 중에서의 세척 조건을 사용한다. 염격한 하이브리드화 조건 45°C 6xSSC 중에서 하이브리드화한 후, 68°C 0.1xSSC, 0.2% SDS 중에서 1회 이상 세척한다. 추가로, 하이브리드화의 염격도를 증가시키거나 감소시킴으로써 서로 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산이 전형적으로 서로에 대해 하이브리드화된 상태로 유지될 수 있도록 당업자는 하이브리드화 및/또는 세척 조건을 조작할 수 있다. 더욱 일반적으로, 본 개시내용의 목적을 위해, 핵산 서열과 관련하여 실질적으로 동일하다라는 용어는 참조 핵산 서열과의 서열 동일성이 약 85% 이상, 또는 90% 이상, 또는 95% 이상, 또는 97% 이상인 뉴클레오티드의 서열로서 해석되어야 한다.

[0176] 하이브리드화 조건을 선택하는 것에 영향을 미치는 기본 파라미터 및 적합한 조건을 고안하는 것에 관한 가이던스는 예를 들어, 문헌 ([Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11); 및 [Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4])에 기술되어 있고, 예를 들어, 핵산의 길이 및/또는 염기 조성에 기초하여 당업계의 숙련가에 의해 쉽

게 결정될 수 있다.

[0177] 본 발명에 따라 핵산은 단독으로 존재할 수 있거나, 또는 동종성 또는 이종성인 다른 핵산과 함께 조합하여 존재할 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 바람직한 실시양태에서, 핵산은 상기 핵산과 관련하여 동종성 또는 이종성인 발현 제어 서열에 기능적으로 연결된다. 이와 관련하여, 동종성이라는 용어는 핵산이 또한 천연적으로 발현 제어 서열에 기능적으로 연결되어 있다는 것을 의미하고, 이종성이라는 용어는 핵산이 천연적으로 발현 제어 서열에 기능적으로 연결되어 있지 않다는 것을 의미한다.

c. 발현

[0179] 핵산, 예컨대, RNA 및/또는 단백질 또는 펩티드를 발현하는 핵산, 발현 제어 서열이 상기 핵산의 발현 또는 전사가 제어하에 있도록 또는 상기 발현 제어 서열의 영향하에 있도록 하는 방식으로 서로 공유적으로 연결되어 있다면, 이는 서로 연결되어 있는 것이다. 코딩 서열에 기능적으로 연결되어 있는 발현 제어 서열과 함께 핵산이 기능성 단백질로 번역되는 것이라면, 상기 발현 제어 서열의 유도를 통해 코딩 서열에서의 프레임 쉬프트없이 또는 원하는 단백질 또는 펩티드로 번역될 수 없는 상기의 코딩 서열없이 상기 핵산은 전사된다.

[0180] 본 발명에 따라 발현 제어 서열이라는 용어는 프로모터, 리보솜 결합부, 인핸서 및 유전자의 전사 또는 mRNA의 번역을 조절하는 다른 제어 요소를 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 발현 제어 서열은 조절될 수 있다. 발현 제어 서열의 정확한 구조는 종 또는 세포 유형에 따라 달라질 수 있지만, 일반적으로는 각각 전사 및 번역의 개시에 관여하는 5' 비전사 및 5' 및 3' 비번역 서열, 예컨대, TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등을 포함한다. 더욱 구체적으로, 5' 비전사 발현 제어 서열은 기능적으로 연결된 핵산의 전사 제어를 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함한다. 발현 제어 서열은 또한 인핸서 서열 또는 상류 활성 인자 서열을 포함할 수 있다.

[0181] 본 발명에 따라, 프로모터 또는 프로모터 영역이라는 용어는 발현되는 핵산 서열의 상류(5')에 위치하고, RNA 폴리머라제에 대한 인식 및 결합 부위를 제공함으로써 서열의 발현을 제어하는 핵산 서열에 관한 것이다. 프로모터 영역은 유전자의 전사 조절에 관여하는 추가의 인자에 대한 인식 및 결합 부위를 추가로 포함할 수 있다. 프로모터는 원핵 또는 진핵 유전자의 전사를 제어할 수 있다. 추가로, 프로모터는 유도성일 수 있으며, 유도제에 대한 반응으로 전사를 개시할 수 있거나, 또는 전사가 유도제에 의해 제어되지 않는다면, 이는 구성적 프로모터일 수 있다. 유도제가 존재하지 않을 경우, 유도성 프로모터의 제어하에 있는 유전자는 발현되지 않거나, 또는 단지 작게 발현된다. 유도제의 존재하에서 유전자는 작동하도록 전환되거나, 전사 수준은 증가한다. 이는 일반적으로는 특이적인 전사 인자의 결합에 의해 매개된다.

[0182] 본 발명에 따라 바람직한 프로모터로는 SP6, T3 및 T7 폴리머라제에 대한 프로모터, 인간 U6 RNA 프로모터, CMV 프로모터, 및 한 부분 또는 여러 부분들이 다른 세포 단백질, 예컨대, 인간 GAPDH(글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제) 유전자의 한 부분 또는 여러 부분들에 융합되어 있으며, (한) 추가의 인트론(들)을 포함하거나 포함하지 않는, 이의 인공 하이브리드 프로모터(예컨대, CMV)를 포함한다.

[0183] 본 발명에 따라, 발현이라는 용어는 이의 가장 일반적인 의미로 사용되며, RNA의 생산, 또는 RNA 및 단백질/펩티드의 생산을 포함한다. 또한 핵산의 부분적인 발현도 포함한다. 추가로, 발현은 일시적으로 또는 안정적으로 수행될 수 있다.

[0184] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따라, 핵산 분자는 핵산의 발현을 제어하는 프로모터와 함께 적절히 벡터에 존재한다. 본원에서 벡터라는 용어는 이의 가장 일반적인 의미로 사용되며, 예를 들어, 핵산이 원핵 및/또는 진핵 세포 내로 도입될 수 있도록 하고, 적절하게는 게놈 내로 통합될 수 있도록 하는, 상기 핵산에 대한 임의의 중개자 비히클을 포함한다. 이러한 종류의 벡터는 바람직하게 세포에서 복제되고/거나 발현된다. 벡터는 플라스미드, 파지미드, 박테리오파지 또는 바이러스 게놈을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 플라스미드라는 용어는 일반적으로 염색체와 유전 물질의 구성체, 일반적으로 염색체 DNA와는 독립적으로 복제될 수 있는 환형 DNA 이중나선에 관한 것이다.

[0185] 본 발명을 수행할 때, 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술에서 다수의 종래 기법이 임의로 사용된다는 것을 이해할 것이다. 그러한 종래 기법은 본원에서 정의된 바와 같은 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법에 관한 것이다. 이러한 기법은 주지되어 있고, 예를 들어, 문헌 ([Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif.]; [Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000] 및 [Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., 상

기 문헌 동일])에서 설명되어 있다. 예컨대, 세포 단리 및 배양에 대해(예컨대, 후속 핵산 및 단백질 단리에 대해) 유용한 다른 참고 문헌으로는 문헌 ([Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York and the references cited therein]; [Payne et al. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.]; [Gamborg and Phillips (Eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture]; [Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Atlas and Parks (Eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla])을 포함한다. 핵산을 조작 및 제조하는 데 유용한 (예컨대, 시험관내 증폭, 세포로부터의 정제, 또는 화학적 합성에 의한) 핵산 제조 방법, 핵산 조작 방법(예컨대, 부위 지정 돌연변이유발법, 제한 효소 분해, 결찰 등에 의한 것), 및 다양한 벡터, 세포주 등이 상기 참고 문헌에 기술되어 있다. 추가로, 본질적으로 임의의 폴리뉴클레오티드(예컨대, 표지된 또는 비오티닐화된 폴리뉴클레오티드 포함)는 다양한 상업적 공급원들 중 어느 것으로부터 맞춤형으로 또는 표준형으로 주문 제작될 수 있다.

[0186] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체 또는 이의 일부가 재조합적으로 발현될 수 있도록 하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 상기와 같은 재조합 숙주 세포에서 발현에 의해 생산된 항체는 본원에서 재조합 항체로 지칭된다. 본 발명은 또한 상기 숙주 세포의 자손 세포, 및 상기에 의해 생산된 항체를 제공한다.

[0187] 본원에서 사용되는 바, 재조합 숙주 세포(또는 간단하게 숙주 세포)라는 용어는 재조합 발현 벡터가 그 안으로 도입되어 있는 세포를 의미한다. 재조합 숙주 세포 및 숙주 세포란 특정 피험체 세포 뿐만 아니라, 상기 세포의 자손도 의미한다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경상의 영향으로 인해 다음 세대에서도 특정 변형은 발생할 수 있기 때문에, 사실상 상기 자손은 모체 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 바와 같이 숙주 세포라는 용어의 범주내 포함된다. 상기 세포는 상기 기술된 바와 같이 본 발명에 따른 벡터를 포함할 수 있다.

[0188] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 항체 또는 이의 일부를 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에 따라, 상기 방법은 상기 기술된 바와 같이 벡터로 형질감염되거나 형질전환된 세포를 배양하는 단계, 및 항체 또는 이의 일부를 회수하는 단계를 포함한다.

[0189] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명의 항체(또는 이의 단편 또는 변이체)의 발현은 바람직하게 원하는 항CD46 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터(들)를 포함한다. 당업자에게 주지되어 있는 방법을 사용하여 항체 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 포함하는 발현 벡터를 구성할 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명의 실시양태는 프로모터에 작동가능한 연결된, 본 발명의 항CD46 항체(예컨대, 전체 항체, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 이의 일부, 또는 중쇄 또는 경쇄 CDR, 단일 쇄 Fv, 또는 이의 단편 또는 변이체)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 벡터는 항체 분자(또는 이의 단편)의 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 항체(또는 이의 단편)의 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 중쇄 및 경쇄, 둘 모두를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0190] 일단 본원의 교시에 따라 본 발명의 뉴클레오티드를 단리시키고 나면, 이를 사용하여 항CD46 항체 또는 이의 단편을 비롯한, 선택된 조절 인자를 제조할 수 있다.

X. 조절 인자 제조 및 정제

[0192] 당업계에 알려져 있는 분자 생물학 기법 및 현 단백질 발현 방법을 사용하여, 상당량의 원하는 조절 인자를 제조할 수 있다. 더욱 구체적으로, 조절 인자, 예컨대, 상기 기술된 바와 같이, 수득되고 조작된 항체를 코딩하는 핵산을, 다양한 유형의 숙주 세포를 포함하는 주지되고, 상업적으로 이용가능한 단백질 제조 시스템으로 통합시켜 임상전, 임상 또는 상업적인 양의 원하는 약학적 생성물을 수득할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 선택된 숙주 세포 내로 효율적으로 통합될 수 있도록 하고, 이어서, 원하는 CD46 조절 인자가 높은 수준으로 발현될 수 있도록 하는 벡터 또는 발현 벡터로 조절 인자를 코딩하는 핵산 분자를 조작하는 것을 이해할 것이다.

[0193] 바람직하게는, 비록 원핵 시스템이 조절 인자 생산에 사용될 수 있기는 하지만, CD46 조절 인자를 코딩하는 핵산 분자 및 상기 핵산 분자를 포함하는 벡터가 적합한 포유동물, 식물, 박테리아 또는 효모 숙주 세포를 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 형질감염은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 임의의 공지된 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이종성 폴리뉴클레오티드를 포유동물 세포 내로 도입시키는 방법은 당업계에 주지되어 있고, 그 방법으로는 텍스트란 매개 형질감염, 인산칼슘 침전, 폴리브렌 매개 형질감염, 원형질체 융합, 전기천

공, 폴리뉴클레오티드(들)의 리포솜 내로의 캡슐화, 및 DNA의 핵 내로의 직접적인 미세주입을 포함한다. 추가로, 핵산 분자는 바이러스 벡터에 의해 포유동물 세포 내로 도입될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 예컨대, U.S.P.N 제4,399,216호, 제4,912,040호, 제4,740,461호, 및 제4,959,455호를 참조할 수 있다. 추가로, 식물 세포를 형질전환시키는 방법은 당업계에 주지되어 있으며, 그 예로, 아그로박테리움 매개 형질전환, 바이오리스틱 형질전환, 직접 주입, 전기천공 및 바이러스 형질전환을 포함한다. 박테리아 및 효모 세포를 형질전환시키는 방법 또한 당업계에 주지되어 있다.

[0194] 또한, 숙주 세포를 본 발명의 두 발현 벡터, 예를 들어, 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터, 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 공형질감염시킬 수 있다. 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드가 실질적으로 동일하게 발현될 수 있도록 하는 동일의 선별가능한 마커를 포함할 수 있다. 별법으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드, 둘 모두를 코딩하고, 이들을 발현할 수 있는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 상황하에서 경쇄는 과량의 독성을 띠는 유리 중쇄를 회피하기 위해 중쇄 앞에 배치되는 것이 바람직하다. 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열을 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0195] a. 숙주 발현 시스템

[0196] 다양한 숙주 발현 벡터 시스템이 상업적으로 이용가능하고, 본원의 교시와 화합성이며, 본 발명의 조절 인자를 발현시키는 데 사용될 수 있다. 그러한 숙주 발현 시스템으로는 대표적으로 그에 의해 관심의 대상이 되는 코딩 서열이 발현될 수 있고, 이어서, 정제될 수 있는 비히클이 있고, 또한 대표적으로는, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염되었을 때, 계내에서 본 발명의 분자를 발현시킬 수 있는 세포가 있다. 그러한 시스템으로는 조절 인자 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대, 박테리아(예컨대, *E. coli*, *B. subtilis*), 스트렙토마이세스(*streptomyces*)); 조절 인자 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질감염된 효모(예컨대, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 퍼치아(*Pichia*)); 조절 인자 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 바콜로바이러스)로 형질감염된 곤충 세포계; 조절 인자 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 꽃양배추 모자이크 바이러스, *CaMV*(cauliflower mosaic virus); 담배 모자이크 바이러스, *TMV*(tobacco mosaic virus))로 감염되거나, 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예컨대, *Ti* 플라스미드)로 형질감염된 식물 세포계(예컨대, 니코티아나(*Nicotiana*), 아라비돕시스(*Arabidopsis*), 개구리밥, 옥수수, 소맥, 감자 등); 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예컨대, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터의 프로모터(예컨대, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구성체를 보유하는 포유동물 세포계(예컨대, COS, CHO, BH, 293, 3T3 세포)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0197] 박테리아계의 경우, 발현되는 항체 분자의 용도에 따라서 다수의 발현 벡터를 유리하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 조절 인자의 약학 조성을 위해 이러한 단백질을 다양으로 생산하고자 하는 경우, 쉽게 정제되는 융합 단백질 생성물을 고수준으로 발현될 수 있도록 유도하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터로는 코딩 서열이 lac Z 코딩 영역과 함께 프레임내에서 벡터에 개별적으로 결찰되어 융합 단백질을 생성하는 *E. coli* 발현 벡터 pUR278(문헌 [Ruther et al., EMBO 1. 2: 1791 (1983)]); pIN 벡터(문헌 [Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); [Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)]]) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. pGEX 벡터 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST: glutathione 5-transferase)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드 발현시키는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 매트릭스 글루타티온 아가로스 비드에의 흡착 및 결합 후, 유리 글루타티온의 존재하에 용리시킴으로써 용해된 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 유리될 수 있도록 트롬빈 또는 Xa 인자 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 디자인한다.

[0198] 곤충계의 경우에는, 오토그라파 캘리포니카 핵다각체병 바이러스(AcNPV: *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)가 외래 유전자를 발현하는 벡터로서 사용될 수 있다. 이 바이러스는 스포도프테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 코딩 서열은 바이러스의 비필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)으로 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어하에 배치될 수 있다.

[0199] 포유동물 숙주 세포의 경우에는, 다수의 바이러스 기반 발현 시스템을 이용하여 원하는 뉴클레오티드 서열을 도입할 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심의 대상이 되는 코딩 서열을 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 3 부분 리더 서열에 결찰시킬 수 있다. 이 키메라 유

전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 영역(예컨대, 영역 E1 또는 E3) 내로의 삽입을 통해 생존가능하고, 감염된 숙주에서 분자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 생성할 것이다(예컨대, 문헌 [Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)] 참조). 또한, 삽입된 코딩 서열의 효율적인 번역을 위해서는 특정 개시 신호가 필요할 수 있다. 이러한 신호로는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 추가로, 개시 코돈은 전체 삽입체가 확실하게 번역될 수 있도록 원하는 코딩 서열의 리딩 프레임과 맞게 작동하여야 한다. 이러한 외인성 베이트어 신호 및 개시 코돈은 천연 및 합성, 둘 모두로 다양한 기원을 가질 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서, 전사 종결인자 등의 포함으로 증진될 수 있다(예컨대, 문헌 [Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987) 참조]). 따라서, 발현을 위해 숙주로서 이용가능한 화합성 포유동물 세포주는 당업계에 주지되어 있고, 아메리칸 타입 컬쳐 컬렉션(ATCC: American Type Culture Collection)으로부터 이용가능한 다수의 불멸화된 세포주를 포함한다. 이들 중에서도 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, NS0 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, 293 프리스타일(Freestyle) 세포(라이프 테크놀로지스(Life Technologies: 샌디에고)), NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장(baby hamster kidney) 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예컨대, Hep G2), A549 세포, 및 다수의 다른 세포주를 포함한다.

[0200]

재조합 단백질의 장기간 고수율의 생산을 위해서는 안정한 발현이 바람직하다. 따라서, 선택된 조절 인자를 안정하게 발현하는 세포주를 당업계에 알려져 있는 표준 기법을 사용하여 조작할 수 있다. 바이러스의 복제 기점은 포함하는 발현 벡터를 사용하는 것보다는 적절한 발현 제어 인자(예컨대, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결인자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 제어되는 DNA, 및 선별가능한 마커로 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA를 도입한 후, 조작된 세포를 강화 배지에서 1-2일 동안 성장시킨 후, 선택 배지로 교환시켜준다. 재조합 플라스미드 중의 선별가능한 마커는 선별에 대한 내성을 부여하고, 세포가 그 플라스미드를 이의 염색체 내로 안정하게 통합하여 성장함으로써 병소를 형성한 뒤, 클로닝되어 세포주로 확장될 수 있도록 한다. 이 방법은 항체 분자를 발현하는 세포주를 조작하는 데 유리하게 사용할 수 있다. 상기와 같은 조작된 세포주는 문자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물을 스크리닝 및 평가하는 데 특히 유용할 수 있다.

[0201]

다수의 선별 시스템이 당업계에 주지되어 있고, 이들이 사용될 수 있으며, 그 예로는 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나제(문헌 [Wigler et al., Cell 11:223 (1977)]), 하이포크산틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(문헌 [Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:202 (1992)]), 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(문헌 [Lowy et al., Cell 22:8 17 (1980)]) 유전자가 각각 tk 세포, hgprt 세포 또는 aprt 세포에서 이용될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 또한, 항대사산물 내성이 하기 유전자에 대한 선별의 기본으로서 사용될 수 있다: 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr(문헌 ([Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)]; [O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)])); 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt(문헌 [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)]); 아미노글리코시드 G-418에 대한 내성을 부여하는 neo(문헌 ([Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)]; [Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596(1993)]; [Mulligan, Science 260:926-932 (1993)]; 및 [Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993)]; [TIB TECH 11(5): 155-215 (May, 1993)]); 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygro(문헌 [Santerre et al., Gene 30:147 (1984)]). 원하는 재조합 클론을 선별하는 데 당업계에 통상 알려져 있는 재조합 DNA 기술 방법이 적용될 수 있고, 그러한 방법은 예를 들어, 문헌 ([Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)]; [Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)]; 및 [Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994)]; [Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1(1981)])에 기술되어 있다. 안정한 고수율의 세포를 확립하는 특히 바람직한 방법은, 특정 조건하에서 발현을 증진시키는 효율적인 접근법을 제공하는 글루타민 신테타제 유전자 발현 시스템(GS 시스템)을 포함한다는 것을 이해할 것이다. GS 시스템은 EP 특허 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 및 0 338 841(이들 각각은 본원에 참고로 포함된다)와 관련하여 전체적으로 또는 부분적으로 논의되고 있다.

[0202]

추가로, 숙주 세포 균주는 삽입 서열의 발현을 조절하거나, 바람직한 특정 방식으로 유전자 생성물을 변형시키고 프로세싱하는 것이 선택될 수 있다. 그러한 단백질 생성물의 변형(예컨대, 당화) 및 프로세싱(예컨대, 절단)은 단백질의 기능 및/또는 정체에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역 후 프로세싱과 변형에 특징적이고 특이적인 기전을 가지고 있다. 당업계에 알려져 있는 바와 같이, 발현되는 발현된 폴리펩티드가 확실하게 원하는 바대로 변형 및 프로세싱될 수 있도록 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 상기 목적을 달성하기 위해, 1차 전사체의 적당한 프로세싱, 당화 및 인산화에 대한 세포 기구를

소유하는 진핵 숙주 세포는 본 발명에서 사용하는 데 특히 효과적이다. 따라서, 특히 바람직한 포유동물 숙주 세포로는 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, NS0, MDCK, 293, 3T3, W138 뿐만 아니라, 유방암 세포주, 예컨대, 예를 들어, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상적인 유선 세포주, 예컨대, CRL7030 및 HsS78Bst를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 조절 인자 및 선택된 생산 시스템에 따라, 당업자는 조절 인자의 효율적인 발현을 위해 적절한 숙주 세포를 쉽게 선택하고 최적화시킬 수 있다.

[0203] b. 화학적 합성

상기 언급한 숙주 세포 시스템 이외에도, 본 발명의 조절 인자는 당업계에 공지된 기법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다는 것을 이해할 것이다(예컨대, 문헌 [Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y.], 및 [Hunkapiller, M., et al., 1984, Nature 310:105-11 1]) 참조). 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 단편에 상응하는 웨프티드는 웨프티드 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 추가로, 원하는 경우, 비교전적 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체가 폴리펩티드 서열에의 치환 또는 부가로서 도입될 수 있다. 비교전적 아미노산으로는 일반적으로 일반 아미노산의 D-이성질체, 2,4-디아미노 부티르산, a-아미노 이소부티르산, 4-아미노 부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, g-Abu, e-Ahx, 6-아미노 헥산산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르류신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스테인산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, b-알라닌, 플루오로-아미노산, 디자이너 아미노산, 예를 들어, b-메틸 아미노산, Ca-메틸 아미노산, Na-메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 추가로, 아미노산은 D(우선성) 또는 L(좌선성)일 수 있다.

[0205] c. 트랜스제닉 시스템

[0206] 본 발명의 CD46 조절 인자는 또한 관심의 대상이 되는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 서열(또는 이의 단편 또는 유도체 또는 변이체)에 대해 트랜스제닉인 포유동물 또는 식물의 생성 및 회수 가능한 형태로 원하는 화합물의 생산을 통해 트랜스제닉 기법에 의해 생산될 수 있다. 포유동물에서의 트랜스제닉 생산과 관련하여, 예를 들어, 항CD46 항체는 염소, 소, 또는 다른 포유동물의 젖으로부터 생산되고, 회수될 수 있다. 예컨대, U.S.P.N. 제5,827,690호, 제5,756,687호, 제5,750,172호, 및 제5,741,957호를 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같이, 인간 면역글로불린 유전자좌를 포함하는 비인간 트랜스제닉 동물을 CD46 또는 이의 면역원성 부위로 면역화시킨다. 식물에서 항체를 제조하는 방법은 예컨대, U.S.P.N. 제6,046,037호, 및 제5,959,177호에 기술되어 있다.

[0207] 본원의 교시에 따라, 표준 트랜스제닉 기법에 의해 본 발명의 CD46 조절 인자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 분자를 동물 또는 식물 내로 도입함으로써 비인간 트랜스제닉 동물 또는 식물을 생산할 수 있다. 문헌 [Hogan] 및 미국 특히 번호 제6,417,429호를 참조할 수 있다. 트랜스제닉 동물을 제조하는 데 사용되는 트랜스제닉 세포는 배아 줄기 세포 또는 체세포 또는 수정란일 수 있다. 트랜스제닉 비인간 유기체는 키메라, 비키메라이형접합체, 및 비키메라 동형접합체일 수 있다. 예컨대, 문헌 ([Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999)]; [Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000)]; 및 [Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999)])을 참조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스제닉 비인간 동물은 표적화된 파괴 및 예를 들어, 관심의 대상이 되는 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 표적 구성체에 의한 치환을 가진다. 한 실시양태에서, 트랜스제닉 동물은 CD46에 특이적으로 결합하는 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 분자를 포함하고 발현한다. 항CD46 항체는 임의의 트랜스제닉 동물에서 제조될 수 있지만, 특히 바람직한 실시양태에서, 비인간 동물은 마우스, 래트, 양, 돼지, 염소, 소, 또는 말이다. 추가의 실시양태에서, 비인간 트랜스제닉 동물은 혈액, 젖, 뇨, 타액, 눈물, 점액 및 그로부터 당업계에 알려져 있는 정제 기법을 사용하여 원하는 약학 생성물이 쉽게 수득될 수 있는 다른 체액 중에서 원하는 약학적 생성물을 발현한다.

[0208] 상이한 세포주에 의해 또는 트랜스제닉 동물에서 발현된, 항체를 비롯한 조절 인자는 서로 상이한 당화 패턴을 가질 수 있을 것이다. 그러나, 본원에서 제공하는 핵산 분자에 의해 코딩되거나, 또는 본원에서 제공하는 아미노산 서열을 포함하는 모든 조절 인자는 그 분자의 당화 상태와는 상관없이, 및 더욱 일반적으로는 번역 후 변형(들)의 존재 또는 부재와는 상관없이 본 발명의 일부가 된다. 추가로, 본 발명은 예컨대, 당화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기, 단백질 분해 절단, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드에의 연결에 의한 유도체화 등에 의해 번역 동안 또는 그 이후에 차별적으로 변형된 조절 인자를 포함한다. 다수의 화학적 변형 중 임의의 것은 시아노겐 브로마이드, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8 프로테아제, NaBH₄에 의한 특정 화학적

절단, 아세틸화, 포르밀화, 산화, 환원, 투니카마이신의 존재하에서의 대사 합성 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 공지된 기법에 의해 수행될 수 있다. 또한 본 발명에 포함되는 다양한 번역 후 변형으로는 예를 들어, N 연결된 또는 O 연결된 탄수화물 쇄, N 말단 또는 C 말단 단부의 프로세싱, 아미노산 골격에의 화학적 모이어티 부착, N 연결된 또는 O 연결된 탄수화물 쇄의 화학적 변형, 및 원핵 숙주 세포 발현의 결과로서 N 말단 메티오닌 잔기의 부가 또는 결실을 포함한다. 또한, 본 명세서 및 하기 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, 폴리펩티드는 또한 조절 인자가 검출 및 단리될 수 있도록 하는 검출가능한 표지, 예컨대, 효소, 형광, 방사성 동위원소 또는 친화성 표지로 변형될 수 있다.

[0209] d. 정제

일단 본 발명의 조절 인자가 재조합 발현 또는 본원에 개시된 다른 기법 중 어느 하나에 의해 제조되고 나면, 당업계에 공지된 임의의 면역글로불린 정제 방법에 의해, 또는 더욱 일반적으로는 단백질을 정제시키는 임의의 다른 표준 기법에 의해 정제시킬 수 있다. 이와 관련하여, 조절 인자는 단리될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 단리된 CD46 조절 인자는 이의 천연 환경의 성분으로부터 확인되고, 분리 및/또는 회수된 것이다. 이의 천연 환경의 오염성 성분은 상기 폴리펩티드의 진단학적 또는 치료학적 사용을 방해할 수 있는 물질이며, 이는 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 단리된 조절 인자는 폴리펩티드의 천연 환경의 1 이상의 성분이 존재하지 않는 바, 재조합 세포 내에서 계내에 조절 인자를 포함한다.

재조합 기법을 사용할 때, CD46 조절 인자(예컨대, 항CD46 항체 또는 이의 유도체 또는 단편)는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생산될 수 있거나, 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 원하는 분자가 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서 미립자 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Carter, et al., Bio/Technology 10: 163 (1992)]에는 E. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 단리시키는 방법이 기술되어 있다. 간략하면, 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸су포닐플루오라이드(PMSF)의 존재하에 약 30분에 걸쳐 세포 페이스트를 해동시킨다. 원심분리에 의해 세포 잔해를 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비된 경우에는 일반적으로 상기 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유니트를 이용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제시키기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 프로테아제 억제제 예컨대, PMSF를 포함시킬 수 있고, 우발성 오염물질의 성장을 막기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

세포로부터 제조된 조절 인자(예컨대, fc-CD46 또는 항CD46 항체) 조성물은 예를 들어, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있으며, 바람직한 정제 기법은 친화성 크로마토그래피이다. 단백질 A의 친화성 리간드로서의 적합성은 선택된 구성체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 종류와 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG4 중쇄에 기초한 항체를 정제하는 데 이용될 수 있다(문헌 [Lindmark, et al., J Immunol Meth 62: 1 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형과 인간 IgG3에 대해 권장된다(문헌 [Guss, et al., EMBO J 5: 1567 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 흔히 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 예컨대, 공극이 조절되는 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 매트릭스를 통해 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 유속은 더 빨라지고, 처리 시간은 단축될 수 있다. 항체가 C_{h3} 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지(J. T. Baker; 미국 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 다른 단백질 정제 기법, 예컨대, 이온 교환 칼럼 상에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 세파로스 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전 또한 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 적어도 부분적으로는 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 것이다.

[0213] XI. 접합된 CD46 조절 인자

일단 본 발명의 조절 인자를 본원의 교시에 따라 정제하고 나면, 이를 약학적으로 활성인 모이어티 또는 진단학적 모이어티 또는 생체화합성 개질체와 연결시키거나, 그에 용합시키거나, 그에 (예컨대, 공유적으로 또는 비공유적으로) 접합시키거나, 또는 다르게는 회합시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 접합체라는 용어는 광범위하게 사용되며, 회합 방법과는 상관없이, 개시된 조절 인자와 회합된 임의의 분자를 의미하는 것으로 간주된다. 이와 관련하여, 상기와 같은 접합체는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 중합체, 핵산 분자, 소분자, 모방체 작용제, 합성 약물, 무기 분자, 유기 분자 및 방사성 동위원소를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한,

상기 언급한 바와 같이, 선택된 접합체는 공유적으로 또는 비공유적으로 조절 인자에 연결될 수 있고, 적어도 부분적으로는 접합을 일으키는 데 사용되는 방법에 따라 다양한 몰비를 나타낼 수 있다.

[0215] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 선택된 특징을 부여하는 단백질, 폴리펩티드 또는 웨티드(예컨대, 생체독소, 바이오마커, 경제용 태그 등)와 접합되거나 회합될 수 있다는 것이 자명할 것이다. 더욱 일반적으로, 선택된 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩티드가 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상 또는 100개 이상의 아미노산을 포함하는 것인, 이종성 단백질 또는 폴리펩티드에 재조합적으로 융합되거나, 화학적으로 접합된(공유 및 비공유 접합, 둘 모두 포함) 조절 인자 또는 이의 단편의 용도를 포함한다. 구성체는 반드시 직접 연결될 필요는 없지만, 링커 서열을 통해 존재할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조절 인자를 특정 세포 표면 수용체에 특이적인 항체에 융합시키거나, 또는 접합시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 CD46을 발현하는 특정 세포 유형에 이종성 폴리펩티드를 표적화시키는 데 항체를 사용할 수 있다. 또한, 이종성 폴리펩티드에 융합되거나, 접합된 조절 인자는 또한 시험관내 면역검정법에 사용될 수 있고, 당업계에 공지되어 있는 정제 방법과 화합성일 수 있다. 예컨대, (국제 공개 번호 WO 93/21232; 유럽 특허 번호 EP 439,095; [Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99]; 미국 특허 번호 제5,474,981호; [Gillies et al., 1992, PNAS 89: 1428-1432]; 및 [Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452])를 참조할 수 있다.

a. 생체화합성 개질제

[0217] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 원하는 대로 조절 인자의 특징을 조정하거나, 변경시키거나, 개선시키거나, 또는 완화시키는 데 사용될 수 있는 생체화합성 개질제와 접합되거나, 또는 다르게는 그와 회합될 수 있다. 예를 들어, 생체내 반감기가 증가된 항체 또는 융합 구성체는 상대적으로 고분자량의 중합체 분자, 예컨대, 상업적으로 이용가능한 폴리에틸렌 글리콜(PEG: polyethylene glycol) 또는 유사한 생체화합성 중합체 부착에 의해 생성될 수 있다. PEG는 항체에 특이적인 특성을 부여하도록 선택될 수 있는 다수의 상이한 분자량 및 분자 배열로 수득될 수 있다는 것(예컨대, 반감기는 조정될 수 있다)을 당업자는 이해할 것이다. PEG는 상기 항체 또는 항체 단편의 N 또는 C 말단에의 PEG의 부위 특이 접합을 통해, 또는 리신 잔기 상에 존재하는 앱실론 아미노기를 통해 다기능 링커로 또는 이의 부재하에 조절 인자 또는 항체 단편 또는 유도체에 부착될 수 있다. 생물학적 활성을 최소로 손실시키는 선형 또는 분지형 중합체 유도체화가 사용될 수 있다. 접합 정도는 SDS-PAGE 및 질량 분석법에 의해 면밀히 모니터링함으로써 PEG 분자를 항체 분자에 확실히 최적으로 접합시킬 수 있다. 비처리된 PEG는 예컨대, 크기 배제 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리시킬 수 있다. 유사한 방식으로, 개시된 조절 인자는 항체 또는 항체 단편이 생체내에서 보다 안정화도록 만들기 위해, 또는 생체내에서 보다 장기간의 반감기를 가지도록 하기 위해 일부분에 접합시킬 수 있다. 기법은 당업계에 주지되어 있고, 예컨대, 국제 공개 번호 WO 93/15199, WO 93/15200, 및 WO 01/77137; 및 유럽 특허 번호 0 413,622를 참조할 수 있다. 다른 생체화합성 접합체는 당업계의 숙련가에게는 분명해져 있으며, 이는 본원의 교시에 따라 쉽게 확인될 수 있다.

b. 진단제 또는 검출제

[0219] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자, 또는 이의 단편 또는 유도체는 생물학적 분자(예컨대, 웨티드 또는 뉴클레오티드) 또는 소분자 또는 방사성 동위원소일 수 있는 진단제 또는 검출제에 접합된다. 그러한 조절 인자는 과증식성 장애의 발생 또는 진행을 모니터링하는 데, 또는 개시된 조절 인자를 포함하는 특정 요법의 효능을 측정하는 임상 테스팅의 일부로서 유용할 수 있다. 그러한 마커는 또한 선택된 조절 인자를 정제하는데, TIC를 분리 또는 단리시키는 데, 또는 임상전 방법 또는 독성학 연구에서 유용할 수 있다.

[0220] 그러한 진단 및 검출은 예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알카리성 포스파타제, 베타 갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함하는 다양한 효소; 보결분자단, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 스트렙트아비딘 및 아비딘/바이오틴; 형광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 웜밸리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린; 발광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 루미놀; 생체발광 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 루시퍼라제, 루시페린 및 에퀴린; 방사성 물질, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 탄소(^{14}C), 황(^{35}S), 삼중수소(^3H), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 및 테크네튬(^{99}Tc), 탈륨(^{201}Ti), 갈륨(^{68}Ga , ^{67}Ga), 팔라듐(^{103}Pd), 몰리브덴(^{99}Mo), 크세논(^{133}Xe), 불소(^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{66}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , 및 ^{117}Tin ; 다양

한 양전자 방출 단층촬영을 이용한 양전자 방출 금속, 비방사성 상자성 금속 이온, 및 방사성 동위원소 표지된, 또는 특이 방사성 동위원소에 접합된 분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는 검출가능한 물질에 조절 인자를 커플링시킴으로써 달성될 수 있다. 상기 실시양태에서, 적절한 검출 방법은 당업계에 주지되어 있고, 다수의 상업적 공급원으로부터 쉽게 이용할 수 있다.

[0221] 상기 언급한 바와 같이, 다른 실시양태에서, 조절 인자 또는 이의 단편은 정제 또는 진단학적 방법, 예컨대, 면역조직화학법 또는 FACs가 원활하게 이루어질 수 있도록 마커 서열, 예컨대, 웨პ티드 또는 형광단에 융합될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 마커 아미노산 서열들 중 다수는 상업적으로 이용가능한 데, 그 중에서도, 예컨대, pQE 벡터(퀴아젠)에 제공된 태그인 헥사 히스티딘 웨პ티드가 있다. 문헌 [Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824]에 기술되어 있는 바와 같이, 예를 들어, 헥사 히스티딘을 융합 단백질은 쉽게 정제될 수 있다. 정제용으로서 유용한 다른 웨პ티드로는 인플루엔자 해마글루티닌 단백질 유래의 에피토프에 상응하는 해마글루티닌 "HA" 태그(문헌 [Wilson et al., 1984, Cell 37:767] 및 "플래그" 태그(U.S.P.N. 제4,703,004호)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

c. 치료학적 모이어티

[0223] 앞에서 언급한 바와 같이, 조절 인자 또는 이의 단편 또는 유도체는 또한 치료학적 모이어티, 예컨대, 세포독소 또는 세포독성제, 예컨대, 세포증식 억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예컨대, 알파 또는 베타 방출체에 접합되거나, 연결되거나, 또는 융합되거나, 또는 다르게는 그와 화합될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 세포독소 또는 세포독성제로는 세포에 유해하고, 세포 성장 또는 생존을 억제시킬 수 있는 임의의 작용제 또는 치료학적 모이어티를 포함한다. 그 예로는 파클리탁셀, 사이토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티디움 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신, 메이탄시노이드, 예컨대, DM-1 및 DM-4(이뮤노젠, 인코퍼레이티드(Immunogen, Inc.)), 디온, 미토크산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 에피루비신, 및 사이클로포스파미드 및 이의 유사체 또는 동족체를 포함한다. 추가의 세포독소로는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE: monomethyl auristatin E) 및 모노메틸 아우리스타틴 F(MMAF: monomethyl auristatin F)(시애틀 제네티스, 인코퍼레이티드(Seattle Genetics, Inc.))를 비롯한 아우리스타틴, 아마니틴, 예컨대, 알파 아마니틴, 베타 아마니틴, 감마 아마니틴 또는 엡실론 아마니틴(하이델베르크 파마 아게(Heidelberg Pharma AG)), DNA 마이너 그루브 결합제, 예컨대, 듀오카르마이신 유도체(신타르가, B.V.(Syntarga, B.V.)) 및 개질된 피롤로벤조디아제핀 이량체(PBD: pyrrolobenzodiazepine dimer, 스피로겐, 리미티드(Spirogen, Ltd))를 포함한다. 추가로, 한 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 세포독성 T 세포를 동원하여 종양 개시 세포를 표적하기 위해 항CD3 결합 분자와 화합될 수 있다(BiTE 테크놀로지(BiTE Technology); 예컨대, 문헌 [Fuhrmann, S. et. al. Annual Meeting of AACR Abstract No. 5625 (2010)] (이는 본원에 참고로 포함된다) 참조).

[0224] 추가의 화합성 치료학적 모이어티로는 항대사산물(예컨대, 메토트렉세이트, 6-미캡토퓨린, 6-티오구아닌, 사이타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카뮤스틴(BSNU) 및 로뮤스틴(CCNU), 사이클로토스파미드, 부술판, 디브로모만닛톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(이전에는 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(이전에는 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신(AMC)) 및 항유사분열제(예컨대, 빙크리스틴 및 빈블라스틴)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 세포독성제를 포함한다. 치료학적 모이어티에 관한 보다 광범위한 목록은 PCR 공보 WO 03/075957 및 U.S.P.N. 제2009/0155255호(이들은 각각 본원에 참고로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다.

[0225] 선택된 조절 인자는 또한 치료학적 모이어티, 예컨대, 방사성금속 이온을 접합시키는 데 유용한 거대고리 킬레이터 또는 방사성 물질에 접합될 수 있다(예를 들어, 방사성 물질에 대해 상기 참조). 특정 실시양태에서, 거대고리 킬레이터는 링커 분자를 통해 항체에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도테칸-N,N',N",N"-테트라아세트산(DOTA)이다. 그러한 링커 분자는 통상 당업계에 공지되어 있고, 문헌 ([Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483]; [Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553]; 및 [Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943])에 기술되어 있다.

[0226] 본 발명의 상기 측면과 화합성일 수 있는 방사성 동위원소의 예로는 요오드(^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), 탄소(^{14}C), 구리(^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu), 황(^{35}S), 삼중수소(^3H), 인듐(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), 비스무트(^{212}Bi , ^{213}Bi), 테크네튬

(⁹⁹Tc), 탈륨(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³Pd), 몰리브덴(⁹⁹Mo), 크세논(¹³³Xe), 불소(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, ¹¹⁷Tin, ²²⁵Ac, ⁷⁶Br, 및 ²¹¹At를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 방사성 핵종 또한 진단제 및 치료제로서 이용가능하며, 특히, 에너지 범위가 60 내지 4,000 keV인 것이 그러하다. 치료하고자 하는 병증 및 원하는 치료학적 프로파일에 따라, 당업자는 개시된 조절 인자와 함께 사용하기에 적절한 방사성 동위원소를 쉽게 선택할 수 있다.

[0227]

본 발명의 CD46 조절 인자는 또한 주어진 생물학적 반응을 개질시키는 치료학적 모이어티 또는 약물에 접합될 수 있다. 즉, 본 발명과 화합성인 치료제 또는 모이어티가 고전적 화학 치료제로 제한하는 것으로서 해석되서는 안된다. 예를 들어, 특히 바람직한 실시양태에서, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 이의 단편일 수 있다. 그러한 단백질로는 예를 들어, 독소, 예컨대, 아브린, 리신 A, 온코나제(또는 또 다른 세포독성 RN아제), 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소, 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예컨대, 종양 괴사 인자, α 인터페론, β 인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성인자, 아포프토시스제, 예컨대, TNF α , TNF β , AIM I(국제 공개 번호 WO 97/33899 참조), AIM II(국제 공개 번호 WO 97/34911 참조), Fas 리간드(문헌 [Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567]), 및 VEGI(국제 공개 번호 WO 99/23105 참조), 혈전제 또는 항혈관신생제, 예컨대, 안지오스타틴 또는 엔도스타틴; 또는 생물학적 반응 개질제, 예컨대, 림포카인(예컨대, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor"), 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF: granulocyte colony stimulating factor")), 또는 성장 인자(예컨대, 성장 호르몬("GH: growth hormone"))을 포함할 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 조절 인자를 폴리펩티드 모이어티에 융합 또는 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 앞서 개시된 대상 참고 문헌 이외에도, 예컨대, (U.S.P.N. 제5,336,603호; 제5,622,929호; 제5,359,046호; 제5,349,053호; 제5,447,851호; 및 제5,112,946호; EP 307,434; EP 367, 166; PCT 공보 WO 96/04388 및 WO 91/06570; [Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535]; [Zheng et al., 1995, J Immunol 154:5590]; 및 [Vil et al., 1992, PNAS USA 89:11337])(이들 각각은 본원에 참고로 포함된다)을 참조할 수 있다. 조절 인자와 모이어티의 회합이 반드시 적접적일 필요는 없지만, 이는 링커 서열을 통해 이루어질 수 있다. 그러한 링커 분자는 통상 당업계에 공지되어 있고, 이는 문헌 ([Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res 4:2483]; [Peterson et al., 1999, Bioconjug Chem 10:553]; [Zimmerman et al., 1999, Nucl Med Biol 26:943]; [Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53: 171])(이들 각각은 본원에 포함된다)에 기술되어 있다.

[0228]

더욱 일반적으로, 치료학적 모이어티 또는 세포독성제를 조절 인자에 접합시키는 기법은 주지되어 있다. 모이어티는 알데히드/쉬프(Schiff) 결합, 슬프하이드릴 결합, 산 불안정성 결합, 시스 아코니틸 결합, 히드라존 결합, 효소적으로 분해가능한 결합을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 조절 인자에 접합될 수 있다(일반적으로, 문헌 [Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53:171] 참조). 또한, 예컨대, 문헌 ([Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]; [Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)]; [Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)]; ["Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)] 및 [Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119])를 참조할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 치료학적 모이어티 또는 세포독성제에 접합된 CD46 조절 인자는 세포 표면과 회합된 CD46 분자에의 결합시 세포에 의해 내재화됨으로써 치료학적 페이로드를 전달할 수 있다.

[0229]

XII. 진단제 및 스크리닝

[0230]

언급한 바와 같이, 본 발명은 과증식성 장애를 검출 또는 진단하는 방법, 및 종양 개시 세포를 확인하기 위해 환자로부터 세포를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 환자로부터 수득된 시료를 본원에 기술된 바와 같은 CD46 조절 인자와 접촉시키고, 시료 중 결합형 또는 유리형 CD46의 존재 여부, 또는 그에의 조절 인자의 회합 수준을 검출하는 것을 포함하는, 암의 치료를 위해, 또는 암의 진행을 모니터링하기 위해 암을 앓는 개체

를 확인하는 단계를 포함한다. 조절 인자가 항체 또는 이의 면역학적으로 활성인 단편을 포함할 때, 시료 중 CD46과의 회합은 시료가 종양 영구 세포(예컨대, 암 줄기 세포)를 함유할 수 있다는 것으로 나타내는 것이며, 이는 암을 앓는 개체가 본원에 기술된 CD46 조절 인자로 효과적으로 치료될 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 본 방법은 대조군에의 결합 수준과 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 대조적으로, 선택된 조절 인자가 Fc-CD46일 경우, 시료와 접촉하였을 때 본원에 기술된 분자의 효소적 특성을 (직접적으로 또는 간접적으로) 모니터링함으로써 원하는 정보를 제공할 수 있다. 본원의 교시와 화합성인 다른 진단 방법은 당업계에 주지되어 있고, 이는 시판 물질, 예컨대, 전용 리포팅 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.

[0231] 화합성 검정 방법의 예로는 방사선면역검정법, 효소 면역검정법, 경쟁 결합 검정법, 형광 면역검정법, 면역불특정법, 웨스턴 블로트 분석, 유세포 분석 검정법, 및 ELISA 검정법을 포함한다. 더욱 일반적으로, 생물학적 시료 중 CD46의 검출 또는 CD46의 효소적 활성(또는 이의 억제) 측정은 당업계에 공지된 임의의 검정법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0232] 또 다른 측면에서, 및 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같이, 본 발명은 본원에 기술된 조절 인자, 및 조절 인자가 시료에 미치는 영향을 검출하기 위한 시약을 포함하는, 과증식성 장애를 검출, 모니터링, 또는 진단하기 위한, 환자에서 상기 장애의 가능한 치료를 위해 또는 이의 진행(또는 퇴행)을 모니터링하기 위해 장애를 앓는 개체를 확인하기 위한 키트를 제공한다.

[0233] CD46 조절 인자 및 세포, 이의 자손을 비롯한 상기의 것을 포함하는 배양물, 집단 및 조성물 또한 CD46과의 상호작용에 의해 종양 개시 세포 또는 이의 자손의 기능 또는 활성에 영향을 미치는 화합물 또는 작용제(예컨대, 약물)(예컨대, 폴리펩티드 또는 이의 유전적 성분)를 스크리닝 또는 확인하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 CD46 또는 이의 기질과의 회합에 의해 종양 개시 세포 또는 이의 자손의 기능 또는 활성에 영향을 미칠 수 있는 화합물 또는 작용제를 평가 또는 확인하기 위한 시스템 및 방법을 제공한다. 그러한 화합물 및 작용제는 예를 들어, 과증식성 장애 치료를 위해 스크리닝되는 약물 후보일 수 있다. 한 실시양태에서, 시스템 또는 방법은 CD46을 나타내는 종양 개시 세포 및 화합물 또는 작용제(예컨대, 약물)을 포함하는데, 여기서, 세포 및 화합물 또는 작용제(예컨대, 약물)는 서로 접촉하는 것이다.

[0234] 본 발명은 추가로 종양 개시 세포 또는 자손 세포의 활성 또는 기능을 변경시키기 위한 CD46 조절 인자 또는 작용제 및 화합물을 스크리닝 및 확인하기 위한 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 종양 개시 세포 또는 이의 자손을 테스트 작용제 또는 화합물과 접촉시키는 단계; 및 테스트 작용제 또는 화합물이 CD46^고 종양 개시 세포의 활성 또는 기능을 조절하는지 여부를 측정하는 단계를 포함한다.

[0235] 집단 내에서 상기 종양 개시 세포 또는 이의 자손의 CD46과 관련된 활성 또는 기능을 조절하는 테스트 작용제 또는 화합물은 테스트 작용제 또는 화합물이 활성제인 것으로 확인된다. 조절될 수 있는 활성 또는 기능의 예로는 세포 형태 변화, 마커 발현, 분화 또는 탈분화, 성숙, 증식, 생존능, 아포프토시스 또는 세포 사멸 신경세포 전구 세포 또는 이의 자손을 포함한다.

[0236] 세포 또는 세포 배양물 또는 방법 단계 또는 치료와 관련하여 사용될 때, 접촉이란 조성물(예컨대, CD46^고 세포 또는 세포 배양물)과 또 다른 참조 실체 사이의 직접 또는 간접적인 상호작용을 의미한다. 간접적인 상호작용의 특정 예는 조성물이 중간 분자에 작용하고, 결국에는 이 중간 분자가 참조 실제(예컨대, 세포 또는 세포 배양물)에 작용하는 경우이다.

[0237] 이러한 본 발명의 측면에서, 조절하다라는 것은 본 발명의 종양 개시 세포 또는 자손 세포의 특정 측면과 관련하여 측정된 세포 활성 또는 기능(예컨대, 전이 또는 증식)에 미치는 효과를 검출하는 것과 화합성인 방식으로 종양 개시 세포 또는 자손 세포의 활성 또는 기능에 영향을 미치는 것을 나타낸다. 활성 및 기능의 예로는 형태, 발생상 마커, 분화, 증식, 생존능, 세포 호흡, 미토콘드리아 활성, 막 완전성, 또는 특정 병증과 관련된 마커의 발현의 측정을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 종양 개시 세포 또는 자손 세포를 화합물 또는 작용제와 접촉시키고, 본원에 개시된 바와 같이, 또는 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 종양 개시 세포 또는 자손 세포의 활성 또는 기능의 임의의 조절을 측정함으로써 화합물 또는 작용제(예컨대, 약물 후보)는 그가 종양 개시 세포 또는 자손 세포에 미치는 효과에 대해 평가될 수 있다.

[0238] 작용제 및 화합물을 스크리닝 및 확인하는 방법은 임의로 소정의 위치 또는 주소에 위치 또는 배치된 세포 어레이(예컨대, 마이크로어레이)를 포함하는, 고처리량 스크리닝에 적합한 것을 포함한다. 고처리량 로보트식 또는 수동식 처리 방법은 단시간에 다수의 유전자의 화학적 상호작용을 프로빙할 수 있고, 발현 수준을 측정할 수 있다. 분자 신호(예컨대, 형광단) 및 초고속으로 정보를 프로세싱하는 자동 분석 연구를 사용하는 기법이 개발되

었다(예컨대, 문헌 [Pinhasov et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 7: 133 (2004)] 참조). 예를 들어, 마이크로어레이 기술은 특정 유전자에 대한 정보를 제공함과 동시에, 수천여 개의 유전자의 상호작용을 동시에 프로빙하는 데 광범위하게 사용되었다(예컨대, 문헌 [Mocellin and Rossi, Adv. Exp. Med. Biol. 593: 19 (2007)] 참조).

[0239] 상기와 같은 스크리닝 방법(예컨대, 고처리량)을 통해 신속하게 효율적으로 활성제 및 화합물을 확인할 수 있다. 예를 들어, 잠재적으로 치료학적 성질을 띠는 분자를 확인하기 위해 세포를 배양 디쉬, 튜브, 플라스크, 롤러 병 또는 플레이트(예컨대, 단일 다중 웰 플레이트 또는 디쉬, 예컨대, 8, 16, 32, 64, 96, 384 및 1,536 다중 웰 플레이트 또는 디쉬) 상에, 임의로는 정의된 위치에 위치 또는 배치시킬 수 있다(사전에 시팅시켜 놓을 수 있다). 스크리닝될 수 있는 라이브러리로는 예를 들어, 소분자 라이브러리, 파지 디스플레이 라이브러리, 완전 인간 항체 효모 디스플레이 라이브러리(아디맙, LLC(Adimab, LLC)), siRNA 라이브러리, 및 아데노바이러스 형질감염 벡터를 포함한다.

XIII. 약학 조제물 및 치료학적 용도

a. 제제화 및 투여 경로

[0242] 어떤 임의의 접합체, 의도하는 전달 방식, 치료 또는 모니터링되는 질환, 및 다수의 다른 변수와 함께 조절 인자의 형태에 따라서, 본 발명의 조성물은 당업계에 알려져 있는 기법을 사용하여 원하는 대로 제제화될 수 있다. 즉, 본 발명의 다양한 실시양태에서, CD46 조절 인자를 포함하는 조성물은 매우 다양한 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제제화된다(예컨대, 문헌 ([Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)]; [Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)]; [Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)]) 참조). 비히클, 애주번트, 및 희석제를 비롯한, 다양한 약학적으로 허용가능한 담체가 다수의 상업적 공급원으로부터 쉽게 이용될 수 있다. 또한, 각종 약학적으로 허용가능한 보조 물질, 예컨대, pH 조정제 및 완충화제, 등장성 조정제, 안정제, 습윤제 등도 또한 이용가능하다. 담체의 특정의 비제한적인 예로는 염수, 완충처리된 염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이의 조합을 포함한다.

[0243] 더욱 특히, 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료학적 조성물은 순수하게, 또는 최소량의 추가의 성분과 함께 투여될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대조적으로, 본 발명의 CD46 조절 인자는 임의로, 당업계에 주지되어 있으며, 조절 인자의 투여를 용이하게 하거나, 활성 화합물을 작용 부위로 전달하기 위해 약학적으로 최적화된 제제로 프로세싱하는 것에 도움을 주는, 상대적으로 불활성인 물질인 부형제 및 보조제를 포함하는 적합한 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 제제로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 부형제는 조절 인자의 약동학적 성질을 개선시킬 수 있는 형태 또는 점조도를 제공하거나, 또는 희석제로서의 역할을 할 수 있다. 적합한 부형제로는 안정화제, 습윤제, 및 유화제, 다양한 삼투압의 염, 캡슐화제, 완충제, 및 피부 침투 증진제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0244] 전신 투여를 위한 개시된 조절 인자는 장관, 비경구 또는 국부 투여용으로 제제화될 수 있다. 사실상, 활성 성분을 동시에 전신 투여하기 위해 3가지 유형의 제제가 모두 사용될 수 있다. 부형제 뿐만 아니라, 비경구, 및 비경구를 제외한 약물 전달용 제제가 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000)]에 기술되어 있다. 비경구 투여용으로 적합한 제제로는 수용성 형태, 예를 들어, 수용성 염 형태의 활성 화합물 수성 액제를 포함한다. 추가로, 오일성 주사용 혼탁제용으로 적절한 활성 화합물의 혼탁액이 투여될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클로는 지방유, 예를 들어, 참깨 오일, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드를 포함한다. 수성 주사용 혼탁제는 혼탁제의 점성을 증가시키는 물질을 함유할 수 있고, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 소르비톨, 및/또는 텍스트란을 포함한다. 임의로, 혼탁제는 또한 안정제도 함유할 수 있다. 리포솜은 또한 세포로의 전달을 위해 작용제를 캡슐화하는 데 사용될 수 있다.

[0245] 장관 투여용으로 적합한 제제로는 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐제, 환제, 피복된 정제를 비롯한 정제, 엘리시르, 혼탁제, 시럽제 또는 흡입제 및 이의 방출 조절형 제형을 포함한다.

[0246] 일반적으로, CD46 조절 인자를 포함하는, 본 발명의 화합물 및 조성물은, 경구, 정맥내, 동맥내, 피하, 비경구, 비내, 근육내, 심장내, 뇌실내, 기관내, 협측, 직장, 복강내, 진피내, 국부, 경피, 및 경막내, 또는 다르게는 이식에 의해 또는 흡입에 의해서인 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않는 다양한 경로에 의해 그를 필요로 하는

피험체에게 생체내 투여될 수 있다. 대상 조성물은 캡슐제, 분제, 과립제, 연고제, 액제, 좌제, 관장제, 주사제, 흡입제, 및 에어로졸을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 고체, 반고체, 액체, 또는 기체 형태의 제제로 제제화될 수 있다. 적절한 제제화 및 투여 경로는 의도하는 적용 및 치료학적 요법에 따라 선택될 수 있다.

[0247] b. 투여량

[0248] 유사하게, 특정 투여량 요법, 즉, 용량, 타이밍 및 반복 회수는 특정 개체, 및 상기 개체의 병력에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 반감기와 같은 실험상의 고려 사항이 일반적으로는 투여량을 결정하는 데 기여할 것이다. 투여 빈도는 요법 진행 과정에 걸쳐 결정되고 조정될 수 있으며, 이는 종양 개시 세포를 비롯한 과증식성 또는 신생물성 세포 개수 감소, 상기 신생물성 세포 감소 유지, 신생물성 세포 증식 감소, 또는 전이 발생 지연에 기초한다. 별법으로, 대상 치료학적 조성물의 지속 연속형 방출 제제가 적절할 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 지속적인 방출을 위한 다양한 제제 및 장치가 당업계에 공지되어 있다.

[0249] 치료학적인 관점에서 약학 조성물은 특정 적응증의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 투여된다. 치료적 유효량은 전형적으로는 치료받는 피험체의 체중, 그 또는 그녀의 신체 상태 또는 건강 상태, 치료하고자 하는 병증의 광대함, 또는 치료받는 피험체의 연령에 따라 달라진다. 일반적으로, 본 발명의 CD46 조절 인자는 1회 투약당 약 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 내지 약 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 1회 투약당 약 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 내지 약 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다. 특정 다른 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 1회 투약당 약 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 내지 약 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다. 임의로, 본 발명의 CD46 조절 인자는 1회 투약당 약 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 내지 약 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다. 추가로 임의로, 본 발명의 CD46 조절 인자는 1회 투약당 약 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 내지 약 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 범위인 양으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 약 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 이상, 약 $250 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 이상, 약 $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ (체중) 이상, 약 $3 \text{ mg}/\text{kg}$ (체중) 이상, 약 $5 \text{ mg}/\text{kg}$ (체중) 이상, 약 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ (체중) 이상인 용량으로 투여되는 것으로 제공된다.

[0250] 다른 투약 요법은 U.S.P.N. 제7,744,877호(이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 개시된 바와 같이, 체표면적(BSA: body surface area) 계산에 기초하여 예측할 수 있다. 당업계에 주지되어 있는 바와 같이, BSA는 환자의 신장 및 체중을 사용하여 계산되며, 이는 그 또는 그녀 신체의 표면적을 나타내는 피험체의 크기에 대한 척도를 제공한다. 본 발명의 선택된 실시양태에서, BSA를 사용함으로써 조절 인자를 $10 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $800 \text{ mg}/\text{m}^2$ 인 투여량으로 투여할 수 있다. 다른 바람직한 실시양태에서, 조절 인자는 $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $500 \text{ mg}/\text{m}^2$ 인 투여량으로 투여될 것이며, 더욱더 바람직하게는, $100 \text{ mg}/\text{m}^2$, $150 \text{ mg}/\text{m}^2$, $200 \text{ mg}/\text{m}^2$, $250 \text{ mg}/\text{m}^2$, $300 \text{ mg}/\text{m}^2$, $350 \text{ mg}/\text{m}^2$, $400 \text{ mg}/\text{m}^2$ 또는 $450 \text{ mg}/\text{m}^2$ 인 투여량으로 투여될 것이다. 물론, 투여량을 계산하는 방법과는 상관없이, 개별 투여보다는 실질적으로 더 높은 절대 투여량을 제공하기 위해 선택된 기간에 걸쳐 다중 투여량을 투여할 수 있다.

[0251] 어느 경우든, CD46 조절 인자는 그를 필요로 하는 피험체에게 필요에 따라 투여되는 것이 바람직하다. 투여 빈도는 치료되는 병증, 치료받는 피험체의 연령, 치료되는 병증의 중증도, 치료받는 피험체의 일반적인 건강 상태 등의 고려 사항에 기초하여 당업자, 예컨대, 주치의에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 유효량의 CD46 조절 인자는 1회 이상에 걸쳐 피험체에게 투여된다. 더욱 특히, 유효량의 조절 인자는 월 1회, 월 1회 초파, 또는 월 1회 미만으로 피험체에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 유효량의 CD46 조절 인자는 비롯한, 1개월 이상, 6개월 이상, 또는 1년 이상이라는 기간을 포함하여 다회에 걸쳐 투여될 수 있다.

[0252] 투여량 및 요법은 또한 1회 이상 투여(들)를 받은 개체에서 개시된 치료학적 조성물에서 실험적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 개체는 본원에 기술된 바와 같이 생산된 치료학적 조성물을 충분식의 투여량으로 제공받을 수 있다. 선택된 조성물의 효능을 평가하기 위해, 특정 질환, 장애, 또는 병증의 마커를 계속 지켜볼 수 있다. 개체가 암을 앓는 경우인 실시양태에서, 이는 촉진 또는 시각적 관찰을 통한 종양의 크기에 대한 직접적인 측정, x선 또는 다른 영상 기법에 의한 종양의 크기에 대한 간접적인 측정; 직접적인 종양 생검 및 종양 시료의 현미경 검사에 의해 평가된 개선; 간접적인 종양 마커(예컨대, 전립샘 암인 경우, PSA) 또는 본원에 기술된 방법에 따라 확인된 항원 측정, 동통 또는 마비 감소; 언어 능력, 시력, 호흡 또는 종양과 관련된 다른 장애 개선; 식욕 증가; 또는 승인 테스트 또는 생존 연장에 의해 측정되는 삶의 질 증진을 포함한다. 투여량은 개체, 신생물성 병증의 유형, 신생물성 병증의 병기, 신생물성 병증이 개체에서 다른 위치로 전이되기 시작하였는지 여부, 및 과거 및 현재 사용되는 치료법에 따라 달라질 수 있다는 것이 당업계의 숙련가에게는 자명할 것이다.

[0253] c. 병용 요법

[0254] 본 발명에 의해 주시된 병용 요법은 원치않는 신생물성 세포 증식(예컨대, 내피 세포)를 줄이거나, 억제하는

데, 암 발생을 줄이는 데, 암의 재발을 줄이거나 예방하는 데, 또는 암의 확산 또는 전이를 줄이거나 예방하는 데 특히 유용할 수 있다. 그러한 경우, 본 발명의 화합물은 종양 종괴(예컨대, NTG 세포)를 지지하고 영구화시키는 TPC를 제거함으로써 감작제 또는 화학감작제로서 작용할 수 있고, 용적축소제 또는 항암제에 관한 현 치료지침을 더욱 효과적으로 사용할 수 있게 한다. 즉, CD46 조절 인자 및 하나 이상의 항암제를 포함하는 병용 요법을 사용하여 확립된 암을 축소시킬 수 있고, 예컨대, 존재하는 암 세포의 개수를 줄이고/거나, 종양 부하량을 줄이거나, 1 이상의 소견 또는 암 부작용을 호전시킬 수 있다. 따라서, 병용 요법이란 CD46 조절 인자와, 세포독성제, 세포증식 억제제, 화학요법제, 표적화된 항암제, 생물학적 반응 개질제, 면역치료제, 암 백신, 항혈관신생제, 사이토카인, 호르몬 요법, 방사선 요법 및 항전이제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 항암제를 투여하는 것을 의미한다.

[0255] 본 발명의 방법에 따라, 조합된 결과가 각 치료법(예컨대, 항CD46 항체 및 항암제)이 별개로 수행되었을 때 관찰되는 효과의 가산적인 것일 필요는 없다. 일반적으로는, 적어도 가산 효과가 바람직하지만, 단일 요법들 중 하나의 것보다 더 큰 임의의 증가된 항종양 효과가 이익이 된다. 추가로, 본 발명은 병용된 치료법이 시너지 효과를 보이는 것을 필요로 하지 않는다. 그러나, 바람직한 실시양태를 포함하는 특정 선택된 병용법을 이용하면 시너지 작용이 관찰될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0256] 본 발명에 따른 병용 요법을 수행하기 위해, 하나 이상의 항암제와 함께 병용되는 CD46 조절 인자(예컨대, 항CD46 항체)를 그를 필요로 하는 피험체에게 피험체 내에서 항암 활성을 효과적으로 일으키는 방식으로 투여할 수 있다. CD46 조절 인자 및 항암제는 원하는 바에 따라 종양 환경에서 그들이 조합하여 존재할 수 있게 하고, 그들이 조합된 작용할 수 있도록 하는 데 효과적인 양으로 및 효과적인 기간 동안 제공한다. 이러한 목적을 달성하기 위해, CD46 조절 인자 및 항암제는 단일 조성물로, 또는 동일한 또는 상이한 투여 경로를 이용하여 2개 이상의 별개의 조성물로 동시에 피험체에게 투여될 수 있다.

[0257] 별법으로, 조절 인자는 예컨대, 수분 내지 수주 범위의 간격을 두고 항암제 치료 이전에 또는 그 이후에 진행될 수 있다. 항암제 및 항체가 피험체에게 별개로 적용되는 경우인 특정 실시양태에서, 각 전달 시간 사이의 기간은 항암제 및 조절 인자가 종양에 대해 병용 효과를 발휘할 수 있도록 하는 기간이어야 한다. 특정 실시양태에서, 항암제 및 CD46 조절 인자, 둘 모두 서로 약 5분 내지 약 2주 이내에 투여되는 것이 고려된다.

[0258] 추가의 다른 실시양태에서, 조절 인자 및 항암제 투여 사이에 수일(2, 3, 4, 5, 6 또는 7일), 수주(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주) 또는 수개월(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개월)이 경과할 수 있다. CD46 조절 인자 및 하나 이상의 항암제(병용 요법)는 1회, 2회, 또는 적어도 병증이 치료, 완화 또는 치유될 때까지 그 기간 동안 투여될 수 있다. 바람직하게, 병용 요법은 다회에 걸쳐 수행된다. 병용 요법은 1일 3회 내지 매 6개월마다 1회씩으로 투여될 수 있다. 예컨대, 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일마다 1회, 3일마다 1회, 주 1회, 매 2주마다 1회, 매주 1회, 매 2개월마다 1회, 매 3개월마다 1회, 매 6개월마다 1회인 스케줄로 투여될 수 있거나, 또는 미니펌프를 통해 연속적으로 투여될 수 있다. 앞서 언급된 바와 같이, 병용 요법은 경구, 점막, 협측, 비내, 흡인식, 정맥내, 피하, 근육내, 비경구, 종양내, 또는 국부 경로를 통해 수행될 수 있다. 병용 요법은 종양 부위로부터 원거리에 있는 부위에서 수행될 수 있다. 병용 요법은 일반적으로 병용 요법이 종양 또는 암의 성장을 멈추게 하거나, 이의 증량 또는 용적을 줄인다면, 종양이 존재하는 한은 수행될 것이다.

[0259] 한 실시양태에서, CD46 조절 인자는 암을 치료하기 위해 암 환자에게 짧은 치료 주기 동안 하나 이상의 항암제와 함께 투여된다. 항체를 사용하는 치료 기간은 사용되는 특정 항암제에 따라 달라질 수 있다. 본 발명은 또한 불연속 투여 또는 수개의 부분 투여로 분할된 1일 투약을 고려한다. 특정 항암제에 대해 적절한 치료 시간에 대해서는 당업자는 이해할 것이고, 본 발명은 각 항암제에 대해 최적의 치료 스케줄을 연속적으로 평가하는 것을 고려한다.

[0260] 본 발명은 병용 요법이 수행되는 기간 동안 1 이상의 주기, 바람직하게는 1 초과의 주기를 고려한다. 1 주기로 적절한 기간은 총 주기 회수 및 주기 사이의 간격과 같이 당업자가 이해할 것이다. 본 발명은 각 조절 인자 및 항암제에 대해 최적의 치료 스케줄을 연속적으로 평가하는 것을 고려한다. 또한, 본 발명은 또한 항CD46 항체 또는 항암제 중 어느 하나를 1회 초과로 투여하는 것을 제공한다. 조절 인자 및 항암제는 격일로 또는 격주로 상호교환적으로 투여될 수 있거나; 또는 일련의 항체 치료 후, 이어서 항암제 요법 치료를 1회 이상으로 수행할 수 있다. 어느 경우든, 당업계의 숙련가가 이해하고 있는 바와 같이, 화학요법제의 적절한 용량은 일반적으로 대량적으로 화학요법제가 단독으로 투여되거나, 또는 다른 화학요법제와 함께 병용하여 투여되는 임상 요법에서 이미 사용되고 있는 용량이 될 것이다.

[0261] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CD46 조절 인자는 종양의 초기 발현 이후 종양 재발의 기회를 감소

또는 제거하는 유지 요법에서 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 장애는 치료되고, 초기 종양 종괴는 제거되거나, 감소되거나, 또는 다르게는 호전되어 환자는 무증상이거나 병에 차도가 있게 된다. 그러한 시간 동안 비록 표준 진단학적 방법을 사용하여 질환의 적응증이 거의 없거나, 전혀 없을지라도 피험체는 약학적 유효량의 개시된 효과기를 1회 이상 투여받을 수 있다. 일부 실시양태에서, 효과기는 일정 기간 동안에 걸쳐 정기적으로 투여될 것이다. 예를 들어, CD46 조절 인자는 매주, 매 2주마다, 매월, 매 6주마다, 매 2개월마다, 매 3개월마다, 매 6개월마다, 또는 매년 투여될 수 있다. 본원의 교시를 고려해 볼 때, 당업자는 질환 재발의 가능성을 감소시키는 데 바람직한 투여량 및 투약 요법을 쉽게 결정할 수 있다. 또한, 상기와 같은 치료법은 수주, 수개월, 수년 또는 짧지만은 환자 반응 및 임상적 및 진단학적 파라미터에 따라 무기한으로 계속될 수 있다.

[0262]

추가의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 효과기는 예방학적으로 용적축소술(debulking procedure) 이후 종양이 전이될 가능성을 막거나, 그러한 가능성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 본 개시내용에서 사용되는 바, 용적축소술이란 광범위하게 정의되며, 이는 종양 또는 종양 증식을 제거, 감소, 치료 또는 호전시키는 임의의 수술, 기법 또는 방법을 의미하여야 한다. 용적축소술의 예로는 수술, 방사선 치료(즉, 빔 조사), 화학요법 또는 절제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 종양 전이를 감소시키는 임상적 및 진단학적 방법에 의해 제안되는 바와 같이 본 개시내용을 고려하여 당업자에 의해 쉽게 결정되는 적절한 시점에 CD46 조절 인자는 투여될 수 있다. 효과기는 표준 기법을 사용하여 결정되는 바와 같은 약학적 유효 투여량으로 1회 이상에 걸쳐 투여될 수 있다. 바람직하게, 투약 요법은 필요에 따라 이를 변형시킬 수 있는 적절한 진단학적 기법 또는 모니터링 기법을 동반할 것이다.

[0263]

d. 항암제

[0264]

본원에서 사용되는 바, 항암제란 세포독성제, 세포증식 억제제, 항혈관신생제, 용적축소제, 화학요법제, 방사선요법 및 방사선치료제, 표적화된 항암제, 생물학적 반응 개질제, 항체, 및 면역치료제를 비롯한, 세포 증식성 장애, 예컨대, 암을 치료하는 데 사용될 수 있는 임의의 작용제를 의미한다. 상기 논의된 바와 같은 선택된 실시양태에서, 항암제는 접합체를 포함할 수 있고, 투여 전에 조절 인자와 함께 희합될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0265]

세포독성제라는 용어는 세포의 기능을 줄이거나 억제시키고/거나, 세포를 파괴시키는 물질을 의미하며, 즉, 그러한 물질은 세포에 대해 독성을 띤다. 전형적으로 상기 물질은 살아있는 유기체로부터 유래된 천연적으로 발생된 분자이다. 세포독성제의 예로는 박테리아의 소분자 독소 또는 효소적으로 활성인 독소(예컨대, 디프테리아독소, 슈도모나스 내독소 및 외독소, 스타필로코쿠스(*Staphylococcal*) 장독소 A), 진균(예컨대, a 사르신, 레스트릭토신), 식물(예컨대, 아브린, 리신, 모데신, 비스쿠민, 포크위드 항바이러스 단백질, 사포린, 젤로닌, 모모리딘, 트리코산틴, 보리 독소, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토락카아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스트릭토신, 페노마이신, 네오마이신 및 트리코테센) 또는 동물, 예컨대, 세포독성 RN아제, 예컨대, 세포외 췌장 RN아제; DN아제 I와 이의 단편 및/또는 변이체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0266]

화학요법제란 암 세포의 성장, 증식, 및/또는 생존을 비특이적으로 줄이거나 억제시키는 화합물(예컨대, 세포독성 또는 세포증식 억제제)을 의미한다. 그러한 화학제는 대개 세포 성장 또는 분열에 필요한 세포내 과정으로 지시되고, 따라서, 일반적으로는 빠르게 성장하고 분열하는 암성 세포에 대해 특히 효과적이다. 예를 들어, 빙크리스틴은 미세소관을 탈중합화시켜 세포가 유사분열로 진입하지 못하도록 막는다. 일반적으로, 화학요법제로는 암성 세포, 또는 암성이 될 가능성이 있거나, 종양발생 자손(예컨대, TIC)을 생성할 가능성이 있는 세포를 억제하도록 디자인된 임의의 화학제를 포함할 수 있다. 그러한 작용제는 대개 병용하여, 예컨대, 제법 CHOP로 투여되고, 대개 이때 가장 효과적이다.

[0267]

본 발명의 조절 인자와 함께 병용하여(또는 이에 접합되어) 사용될 수 있는 항암제의 예로는 알킬화제, 알킬 술포네이트, 아지리딘, 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 아세토게닌, 캄포테신, 브리오스타틴, 칼리스타틴, CC-1065, 크립토피신, 돌라스타틴, 듀오카르마이신, 엘레우테로빈, 판크라티스타틴, 사르코딕티인, 스폰지스타틴, 질소머스타드, 항생제, 엔다이인 항생제, 다이네미신, 비스포스포네이트, 에스페라미신, 색소 단백질 엔다이인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 카루비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®] 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신(esorubicin), 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 퓨로마이신, 쿠

엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조토신, 투베르시딘, 유베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사산물, 폴산 유사체, 퓨린 유사체, 안드로겐, 항부신성 제제, 폴산 보충제, 예컨대, 폴린산, 아세글라톤, 알도포스파미드 글리코시드, 아미노레불린산, 에닐루라실, 암사크린, 베스트라부실, 비산트렌, 에다트렉세이트, 데포파민, 데메콜신, 디아지린, 에플로르니틴, 엘립티늄 아세테이트, 에포틸론, 에토글루시드, 질산갈륨, 하이드록시우레아, 레티난, 로니다민, 메이탄시노이드, 미토구아존, 미토크산트론, 모피다몰, 니트라에린, 페토스타틴, 페나메트, 피라루비신, 로소크산트론, 포도필린산, 2-에틸하이드라지드, 프로카바진, PSK® 다당류 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products: 미국 오리건주 유진), 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아진산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히, T-2 독소, 베루카린 A, 로로딘 A 및 안카딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피로브로만; 가시토신; 아리비노시드("Ara-C")); 사이클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 클로람부실; 캠자르(GEMZAR)® 캠시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토크산트론; 빙크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(캄프토사르, CPT-11), 토포이소마라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드; 카페시타빈; 콤브레타스타틴; 류코보린(LV); 옥살리플라틴; 세포 증식을 감소시키는 PKC-알파, Raf, H-Ras, EGFR 및 VEGF-A의 억제제 및 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용가능한 염, 산, 또는 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제시키는 역할을 하는 항호르몬제, 항에스트로겐제 및 선택성 에스트로겐 수용체 조절 인자(SERM: selective estrogen receptor modulator), 피신에서의 에스트로겐 생산을 조절하는 효소 아로마타제를 억제시키는 아로마타제 억제제, 및 항안드로겐제; 뿐만 아니라, 트록사시타빈(1,3-디옥소란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드; 리보자임, 예컨대, VEGF 발현 억제제 및 HER2 발현 억제제; 백신, 프로류킨(PROLEUKIN)® rIL-2; 루트로테칸(LURTOTECAN)® 토포이소마라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)® rmRH; 비노렐빈 및 에스페라미신 및 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용가능한 염, 산, 또는 유도체 또한 본 정의에 포함된다. 다른 실시양태는 리툭시맙, 트라스투주맙, 캡투주맙 오조가미신, 알렌투주맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 토시투모맙, 베바시주맙, 세툭시맙, 파니투무맙, 오파투무맙, 이필리무맙 및 브렌툭시맙 베도틴을 포함하나, 이에 한정되지 않는 암 요법용으로 승인받은 항체의 용도를 포함한다. 당업자는 본원의 교시와 화합성인 추가의 항암제를 쉽게 확인할 수 있을 것이다.

[0268]

e. 방사선 요법

[0269]

본 발명은 또한 CD46 조절 인자와 방사선 요법(즉, 종양 세포 내에서 국소적으로 DNA 손상을 유도하기 위한 기전, 예컨대, 감마 조사, X선, UV 조사, 마이크로파, 전자 방출 등)을 병용하는 것을 제공한다. 방사성 동위원소를 종양 세포에 직접 전달하는 병용 요법 또한 고려되며, 이는 표적화된 항암제 또는 다른 표적화 수단과 함께 사용될 수 있다. 전형적으로, 방사선 요법은 약 1 내지 약 2주 동안의 기간에 걸쳐 펄스로 수행된다. 방사선 요법은 약 6 내지 7주 동안 두부경부암 피험체에게 수행될 수 있다. 임의로, 방사선 요법은 단일 선량 또는 다회, 순차적 선량으로 수행될 수 있다.

[0270]

f. 신생물성 병증

[0271]

본 발명의 CD46 조절 인자가 단독으로 또는 항암제 또는 방사선 요법과 함께 병용하여 투여되는 간에, 상기 CD46 조절 인자는 일반적으로는 약성 또는 악성 종양(예컨대, 신장 종양, 간 종양, 신장 종양, 방광 종양, 유방 종양, 위 종양, 난소 종양, 결장직장 종양, 전립샘 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 갑상샘 종양, 간암종; 육종; 아교모세포종; 및 다양한 두부경부 종양); 백혈병 및 팀프성 악성 종양; 다른 장애, 예컨대, 신경세포, 아교세포, 성상세포, 시상하부 및 다른 샘, 대식세포, 상피, 기질 및 블라스토코엘릭 장애; 및 염증성, 혈관신생, 면역성 장애 및 병원체에 의해 유발되는 장애를 포함할 수 있는, 환자 또는 피험체에서의 신생물성 병증을 치료하는 데 특히 유용하다. 본 발명의 치료학적 조성물 및 방법으로 치료하는 데 특히 바람직한 표적은 고형 종양을 포함하는 신생물성 병증이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 조절 인자는 혈액 악성 종양의 진단, 예방, 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 비록 본원에서 사용되는 바, 피험체 또는 환자라는 용어가 임의의 포유동물 종을 포함하는 것으로 명백하게 간주되고 있기는 하지만, 치료하고자 하는 피험체 또는 환자는 인간이 될 것이다.

[0272]

더욱 구체적으로, 본 발명에 따라 치료를 받게 되는 신생물성 병증은 부신 종양, AIDS관련 암, 포상 연부 육종, 성상세포 종양, 방광암(편평 세포 암종 및 이행 세포 암종), 골암(사기질종, 동맥류 뼈 낭종, 골연골종, 골육종), 뇌척수암, 전이성 뇌 종양, 유방암, 경동맥소체 종양, 자궁경부암, 연골육종, 척색종, 혐색소 신장 세

포 암종, 투명세포 암종, 결장암, 결장직장암, 피부 양성 섬유성 조직구종, 섬유조직형성 소원형 세포 종양, 뇌 실막세포종, 유잉 종양, 골외성 점액모양 연골육종, 골성 불완전 섬유 생성증, 골 섬유형성이상, 담낭암 및 담관암, 임신영양막병, 생식 세포 종양, 두부경부암, 섬세포 종양, 카포시 육종, 신장암(신장아세포종, 유두상 신장 세포 암종), 백혈병, 지방종/양성 지방종성 종양, 지방육종/악성 지방종성 종양, 간암(간아세포종, 간세포 암종), 림프종, 폐암(소세포 암종, 샘암종, 편평 세포 암종, 대세포 암종 등), 수모세포종, 흑색종, 수막종, 다발성 내분비샘 신생물, 다발성 골수종, 골수형성 이상 증후군, 신경아세포종, 신경내분비 종양, 난소암, 췌장암, 유두상 갑상샘 암종, 부갑상샘 종양, 소아암, 말초신경초 종양, 크롬친화세포종, 뇌하수체 종양, 전립 샘암, 후방 포도막 흑색종, 희귀 혈액 장애, 전이성 신장암, 횡문근양 종양, 횡문근육종, 육종, 피부암, 연조직 육종, 편평 세포 암, 위암, 윤활막 육종, 고환암, 가슴샘 암종, 가슴샘종, 전이성 갑상샘암, 및 자궁암(자궁경부 암종, 자궁내막 암종, 및 평활근종)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 바람직한 실시양태에서, 암성 세포는 유방암, 비소세포 폐암(NSCLC: non-small cell lung cancer), 소세포 폐암, 췌장암, 결장암, 전립샘암, 육종, 전이성 신장암, 갑상샘 전이성 암, 및 투명세포 암종을 포함하나, 이에 한정되지 않는 고형 종양 군으로부터 선택된다.

[0273]

혈액 악성 종양과 관련하여, 본 발명의 화합물 및 방법은 저등급/NHL 난포 세포 림프종(FCC: follicular cell lymphoma), 외투 세포 림프종(MCL: mantle cell lymphoma), 미만성 대세포 림프종(DLCL: diffuse large cell lymphoma), 소림프구(SL: small lymphocytic) NHL, 중등급/난포 NHL, 중등급 미만성 NHL, 고등급 면역아세포 NHL, 고등급 림프아구성 NHL, 고등급 소비분할 세포 NHL, 거대 질환 NHL, 월덴스트룀 마크로글로불린혈증 (Waldenstrom's macroglobulinemia), 림프형질세포성 림프종(LPL: lymphoplasmacytoid lymphoma), 외투 세포 림프종(MCL), 난포 림프종(FL: follicular lymphoma), 미만성 대세포 림프종(DLCL), 버킷 림프종(BL: Burkitt's lymphoma), AIDS 관련 림프종, 단핵구 B 세포 림프종, 혈관면역아세포 림프절병증, 소림프구, 난포, 미만성 대세포, 미만성 소분할 세포, 대세포 면역아세포 림프아세포종, 소비분할, 버킷 및 비버킷, 난포, 주로 대세포; 난포, 주로 소분할 세포; 및 난포, 혼합형 소분할 및 대세포 림프종을 비롯한, 다양한 B 세포 림프종을 치료하는 데 특히 효과적일 수 있다는 것을 추가로 이해할 것이다. 문헌 ([Gaidano et al., "Lymphomas", IN CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, Vol. 2: 2131-2145 (DeVita et al., eds., 5.sup.th ed. 1997])을 참조할 수 있다. 상기 림프종은 대개 분류 체계가 달라짐에 따라 상이한 명칭을 가질 수 있고, 상이한 명칭으로 분류된 림프종을 앓는 환자 또한 본 발명의 병용 치료 요법으로 이익을 얻을 수 있다는 것이 당업자에게는 명백하여야 한다.

[0274]

추가의 다른 바람직한 실시양태에서, CD46 조절 인자는 백혈병, 예컨대, 만성 림프구 백혈병(CLL: chronic lymphocytic leukemia 또는 B CLL)을 비롯한 특정 특정 골수성 및 혈액 악성 종양을 효과적으로 치료하는 데 사용될 수 있다. CLL은 주로 50대 이후에 발병이 증가하기 시작하여 60대 후반에 최고점에 도달하는 노인성 질환이다. 일반적으로 신생물성 말초 혈액 림프구의 증식을 포함한다. CLL의 임상 소견으로는 림프구증가증, 림프절 병증, 비장비대, 빈혈 및 혈소판감소증을 포함한다. CLL의 특징적인 특성은 단일클론 B 세포 증식 및 상기 B 세포가 표면 IgM(sIgM: surface IgM) 또는 sIgM 및 sIgD, 둘 모두, 및 단일 경쇄를 정상적인 B 세포 상에서보다 더 낮은 밀도로 발현하는 경우, 중간 정도의 분화 상태에서 정지된 B 림프구의 축적이다. 그러나, 상기에서 논의되고, 본 명세서에 첨부된 실시예에서 제시되어 있는 바와 같이, 선택된 CD46 발현(예컨대, CD46)은 B CLL 세포 상에서 상향조절됨으로써 개시된 조절 인자에 대하여 관심을 끄는 표적을 제공한다.

[0275]

본 발명은 또한 양성 또는 전암성 종양을 발현하는 피험체에 대한 예방적 또는 예방학적 치료법을 제공한다. 본 발명을 사용하는 치료법으로부터 임의의 특정 유형의 종양 또는 신생물성 장애가 배제되어야 한다고는 여겨지지 않는다. 그러나, 종양 세포 유형은 2차 치료제, 특히 화학요법제 및 표적화된 항암제와 병용하여 사용되는 경우에 본 발명의 용도와 관련이 있을 수 있다.

[0276]

본 발명의 추가의 다른 바람직한 실시양태는 고형 종양을 앓는 피험체를 치료하기 위한 CD46 조절 인자의 용도를 포함한다. 상기 피험체에서, 상기 고형 종양 중 다수는 개시된 효과기를 사용하는 치료법으로 특히 쉽게 치료될 수 있도록 만들 수 있는 다양한 유전자 돌연변이를 보이는 조직을 포함한다. 예를 들어, KRAS, APC 및 CTNNB1 돌연변이는 상대적으로 결장직장암 환자에서 일반적이다. 또한, 이러한 돌연변이를 가진 종양을 앓는 환자는 보통 현 요법에 대해서 가장 난치성이다; 특히, KRAS 돌연변이를 가진 환자가 그러하다. 전형적으로 단일 아미노산 치환을 일으키는 KRAS 활성화 돌연변이 또한 폐 샘암종, 점액 샘종, 및 췌장 관암종을 비롯한, 악성 종양 치료에 대한 다른 난점과 연루되어 있다.

[0277]

현재, 결장직장암 환자가 EGFR 또는 VEGF 억제 약물에 대하여 반응할지 여부를 예측할 수 있는 가장 신뢰할 만한 방법은 특정 KRAS "활성화" 돌연변이에 대해 테스트하는 것이다. KRAS는 결장직장암 중 35-45%에서 돌연변이

화되어 있고, 종양이 돌연변이화된 KRAS를 발현하는 환자는 상기 약물에 대해 잘 반응하지 못한다. 예를 들어, KRAS 돌연변이가 결장직장암에서는 파니투무맙 및 세톡시맙 요법에 대한 반응 부족을 예측한다(문헌 [Lievre et al. *Cancer Res* 66:3992-5]; [Karapetis et al. *NEJM* 359: 1757-1765]). 결장직장암 환자 중 대략 85%는 APC 유전자에 돌연변이를 가지고 있고(문헌 [Markowitz & Bertagnolli. *NEJM* 361:2449-60]), 가족성 샘종 폴립증 및 결장직장암 환자에서 800개 초과의 APC 돌연변이에 대한 특징이 규명되어 있다. 대다수의 상기 돌연변이들을 통해 베타 카테닌 파괴를 막아줄 수 있는 기능성 능력이 감소되어 있는 절단형 APC 단백질이 생성된다. 베타 카테닌 유전자, CTNNB1에서의 돌연변이는 또한 단백질의 안정화를 증가시켜 핵 유입을 일으킨 후, 수개의 종양원성 전사 프로그램을 활성화시키는데, 이는 또한 돌연변이화된 APC의 기능상실로부터 발생된 발암이 베타 카테닌 파괴를 적절히 막아줄 수 있는 기전이기도 하며, 이는 정상적인 세포 증식 및 분화 프로그램을 억제시키는 데 필요하다.

[0278] XIV. 제조물품

CD46 조절 인자를 1회 이상의 용량으로 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 및 키트 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 예를 들어, 하나 이상의 추가의 작용제와 함께, 또는 그를 포함하지 않고 항CD46 항체를 포함하는 소정량의 조성물을 함유하는 단위 제형을 제공한다. 다른 실시양태의 경우, 상기 단위 제형은 1회 용인 사전 충전된 주사용 시린지로 공급된다. 추가의 다른 실시양태에서, 단위 제형이 포함되어 있는 조성물은 염수, 수크로스 등; 완충제, 예컨대, 포스페이트 등을 포함할 수 있고/거나; 안정하고 유효한 pH 범위 내로 제제화될 수 있다. 별법으로, 특정 실시양태에서, 조성물은 적절한 액체, 예를 들어, 멸균수 첨가시 재구성될 수 있는 동결건조된 분말로서 제공될 수 있다. 특정의 바람직한 실시양태에서, 조성물은 수크로스 및 아르기닌을 포함하나, 이에 한정되지 않는 단백질 응집을 억제시키는 하나 이상의 물질을 포함한다. 용기(들) 상의, 또는 그에 회합되어 있는 임의의 라벨은 동봉된 조성물은 선택된 질환 병증을 진단 또는 치료하는 데 사용되는 것임을 나타낸다.

본 발명은 CD46 조절 인자 및 임의로, 하나 이상의 항암제의 단일 투약 또는 다중 투약용 투여 단위를 생산하기 위한 키트를 제공한다. 키트는 용기 및 용기 상의, 또는 그에 회합되어 있는 라벨 또는 패키지 인서트를 포함한다. 적합한 용기로는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 병증을 치료하는 데 효과적인 조성물을 수용하고 있으며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사용 니들에 의해 천공가능한 마개를 가진 정맥용 액체 백 또는 바이알일 수 있다). 그러한 키트는 일반적으로 동일한 또는 상이한 용기 중의 CD46 조절 인자 및 임의로, 하나 이상의 항암제의 약학적으로 허용가능한 제제를 적합한 용기에 포함한다. 키트는 또한 진단을 위해 또는 병용요법을 위해 다른 약학적으로 허용가능한 제제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 CD46 조절 인자 이외에도, 상기 키트는 다양한 항암제, 예컨대, 화학요법제 또는 방사선치료 약물; 항혈관신생제; 항전이제; 표적화된 항암제; 세포독성제; 및/또는 다른 항암제 중 어느 하나 이상의 것을 함유할 수 있다. 상기 키트는 또한 CD46 조절 인자를 항암제 또는 진단학적 제제와 접합시키는 적절한 시약을 제공할 수 있다(예컨대, U.S.P.N. 제 7,422,739호(이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다) 참조).

더욱 구체적으로, 키트는 추가의 성분과 함께, 또는 그를 포함하지 않고 CD46 조절 인자를 포함하는 단일 용기를 가질 수 있거나, 또는 각 원하는 제제에 대한 별개의 용기를 가질 수 있다. 접합을 위해 병용 치료제가 제공되는 경우, 단일 용액은 등가인 물비로 조합되어, 또는 한 성분을 다른 나머지 한 성분보다 과량으로 하여 사전 혼합될 수 있다. 별법으로, 키트의 CD46 조절 인자 및 어느 임의의 항암제는 환자에게로의 투여 이전에 별개의 용기 내에서 따로따로 유지될 수 있다. 키트는 또한 멸균제, 약학적으로 허용가능한 완충제 또는 다른 희석제, 예컨대, 정균 주사용수(BWFI: bacteriostatic water for injection), 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate-buffered saline), 링거액 및 텍스트로스 용액을 함유하는 제2/제3 용기 수단을 포함할 수 있다.

키트의 성분들이 하나 이상의 액체 용액으로 제공되는 경우, 액체 용액은 수용액인 것이 바람직하고, 멸균 수용액이 특히 바람직하다. 그러나, 키트의 성분들은 건식 분말(들)로서 제공될 수 있다. 시약 또는 성분들이 건식 분말로서 제공되는 경우, 상기 분말은 적합한 용매 첨가시에 재구성될 수 있다. 용매 또한 또 다른 용기 중에서 제공될 수 있을 것으로 구상된다.

상기에서 간략하게 언급한 바와 같이, 키트는 또한 항체 및 어느 임의의 성분들을 동물 또는 환자에게로 투여하기 위한 수단, 예컨대, 하나 이상의 니들 또는 시린지 또는 심지어는 점안기, 피펫, 또는 다른 유사 기구를 포함할 수 있는데, 그로부터 제제는 동물 내로 주사되거나 도입될 수 있거나, 또는 체내 이환 부위로 적용될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로는 상업적 판매를 위해, 바이알 등, 및 다른 성분을 좁은 제한 공간에

포함시키기 위한 수단, 예컨대, 원하는 바이알 및 다른 기구가 그 안으로 배치되고, 그에 보유되는 주사 또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함할 것이다. 임의의 라벨 또는 패키지 인서트는 CD46 조절 인자 조성물이 암, 예를 들어 결장직장암을 치료하는 데 사용되는 것임을 나타낸다.

[0284] XV. 연구용 시약

본 발명의 다른 바람직한 실시양태는 또한 방법, 예컨대, 형광 활성화된 세포 분류법(FACS), 자기 활성화 세포 분류(MACS: magnetic activated cell sorting) 또는 레이저 매개 절편화를 통해 종양 개시 세포의 집단 또는 서브집단을 확인, 단리, 절편화, 또는 강화시키는 데 유용한 계기로서 개시된 조절 인자의 특성을 활용한다. 조절 인자는 암 줄기 세포를 비롯한 TIC의 특징 규명 및 조작을 위한 수개의 화합성 기법에 사용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다(예컨대, U.S.S.N. 제12/686,359호, 제12/669,136호 및 제12/757,649호(이들 각각은 그 본문이 본원에 참고로 포함된다) 참조).

[0286] XVI. 기타

본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업계의 숙련가에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가져야 한다. 추가로, 달리 문맥상 달리 요구되지 않는다면, 단수 형태는 복수의 것도 포함하여야 하고, 복수 용어는 단수의 것도 포함하여야 한다. 더욱 구체적으로, 첨부된 특허청구범위의 상기 명세서에서 사용되는 바, 단수 형태인 "하나"("a," "an") 및 "그"라는 것은 문맥상 달리 명확하게 언급되지 않는 한, 복수의 지시 대상도 포함한다. 따라서, 예를 들어, "하나의 단백질"이라고 언급하는 것은 복수개의 단백질을 포함하고; "하나의 세포"라고 언급하는 것은 세포의 혼합물 등을 포함하는 것이다. 추가로, 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 제공된 범위는 종점과, 그 종점을 사이의 모든 점들, 모두를 포함하는 것이다. 그러므로, 2.0 내지 3.0이라는 범위는 2.0, 3.0, 및 2.0 내지 3.0 사이의 모든 점들을 포함한다.

일반적으로, 본원에 개시된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용된 명명법 및 그 기법은 당업계에 주지되어 있고, 통상적으로 사용되는 것이다. 본 발명의 방법 및 기법은 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 당업계에 주지되어 있고, 본 명세서 전역에서 인용되고, 논의된 다양한 일반 참고 문헌 및 보다 구체적인 참고 문헌에 기술되어 있는 바와 같은 종래 방법에 따라 수행된다. 예컨대, 문헌 ([Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)]; [Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002)]; [Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)]; 및 [Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)])을 참조할 수 있다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조사의 설명서에 따라, 통상 당업계에서 달성될 수 있는 바와 같이, 또는 본원에 기술되어 있는 바와 같이 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 화학 및 제약 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 이의 실험실 방법 및 기법은 당업계에 주지되어 있고, 통상적으로 사용되는 것이다.

[0289] 본 명세서 내에서 개시되거나, 인용된 모든 참고 문헌 또는 문서는 제한없이, 이의 전문이 참고로 본원에 포함된다. 또한, 본원에서 사용된 임의 섹션의 제목은 단지 조직화를 목적으로 한 것이며, 기술된 주제를 제한하는 것으로서 해석되서는 안된다.

[0290] 실시예

[0291] 따라서, 일반적으로 기술되는 바, 본 발명은 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아닌, 일례로서 제공되는 하기 실시예를 참고로 하여 보다 쉽게 이해될 것이다. 실시예는 하기 실험이 수행되는 모든 실험이거나, 유일한 실험임을 나타내고자 하는 것이 아니다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨도이고, 압력은 대기압이거나, 그에 가까운 값이다.

[0292] 실시예 1

[0293] 종양 개시 세포 집단에서의 CD46 발현

[0294] 고형 종양이 암 환자에 존재하는 바, 이의 세포 이질성의 특징을 규명하고, 특정 표현형 마커를 사용하여 종양 영구 세포(TPC; 즉, 암 줄기 세포: CSC)의 정체를 밝혀내고, 임상적으로 관련된 치료학적 표적을 확인하기 위해, 당업계에 알려져 있는 기법을 사용하여 큰 비전통적인 이종이식편(NTX) 종양 은행을 개발하고, 유지시켰다. 원래는 다양한 고형 종양 악성 종양을 앓는 다수의 암 환자로부터 수득된 이질성 종양 세포를 다회에 걸쳐

계대접종합으로써 다수의 별개의 종양 세포주를 포함하는 NTX 종양 은행을 면역약화된 마우스에 전파시켰다. 계통이 잘 정의된 다수의 별개의 조기 계대접종 NTX 종양 세포주의 연속적인 이용가능성을 통해 상기 세포주로부터 정제된 세포를 재현가능한 방식으로 반복하여 특징 규명을 할 수 있는 바, TPC를 매우 용이하게 확인 및 단리시킬 수 있다. 더욱 특히, 후향적으로 볼 때, 세포의 기원이 된 환자 종양 시료의 발생을 반복하는 마우스에서 표현형적으로 및 형태학적으로 이질성인 종양을 생성할 수 있는 이의 능력에 따르면, 단리된 또는 정제된 TPC가 가장 정확하게 정의된 것이다. 따라서, 마우스에서 완전하게 이질성인 종양을 생성하는 단리된 세포로 이루어진 소집단을 사용할 수 있는 능력은 단리된 세포가 TPC를 포함한다는 사실을 강력하게 나타낸다. 그러한 연구에서, 최소로 계대접종된 NTX 세포주를 사용하면 생체내 실험은 현저히 간소화되고, 쉽게 입증할 수 있는 결과를 얻게 된다. 또한, 조기 계대접종 NTX 종양은 또한 치료제, 예컨대, 이리노테칸(즉, 캄프토사르[®])에 대해 반응하는데, 이는 종양 성장, 현 요법에 대한 내성 및 종양 재발을 유도하는 근본적인 기전에 대한 임상적으로 관련된 통찰력을 제시한다.

[0295] NTX 종양 세포주는 확립되어 있는 바, 유세포 분석을 사용하여 구성 요소인 종양 세포의 표현형을 분석함으로써 종양 개시 세포(TIC)의 특징을 규명하거나, 단리시키거나, 정제하거나, 또는 강화시키고, 상기 집단 내의 TPC 및 TProg 세포를 분리하거나, 분석하는 데 사용될 수 있는 별개의 마커를 확인하였다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 사유(proprietary) 프로테옴 기반 플랫폼(즉, 페노프린트™ 어레이(PhenoPrint™ Array))을 사용함으로써 단백질 발현에 기초하여 세포의 특징을 신속하게 규명할 수 있었고, 동시에 잠재적으로 유용한 마커를 확인할 수 있었다. 페노프린트 어레이는, 각 웰이 피코에리트린 형광 채널에는 별개의 한 항체를, 및 플레이트 전역의 모든 웰에 어레이되어 있는 상이한 플루오로크롬에는 다중의 추가 항체를 포함하는 것인 96 웰 플레이트에 어레이된, 다수는 상업적 공급원으로부터 입수된 것인 수백여 개의 별개의 결합 분자를 포함하는 사유 프로테옴 플랫폼이다. 이를 이용함으로써 비피코에리트린 채널을 통해 관련 세포는 신속하게 포함시키거나, 또는 비관련 세포는 제거함으로써 선택된 종양 세포의 서브집단 중 관심의 대상이 되는 항원의 발현 수준을 측정할 수 있다. 페노프린트 어레이를 당업계에 주지되어 있는 조직 해리, 이식, 및 줄기 세포 기법과 조합하여 사용하였을 때 (문헌 ([Al-Hajj et al., 2004, 상기 문헌 동일], [Dalerba et al., 2007, 상기 문헌 동일] 및 [Dylla et al., 2008, 상기 문헌 동일]) (이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)), 관련 마커를 효과적으로 확인할 수 있었고, 이어서, 고효율로 특이 인간 종양 세포 서브집단을 단리시키고 이식시킬 수 있었다.

[0296] 따라서, 보통 인간 종양에 대해 수행되고 있는 것과 같이 심하게 면역약화된 마우스에서 다양한 NTX 종양 세포주를 확립할 때, 800-2,000 μ l에 이르도록 종양을 마우스로부터 절개해 내고, 당업계에 공지되어 있는 효소 분해 기법(예를 들어, U.S.P.N. 제2007/0292414호(이는 본원에 포함되어 있다) 참조)을 사용하여 세포를 단일 세포 혼탁액으로 해리시켰다. 페노프린트 어레이를 사용하여 상기 혼탁액으로부터 획득한 데이터를 통해 세포 하나씩 차례대로인 방식에 근거하여 절대(세포 1개당인 개념) 및 상대(집단 중의 다른 세포에 대한 개념) 표면 단백질 발현 값을 얻었고, 이로써 세포 집단을 더욱 정교하게 특징 규명하고, 계층화할 수 있었다. 더욱 구체적으로, 페노프린트 어레이를 사용함으로써 전향적으로 TIC 또는 TPC를 NTG 벌크한 종양 세포 및 종양 기질과 구별짓는 단백질 또는 마커를 신속하게 확인할 수 있었고, NTX 종양 모델로부터 단리된 경우에는, 상이한 수준으로 특이 세포 표면 단백질을 발현하는 종양 세포 서브집단의 특징을 상대적으로 신속하게 규명할 수 있었다. 특히, 종양 세포 집단 전역에 걸쳐 이질성 발현을 하는 단백질을 통해 고수준 및 저수준으로 특정 단백질 또는 마커를 발현하는 별개의, 및 고도로 정제된 종양 세포 서브집단을 단리시키고, 면역약화된 마우스 내로 이식함으로써 TPC가 한 서브집단 또는 또 다른 서브집단에서 강화되었는지 여부를 쉽게 평가할 수 있었다.

[0297] 강화시키다라는 용어는 세포를 단리시키다라는 것과 같은 의미로 사용되는데, 이는 한 유형의 세포 수율(분율)이 출발 또는 개시 세포 집단과 비교하였을 때 다른 유형의 세포 분율에 비하여 증가되었음을 의미하는 것이다. 바람직하게, 강화시키다라는 것은 출발 세포 집단과 비교하여 세포 집단 중의 한 세포 유형의 비율을 약 10% 만큼, 약 20% 만큼, 약 30% 만큼, 약 40% 만큼, 약 50% 만큼 또는 50% 초과만큼 증가시키는 것을 의미한다.

[0298] 본원에서 사용되는 바, 세포 또는 조직과 관련하여 마커란, 질환 또는 장애를 앓는 조직 또는 세포 집단 중에서 또는 그 상에서 확인되는 것을 비롯한, 특정 세포, 세포 집단 또는 조직과 확인가능한 방식으로 관련이 있거나, 또는 특정 세포, 세포 집단 또는 조직 중에서 또는 그 상에서 특이적으로 발현되는, 화학적 또는 생물학적 실체 형태의 임의의 특징을 의미한다. 나타낸 바와 같이, 마커는 사실상 형태학적, 기능성 또는 생화학적인 것일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 마커는 특이 세포 유형(예컨대, TPC)에 의해, 또는 특정 조건하에 있는 세포(예컨대, 세포 생활 주기의 특정 시점 동안의 또는 특정 니치 중의 세포)에 의해 차별적으로 또는 우선적으로 발현되는 세포 표면 항원이다. 바람직하게, 그러한 마커는 단백질이고, 더욱 바람직하게는 당업계에 공지되어 있는 바와 같이 항체, 압타머 또는 다른 결합 분자에 대한 에피토프를 소유한다. 그러나, 마커는 표면 상에서, 또는

세포 내에서 발견되는 임의의 문자로 구성될 수 있고, 그 예로는 단백질(펩티드 및 폴리펩티드), 지질, 다당류, 핵산 및 스테로이드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 형태학적 마커 특징 또는 소질의 예로는 형상, 크기, 및 핵 대 세포질의 비율을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 기능성 마커 특징 또는 소질의 예로는 특정 기질에 부착할 수 있는 능력, 특정 염료를 흡입 또는 배제시킬 수 있는 능력, 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 친유성 염료 배제 능력, 특정 조건하에서 이주할 수 있는 능력, 및 특정 계통으로 따라 분화할 수 있는 능력을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 마커는 또한 예를 들어, 리포터 유전자를 코딩하는 핵산 서열의 세포 내로의 도입 및 이의 전사를 통해 마커로서 사용될 수 있는 리포터 단백질이 생산되는 결과로서 세포에 의해 발현되는 리포터와 같은 리포터 유전자로부터 발현되는 단백질일 수 있다. 마커로서 사용될 수 있는 그러한 리포터 유전자로는 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 형광 단백질 효소, 염색소립 단백질, 내성 유전자 등이 있다.

[0299] 관련된 의미에서, 조직, 세포 또는 세포 집단과 관련이 있는 마커 표현형(예컨대, 안정한 TPC 표현형)이라는 용어는 특정 세포 또는 세포 집단을 특징 규명하거나, 확인하거나, 분리하거나, 단리시키거나, 또는 강화시키는데 사용될 수 있는 임의의 마커 또는 마커 조합을 의미한다. 구체적인 실시양태에서, 마커 표현형은 세포 표면 마커 조합의 발현을 검출하거나 확인함으로써 측정될 수 있는 세포 표면 표현형이다.

[0300] 다수의 마커(또는 이의 부재)가 다양한 암 줄기 세포 집단과 관련이 있으며, 이를 사용하여 종양 세포 서브집단을 단리시키거나, 그 특징을 규명할 수 있음을 당업자는 알고 있을 것이다. 이과 관련하여, 암 줄기 세포 마커의 예로는 OCT4, Nanog, STAT3, EPCAM, CD24, CD34, NB84, TrkA, GD2, CD133, CD20, CD56, CD29, B7H3, CD46, 트랜스페린 수용체, JAM3, 카복시펩티다제 M, ADAM9, 온코스타틴 M, Lgr5, Lgr6, CD324, CD325, 네스틴, Sox1, Bmi-1, eed, easyh1, easyh2, mf2, yy1, smarcA3, smarckA5, smarcD3, smarcE1, m11t3, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WNT10B, WNT16, AXIN1, BCL9, MYC, (TCF4), SLC7A8, IL1RAP, TEM8, TMPRSS4, MUC16, GPRC5B, SLC6A14, SLC4A11, PPAP2C, CAV1, CAV2, PTPN3, EPHA1, EPHA2, SLC1A1, CX3CL1, ADORA2A, MPZL1, FLJ10052, C4.4A, EDG3, RARRES1, TMEPAI, PTS, CEACAM6, NID2, STEAP, ABCA3, CRIM1, IL1R1, OPN3, DAF, MUC1, MCP, CPD, NMA, ADAM9, GJA1, SLC19A2, ABCA1, PCDH7, ADCY9, SLC39A1, NPC1, ENPP1, N33, GPNMB, LY6E, CELSR1, LRP3, C20orf52, TMEPAI, FLVCR, PCDHA10, GPR54, TGFBR3, SEMA4B, PCDHB2, ABCG2, CD166, AFP, BMP-4, β 카테닌, CD2, CD3, CD9, CD14, CD31, CD38, CD44, CD45, CD74, CD90, CXCR4, 테코린, EGFR, CD105, CD64, CD16, CD16a, CD16b, GLI1, GLI2, CD49b, 및 CD49f를 포함한다. 예를 들어, 문헌 ([Schulenburg et al., 2010, PMID: 20185329], U.S.P.N. 제7,632,678호 및 U.S.P.N. 제2007/0292414호, 제2008/0175870호, 제2010/0275280호, 제2010/0162416호, 및 제2011/0020221호) (이들 각각은 본원에 참고로 포함된다)를 참조할 수 있다. 다수의 이러한 마커들이 상기 기술된 페노프린트 어레이에 포함되어 있다는 것을 이해할 것이다.

[0301] 유사하게, 특정 종양 유형의 암 줄기 세포와 관련이 있는 세포 표면 표현형의 비제한적인 예로는 CD44 $^{+/-}$ CD24 $^{+/-}$, ALDH $^{+}$, CD133 $^{+}$, CD123 $^{+}$, CD34 $^{+}$ CD38 $^{-}$, CD44 $^{+}$ CD24 $^{-}$, CD46 $^{+/-}$ CD324 $^{+/-}$ CD66c $^{-}$, CD133 $^{+/-}$ CD34 $^{+/-}$ CD10 $^{-/-}$ CD19 $^{-/-}$, CD138 $^{-/-}$ CD34 $^{-/-}$ CD19 $^{+/-}$, CD133 $^{+/-}$ RC2 $^{+/-}$, CD44 $^{+/-}$ α_2 β_1 CD133 $^{+/-}$, CD44 $^{+/-}$ CD24 $^{+/-}$ ESA $^{+/-}$, CD271 $^{+/-}$, ABCB5 $^{+/-}$ 뿐만 아니라, 당업계에 공지되어 있는 다른 암 줄기 세포 표면 표현형도 포함한다. 예를 들어, 문헌 ([Schulenburg et al., 2010, 상기 문헌 동일], [Visvader et al., 2008, PMID: 18784658] 및 U.S.P.N. 제2008/0138313호(이들 각각은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)를 참조할 수 있다. 예컨대, 바로 앞에서 예시된 것과 같은 마커 표현형은 추가 분석을 위해 TIC 및/또는 TPC 세포 또는 세포 집단을 특징 규명하거나, 단리시키거나, 정제하거나, 강화시키기 위한 표준 유세포 분석법 및 세포 분류 기법과 함께 사용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 본 발명과 관련하여, 분석되는 종양 표본이 원발성 환자 종양 표본(도 1a)인지 또는 환자 유래의 NTX 종양(도 1b)인지에는 상관없이, CD46, CD324 및 임의로, CD66c가 다수의 인간 결장직장("CR: colorectal cancer"), 유방암("BR: breast cancer"), 비소세포 폐암(NSCLC), 소세포 폐암(SCLC: small cell lung cancer), 췌장암("PA: pancreatic cancer"), 흑색종("Mel: melanoma"), 난소암("OV: ovarian cancer"), 및 두부경부암("HN: head and neck cancer") 종양 세포의 표면 상에서 고도로 또는 이질성으로 발현된다는 것은 관심의 대상이 된다.

[0302] 도 1a 및 b에 제시된 데이터는 제조사의 설명서에 따라 FACS캔토 II(FACSCanto II)(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 작성된 유세포 분석 기반 단백질 발현 데이터이다. 데이터는, 이소형 대조군 항체의 배경 염색은 회색의 채워진 히스토그램으로 표시되어 있고, MEM-258 항체(바이오레전드 인코퍼레이티드(BioLegend Inc.))를 사용하여 측정된 CD46 발현은 검은색 굵은 선으로 표시되어 있는, 히스토그램 플롯으로 제시된 개별 종양 세포를 나타낸다.

[0303]

본원에서 음성 발현(즉, "-")인 세포는 추가의 형광 방출 채널에서 관심의 대상이 되는 다른 단백질을 표지하는 완전 항체 염색 칵테일의 존재하에서 형광 채널 중 이소형 대조군 항체 사용시 관찰되는 발현의 95번째 백분위수 이하로 발현하는 세포인 것으로 정의된다. 음성 이벤트를 정의하는 상기 방법이 "형광 마이너스 원 (fluorescence minus one)," 또는 "FMO" 염색법으로 지칭된다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 상기 기술된 FMO 염색 방법을 이용하여 이소형 대조군 항체 사용시 관찰되는 발현의 95번째 백분위수 초과로 발현하는 세포를 본원에서는 "양성"(즉, "+")으로 정의한다. 본원에서 정의된 바, "양성"으로 광범위하게 정의된 세포 집단이 다양하게 존재한다. 먼저, 발현이 낮은("즉, "저") 세포는 일반적으로 관찰되는 발현이 FMO 염색법을 이용하여 이소형 대조군 항체 사용시 측정된 95번째 백분위수 초과이고, 상기 기술된 FMO 염색 방법을 이용하여 이소형 대조군 항체 사용시 관찰되는 발현의 95번째 백분위수에서 1 표준 편차 이내인 세포로 정의된다. 발현이 "높은"(즉, "고") 세포는 관찰되는 발현이 FMO 염색법을 이용하여 이소형 대조군 항체 사용시 측정된 95번째 백분위수 초과이고, 상기 기술된 FMO 염색 방법을 이용하여 이소형 대조군 항체 사용시 관찰되는 발현의 95번째 백분위수에서 1 초과의 표준 편차 위인 세포로 정의될 수 있다. 다른 실시양태에서, 99번째 백분위수가 음성과 양성 FMO 염색 사이의 경계점으로서 바람직하게 사용될 수 있고, 특히 바람직한 실시양태에서, 백분위수는 99% 초과일 수 있다.

[0304]

고형 종양을 앓는 다양한 환자들간에 CD46 발현은 다양하게 나타났다; 그러나, 이소형 대조군 항체를 사용하여 측정된 바, 발현은 일반적으로 배경 염색보다 더 컸다(도 1a 및 1b). CD46 발현은 특히 대부분의 결장직장암 및 췌장장암 환자로부터 유래된 종양에서 이질성이었고, 별개의 세포 서브집단은 일반적으로 각각 음성, 저 및 고 CD46 발현을 보여주었다(도 1b).

[0305]

실시예 2

[0306]

FACS 및 이식에 의한 종양 개시 세포 집단에 대한 강화 입증

[0307]

관심의 대상이 되는 특정 단백질이 이질적으로 발현되는 종양에서, 상기 단백질의 고발현 또는 비발현/저발현에 기초하여 세포를 단리시킨 후, 면역약화된 마우스 내로 이식하였다. 놀랍게도, 사유 폐노프린트 어레이를 사용하여 이질적으로 발현되는 것으로 확인된 대부분의 별개의 마커가 종양 개시 세포를 강화시키는 데 있어서의 유용성을 입증하지 못한 것으로 관찰되었다. CD46의 세포 표면 발현이 높거나 낮은 결장직장 종양 및 췌장 종양 세포가 각각 면역약화된 마우스에서 종양발생 활성을 위해 강화되어 있는지 여부를 측정하기 위해, 당업자에게 주지된 세포 해리 및 FACS 기법을 사용하여 NTX 종양으로부터 별개의 세포 집단을 단리시킨 후, 마우스 1마리당 1,000 내지 3개의 세포로 이식하였다. 표현형상의 특징을 규명함으로써 생성된 종양이, 원래 이식된 세포가 그로부터 단리된 것인 모체 종양을 나타내는지 여부를 측정하기 위한 목적으로 종양이 800-2,000 mm^3 에 도달하였을 때, 마우스를 안락사시키고, 종양을 제거하고, 효소 분해를 사용하여 단일 세포 혼탁액으로 해리시켰다.

[0308]

하기 표 1은 상기 실험의 결과를 보여준다. 블랭크는 명시된 실험이 수행되지 않았다는 것을 나타낸다. 상피 특이 항원(ESA)-양성, CD46⁺ 세포로부터 발생된 종양은, 비록 이식 세포 개수가 마우스 1마리당 200개 미만인 경우에 상기와 같이 충분히 종양이 발생되도록 하기 위해서는 추가의 마커(즉, 결장직장암: CD324⁺CD66c⁻; 췌장암: CD324⁺)가 요구되기는 하였지만, 일관되게 이질성 종양을 발생시켰다.

표 1

FACS 및 면역화된 마우스 내로의 이식에 의한

결장직장 종양 및 췌장 종양 개시 세포 집단에 대한 강화 입증

결장직장 종양		500개의 세포	51-200개의 세포	3-50개의 세포
SCRx-CR2	CD46 ^고	3/10	30%	
	CD46 ^저	0/5	0%	
SCRx-CR4	CD46 ^고		3/5	60%
	CD46 ^저		0/5	0%
SCRx-CR5	CD46 ^고		19/19	100%
	CD46 ^저		2/10	20%
SCRx-CR7	CD46 ^고	12/13	92%	
	CD46 ^저	1/10	10%	
SCRx-CR10	CD46 ^고		4/10	40%
	CD46 ^저		0/5	0%
SCRx-CR14	CD46 ^고		37/45	82%
	CD46 ^저		3/20	15%
SCRx-CR16	CD46 ^고		5/14	36%
	CD46 ^저		0/5	0%
SCRx-CR21	CD46 ^고			2/15 13%
	CD46 ^저			0/5 0%
SCRx-CR33	CD46 ^고		4/10	40%
	CD46 ^저		0/5	0%
요약	CD46 ^고	15/23 65%	72/103 70%	14/29 48%
	CD46 ^저	1/15 7%	5/50 10%	1/10 10%

췌장 종양		1,000개의 세포	500개의 세포	200개의 세포	100개의 세포
SCRx-PA3	CD46 ^고		13/14 93%	13/20 65%	
	CD46 ^저		2/15 13%	1/15 7%	
SCRx-PA4	CD46 ^고	8/14 80%		3/5 60%	
	CD46 ^저	0/10 0%		0/5 0%	
SCRx-PA14	CD46 ^고			4/10 40%	
	CD46 ^저			0/5 0%	

[0309]

실시예 3

[0311] CD46^고 종양 개시 세포의 서브집단이 NTX 모델에서의 일련의 계대접종에 의해 종양 영구 능력을 입증하다

[0312] 대다수의 종양 세포에는 종양 형성 능력이 없고, 따라서, 비종양발생(NTG)인 것으로서 특징화될 수 있는 반면, 정상적인 배아 발생 및 조혈 종양, 둘 모두에 고도로 증식성인 세포는 이식시 종양 및/또는 조직을 재구성할 수는 있다는 전례가 있기는 하지만, 이는 자가 재생 능력은 없고(즉, 유한 수명), 따라서, 그러한 세포는 단기 재구성 세포 또는 전구 세포로 지칭된다.

[0313] CD46^고 세포의 서브집단이 다른 것보다 다소 종양발생성을 띠었는지 여부를 측정하기 위해, 세포 단리 및 이식 목적으로 CD46을 추가의 마커와 체계적으로 조합하였다. 상기 연구를 통해 결장직장암의 경우, 추가의 두 세포 표면 마커(CD324 및 CD66c)가, 그리고 췌장암의 경우, 추가의 한 마커(CD324)가 확인되었는데, 각 항원의 고발현 또는 비발현(negative)/저발현에 기초하여 종양 개시 세포 강화에 도움을 줄 수 있는 것이었다. 결장직장암에서 상기 마커의 유용성에 대한 입증으로서, 예를 들어, ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포의 이식으로부터 발생된 종양(즉, p1(passage 1), 계대 1)은 전체적으로 이질성이고, 그들이 유래된 모체 종양을 반영하였다(도 2; p1 종양 대 모체 종양). 그에 반해, 소수의 ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포를 가진 이식체는 유의적으로 더 적은 CD66c⁻ 세포가 존재한다는 점에서 전체적으로 이질성인 종양을 발생시키지 못하였는데, 이는 ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포가 유의적인 증식 능력을 가진 종양 전구 세포(TProg)이지만, 그에게는 자가 재생 특성이 없다는 것을 제안한다. ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포로부터 발생된 ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포 서브세트는 50개의 세포를 일련으로 이식시켰을 때 유효하게 종양을 생성시킨 반면(도 2; p2 대 p1 종양), ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포로부터 발생된 종양 중의 어떤 세포도 일련의 이식시 종양을 유효하게 재개시시키지 못하였는 바, 유망한 TPC(ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포) 및 TProg(ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포)의 일련의 이식을 통해 상기 종양 세포 서브집단의 아

이덴티티를 확인할 수 있었다. 명확하게 하기 위해, 오직 200개의 CD66c⁻ 또는 CD66c⁺ 세포로부터만 생성된 종양으로부터 단리된 50개의 ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포는 각각 거의 종양발생성을 띠지 않았고; CD66c⁺ 유래 종양으로부터 수득된 것은 특히 그러하였다. 놀랍게도, ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포는 TPC이고, ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁺ 세포는 TProg 세포라는 점에서, 상기 데이터를 통해 고형 종양에 대한 중요한 관찰 결과가 입증되었다.

[0314] 결장직장암에서 상기 기술된 TPC 표현형의 정확성을 측정하기 위해, ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 세포를 상기 기술된 바와 같이 FACS에 의해 단리시키고(도 3A; FACS 이후 대 FACS 이전), 제한 회석법으로 각각 마우스 1마리당 50, 20, 8 및 3개의 세포로 이식하였다. 성공적인 종양발생인 것으로 정의되는 양성 이벤트에 기초하는 푸아송 분포 통계를 사용함으로써(도 3B & 3C 참조) ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ TPC 중 실제 종양 개시 세포의 빈도는 7±3개의 세포 중 대략 1개라고 계산할 수 있었다.

[0315] 비록 종양발생 세포에 대해 강화시키는 데 유사하게 사용될 수 있는 세포 표면 마커 또는 효소 활성에 대해서는 정의된 바 있지만(문헌 [Dylla et al 2008, 상기 문헌 동일]), 결장직장 종양에서 상기 정의된 TPC 및 TProg 세포 집단에 대해 강화시키기 위해 조합하여 사용된 각 단백질이 임의의 종양 또는 신생물 중 상기와 같은 활성을 가진 세포와 관련이 있다고 알려져 있지는 않다. 본 연구는 방법의 해석 능력이 상당히 향상되었다는 것을 나타내며, 추가로 오로지 이식시 종양 발생 능력을 포함하는 별개의, 고도로 강화된 고형 종양 세포 서브집단을 확인하고, 단리시키고, 이의 특징을 규명하기 위한 기법을 개선시키며, 자가 재생 능력이 있거나 없는 종양발생 세포 서브집단, 즉, 각각 TProg 및 TPC 사이를 구별한다. 그럼에도 불구하고, TPC 및 고도로 증식성인 TProg 서브집단, 둘 모두 세포 표면 상에서 CD46을 발현하는 바, 따라서, 이는 CD46 표적화 조절 인자가 고도로 증식성인 세포(즉, TProg) 및 종양 성장 및 재발의 원인이 되는 세포(즉, TPC), 둘 모두를 제거함으로써 암 환자에게 유익할 것이라는 것을 제안하다.

[0316] 페노프린트 어레이를 사용하여 확인된 대부분의 세포 표면 마커는 표준 FACS 프로토콜을 사용하여 결장직장 종양에서 종양 개시 세포 집단을 강화시킬 수 있는 능력을 입증하지 못한 반면, 별개의 마커 조합을 사용함으로써 종양 개시 세포의 두 서브집단: TPC 및 TProg를 확인할 수 있었다.

0317] 실시예 4

[0318] 이리노테칸 처리가 CD46^고 종양 영구 세포의 빈도를 증가시킨다

[0319] 암 줄기 세포 패러다임의 중심 원리는 CSC(즉, TPC)가 화학요법제, 예컨대, 이리노테칸에 대해 상대적으로 내성을 띤다는 점이다. CD46^고 TPC가 화학요법에 대하여 내성을 띠는지 여부를 측정하기 위해, SCRx-CR4 및 CR14 결장직장 종양을 사용하여 마우스에서 개시시켰다. 일단 종양 부하량이 ~300 mm³에 도달하고 나면, 마우스를 무작위화시키고, 20일 동안 주당 2회에 걸쳐 15 mg/kg 이리노테칸 또는 비히클(PBS)로 처리하고, 20일째 되는 시점에 마우스를 안락사시켰다(도 4A). 종양 수거 시점에, 비히클 처리 대조군 마우스는 ~700 mm³의 종양을 보유한 반면, 이리노테칸으로 처리된 마우스의 종양의 크기는 상기 크기에 절반에 가까웠다(~388 mm³). 상기 정의된 ESA⁺CD46^고CD324⁺CD66c⁻ 표현형을 사용하여 정의된 바와 같이, 각 처리군으로부터 종양내 TPC의 빈도는 비히클과 비교하였을 때, 이리노테칸으로 처리된 마우스로부터의 종양에서 2.5배 강화되어 있는 것으로 나타났다(n = 7; P < 0.0001; 도 4B). 비히클 처리군 마우스와 개별적으로 비교하였을 때, 이리노테칸 처리군 중 소형 종양도 뚜렷히 TPC에 대해 강화된 것으로 나타났는 바(도 4C), TPC 빈도에 대한 강화는 종양 크기로 편향되는 것은 아니었다.

[0320] TPC 및 고도로 증식성인 TProg 세포 집단, 둘 모두 CD46을 발현하고, TPC가 처리 후 잔류 종양 중에 유의적으로 강화되어 있다는 상기 관찰 결과는 CD46^고 세포가 대개 종양 성장, 재발 및, 요법에 대한 내성, 둘 모두에 기여한다는 것을 명확히 입증한다. 이에, SOLiD3 차세대 서열 분석 플랫폼을 사용하여 각 종양 세포 서브집단의 전체 트랜스크립트의 서열을 분석하여 본 고형 종양의 단백질 및 유전자 발현을 보다 자세하게 연구할 수 있도록 하기 위해 CD46^고 세포를 결장직장 및 췌장, 둘 모두로부터 기원하는 수개의 고형 종양으로부터 단리시켰다.

0321] 실시예 5

[0322] SOLiD 전체 트랜스크립트 서열 분석을 통해 종양 영구 세포 집단 중의 CD46 스플라이스 변이체가 밝혀졌다

[0323]

실시예 1에 기술된 바와 같이 생성되고 계대접종된 수개의 결장직장(SCRx-CR2, CR4, CR11 및 CR14) 및 췌장(SCRx-PA3 및 PA6) 암 NTX 세포주를 사용하여 면역약화된 마우스에서 종양을 개시시켰다. 상기 NTX 세포주로부터 발생된 종양을 제거하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 FACS를 사용하여 각각 TPC, TProg 및 NTG 세포를 새로 절제된 NTX 종양으로부터 단리시켰다. 더욱 특히, CD46, CD324 및 CD66c 마커를 사용하여 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)에 의해 세포 집단을 단리시킨 후, 즉시 바로 펠릿화시키고, 퀴아젠 RLT플러스(Qiagen RLTplus) RNA 용해용 완충제(퀴아젠 인코퍼레이티드(Qiagen, Inc.))에서 용해시켰다. 이어서, 사용할 때까지, 용해물을 -80°C에서 보관하였다. 해동시, 제조업체의 설명서에 따라 퀴아젠 RN이지(Qiagen RNEasy) 단리용 키트(퀴아젠 인코퍼레이티드)를 사용하여 전체 RNA를 추출하고, 제조업체의 프로토콜 및 권고되는 장치 설정을 사용하여 나노드롭(Nanodrop)(써모 사이언티픽(Thermo Scientific)) 및 바이오애널라이저 2100(Bioanalyzer 2100)(애질런트(Agilent)) 상에서 정량하였다. 생성된 전체 RNA 시료가 유전자 서열 분석 및 분석에 적합하였다.

[0324]

상기 기술된 바와 같이 비히를 또는 이리노테칸으로 처리된 마우스로부터 단리된 TPC, TProg 및 NTG 세포 집단으로부터 수득된 RNA 시료를 시료당 전체 RNA 5 ng 이상씩으로 출발하여 어플라이드 바이오시스템즈 SOLiD 3.0(Applied Biosystems SOLiD 3.0)(올리고 결찰/검출에 의한 서열 분석: Sequencing by Oligo Ligation/Detection) 차세대 서열 분석 플랫폼(라이프 테크놀로지스)을 이용하여 전체 트랜스크립트 서열 분석을 위해 제조하였다. 인간 게놈으로부터의 34,609 유전자에 대하여 지도화된 SOLiD 플랫폼에 의해 작성된 데이터를 통해 CD46을 검출할 수 있었고, 모든 시료 중의 CD46 수준을 입증가능하게 측정하였다.

[0325]

일반적으로, SOLiD3 차세대 서열 분석 플랫폼을 통해서는 비드에 연결된, 클론으로 증식된 RNA/DNA 단편을 동시에 서열 분석할 수 있다. 이어서, 염료로 표지된 올리고뉴클레오티드와의 결찰에 의한 서열 분석을 사용하여 총 5천만개 초파의 리드를 이용하여 시료 중에 존재하는 각 단편의 50개의 염기 리드를 작성함으로써 게놈 중 단백질의 mRNA 전사체 발현 수준을 정확하게 나타낼 수 있다. SOLiD3 플랫폼은 단지 리드 범위(게놈 위치에 대해 특유의 방법으로 지도화된 리드)에만 기초하여 발현 뿐만 아니라, 공지 및 미지의 선택적 스플라이싱 이벤트인 SNP도 포착할 수 있으며, 잠재적으로는 새로운 엑손도 발견할 수 있다. 따라서, 이러한 차세대 플랫폼을 사용함으로써 전사체 발현 수준 상의 차이 뿐만 아니라, 발현된 mRNA 전사체의 특이적인 스플라이스 변이체에 대한 차이 또는 선호도를 측정할 수 있었다. 또한, 어플라이드 바이오시스템즈로부터 입수한 변형된 전체 트랜스크립트 프로토콜을 이용하여 SOLiD3 플랫폼으로 분석하는 것은 증폭전 단지 대략 5 ng의 출발 물질만을 필요로 하였다. 이는, 세포 중 TPC 서브세트가 예를 들어, 수적으로 NTG 또는 벌크한 종양에 비하여 방대하게 훨씬 더 작고, 이로 인해 사용가능한 출발 물질의 양도 매우 작은 바, 선별된 세포 집단으로부터의 전체 RNA 추출이라는 이유에서 중요하다. SOLiD3 플랫폼으로부터 이중으로 수행하여 획득한 서열 분석 데이터를 표준 산업적 관행에 따라, 정규화하고, 변환시키고, 배수 비율을 계산하였다. 놀랍게도, 결장직장 또는 췌장 NTX 종양 세포주에서 측정된 바, 대개 CD46 단백질의 차별적인 표면 발현에 기초하여 단리된 것임에도 불구하고, CD46⁺ 또는 CD46⁺/⁻ 세포 집단에서 두드러지게 다른 CD46 유전자 발현 차이는 없었다.

[0326]

고등 포유동물에서의 단백질 다양성의 중요한 근원은 번역 동안 메신저 RNA(mRNA: messenger RNA)에 의해 코딩되는 핵손의 차별적인 포함 또는 절제(즉, 선택적 스플라이싱)로부터 이루어지는 것이다. 트랜스크립트(즉, mRNA 전사체)의 서열을 분석함으로써 특정 세포 집단에서 코딩되는 단백질에 대한 중요한 통찰력을 획득할 수 있는 반면, mRNA 사용 빈도 및/또는 유전자 발현 측정을 포함하는 다른 기법은 각각 유의적으로 더 많은 작업(표적화된 서열 재분석)을 수반하거나, 엑손-엑손 연결부 사용 빈도를 측정하지 못한다(마이크로어레이). 하기 표에서 알 수 있는 바와 같이, ABI SOLiD3 플랫폼 상에서 mRNA 증폭 프로토콜 및 Next-Gen 서열 분석을 사용하여 전체 트랜스크립트의 서열을 분석함으로써 수득된 CD46 전사체 데이터를 분석한 바, 수개의 환자 시료로부터 유래된 TPC 상에서 발현된 CD46의 1차 변이체는 엑손 7 및 13 주변을 스플라이싱함으로써 그를 배제시키면서, 엑손 1-6, 8-12 및 14를 사용하는 것을 포함하는 것이었다(변이체 D; NM_153826)(표 2). 대부분의 TPC에서 발현되는 2차 변이체는 또한 엑손 8을 스킵(skip)하여 이의 포함에 있어 엑손 1-6, 9-12 및 14로 다양화된 CD46 단백질로 생성된 것이었다(변이체 F; NM_172353). 요약하면, 결장직장 및 췌장 TPC에서 발현되는 변이체들 모두 엑손 1-6 및 10-14를 사용하지만, 대부분의 전사체들은 또한, 단백질의 세포내 부분을 코딩하는 엑손 13을 스킵한다. 따라서, 결장직장 및 췌장 TPC에서 발현된 CD46 전사체의 기본적인 다양성은 엑손 8의 포함 또는 절제로부터 기원되는 것이다. 다른 결장직장 종양과는 대조적으로는, 비록 CD46 변이체 J(NM_172356) 전사체가 여전히 CD46 변이체 D 발현에 대해 2차적인 것이기는 하지만, CD46 엑손 7은 SCRx-CR14 NTX 종양으로부터의 전사체에 사용되었다(표 2). 결장직장 또는 췌장 종양 세포 서브집단으로부터의 전사체에서의 엑손 13의 사용은 거의 관찰되지 않았다.

표 2

SOLiD 전체 트랜스크립트 서열 분석에 의한
결장직장 영구 세포 및 혈장 종양 영구 세포 중 선택적으로 스플라이스된
CD46 이소폼 확인

종양	1차 변이체	2차 변이체	3차 변이체
SCRx-CR4 TPC	e6-8-9-10	e6-9-10	
SCRx-CR4 Prog	e6-8-9-10	e6-9-10	
SCRx-CR4 NTG	e6-8-9-10	e6-9-10	
SCRx-CR5 TPC	e6-8-9-10	e6-9-10	
SCRx-CR5 Prog	e6-9-10	e6-8-9-10	
SCRx-CR5 별크한 종양	e6-9-10	e6-8-9-10	
SCRx-CR11 TPC	e6-8-9-10	e6-9-10	e6-8-10
SCRx-CR11 Prog	e6-8-9-10	e6-9-10	e6-8-10
SCRx-CR14 TPC	e6-8-9-10	e6-7-8-9-10	
SCRx-CR14 NTG	e6-8-9-10	e6-7-8-9-10	
SCRx-PA3 TPC	e6-8-9-10	e6-9-10	e6-8-10
SCRx-PA3 NTG	e6-8-9-10	e6-9-10	
SCRx-PA6 TPC	e6-9-10	e6-8-9-10	
SCRx-PA6 NTG	e6-8-9-10		

[0327]

별개의 NTX 종양 세포 서브집단으로부터 유래된 mRNA의 전체 트랜스크립트 서열 분석 결과, 전사 이후에 CD46 엑손 사용 빈도를 정확하게 확인할 수 있는 것으로 나타났다. 놀랍게도, TPC 서브집단은 이의 보다 분화된 자손인 TProg, 및 NTG 세포와 동일한 CD46 전사체를 항상 코딩하고/거나, 사용하는 것은 아니었다. 그에도 불구하고, 각 종양 세포 서브집단에서 어떤 전사체가 코딩되는지에 관한 정보는 TIC 집단에서 발현된 CD46 단백질을 표적화하는 요법 개발에 도움이 될 수 있다.

[0329]

실시예 6

[0330]

RT-PCR을 통해 종양 개시 세포 강화된 세포 집단 중 CD46 스플라이스 변이체의 아이덴티티를 확인하였다

[0331]

SOLiD 전체 트랜스크립트 서열 분석에 의해 관찰된 CD46 스플라이스 형태의 아이덴티티가 실제로 NTX 종양으로부터 단리된 별개의 세포 집단에서 발현되었는지 여부를 FACS에 의해 측정하기 위해, 1% β -마캡토에탄올을 함유하는 RLT플러스 완충제(퀴아젠 인코퍼레이티드 제공) 중 -70°C에서 보관한 후, RN이지 플러스 마이크로 키트(RNeasy Plus Micro Kit)(퀴아젠 인코퍼레이티드)를 사용하여 용해물로부터 전체 RNA를 단리시켰다. 구체적으로, 퀴아슈레더(QIAshredder) 회전식 칼럼(퀴아젠)을 사용하여 해동된 용해물을 균질화시키고, gDNA 일리미네이터(gDNA Eliminator) 칼럼을 사용하여 게놈 DNA를 제거한 후, RN이지 미니일루트(RNeasy MiniElute) 회전식 칼럼에 적용시켜 전체 RNA를 포획하였다. 세척 후, RN아제 무함유 물을 이용하여 전체 RNA를 용리시켰다. RNA 6000 피코 키트(RNA 6000 Pico Kit)을 사용하여 나노드롭 1000 분광광도계 또는 애질런트 2100 바이오애널라이저를 이용함으로써 제조사의 프로토콜에 따라 단리된 전체 RNA를 정량하였다. 이어서, 퀸타 q스크립트 cDNA 수퍼믹스(Quanta qScript cDNA SuperMix)를 사용하여 전체 RNA 20 ng을 역전사시키고, 도 5A에 열거되어 있는 e6 정방향 프라이머 및 e14 역방향 프라이머와 함께 앰플리태크골드 DNA 폴리머라제(AmpliTaqGold DNA Polymerase)를 사용함으로써 PCR 증폭을 수행하였다(40 사이클에 걸쳐 1 min 동안 54°C 어닐링 및 72°C 신장). 관찰되는 변이체들 간에 보존되는 엑손인 엑손 6 및 14를 사용하기 위해, 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스 프라이머퀘스트(Integrated DNA Technologies' PrimerQuest) 및 올리고애널라이저 3.0 프로그램(OligoAnalyzer 3.0 program)을 이용하여 프라이머(서열 번호: 1 및 서열 번호: 2)를 디자인하였다. 100 bp DNA 래더를 사용하여 2% E 젤 상에서 앰플리콘을 분석하였다. 증폭 후, 퀴아젠 퀴아퀵 PCR 정제용 키트(QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit)를 사용하여 PCR 생성물을 정제하고, pCR4-TOPO 벡터로 클로닝하였다. 이어서, TOP10 세포를 사용하여 벡터 형질전환을 수행하고(서열 분석용 TOPO TA 클로닝 키트, 인비트로젠), 및 PCR에 의해 삽입체의 존재에 대해 콜로니를 스크리닝하였다. EZNA 플라스미드 미니프렙 키트 I(EZNA Plasmid MiniPrep Kit I)(오메가-바이오-테크((Omega Bio-Tek))를 사용하여 올바른 삽입체를 포함하는 플라스미드를 단

리시키고, T3 및 T4 서열 분석 프라이머를 사용하여 서열을 분석하였다.

[0332] SCRx-CR5 및 SCRx-CR11 NTX 종양으로부터 단리된 CD46^교 세포로부터의 CD46 엑손 6 내지 14 중폭 생성물을 보여 주는 에티디움 브로마이드로 염색된 겔이 도 5B의 래인 1(CR5) 및 2(CR11)에 제시되어 있다. 100 염기쌍 래더는 래인 L로 표시되어 있고, 비주형 대조군(NC)은 4번째 래인에 로딩되었다. 시각적으로 관찰된 밴드를 단리시킬 때, cDNA를 정제한 후, 발현 백터 및 박테리아로 클로닝하였다. 단일 콜로니를 채취하고, 상기 기술된 바와 같이, T3 및 T4 프라이머를 사용하여 삽입체의 서열을 분석하였다. 구체적으로, CR5 종양 세포로부터 중폭된 1차 전사체는 엑손 6, 9, 10, 11, 12 및 14를 함유한 반면(323 bp 앰플리콘, 이는 변이체 F; vF를 나타낸다), CR11 종양 세포로부터 확인된 1차 전사체는 엑손 6, 8, 9, 10, 11, 12 및 14를 함유하였다(368 bp 앰플리콘, 이는 변이체 D; vD를 나타낸다)(도 5C). 비록 밴드가 육안으로는 간신히 보이지만(데이터 나타내지 않음), (도 5C에 표로 나타낸 바와 같이), 2차 전사체가 검출되었고, 존재하는 것으로 확인되었다. SCRx-CR4 NTX 종양 세포주로부터의 TPC, TProg 및 NTG 세포 집단으로부터의 mRNA 또한 중폭시키고, 서열 분석함으로써 다양한 종양 세포 서브 집단에서 변이체 D 및 F가 더 모호하게 사용된다는 것이 입증되었다(도 5C); 그럼에도 불구하고, 변이체 사용 빈도를 통해 상기 기술된 전체 트랜스크립트 SOLiD3 서열 분석 연구에서 관찰된 결과를 확인할 수 있었다.

실시예 7

[0334] 벌크한 종양 및 강화된 세포 집단에서의 CD46 스플라이스 변이체 발현을 측정하기 위한 스플라이스 변이체 특이 프라이머/프로브 세트를 이용한 qRT-PCR

[0335] 주어진 세포 집단 및/또는 전체 조직 표본에서의 CD46 스플라이스 변이체의 발현 수준을, 구체적으로, 엑손 6 내지 12의 사용 빈도를 보다 빠르게 확인하기 위해서, ABI 7900HT 실시간 정량적 PCR 기기에 맞는 맞춤형 qRT-PCR 프라이머 및 FAM 프로브를 디자인하였다(도 6). 특이 스플라이스 변이체에 독특한 특이 CD46 엑손-엑손 연결부를 검출하기 위해 각 FAM 프로브들 각각을 디자인하고, 384 웰 플레이트 중 적어도 2벌의 웰에서 표준 택맨 (Taqman)[®] qRT-PCR 프로토콜을 사용하여 PCR을 수행하였다. 예를 들어, 엑손 8-9 연결부를 포함하도록 FAM 표지된 프로브를 디자인하였는데, 이는 엑손 6, 8, 9 및 10을 사용하는 전사체(CD46 변이체 C, D & M)와 6, 7, 8, 9 및 10을 사용하는 전사체(CD46 변이체 A & B)의 사용 빈도를 구별한다. 유사하게, 각각 엑손 6-9 및 8-10 쌍 형성의 사용 빈도를 포착하기 위한 FAM 표지된 프로브를 디자인함으로써 엑손 6, 9 및 10을 사용하는 전사체(CD46 변이체 E & F)와 6, 8 및 10을 사용하는 전사체(CD46 변이체 I & J) 또한 신속하게 구별될 수 있도록 하고, qRT-PCR에 의해 정량화하였다.

[0336] 이전 실시예에 기술된 데이터와 유사하게, 12개의 결장직장 NTX 종양으로부터 얻은 대표적인 데이터는 CD46 엑손 6, 8, 9 및 10, 또는 CD46 엑손 6, 7, 8, 9 및 10을 포함하는 전사체가 대부분의 결장직장 종양에서 사용되는 1차 스플라이스 변이체라는 것을 제안하다(도 6). 상기 실시예에 기술된 바와 같이, 전체 트랜스크립트 서열 분석 및 포획 전사체의 표적화된 서열 재분석, 둘 모두를 통해 1차 전사체에서는 엑손 6, 8, 9 및 10이 사용되고, 이는 일반적으로는 엑손 7을 포함하지 않는다는 것이 입증되었으며, 따라서, 이는 대부분의 결장직장 종양에서 1차 전사체는 CD46 변이체 D라는 것을 제안한다. 엑손 6, 9 및 10을 사용하는 전사체(변이체 F) 및 6, 8 및 10을 사용하는 전사체(변이체 J) 또한 존재하기는 하지만, 대부분의 환자에서 각각 그 정도는 계속해서 더 낮아졌다(도 6). 엑손-엑손 연결부 특이 프라이머(서열 번호: 3-8)를 사용하여 스크리닝된 12개의 시료 중 한 시료를 통해, 엑손 6, 9 및 10을 발현하는 변이체가 NTX 종양 세포주 SCRx-CR15에서 1차 CD46 전사체이지만, CD46 엑손 6, 8, 9 및 10을 코딩하는 전사체는 더 낮은 정도로 발현되었다는 것이 제안되었다. 놀랍게도, 이러한 데이터 및 상기 실시예에서 기술된 데이터를 통해 결장직장 종양 개시 세포에서 1차 CD46 스플라이스 변이체는 엑손 6, 8, 9 및 10(변이체 D) 또는 엑손 6, 9, 및 10(변이체 F)을 이용한다는 것이 제안된다. CD46이 일관되게 결장직장 종양 및 퀘장 종양, 둘 모두에서 종양 개시 능력과 관련이 있고, 상기 특이 엑손-엑손 연결부는 일반적으로 상기 세포의 표면 상에서 발현되는 CD46 단백질을 코딩할 때 사용되는 바, 엑손 연결부 6-8, 6-9, 및 더 낮은 정도로 엑손 연결부 8-10 및 9-10(엑손 13 또한 스플라이싱으로 배제되었을 때, 변이체 B, D 및 F에 존재)은 예를 들어, 종양 개시 세포로 독소를 전달하거나, 세포독성 T 세포를 동원하여 종양 개시 세포를 제거할 수 있는 권한을 부여받은 항체에 대한 표적이 된다.

실시예 8

[0338] 예시적인 종양 시료에서의 CD46의 단백질 발현

[0339] 상기 실시예에 기술되어 있는 바와 같이, TIC 상에서의 CD46의 표면 발현 증진을 서류로 입증하고, 상기 세포 및 종양에서 CD46을 코딩하는 데 사용되는 엑손 연결부의 특징을 규명한 후, 유사 종양 시료에서도 상응하는

CD46 단백질 증가가 있는지에 관해 입증하고자 하였다. 이와 관련하여, 외인성 프로모터에 의해 구동된 TP53 과 발현을 하거나, 하지 않는 HEK 293 세포로 구성된 대조군과 함께, 11종의 종양 유형, 또는 그들 각각의 정상적인 인접한 조직으로부터 유래된 432개의 조직 용해물의 4개의 희석액을 포함하는 역상 암 단백질 용해물 어레이 (프로테오스캔 어레이스(ProteoScan™ Arrays); 오리진 테크놀로지스(Origene Technologies))를 제공하였다. 인간 CD46에 대해 생성된 토키 다중클론 항체(HPA; 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)), 또는 CD46 엑손 6, 8, 9 및 10을 코딩하는 단백질 구성체에 대해 생성된 마우스 단일클론 항체(하기 실시예 10으로부터의 것인 SC1.N2 9)을 사용하여 상기 어레이 상의 용해물 중 CD46 단백질 발현을 검출하였다. 비색 검출용 시약 및 프로토콜은 프로테오스캔 어레이스의 제조사로부터 제공받았다. 제작된 어레이 상의 점들을 BZ스캔2 자바 소프트웨어 (BZScan2 java Software)(<http://tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/bzscan/>)를 사용하여 평판 스캐너를 이용함으로써 디지털 영상으로 전환시켜 점 강도를 정량화하였다.

[0340]

상기 검정법의 결과는 도 7A-7C 및 도 8A-C에 제시되어 있고, 이는 CD46 단백질의 발현이 수개의 상이한 종양 유형에서 상향조절되어 있음을 나타낸다. 더욱 구체적으로, 도 7A-C에서는 정상적인 인접한 조직에서, 또는 종양 질환의 다중 병기 전역에 걸쳐 상이한 종양 유형을 가진 환자로부터 수득된 표본으로부터의 종양 조직(즉, 1차 종양 시료)에서 인간 CD46의 발현 수준을 제시하기 위해 범 CD46 항체가 사용되었다. 유사하게, 도 8A-C에서는 다양한 종양 시료에서의 발현 수준을 제시하기 위해 CD46의 엑손 10과 반응하는 항체가 사용되었다. 상기 기술된 바와 같이 데이터를 작성하고, 점 1개당 평균 픽셀 강도(점 밀도)로 나타내었다. 각 데이터 세트에 대해 플로팅된 선은 각 카테고리에서 표본이 평균을 나타내는 것이다.

[0341]

공지된 D46 스플라이스 변이체 모두에 존재하는 엑손 1-6에 의해 코딩되는 영역 내의 한 영역을 인식하는 범 CD46 항체(HPA)를 사용하여 검출된 바와 같이, CD46 단백질 발현은 결장직장 종양 표본의 서브세트, 특히, 병기 IV 질환의 환자에서 유의적으로 상승되어 있는 것으로 나타났다(도 7A). 도 7B는 신경내분비 및 비신경내분비 형태의 질환을 가진 췌장암 환자로부터 유래된 종양 시료 상의 발현 수준을 보여주는 반면, 도 7C는 상이한 병기의 질환을 가진 난소암 환자로부터 유래된 시료 상의 발현 수준을 보여주는 것이다. 유사하게, 14개의 CD46 전사체 모두에 의해 사용되는 CD46 엑손 10을 인식하는, 선택성이 더욱 큰 항체(SC1.N29; 하기 실시예 15에서 특징 규명된 특이성)는 정상적인 인접한 조직에 비하여 더욱 특이적으로 말기 결장직장 종양(도 8A), 난소 종양(도 8B) 및 췌장 종양의 신경내분비 서브타입(도 8C)과 더욱 큰 특이성으로 반응하는 것으로 나타났다. 또한, 다중클론 범 항CD46 항체와 달리, 정상적인 인접한 조직 시료 간의 점 밀도 및 표준 편차는 CD46 엑손 10 특이 항체: SC1.N29로 프로빙하였을 때, 유의적으로 더 낮았다. 이러한 결과는, 정상 조직에서도 최소량으로 나타나기는 하지만, 상기 언급된 종양에서의 CD46 단백질 발현이 암에서 상향조절되어 있다는 것을 제안한다.

[0342]

이러한 데이터는 CD46 과발현이 종양 개시 세포 및/또는 TPC 종식 및 생존에 관여할 수 있다는 상기 실시예의 관찰결과를 지지한다. CD46 발현이 적어도 부분적으로 결장직장 종양 및 췌장 종양에서 TPC 강화된 세포 집단의 경계를 구분 짓고, CD46 표면 발현이 종양발생 및 종양 전파와 관련이 있음을 보여주는 상기 실시예를 고려하여, 항CD46 항체 생성에 사용될 수 있는 CD46 면역원을 구성하기로 결정하였다.

[0343]

실시예 9

[0344]

가용성 CD46 구성체의 제작 및 발현

[0345]

CD46 조절 인자의 생성, 및 이의 특징 규명에 사용하기 위해 D, F 및 J 이소폼을 사용하여 3개의 가용성 CD46 구성체를 제조하였다.

[0346]

CD46 이소폼 D(CD46 유전자의 엑손 1-6, 8-12 및 14를 포함; NM_153826의 코딩 서열에 등가) 및 이소폼 F(엑손 1-6, 9-12, 및 14 포함; NM_172353의 코딩 서열에 등가)의 전장의 ORF를, 종양 시료 Cd4p2로부터 수득된 cDNA로부터 pENTR 벡터(라이프 테크놀로지스)로 PCR 클로닝하였다. DNA 서열 분석을 통해, NCBI RefSeq(NM_172353)와 비교하여 이소폼 F 클론에는 돌연변이가 없는 반면, 이소폼 D 클론은 오픈 리딩 프레임내 뉴클레오티드 +822(여기서, +1 = 야생형 CD46 ORF의 개시 ATG 중의 "A")에 단일 C→T 침묵 돌연변이를 포함한다는 것이 입증되었다. 주형으로서 CD46 이소폼 D cDNA를 사용하여 스플라이스 중복 신장 PCR을 이용함으로써 CD46 이소폼 J (엑손 1-6, 8, 10-12, 및 14 포함; NM_172356의 cd에 등가)에 대한 전장의 오픈 리딩 프레임을 생성하였다. DNA 서열 분석을 통해 이소폼 J 클론에는 상기 기술된 침묵 돌연변이 이상의 추가의 돌연변이는 없다는 것이 확인되었다.

[0347]

각각의 상기 3가지 CD46 변이체로부터의 세포외 도메인(ECD: extracellular domain)을 코딩하는 서열을 pSec-2-하이그로(pSec-2-Hygro) 벡터(라이프 테크놀로지스) 중 뮤린 Ig κ 쇄 리더 서열 및 8X His 태그와 함께 프레

임내 PCR 클로닝하였다. 3개의 CD46 ECD cDNA 모두 성숙 N 말단 잔기(Cys35)로부터 출발하여 (변이체 a 이소폼에서 잔기 343에 상응하는) 각 이소폼에 대한 막횡단 도메인까지의 CD46 단백질을 코딩한다. 고성능 어큐프라임 (AccuPrime)™ Taq DNA 폴리머라제(라이프 테크놀로지스)를 사용하여 PCR에 의해 cDNA 구성체 모두를 생성하고, pSec-Tag(라이프 테크놀로지스)의 독특한 Sfi I-Pme I 부위로 클로닝하였다. 상이한 CD46 스플라이스 변이체를 코딩하는 플라스미드로 HEK-293T 세포를 일과적으로 형질감염시켰다. 니켈 친화성 칼럼을 사용하여 일과적으로 형질감염 세포 배양물 상청액으로부터 히스티딘 태그에 융합된 가용성의 분비된 CD46 ECD 단백질을 정제하였다. 포스페이트 완충처리된 염수(PBS)(pH 7.2) 중에서 수퍼덱스x200(Superdex200) 칼럼(GE 헬쓰케어)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단백질을 추가로 정제하였다.

[0348] 생성된 구성체 CD46D-His(서열 번호: 9), CD46F-His(서열 번호: 10) 및 CD46J-His(서열 번호: 11)에 대한 아미노산 서열이 바로 다음에 제시되어 있다.

CD46D-His (서열 번호: 9)

```

1  AQPACEEPPTFEAMELIGKPKPYYEIGERVVDYKCKKGYFYIPPLATHTIC
51  DRNHTWLPVSDDACYRETCPIRDPLNGQAVPANGTYEFGYQMHFICNEG
101 YYLIGEEILYCELKGSAIWSGKPPICEKVLCTPPPKIKNGKHTFSEVEV
151 FEYLDATVYSCDPAPGPDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPECKVVKCRF
201 PVVNGKQISGFGKKFYYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDSNSTWDPPV
251 PKCLKVSTSSTTKSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGILDSDLHH
301 HHHHHH*
```

[0349]

CD46F-His (서열 번호: 10)

```

1  AMVLLYSFSDACEEPPTFEAMELIGKPKPYYEIGERVVDYKCKKGYFYIP
51  PLATHTICDRNHTWLPVSDDACYRETCPIRDPLNGQAVPANGTYEFGYQ
101 MHFICNEGYYLIGEEILYCELKGSAIWSGKPPICEKVLCTPPPKIKNGK
151 HTFSEVEVFYEYLDATVYSCDPAPGPDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAAPE
201 CKVVKCRFPVVENGKQISGFGKKFYYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDS
251 NSTWDPPVPKCLKVSTSSTTKSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEG
301 ILDSLDDHHHHHHHH*
```

[0350] CD46J-His (서열 번호: 11)

```

1  AVLLLYSFSDACEEPPTFEAMELIGKPKPYYEIGERVVDYKCKKGYFYIP
51  LATHTICDRNHTWLPVSDDACYRETCPIRDPLNGQAVPANGTYEFGYQM
101 HFICNEGYYLIGEEILYCELKGSAIWSGKPPICEKVLCTPPPKIKNGKH
151 TFSEVEVFYEYLDATVYSCDPAPGPDPFSLIGESTIYCGDNSVWSRAPEC
201 KVVKCRFPVVENGKQISGFGKKFYYKATVMFECDKGFYLDGSDTIVCDSN
251 STWDPPVPKCLKVSTSSTTKSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYPKPEEGI
301 LDSLDHHHHHHHH*
```

[0351]

[0352] 실시예 10

[0353] CD46 조절 인자 생성

[0354] CD46D-His 접종을 통해, 본원의 교시에 따라 뮤린 항체 형태의 CD46 조절 인자를 제조하였다. 이와 관련하여, 과증식성 장애 치료를 위해 CD46 작용을 치료학적으로 억제시키는 데 사용될 수 있는 고친화성의 뮤린 단일클론 항체를 생성하는 데 3가지 마우스 계통을 사용하였다. 구체적으로, 하기와 같이 Balb/c, CD-1 및 FVB 마우스 계통을 인간 재조합 CD46으로 면역화시키고, 이를 사용하여 하이브리도마를 생산하였다:

[0355] 항원

[0356] 실시예 9로부터의 CD46-D-His의 세포외 부분을 포함하고, CD46 단백질 서열로부터 유래되고, 엑손 6-8 및 6-9의 엑손-엑손 연결부내 위치하는 2개의 합성 웨티드를 포함하는 재조합 융합 단백질, 두 모두를 이용하여 마우스를 면역화시켰다.

[0357] 고체상 합성(아나스펙, 인코퍼레이티드(AnaSpec, Inc.))을 사용하여 2가지 웨티드(길이 21-22 aa) 모두를 합성하였다. CD46 단백질에 기초한 웨티드의 아미노산 서열은 하기와 같았다:

엑손 6-8 연결부: CVPKSLKVSTSSTTKSPASSAS (서열 번호: 12)

엑손 6-9 연결부: PVPKSLKGPRPTYKPPVSNYPG (서열 번호: 13)

[0358]

면역화

[0360]

3가지 계통의 암컷 마우스 Balb/c, CD-1 및 FVB를 사용하여 CD46에 대한 마우스 단일클론 항체를 제조하였다. 재조합 CD46D-His(마우스 1마리당 10 μ g)와 조합된 합성 CD46 웨პ티드 1 및 2CD46 웨პ티드 1 및 2 혼합물(각 면역화에 대해 마우스 1마리당 50 μ g)을 10회 용량으로 발바닥에 주사하여 마우스를 면역화시켰다. 면역원 혼합물을 동량의 타이터맥스(TITERMAX) 또는 알룸 애주번트로 유화시킨 후 주사하였다.

[0361]

CD46에 대한 마우스 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0362]

혈청 양성 면역화된 마우스를 희생시키고, 배출 램프절(램프절이 종대된 경우에는 슬와 및 서혜 램프절)을 절개하고, 항체 생산 세포에 대한 공급원으로서 사용하였다. B 세포의 단일 세포 혼탁액(6.35 X 10⁷개의 세포)을 전기 용합에 의해 1:1의 비율로 비분비형 P3x63Ag8.653 골수종 세포(ATCC #CRL-1580)와 용합시켰다. 용합 발생기, 모델 ECM2001(진트로닉 인코퍼레이티드(Genetronic, Inc.))을 사용하여 전기 세포 용합을 수행하였다. HAT(시그마(Sigma) #A9666)로 보충된 하이브리도마 선별 배지((15% 태아 클론 I 혈청(하이클론(Hyclone)), 1 mM 피루브산나트륨, 4 mM L 클루타민, 10 μ g/mL 젠타마이신, 50 μ M 2-머캅토에탄올, 100 μ M 하이포크산틴, 0.4 μ M 아미노프테린, 및 16 μ M 티미딘을 함유하는 DMEM(셀그로(Cellgro) 카탈로그 번호 15-017-CM) 배지) 중에 세포를 재현탁시킨 후, 최종 플레이팅은 96 웰 플레이트당 2 X 10⁶개의 B 세포인 것에 기초하여 20개의 96 웰 편평한 바닥 조직 배양 플레이트에 200 μ l/웰로 플레이팅하였다. 이어서, 플레이트를 7-10일 동안 5% CO₂ 및 95% 대기를 함유하는 습윤화된 37°C 인큐베이터에 놓았다.

[0363]

항인간 CD46 항체 스크리닝

[0364]

ELISA에 의해 15개의 96 웰 플레이트로부터의 상청액을 스크리닝하였다. 더욱 구체적으로, ELISA 마이크로타이터 플레이트를 형질감염된 HEK-293 세포로부터 정제된 재조합 CD46D-His 용합 단백질로 카보네이트 완충제 중 100 ng/웰로 코팅하였다. 플레이트를 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 200 μ l/웰의, PBS/트윈(0.05%) 중 3% BSA로 차단시켰다. 하이브리도마 플레이트로부터의 상청액을 각 웰에 첨가하고, 주변 온도에서 1-2시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척한 후, 호스래디쉬 퍼옥시다제(잭슨 이뮤노 리서치(Jackson Immuno Research))와 접합된 염소 항마우스 IgG(Fc 단편 특이)과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 후, 플레이트를 TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 기질(써모 사이언티픽 34028)로 발색시키고, 분광광도계에 의해 OD 450에서 분석하였다.

[0365]

CD46 특이 하이브리도마(154개의 상청액이 항원과 반응하였다)를 세포 배양물 중에서 확장시키고, 재플레이팅시키고, 재스크리닝하고, 제한 희석법에 의해 또는 단일 세포 FACS 분류법에 의해 일련으로 서브클로닝하였다. 생성된 클론 집단을 확장시키고, 냉동 배지(90% FBS, 10% DMSO) 중에서 냉동보존하고, 액상 질소 중에 보관하였다.

[0366]

실시예 11

[0367]

유세포 분석에 의한 CD46 조절 인자 특징 규명

[0368]

유세포 분석 검정을 위해, 50 x 10⁶개의 SW480 세포(ATCC 카탈로그 번호 CCL-228; 이는 천연적으로 인간 CD46을 고수준으로 발현하는 것으로 알려져 있다)를 같은 개수의 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO-S; 이는 인간 CD46을 발현하지 않는다)와 혼합하여 최종 농도가 2.5 x 10⁶개의 세포/mL가 되도록 만들었다. 20 μ l의 상기 세포 혼합물을 15개의 96 웰 플레이트의 각 웰 중, 실시예 10에 기술된 바와 같이 수득된 상이한 클론으로부터 유래된 CD46 항체 함유 상청액 25 μ l에 첨가하였다. 완만하게 와동시켜 시료를 혼합하고, 플레이트를 4°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 한번 세척한 후, 암실에서 4°C에서 30분 동안 다이라이트 649(DyLight649) 항마우스 IgG(바이오레전드 인코퍼레이티드)로 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 세척하고, DAPI(4',6-디아미노-2-페닐인돌; 분석으로부터의 죽은 세포 제거용)로 대조 염색하였다. 상업적으로 이용가능한 마우스 단일클론 CD46 항체(MEM-258; 바이오레전드)를 1:100으로 희석하여 양성 대조군 시료를 제조하고, 음성 대조군은 오직 항마우스 IgG로만 표지하였다. 시료를 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0369] 상기 기술된 유세포 분석 프로토콜을 사용하여, (1,440개의 유망한 CD46 항체 발현 하이브리도마 클론 중) 154 개의 양성 하이브리도마 상청액 중 114개가 세포 표면 상의 인간 CD46과 상호작용하는 항체를 포함한다고 판단되었다(데이터 나타내지 않음). 유세포 분석에 의한 항체 스크리닝을 통해, 본 발명의 조절 인자를 사용하여 세포 표면 CD46 발현의 특징을 효과적으로 규명할 수 있고, CD46 양성 세포를 단리시킬 수 있다는 것이 입증되었다.

[0370] 실시예 12

[0371] CD46 조절 인자 내재화

[0372] CD46에 대하여 생성하는 항체를 생산하는 하이브리도마로부터의 상청액을, 세포 표면 상에서 CD46을 발현하는 것인 K562 세포에서 이의 내재화 능력에 대하여 스크리닝하였다. 출발 농도 10^6 개/ml의 K562 세포(단일 세포 혼탁액)를 실온에서 10분 동안 인간 트루스케인(TruStain)(바이오헤리드 인코퍼레이티드)으로 차단하고, 각 조건 당 5×10^4 개의 세포로 희석시켰다. 이어서, 2별의 시료를 얼음 상에서 30분 동안 최종 부피 50 μ l의 항체 함유 상청액으로 염색하였다. 이어서, 세포를 FACS 염색 배지(FSM: FACS staining medium; 2% 우태아 혈청/헹크스 (Hank's) 완충처리된 염수 용액/25 mM HEPES [pH7.4])로 세척하여 비결합 항체를 제거하였다. 상기 단계 후, 얼음 상에서 30분 동안 당나귀 항마우스 알렉사647(Alexa647)(라이프 테크놀로지스)로 2차 염색을 수행하였다. 다시 시료를 세척하여 비결합 항체를 제거한 후, 내재화 배지(2% 우태아 혈청/이스코브 변형 둘베코 배지 (Iscoive's Modified Dulbecco's Medium)) 중에 재현탁시켰다.

[0373] 내재화될 수 있도록 하기 위해, 시료를 5% CO₂ @ 37°C에서 (또는 대조군의 경우, 4°C에서) 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 시료를 얼음으로 끓기고, 과량의 냉동 FSM을 첨가함으로써 내재화를 종결시켰다. 내재화되지 못하고, 세포 표면 상에 남아있는 임의의 항체를 제거하기 위해, 시료를 얼음 상에서 10분 동안 pH가 낮은 PBS(pH 2.0)로 처리하였다. 상기 "산 스트립" 방법을 수행한 후, 시료를 FSM으로 철저하게 세척하고, 2 μ g/ml의 DAPI를 함유하는 150 μ l의 FSM 중에 재현탁시키고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 배경값을 초과하는 것으로 검출된 임의의 신호는, 산 스트립 공정 동안 형광 접합체를 세포 표면으로부터의 제거로부터 보호하는 과정인 항체 내재화로부터 일어난 것이었다. 달리 언급되지 않는 한, 모든 인큐베이션을 FSM 중에서 수행하였다.

[0374] 상기 기술된 산 스트립 프로토콜을 사용하여 75개 이상의, CD46 항체 함유 하이브리도마 클론 상청액을 스크리닝하였을 때, 다수의 상청액의 형광은 IgG1 및 IgG2b 음성 대조군 항체와 비교하여 양의 방향으로 이동한 것으로 나타났다(도 9A). 예를 들어, 예시적인 SC1.N149 및 SC1.N71 클론은 상기 클론으로부터의 상청액이 알렉사 647 2차 항체를 내재화하여 산 스트립으로부터 보호할 수 있는 한에 있어서는, 탁월한 내재화를 입증하였다. 상기 데이터는 인간 CD46 스플라이스 변이체 특이 웨티드 및 CD46D-His에 대하여 생성된 항체 서브세트는 그가 세포 상에 존재하고, 내재화가 가능하기 때문에, 항원에 결합한다는 것을 입증한다(도 9A).

[0375] 실시예 13

[0376] 표적 모이어티로서의 CD46 조절 인자

[0377] 항체에 안정적으로 연결된 세포독성 약물의 표적화는 고형 종양 환자에게 치료학적으로 큰 도움이 될 수 있는 권한을 부여받은 항체 접근법을 나타낸다. 상기 기술된 CD46 특이 항체가 세포독성제의 생세포로의 전달을 매개할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 리보솜 불활성화 단백질 사포린(어드밴스트 타겟팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems))에 접합된 항마우스 2차 항체를 이의 마우스 Fc 영역을 통해 CD46 항체에 결합시킨 것인, 시험관내 세포 사멸 검정법을 수행하고, 72시간 경과 후, 상기 사포린 접합체가 내재화하여 세포를 사멸시킬 수 있는 능력을 세포 생존능을 측정함으로써 측정하였다.

[0378] 구체적으로, 96 웰 플레이트의 웰 중에 웰당 5,000개로 K562 세포를 플레이팅하였다. 상기 기술된 항CD46 항체를 항체 함유 상청액으로서 스크리닝하거나, 또는 상청액으로부터 정제한 후, 20 μ g/ml로 희석시켰다. 각각의 분취량의 각 항체를 항마우스 ZAP 또는 IgG-ZAP(어드밴스트 타겟팅 시스템즈)와 1:1로 혼합하고, 5초 동안 와동시킨 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 10배 희석된 항체-사포린 접합체의 두 일련의 추가 희석액을 제조하고, 각 혼합물 50 μ l씩을 각각, 이미 50 μ l의 배지를 함유하고 있는, K562 세포 함유 웰에 첨가하였다. 이어서, 세포/항체-접합체 혼합물을 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 인큐베이션 후, 세포를 등근 바닥형 96 웰 플레이트 중에서 스펀 다운시키고, 상청액을 제거하고, 100 μ l의 새 배양 배지를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 세포를 추가의 72시간 동안 인큐베이션시킨 후, 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)(프로메가 인코퍼레이티드(Promega Inc.))를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생존가능한 세포의 개수를

계수하였다.

[0379] CD46 특이, 내재화 항체 클론을 상기 기술된 바와 같이, 사포린 독소 내재화 및 세포 사멸을 매개할 수 있는 이의 능력에 대해 스크리닝하였을 때, 실시예 12의 내재화 검정에서 내재화할 수 있었던 항체 클론 모두 시험관내에서 세포 사멸을 매개할 수 있었던 반면, 비특이 마우스 IgG SAP 항체 대조군은 세포를 사멸시키지 못했다(도 9B). 이러한 관찰 결과는, 본원에 기술된 내재화 항CD46 항체가 세포독성 독소의 세포로의 전달을 매개함으로써, 결과적으로는 CD46⁺ 세포를 균절시킬 수 있다는 것을 확인시켜 준다. 종양 재생 및 요법에 대한 내성의 책임이 있는 결장직장 종양 세포 및 혀장 종양 세포는 상기 기술된 바와 같이 CD46⁺이기 때문에, 본원에 기술된 단일클론 항체는 환자의 총 생존율에 유의적인 영향을 미칠 수 있는, 현 치료 지침의 요법을 뛰어넘는 치료제로서의 큰 잠재능을 가지고 있다.

실시예 14

CD46 조절 인자의 서열 분석

[0382] 상기 결과에 기초하여, 고정화된 인간 CD46에 걸보기상 고도의 친화도로 결합하는 다수의 예시적인 별개의 단일 클론 항체를 선택하였다. 도 11a 및 11b에 표 양식으로 제시되어 있는 바와 같이, 실시예 10으로부터의 mAb를 코딩하는 DNA에 관한 서열 분석을 통해 다수가 독특한 VDJ 재배열을 가지고 있고, 신규한 상보성 결정 영역을 나타낸다는 것을 확인하였다. 도 11b에 제시된 상보성 결정 영역은 [Chothia et al., 상기 문현 동일]에 따라 정의된 것임에 주의한다.

[0383] 서열 분석을 개시하기 위해, 트리졸(TRIZOL) 시약을 인비트로겐(라이프 테크놀로지스)으로부터 구입하였다. 1 단계 RT PCR용 키트 및 퀴아첵 PCR 정제용 키트는 퀴아젠, 인코퍼레이티드로부터 구입하고, RN아신(RNasin)은 프로메가(Promega)로부터 입수하였다. 커스텀 올리고뉴클레오티드는 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스로부터 구입하였다.

[0384] RNA 시료용 트리졸 시약 중에 하이브리도마 세포를 용해시켰다. $10^4 \mu\text{l}$ 내지 10^5 개 사이의 세포를 1 ml 트리졸 중에 재현탁시켰다. $200 \mu\text{l}$ 의 클로로포름을 첨가한 후, 투브를 왕성하게 진탕시켰다. 시료를 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 수성 상을 새 미세원심분리 투브로 옮기고, 동량의 이소프로판올을 첨가하였다. 투브를 왕성하게 진탕시키고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 시료를 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 펠릿을 1 ml의 70% 에탄올로 한번 세척하고, 실온에서 잠시 동안 건조시켰다. RNA 펠릿을 DEPC로 처리된 물 40 μl 로 재현탁시켰다. 1% 아가로스 겔 중에서 3 μl 를 분별화하여 RNA의 시료의 양을 측정하였다. RNA를 사용시까지 -80°C 냉동기에서 보관하였다.

[0385] 뮤린 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄에 특이적인 컨센서스 프라이머 세트를 사용하여 증폭된 하이브리도마의 DNA의 가변 서열을 가변 도메인 프라이머 믹스를 사용함으로써 수득하였다. 1 단계 RT-PCR용 키트를 사용하여 각 RNA 시료로부터의 VH 및 VK 유전자 세그먼트를 증폭시켰다. 퀴아젠 원스텝(Qiagen One-Step) RT-PCR용 키트는 센시스크립트(Sensiscript) 및 옴니스크립트(Omniscript) 역전사효소의 블렌드, 핫스타Taq(Hot StarTaq) DNA 폴리머라제, 퀴아젠 원스텝 RT-PCR 완충제, dNTP 믹스, 및 "난해한"(예컨대, GC가 풍부한) 주형이 효율적으로 증폭될 수 있도록 하는 신규한 첨가제인 Q 용액을 제공한다.

[0386] 3 μl 의 RNA, 0.5의 100 μM 의 중쇄 또는 카파 경쇄 프라이머 5 μl 의 5 x RT-PCR 완충제, 1 μl 의 dNTP, 역전사 효소 및 DNA 폴리머라제를 함유하는 효소 믹스 1 μl , 및 0.4 μl 의 리보뉴클레아제 억제제 RN아신(1 유니트)을 포함하는 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물은 역전사 및 PCR, 둘 모두에 필요한 시약 모두를 포함하였다. 열 사이클러 프로그램은 50°C에서 30분 동안, 95°C에서 15분 동안, 이어서, (95°C에서 30초 동안, 48°C에서 30초 동안, 72°C에서 1.0분 동안 진행되는) 30 사이클인 RT 단계였다. 이어서, 72°C에서 10분 동안 최종적으로 인큐베이션시켰다.

[0387] 직접적인 DNA 서열 분석을 위한 PCR 생성물을 제조하기 위해, 제조사의 프로토콜에 따라 퀴아첵™ PCR 정제용 키트를 사용하여 정제하였다. 50 μl 의 멸균수를 사용하여 회전식 칼럼으로부터 DNA를 용리시킨 후, 직접 양 가닥 모두로부터 서열을 분석하였다. PCR 단편의 서열을 직접 분석하고, VBASE2를 사용하여 DNA 서열을 분석하였다(문현 [Retter et al. Nucleic Acids Res. 33: 671-674, 2005]).

[0388] 상기 논의된 바와 같이, 열 여덟개(18)의 예시적인 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 아미노산 및 핵산 서열이 도 10a-10r에 각각 제시되고 있고(서열 번호: 14-85), 상기 항hCD46 항체의 유전자 배열 및 유도된 CDR(문현 [Chothia et al., 상기 문현 동일])에 의해 정의된 바와 같다)은 각각 도 11a 및 11b에 표 형식으로 제시되어 있

다(서열 번호: 86-193).

[0389] 서열 분석된 18개의 단일클론 항체 중 유효 분율(50%)의 항체가 VK10 및 VK14 경쇄 생식계열 세그먼트를 포함하였다는 것을 아주 흥미로운 일이다. 더욱 구체적으로, 면역화된 마우스 레퍼토리에서 IGKV 10-94 및 IGKV14-111 유전자 사용에 대해 강하게 편향되어 있었다. 8개의 mAb 중 6개는 IGKV 10-94 유전자를 사용하였고, 19개의 mAb 중 3개는 IGKV14-111 유전자를 사용하였다는 것인 추가 분석을 통해 밝혀졌다. IGKV 14-111 유전자 세그먼트를 사용하는 3가지 항체(SC1.N56, SC1.N66 및 SC1.N77)가 CD46 수시 도메인 1 내의 에피토프를 인식한다. IGKV10-94 유전자 세그먼트를 사용하는 6개의 항체 중 5가지가 수시 도메인 3-4 내의 에피토프를 인식한다. 물론 선별 방법의 성질이 불명확하기는 하지만, 생식계열 유전자 세그먼트의 CDR 영역이 CD46의 항원 결정기와의 결합에 바람직한 입체형태를 형성할 수도 있다. 동시에 가변 영역 편향성은 상응하는 중쇄에서는 관찰되지 않았다.

[0390] 실시예 15

[0391] CD46 조절 인자의 에피토프 결정

[0392] 상기 논의된 바와 같이, CD46은 (액손 1-6에 의해 코딩되고, 모든 CD46 전사체에 대해 공통적인) 세포외 도메인의 아미노 말단 도메인이 4개의 짧은 컨센서스 반복부(SCR)로 구성된 I형 막 당단백질이다. 이를 SCR들은 각각 대략 60개의 아미노산으로 이루어진 시스테인인 풍부한 도메인이다. 그 다음으로 CD46의 4개의 SCR에 이어서, 문헌 [Karosi et al., 상기 문헌 동일](이는 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같이, 3개의 스플라이스 변이체 CD46D, CD46F 및 CD46J를 정의하는 STP 도메인이 따른다. 범 CD46 항체(즉, SCR 중 하나 이상과 결합하는 항체)와 이소폼 특이 CD46 항체 사이를 구별하기 위해, 일반적으로 실시예 9에 기술되어 있는 바와 같이 pSec-Tag 백터에서 범 CD46 ECD-Fc 구성체를 생성하였다. 상기 구성체는 4개의 SCR을 코딩하며(즉, 액손 1-6), 이를 사용하여 CD46 ECD 변이체에 대해 상기 기술되어 있는 것과 동일한 방법을 이용함으로써 HEK-293T 세포에서 CD46 ECD-Fc를 발현하였다(데이터는 나타내지 않음). 각 하이브리도마 상청액을 각 범 또는 이소폼 특이 CD46 ECD 단백질에의 결합에 대하여 테스트하였다. 실시예 9로부터의 CD46 액손 1-6 및 CD46D-His, CD46F-His 및 CD46J-His의 서열로부터 유도된 His 태깅된 정제된 CD46 항원을 사용하여 ELISA 플레이트를 코팅시켰다. HRP 표지된 염소 항마우스 IgG에 의해 각 단일클론 항체의 결합을 검출하였다. CD46 세포외 도메인의 처음 6개의 액손은 포함하고, 액손 7-10은 포함하지 않는 CD46 항원과 반응할 수 있는 범 CD46 항체의 능력에 의해 범 CD46 항체를 확인하였다. 160개의 mAb 중 155개가, 모든 CD46 재조합 발현된 엑토도메인에 결합하는 범 항체인 것으로 밝혀졌다. 5개의 mAb는 CD46의 처음 6개의 액손 중의 에피토프를 인식하는 데는 실패하였지만, 3개의 스플라이스 변이체 CD46D, CD46F 및 CD46J를 정의하는 STP 도메인은 인식하였다.

[0393] 도 12의 A는 SC1.N122 및 SC1.N29 항체에 대한 ELISA 데이터의 그래프적 표현을 나타낸 것이다. SC1.N122는 CD46 액손 1-6(즉, CD46ECD-Fc), CD46D-His, CD46F-His 및 CD46J-His에 결합하는 바, 이는 범 CD46 항체라는 것이 데이터를 통해 제시된다. 한편, SC1.N29는 CD46 액손 1-6은 거의 결합하지 않거나, 전혀 결합하지 않는 것으로 나타났지만, CD46D-His, CD46F-His, 및 CD46J-His에는 결합하는 것으로 나타났다. 따라서, SC1.N29는 액손 8, 및 액손 9에 의해 코딩되는 ST 도메인, 또는 액손 10 내의 막 인접 도메인에 결합한다는 것이 상기 데이터를 통해 나타났다.

[0394] SC1.N29에 의해 인식되는 CD46의 영역을 더욱 구체적으로 확인하기 위해, CD46의 다양한 액손-액손 연결부로부터 유도된 합성 펩티드를 직접 ELISA 플레이트 상에 코팅시켰다. RP 표지된 염소 항마우스 IgG에 의해 SC1.N29의 상기 펩티드에의 결합을 검출하였다. 도 12의 B에 제시된 바와 같이, SC1.N29는, 액손 9-액손 10 연결부로부터 유도된 것인 펩티드 4에 결합하였다. SC1.N29가 펩티드 4(도 12의 B) 및 CD46J(도 12의 A)에 결합하였는 바, 상기 데이터는 오직 액손 10 중의 영역 잔기만이 상기 펩티드와 CD46J 단백질, 둘 모두에 공통적이기 때문에 SC1.N29는 액손 10 중의 영역에 결합한다고 제안한다.

[0395] 실시예 16

[0396] 단일클론 항체 CD46 조절 인자의 인간화

[0397] 컴퓨터 지원 CDR 이식 방법(아비시스 데이터베이스(Abysis Database: UCL 비지니스 피.(UCL Business Pic.)) 및 표준 분자 공학 기법을 사용하여 뮤린 항체 SC1.N71 및 SC1.N149를 인간화함으로써 hSC1.N71 및 hSC1.N149 조절 인자를 수득하였다. 가변 영역의 인간 골격 영역은 마우스 골격 서열과의 이의 최고 서열 상동성 및 이의 정규 구조에 기초하여 선택하였다. 분석 목적으로, 각각의 CDR 도메인에 대한 아미노산의 정렬은 코티아 등의 번호매김에 따라 수행하였다. 최적의 인간화된 항체를 생성하기 위해 수개의 인간화된 항체 변이체를 제조하였

다. 두 인간화된 항체 모두 인간 골격 영역과 결합된, 마우스 하이브리도마로부터의 항원 결합 상보성 결정 영역(CDR)을 보유하였다. 인간화된 SC1.N71 mAb는 개선된 결합 친화도로 CD46 항원에 결합하는 반면, 인간화된 SC1.N149 mAb는 이의 마우스 대응물과 동일한 항원 결합 친화도를 보유하였다.

[0398] 당업계에 공지되어 있는 기법을 사용하여 분자 공학 방법을 수행하였다. 상기 목적을 달성하기 위해, 제조사의 프로토콜(트리졸® 플러스 RNA 정제 시스템(Trizol® Plus RNA Purification System), 라이프 테크놀로지스)에 따라 하이브리도마로부터 전체 mRNA를 추출하였다. 완전 마우스 레퍼토리를 표적하도록 디자인된, 32개의 마우스 특이 5' 리더 서열 프라이머를 포함하는 프라이머 믹스를 3' 마우스 C_γ1 프라이머와 조합하여 사용함으로써 항체 중쇄의 가변 영역을 증폭시키고 서열 분석하였다. 유사하게, 마우스 카파 불변 영역에 특이적인 단일 역방향 프라이머와 조합된 V_κ 마우스 패밀리 중 각각을 증폭시키도록 디자인된 32개의 5' V_κ 리더 서열 프라이머 믹스를 사용하여 카파 경쇄를 증폭시키고 서열 분석하였다. 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 사용하여 100 ng의 전체 RNA로부터 V_H 및 V_L 전사체를 증폭시켰다.

[0399] 각각의 하이브리도마에 대하여 총 8회의 RT-PCR 반응을 수행하였는데: 그 중 4회는 V 카파 경쇄에 대한 것이고, 4회는 V 감마 중쇄(γ1)에 대한 것이었다. 증폭을 위해 퀴아젠 원스텝 RT-PCR용 키트를 사용하였다(퀴아젠, 인코퍼레이티드). 특이 V 영역 프라이머를 사용하여 추출된 PCR 생성물을 직접 서열 분석하였다. IMGT를 사용하여 뉴클레오티드 서열에 대해 분석함으로써 최고의 서열 상동성을 가진 생식계열 V, D 및 J 유전자 구성을 확인하였다. V-BASE2를 사용하고(문헌 [Retter et al., 상기 문헌 동일]), 마우스 생식계열 데이터베이스에 대해 V_H 및 V_L 유전자를 정렬함으로써 유도된 서열을 Ig V 및 J 영역의 공지된 생식계열 DNA 서열과 비교하였다.

[0400] 뉴클레오티드 서열 정보로부터 SC1.N71 및 SC1.N149의 중쇄 및 경쇄의 V, D 및 J 유전자 세그먼트에 관한 데이터를 획득하였다. 재조합 단일클론 항체의 클로닝을 위해, 서열 데이터에 기초하여, 항체의 Ig V_H 및 V_κ 쇄의 리더 서열에 특이적인 새로운 프라이머 세트를 디자인하였다. 이어서, V-(D)-J 서열을 마우스 Ig 생식계열 서열과 함께 정렬하였다. N71의 중쇄 유전자는 VHQ52.a13.37(V), DSP2.9(D) 및 JH3인 것으로 확인된 반면, N149의 중쇄 유전자는 IGHV1-18(V), DSP2.8(D) 및 JH3인 것으로 확인되었다. 경쇄 유전자는 두 mAb 모두에 대하여 IGKV10-94 및 JK1 생식계열 유전자 패밀리로부터의 것이었다.

[0401] SC1.N71로부터 수득된 중쇄 및 경쇄 서열을 기능성 인간 가변 영역 서열에 대해 정렬하고, 상동성 및 정규 구조에 대해 리뷰하였다. 분석에 기초하여, 인간화된 SC1.N71 구성체에 사용하기 위한, 골격 아미노산 치환이 없는 VH4-59 생식계열 및 JH4 J 세그먼트를 선택하였다. 인간화된 SC1.N71 중쇄의 가변 영역은 인간 VH4-59 생식계열 서열과 88%의 상동성을 나타내었고, 마우스 가변 영역과는 78% 서열 상동성을 나타내었다. SC1.N71의 경쇄의 경우, 유사하게 방법을 수행하여 골격 아미노산 치환이 없는, 인간 생식계열 V_κ 02 및 J 세그먼트 JK1을 선택하였다. hSC1.N71 카파 경쇄의 생성된 가변 영역은 인간 V_κ 02 생식계열 서열과 90%의 상동성을 나타내었고(양의 Z 점수값=0.945), 마우스 가변 영역과는 85% 서열 상동성을 나타내었다. 인간화된 SC1.N71 중쇄의 핵산 서열 및 상응하는 아미노산 서열(서열 번호: 198 및 199), 및 인간화된 경쇄의 핵산 서열 및 상응하는 아미노산 서열(서열 번호: 200 및 201)은 도 13a에 제시되어 있으며, 여기서, CDR(카바트 등에 의해 정의된 바와 같음)은 밑줄로 표시되어 있다.

[0402] 유사한 방법을 수행하여 hSC1.N149를 유도하였다. 상기 분석을 통해 골격 아미노산 치환이 없는, V_H1-18 유전자 세그먼트 및 J 세그먼트 JH4를 포함하는 인간화된 중쇄를 수득하였다. 인간화된 SC1.N149 중쇄의 가변 영역은 인간 VH1-18 생식계열 서열과 87%의 상동성을 나타내었고, 마우스 가변 영역과 77%의 서열 상동성을 나타내었다. 경쇄 가변 영역의 경우, 분석을 통해, 골격 치환이 없는 V_κ 02 및 J 세그먼트 JK1이 효과적일 것으로 나타났다. 인간화된 SC1.N149 카파 경쇄의 가변 영역은 인간 V_κ 02 생식계열 서열과 87%의 상동성을 나타내었고(양의 Z 점수값 = 0.942), 마우스 가변 영역과 80%의 서열 상동성을 나타내었다. 인간화된 SC1.N149 중쇄의 핵산 서열 및 상응하는 아미노산 서열(서열 번호: 202 및 203), 및 인간화된 경쇄의 핵산 서열 및 상응하는 아미노산 서열(서열 번호: 204 및 205)은 도 13a에 제시되어 있으며, 여기서, CDR(카바트 등에 의해 정의된 바와 같음)은 밑줄로 표시되어 있다.

[0403] 두 중쇄 모두의 합성 인간화된 가변 DNA 단편(인티그레이티드 DNA 테크놀로지스)을 인간 IgG1 발현 벡터로 클로닝하였다. 가변 경쇄 단편을 인간 C 카파 발현 벡터로 클로닝하였다. 중쇄 및 경쇄의 CHO 세포로의 공형질감염에 의해 항체를 발현시켰다.

[0404]

더욱 특히, 항체 생산을 위해, 뮤린 및 인간화된 가변 유전자 PCR 생성물의 인간 면역글로불린 발현 백터로의 방향성 클로닝에 착수하였다. Ig 유전자 특이 PCR에 사용된 프라이머 모두 제한 부위(IgH인 경우, AgeI 및 XhoI, IgK인 경우, XmaI 및 DraIII)를 포함하였는데, 이를 통해 각각 인간 IgG1, 및 IGK 불변 영역을 포함하는 발현 백터로의 방향성 클로닝을 수행할 수 있었다. 간략하면, PCR 생성물을 퀴아첵 PCR 정제용 키트(퀴아젠 인코퍼레이티드)로 정제한 후, 각각 AgeI 및 XhoI(IgH), XmaI 및 DraIII(IgK)로 분해하였다. 분해된 PCR 생성물을 정제한 후, 발현 백터로 결찰시켰다. 결찰 반응은 총 부피 10 μ L로 200U T4-DNA 리가제(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), 7.5 μ L의 분해되고 정제된 유전자 특이 PCR 생성물 및 25 ng 선형화된 백터 DNA를 사용하여 수행되었다. 열 쇼크를 통해 42°C에서 적격 E. 콜라이 DH10B 박테리아(라이프 테크놀로지스)를 3 μ L의 결찰 생성물로 형질전환시키고, 이를 암피실린 플레이트(100 μ g/mL) 상에 플레이팅시켰다. 이어서, V_H 영역의 AgeI-EcoRI 단편을 pEE6.4HuIgG1 발현 백터의 동일 부위 내로 삽입하고, 동시에 합성 XmaI-DraIII V_K 삽입체를 각 pEE12.4Hu-카파 발현 백터의 XmaI-DraIII 부위로 클로닝하였다.

[0405]

293세포를 사용하여 적절한 플라스미드로 HEK 293 세포를 형질감염시킴으로써 인간화된 항체를 생산하는 세포를 생성하였다. 이와 관련하여, 플라스미드 DNA를 QIA프렙 스핀 칼럼(QIAprep Spin columns)(퀴아젠)으로 정제하였다. 인간 배아 신장(HEK: Human embryonic kidney) 293T(ATCC 번호 CRL-11268) 세포를 10% 옥틸 불활성화된 FCS, 100 μ g/mL 스트렙토마이신, 100 U/mL 페니실린 G(이들 모두 라이프 테크놀로지스로부터 입수)로 보충된 둘째코 변형 이글 배지(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 중에 표준 조건하에 150 mm 플레이트(팔콘(Falcon), 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에서 배양하였다.

[0406]

일과성 형질감염을 위해, 세포를 80% 컨플루언시까지 성장시켰다. 동량의 IgH 및 상응하는 IgL 쇄 백터 DNA(각각의 백터 DNA 12.5 μ g)를 1.5 mL 옵티 MEM 중 50 μ L HEK 293 형질감염 시약과 혼합된 1.5 mL 옵티 MEM에 첨가하였다. 상기 믹스를 실온에서 30 min 동안 인큐베이션시키고, 배양 플레이트에 고르게 분포시켰다. 형질감염 후 3일 경과하였을 때, 상청액을 수거하고, 10% FBS로 보충된 20 mL의 새 DMEM으로 대체하고, 형질감염 후 6일 경과하였을 때 다시 수거하였다. 10 min 동안 800 x g으로 원심분리하여 배양 상청액을 세포 잔해로부터 제거하고, 4°C에서 보관하였다. 재조합 키메라 및 인간화된 항체를 단백질 G 비드(GE 헬쓰케어)로 정제하였다.

[0407]

실시예 17

[0408]

CD46 조절 인자의 결합 특징 측정

[0409]

다양한 방법을 사용하여 상기 기술된 바와 같이 생성된 선택된 CD46 조절 인자의 결합 특징을 분석하였다. 구체적으로, 일반적으로 상기 실시예 9에 기술된 바와 같은 표준 기법을 사용하여 생성되고 발현된 3개의 CD46 동족체와 관련하여, 다수의 CD46 항체를 친화도, 동력학적 성질, 비닝, 및 교차 반응성에 관하여 특징 규명하였다. 더욱 구체적으로, 마카크(사내에서(in-house) 서열 분석되고 발현된 단백질, 데이터는 나타내지 않음), 마모셋(칼리트릭스 자쿠스(*Callicebus jacchus*); 진뱅크 수탁 번호(GenBank Accession No.): Q8HYX8.2) 및 다람쥐 원숭이(사이미리 시우레우스(*Saimiri sciureus*); 진뱅크 수탁 번호 AAB66819.1 및 AAC39671.1의 조합을 사용하여 제조된 구성체, 데이터는 나타내지 않음) CD46 동족체를 발현하고, 정제한 후, 포르테바이오에 의해 분석하였다. 웨스턴 블로트에 의해 항체의 환원된 및 비환원된 항원에의 반응성 또한 측정하고, 테스트된 항체 중 극히 극소수만이 환원된 항원에 결합하였다. 상기 실험의 결과는 도 14에 표 형식으로 제시되어 있다.

[0410]

상기 데이터와 관련하여, 정확하게 하기 위해 3가지 방법으로 친화도를 측정하였다. 첫번째 방법으로, ELISA로 일련의 항원 희석액에 대해 프로빙된 고정량의 항체에 대한 결합 신호를 측정하여 조절 인자의 상대적인 활성을 측정하였다(데이터는 나타내지 않음). 두번째 방법으로, 이어서, 일련의 표준 항원 농도와 함께 포르테바이오레드(포르테바이오, 인코퍼레이티드) 상에서 바이오층 간섭계 분석을 사용하여 선택된 조절 인자의 친화도 및 반응속도상수 k_{on} 및 k_{off} 를 측정하였다. 마지막으로, 표면 플라즈몬 공명(비아코어 시스템(Biacore System), GE 헬쓰케어)에 의해 선택된 조절 인자의 친화도를 측정하였다. 일련의 표준 항원 농도에 기초하고, 1:1 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델을 사용하여, 항체의 항원에의 결합의 K_d 및 반응속도상수 k_{on} 및 k_{off} 를 측정하였다. 도 14를 통해 표에 포함된 친화도 측정값을 작성하는 데 사용된 방법(F =포르테바이오, B =비아코어)을 확인할 수 있다. 일반적으로, 선택된 조절 인자는 나노몰 범위의, 상대적으로 높은 친화도를 나타내었다.

[0411]

CD46 조절 인자의 특징을 추가로 규명하기 위해, 각각 4개의 수시 도메인 중 하나가 결실되어 있는 것인 절단형 단백질 구성체들을 제작하였다. ELISA를 사용하여 상기 구성체에의 결합을 테스트함으로써 특정 조절 인자의 CD46 표적 영역을 확인하였다. 상기 연구에 대한 실험상의 상세한 설명은 실시예 14에 제시되어 있으며, 테스트된 각 항체의 결합 도메인은 도 14에 제시되어 있다.

[0412] CD46 조절 인자에 의해 인식되는 에피토프가 연속 아미노산을 포함하는지, 또는 항원의 2차 구조에 의해 병치된 비연속 아미노산에 의해 형성되는지 여부를 측정하기 위해, 환원 및 비환원 조건하에서 웨스턴 블로트을 수행하였다. 더욱 특히, 당업계에 주지되어 있는 표준 전기영동 기법을 사용하여, 상기 두 상태에서 CD46 항원을 선택된 조절 인자에 노출시켰다. 도 14에 상세하게 나타나 있는 바와 같이, 대부분의 CD46 조절 인자는 이황화 결합이 원 상태 그대로인(NR) 항원에만 실질적으로 반응한 반면, 2개의 조절 인자는 비환원 및 환원된 항원(NR/R: non-reduced/reduced)과 반응하였다.

[0413] 마지막으로, 시노몰구스, 마모셋, 및 다람쥐 원숭이 CD46 동족체에 관한 교차 반응성은 재조합적으로 발현된 단량체 CD46 항원을 일련의 농도로 사용하여 포르테바이오에서 평가하였다. 도 14에 열거되어 있는 바와 같이, 선택된 조절 인자는 임의 개수의 동족체와 반응성이었다. 특히, SC1.N71 및 SC1.N149는 시노몰구스 및 마모셋과 반응성이었지만, 다람쥐 원숭이와는 무반응성이었다. 표에서 ND는 데이터가 측정되지 않았음을 나타내는 것이다.

실시예 18

선택된 CD46 조절 인자의 에피토프 결정

[0415] 상기 기술된 바와 같이 생성된 선택된 CD46 조절 인자에 의해 정의되는 에피토프를 결정하기 위해, CD46 ECD의 수개의 상이한 변이체를 구성하고, 발현시켰다. 더욱 구체적으로, (문헌 [Adams et al., Journ. Immunol, Vol. 147:3005, 1991] (이는 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같이) 다양한 CD46 SCR 도메인을 증폭시킨 프라이머를 사용하여 CD46 결실 돌연변이체를 디자인하고, 이를 친화도 정제용 Hig 태그(퀴아젠, Ni-NTA)에 융합시켰다. 이어서, 각각 4개의 SCR 도메인 중 하나가 결실되어 있는, 4개의 다른 His 융합 구성체를 표준 생화학법을 사용하여 일반적으로 실시예 9에 기술되어 있는 바와 같이 클로닝하고, 발현시켰다. 293펙틴 (라이프 테크놀로지스)을 사용하여 부착성 HEK-293 세포의 형질감염을 위해 단리된 내독소 무함유 플라스미드 DNA(퀴아젠)를 사용하였다. 형질감염 후 72시간이 경과하였을 때, 발현된 결실 돌연변이체를 포함하는 HEK-293 형질감염된 세포로부터 상청액을 수거하였다. CD46에 대한 수개의 단일클론 항체를, 정의된 SCR 도메인이 결실되어 있는 다양한 CD46 단백질을 인식할 수 있는 이의 능력에 의해 테스트하였다. 더욱 특히, 일반적으로 본원 어디에나 기술되어 있는 방법을 사용하여 수행되는 ELISA 검정법을 통해, 선택된 항체 조절 인자는 각각 SCR 도메인 1부터 4까지의 임의의 조합에 대해 유발된 것으로서 확인되었다. 이들 조절 인자 중 12개에 대한 상기의 데이터는 표 형식으로 제시된 도 14의 "도메인"이라는 표제하에 살펴볼 수 있는데, 여기서, 유래된 결합 도메인이 명시되어 있다. SC1.N29라는 한 항체는 수시 도메인 중 어느 것에도 결합하지 않았고, 오히려, 실시예 15에서 입증된 바와 같이 엑손 9에 결합하였다는 것에 주목하여야 한다.

[0417] 또한 상기 실시예는 치료학적 표적인 것인 선택된 이소폼 또는 스플라이스 변이체와 면역특이적으로 회합하는 CD46 조절 인자를 생성 및 선택할 수 있는 능력을 입증한다.

실시예 19

단일클론 항체 CD46 조절 인자의 특징 규명

[0420] 실시예 17에 기술되어 있는 기법을 사용하여, 인간화된 구성체 hSC1.N71 및 hSC1.N149를 분석함으로써 이의 결합 특징을 측정하였다. 더욱 특히, 두 항체 모두에 대해 인간화된 항체 결합을 모체 뮤린 항체와 직접 비교함으로써 인간화 과정에 의해 유발된 속도 상수의 임의의 미세한 변화를 확인하였다.

[0421] 이와 관련하여, 비아코어에 의해 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 뮤린 SC1.N71의 친화도를 측정함으로써 도 15의 A에 제시된 결과를 제공하였다. (도 15의 A 및 B에서 상부 곡선에서부터 하부 곡선까지를 형성하는) 12.5, 6.25, 3.125 및 1.5625 nM인 일련의 농도에 기초하고, 1:1 랭류어 결합 모델을 사용하여, 항원에의 항체 결합의 K_d 는 1.1 nM 미만인 것으로 추정되었다. 이어서, 인간화된 구성체를 사용하여 수행된 유사 실험에서 등가인 결과가 나왔는데(도 15의 B), 이는 인간화 과정이 친화도에는 어떤 불리한 영향도 미치지 않았다는 것을 나타낸다. 이와 관련하여, 측정 결과, 인간 CD46을 사용하여 테스트하였을 때, 모체 뮤린 항체의 K_d 는 1.1×10^{-9} 인데 반해, 인간화된 구성체의 K_d 는 0.7×10^{-9} 였다(도 15의 C).

[0422] 이어서, hSC1.N149의 결합과, 이의 뮤린 모체 SC1.N149의 것을 비교하기 위해 유사 실험을 수행하였다(데이터는 나타내지 않음). 도 15의 C에서 알 수 있는 바와 같이, 모체 뮤린 항체의 K_d 는 1.1×10^{-9} 인데 반해, 인간화된

항체의 K_d 는 1.2×10^{-9} 였다.

[0423] 친화도 측정 이외에도, 항체를 추가로 테스트하여 마모셋 및 시노몰구스 항원과 관련한 교차 반응성을 측정하였다. 도 15의 C에 제시되어 있는 바와 같이, SC1.N71 및 SC1.N149, 둘 모두 시노몰구스 및 마모셋 CD46 동족체, 둘 모두와 강하게 교차 반응하였는 바, 이를 통해 독성학적 성질에 관한 연구가 용이해졌다. 비록 인간 표적에 대한 것보다는 약간 낮기는 하였지만, 마모셋 및 시노몰구스과의 반응성도 여전히 허용되는 치료 창(therapeutic window) 내에 충분히 포함되었다.

[0424] 실시예 20

[0425] CD46 조절 인자가 진단제로서 사용될 수 있다.

[0426] 본원의 교시에 따라, 개시된 CD46 조절 인자는 환자로부터 유래된 생물학적 시료 중 CD46과 관련된 바이오마커를 검출하기 위한 진단제로서 사용될 수 있다.

[0427] 상기에 언급된 바와 같이, CD46은 세포의 형질막에 상주하는 것으로 알려져 있는 I형 단백질이지만, 이는 메탈로프로테이나제의 작용에 의해 막으로부터 절단될 수 있다. CD46은 막횡단 도메인 양측 모두 위에 있는 막 근위부 영역의 액손 스위칭 및/또는 스킵에 기초한 이의 mRNA의 선택적 스플라이싱에 기인하여 다중의 분자량을 가진 이소폼으로 존재한다. 그러한 특성을 보일 경우, CD46은 특정 질환 병증에서 체액, 예컨대, 혈청 또는 혈장 중에서 검출될 수 있고, 그러므로, 진단 목적으로 유용할 수 있거나, 또는 질환에 대한 생체마커로서의 역할을 할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면을 확인하기 위해, 도 16의 A(인서트)에 제시된 샌드위치 ELISA 포맷을 사용하여 항CD46 항체를 이용함으로써 표준 곡선을 작성하고, 도 16의 A의 상기 표준 곡선(주요 도면)의 일부를 사용하여 건강한 피험체 및 다양한 고형 종양을 앓는 환자로부터 수득된 혈청 시료 중의 CD46 수준을 정량하였다(도 16의 B).

[0428] 더욱 구체적으로, 단일클론 항체 SC1.N35.6을 50 mM 탄산나트륨 완충제(pH 9.6) 중 1 μ g/ml로 표준 ELISA 플레이트 상에 흡착시켰다. 0.05% (v/v) 트윈 20(PBST)을 함유하는 PBS로 플레이트를 세척한 후, 주변 온도에서 2시간 동안 2% (w/v) 우혈청 알부민(여기서부터 이는 "희석제"로서 명명됨)을 함유하는 PBS 중에서 플레이트를 차단시켰다. 플레이트의 내용물을 털어 내고, 희석제 중에 희석된 혈청 시료 또는 다양한 농도의 정제된 재조합 CD46D-His를 주변 온도에서 최소 2시간 동안 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 PBST 중에서 세척한 후, 희석제 중 0.5 μ g/ml로 비오틴에 접합된 CD46 특이 염소 다중클론 항체를 첨가하였다. 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 플레이트를 PBST로 다시 세척하고, 호스래디쉬 퍼옥시다제(액손 이뮤노 리서치)에 접합된 스트렙트아비딘의 1:2,000 희석액과 함께 30분 동안 인큐베이션시켰다. 모든 플레이트를 2회에 걸쳐 PBST로 세척한 후, 100 μ l TMB 기질(써모 사이언티픽)을 웰에 첨가하고, 암실에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 100 μ l/웰로 2 M 황산을 첨가함으로써 발색 반응을 종결시켰다. 표준 플레이트 판독기를 사용하여 모든 웰에서 $\lambda=450$ nm에서의 흡광도를 판독하였다.

[0429] 상기 데이터 세트에서, 12명의 건강한 성인으로부터 유래된 혈청 중의 CD46 수준을 17명의 결장직장암 환자, 6명의 흑색종 환자, 15명의 유방암 환자, 7명의 난소암 환자, 10명의 비소세포 폐암환자, 14명의 전립샘암 환자 및 9명의 췌장암 환자로부터 유래된 혈청의 것과 비교하였다. 도 16의 B에 도시되어 있는 바와 같이, 상기 데이터는 건강한 성의 혈청 시료 중의 평균 CD46 농도가 대략 12.1 ± 2.2 ng/ml인 반면, 결장직장암 환자, 유방암 환자 및 비소세포 폐암 환자에서의 CD46 농도는 유의적으로 더 높게 나타났다(각각 26.6 ± 3.4 , 30.6 ± 2.3 및 42.0 ± 7.1 ng/ml)는 것을 보여준다. 이러한 결과를 통해 본 발명의 개시된 조절 인자가 신생물성 장애를 검출 및/또는 모니터링하기 위한 진단제로서 효과적으로 작용할 수 있다는 것이 입증되었다.

[0430] 실시예 21

[0431] CD46 조절 인자는 표적 모이어티로서 작용한다

[0432] 항체에 안정적으로 연결된 세포독성 약물의 표적화는 고형 종양 환자에게 치료학적으로 큰 도움이 될 수 있는 권한을 부여받은 항체 접근법을 나타낸다. 상기 기술된 CD46 특이 항체가 세포독성제의 생세포로의 전달을 매개할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 리보솜 불활성화 단백질 사포린(어드밴스드 타겟팅시스템즈)에 접합된 스트렙트아비딘을 비오틴화된 CD46 항체 조절 인자에 결합시킨 것인, 시험관내 세포 사멸 검정법을 수행하고, 72시간 경과 후, 상기 사포린 복합체가 내재화하여 세포를 사멸시킬 수 있는 능력을 세포 생존율을 측정함으로써 측정하였다. 더욱 구체적으로, 96 웰 플레이트의 웰 중에 웰당 10,000개로 HEK-293T 세포를 풀레이팅하였다. 그 다음날, 상기 기술된 바와 같이 정제되고 비오틴화된 항CD46 항체를 100 nM로 희석시켰다. 각각의 분취량

의 각 항체를 스트렙트아비딘-ZAP(어드밴스드 타겟팅 시스템즈)와 1:1의 몰비로 혼합하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 항체-스트렙트아비딘-ZAP 접합체를 일련으로 희석시키고, 모든 희석액을 세포에 첨가하였다. 이어서, 세포/항체-사포린 혼합물을 37°C/5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 인큐베이션 후, 셀타이터-글로(프로메가 코포레이션(Promega Corp.))를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생존가능한 세포의 개수를 계수하였다. 항체-스트렙트아비딘-ZAP를 포함하지 않는 배양물이 참조로서의 역할을 하였고, 이의 발광 값을 "100% 생세포"로 설정하였다.

[0433] 상기 프로토콜을 사용하였을 때, 상기 실시예에서 기술된 바와 같이 내재화가 가능한 수개의 항체는 또한 시험관내에서 세포 사멸을 매개할 수 있는 반면, 비오틴화된 이소형 대조군 항체는 세포를 사멸시키지 못했다. 즉, 수개의 이들 내재화 조절 인자가 사포린 독소 내재화를 매개하여 세포를 사멸시킬 수 있었다. 도 17은 예시적인 내재화 조절 인자 SC1.N71, SC1.N146(마우스/인간 키메라 항체로서의 것) 및 SC1.N149에 대한 상기와 같은 세포 사멸 능력을 도시한 것으로서, 여기서, 곡선의 하강 기울기는 대조군과의 비교로 제시된, 농도 의존성 방식의 세포 사멸을 나타내는 것이다. 추가로, 도 17에 제시된 데이터는 실시예 16으로부터의 hSC1.N71 및 hSC1.N149인 두 항CD46 항체는 세포에 의한 CD46 의존성 독소 흡수를 매개할 수 있는 원래의 마우스 항체의 능력을 보유한다는 것을 입증한다. 구체적으로, 50% 세포 사멸을 유발하는 유효 농도(EC₅₀)는 하기와 같이 기록되었다: 비오틴-인간 IgG1, 53.1 nM; 비오틴-마우스 SC1.N71, 51.4 pM; 비오틴-인간 SC1.N71, 26.6 pM; 비오틴-키메라 SC1.N146, 12.1 pM; 비오틴-마우스 SC1.N149, 70.4 pM; 비오틴-인간 SC1.N149, 174 pM.

실시예 22

CD46 조절 인자는 세포 표면 상의 수용체와 상호작용한다

[0435] 세포 사멸이 CD46 조절 인자와, 세포 표면 상에서 발현되는 CD46 수용체 사이의 상호작용에 의해 매개된다는 것을 입증하기 위해, 숙주 세포로의 형질도입시 숙주 세포의 게놈 내로 통합되고, 발현 후, CD46 mRNA의 영역에 특이적으로 결합하여 세포 내에서 mRNA를 빠르게 분해시키거나, 숙주 세포에 의한 CD46 발현을 감소 또는 손실시키는 것인 소형 헤어핀 RNA(shRNA: small hairpin RNA)를 안정적으로 전달할 수 있도록 렌티바이러스를 이용하였다.

[0436] 확립된 기법을 사용하여 CD46 헤어핀(라이프 테크놀로지스)을 함유하는 3세대 렌티바이러스 스톡을 제조하고 농축시켰다. CD46에 특이적인 shRNA, 및 성공적인 형질도입에 대한 마커로서의 청색 형광 단백질을 코딩하는 렌티바이러스 스톡을 HEK293T 세포에 형질도입시켰다. 형질도입 후 6일이 경과하였을 때, 유세포 분석에 의해 CD46 발현 및 청색 형광 단백질 고발현에 대해 세포를 분석하고(나타내지 않음), CD46이 가장 크게 하향조절된 것 및 청색 형광 단백질이 가장 높게 발현된 세포(즉, shRNA C1을 발현하는 것)를 FACS에 의해 분류하였다. 분류된 세포를 추가의 7일 동안 배양한 후, 상기 실시예 21에 기술된 것과 유사한 시험관내 사멸 검정법으로 이의 모체 대응물과 나란히 테스트하였다. 추가로, 두 세포주 모두 형광단 피코에리트린(R&D 시스템즈)에 접합된 항CD46 항체로 염색하고, 유세포 분석에 의해 분석하여 렌티바이러스로 형질도입된(및 분류된) 세포주에서 CD46 발현이 하향조절되어 있음을 입증하였다. 결과는 도 18의 A 및 B에 제시되어 있다.

[0437] 더욱 특히, 도 18의 A는 항CD46 항체로 염색하였을 때, EK-293T-C1 세포는 이의 모체 대응물(흰색 피크)에 비하여 10배 감소된 평균 형광 강도(회색 피크)를 가지는 것으로 입증한다. CD46 발현을 하향조절하는, shRNA를 발현하는 이의 유도체인 HEK293T-C1을 제외한 HEK-293T 세포는 CD46 조절 인자에 의해 유효하게 사멸되었다(도 18의 B). 상기 특정 실시예에서, 명시된 농도의 정제된 항체 및 120 nM의, 리보솜 불활성화 단백질 사포린에 접합된 항마우스 IgG 분자의 Fab 단편(어드밴스드 타겟팅 시스템즈; FAB-ZAP)을 HEK293T 세포 또는 분류된 HEK293T-C1 세포에 첨가하였다. 72시간 동안 인큐베이션한 후, 셀타이터-글로(프로메가 코포레이션)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생존가능한 세포의 개수를 계수하였다. 세포 및 FAB-ZAP를 포함하는 배양물이 참조로서의 역할만을 하였고, 이의 발광 값을 "100% 생세포"로 설정하였다.

실시예 23

CD46 조절 인자가 수용체 의존성 독소 흡수를 매개한다

[0438] 다회의 계대접종에 걸쳐 시험관내에서 성장시킨 전통적인 세포주는 이의 생물학적 성질에 있어서 1차 환자 유래의 종양 세포와 현저한 차이를 보였다. CD46 조절 인자가 환자 종양과 유사한 암 세포에 의한 수용체 의존성 독소 흡수를 매개할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 면역악화된 마우스에 계대접종된, 환자 유래의 비전통적인 이종이식체를 시험관내 사멸 검정법으로 테스트하였다.

[0442] 구체적으로, 유방암 환자로부터 유래된 세포주인 BR31p6 세포를 프리마리아(Primaria) TC 플레이트에 10,000개/웰로 시딩하고, 24시간 동안 저산소 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 배지를 교환하고, 실시예 21에 기술된 바와 같이 제조된 비오티닐화된 항체 및 스트렙트아비딘-ZAP 접합체를 24시간 동안 상기 배양물에 첨가하였다. 셀타이터-글로(프로메가 코포레이션)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생존가능한 세포의 개수를 계수하였다. 항체-스트렙트아비딘-ZAP를 포함하지 않는 배양물이 참조로서의 역할을 하였고, 이의 발광 값을 "100% 생세포"로 설정하였다. 오직 비오티닐화된 SC1.N149 및 스트렙트아비딘-ZAP가 함께 존재하는 경우에만 BR31 세포가 사멸되었다. SC1.N149 단독의 것도, 비오티닐화 이소형 대조군 항체 + 스트렙트아비딘-ZAP도 유의적인 세포 사멸을 매개하지 못했다(도 19의 A).

[0443] CD46 조절 인자가 다수의 고형 종양 적응증 간의 세포독성 페이로드에 대한 비히클로서 사용될 수 있는지를 입증하기 위해, 비전통적인 이종이식체로부터 유래된 종양, 결장직장암 환자로부터 유래된 세포주인 CR42p3, 및 췌장암 환자로부터 유래된 세포주인 PA20p6을 프리마리아 TC 플레이트에 2,000개/웰로 시딩하였다. 72시간 동안 저산소 인큐베이터에서 배양한 후, 1.0 nM 정제된 항체(CD46 조절 인자 또는 이의 이소형 대조군) 및 40 nM FAB-ZAP(도 19의 B 참조)를 추가의 168시간의 배양 시간 동안 상기 배양물에 첨가하였다. 셀타이터-글로(프로메가 코포레이션)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 생존가능한 세포의 개수를 계수하였다. 세포 및 FAB-ZAP를 포함하는 배양물이 참조로서의 역할만을 하였고, 이의 발광 값을 "100% 생세포"로 설정하였다. 항체 SC1.N71 및 SC1.N149가 특이적으로 CR42 및 PA20 세포를 사멸시켰으며, SC1.N71이 SC1.N149보다 다소 더 효능이 큰 것으로 나타났다(도 19의 B).

[0444] CD46 리간드를 발현하는 종양발생 세포에서 세포독성 페이로드의 선택적 내재화에 대한 벡터로서 작용할 때의 개시된 조절 인자의 특이성 및 광범위한 효능이 상기 데이터를 통해 명확하게 입증되었다.

[0445] 실시예 24

[0446] CD46 조절 인자가 화학요법에 대하여 췌장 종양을 감작화시킨다

[0447] 개시된 조절 인자가 췌장 종양의 화학감작성을 증가시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 항CD46 항체를 생체내 검정법에서 항암제와 조합시켰다.

[0448] 더욱 특히, NTX-PA14 환자 유래의 종양 세포주를 사용하여 면역약화된 마우스에서 종양을 개시시키고, 모든 마우스의 평균 종양 용적이 대략 500 mm³에 도달하였을 때, 3개의 군 중 하나로 무작위화시켰다(각 군당 마우스 10마리). 2개의 군을 매주 2회에 걸쳐 20 mg/kg 용량의 켐시타빈, 및 10 mg/kg의, CD46을 표적화하는 항체(SC1.N149) 또는 대조군 비특이 이소형 대응 항체(MOPC)로 처리하였다. 대조군으로서의 역할을 하는 나머지 한 군은 내재화가 불가능하거나, 세포 사멸을 매개할 수 없는 항CD46 항체 약물 접합체를 2 mg/kg의 용량으로 주 1회 투여받았다. 3차 처리 후 1일째(무작위화 후 8일째), 및 종양이 상응하는 요법에 대하여 능동적으로 반응하였을 때, 각 군으로부터 2마리씩 마우스를 안락사시키고, 유세포 분석에 의해 남은 TPC의 빈도를 계수하였다. 구체적으로, TPC 서브집단을 확인 및 정량화할 수 있도록 허용하는 마커에 대한 항체와, 상기 기술된 바와 같이 처리된 마우스로부터 단리된 종양 세포의 단일 세포 혼탁액을 접촉시켰다. 항CD46 항체 SC1.N149 및 켐시타빈의 조합으로 처리된 마우스로부터의 종양에서, TPC 집단과 관련된 세포 표면 마커(즉, CD46 및 CD324)를 발현하는 인간 세포의 비율(%)은 대조군 및 켐시타빈 + MOPC 항체 처리군보다 유의적으로 더 낮았다(인간 세포의 경우, 27% 대 대조군 및 켐시타빈 + MOPC 항체 처리군의 경우, ~39%)(도 20A).

[0449] 본 연구에서 대조군으로서의 역할을 하는, 이의 종양 부하량이 크다는 이유에서 이미 안락사된 마우스를 제외하고, 각 군당 나머지 8마리의 마우스를 7주간의 진행 과정 동안 켐시타빈 및 항체로 추가로 11회에 걸쳐 처리하고(총 14회 처리), 이후, 주 2회에 걸쳐 오직 항체로만(각각 MOPC 또는 SC1.N149) 처리하고, 종양 부하량을 모니터링하였다(즉, 종양 용적 측정). 전반적으로, 두 켐시타빈 처리군 모두에서 종양은 이의 각 처리 요법에 대하여 반응하였고, 100 mm³ 미만으로 퇴행되었지만; SC1.N149 항체 및 켐시타빈으로 처리된 마우스는 켐시타빈만으로 처리된 마우스에서의 종양보다 더 장기간의 무진행 생존을 나타내었다(각각 75일 대 30일) (도 20B).

[0450] 이러한 데이터는 CD46을 표적화하는 항체가 췌장암에서 치료 지침의 요법제인 켐시타빈에 대해 종양 세포를 감작화시킬 수 있다는 것을 입증한다. 켐시타빈으로만 처리된 것에 비하여 네이키드 항CD46 항체 및 켐시타빈, 둘 모두로 처리된 마우스에서 종양 재발은 유의적으로 지연되었는데, TIC가 종양 재발을 가속화시킨다는 상기 설명을 고려해 볼 때, 여기서 제시된 데이터는 네이키드 SC1.N149 항체가 화학요법제 약물, 예컨대, 켐시타빈에 대한 TIC 감작성을 특이적으로 가속화시킬 수 있다는 것을 제안한다.

[0451] 실시예 25

[0452] CD46 조절 인자는 NTX 마우스에서 종양 개시 세포를 감소시킬 수 있다

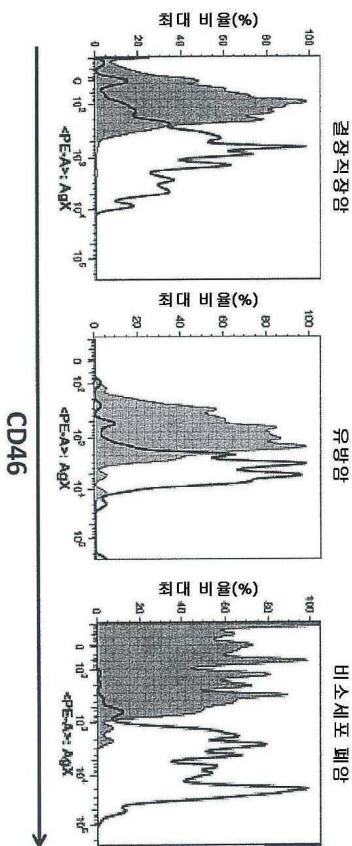
[0453] 적어도 이의 서브집단은 CD46을 발현하는 것인 인간 종양 세포의 인간 종양 단편 또는 단일 세포 상청액을 마우스의 피하, 신피막 또는 이소성 착성으로 마우스에 이종이식시키고, 인간 종양을 보유하도록 하였다. 이어서, 일단 종양 부하량이 100~500 mm³에 도달하고 나면, 인간 종양을 보유하는 마우스를 무작위화시키고, 예를 들어, 단독으로 또는 치료 지침의 화학요법제, 예컨대, 이리노테칸 또는 겔시타빈과 함께 병용하여 최대 10 mg/kg까지 주 1회 또는 2회에 걸쳐 약물을 투여함으로써 인간 CD46을 표적화하는 항체 약물 접합체(ADC: antibody drug conjugate)로 처리하였다. ADC는 세포독성 약물 모이어티 또는 독소에 접합된 항CD46 항체를 포함하는 것이 바람직할 것이다.

[0454] 수주 간의 처리 기간이 경과한 후, 종양은 종양 종괴가 남아있지 않을 때까지 위축되거나, 일부 종괴가 남아있는 상태로 부분적으로 퇴행되거나, 또는 계속 성장하지 않고 그 종괴를 유지하는 것으로 관찰되었다. 후자의 경우(들)에서, 잔류 종양 종괴를 검사한 결과, 다양한 시험관내 검정법(예컨대 콜로니 형성 세포 계수) 및 생체내 검정법(예컨대, 처리된 종양에서 종양 개시 세포의 절대적인 감소 또는 제거를 입증하는 제한 회석 분석)에 의해 측정한 바에 따르면, 종양 종괴에 인간 세포는 남아있지 않는 것으로 나타났거나(즉, 종양 종괴는 잔류 뮤린 기질 세포로 구성되어 있었다) 또는 종양 개시 세포가 감소하였거나 제거된 것으로 나타났다. 추가로, 마우스의 추가의 관찰결과를 통해, 종양 성장이 재발되기 전에 상당히 지연된 것(즉, >60일)으로 드러나는 바, TIC의 감소 또는 제거, 또는 완전한 종양 재발의 예방을 확인할 수 있었다.

[0455] 본 발명은 본 발명의 정신 또는 중심이 되는 속성으로부터 벗어남 없이 다른 구체적인 형태로 구현될 수 있다는 것을 당업자는 추가로 이해할 것이다. 본 발명의 상기 설명은 단지 이의 예시적인 실시양태만을 개시한다는 점에서, 다른 변형도 본 발명의 범주내 포함되는 것으로서 고려된다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 본 발명은 본원에서 상세하게 기술된 특정 실시양태로 제한되는 것이 아니다. 더 정확히 말하면, 본 발명의 범주 및 주제를 나타내는 바와 같이, 첨부된 특허청구범위를 참조하여야 한다.

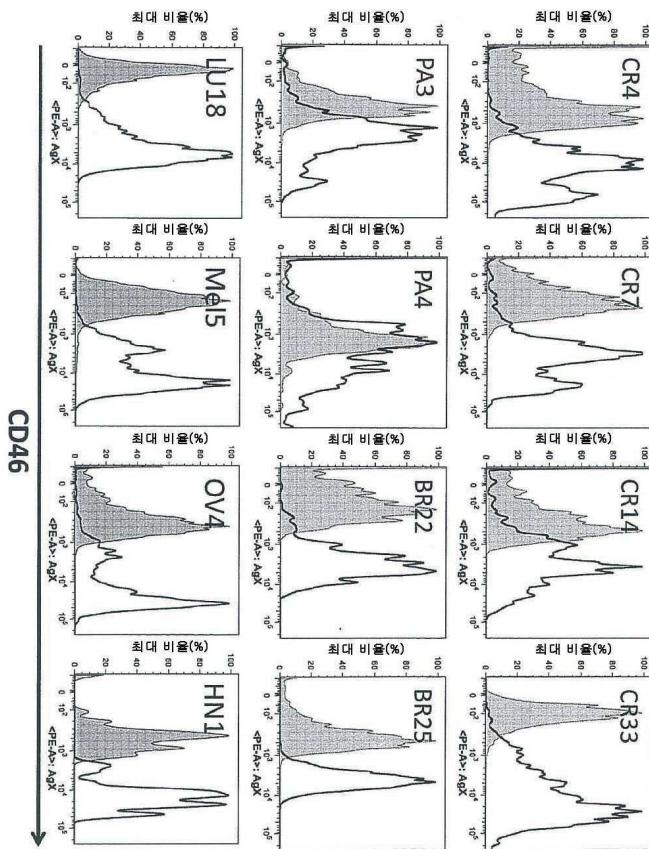
도면

도면 1a



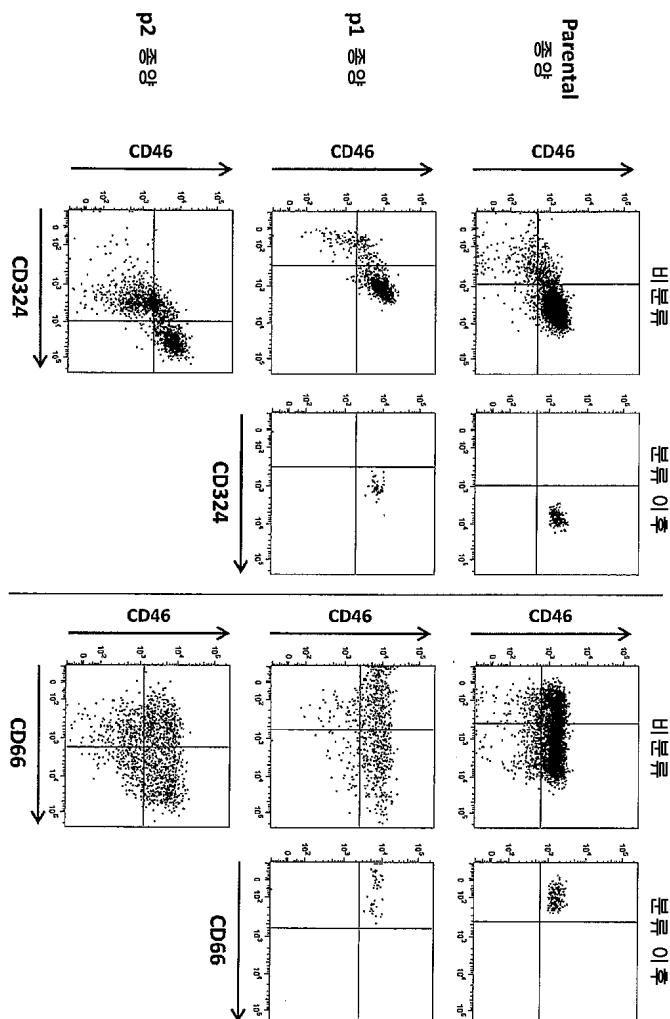
다양한 고형 종양 표본에서의 CD46 이중성의 특징 규명

도면1b



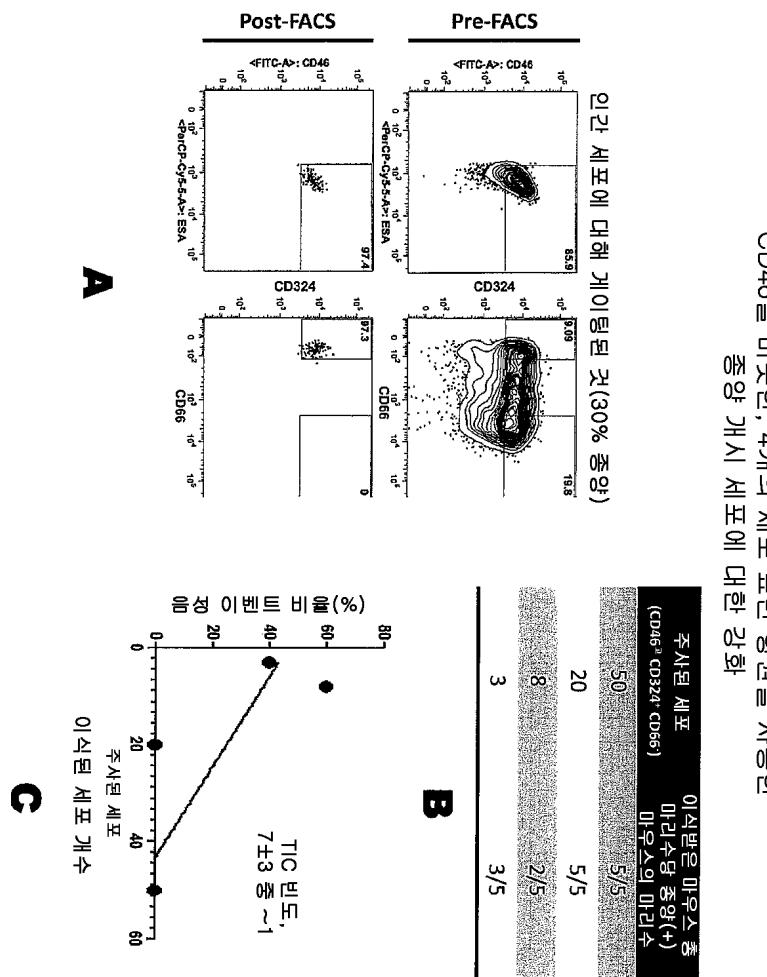
환자 유래의 다양한 NTX 종양 표본에서의 CD46 이질성의 특징 규명

도면2

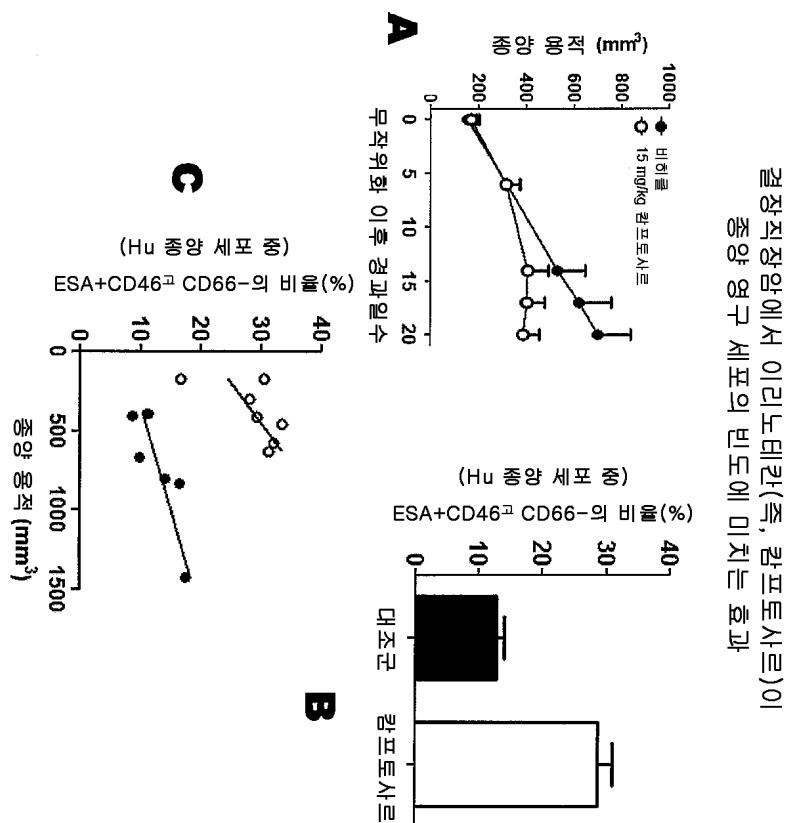


비전통적인 이종이식편 모델에서 일련의 계대 접종에 의한
CD46과 세포의 종양 영구 능력에 관한 일종

도면3



도면4

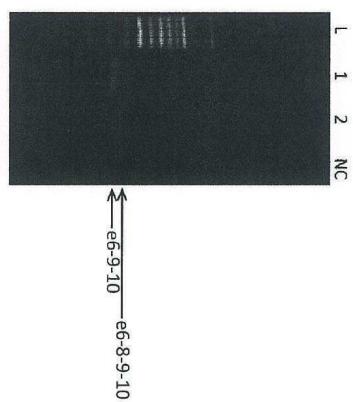


도면5

CD46 엑손 사용 빈도를 입증하기 위한
표적화된 RT-PCR 클로닝 및 서열 분석

A

프리이미	서열
e6 정방향	TTACCTGGATGGCAGGCAAT (서열 번호 : 1)
e14 역방향	TCTGCTCTGCTGGAGTGGTGGATT (서열 번호 : 2)



B

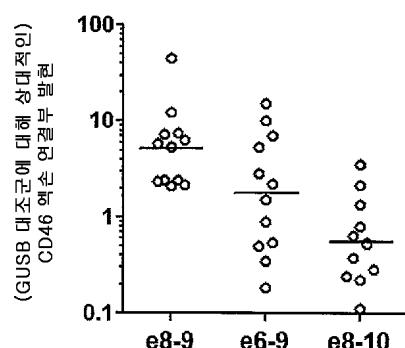
	vD	vF	vJ
CR4 TPC	4	3	1
CR4 Prog	2	6	
CR4 NTG	5	3	
CR5 TPC	5		
CR5 Prog	5		
CR5 NTG	4		
CR11 TPC	13	5	1

C

도면6

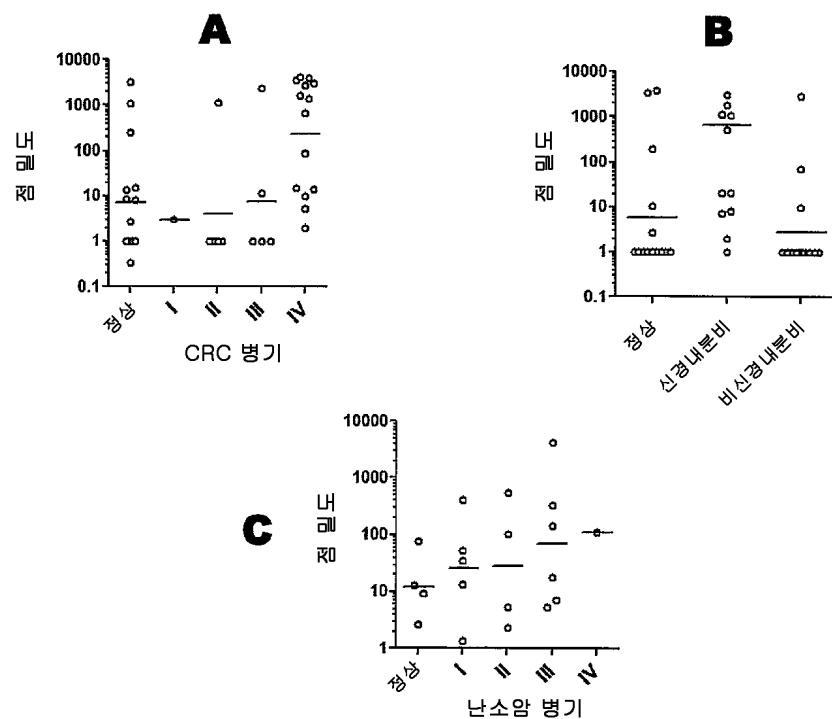
벌크한 종양 및 강화된 세포 집단에서의
D46 스플라이스 변이체 발현을 측정하기 위한
스플라이스 변이체 특이 프라이머/프로브 세트를 이용한 qRT-PCR

프라이머/프로브 세트	
e6 정방향 프라이머	CACAATTGCTGTGACAGTAACAGTACTT (서열 번호: 3)
e12 역방향 프라이머	ACACAAAATTACTGCAACTCCAACAA (서열 번호: 4)
e8-9 (FAM)	TAGGACCTGAGGCACTGGACGCTGG (서열 번호: 5)
e6-9 (FAM)	CCAGTCCAAAGTGTCTTAAAGGTCTAGGCC (서열 번호: 6)
e8-10 (FAM)	TTTAGGATATCCTGAGGCACTGGACGCTG (서열 번호: 7)
e11 (FAM)	TTGGGTCAATTGCTGTGATTGTTATTGCCA (서열 번호: 8)



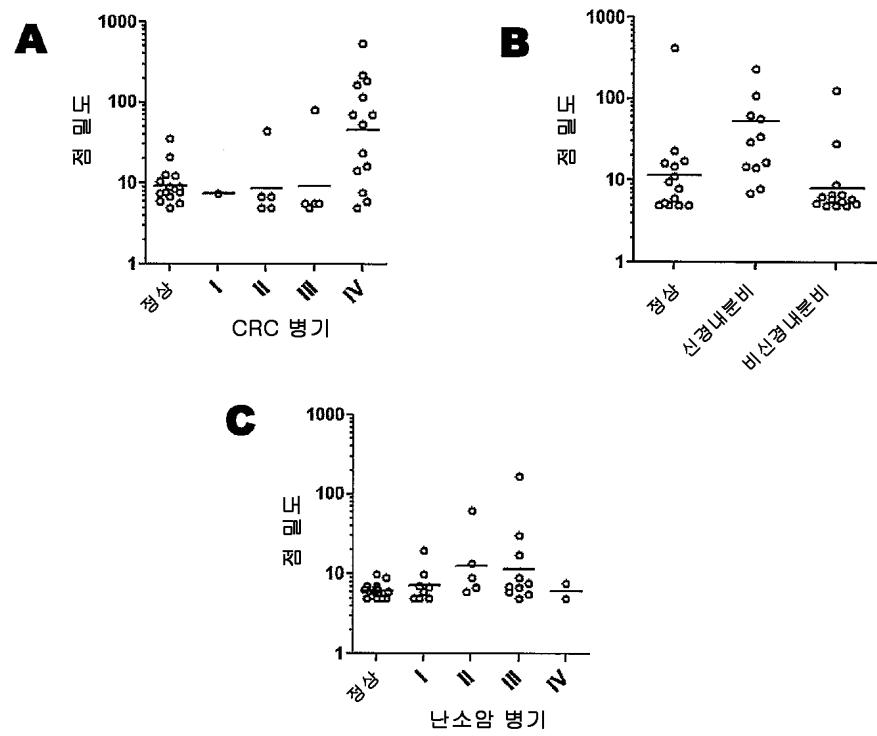
도면7

예시적인 종양 시료에서의 CD46의 단백질 발현

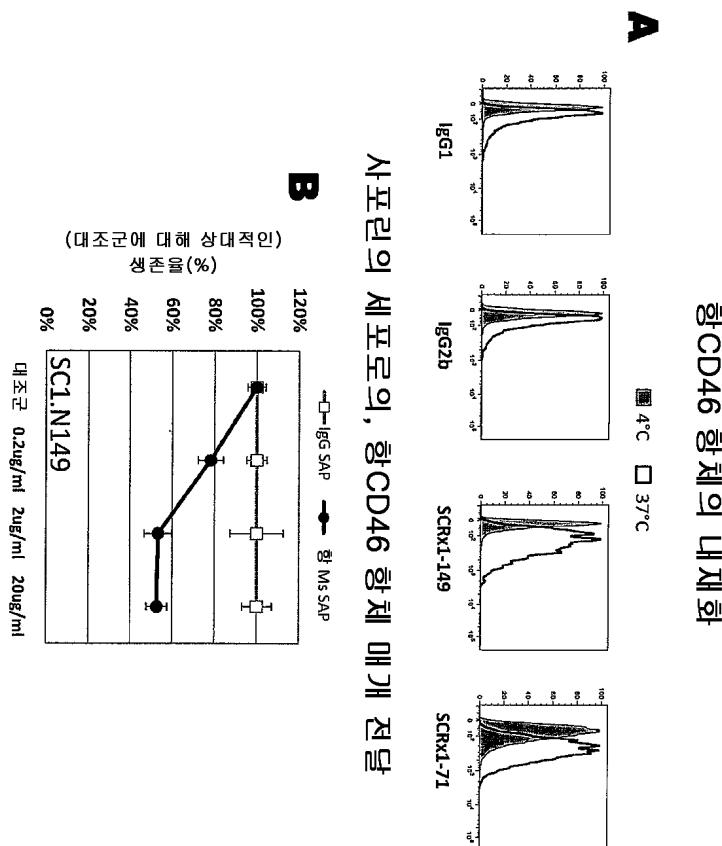


도면8

엑손 10 특이 단일클론 항체를 사용하여 검출된
예시적인 종양 시료에서의 CD46의 단백질 발현



도면9



도면 10a

SC1.N29	중쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 14)
1	GAGGTTCA6GTCGACGAGCTGGGCGAGAGCTTGAGGCCAGGGCCCTCAGTCAGTTG
61	TCTTCGACAGCTTCGCTTCACATTAAGAACCTATCTGACTCTGGGAGACGAGG
121	CTGGACAGCGCTGGATGGATGGAAAGGATTGATCTGGCAATGGTAAATTAAATAAT
181	GACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACATCAGACACATCCTCCAACACAGCCTAC
241	CTGCAGCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACACTGCGCTATTACTGTGCTCACCCCTCC
301	TATGATTACGACAGGAACATGTGACTGGACTACTGGGTCAGGAAACCTCAGTCACCGTC
361	TCCTCA
SC1.N29	중쇄-단백질 서열 (서열 번호: 15)
1	EVQLQQSGAELVKGPSVKLSCTSAGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGR
51	IDPANGNIKYDPKFQKGATITSDTSSNTAYLQLSSLTSEDAVYYCAHPS
101	YDYDRNYAMDYWQGQTSVTVSS
SC1.N29	경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 16)
1	GACATCGTGCCTGACTCAGTTCCAGGCCATCCTGCTGTAGCTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
61	TCTCTCGAGGGGCACTCAGAGCATTGCGCACAACTTACACTGGTATCAGCAAAAGAAC
121	AATGGTTCTCCAAGGGCTTCATGAAGTATGCTTGAGTCTATCTCTGGATCCCTTC
181	AGGTTAGTGGCAGGTTGATCAGGGGACAGATTTACTCTAGCATCAACAGTGTGGAGCT
241	GAAGATTATGCCAGATTTACTCTGACCAAAAGTTATAGCTGGCCGCTCACGTTCTGGTGT
301	GGGACCAA6CTGGAGCTGAAACGGGCT
SC1.N29	경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 17)
1	DIVLTQFPAILSVSPGPERVSFSRASQSIGTSLHWYQQRNTGSPRLLMKY
51	ASESISIGPSRFGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSQYSWPLTFGA
101	GTKLELKR

도면10b

SC1.N35 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 18)
 1 GAAGTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCTGGAGGGTCCCTGAAACTC
 61 TCCGTGCAAGGCTCTGGATTCACTTCACTGACTATTACATGATTTGGGTCGCCAGACT
 121 CCGGAAAGAGGCTGGAGTGGCTGCAACCCATTAGTATGGTGTACTACATTACTAT
 181 CCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCGAAGAACACCTGAC
 241 CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTTAGAGATATA
 301 GACTACGATACAGCTATCCCTGGTTGCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTC
 361 TCTGCAGCCAAAACAACAGCCCCATCG

SC1.N35 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 19)
 1 EVQLVESGGGLVKPGGLKLSKAASGFTFDYVMYVVRQTPERLEWVAT
 51 ISDGGTYIYYPDSVKGRFTISDRNAKNLYLQMSSLKSEDTAMYYCVRDI
 101 DYDTSYPWFAYWGGQTLVTVSAAKTTAPSV

SC1.N35 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 20)
 1 GATATCCAGATGACACAGACTACATCTCCCTGTCGCTCTCTGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCAGTTGCAAGTCAAGGCTAGGGATTAGCAATTATTTAAACTGTTACAGCAGAAACCA
 121 GATGGAACCTGTTAAACTCTGTATCTTACACATCAAGTTACACTCAGGAGTCCCATCA
 181 AGGTTAGGCTGGAGTGGGAGCAGATTATCTCTCACCATCACAAACCTGGAAACCT
 241 GAAAGATTTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATAGCTAAGCTTCCGGAGCTGGTGG
 301 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGT

SC1.N35 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 21)
 1 RCDIQMTQITSSLSASLGLDRVTISCSASQGISNYLNWVQKPDGTVKLI
 51 YYTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDXSLTINNLEPEDIATYYCQQYIKLPWTF
 101 GGGTKEIKRADAAPT

도면10c

SC1.N50 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 22)
 1 GAGGTCCTGCTGCATCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCTGGGCTTCAGTGAAGATT
 61 CCCTGEAAAGGCTCTGGATACACATTCACTGACTACAAACATGGACTGGTGAAGCAGAGC
 121 CATGGAAGAGGCCCTGGAGTGGGAGATTTAACCTAACAATGGGGTACTTTAC
 181 AACAGAAAGTCAAGGGAAGGCCACATTGACTGTACACAAGTCTCCAGCAGCAGCCTTC
 241 ATGGAGCTGGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCACTGAGTTATTGTACAAGATCAAAG
 301 TATGATAACTATCCCTGGTTGCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGCA

SC1.N50 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 23)
 1 EVLLHQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFDYNMDWVKQSHGKSLEWIGD
 51 INPNNGGTFYNOQKFKGKATLTVHKSSTAFMELRSLTSEDATVYYCTRSK
 101 YDNYPWFAYWGGQTLVTVSA

SC1.N50 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 24)
 1 GATATCCAGATGACACAGATTACATCTCCCTGTCGCTCTCTGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCAGTTGCAAGTCAAGGCTAGGGATTAGCAACTTTAAACTGTTACAGCAGAAACCA
 121 GATGGAACCTGTTAAACTCTGTATCTTACACATCAAGTTACACTCAGGAGTCCCATCA
 181 AGGTTCCGGCAGTGGGCTGGGACAAATTATCTCTCACCATCAGCAACCTGGAAACCT
 241 GAAAGATTTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATATAAGCTTCCGGAGCTGGTGG
 301 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGG

SC1.N50 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 25)
 1 DIQMTQITSSLSASLGLDRVTISCSASQGISNYLNWVQKPDGTVKLI
 51 TSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDXSLTISNLEPEDIATYYCQQYIKLPWTF
 101 GTKLEIKR

도면10d

SC1.N53 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 26)
 1 CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCTGGGCTTCAGTGAAGTTG
 61 TCCGTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTCACAAACATACGATATAAACTGGTGAAGCAGAGG
 121 CCTGGCAAGGGACTTGAGTGGATTGATCTAGAGATGGTAGTTTAAGTAC
 181 AATGAGAAAGTCAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTCCAGCACAGCGTAC
 241 ATGGACCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTTCTGTGCACTTGGAG
 301 GATGGTTACCCCTGGTTCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGCA

SC1.N53 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 27)
 1 QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFDYNINWVKQRPQGQLEWIGW
 51 IYPRDGSFKNFKGKATLTVDTSSSTAYMDLHSLTSEDSAVFFCAVSE
 101 DGYPWFAYWGGQTLVTVSA

SC1.N53 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 28)
 1 GGTATCCAGATGACACAGACAATCTCCCTGTCGCTCTCTGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCAGTTGCAAGTCAAGGCTAGGGATTAGCAACTTTAAACTGTTACAGCAGAAACCA
 121 GATGGAACCTGTTAAACTCTGTATCTTACACATCAAGTTACACTCAGGAGTCCCATCA
 181 AGGTTAGTGGCAGTGGGCTGGGAGCAGATTATCTCTCACCATCAGCAACCTGGAAACCT
 241 GAAGATTTGCCACTTACTATTGTCAGCAGTATATAAGCTTCCATTCACTGTCCTGCG
 301 GGGACAAATGGAAATAAACGGG

SC1.N53 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 29)
 1 GIOQMTQITSSLSASLGLDRVTISCSASQGISNYLNWVQKPDGTVKLI
 51 TSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDXSLTISNLEPEDIATYYCQQYIKLPFTFGS
 101 GTKLEIKR

도면10e

SC1.N71 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 30)
 1 CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGGACCTGGCTGGTGGCCCTCACAGAACCTGTCCATT
 61 ACCTGCACAGTCTCTGGGCTCATTAACCAAGCTATGATATAAGCTGGATTGCGAGCCA
 121 CCAGGAAAGGGCTGGAGTGGCTTGGAGATAATATGGACTGTGGAGGACACAAATTATAAT
 181 TCAGCTTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTCTTA
 241 AAAATGAACAGTCGCAAACCTGATGACACAGGCCATATATTACTGTGTAAGGGTCTATGAT
 301 GGTTATCCCTGGTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTGCA

SC1.N71 종쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 31)
 1 SQVQLKESGPGLVAPSQNLISITCTVSGPSLTSYDISWIRQPPGKLEWLG
 51 VIWTDGGTNYNSAFMSRLSISKDNSSQVFLKMNSLQTDATIYYCVRVY
 101 DGYPWFAYWQGTLTVVSA

SC1.N71 결쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 32)
 1 GATATCCAGATGACACAGACTCCATCCTCCCTGTCTGGCTCTGGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCAGTTGCACTGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAACCA
 121 GATGGAACGTAAACTCTGTCTTACACATCAAGTTAACACTCAGGAGTCCCCATCA
 181 AGGTTCAGTGGCAGTGGCTGGGAGACATTATCTCACCATCAGCAACCTGGAACCT
 241 GAAGATATTGCCACTACTATTGTCAGCAGTATATAAGCTCCGTGGACGTTGGTGG
 301 GGCACCAAGCTGGCAATCAACACGG

SC1.N71 결쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 33)
 1 DIQMTQTPSSLSASLGLDRTVTCASASQISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
 51 TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYIKLPWTFGG
 101 GTKLAIKRADAAPTVSIFPP

도면10f

SC1.N91 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 34)
 1 CAGATCCAGTTGGTCAGTCTGGACAGAACGAAAGAACCTGGAGAGAGACAGTCAGAC
 61 TCCCTGCAAGGCTCTGGTTATACCTTACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCT
 121 CCAGGAAAGGGTTAAAGTGGATGGGATGATAAAACACTGAGACTGGTGAGCCAGCAT
 181 GCAGATGACTTCAGGGGACGGTTAGACTTCTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCCTAC
 241 TTGCAAGATCAACACCTCAAGAATGAGGGACACGGCTACATATTCGTGTTAGGTTTG
 301 TACTGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SC1.N91 종쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 35)
 1 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSMHWVKQAPGKGLKWMGL
 51 INTETGEPAYADDFRGRLDLFSLETSASTAYLQIKNLNKEDTATYFCVRFA
 101 YWGHGTLTVSA

SC1.N91 결쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 36)
 1 GACATTGTGATGTCAGACTCCATCCTCCCTGGCTGTCTGGCAGCAGGAGAGAACGGTCACT
 61 ATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAACTACTGGCT
 121 TGGTACCAACAGAACGGCAGTCTCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCTACTAGG
 181 GAACTGGGGTCCCTGATGCCCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACC
 241 ATCAGCAGTGTGCAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTAACTGCAAGCAATCTTATAATCTG
 301 TGGACGTTCGGTGGAGGCCAACAGCTGGAATCAAACCG

SC1.N91 결쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 37)
 1 DIVMSQSPSSLAWSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSP
 51 KLLIWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEIDLAVYYCKQSYNL
 101 WTFGGGTKLEIKR

도면10g

SC1.N106 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 38)
 1 CAGATCCAGTTGGTCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAACCTGGAGAGAGACAGTCAGAC
 61 TCCCTGCAAGGCTCTGGTTATGCTCTCACAGACTTTCAATGCACTGGGTGAACACAGCT
 121 CCAGGAAAGGGTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAACACTGAGACTGGTGAGCCACAT
 181 GCAGATGACTTCAGGGGACGGTTTGCTCTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCCTAT
 241 TTGCAAGATCAAAACCTCAAGAACGAGGACACGGCAACATATTCGTGTTAGGTTGCT
 301 TACTGGGCCACGGGACTCTGGTCACTGGTCTCTGCA

SC1.N106 종쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 39)
 1 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSMHWVKQAPGKGLRWMGW
 51 INTETGEPAYADDFRGRFAFSLETSASTAYLQIKNLNKEDTATYFCVRFA
 101 YWQGQGTLTVSA

SC1.N106 결쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 40)
 1 GACATTGTGATGTCAGACTCCATCCTCCCTGGCTGTCTGGCAGCAGGAGAGAACGGTCACT
 61 ATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAACTACTGGCT
 121 TGGTACCAACAGAACGGCAGTCTCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGG
 181 GAACTGGGGTCCCTGATGCCCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTACC
 241 ATCAGCAGTGTGCAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTAACTGCAAGCAATCTTATAATCTT
 301 TGGACGTTCGGTGGAGGCCAACAGCTGGAATCAGA

SC1.N106 결쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 41)
 1 DIVMSQSPSSLAWSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSP
 51 KLLIWASTRESGPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEIDLAVYYCKQSYNL
 101 WTFGGGTKLEIR

도면10h

SC1.N122.1 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 42)
 1 CAGGTCCAACCTGCAGCGCTGGGCTGAGCTGGTGGAGGCTGGGGCTCAGTGAAGCTG
 61 TCCCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTCACCGCCCTCTGGATAAAACTGGGTGAAACAGAGG
 121 CCTGGACAAGGCCCTGAGTGGATCGGAATATTATCCTCTGATAGTTATACAACTAC
 181 AATCAAAACTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCAGCACAGCCTAC
 241 ATGCAGCTCACGAGGCCACATCTGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTGCAAGATCGAT
 301 TACTACGGTAGTAGCTACTATGCTCTGGACTACTGGGGCAAGGAACCTCAGTCACCGTC
 361 TCCTCAGCC

SC1.N122.1 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 43)
 1 QVQLQQPGAEVLRPAGASVQLCKASGYTFATFWF/NWVKQRPQGLEWIGN
 51 IYPSDSYTNYNQNFKDATALTVKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSD
 101 YYGSSYYALDYWGQGTSVTVSS

SC1.N122.1 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 44)
 1 GACATTGTGGTGAACCAATCTCAGCCTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
 61 ATCTCTGAGGCCAGCGGAAAGTGTGATAATTATGGCATTAGTTATGAACTGGTTC
 121 CAACAGAAACCCAGGACAGGCCACCCAAACTCTCATCTATGCTGCATCCAACAGGATCC
 181 GGGTCCCTCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGTCAAGCTCAGCCTCAACATCCAT
 241 CCTATGGAGGAGGATGATCTGCAATGTATTCTGTCAGCAGAAAGTAAGGAGGGTCCATT
 301 ACGTTGGCTCGGGACAAAGTTGAAATAAAACGG

SC1.N122.1 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 45)
 1 DIVTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISMNWFQKPGQPPKL
 51 LIYASNQGSGVPARFSGSGSGDFSLNIHPMEEDDPAMYFCQQSKEVPF
 101 TFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPT

도면10i

SC1.N149 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 46)
 1 GAGGTCTCTGCAACAGCTGGACCTGAACATGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATT
 61 CCCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGACTACACATGGACTGGGTGAAGCAGAGC
 121 CATGGAAAGGACCTTGAGTGGAGATATTAACTCTAACAAATGGTGTGATCTTCTAC
 181 AACCAGAAAGTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTACACAAAGTCTCCAGCACAGGCC
 241 ATGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGCTTACTGTACAAAGATCAAAG
 301 TATGATAACTATCCCTGGTTGCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTACTGTCTCTGCA

SC1.N149 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 47)
 1 EVLQQSGPELVKPGASVVKIPCKASGYTFDYNMDWKQSHGKSLEWIGD
 51 INPNNGDFTYNNQFKKGATLTVKSSSTAFMELRSLTSEDATAVYYCTRSK
 101 YDNYPWFAYWQGTLTVTSAKTPPSVYPLAPGGDTTGSV

SC1.N149 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 48)
 1 GATATCCAGATGACACAGACTACATCCCTGTCGCTCTGGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCACTTGCAAGTCAGGACATTAACAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCA
 121 GATGGAACCTTAAACTCTGATCTTACACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCA
 181 AGGTCACTGGCAGTGGGTCTGGACAGATTATTCTCTCACCATCAGCAACCTGGAAACCT
 241 GGAAAGATTGCCACTACTATGTCAGCAGTATATTAAAGCTTCCGTGGACGTTGG
 301 GGCACCAAGCTGGAAATAACACGG

SC1.N149 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 49)
 1 DIQMTQTSSLSASLGDRTVTCSCASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIY
 51 TSSLHSVGPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYQQYIKLPWTFGG
 101 GTKLEIKR

도면10j

SC1.N7 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 50)
 1 GAGGTCCAGCTGCAACAGTTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATA
 61 TCTTGCAGGCTCTGGCTACACATTCACTGACTACACATGGACTGGGTGAAACAGAGC
 121 CCTGGAAAGGCCCTTGAGTGGAGATATTCTCTAACATTATGATACTTCTACCTAC
 181 AACACGAAAGTCAAGGGAAAGGCCACATTGACTGTAGACAAAGTCTCCAGCACAGCTAC
 241 ATGGAACTCCGAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGCTTACTGTACAAAGAGGGT
 301 CGACGGGTTACTCTTGTACCTGGGCAAGGCCACACTCACAGCTCAGTCTCTCA

SC1.N7 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 51)
 1 EVLQQSGPELVKPGASVVKIPCKASGYTFDYNMDWKQSPGKSLEWIGD
 51 IHPNYDTSTYNNQFKKGATLTVKSSSTAFMELRSLTSEDATAVYYCAREV
 101 RRGYFFDFWGQGTTLTSS

SC1.N7 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 52)
 1 GATGTTGATGACCCAGCTCCACTCTCCCTGCTGAGCTTGGAGATCAAGCCCTCC
 61 ATCTCTGCAAGTCACTGAGGACATTGTCATAGTAACTGGAAACACCTTATAGAATGG
 121 TACCTGCAAGAAACCAAGGCCAGCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTCCACCGATT
 181 TCTGGGGTCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATC
 241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTCTGCTTCAAGGTTACATGTTCC
 301 CTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTTGTAGCTGAAACGG

SC1.N7 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 53)
 1 DVLMTQSPLSPVSLGDQASISCRSSQSVHNSGNTYLEWYLQKPGQSPK
 51 LLIYKVSNRFSGVPDFRGSGSGSGTDFLKRISRAEDLGVYFCFQGSHVP
 101 LTFGAGTKLEIKR

도면 10k

SC1.N54	중쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 54)
1	CAGGTCCA C TGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAA GCGCTGGGGCTTCA GTGAAACTG
61	TCTGGCAGAC TCTGGTACACCTT CACCGAC TCTGGATGCTAC TGGTAAAGCAGAGG
121	CCTGACAA GAGGCTTGA GTGGATTGGAGAGATAATCCAGCAACGGTCTGACTAACTAC
181	AATGAGAAGTTCAAGGCA CAAAGGCAAC TGTGACTGAGACAAATCCTCCACCAAGCCTAC
241	ATTCATCAAGCCTGACATCTGGCAAGGACTGATCTGCTGGCTATCTGTCAGAAGATTGCGG
301	GATTACGGAGGGGGGGGGCAAGGACTGATCTGCTGGCTATCTGTCAGAAGATTGCGG

SC1.N54	증세-단백질 서열 (서열 번호: 55)
1	QVQLQQPGAEVLKPGAVKLSQCQTSGYFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG
51	INPSNRTNYESKFKTTLTVDKSSTTAYQLNSLTSEDAVYYCARLR
101	DYGGWGQGTLLTVSA

SC1.N54	검색-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 56)
1	AACATTGTTATGCCAACTTCCCCATCTGGCTTGTACAGTGGAGAGGGGTCA
61	TTGAGCTTACAGGGCCTGGAGATCTGTAACTTCTTGTATCTGGTTCAACAGAAACCA
121	GATCAGTCTCTAACTCTGATTTACGGGGCATCCAAACGGTACCTGGGGTCCCGAT
181	CGCTTACAGGCGATGTGACCTGAAACAGAATTCACTCTGACCATCAGCATGTTCAAGGCT
241	GAAGACTTCTGGAGATTACTCTGGACAGAGTTACAGTTACCGTACAGTTCGGAGGG
301	GGGGCAAGCTGGAAAATTAACCGG

SC1.N54	경색-단백질 서열 (서열 번호: 57)
1	NIVMTQSPKSVMSVGERVTLSCKASENVNTFVSWFQQPKDQSPKLLIYG
51	ASNRYPGVPRDFTGSGSATEFTLITISVQAEDLADYHCGQSYSYPYTFGG
101	GTKLEIKR

도면101

SC1_N56	중쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 58)
1	CAGATCCAGCTGCAAGCTGGACCTGAGCTGGAAAGCTGGGGCTTCAGTGAAGATA
61	TCTCTGCAAGGGCTCTGGACACCTTCTACACTTACACTATAAACTGGTGAAGCAGGG
121	CTCTGGACAGGGCTCTGGATGTTGGATGTTGGATGATTCTTCGGAAAGGGTAATACTGGTAC
181	AATGAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCTAC
241	ATGCACTCAGCAGCTGACCTCTGAGGACTCTCGCGGTCTATTCTGTAACAGATATTAC
301	TACGCTGGTCGCGTACGACTGGTACTTCGATGTCGGGCGCTAGGACACCAGGTACCCGTC
361	TCTCTA

SC_1_N56	중쇄-단백질 서열 (서열 번호 : 59)
1	QIQLQQSGPELVKPGASV KISCKASGYTFDYYINWVKQRPGQGLEWIGW
51	IYPSGGNTRYNEKFKGKATLTV TDTSSSTAVMQLSSLTSDESAVYFCTRYY
101	YAGRVDWYFEDWV MGATGATV TVSS

SC1.N56	경세-뉴클레오틴드 서열 (서열 번호: 60)
1	GGCATCAAGATGCCAGCTCCATCTCCATGATGCACTCTCGGAGAGAGACT
61	ATCTACGGAACGGCGATCAGGGACGTTAATAGCTTAAAGCTGGTTCAGGGAAACAA
121	GGGAAATCTCTAACGGGCTGATCTCTGGCAACAGATTGGTAGATGGGGTCCATCA
181	AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTCTCTCACCATCAGCAGCTGGAGTAT
241	GAAGATATGGGATTTATTTGTCACGATGATGAGTTCCGTACAGTCGGAGGG
301	GGGGCAACAGCTGGGAAATTAAGGCG

SC1_N56	경색-단백질 서열 (서열 번호: 61)
1	GIKMTQSPSSPMYASLERVTITCKASQDVNSYLSWFQQKPGKSPKTLIYR
51	ANRLVDGVPGRSFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDFEPYTFGG
52	TRWVH

도면 10m

SC1.N60 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 63)
1 EIQLQQTGPVELVKPGASVVK15CKASGYSVFTSDISIMLWVVKQSHGKSELEWIGN
51 INPYYYGSTTYNLKFKGKATLTVDKSSSTAYMLQNLNSLTSEDASVYYCARGL

SC1.N60	경색-뉴클레오티드 서열 (서열 번호 : 64)
1	GTGATGACCCAGTCTCCACCTCTCTGCCTGTCATAATTGGAGATCAAGCCTCTATCTCT
61	TGCAAGTCTACTAAAGATCTCTGAAATGTTGATGGATTCACTTATTGGACTGTTACCTG
121	CAGAACGCCAGGGCAGTCACGCTCTAATATATTGGTTCTAACTGATTTCGGA
181	GTTCAGACAGGGTCACTGGTCACTGGGACAGACATTTCACCTAACGATCAGCAGA
241	GTGGGGAGCTGAGGATTGGGAGTTTATTATGTCCTCCAGAGTAACTCTTCATTCAGC

SC1.N60 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 65)
1 VMTQSPSLSPVNINGDQASISCKSTSLLNSDGFYTLDWYLQKPGQSPQLL
51 IYLVSNRFSGVPDRFGSGSGTDFLKISRVEAEIDLGVYYCFQNSNLPT

도면10n

SC1.N66 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 66)
 1 GAGGTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGACTGGTGAAGCTGGGCTTCAGTGAGGATG
 61 TCCGTAAAGCTCTGGATACACATTCACTGACTACTATATGAACTGGGTAAGCAGAGC
 121 CATGAAAGGCCCTGAGGTGGAGTTTAAATCTTACAACGGTGCACTAACTAC
 181 AACAGAAGTCAAGGCCAACATGACTGTGACAAGTCCTCAGTACAGCTAC
 241 ATGGAGCTCAAGGCCCTGACATCTGAGGACTCTGCACTGAGTCTATTACTGTGCCGATGGTTAC
 301 TACAGTTACTATGCTATGGACTACTGGGCAAGGAACCTCACTACCGTCTCCCA

SC1.N66 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 67)
 1 EVQLQQSGPVLVKPGASVRMSCKASGYTFDYYMNWVKQSHGKSLIEWIGV
 51 FNPYNGGTNVNQFKKGATLTVDKSSSTAYMELNGLTSEDSAVYYCADGY
 101 YSYYAMDYWGQGTSIVSS

SC1.N66 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 68)
 1 GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTTAGGAGAGAGTCAC
 61 ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGACATTAATAGCTATTAAAGCTGGTCCACAGAAACCA
 121 GGGAAATCTCTAAAGACCCCTGATCTATGTCACAAACAGATTGGTAGATGGGTCCATCA
 181 AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTT
 241 GAAGATACTGGAAATTATTATTGTCACAGTATGATGACTTCCGTACACGTTGGAGGG
 301 GGGACCAAGCTGGAAATAAACCGG

SC1.N66 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 69)
 1 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFHQKPGKSPKTLIYR
 51 ANRLVDGVPSRSGSGSQDYSLSISSLFEDMGIYVCLQYDDFPYTFGG
 101 GTKLEIKR

도면10o

SC1.N77 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 70)
 1 CAGATCCAGCTGCAAGCAGTCTGAACTGGTGAAGCTGGGCTTCAGTGAAAGATA
 61 TCCGTCAAGGCTCTGGCTACACCTCACTGACTACTATATAAACTGGGTAAAGCAGAAAG
 121 CCTGGACAGGGACTTGGAGTGGATGGATTTATCTGGAAAGCGGTAACTAAAGTAC
 181 AATGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGAGACACATCTCCAGCACAGCTAC
 241 ATGCAGCTAGCGAGCTGACATCTGAAGACACTGCTGTCTATTCTGTGCAAGACTGGGA
 301 TATTCCTACGGTAGTAGTCTCTGACTCTGATGTCATCTGGGGCGAGGGACACGGTCA
 361 GTCTCCTCA

SC1.N77 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 71)
 1 QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFDYYINWVKQKPGQGLEWIGV
 51 IYPSGSNTKYNEFKKGATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYPCARLG
 101 YFYGSSSWYFDVWAGTTTVSS

SC1.N77 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 72)
 1 GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTTAGGAGAGAGTCAC
 61 ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGACATTAATAGCTATTCACTGGTCCAGCAGAAACCA
 121 GGGAAATCTCTAAAGACCCCTGATCTATGTCACAAACAGATTGGTAGATGGGTCCATCA
 181 AGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCCTCAGCATCAGCAGCCTGGAGTAT
 241 GAAGATACTGGAAATTATTATTGTCACAGTATGATGAGTTCCGTACACGTTGGAGGG
 301 GGGACCAAGCTGGAAATAAACCGG

SC1.N77 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 73)
 1 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYSGWFQKPGKSPKTLIYR
 51 TNRLVDGVPSRSGSGSQDYSLSISSLFEDMGIYVCLQYDFPYTFGG
 101 GTKLEIKRADAAPTVSIFPT

도면10p

SC1.N95 종쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 74)
 1 CAGGTTCACTGCAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCCTGGGCTTCAGTGAAAGCTG
 61 TCCGTCAAGGCTCTGGACTACACCTTCACAAGCTATGGTATAAGCTGGGTAAGCAGAGA
 121 ACTGGACAGGGCTTGGAGTGGAGGAGATTTCCTAGAAGTGGCAATACTTAC
 181 AATGAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGAGACACAATCTCCAGCACAGCGTAC
 241 ATGGAGCTCCGAGCCTGACACTGAGGACTCTGGCGTCTATTCTGTGCAAGGGGACTG
 301 GGAGGTGCTATGGACTACTGGGCAAGGAACCTCAGTCATCGTCTCCCA

SC1.N95 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 75)
 1 QVQLQQSGAELARPGASVKISCKASDVTFTSYGIVSVVKQRTGQGLEWIGE
 51 IIPRSGNTYNEFKKGATLTDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARLG
 101 GGAMDYWGQGTSIVSS

SC1.N95 경쇄-뉴클레오티드 서열 (서열 번호: 76)
 1 GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCCTGTACCTGTCACCTCTGGAGAGTCAGTATAC
 61 ATCTCTGCAAGGTCTAGTAAGAGCTCTCTGCTCATGTAATGGCAACACTTACTGTTATGG
 121 TTCCGTCAAGGGCCAGGCCAGTCCTCTCAGCTCTGATATATCGATGTCACCTTGC
 181 TCAGGAGTCCAGACAGGTCTAGTGGCAGTGGTCAGGAACAACCTTACACTGAGAATC
 241 AGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTATGATGCAACATCTAGAAATATCG
 301 TGACAGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACCGG

SC1.N95 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 77)
 1 DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLIHSNGNTLYWFLQRPQGSPQ
 51 LIYRMSNLASGVPSDRFSGSGSGTFTLRLISGVAEEDVGVYYCMQHLEYP
 101 CTFGGGTKLEIKR

도면10q

SC1.N135 종쇄-뉴클레오틴드 서열 (서열 번호: 78)
 1 GATGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACCT
 61 TCCGTGAGCCTCTGGATTCACTTCAAGTAGCTTGGAAATGCACTGGGTCGTCAGGCT
 121 CCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGTCGCATACATTAGTAGTGCACAGTGCCTACTAT
 181 GCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCACGAACACCCGTTC
 241 CTGCAAATGACCACTGAAGGTCGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAAAGGG
 301 ACAACTTGTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAC

SC1.N135 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 79)
 1 DVQLVESGGGLVQPGGSKRLSCAASGFTFSSFGMHNWVROAPEKGLEVVAY
 51 ISSATSAIYADTVKGRFTISRDNPNTLFLQMTSLRSEDTAMYCARKG
 101 NYFDYWGQGTTLVSS

SC1.N135 경쇄-뉴클레오틴드 서열 (서열 번호: 80)
 1 CAAATTGTCCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCATCTCCAGGGGAGAAGGTCA
 61 TTATCCTGCACTGCCACCTCAAGTGTAACTTACATGCACTGGCTCAGCAGAACCCAGGA
 121 TCCTCCCCAAACCCCTGGGATTATTCGCACATCCAACCTGGCTTGGAGTCCCTGCTCG
 181 TCCGTTGGCAGTGGGCTGGGACCTTACTCTCACAACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA
 241 GATGTCGCACTTAACTGCGCAGCAGTATCATAGTTACCCACCGACGTTGGGTGGAGGC
 301 ACCAAGCTGGAAATCAA

SC1.N135 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 81)
 1 QJVLTQSPAIMSASPGEKVTLSCTSSVTVMHWLQKPGSSPKPWIYRT
 51 SNLASGVPARFRGSGSGTSYSLISSMEAEDAATYYCQQYHSYPPTFGGG
 101 TKLEIKR

도면10r

SC1.N146 종쇄-뉴클레오틴드 서열 (서열 번호: 82)
 1 GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACCT
 61 TCCGTGAGCCTCTGGATTCACTTCAAGTAGCTTGGCATGCTTGGGTCGCAAGACT
 121 CCGGAGAAGGGCTGGAGTGGTCGCAGGCCATTAAATAGTAATGGTTAACACATACTAT
 181 TCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCGTAC
 241 CTGCAAATGAGCAGTCTGGGACTGGGACACTGCCCTGATTACTGTGCAAGAGTGGT
 301 CACTCGATGTCGGGGCAAGGACACGGTCACCGTCTCCCTCA

SC1.N146 종쇄-단백질 서열 (서열 번호: 83)
 1 EVQLVESGGGLVKGGSILKLSAASGFTFSSFGMSVVRQTPKRELEWVAA
 51 INSNGGNTYSDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLRSADTALYYCARVV
 101 HFDVWGAGTTVTSS

SC1.N146 경쇄-뉴클레오틴드 서열 (서열 번호: 84)
 1 GCTATCCAGATGACACAGACTACATCTCCCTGTCCTCCCTCTGGGAGACAGAGTCACC
 61 ATCAGTGGCAGTCAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCA
 121 GATGGAACACTGTTAAACTCTGATCTTAAACATCAAGTTTACACTCAGGAGTCCCATCA
 181 CGGTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGATTATTCCTCACCATCAGCACAGTGGAAACCT
 241 GAAGATGTTGCACTTAACTTATGTCAGCAATATAGTGAACGTTCCGTAACCGTGGAGGG
 301 GGGACCAAGCTGGAAATAAACCG

SC1.N146 경쇄-단백질 서열 (서열 번호: 85)
 1 AIQMTQTTSSLSASLDRVTISCSASQDINSYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
 51 TSSLHSVPSRFSGSGSTDVSLTISNVEPEDVATYYCQYSELPYTFGG
 101 GTKLEINR

도면11a

별개의 항CD46 항체의 유전자 배열

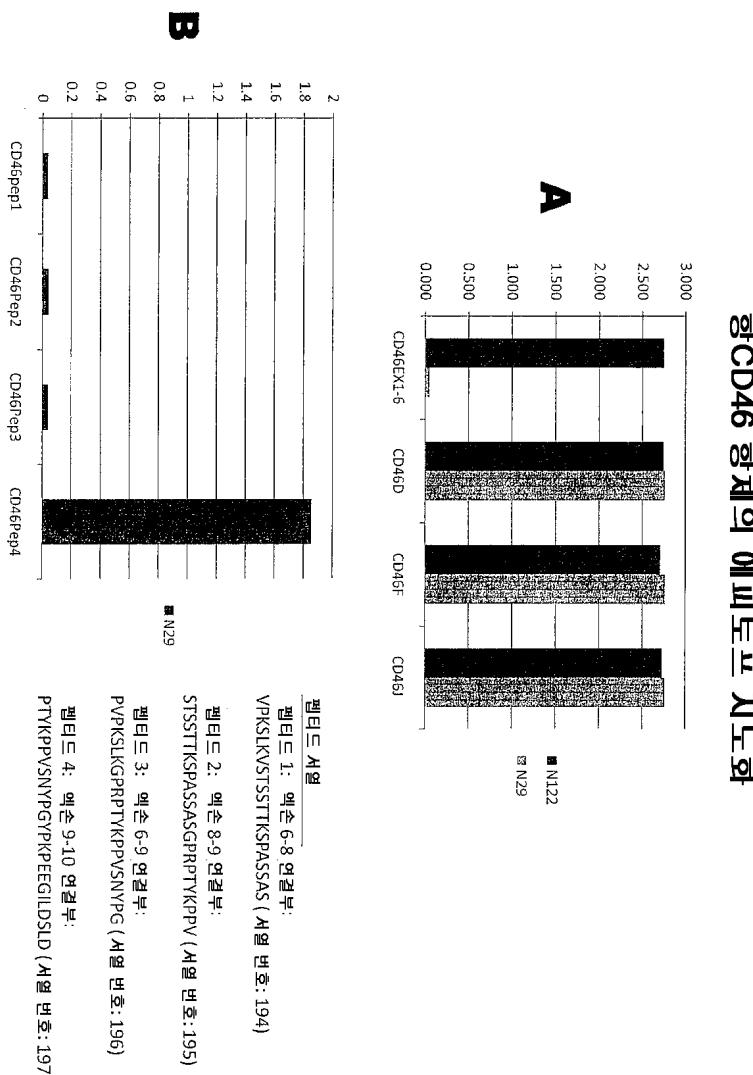
	클론	이소형	VH	DH	JH	VK	JK	FIG
1	SC1.N7	IgG2a/K	IGHV1-18	IGHD2-14	JH2	IGKV1-117	JK5	10I
2	SC1.N29	IgG2a/K	IGHV14-3	DSP2.2	JH4	IGKV5-48	JK5	10A
3	SC1.N35	IgG2a/K	IGHV5-4	DSP2.x	JH3	IGKV10-94	JK1	10B
4	SC1.N50	IgG2b/K	IGHV1-18	DSP2.8	JH3	IGKV10-94	JK1	10C
5	SC1.N53	IgG1/K	J558.88.194	DSP2.13Inv	JH3	IGKV10-94	JK4	10D
6	SC1.N54	IgG2a/K	J558.33	DSP2.2	JH3	IGKV6-20	JK2	10K
7	SC1.N56	IgG2a/K	J558.87.193	DFL16.1	JH1	IGKV14-111	JK2	10L
8	SC1.N60	IgG1/K	VH1558	DFL16.1	JH2	IGKV1-99	JK4	10M
9	SC1.N66	IgG2c/K	IGHV1-19	DSP2.9	JH4	IGKV14-111	JK2	10N
10	SC1.N71	IgG2a/K	VH052.a13.37	DSP2.9	JH3	IGKV10-94	JK1	10E
11	SC1.N77	IgG2a/K	IGHV1-11	DFL16.1	JH1	IGKV14-111	JK2	10O
12	SC1.N91	IgG2b/K	IGHV9-2-1	none	JH3	IGKV8-21	JK1	10F
13	SC1.N95	IgG2a/K	VH1558	DQ52a.1	JH4	IGKV2-137	JK2	10P
14	SC1.N106	IgG2b/K	IGHV9-2-1	none	JH3	IGKV8-21	JK1	10G
15	SC1.N122	IgG2a/K	J558.40	DFL16.1	JH4	IGKV3-2	JK4	10H
16	SC1.N135	IgG2b/K	IGHV5-17	DQ52	JH2	IGKV4-61	JK1	10Q
17	SC1.N146	IgG1/K	IGHV5-6-2	DFL16.3	JH1	IGKV10-94	JK2	10R
18	SC1.N149	IgG2b/K	IGHV1-18	DSP2.8	JH3	IGKV10-94	JK1	10I

도면11b

별기의 항CD46 항체의 상보성 결정 영역

번호	CDR11 (서열 번호 86-103)	CDR12 (서열 번호 104-121)	CDR13 (서열 번호 122-139)	CDR11 (서열 번호 140-157)	CDR12 (서열 번호 158-175)	CDR13 (서열 번호 176-193)
1	SC1.N17	GTFIDYD	HPNPDTS	AREVRRGPFIF	QSVNSIGNY	KVSINRS
2	SC1.N29	GRNKDQY	IDPANGNI	AHPSDVDDNMYAMV	QSVNSIGNY	QGSQSWPLT
3	SC1.N35	GTFSDYV	ISDGGVNI	VRDQDQSYWFAV	QGNNY	YTSLSHS
4	SC1.N50	GTFIDYD	INPRNGST	TRSKDQNPWFAV	QGSIN	YTSLSHS
5	SC1.N53	GTFIDYD	INPRNGST	AVSVQSPWPFY	QGSIN	YTSLSHS
6	SC1.N54	GTFIDYD	INPNSGNT	ARLRLDQY	ENVATF	QDVKLPLFT
7	SC1.N55	GTFIDYD	INPNSGNT	TRYWAGRDWYDFV	QDWSVY	GASNRYP
8	SC1.N60	GTFDSD	INPNSGNT	ARGIGRSQYDFY	KSLANGSFY	QDVSFPT
9	SC1.N66	GTFIDYD	INPNSGNT	ADGYSYHMY	QDNT	IVSNSF
10	SC1.N71	GFSITSD	INPNSGNT	VRVQDQSPWPFY	QGSIN	YDVKLPLFT
11	SC1.N77	GTFIDYD	INPNSGNT	ARLGVQSSWYDFV	QGSIN	YTSLSHS
12	SC1.N91	GTFIDYD	INTEGEP	VRFAY	QDNT	RTFLBLD
13	SC1.N95	GTFIDYD	INTEGEP	ARLGSGAMDY	QSLNSRTRK	KGSWNU
14	SC1.N106	GTAFTDVS	INTEGEP	VRFAY	QSLNSRTRK	WASTRES
15	SC1.N122	GTFIDYD	INPNSGNT	ABSDQYSSYVADY	ESQVNGFSE	KOSWNU
16	SC1.N135	GTFSSG	ISSRSA	ARGKNNVDFI	SVSY	ASNDQG
17	SC1.N143	GTFIDYD	INSPNGST	ARVHVFV	RTSLAS	QDVKLPLFT
18	SC1.N149	GTFIDYD	INPNSGNT	QDNT	YTSLSHS	QDVKLPLFT

도면12



도면13a

인간화된 SC1.N71 종쇄

1 50
 CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGCCCCAGGACTGGTGAACCCCTTCGGAGAC
 -Q--V--Q--L--Q--E--S--G--P--G--L--V--K--P--S--E--T
 51 100
 CCTGTCCTCACCTGCACTGTCCTGGCTCCGTCACTAGTTACGACA
 --L--S--L--T--C--T--V--S--G--S--V--S--S--Y--D--
 101 150
 TTAGCTGGATCCGGCACGCCAGGGACTGGAGTGGATTGGGTT
 151 200
 ATCTGGACCGATGGGGCACCAACTACAACCTCGCCTCATGAGTCGAGT
 -I--W--T--D--G--G--T--N--Y--N--S--A--F--M--S--R--V
 201 250
 CACCATATCAGTAGACAGCTCCAAGAACAGTTCTCCCTGAAGCTGACCT
 --T--I--S--V--D--T--S--K--N--Q--F--S--L--K--L--S--
 251 300
 CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTATTAAGTGTGCGAGAGTCTATGAT
 S--V--T--A--A--D--T--A--V--Y--C--A--R--V--Y--D--
 301 350
 GGTTATCCCTGGTTGCTACTGGGGCACCCCTGGTCACCGTCTC
 -G--Y--P--W--F--A--Y--W--G--Q--G--T--L--V--T--V--S
 351
 CTCA (서열 번호 : 198)
 --S- (서열 번호 : 199)

인간화된 SC1.N71 경쇄

1 50
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGCTGCACTGTAGGAGA
 -D--I--Q--M--T--Q--S--P--S--L--S--A--S--V--G--D
 51 100
 CAGAGTCACCATCACTGGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAA
 --R--V--T--I--T--C--R--A--S--Q--G--I--S--N--Y--L--
 101 150
 ATTGGTATCAGCAGAACAGGGAAAGGCCCTAACGCTCTGATCTATTAC
 N--W--Y--Q--K--P--G--K--A--P--K--L--I--Y--Y--
 151 200
 ACATCCAGTTGCACAGTGGGTCCCATCAAGGTTAGTGGCAGTGGATC
 -T--S--S--L--H--S--G--V--P--S--R--F--S--G--S--G--S
 201 250
 TGGGACAGATTTCACTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTG
 --G--T--D--F--T--L--T--I--S--S--L--Q--P--E--D--F--
 251 300
 CAACTTACTACTGTCACAGTATATTAAGCTCCGTGGACGTTGGTGG
 A--T--Y--Y--C--Q--Q--Y--I--K--L--P--W--T--F--G--G--
 301
 GGCAACCAAGCTGGAAATCAAACGG (서열 번호 : 200)
 -G--T--K--L--E--I--K--R- (서열 번호 : 201)

도면13b

인간화된SC1.N149 중쇄

1 50
 CAGGTTAGCTGGTGCAGTCGGAGCTGAGGTGAAGAACGCTGGGCCCTC
 -Q--V--Q--L--V--Q--S--G--A--E--V--K--K--P--G--A--S
 51 100
 AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGTTACACCTTACCGACTACAACA
 --V--K--V--S--C--K--A--S--G--Y--T--F--T--D--Y--N--
 101 150
 TGGACTGGGTGCCACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGAT
 M--D--W--V--R--Q--A--P--G--Q--G--L--E--W--M--C--D--
 151 200
 ATTAATCCTAACAAATGGGTGATACTTCTACAACCAGAAAGTCAAGGGCAG
 -I--N--P--N--N--G--D--T--F--Y--N--Q--K--F--K--G--R
 201 250
 AGTCACCATGACACACAGACATCCACGAGCACAGCTACATGGACTGA
 --V--T--M--T--D--T--S--T--S--T--A--Y--M--E--L--
 251 300
 GGACCCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTCGAGATCAAAG
 R--S--L--R--S--D--T--A--V--Y--Y--C--A--R--S--K--
 301 350
 TATGATAACTATCCCTGGTTGCTTACTGGGCAAGGGACTCTGGTAC
 -Y--D--N--Y--P--W--F--A--Y--W--G--Q--G--T--L--V--T
 351 400
 TGTCCTCTCC (서열 번호 : 202)
 --V--S--S-- (서열 번호 : 203)

인간화된SC1.N149 경쇄 카파

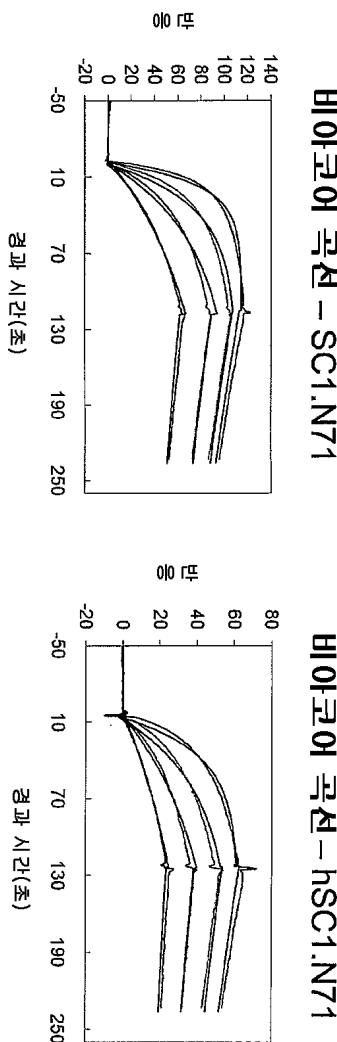
1 50
 GGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCACTGTAGGAG
 -D--I--Q--M--T--Q--S--P--S--L--S--A--S--V--G--
 51 100
 ACAGAGTCACCATCACTTGCCGGCAAGTCAGGACATTAAACATTATTAA
 D--R--V--T--I--T--C--R--A--S--Q--D--I--N--N--Y--L--
 101 150
 AATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAAAGCTCTGATCTATTAA
 -N--W--Y--Q--Q--K--P--G--K--A--P--K--L--L--I--Y--Y--
 151 200
 CACATCCAGTTGCACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT
 --T--S--S--L--R--S--G--V--P--S--R--F--S--G--S--G--
 201 250
 CTGGACAGATTCACACTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
 S--G--T--D--F--T--L--T--I--S--S--L--Q--P--E--D--F--
 251 300
 GCAAATTAACAGTATATTAAAGCTTCCGTGGACGTTGGTGG
 -A--T--Y--Y--C--Q--Q--Y--I--K--L--P--W--T--F--G--G--
 301 350
 AGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (서열 번호 : 204)
 --G--T--K--L--E--I--K--R-- (서열 번호 : 205)

도면14

SC1 클론	도메인 exon 9	친화도 (mV)	웨스턴 반응성	시노글리스 XR	미모켓 XR	다임처 XR	월승이
N29.8	1.0 ^F	NR/R	ND	ND	ND	ND	
N35.6	4	5.0 ^F	NR	반응	반응	무반응	
N50.3	4	1.0 ^F	NR	반응	반응	무반응	
N53.5	4	4.0 ^F	NR	반응	반응	악한 반응	
N54.4	3/4	4.0 ^F	ND	반응	반응	악한 반응	
N56.1	1/2	1.0 ^F	ND	반응	무반응	ND	
N71	3/4	1.1 ^B	NR	반응	반응	반응	악한 반응
N95.1	1	8.0 ^F	ND	악한 반응	무반응	무반응	
N122.1	3/4	2.0 ^F	NR	반응	반응	반응	
N135.1	1/2	1.0 ^F	ND	반응	무반응	ND	
N146.2	1	1.5 ^B	NR/R	무반응	무반응	무반응	
N149.2	3/4	1.1 ^B	NR	반응	반응	악한 반응	

선택된 CD46 조절 인자의 특징

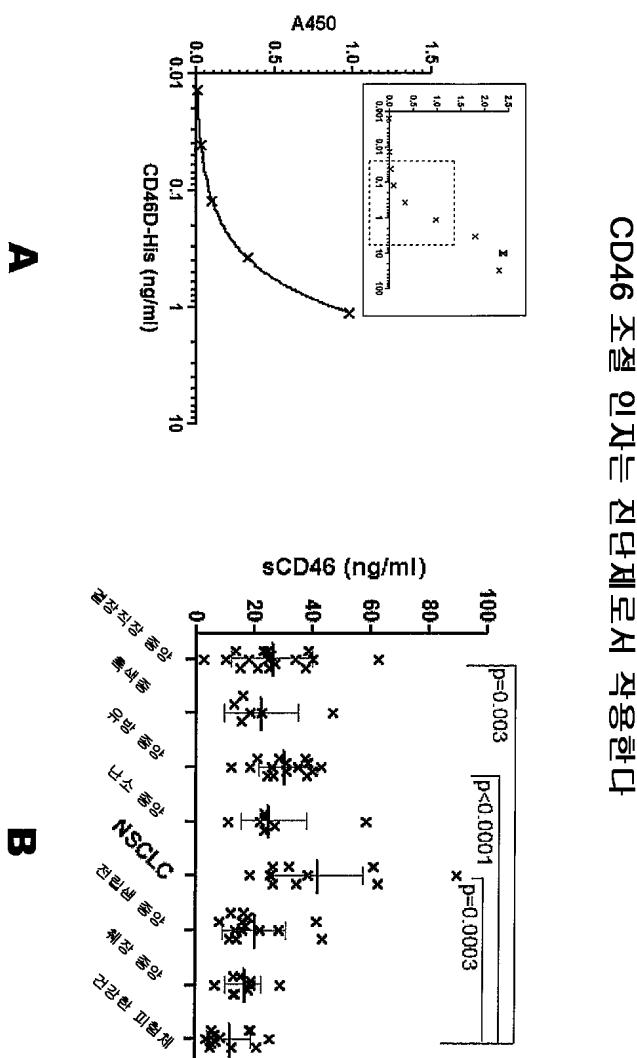
도면15

**A****B**

SCRx1	SCR	Ms mAb 이소형	마모셋 Ag 친화도	시노를구스 Ag (유관 mAb)	HuAg 친화도 (유관 mAb)
N71	3/4	IgG _{2a}	6.4 nM	4.2 nM	1.1 nM
N149	3/4	IgG _{2b}	2.2 nM	1.1 nM	1.1 nM

C

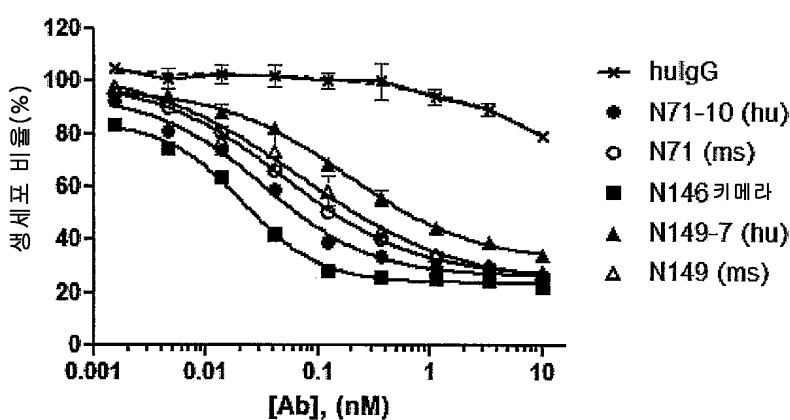
도면16



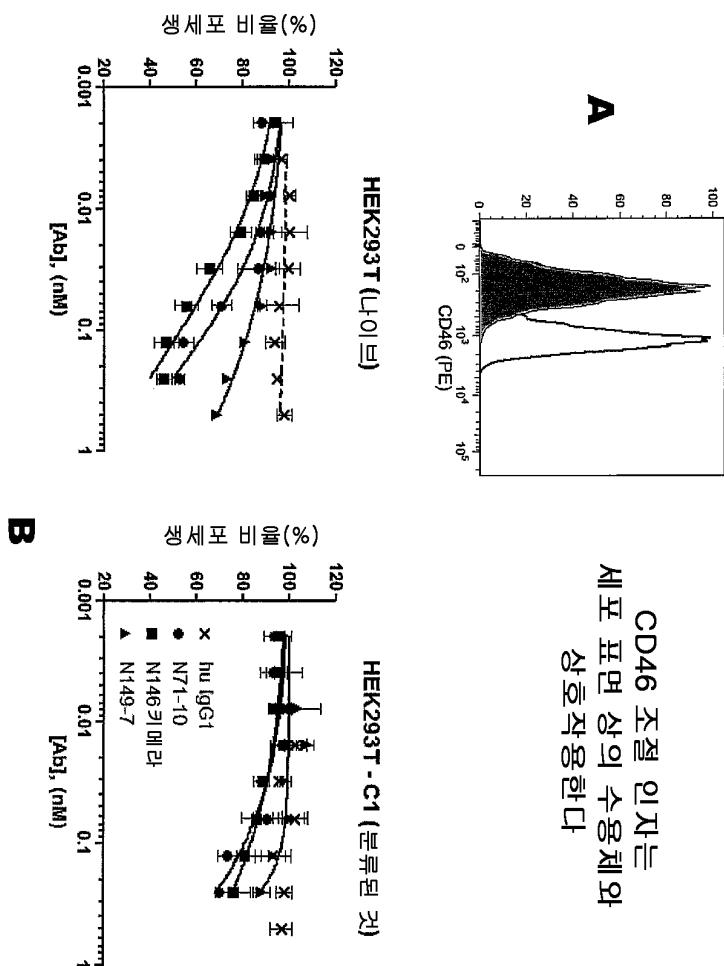
CD46 조절 인자는 진단제로서 작용한다

도면17

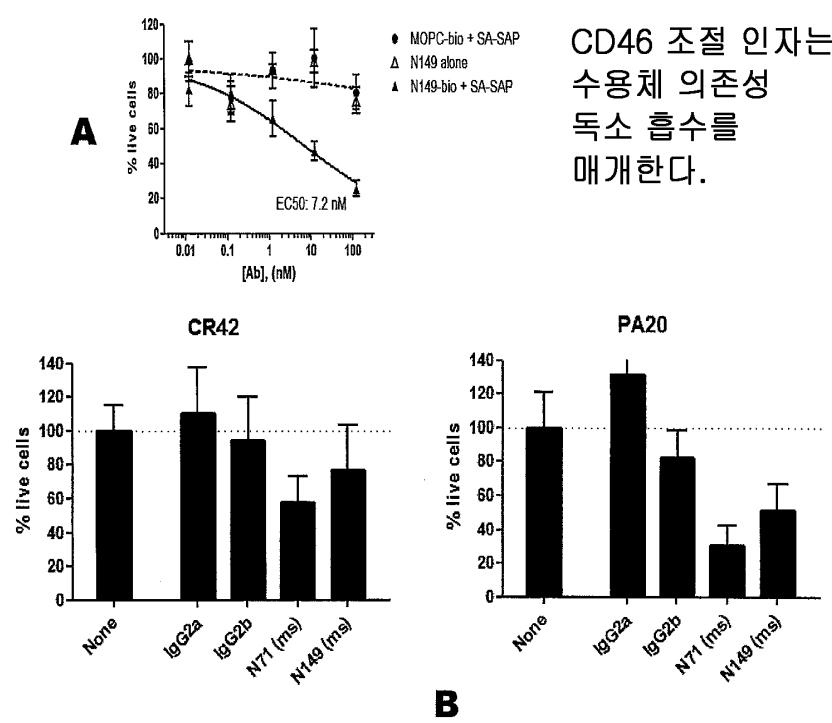
CD46 조절 인자는 표적 모이어티로서 작용한다



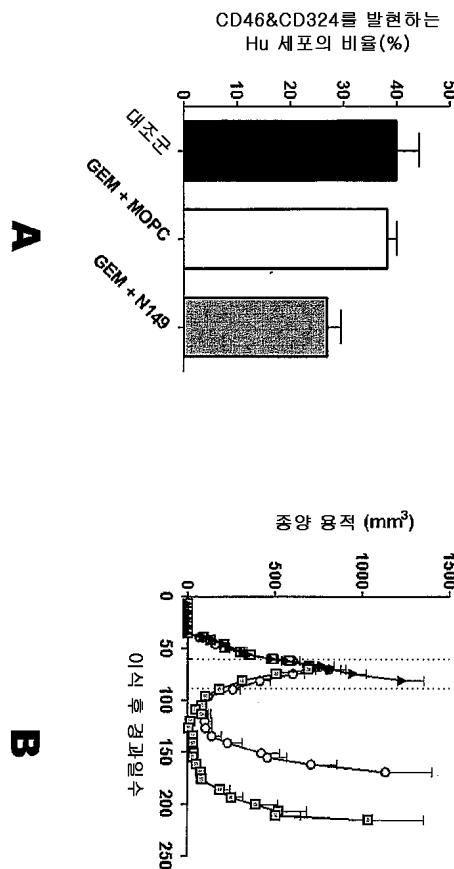
도면18



도면19



도면20



CD46 조절 인자가 화학요법에 대하여 종양을 감작화시킨다

서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> STEM CENTRX, INC.

<120> NOVEL MODULATORS AND METHODS OF USE

<130> 11200-2-304

<140> PCT/US2011/050439

<141> 2011-09-02

<150> 61/380,181

<151> 2010-09-03

<160> 207

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 1

ttacctcgat ggccgcgaca caat

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 2

tctgctctgc tggagtggtt gatt

24

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 3

cacaattgtc tgtgacagta acagtactt

29

<210> 4

<211> 25

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 4

acacaaatta ctgcaactcc aacaa	25
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"	
<400> 5	
taggacctga ggcactggac gctgg	25
<210> 6	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"	
<400> 6	
ccagttccaa agtgtcttaa aggtcctagg cc	32
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic probe"	
<400> 7	
tttaggatat cctgaggcac tggacgctg	29
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223>	

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
probe"

<400> 8

ttgggtcatt gcigtgattt ttattgcca 29

<210> 9

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

Ala Gln Pro Ala Cys Glu Glu Pro Pro Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu

1 5 10 15

Ile Gly Lys Pro Lys Pro Tyr Tyr Glu Ile Gly Glu Arg Val Asp Tyr

20 25 30

Lys Cys Lys Lys Gly Tyr Phe Tyr Ile Pro Pro Leu Ala Thr His Thr
35 40 45

Ile Cys Asp Arg Asn His Thr Trp Leu Pro Val Ser Asp Asp Ala Cys
50 55 60

Tyr Arg Glu Thr Cys Pro Tyr Ile Arg Asp Pro Leu Asn Gly Gln Ala
65 70 75 80

Val Pro Ala Asn Gly Thr Tyr Glu Phe Gly Tyr Gln Met His Phe Ile

85 90 95

Cys Asn Glu Gly Tyr Tyr Leu Ile Gly Glu Ile Leu Tyr Cys Glu
100 105 110

Leu Lys Gly Ser Val Ala Ile Trp Ser Gly Lys Pro Pro Ile Cys Glu
115 120 125

Lys Val Leu Cys Thr Pro Pro Pro Lys Ile Lys Asn Gly Lys His Thr
130 135 140

Phe Ser Glu Val Glu Val Phe Glu Tyr Leu Asp Ala Val Thr Tyr Ser

145 150 155 160

Cys Asp Pro Ala Pro Gly Pro Asp Pro Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser

165 170 175

Thr Ile Tyr Cys Gly Asp Asn Ser Val Trp Ser Arg Ala Ala Pro Glu

180 185 190

Cys Lys Val Val Lys Cys Arg Phe Pro Val Val Glu Asn Gly Lys Gln

195 200 205

Ile Ser Gly Phe Gly Lys Phe Tyr Tyr Lys Ala Thr Val Met Phe

210 215 220

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

225 230 235 240

Asp Ser Asn Ser Thr Trp Asp Pro Pro Val Pro Lys Cys Leu Lys Val

245 250 255

Ser Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser Pro Ala Ser Ser Ala Ser Gly Pro

260 265 270

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

275 280 285

Pro Glu Glu Gly Ile Leu Asp Ser Leu Asp His His His His His

290 295 300

His His

305

<210> 10

<211> 314

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 10

Ala Met Val Leu Leu Leu Tyr Ser Phe Ser Asp Ala Cys Glu Glu Pro

1 5 10 15

Pro Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu Ile Gly Lys Pro Lys Pro Tyr Tyr

20 25 30

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

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

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

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

 Pro Ala Ser Ser Ala Ser Gly Pro Arg Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Val

275

280

285

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

290

295

300

Leu Asp His His His His His His His

305

310

<210> 11

<211> 313

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 11

Ala Val Leu Leu Leu Tyr Ser Phe Ser Asp Ala Cys Glu Glu Pro Pro

1 5 10 15

Thr Phe Glu Ala Met Glu Leu Ile Gly Lys Pro Lys Pro Tyr Tyr Glu

20 25 30

Ile Gly Glu Arg Val Asp Tyr Lys Cys Lys Lys Gly Tyr Phe Tyr Ile

35 40 45

Pro Pro Leu Ala Thr His Thr Ile Cys Asp Arg Asn His Thr Trp Leu

50 55 60

Pro Val Ser Asp Asp Ala Cys Tyr Arg Glu Thr Cys Pro Tyr Ile Arg

65 70 75 80

Asp Pro Leu Asn Gly Gln Ala Val Pro Ala Asn Gly Thr Tyr Glu Phe

85 90 95

Gly Tyr Gln Met His Phe Ile Cys Asn Glu Gly Tyr Tyr Leu Ile Gly

100 105 110

Glu Glu Ile Leu Tyr Cys Glu Leu Lys Gly Ser Val Ala Ile Trp Ser

115 120 125

Gly Lys Pro Pro Ile Cys Glu Lys Val Leu Cys Thr Pro Pro Pro Lys

130 135 140

Ile Lys Asn Gly Lys His Thr Phe Ser Glu Val Glu Val Phe Glu Tyr

145	150	155	160
Leu Asp Ala Val Thr Tyr Ser Cys Asp Pro Ala Pro Gly Pro Asp Pro			
165	170	175	
Phe Ser Leu Ile Gly Glu Ser Thr Ile Tyr Cys Gly Asp Asn Ser Val			
180	185	190	
Trp Ser Arg Ala Ala Pro Glu Cys Lys Val Val Lys Cys Arg Phe Pro			
195	200	205	
Val Val Glu Asn Gly Lys Gln Ile Ser Gly Phe Gly Lys Lys Phe Tyr			
210	215	220	
Tyr Lys Ala Thr Val Met Phe Glu Cys Asp Lys Gly Phe Tyr Leu Asp			
225	230	235	240
Gly Ser Asp Thr Ile Val Cys Asp Ser Asn Ser Thr Trp Asp Pro Pro			
245	250	255	
Val Pro Lys Cys Leu Lys Val Ser Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser Pro			
260	265	270	
Ala Ser Ser Ala Ser Gly Pro Arg Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Val Ser			
275	280	285	
Asn Tyr Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Glu Glu Gly Ile Leu Asp Ser Leu			
290	295	300	
Asp His His His His His His His			
305	310		
<210> 12			
<211> 22			
<212> PRT			
<213>			
> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"			
<400> 12			
Cys Val Pro Lys Ser Leu Lys Val Ser Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser			
1	5	10	15
Pro Ala Ser Ser Ala Ser			

20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

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

1 5 10 15

Val Ser Asn Tyr Pro Gly

20

<210> 14

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 14

gagggttcagc tgcatcgatc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagtgg 60

tcctgcacag cttctggctt caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg 120

cctgaacagg gcctggagtg gatttggagg atttgatcctg cgaatggtaa tattaaat 180

gaccgcgaagt tccaggcaaa ggccactata acatcagaca catcctccaa cacagctac 240

ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tcacccctcc 300

tatgattacg acaggaacta tgctatggac tactgggtc aaggaacctc agtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 15

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His Pro Ser Tyr Asp Tyr Asp Arg Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 16

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 16

gacatcgtgc tgactcagtt tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtca	60
ttctcctgca gggcagtc a gacattggc acaagttac actggatca gcaaagaaca	120
aatggttctc caaggcttct catgaagttat gcttctgagt ctatctgg gatccctcc	180
aggttagtg gcagtggatc agggacatgt tttactctta gcatcaacag tgtggatct	240
gaagatattt cagatttata ctgtcaacaa agttatagct ggccgctcac gttcggtct	300

gggaccaagc tggagctgaa acgggct 327
 <210> 17
 <211>
 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 17
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Phe Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Met
 35 40 45

 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105
 <210> 18
 <211>
 > 387
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 18
 gaagtgcagc tggtgagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtcag cctctggatt cacttcagt gactattaca tgtattgggt tcgccagact	120
ccggaaaaga ggctggagtg ggctcgcaacc attagtatg gtggtaactta catttactat	180
ccagacagtg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac	240
ctgcaaatga gcagtcgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgt tagagatata	300

gactacgata ctagctatcc ctgggttgc tactggggcc aaggactct ggtcactgtc	360
---	-----

tctgcagcca aaacaacagc cccatcg	387
-------------------------------	-----

<210> 19

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Asp Ile Asp Tyr Asp Thr Ser Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Val

130

<210> 20

<211> 344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 20

gatatccaga	tgacacagac	tacatccccc	ctgtctgcct	ctctgggaga	cagagtacc	60
atcagttgca	gtgcaagtca	gggcattagc	aattatcaa	actggtatca	gcagaaacca	120
gatggaactg	ttaaactcct	gatctattac	acatcaagtt	tacactcagg	agtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagat	tattctctca	ccatcaacaa	cctggAACCT	240
gaagatattg	ccacttacta	ttgtcagcag	tatagtaagc	ttccgtggac	gttcgggtgga	300
ggcaccacaa	tggaaatcaa	acgggctgat	gctgcaccaa	ctgt		344

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 21

Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser

1 5 10 15

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser

20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu

65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ala Ala Pro Thr

115

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 22

gaggtcctgc tgcattcgtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatt	60
ccctgcagg ctctggata cacattcaact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc	120
catgaaaga gccttgatgt gattggagat attaattccta acaatggtgg tactttctac	180
aaccagaagt tcaaggcaaa ggccacattt actgtacaca agtcctccag cacagccttc	240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attattgtac aagatcaaag	300
---	-----

tatgataact atccctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggcac tgtctctgca	360
--	-----

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 24

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 24

gatatccaga tgacacagat tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcatttgc aactatttaa actggatca gcagaaacca 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180

aggttccgtg gcagtgggtc tgggacaaat tattctctca ccatcagcaa cctggAACCT 240

gaagatatttgc ccaattacta ttgtcagcag tatattaagc ttccgtggac gttcggtgga 300

ggcaccaaggc tgaaatcaa acgg 324

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 26

cagggtcagc tgcagcagtc tggaccttag ctggtaagc ctggggcttc agtgaagttg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactacgata taaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gacttgatgt gattggatgg atttaccta gagatggtag ttttaagtac 180

aatgagaagt tcaaggcCAA ggccacattg actgttagaca catcctccag cacagcgtac 240

atggacacctt acagcctgac atctgaggac tctgcggctt tttctgtgc agttcggag 300

gatggttacc cctggttcc ttactggggc caagggactc tggtaactgt ctctgca 357

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Phe Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Asp Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Phe Cys

85 90 95

Ala Val Ser Glu Asp Gly Tyr Pro Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 28

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 28

ggtatccaga	tgacacagac	aacatcctcc	ctgtctgcct	ctctgggaga	cagagtacc	60
atcagttgca	gtgcaagtca	gggcattagc	aactattaa	actggtatca	gcagaaacca	120
gatggaactg	ttaaactcct	gatctattac	acatcaagtt	tacactcagg	agtcccatca	180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggAACCT 240

gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatattaAGC ttccattcac gttcggtcg 300

gggacaaaat tgaaataaa acgg 324

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 29

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

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 30

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 30

caggtgcaac tgaaggagtc aggacctggc ctggggcgc cctcacagaa cctgtccatt	60
acctgcactg tctctgggtt ctcattaacc agctatgata taagctggat tcggcagcca	120
ccagggaaagg gctggagtg gcttggagta atatggactg atggaggcac aaattataat	180

tcagcttca tgtccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agtttctta	240
aaaatgaaca gtctgcaaac tcatgacaca gccatataatt actgtgtaa ggtctatgat	300
gtttatccct gtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca	354

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 31

Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser

1 5 10 15

Gln Asn Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser

20 25 30

Tyr Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Leu Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe

50 55 60

Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe

65 70 75 80

Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Val Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 32

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 32

gatatccaga tgacacagac tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtacc 60

atcagttgca gtgcaagtca gggcatttagc aattatcaa actggatca gcagaaacca 120
gatgaaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtgc cagttggc tggacagat tattctctca ccatcagcaa cctgaaacct 240
gaagatattgc ccaattacta ttgtcagcag tatattaagc ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggcaatcaa acgg 324

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala		
100	105	110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro		
115	120	
<210> 34		
<211> 336		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 34

cagatccagt tgggtgcagtc tggaccagaa ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcagg ctctctgtta tacttcaca gactattcaa tgcactgggt gaaggcaggct	120
ccagggaaagg gtttaaagtg gatgggcttg ataaacactg agactggtga gccagcatat	180
gcagatgact tcaggggacg gttagacttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctac	240
ttgcagatca acaacctcaa gaatgaggac acggctacat atttctgtgt taggtttgc	300
tactggggcc acgggactct ggtcactgtc tctgca	336

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 35

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

1	5	10
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30

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

35 40 45

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

<210> 36

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 36

gacattgtga tgcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact	60
atgagctgca aatccagtc aagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct	120
tggtaccaac agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactggc atctactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cacttcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg	339
--	-----

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 37

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 Leu 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 Thr 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 Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
Arg			

<210> 38

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 38

cagatccagt tggcgcagtc tggaccttag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcagg ctctggta tgccttcaca gactttcaa tgcactgggt gaaacaggct	120
ccagggaaagg gtttaaggtg gatgggctgg ataaacactg agactggtga gccaacat	180

gcagatgact tcaaggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca agaacctcaa aaatgaggac acggcaacat atttctgtgt taggtttgct	300
tactggggcc aaggactct ggtcacggtc tctgca	336

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 39

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Lys Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Val Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

100 105 110

<210> 40

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 40

gacatttgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaagggtcact 60

atgagactgca aatccagtca gagtctgctc aacagttagaa cccgaaagaa ctacttgct 120

tggtaccaggc agaaaccagg gcagtcctt aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctacc 240

atcagcagtgc tgccaggctga agacctggca gtttattact gcaaggaaatc ttataatctt 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaga 336

<210> 41

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 41

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 Leu 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 Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

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

100 105 110

<210> 42

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 42

cagggtccaaac tgcagcagcc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc gccttctgga taaactgggt gaaacagagg	120
cctggacaag gccttgagtg gatcgaaat atttacccctt ctgatagtt tactaactac	180
aatcaaaaact tcaaggacaa ggccacattg actgttagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca gcagccgcac atctgaggac tctgcgtct attactgtgc aagatccgat	300
tactacggta gtagctacta tgctctggac tactgggtc aaggaacctc agtaccgatc	360
tcctcagcc	369

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 43

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

1 5 10 15

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

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 44

gacattgtgg tgacccaatc tccagcctct ttggctgtgt ctctaggcga gagggccacc	60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgc aattatggca tttagtttat gaactggttc	120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcattccaa ccaaggatcc	180
ggggccctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggtcag acttcagcct caacatccat	240

cctatggagg aggtatgtcc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccattc	300
acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaacgg	336

<210> 45

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 45

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

	20	25	30
--	----	----	----

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35	40	45
----	----	----

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala

50	55	60
----	----	----

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Met Glu Glu Asp Asp Pro Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85	90	95
----	----	----

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

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

115 120

<210> 46

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 46

gagggtcctgc tgcacacagtc tggacacctgaa ctgggtgaagc ctggggcttc agtgaagatt 60

ccctgcaagg ctcttgata cacattcaact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgatgt gattggagat attaattccta acaatggtga tactttctac 180

aaccagaagt tcaaggccaa ggccacattt gactgtacaca agtccctccag cacagccttc 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtttctt attactgtac aagatcaaag 300

tatgataact atccctggtt tgcttactgg ggccaaaggga ctctggcac tgtctctgca 360

<210> 47

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 47

Glu Val Leu Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val His Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe		
65	70	75
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Thr Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val		
115	120	125
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr		
130	135	140
<210> 48		
<211> 324		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 48		
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtccac		60
atcagttgca gtgcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca		120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtccatca		180
agtttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggAACCT		240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatattaagc ttccgtggac gttcggtgga		300
ggcaccaagc tgaaatcaa acgg		324
<210> 49		
<211> 108		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"		

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 50

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 50

gagggtccagc tgcaacagtt tggagcttag ctggtaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcttgcaagg ctctggcta cacattcaact gactacaaca tggactgggt gaaacagagc 120

cctggaaaga gccttgagtg gattggagat attcatccta attatgatac ttctacctac 180

aaccagaagt tcaaggaaa ggcacattg actgttagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggaactcc gcagcctgac atctgaggac actgcgtct attactgtgc aagagaggtg 300

cgacgggtt acttcttga ctctgggc caaggcacca ctctcacagt ctcctca 357

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 51

Glu Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Asn Tyr Asp Thr Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Arg Gly Tyr Phe Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 52

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 52

gatgtgttga tgaccaggc tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaggattgtca catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaaggttc caaccgattt 180

tctgggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagattcac actcaagatc
 agcagagtgg aggctgagga tctggagtt tatttctgct ttcaagggttc acatgttccg
 ctcacgttcg gtgctggac caagctttag ctgaaacgg
 <210> 53

<211>

113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 53

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 54

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 54

caggccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtaaagc ctgggccttc agtggaaactg	60
tcctgccaga ctctggcta cacccacc accacttgga tgcactgggt aaaggcagg	120
cctggacaag gccttgatgt gatggagag attaatccca gcaacggctcg tactaactac	180
aatgagaagt tcaagaccaa ggccacactg actgttagaca aatcctccac cacagcctac	240
attcaactca acagcctgac atctgaagac tctgcggctt attactgtgc aagattgcgg	300

gattacggag ggtggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
---	-----

<210> 55

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 55

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
---	--

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Leu Ser Cys Gln Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
---	--

20	25	30
----	----	----

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
---	--

35	40	45
----	----	----

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
---	--

50	55	60
----	----	----

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr	
---	--

65	70	75	80
----	----	----	----

Ile Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
---	--

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Leu Arg Asp Tyr Gly Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
---	--

100	105	110
-----	-----	-----

Val Ser Ala

115

<210> 56

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 56

aacatgtta tgacccaatc tcccaaatcc gtgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
tttagctgca aggccagtga gaatgtgaat actttgtat cctggttca acagaaacca	120
gatcagtctc ctaaaactgct gatttacggg gcatccaacc ggtaccctgg ggtccccat	180

cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagaa ttcaactctga ccatcagcag tgttcaggct	240
gaagaccttg cagattatca ctgtggacag agttacagtt atccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tgaaataaa acgg	324

<210> 57

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 57

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Val Ser Met Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asn Thr Phe

20 25 30

Val Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 58

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 58

cagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gactactata taaactgggt gaaggcaggagg	120

cctggacagg gacttgatg gattggatgg atttacccgt gaagcgtaa tactaggtac	180
---	-----

aatgagaagt tcaaggcggcaa ggccacatttgc actgttagaca catcctccag cacagcctac	240
--	-----

atgcagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggctt atttctgtac aagatattac	300
---	-----

tacgttgttc ggtacgactg gtacttcgt gtctggcgctt ctaggaccac ggtcaccgtc	360
---	-----

tcctca	366
--------	-----

<210> 59

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 59

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Tyr Tyr Ala Gly Arg Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp

100 105 110

Gly Ala Arg Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 60

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 60

ggcatcaaga tgaccagtc tccatttcc atgtatgcat ctctggaga gagagtca	60
atcacttgca aggcgagtca ggacgttaat agctattaa gctggttcca gcagaaacca	120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagat	240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgtgagt ttccgtacac gttcggaggg	300

gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 61

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 61

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

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

100 105

<210> 62

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 62

gagatccagc tgcagcagac tggaccttag ctggtaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggta ttcattcaact gactccatca tgctctgggt gaaggcagac 120

catgaaaga gccttgaatg gattggaaat attaatcctt actatggtag tactacctac 180

aatctgaagt tcaaggcaaa ggccacattt actgttagaca aatcttccag cacagcctac 240

atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcgtct attactgtgc aagaggacta 300

cggggttacg gaggatactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctccca 360

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 63

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Thr Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser

20 25 30

Ile Met Leu Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Leu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Arg Gly Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 64

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 64

gtgatgaccc agtctccact ctctctgcct gtcaatattg gagatcaagc ctctatctct 60
tgcaagtctta ctaagagtct tctgaatagt gatggattca ctatttgga ctggtagctg 120

cagaagccag gccagtcctcc acagtccta atatattgg tttctaattcg attttctgga 180
 gttccagaca gttcagtgg cagtgggtca ggaacagatt tcacactcaa gatcagcaga 240
 gtggaggctg aggatttggg agtttattat tgcttcaga gtaactctt tccattcagc 300
 ttccggctcg ggacaaagtt ggaaataaaa cg 333

<210> 65

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 65

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

1 5 10 15

Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly

20 25 30

Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser Asn Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 66

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 66

gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgta ctgggtgaagc ctggggcttc agtgaggatg	60
tcctgttaagg ctctggata cacattcaact gactactata tgaactgggt gaagcagagc	120
catggaaaga gccttgagtg gattggagtt tttaatcctt acaacggtgg cactaactac	180
aaccagaagt tcaaggcCAA ggccacattg actgttgaca agtcctccag tacagcctac	240
atggagctca acggcctgac atctgaggac tctgcagctt attactgtgc cgatggttac	300
taacatgtttatc atgctatgga ctactgggtt caagggactt cactcaccgtt ctcctca	357

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 67

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20	25	30
----	----	----

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35	40	45
----	----	----

Gly Val Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Met Glu Leu Asn Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Asp Gly Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 68

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 68

gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtca	60
atcaacttgca aggcgagtca ggacattaa agctatttaa gctggttcca ccagaaacca	120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtt	240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgtatgact ttccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acgg	324

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 69

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe His Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Phe
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 70

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 70

cagatccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaagg ctctggcta caccttact gactactata taaactgggt gaagcagaag	120
cctggacagg gacttgatgt gattggatgg atttacccgtt gaagcgtta tactaagtac	180

aatgagaagt tcaaggccaa ggccacattt actgttagaca catcctccag cacagcctac	240
atgcagctca gcagcctgac atctgaagac actgctgtct atttctgtgc aagactggga	300
tatttctacg gtatgtttc ctggtaatcc gatgtctggg gcgcaggac cacggtaacc	360
gtctccctca	369

<210> 71

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 71

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 72

<211> 325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 72

gacatcaaga tgaccaggc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtca	60
atcacctgca aggcgagtca ggacattaat agctattcag gctgggttcca gcagaaacca	120
ggaaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaacagat tggtagatgg ggtccatca	180
aggttcagtgc cagtggtatc tggcaagat tattctctca gcatcagcag cctggagat	240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgtgagt ttccgtacac gttcgaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa acggg	325

<210> 73

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 73

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Thr

115 120

<210> 74

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 74

cagggtcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg ctctgacta caccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagaga 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag attttccta gaagtggcaa tacttactac 180

aatgagaagt tcaaggcCAA ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt atttctgtgc aaggggactg 300

ggaggtgcta tggactactg gggtaagga acctcagtc tcgtctcctc a 351

<210> 75

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 75

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Leu Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Ile Val Ser Ser

115

<210> 76

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 76

gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60

atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120

ttcctgcaga gcccaggcca gtctcctcag ctcctgatat atcgatgtc caacccgtcc 180

tcaggagtcc cagacagggtt cagtggcagt gggtcaggaa caacttcac actgagaatc 240

agtggagtgg aggctgagga tgtgggttt tattattgtt tgcaacatct agaatatccg 300

tgcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 77

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 77

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

1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 78

<211> 352

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 78

gatgtgcagc tgggggaggc tttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc	60
tcctgtgcagc cctctggatt cacttcagt agctttgaa tgcactgggt tcgtcaggt	120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg ccactagtgc catctactat	180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccacgaa caccctgttc	240
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaaagggg	300
aacaactactt tgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc ac	352

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 79

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Ala Thr Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val

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

100	105	110	
Leu Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 80			
<211> 318			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"			
<400> 80			
caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaagggtcacc			60
ttatcctgca gtgccacctc aagtgtact tacatgcact ggctccagca gaagccagga			120
tcctccccca aaccctggat ttatgcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc			180
ttccgtggca gtgggtctgg gacctttac tctctacaa tcagcagcat ggaggctgaa			240
gatgctgcca ctattactg ccagcagtat catagttacc caccgacgtt cggtggaggc			300
accaagctgg aaatcaa			318
<210> 81			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 81			
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met			
20	25	30	
His Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr			
35	40	45	
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Arg Gly Ser			

50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

85 90 95
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 82

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 82

gaggtgcagc tggggagtc tggggaggc ttatgtaaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agcttggca tgtctgggt tcgcccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgccagcc attaatagta atggtggtaa cacatactat	180

tcagacactg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgcggac actgccttgtt attactgtgc aagagtggtg	300
cacttcgatg tctggggcgc agggaccacg gtcaccgtct cctca	345

<210> 83

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 83

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Val Val His Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr		
100	105	110

Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 84

gctatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctggaga cagagtacc	60
---	----

atcagttgca gtgcaagtca ggacatttagc aattatcaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctttaac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
cggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cgtggAACCT	240
gaagatgttg ccacttacta ttgtcagcaa tatagtgagc ttccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggaaataaa ccgg	324

<210> 85

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 85

Ala Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg

100 105

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 86

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn

1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 87

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 88

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 89

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 90

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Asp

1 5

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 91
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 92
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 93
<211> 8
<212> PRT
<213>
> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 93
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Ser Ile
1 5

<210> 94
<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 94

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 95

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp

1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 96

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 97

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser

1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 98

Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly

1 5

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 99

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Phe Ser

1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 100

Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Phe Trp

1 5

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 101

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 102

Thr Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

1 5

<210> 103

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 103

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn

1 5

<210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 104

Ile His Pro Asn Tyr Asp Thr Ser

1 5

<210> 105

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 105

Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile

1 5

<210> 106

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 106

Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Ile

1 5

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 107

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 108

Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Phe

1 5

<210> 109

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 109

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr

1 5

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 110

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 111

Ile Asn Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr

1 5

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 112

Phe Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr

1 5

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 113

Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr

1 5

<210> 114

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 114

Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 115

<211> 8

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 115

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 116

Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 117

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 117

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 118

Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr

1 5

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 119

Ile Ser Ser Ala Thr Ser Ala Ile

1 5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 120

Ile Asn Ser Asn Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 121

Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 122

Ala Arg Glu Val Arg Arg Gly Tyr Phe Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 123

Ala His Pro Ser Tyr Asp Tyr Asp Arg Asn Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 124

Val Arg Asp Ile Asp Tyr Asp Thr Ser Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 125

Thr Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 126

Ala Val Ser Glu Val Gly His Pro Trp Phe Pro Tyr

1 5 10

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 127

Ala Arg Leu Arg Asp Tyr Gly Gly

1 5

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 128

Thr Arg Tyr Tyr Tyr Ala Gly Arg Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 129

Ala Arg Gly Leu Arg Gly Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 130

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 130

Ala Asp Gly Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 131

Val Arg Val Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 132

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

1 5 10 15

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 133

Val Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 134

Ala Arg Gly Leu Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 135

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 135

Val Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 136

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 137

Ala Arg Lys Gly Asn Asn Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 138

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 138

Ala Arg Val Val His Phe Asp Val

1 5

<210> 139

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 139

Thr Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 140

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 141

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 141

Gln Ser Ile Gly Thr Ser

1 5

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 142

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 143

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 143

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 144

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 144

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 145

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 145

Glu Asn Val Asn Thr Phe

1 5

<210> 146

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 146

Gln Asp Val Asn Ser Tyr

1 5

<210> 147

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 147

Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr

1 5 10

<210> 148

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 148

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

1 5

<210> 149

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 149

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 150

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 150

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

1 5

<210> 151

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 151

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

1 5 10

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 152

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 153

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

1 5 10

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 154

Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe

1 5 10

<210> 155

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 155

Ser Ser Val Thr Tyr

1 5

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 156

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 157

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 157

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 158

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 159

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 160

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 160

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 161

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 162

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 163

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 163

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Pro

1 5

<210> 164

<211

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 164

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 165

Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 166

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 166

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 167

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 167

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 168

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 168

Arg Thr Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 169

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 170

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 171

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 172

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 172

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 173

<211>

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 173

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 174

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 175

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 175

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 176

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 177

Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 178

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 179

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 179

Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 180

Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 181

Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 182

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 183

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 183

Phe Gln Ser Asn Ser Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 184

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 184

Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 185

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 185

Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 186

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 186

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 187

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 188

<211> 9

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 188

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Cys Thr

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 189

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 190

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 191

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 192

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 193

Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 194

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 194

Val Pro Lys Ser Leu Lys Val Ser Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser Pro

1 5 10 15

Ala Ser Ser Ala Ser

20

<210> 195

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 195

Ser Thr Ser Ser Thr Thr Lys Ser Pro Ala Ser Ser Ala Ser Gly Pro

1 5 10 15

Arg Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Val

20

<210> 196

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 196

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

1 5 10 15

Val Ser Asn Tyr Pro Gly

20

<210> 197

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 197

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

1 5 10 15

Glu Glu Gly Ile Leu Asp Ser Leu Asp

20 25

<210> 198

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 198

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc gtc agt agt tac 96

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

gac att agc tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg att 144

Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

ggg gtt atc tgg acc gat ggg ggc acc aac tac aac tcc gcc ttc atg 192

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met

50	55	60	
agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg			240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
aag ctg agc tct gtg acc gct gcg gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg			288
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
aga gtc tat gat ggt tat ccc tgg ttt gct tac tgg ggc cag ggc acc			336
Arg Val Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
ctg gtc acc gtc tcc tca			354
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 199			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 199			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Asp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met			
50	55	60	
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Val Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 200

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 200

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag ggc att agc aat tat 96

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

20 25 30

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144

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

35 40 45

tat tac aca tcc agt ttg cac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240

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

65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag tat att aag ctt ccg tgg 288

Glu Asp Phe A1a Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr I1e Lys Leu Pro Trp

85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cg 324

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu I1e Lys Arg

100 105

<210> 201

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 201

Asp I1e Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr I1e Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly I1e Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu I1e

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr I1e Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe A1a Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr I1e Lys Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu I1e Lys Arg

100 105

<210> 202

<

211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 202

cag gtt cag ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc gac tac 96

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

aac atg gac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

gga gat att aat cct aac aat ggt gat act ttc tac aac cag aag ttc 192

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

aag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg acg aca gcc tac 240

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

gcg aga tca aag tat gat aac tat ccc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 336

Ala Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct tcc 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 203

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 203

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Lys Tyr Asp Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 204

<211> 325

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (2)..(325)

<400> 204

g gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag gac att aac aat tat 97
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

 20 25 30
 tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 145
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat tac aca tcc agt ttg cac agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 193
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 241
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag tat att aag ctt ccg tgg 289
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ile Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 325

 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 205
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 205
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

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

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 206

His His His His His

1 5

<210> 207

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

8xHis tag"

<400> 207

His His His His His His His

1 5